

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Lukáš Vlk

Transgenerační účinek výživy na potomstvo apomiktických rostlin
Transgenerational effect of nutrient treatment on progeny of an apomitic plant

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. Mgr. Patrik Mráz, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

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

V Praze dne: 24. dubna 2017

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Patrikovi Mrázovi za pomoc, cenné rady, a hlavně velkou trpělivost při vzniku této práce. Dále bych chtěl poděkovat svým rodičům za podporu a své přítelkyni Terezce za to, že mi neustále pomáhala vyrovnávat se se všemi překážkami.

Abstrakt:

Environmentální podmínky mohou ovlivňovat epigenetickou variabilitu klonálních organismů. Tyto prostředím indukované změny se mohou potenciálně přenášet do dalších generací. Tato transgenerační paměť by teoreticky mohla umožnit klonálním (a zvláště apomiktickým) rostlinám částečně kompenzovat redukovanou genetickou variabilitu a mohla by tak přispívat k zvyšování adaptační schopnosti apomiktických populací. Podle modelu Millerovy rohatky asexuální organismy postupně hromadí nevýhodné mutace, což nakonec může vést až k jejich zániku. Případný transgenerační přenos by mohl tento jev částečně kompenzovat. Mohl by zároveň přispět k vysvětlení dlouhodobého přežívání asexuálních organismů v prostředí. Tato práce se zaměřuje na studium transgenerační paměti triploidních apomiktických populací druhu *Hieracium alpinum* se zcela absentující sexualitou, a tedy geneticky uniformním potomstvem. Transgenerační paměť u *Hieracium alpinum* jsme studovali na klonálních liniích, pocházejících z pěti populací (Norsko, Rakousko, Bosna a Hercegovina a Slovensko). Několik vegetativních a generativních znaků bylo měřeno v kultivačním experimentu I ve 3 ošetřeních (kontrola, kyselina salicylová a přidané živiny). Rostliny signifikantně reagovaly na ošetření přidanými živinami, ale ne kyselinou salicylovou (proto byla dále vyřazena z experimentů). Živiny zvyšovaly biomasu, počet listů a SLA (specifickou listovou plochu) a snižovaly LDMC (poměr sušiny listů). Mezi semeny rostlin z různých mateřských ošetření nebyly zjištěny rozdíly v hmotnosti ani početnosti na úbor. Částí semen bylo umožněno vyklíčit a část byla ošetřena demetylačním činidlem 5-azacytidinem. Mezi semeny z rostlin z různých mateřských ošetření nebyly rozdíly v klíčivosti, v rychlosti klíčení ani v indexu rychlosti klíčení. Tato semena pak byla použita v kultivačním experimentu II s designem mateřské ošetření × živiny. Vegetativní znaky semenáčků a poté i dospělých rostlin byly změřeny. Mateřské ošetření nemělo v použitých modelech nikdy statisticky významný vliv. Rostliny reagovaly na přidání živin v F1 generaci především skrze zvýšenou biomasu, méně pak skrze listové znaky SLA a LDMC. Aplikace 5-azacytidinu se naopak projevila především skrze tyto listové znaky. Triploidní apomiktické rostliny *Hieracium alpinum* tak pravděpodobně nedokáží přenést informaci o živinách z rodičů do potomků a reagují na změny živin jen skrze fenotypovou plasticitu. Vliv 5-azacytidinu na vegetativní znaky je v souladu se zdokumentovanými důsledky změn metylace DNA u jiných druhů. Ukazuje na důležitou roli metylace DNA v adaptacích rostlin.

Klíčová slova:

Hieracium alpinum, transgenerační efekt, epigenetická variabilita, fenotypová plasticita, evoluce asexuálních organismů, apimixie, živiny, kyselina salicylová

Abstract:

Environmental conditions can influence epigenetic variability of clonal organisms. These environmentally induced changes have potential to persist in following generations. In theory, this transgenerational memory could allow clonal (and especially apomictic) plants to partly compensate reduced genetic variability and could enhance adaptative ability of apomictic populations. According to Muller's ratchet model, asexual organisms amass deleterious mutations, which could lead to their extinction. Possible transgenerational memory could partly compensate for this. It could also account for longtime survivorship of asexual organisms in environment. This thesis deals with transgenerational memory of triploid apomictic populations of *Hieracium alpinum*, with completely missing sexuality and thus genetically uniform offspring. Transgenerational effect in *Hieracium alpinum* was studied on clonal lineages originated from 5 populations (Norway, Austria, Bosnia and Herzegovina and Slovakia). Seeds were planted in cultivation experiment I in 3 treatments (control, added nutrients, added salicylic acid) and vegetative and generative traits were measured. Plants responded to nutrient addition but not to salicylic acid. Treatment with nutrient addition increased biomass, number of leaves and SLA (specific leaf area) and lowered LDMC (leaf dry mass content). No significant differences in plants seed weight and yield per capitulum among different maternal environments were recorded. The seeds from treated plants were left to germinate and part of seeds was treated by demethylation agent 5-azacytidin. There were no differences in germination, germination rate and index of germination rate among the maternal treatments. The seeds were subsequently used in cultivation experiment II using maternal treatment \times nutrient design. Vegetative traits of seedlings and later on of adult plants were measured. Maternal environment had no significant effect on measured traits. Plants responded to nutrient addition in F1 generation through increased biomass, leaf traits SLA and LDMC reactions were weaker. On the contrary, plants responded to application of 5-azacytidin mainly through these leaf traits. Our results suggest that triploid apomictic plants of *Hieracium alpinum* are not able to transfer nutrient information to their offspring and their response to nutrients is mainly through fenotypic plasticity. The effect of 5-azacytidin was in accordance with other published consequences of DNA methylation changes in other species. This suggest that DNA methylation might play a key role in plant adaptations.

Keywords:

Hieracium alpinum, transgenerational effect, epigenetic variability, phenotypic plasticity, evolution of asexual organisms, apomixis, nutrients, salicylic acid

Obsah

1. Teoretická část.....	10
1.1 Úvod	10
1.2 Co je epigenetika?	10
1.2.1 Historický kontext.....	11
1.2.2 Epigenetické děje	11
1.2.3 Epigenetická dědičnost	11
1.2.4 Evoluční význam epigenetických dějů	12
1.2.5 Evoluční význam epigenetických dějů v kontextu asexuálních organismů.....	13
1.3 Epigenetika u rostlin.....	14
1.3.1 Konkrétní epigenetické studie v ekologii rostlin	14
1.4 Nejvýznamnější epigenetické mechanismy.....	16
1.4.1 Metylace DNA	16
1.4.2 Modifikace histonů	17
1.4.3 Malé interferující RNA molekuly (siRNA)	18
1.5 Vybrané metody studia epigenetických dějů.....	18
1.5.1 Bisulfidová modifikace	18
1.5.2 Metyl-senzitivní AFLP (dévkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů)	18
1.5.3 Metylovaná-DNA Imunoprecipitace.....	19
1.5.4 Analýza přístupnosti chromatinu a jeho konformace	19
1.6 Cíle práce	19
2. Metodika.....	21
2.1 Popis druhu	21
2.2 Zvolené populace.....	22
2.3 Rozložení průběhu práce	23
2.3 Kultivační experiment I.....	23
2.3.1 Vybrané měřené funkční vlastnosti v kultivačním experimentu	25
2.4 Hmotnost semen a velikost úboru	25
2.5 Klíčení semen v růstové komoře	26
2.6 Kultivační experiment II.....	27
2.7 Analýza dat	28
2.7.1 Vyhodnocení dat o klíčení	28
2.7.2 Vyhodnocení dat z kultivačního experimentu I a II.....	29
3. Výsledky.....	31
3.1 Kultivační experiment I.....	31

3.1.1	Modely fenotypové plasticity v kultivačním experimentu I	31
3.1.2	Výsledky funkčních vlastností v modelech	32
3.2	Individuální hmotnost semen a velikost úboru	38
3.2.1	Individuální hmotnost semen	38
3.2.2	Velikost úboru.....	39
3.3	Klíčení potomků rostlin z kultivačního experimentu I.....	40
3.3.1	Celková klíčivost	40
3.3.2	Klíčovost populace H33.....	41
3.3.3	Klíčovost populací H33, H42 a H99 v ošetření s přidanými živinami	41
3.3.4	Index rychlosti klíčení populace H33	42
3.3.5	Index rychlosti klíčení populací H33, H42 a H99 v mateřském ošetření N	43
3.3.6	Modely vysvětlující klíčivost.....	44
3.4	Kultivační experiment II.....	45
3.4.1	Modely transgenerační paměti z kultivačního experimentu II.....	45
3.4.2	Výsledky funkčních vlastností v modelech Kultivačního experimentu II.....	47
4.	Diskuze.....	54
4.1	Kultivační experiment I	54
4.1.1	Reakce rostlin na ošetření přidanými živinami.....	54
4.1.2	Reakce rostlin na ošetření aplikací kyseliny salicylové.....	56
4.1.3	Generativní znaky rostlin	56
4.2	Klíčení potomků rostlin z kultivačního experimentu I.....	58
4.3	Kultivační experiment II.....	60
4.3.1	Aplikace demetylačního činidla 5-azacytidinu	62
5.	Závěr.....	65
6.	Seznam citované literatury	66
7.	Seznam obrázků	76
8.	Seznam tabulek	77
9.	Přílohy	78

1. Teoretická část

1.1 Úvod

Předkládaná diplomová práce se zabývá možným transgeneračním přenosem informace o prostředí apomiktických mateřských rostlin do jejich potomků. Zaměřuje se hlavně na fenotypovou plasticitu rostlin pěstovaných v druhé generaci. Semena byla sebrána v přírodních populacích v roce 2014, následně v roce 2015 byla pěstována ve skleníku v rámci kultivačního experimentu I v různých podmínkách se snahou indukovat v rostlinách epigenetické změny. Semena těchto rostlin byla následně sebrána a vysazena v březnu 2016 v růstové komoře. Poté byly semenáčky z růstové komory přesunuty do skleníku, kde probíhal hlavní transgenerační experiment (kultivační experiment II). Hlavním těžištěm této práce je tedy zhodnocení kultivačního experimentu I především skrze změny funkčních vlastností rostlin (fenotypové reakce), zhodnocení klíčení jejich potomků v klíčovém experimentu a zhodnocení možného transgeneračního přenosu informace o prostředí z mateřských (apomikticky se rozmnožujících) rostlin do svých potomků v kultivačním experimentu II.

1.2 Co je epigenetika?

Mezi nejdůležitější otázky moderní ekologie patří procesy určující výskyt určitých druhů v různých ekosystémech, dynamiku jejich populací a jejich evoluční potenciál. Pro aplikovaný i teoretický výzkum těchto otázek je nezbytné, aby modely dědičnosti co nejpřesněji odrážely biologickou realitu a umožňovaly přesně předpovídat děje na úrovni jedinců, populací i společenstev. V posledních desetiletích se objevuje řada důkazů o neúplnosti stávajících modelů dědičnosti (Jablonka a Lamb 2002, Richards 2006). Určitým vysvětlením této neúplnosti může být historická zatíženost na genocentricky zaměřenou moderní evoluční syntézu a nedostatečnou reflexi epigenetických procesů v minulosti.

1.2.1 Historický kontext

Epigenetika má dlouhou historii v myšlení přírodních věd (Jablonka a Lamb 2002, Bonduriansky a Day 2009, Waddington 2012), ale až moderní molekulární metody umožnily její empirické a detailní zkoumání. Tento pojem v moderní době začal používat britský vývojový biolog Conrad Hal Waddington (Jablonka a Lamb 2002) a v jeho pojetí se epigenetika zaměřovala na interakce mezi geny během vývoje, stojící v pozadí genetiky (Diez et al. 2014). Nutno ovšem zmínit, že Waddingtonův koncept „epigenetické krajiny“ (znázornění kuliček jako osudů buněk, pohybujících se po krajině z různých vývojových cest) z moderního studia epigenetiky v podstatě zmizel (Stelmach a Nerlich 2015). Epigenetika byla co nejpřesněji formálně vymezena na setkání pořádaném Cold Spring Harbor Laboratory a Banbury Conference Center v prosinci 2008, kdy epigenetický znak byl definován jako „stabilně dědičný fenotyp, vyplývající ze změn v chromozomech beze změn v DNA sekvenci“ (převzato z Berger et al. 2009). Z toho vyplývá, že moderní pojem epigenetika se týká především modifikací struktury DNA a z toho odvozených rozdílů v jejím čtení. Jedná se spíše o doplnění stávajícího modelu dědičnosti (Jablonka a Lamb 2008, Schrey et al. 2012) a ne o jeho úplné zavržení (Pigliucci 2007).

1.2.2 Epigenetické děje

Epigenetickými ději rozumíme takové děje, při nichž nedochází ke změnám v primární struktuře DNA, ale díky epigenetické regulaci dochází k rozdílné expresi genů (Richards 2006, Verhoeven et al. 2010). Bez epigenetických mechanismů by nebyl možný vznik složitých a diferencovaných struktur v živých systémech. Příkladem může být diferenciaci různých buněčných linií a stejná exprese jejich genetické informace do dalších generací, jako je tomu např. u jaterních nebo nervových buněk (Jablonka a Lamb 2002). I přes to, že tyto buňky obsahují stejnou DNA informaci, je jejich projev ve fenotypu rozdílný díky různým úpravám čtení jejich shodného genomu. Tyto procesy probíhají v organismech na mnoha úrovních – od struktur menších než buňka, až po složité vzájemně se ovlivňující děje mezi komplexy buněk (Jablonka 2012).

1.2.3 Epigenetická dědičnost

V posledních letech se objevuje řada studií, upozorňujících na možný přenos těchto úprav DNA do dalších generací. Jedná se především o tzv. transgenerační přenos informace o prostředí rodičů do svých potomků (Grant-Downton a Dickinson 2005, Angers et al.

2010, Verhoeven et al. 2010, Verhoeven a Van Gurp 2012). Při takovém přenosu nedochází ke změnám primární sekvence DNA, ale k úpravám její struktury a s ní spojených proteinů a k jejich přenosu do dalších generací. Pro dědičnost je nutný i mechanismus přenosu epigenetických mechanismů skrze mitotické a meiotické dělení (Latzel a Klimešová 2010, Jablonka 2013, Takeda a Paszkowski 2006).

Přenos epigenetické informace z rodičů na potomky může být problematický zejména v případě sexuálního rozmnožování, kdy dochází ke vzniku zygoty a epigenetické modifikace mohou být resetovány (Feng et al. 2010). Naopak v případě mitosy dochází k přenosu epigenetických modifikací pravděpodobně v mnoha případech efektivněji (Jablonka a Raz 2009). Existuje ale řada případů, kdy se epigenetické modifikace udržují i po meiose v rámci sexuálního rozmnožování (Jablonka a Raz 2009). Brzy po vzniku embrya dochází k rozsáhlému odstraňování epigenetických značek (Richards 2006), ale např. v případě metylace DNA může být toto odstraňování značně nekompletní a epigenetická informace může přetrvávat v dalších generacích (Macleod et al. 1999). Experimentálně je zdokumentováno udržování těchto značek a jejich stabilní přenos skrze meiosu i mitosu, např. v případě teplotního režimu u *Arabidopsis thaliana* (Whittle et al. 2009). Epigenetické modifikace se liší od genetických změn hlavně svou nestabilitou a mohou s přibývajícimi generacemi i postupně mizet. Liší se i efektivita přenosu různých epigenetických modifikací. U rostlin navíc nedochází k oddělení zárodečné linie od somatických buněk a změny v meristematických buňkách tak mohou být přeneseny jak do rozmnožovacích, tak i vegetativních buněk (Jablonka 2012).

1.2.4 Evoluční význam epigenetických dějů

V kontextu dědičnosti epigenetických modifikací je hlavní otázkou vliv epigenetických modifikací na fitness zkoumaných organismů (Zhang et al. 2013) a s tím související role adaptace na prostředí a její rychlost (Boyko et al. 2010). Parentální efekty (jejichž součástí mohou být epigenetické změny) mohou být adaptivní, pokud je dosaženo zlepšení fitness potomků pomocí přenosu informace o prostředí rodičovského organismu (Mousseau a Fox 1998). Pokud epigenetické změny ovlivňují fitness organismů (skrze fenotypovou variabilitu), pak mohou podléhat přírodnímu výběru (Baulcombe a Dean 2014) a měnit tak evoluční potenciál zkoumaných organismů. V takovém případě je třeba doplnit konzervativní soustředěnost na postupnost nukleotidů a jejich mutačních změn zkoumáním evolučních důsledků epigenetických modifikací.

Organismy ve stresujících situacích (např. při hybridizaci, polyploidizaci, fyziologickém stresu nebo i při poklesu velikosti populace) podle moderních výzkumů dokážou reagovat rozsáhlými změnami na epigenetické, genetické i fenotypové úrovni a rychleji tak dosahovat výhodných adaptací (Rapp a Wendel 2005). Tento fakt může značně měnit dosavadní populační modely a to, co usuzujeme o evolučním potenciálu řady ohrožených organismů. Navíc má tento fakt konceptuálně blízko k alternativním teoriím k současně široce přijímané moderní evoluční syntéze - např. k tzv. teorii přerušovaných rovnovah, kladoucí důraz na krátká období náhlých a prudkých změn (Eldredge a Gould 1972), teoreticky v tomto případě vyvolaná výše zmíněnými stresy. Např. v případě hybridizace je totiž zdokumentováno, že v genomu dochází k rozsáhlým změnám metylačního vzorce genomu (Chen a Chen 2008). Metylace DNA přitom patří mezi hlavní epigenetické mechanismy.

1.2.5 Evoluční význam epigenetických dějů v kontextu asexuálních organismů

Podle teorie Mullerovy rohatky jsou asexuální organismy považovány v podstatě za slepé uličky evoluce (Lynch et al. 1993). Jsou odsouzeny hromadit škodlivé mutace a tento osud nemohou zvrátit (proto „rohatka“ v názvu modelu; Muller 1964) procesem rekombinace a segregace, podobně jako sexuálně se rozmnožující organismy. Jediným zdrojem variability jsou pak somatické mutace (Štorchová et al. 2002). Navzdory tomu jsou však asexuální organismy v přírodě hojně nalézány, dokáží osidlovat velké areály (Castonguay a Angers 2012, Verhoeven a Preite 2014) a především v nich dlouhodobě přežívat. Tento fakt je zvláště nápadný např. v případě pijavenek (třída Bdelloidea z kmene Rotifera), schopných existovat desítky milionů let bez sexuálního rozmnožování (Welch a Meselson 2000). Objevuje se zde tedy paradox, který se zčásti pokouší vysvětlit teorie univerzálního genotypu (tzv. General purpose genotype; Baker 1965). Tato teorie říká, že dlouhodobě přežívající asexuální linie jsou zpravidla generalisté, schopní osidlovat co největší množství ekologických nik (Lynch 1984).

Prostřednictvím tzv. epialel, epigenetických modifikací vznikajících interakcí genomu organismu s prostředím, by ale asexuální organismy mohly teoreticky získat chybějící variabilitu rychleji než vzácnými genetickými mutacemi (Castonguay a Angers 2012) a efektivněji tak čelit heterogennímu prostředí. To by bylo i v souladu s tím, že asexuální organismy rozmnožující se mitosou by nepodstupovaly tak silné epigenetické

resetování, jako je tomu při meiose (Feng et al. 2010, Baulcombe a Dean 2014). Tímto způsobem by teoreticky asexuální organismy mohly být schopné evoluce.

Epigenetická variabilita může přitom být buď náhodná, nebo přímo vyvolaná prostředím. Náhodná variabilita může vznikat např. zhoršenou funkcí enzymů udržujících epigenetické modifikace (Verhoeven a Preite 2014), např. následkem výše zmíněných stresů. Výsledkem by byla řada chyb (tzv. epimutací), které by pak mohly podléhat přírodnímu výběru (Castonguay a Angers 2012, Verhoeven a Preite 2014). U variability vyvolané prostředím je situace teoreticky výhodnější (výsledkem je totiž konkrétní fenotypová adaptace) a při výskytu stabilního systému epigenetické dědičnosti může takto být asexuální organismus teoreticky schopný poměrně rychlé a efektivní evoluce (Angers et al. 2010).

1.3 Epigenetika u rostlin

U rostlin jako sesilných organismů může mít transgenerační přenos informace z prostředí rodičů na potomky velký adaptivní význam. Pro rostliny je důležité pružně reagovat na prostředí větší fenotypovou plasticitou (Grossniklaus et al. 2013, Zhang et al. 2013, Baulcombe a Dean 2014). Zvláště pak v případě, že potomci rostou ve stejném prostředí, představuje takový přenos informace velkou výhodou. Obecně se to týká druhů, jejichž semena se nešíří na stejné vzdálenosti jako jejich pyl a jejich prostředí se nemění na stejné škále jako je vzdálenost dopadu jejich semen (Galloway 2005). Jejich potomci tak zažívají prostředí podobné matce, ale ne nutně otci (Galloway 2005, Latzel a Klimešová 2010). Tyto podmínky velká část druhů rostlin splňuje a transgenerační epigenetická dědičnost tak pro ně může být teoreticky adaptivní.

1.3.1 Konkrétní epigenetické studie v ekologii rostlin

Existuje celá řada případů transgeneračních efektů, kdy epigenetické děje nabízejí vysvětlení přenosu informace o prostředí rodičů do potomků. Např. vystavení různým teplotním režimům zvýšilo u *Arabidopsis thaliana* produkci semen až pětinašobně v F3 generaci (Whittle et al. 2009) a jednalo se přitom o inbrední linie z jedné rostliny (což mělo maximálně omezit genetickou variabilitu zkoumaných rostlin). Rostliny byly pěstovány v režimu 30 °C (mírně teplé ošetření) a 16 °C (chladné ošetření). Kvůli otázce, zda se

epigenetická paměť rodičovského prostředí udržuje i po více generací, byla teplotnímu stresu přitom vystavena rodičovská generace a generace F1, ale generace F2 zažila normální podmínky (Whittle et al. 2009). Zvýšení fitness u potomků v generaci F3 (ve stejném prostředí, kde se nacházely původní mateřské rostliny) bylo soustavné, i když potomci pocházeli z různých (inbredních) genetických linií a možnost vlivu genetické mutace je tak extrémně nepravděpodobná (Whittle et al. 2009).

Když byl druh *Mimulus guttatus* vystaven simulované herbivorii, zvýšila se u jeho potomků hustota trichomů na listech oproti normálu (Holeski 2007). V jiném herbivorním experimentu se díky simulované herbivorii (kyselinou jasmonovou) zvýšila u potomstva *Raphanus raphanistrum* hustota trichomů i koncentrace biochemických obranných látek a rostliny byly méně konzumovány housenkami *Pieris rapae* (Agrawal et al. 1999). U rostlin vystavených simulované herbivorii navíc došlo v některých případech i ke zvýšení fitness skrze počet produkovaných semen (Agrawal 2002).

V jiném experimentu byly apomiktické rostliny *Taraxacum officinale* vystaveny různým environmentálním stresům jako je nedostatek živin, aplikace kyseliny jasmonové a solný stres (Verhoeven a van Gurp 2012). Následkem toho došlo k metylačním změnám genomu a u potomků se projevíly změny v poměru biomasy podzemních a nadzemních částí, změny v morfologii listů (zkrácení délky u živinového stresu a zvýšení délky u solného stresu) a v koncentraci fosforu v pletivech stonků (Verhoeven a van Gurp 2012). Důležitým zjištěním byly i soustavné změny po aplikaci demetylačního činidla zebularinu (stabilnější ekvivalent 5-azacytidinu), ukazující na roli metylace DNA v celém procesu (Verhoeven a van Gurp 2012).

Příkladem adaptibilní epigenetické změny je např. experimentální vystavení rostlin druhu *Arabidopsis thaliana* patogenickému oomycetu *Hyaloperonospora arabidopsidis*, které způsobilo v dalších generacích zvýšení rezistence na tuto houbu (Luna et al. 2012). Dělo se tak ale jen u rostlin vystavených předtím bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Luna et al. 2012), při ději označovaném také jako priming, kdy je organismus vystaven určité hrozbě (např. patogenům nebo herbivorům) v menší míře a může reagovat při opětovné větší hrozbě (v tomto případě oomycetů) adekvátní odpovědí. Tento efekt byl přítomen i v další generaci a opět tak ukazuje na přenos pomocí epigenetických mechanismů, spíše než např. pouhým přenosem biochemických látek z matky (Luna et al. 2012).

Za zmínku stojí i případ maternálního efektu a jeho vysvětlení bez epigenetických mechanismů v experimentu s *Polygonum persicaria* a *P. hydropiper* (Sultan et al. 2009). Mateřské rostliny byly pěstovány v suchých a vlhkých podmínkách a v případě *P. persicaria* se efektivně přenášela informace z prostředí do potomků a umožňovala díky delšímu kořenovému systému lépe reagovat na sucho (Sultan et al. 2009). Výsledek tak částečně vysvětluje úspěch *P. persicaria* v lokalitách s různým vodním režimem oproti *P. hydropiper* (Sultan et al. 2009). Zajímavé je, že autoři výsledek zdůvodňují jen rozdílnou investicí do semen v různých podmínkách, což má podle nich u těchto druhů největší vliv na výsledné fenotypy (Sultan et al. 2009).

1.4 Nejvýznamnější epigenetické mechanismy

1.4.1 Metylace DNA

Metylace DNA je přítomna ve většině epigenetických dějů a je i nejvíce prozkoumaná a popisovaná (Angers et al. 2010, Boyko et al. 2010, Verhoeven et al. 2010). Ze všech epigenetických modifikací se tedy jeví jako nejčastější, ale pravděpodobně je pouze součástí většího komplexu dějů. Hraje úlohu v genovém imprintingu (Verhoeven et al. 2010), paramutaci (Walker 1998) a její výskyt v kódu DNA je silně korelován s umlčením genů a zastavením transkripce metylovaných úseků (Grant-Downton a Dickinson 2005).

Proces je založen na připojení metylové skupiny na pátý uhlík cytosinu (to platí hlavně pro rostliny, u jiných organismů to může být i jiný nukleotid) pomocí enzymů tzv. DNA metyltransferáz. Těch obecně u organismů existuje několik druhů: Dnmt1 zajišťuje hlavně přenesení stávajících míst metylace (Castonguay a Angers 2012), Dnmt3 se pak podílí na tvorbě nových míst metylace (Grant-Downton a Dickinson 2005) a funkce Dnmt2 dosud není uspokojivě vysvětlena. Konkrétně u rostlin vystupují homologní ekvivalent Dnmt1 s názvem MET1, dále pro rostliny specifická CMT3 a dvojice DRM1 a DRM2, zodpovídající za metylaci *de novo* (Chinnusamy a Zhu 2009).

Metylace DNA se vyskytuje hlavně v oblastech souvisejících s výskytem transposibilních elementů (Boyko et al. 2010, Diez et al. 2014). U rostlin je pak nalézána ve sledech nukleotidů CpG a CpNpG (Grant-Downton a Dickinson 2005), kde C je cytosin, G guanin, N je jakýkoliv nukleotid a p je zbytek kyseliny fosforečné. To je označováno

jako symetrická metylace a metylace na jiných místech cytosinu je označována jako asymetrická metylace – např. CpNpN (Grant-Downton a Dickinson 2005, Chinnusamy a Zhu 2009).

Důsledkem procesu metylace DNA je zpravidla přeskočení transkripce metylovaného úseku. Tyto geny jsou tedy umlčeny a neprojevují se ve fenotypu (Jablonka a Lamb 2002). Existuje řada příkladů tohoto jevu v přírodě, původně vysvětlovaných jako jakési podivné výjimky z pravidel mendelismu. Např. u známé pelorie květů *Linaria vulgaris* se ukázalo, že hlavním mechanismem je umlčení genu *CYCLOIDEA* prostřednictvím metylace DNA (Cubas et al. 1999, Paszkowski a Grossniklaus 2011).

1.4.2 Modifikace histonů

Výše zmíněný proces metylace DNA postihuje především primární strukturu DNA, na terciární strukturu DNA pak působí epigenetický mechanismus modifikace histonů. DNA se na nadšroubovicové úrovni organizuje do tzv. nukleozomů a činí tak prostřednictvím proteinů histonů. To, jestli daný úsek DNA přiléhá na histon, má přímý vliv na přístup enzymů i na to, zda může být tento úsek transkribován (Holeski et al. 2012). Histony vystupují ve 4 variantách (H3, H4, H2A a H2B), dohromady po dvojicích tvořící oktamer (Aalfs a Kingston 2000). Pokud je řetězec natěsno sbalen a nachází se ve formě chromatinu označované jako heterochromatin, tak zpravidla není transkribován. Takto vzniklé nukleozomy mají pak vliv na stav chromatinu, tzn., jestli je kondenzovaným a netranskribovaným heterochromatinem, nebo naopak rozvolněným a hojně přepisovaným euchromatinem (Grant-Downton a Dickinson 2005). Deacetylase histonů je potom spojena s tvorbou heterochromatinu, a tedy umlčováním částí DNA (Grant-Downton a Dickinson 2005, Chinnusamy a Zhu 2009). Je řízena histonovými deacetylázami, které mohou přímo reagovat na stres, nebo mohou být řízeny skrze činnost malých interferujících RNA molekul označovaných jako siRNA (Chinnusamy a Zhu 2009). Stejně tak je metylace zbytku aminokyseliny lysin na místě 9 na histonu H3 spojována s umlčováním genů (Kalisz a Purugganan 2004, Baulcombe a Dean 2014). V obou případech tak hraje roli interakce různých epigenetických mechanismů.

1.4.3 Malé interferující RNA molekuly (siRNA)

V rámci protivirové ochrany jsou schopny buňky rozpoznávat jednovláknové úseky RNA a syntetizovat k nim komplementární řetězec pomocí RNA-dependentní RNA polymerázy tak, aby vznikl dvouvláknový řetězec RNA (dsRNA; Baulcombe a Dean 2014). Pomocí enzymu dicer jsou pak tyto dsRNA rozděleny na tzv. malé interferující siRNA a ty se posléze účastní metylace vybraných úseků genomu (Baulcombe a Dean 2014). Malé interferující RNA molekuly se podílejí i na rekrutování histonových metyltransferáz a tímto procesem ovlivňují DNA i na vyšších úrovních její struktury (Grant-Downton a Dickinson 2006, Holoch a Moazed 2015).

Předpokládá se, že původní úlohou siRNA mohla být např. buněčná imunita proti činnosti transpozomů a s nimi související vyšší míře mutací (Diez et al. 2014). V současných výzkumech je zdokumentován podíl tohoto systému hlavně na odpovědích na vystavení stresu (Khraiwesh et al. 2012). Nutno podotknout, že činnost siRNA se neodehrává v izolaci, ale souvisí s metylací DNA, změnami chromatinu a dalšími epigenetickými procesy a tvoří tak spíše vysoce komplexní systém se složitou (a mezi organismy nejednotnou) hierarchií. Např. metylace DNA, řízená skrze aktivitu siRNA je vysoce přesná a postihuje jen konkrétní úseky (Bender 2004).

1.5 Vybrané metody studia epigenetických dějů

1.5.1 Bisulfidová modifikace

Tato metoda patří mezi nejznámější a nejrozšířenější způsoby zkoumání metylace DNA. Bisulfidovou reakcí je nahrazen nemetylovaný cytosin za uracil pomocí hydrogensířičitanu sodného (Sasaki et al. 2003). Dále je použita metoda PCR k vyšetření metylovaných a nemetylovaných úseků a jejich sekvenace. Je tak možné studovat vzorec metylace jednotlivých úseků genomu (Grant-Downton a Dickinson 2006).

1.5.2 Metyl-senzitivní AFLP (délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů)

Při použití této metody (zkracované jako MSAP) je rozpoznáván různý stav metylace anonymních úseků, kdy u metylace DNA je zkoumáno především pořadí CCGG isoschizomery *HpaII* a *MspI* (Cervera et al. 2002). DNA je rozdělena metyl-senzitivními restričními enzymy a opatřena tzv. adaptory, což jsou krátké úseky DNA o známé sekvenci (Yaish et al. 2014). Po amplifikaci následuje elektroforetická separace fragmentů

a jejich vizualizace. Celkový rozdíl v metylačním vzorci těchto úseků v rámci celého genomu je možné zjistit porovnáním vzorců získaných z MSAP a normálního AFLP, použitých na daném úseku DNA. „Normální“ AFLP na rozdíl od MSAP využívá izomery enzymů se stejným štěpným místem, ale tyto enzymy nejsou citlivé na přítomnost metylovaného cytosinu.

1.5.3 Metylovaná-DNA Imunoprecipitace

DNA je fragmentována a vysrážena s protilátkami specifickými na metylovaný cytosin (Chinnusamy a Zhu 2009). Posléze jsou přidány magnetické korálky obsahující druhou protilátku vázající se na tu první. DNA vázaná na tyto protilátky je pak separována od zbytku pomocí magnetu (Thu et al. 2010). Tuto metodu pak lze použít ke studiu různého metylačního stavu jednoho genu pomocí specifických primerů v následné PCR (Jacinto et al. 2008).

1.5.4 Analýza přístupnosti chromatinu a jeho konformace

Heterochromatin je pomocí nukleozomů natěsno sbalená forma chromatinu a jejich pozice má zásadní vliv na přístup transkripčního aparátu (Grant-Downton a Dickinson 2005, Herman a Sultan 2011). Tato metoda stojí na použití DNA nukleáz s přístupem k částem DNA, které nejsou přímo navinuté na histony a ty rozkládají. Chromatinové segmenty jsou síťovány formaldehydem a výsledný produkt je pak rozdělen restrikcčními enzymy (Dekker 2006). Na konci procesu vzniká tzv. 3C templát, složený z množství produktů ligace (činností DNA ligázy), z nichž každý poukazuje na interakci dvou fragmentů (Dekker 2006). Frekvence a identita těchto fragmentů je detekována pomocí PCR a skrze interakční frekvence se dá odhadovat stav chromatinu.

1.6 Cíle práce

Hlavním cílem práce je pokusit se zachytit možný vliv transgeneračního přenosu informace o prostředí (v tomto případě koncentrace živin mateřských rostlin) na klíčení klonálně (apomikticky) vzniklých potomků triploidních rostlin *Hieracium alpinum* a na vybrané funkční vlastnosti rostlin. Naše hypotéza je, že rostliny dokáží předat svým potomkům informaci o prostředí skrze nepohlavně vzniklá semena a takto předaná informace se projeví v klíčení a dalších funkčních vlastnostech. Jak bylo uvedeno výše,

taková prostředím indukovaná dědičná změna ve fenotypu by měla obrovský význam pro pochopení adaptability a evolučního potenciálu klonálních rostlin, jakými jsou i triploidní apomiktické rostliny *Hieracium alpinum*.

Hlavní otázky práce:

1. Dokážou rostliny druhu *Hieracium alpinum* odpovídat fenotypovou změnou na různé podmínky prostředí?
2. Dokážou rostliny druhu *Hieracium alpinum* reagovat prostřednictvím klíčení na různou úroveň živin v mateřském ošetření?
3. Dokážou rostliny druhu *Hieracium alpinum* prostřednictvím transgeneračního efektu ovlivnit fenotypové znaky svých potomků?

2. Metodika

2.1 Popis druhu

Hieracium alpinum L. (Asteraceae), jestřábník alpský, je arkticko-alpínský druh vyskytující se v pohořích střední (Alpy, Karpaty) a severní Evropy (Fennoskandinávie, Skotsko, severozápadní Rusko až po poloostrov Yamal), dále v arktických oblastech Islandu a Grónska (Mráz et al. 2009). Lodyha je až 25 cm vysoká s četnými hvězdicovitými chlupy (v horní části) a s 5 i více listy v přízemní růžici s četnými chlupy a 0-2 listy na lodyze. Vyskytuje se v tundrovém typu habitatu v nezapojené vegetaci a může sestupovat do smilkových luk. V České republice patří druh k silně ohroženým druhům (C2b) a vyskytuje se u nás místy v nejvyšších polohách v Krkonoších, Hrubém Jeseníku a vzácně v Jizerských horách (Chrtek 2004).

Ve volné přírodě se vyskytují dva cytotypy. Diploidní ($2n = 2x = 18$) populace se vyskytují jen v jižních a východních Karpatech (jen Ukrajina a Rumunsko) a triploidní ($2n = 3x = 27$) populace ve zbytku areálu (Mráz et al. 2009). Diploidní populace se rozmnožují striktně sexuálně, přičemž jedinci jsou striktně autoinkompatibilní, takže na úspěšnou tvorbu semen potřebují pyl jiné rostliny (Chrtek 1997). Na rozdíl od diploidů jsou triploidní populace považovány za obligátně apomiktické, což ukázaly kastrální experimenty (Chrtek 1997) a hlavně recentní diplomová práce Pavla Zdvořáka, který cytometricky analyzoval více jak 2532 semen ze 499 rostlin z triploidního areálu druhu a zjistil, že se zde nevyskytuje vůbec žádná sexualita (Zdvořák, nepublikováno). Navíc molekulární analýzy (isozymy a RAPD) zjistily nízkou (klonální) úroveň variability (Chrtek a Plačková 2005, Štorchová et al. 2002). Rozšíření druhu *Hieracium alpinum* je v Evropě výrazným příkladem geografické partenogeneze, podle níž nepohlavně se rozmnožující organismy jsou častější v extrémních ekosystémech. Zvláště patrná může být geografická partenogeneze ve velikosti areálů asexuálních organismů v dříve zaledněných oblastech oproti velikosti areálů jejich sexuálních příbuzných (Cosendai et al. 2013), jako je tomu i v případě *Hieracium alpinum* (Mráz et al. 2009).

Apomiktické linie rodu *Hieracium* se rozmnožují asexuálně mechanismem diplosporie typu *Antennaria*, kdy dochází k nahrazení samičí meiosis mitotickým dělením (Bergman 1941, Skawińska 1963, Chrtek et al. 2004). Jelikož zde absentuje redukční

dělení, rekombinace při tvorbě gamet a syngamie, vzniklé potomstvo je genetickou kopií mateřské rostliny, tzn. je jejím klonem. Důležité je i to, že pro vývoj endospermu není nutná přítomnost pylu (Chrtek et al. 2004). Mráz et al. (2009) zjistili, že co se týče produkce pylu, triploidní rostliny jsou zpravidla úplně sterilní, zřídka tvoří málo velikostně heterogenního pylu (zřejmě v důsledku poruch samčí meiosy).

2.2 Zvolené populace

Pro studium transgeneračního efektu byla v roce 2015 vybrána semena, nasbíraná v roce 2014 v pěti triploidních apomiktických populacích (viz tab. 1). Způsob rozmnožování, stejně jako i ploidie potomstva byla ověřena průtokovou cytometrií semen (Zdvořák, nepublikováno). Přesná lokalizace a charakteristika populací je uvedena v tab. 1.

Tabulka 1 - Charakteristiky triploidních asexuálně se rozmnožujících populací druhu *Hieracium alpinum*, ze kterých byla použita semena k transgeneračnímu pokusu.

Kód populace	země, lokalita	nadmořská výška	datum sběru	zeměpisné souřadnice
H20	Rakousko, Tirol, Defereggengebirge,	2359 m. n. m.	22. 8. 2014	46.89N, 12.37E
H33	Slovensko, Nízké Tatry, Chopok	1961 m. n. m.	10. 8. 2014	48.94N, 19.32E
H42	Slovensko, Nízké Tatry, Kráľova hoľa	1931 m. n. m.	9. 8. 2014	48.89N, 20.13E
H87	Bosna a Hercegovina, Vranica planina	2040 m. n. m.	5. 8. 2014	43.96N, 17.74E
H99	Norsko, Mo i Rana, Hellerfjellet	871 m. n. m.	25. 8. 2014	66.19N, 14.53E

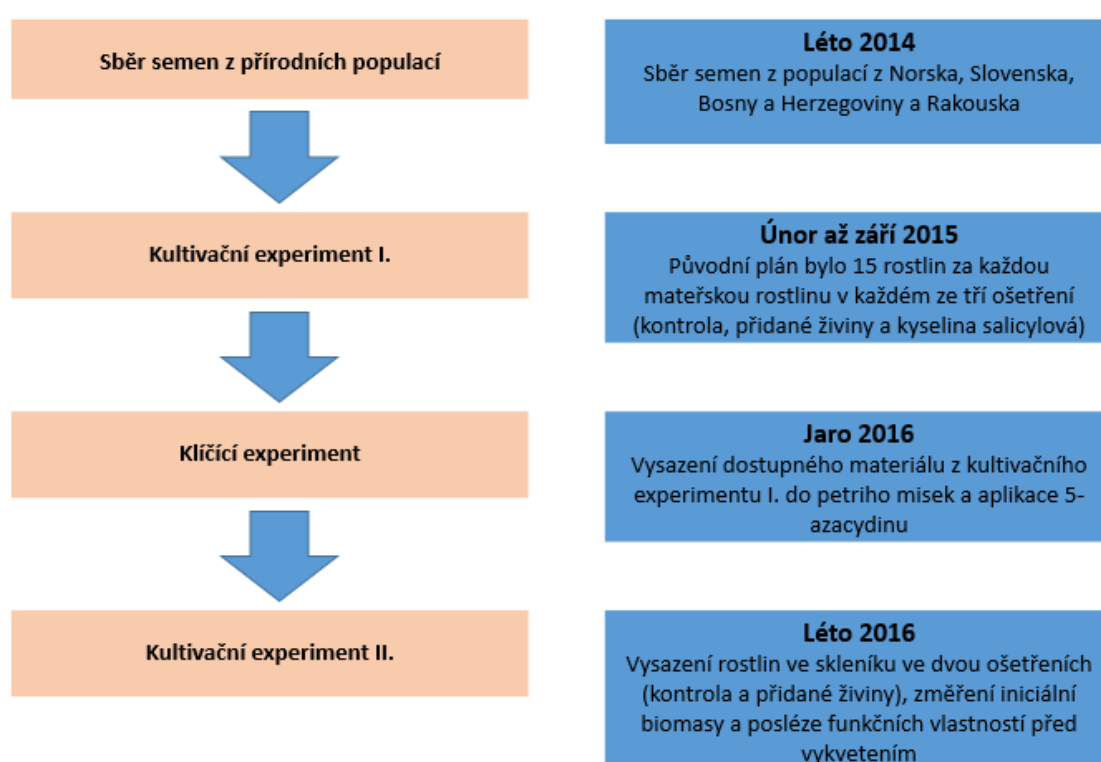
Semena těchto populací byla sbírána v terénu mezi 5. a 25. 8. 2014 pro následující experimenty v rámci projektu GAČR 14-02858S, zaměřeného na studium geografické partenogeneze. Po sesbírání byla semena nejdříve uložena 4-6 týdnů v pokojové teplotě a poté přesunuta do lednice s teplotou 4°C.

Kultivační experiment I probíhal ve skleníku Botanického ústavu AV ČR v Průhoncích v roce 2015 (únor-září). V pokusu se vyselo 48 dobrých semen z každé z třech náhodně vybraných rostlin za populaci (za populaci se sbírala semena z 30 rostlin) do sadbovačů (o rozměrech 2 × 2 × 4 cm) se substrátem ve složení: rašelina : zahradnický substrát : křemičitý písek = 4 : 2 : 1. Protože mateřské rostliny nebyly genotypovány a na lokalitě se může vyskytovat i více klonů (Mráz et al., nepublikováno), mateřské rostliny mohou představovat samostatné klony.

2.3 Rozložení průběhu práce

Pro větší přehlednost bylo vytvořeno grafické znázornění průběhu celé práce (viz obr. 1). Autor sám prováděl klíčící experiment a kultivační experiment II. Kultivační experiment I, z něhož byl získán materiál pro kultivační experiment II, pak autor statisticky vyhodnotil.

Obrázek 1 - Grafické znázornění průběhu diplomové práce.



2.3 Kultivační experiment I

Po vyklíčení rostlin v sadbovačích proběhlo vysazení rostlin 3. dubna 2015 do květináčů o průměru 10 cm a objemu 0,38 l půdy se složením: rašelina : zahradnický substrát : křemičitý písek = 4 : 2 : 1. Rozbor půdy ukázal, že hodnota pH je 5,63, obsah dusíku 0,3 % a obsah uhlíku 10,45 %. Rostliny byly pěstovány ve skleníku Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích–Chotobuzi. Původně bylo plánováno získat 15 rostlin (potomků z jedné mateřské rostliny) tak, aby bylo po 5 rostlinách (opakováních) na každé ošetření. Ne vždy se však podařilo získat dostatečný počet rostlin. Např. populace H99 z

důvodů dormance semen celkově slabě a pozdě klíčila, následně pěstované rostliny pomalu rostly i málo kvetly a podařilo se při pokusu získat potomstvo pouze ze dvou mateřských rostlin (99-100 a 99-3h).

Semenáčky byly přesunuty do květináčů v průběhu jednoho dne 16. května. Po aklimatizaci byla dne 8. června změřena iniciální biomasa, vypočtená jako: počet listů v růžici $\times \frac{\text{délka nejdelšího listu}}{2} \times \frac{\text{šířka nejdelšího listu}}{2} \times \pi$. Vzorec bere v úvahu eliptický tvar listů. Iniciální biomasa dobře koreluje se skutečnou biomasou rostlin *H. alpinum* (Spearmanův test, $r = 0,8$, $n = 20$; M. Hartmann, nepublikováno). Iniciální biomasa byla použita jako kovariáta ve statistických modelech k zjištění toho, nakolik počáteční rozdíly ve velikosti rostlin mohou mít vliv na odpověď rostlin na jejich ošetření. Finální biomasa byla pak spočítána ve výsledcích stejným způsobem, jako je uvedeno výše.

Rostliny po změření iniciální biomasy byly následně pěstovány ve třech různých ošetřeních. Část v kontrolní půdě, část s přidanými živinami prostřednictvím tyčinkového hnojiva (výrobce Floria, „Univerzální tyčinkové hnojivo s guánem“; poměr živin: dusík : fosfor : draslík = 10 : 5 : 6) a část v kontrolní půdě s postřikem kyselinou salicylovou (jednou týdně). Kyselina salicylová byla použita jako umělá indukce herbivorního stresu a rostlinných patogenů (Delaney 1997, Latzel et al. 2012). Dvakrát bylo v průběhu celého experimentu aplikováno ve vodě rozpustné hnojivo (Krystal Gold, poměr živin: dusík : fosfor : draslík = 19 : 6 : 20) a to na všechny rostliny.

Vegetativní části rostlin byly dvakrát změřeny, jednou na začátku (18. května 2015) a poté na konci experimentu (24. června 2015). První měření představovalo iniciální biomasu a druhé měření finální biomasu, ta byla změřena před vykvetením první rostliny. V obou případech byly měřeny následující znaky: počet listů v růžici (delších než 3 mm), délka nejdelšího listu, šířka nejdelšího listu, počet bočních (akcesorických) růžic. Při druhém měření se zjišťovala také specifická listová plocha (SLA, plocha listu v $\text{cm}^2/\text{sušina listu v mg}$) a poměr sušiny a čerstvé hmotnosti listu (LDMC) na nejdelším listu. Dále se u rostlin, které vykvetly, zaznamenával i počet dnů do začátku kvetení, datum kvetení, počet stonků, výška stonku (pokud jich bylo více, tak prvního, resp. nejvyššího) a počet květů na úbor.

Postupně byla sbírána semena u vykvetlých rostlin, vložena do papírových sáčků a uskladněna nejdříve po dobu 6 až 8 dnů při pokojové teplotě a následně v chladničce při 4°C . Celý experiment byl ukončen po sběru posledních semen na konci září 2015. Na tomto

místě je nutno poznamenat, že celé této první části (sběr v terénu a následný kultivační experiment, až na vážení semen) se autor práce neúčastnil, ale statisticky zpracoval výsledky tohoto pokusu. Vzhledem k malému počtu opakování pro jednotlivé mateřské rostliny byla pro statistické zhodnocení zvolena jako porovnávací jednotka populace. Přičemž je předpokládáno, že se buď v krajním případě jedná o jeden klon, nebo že lokální adaptace bude silnější než efekt genotypu (klonu).

2.3.1 Vybrané měřené funkční vlastnosti v kultivačním experimentu

LDMC (Leaf dry matter content – poměr sušiny listu): udává hodnotu poměru hmotnosti usušených listů a hmotnosti čerstvě odříznutých listů. Vyjadřuje tak hustotu pletiva a také to, jak je rostlina adaptována na poškození např. herbivorií (Cornelissen et al. 2003).

SLA (Specific leaf area – specifická listová plocha): SLA je poměr plochy jedné strany listu a váhy jeho sušiny (Cornelissen et al. 2003). Udává se v cm² na mg, případně také m² na kg. Hodnoty SLA vykazují změny podle dostupnosti živin v ekosystému a souvisí tedy s tím, jak s nimi rostlina dokáže hospodařit (Garnier a Navas 2012). Nižší hodnoty jsou typické pro stresované rostliny často limitované např. množstvím živin nebo vody (Lavorel et al. 2007). Vyšší hodnoty se mohou objevovat u rychle rostoucích rostlin, které nejsou limitované živinami (Cornelissen et al. 2003).

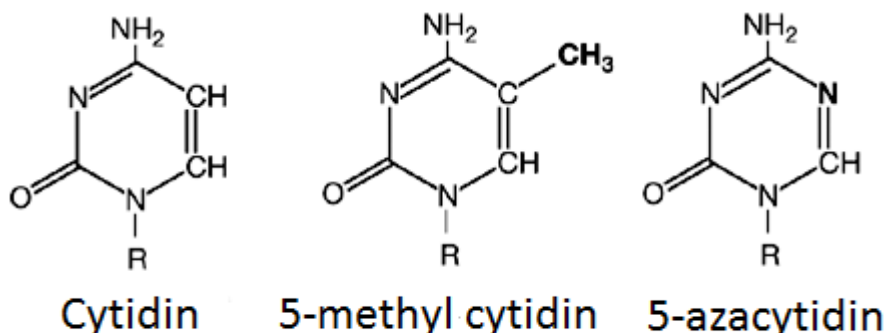
2.4 Hmotnost semen a velikost úboru

Semena rostlin z kultivačního experimentu byla nejdříve spočítána a rozdělena do 3 kategorií podle plnosti endospermu. V první kategorii byla zařazena tvrdá (plná) semena s výraznou tmavou barvou (SK1). V druhé kategorii byla zařazena semena s měkčím endospermem (SK2), ale tvořící mezistupeň k třetí kategorii. Tam byla zařazena měkká (prázdňá), zjevně sterilní semena se světlou barvou (SK3). Zvážena pak byla jen semena první kategorie (SK1) a byla určena jejich celková váha (TSM). Individuální hmotnost semene (ISM) byla vypočtena jako $ISM = \frac{TSM}{SK1}$. Dále byl změřen počet květů v úboru sečtením semen všech tří kategorií (všech semen za úbor) a tato hodnota tak představuje velikost úboru.

2.5 Klíčení semen v růstové komoře

Pro klíčící experiment byla zvolena jen semena z rostlin populací: H20, H33, H42 a H99. Bylo tak učiněno z toho důvodu, že v semenech populace H87 nebylo dostatečné pokrytí všech požadovaných ošetření mateřských rostlin. Tato mateřská ošetření jsou označena následujícím způsobem: N = zvýšená koncentrace živin, K = kontrola, NA = zvýšená koncentrace živin a přidání 5-azacytidinu při klíčení a KA = kontrola a přidání 5-azacytidinu při klíčení. 5-azacytidin je demetylační činidlo, jehož přítomnost vede k snížené metylaci DNA (Jones 1985) a narušuje případnou epigenetickou paměť odstraněním metylovaných úseků a reaktivací umlčených genů (Lee a Chen 2001). Děje se tak nahrazením 5' uhlíku atomem dusíku, jehož přítomnost zabráňuje připojení metylové skupiny, a tak inhibuje činnost metyltransferáz (Zagris a Podimatas 1994; viz Obr. 2).

Obrázek 2 - Grafické znázornění molekuly cytidinu, 5-methyl cytidinu a 5-azacytidinu. Dusík na třetím obrázku už nemůže vázat metylovou skupinu a je tak zabráněno následné metylaci cytidinu, pokud je zabudován do molekuly DNA (převzato a upraveno z Fenaux 2005).



Semena vybraných rostlin byla 11. března 2016 vyseta do skleněných petriho misek o průměru 10 cm (v každé misce semena jednoho klonu z mateřské rostliny z konkrétního ošetření. Např. tedy „99-3h-3 N“, kdy 99 je označení populace, 3h je označení mateřské rostliny (klonu), 3 je označení potomka daného klonu z kultivačního pokusu I a N označení původního (mateřského) ošetření v kultivačním experimentu I. Semena byla rovnoměrně rozložena na filtrační papír a byly přidány 3 ml vody. Po celou dobu trvání pokusu bylo toto původní množství udržováno ve všech miskách a misky byly v růstové komoře čtyřikrát randomizovány. Semen bylo rozloženo vždy 100 na misku, pouze v několika případech bylo dáno méně semen z důvodu limitace materiálem z kultivačního pokusu I.

Misky byly pak umístěny do růstové komory při režimu 12 hodin 10 °C (noc) a 12 hodin 20 °C (den). Zpočátku probíhalo počítání vyklíčených semen denně a od 27. 3. maximálně obden. Do misek se symboly NA a KA byl od 16. 3. do 25. 3. přidán desetkrát 5-azacytidin v koncentraci 50 µM (Vergeer et al. 2012) každý po sobě jdoucí den a každý den byl odstraňován 5-azacytidin z předchozího dne z misek pipetou. 5-azacytidin se v roztocích rychle rozpadá (Yaish et al. 2014) a kdyby se roztok pravidelně nevyměňoval, tak by se jeho koncentrace snižovala. Pokus byl ukončen 29. dubna 2016.

Tabulka 2 - Počty dostupných ošetření (misek v růstové komoře) z vybraných triploidních apomiktických populací *Hieracium alpinum* (miska představuje vždy potomstvo jedné mateřské rostliny; uvedená ošetření jsou mateřská ošetření z kultivačního experimentu I: K = kontrolní ošetření, N = zvýšená koncentrace živin, KA = kontrolní ošetření a 5-azacytidin a NA = zvýšená koncentrace živin a 5-azacytidin).

Ošetření	Populace			
	H20	H33	H42	H99
K	2	5	1	1
N	1	6	8	3
KA	0	5	1	1
NA	0	4	5	1
Celkem	3	20	15	6

2.6 Kultivační experiment II

Semenáčky z klíčího experimentu I byly vysazeny do sadbovačů o velikosti jamek 2 × 2 × 4 cm vyplněných substrátem ve složení: rašelina : zahradnický substrát : křemičitý písek = 4 : 2 : 1. První vysazení proběhlo 29. 3. 2016 a druhé 16. 4. 2016 tak, aby reflektovala dva vrcholy v klíčení semen. Ve skleníku byla v jarních měsících stálá denní teplota okolo 20 °C a noční 10 °C, ale postupně se měnila podle venkovní teploty s letním oteplováním.

Následně byly v průběhu jednoho dne 22. 5. 2016 všechny rostliny přesazeny ze sadbovačů do květináčů o průměru 10 cm a objemu 0,38 l s půdou se stejným složením, jako je uvedeno výše. Provedení bylo tedy úplně stejné, jako v kultivačním experimentu I v Průhonicích v roce 2015. Rostliny byly po dobu experimentu zalévány podle potřeby.

Design experimentu je zobrazen na obr. 3. Potomci rostlin z mateřských ošetření N a K byly pěstovány v obou ošetřeních. Experiment byl pravidelně několikrát v průběhu randomizován.

Obrázek 3 - Experimentální design kultivačního experimentu II s F1 potomky triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* (uváděno je mateřské ošetření z kultivačního experimentu I a současné ošetření potomků v kultivačním experimentu II; K = kontrola, N = ošetření s přidanými živinami, 5-azaC = 5-azacytidin)

Mateřské ošetření K Ošetření potomka - K	Mateřské ošetření K Ošetření potomka - N	Mateřské ošetření K Ošetření potomka - K (+ 5-azaC)	Mateřské ošetření K Ošetření potomka - N (+ 5-azaC)
Mateřské ošetření N Ošetření potomka - K	Mateřské ošetření N Ošetření potomka - N	Mateřské ošetření N Ošetření potomka - K (+ 5-azaC)	Mateřské ošetření N Ošetření potomka - N (+ 5-azaC)

Měření iniciální biomasy bylo provedeno 8. 6. 2016 a byly měřeny tyto vlastnosti: délka nejdelšího listu, šířka nejdelšího listu a celkový počet listů v přízemní růžici. Finální biomasa, délka nejdelšího listu, šířka nejdelšího listu a celkový počet listů v přízemní růžici byly pak změřeny 28. 7. 2016. Ve dnech 11. 6. 2016 a 29. 6. 2016 pak byly do květináčů s ošetřením N aplikovány tyčinky se živinami (stejně jako v kultivačním experimentu I na mateřských rostlinách). Tyčinky byly aplikovány vždy po půl tyčince do květináče. V průběhu experimentu bylo na všechny rostliny zároveň třikrát aplikováno hnojivo Krystal Gold – 11. 6. 2016, 29. 6. 2016 a 7. 7. 2016, tedy stejně jako v předchozím kultivačním experimentu I, a to hlavně kvůli stimulaci kvetení.

2.7 Analýza dat

2.7.1 Vyhodnocení dat o klíčení

Pro jednotlivé misky (v každé misce semena jednoho ošetření z jedné mateřské rostliny) byly vytvořeny kumulativní křivky klíčení, a ty byly následně srovnávány pomocí boxplotů a rozdílů mezi nimi hodnoceny na základě ANOVA a Tukey HSD testu pro nalezení rozdílů mezi skupinami (ošetření a populace). Kromě procenta vyklíčených semen

byla použita ještě hodnota indexu rychlosti klíčení (GRI; Al-Mudaris 1998). Index rychlosti klíčení (Germination rate index = GRI) odráží procento klíčení v každém dni po celou dobu trvání experimentu a čím je GRI vyšší, tím byla větší rychlost klíčení. Vzorec je: $GRI = \frac{G_1}{1} + \frac{G_2}{2} + \frac{G_x}{x}$. G_1 , G_2 , G_x označují procento vyklíčených semen v daný den. Dále byly spočítány i následující indexy: průměrná doba klíčení, první den klíčení, koeficient rychlosti klíčení, poslední den klíčení, časové rozložení klíčení (Al-Mudaris 1998) a logaritmus poměru vyklíčených semen a celkového množství semen. Ve výsledcích však nejsou uváděny, protože se v nich neprojevily téměř žádné rozdíly.

Vzhledem ke značnému omezení materiálem (viz tab. 2) se však nemohla srovnávat všechna data. Bylo proto nutno provést jen částečné srovnání tam, kde se nacházely 3 a více misky na ošetření. Srovnávána byla tedy všechna ošetření populace H33 (kde bylo opakování dost) a ošetření N mezi populacemi H33, H42 a H99.

K statistickému vyhodnocení dat byl použit program R 3.2.3. (R Development Core Team 2015). Naší hypotézou bylo, že rostliny z ošetření s přidanými živinami budou klíčit dříve a více než semena z kontrolního ošetření. Zároveň by tento efekt neměl být přítomen u semen vystavených působení demetylačního činidla 5-azacytidinu, který by měl případné epigenetické adaptace skrze hypometylací DNA narušovat (Yaish et al. 2014).

2.7.2 Vyhodnocení dat z kultivačního experimentu I a II

Pro vyhodnocení dat ve všech částech práce byly vytvořeny obecné lineární modely a zobecněné lineární modely (GLM). U obecných i zobecněných lineárních modelů byla testována normalita residuálů pomocí Shapiro-Wilkova testu normality a Q-Q plotů. V případě SLA, LDMC, iniciální biomasy, finální biomasy a počtu listů bylo nutno použít logaritmickou transformaci tak, aby bylo splněno kritérium normality rozdělení residuálů modelu.

Pomocí modelů byly testovány v kultivačním experimentu I efekty populace, ošetření a iniciální biomasy na vybrané funkční vlastnosti. Iniciální biomasa byla použita v modelech jako kovariáta. Výsledky modelů jsou shrnuty v tabulkách 3 a 4. V kultivačním experimentu II byly testovány vlivy mateřského ošetření, ošetření F1 potomků, 5-azacytidinu a iniciální biomasy na fenotypové vlastnosti jednotlivých populací a (tam, kde to bylo možné testovat) mateřských rostlin. Výsledky modelů jsou shrnuty v tabulkách 7,

8 a 9. Ve výsledcích obou kultivačních experimentů jsou uváděny F statistiky, stupně volnosti a statistická signifikance.

3. Výsledky

3.1 Kultivační experiment I

V této části jsou zpracovány reakce rostlin na tři ošetření v kultivačním experimentu I, který probíhal v roce 2015 v Průhonicích.

3.1.1 Modely fenotypové plasticity v kultivačním experimentu I

Tabulka 3 - Výsledky lineárních modelů testujících efekt zvýšené koncentrace živin (N) a aplikace kyseliny salicylové (S) na triploidní apomiktické rostliny *Hieracium alpinum* pocházející z pěti populací. Testovány jsou efekty ošetření, populace a jejich interakce. Iniciální biomasa byla použita jako kovariáta. Uvedeny jsou hodnoty F, spodní index označuje stupně volnosti, znaménka signifikance: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Šipky označují směr změny v daném ošetření (nahoru znamená zvýšení a dolů znamená snížení hodnot dané vlastnosti). Vždy je uvedeno srovnávané ošetření (např. N versus K).

Závislá proměnná/ faktory	SLA	LDMC	Finální biomasa	Počet listů	Pravděpodobnost kvetení
N versus K					
Transformace	log	log	log	log	
Ošetření	14,898 ₁ ***↑	10,239 ₁ **↓	196,064 ₁ ***↑	47,529 ₁ ***↑	34,471 ₁ ***↑
Populace	1,483 ₄	4,124 ₄ **	21,138 ₄ ***	14,695 ₄ ***	0,787 ₄
Populace × ošetření	1,518 ₄	3,74 ₄ **	2,631 ₄ *	1,607 ₄	1,400 ₄
Iniciální biomasa	0,597 ₁	0,656 ₁	1,439 ₁	6,812 ₁ *↑	5,997 ₁ *↑
RSV	66	66	66	66	66
Typ testu	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	GLM
S versus K					
Transformace	log	log	log	log	
Ošetření	1,322 ₁	0,017 ₁	0,079 ₁	0,749 ₁	0,087 ₁
Populace	6,408 ₄ ***	12,424 ₄ ***	25,292 ₄ ***	28,435 ₄ ***	6,307 ₄ ***
Populace × ošetření	0,732 ₄	0,683 ₄	1,009 ₄	0,176 ₄	1,062 ₄
Iniciální biomasa	0,620 ₁	0,126 ₁	2,039 ₁ *	25,535 ₁ ***↑	4,402 ₁ *↑
RSV	75	75	75	75	75
Typ testu	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	GLM

Závislá proměnná/ faktory	Výška vykvetlých stonků	Počet dnů do kvetení
Ošetření N		
Transformace	log	log
Populace	5,392 ₄ **	10,621 ₄ ***
Iniciální biomasa	1,075 ₁	2,578 ₁
RVS	26	26
Typ testu	ANOVA	ANOVA

Tabulka 4 - Výsledek lineárního modelu testujícího efekt pěti populací na výšku a počet dnů do kvetení vykvetlých apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* v ošetření N. Uvedeny jsou hodnoty F a stupně volnosti (malé indexy). Iniciální biomasa byla použita jako kovariáta. Znaménka signifikance: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.1.2 Výsledky funkčních vlastností v modelech

Modely fenotypové plasticity a pravděpodobnost kvetení byly rozděleny na dvě části. V první části bylo srovnáváno ošetření N (přidané živiny) a kontrola a v druhé části ošetření S (ošetření kyselinou salicylovou) a kontrola. Modely generativních znaků (výška vykvetlých rostlin a pravděpodobnost kvetení) byly omezeny jen na ošetření s přidanými živinami. U těchto dvou modelů mohly být srovnány pouze rostliny z ošetření s přidanými živinami, protože v ostatních dvou ošetřeních nevykvetl dostatek rostlin pro statistickou analýzu.

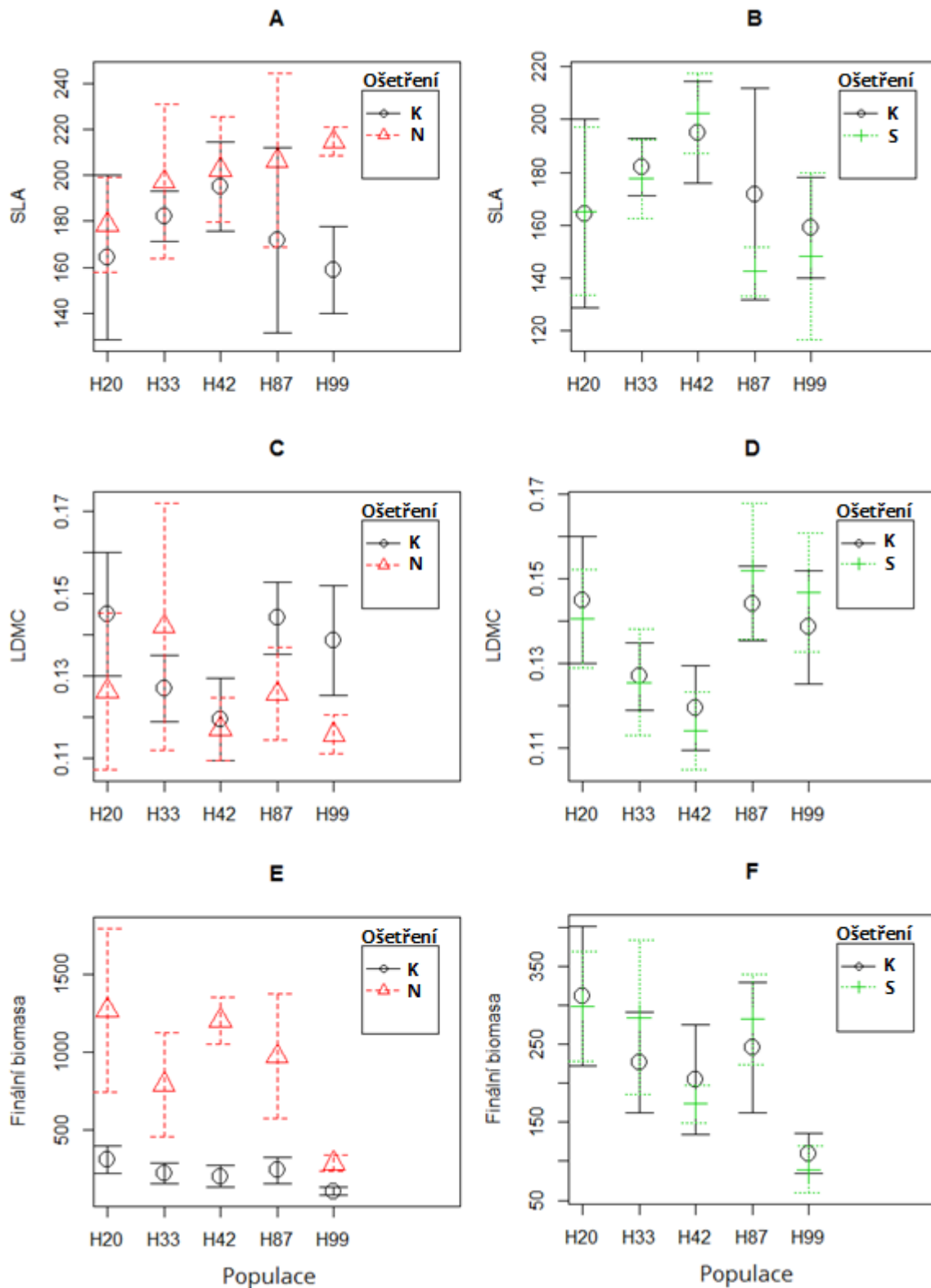
Při srovnání ošetření s přidanými živinami a kontrolních rostlin je nápadný statisticky významný vliv ošetření na všechny testované vlastnosti (viz tab. 3). Naopak při srovnání rostlin ošetřených kyselinou salicylovou a kontroly je nápadný statisticky signifikantní vliv populace u všech měřených fenotypových znaků. Při srovnání kontrolních rostlin a rostlin ošetřených živinami byla v některých případech signifikantní i populace (LDMC, finální biomasa a počet listů) a interakce ošetření a populace (LDMC a finální biomasa). Iniciální biomasa, použitá v modelech jako kovariáta, měla signifikantní vliv jen u některých vlastností (počet listů a pravděpodobnost kvetení u srovnání rostlin z ošetření N a K a finální biomasa, počet listů a pravděpodobnost kvetení u srovnání rostlin z ošetření S a K).

Ošetření přidanými živinami zvyšovalo u všech testovaných populací **specifickou listovou plochu (SLA)**, jak je vidět na obr. 4-A, ale jen u populace H99 byl tento rozdíl statisticky významný (Tukey HSD test, $p < 0,05$). Při srovnání rostlin z ošetření kyselinou salicylovou a kontrolou je nápadná rozdílná reakce rostlin různých populací (signifikantní vliv populace v modelech). SLA nebyla ovlivněna aplikací kyseliny salicylové (viz obr. 4-B).

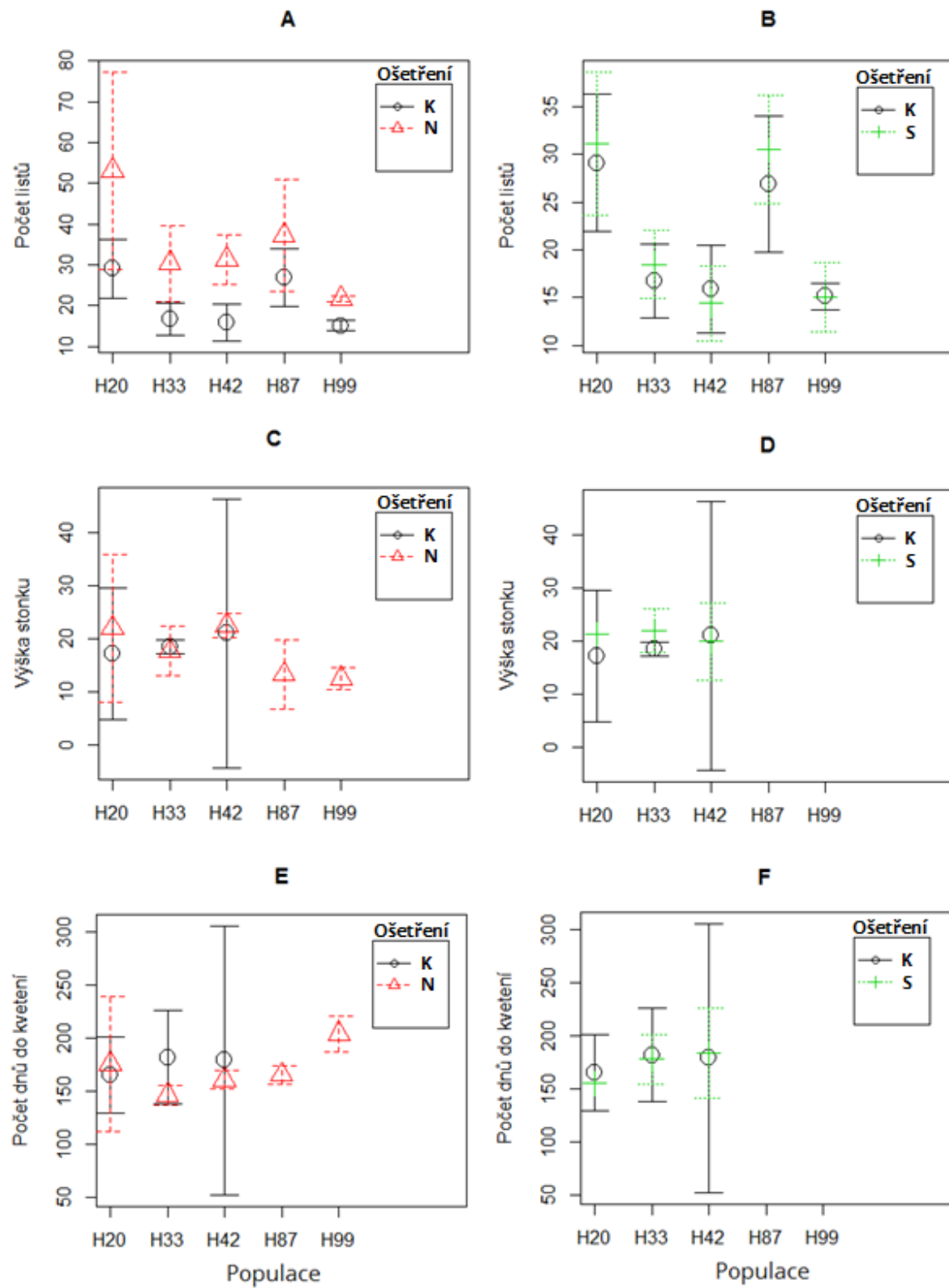
Obsah sušiny v listech (LDMC) byl u rostlin snižován přidáním živin s jedinou výjimkou populace H33, kdy měly rostliny z ošetření N vyšší hodnoty než kontrola (viz obr. 4-C). Rozdíly mezi ošetřeními nebyly v jednotlivých populacích ani v jednom případě statisticky významné (Tukey HSD test, $p > 0,05$). V modelu se projevil jako statisticky signifikantní i vliv populace a interakce populace a ošetření. Různé populace tedy reagovaly na ošetření různým způsobem. Na obrázku 4-C je patrné, že populace H42 na ošetření přidanými živinami skrze tento znak v podstatě nereagovala. Při srovnání rostlin z

ošetření S a kontroly je vidět, že rozdíly mezi ošetřeními jsou minimální, liší se opět pouze průměry populací (viz obr. 4-D).

Obrázek 4 - Grafy srovnávající populační průměry měřených znaků mezi pěti triploidními apomiktickými populacemi *Hieracium alpinum* podle ošetření (K = kontrolní, N = zvýšená koncentrace živin a S = kyselina salicylová; na vodorovné ose jsou zobrazené zkratky populací; značky vyjadřují průměrné hodnoty a vertikální čáry ukazují konfidenční intervaly). SLA je specifická listová plocha (cm^2/g), LDMC je obsah sušiny v listech (poměr sušina/čerstvá biomasa), finální biomasa uváděna v arbitrárních jednotkách.



Obrázek 5 - Grafy srovnávající průměry měřených znaků mezi pěti triploidními apomiktickými populacemi *Hieracium alpinum* podle ošetření (K = kontrolní, N = zvýšená koncentrace živin a S = kyselina salicylová; na vodorovné ose jsou zobrazené zkratky populací; značky vyjadřují průměrné hodnoty a vertikální čáry ukazují konfidenční intervaly). Výška stonků je uváděna v cm.

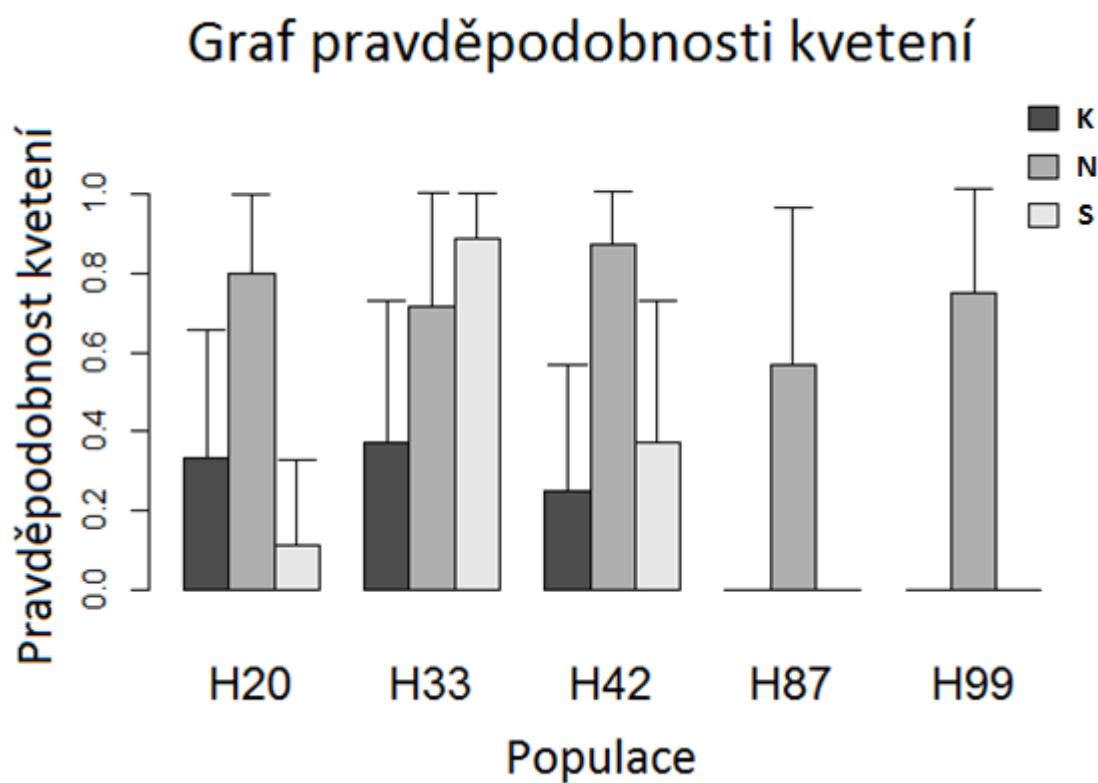


Přidání živin zvýšilo **finální biomasu** u všech populací (viz obr. 4-E). I v tomto případě byl signifikantní vliv ošetření, populace i interakce populace a ošetření (viz tab. 3). Populace reagovaly na ošetření živinami různě výrazným zvýšením biomasy. Tyto rozdíly byly statisticky signifikantní u všech populací kromě H99 (Tukey HSD test, $p < 0,05$). Rostliny nereagovaly na aplikaci kyseliny salicylové skrze biomasu, pouze se lišily průměry jednotlivých populací (viz obr. 4-F). Populace H99 ze Skandinávie měla obecně ze všech populací ve všech ošetřeních nejnižší biomasu (viz obr. 4-E, F).

Přidání živin způsobilo zvýšení **počtu listů** (viz obr. 5-A). V modelu se jako statisticky významný projevil i vliv populace (ale ne interakce populace a ošetření) a iniciální biomasy (viz tab. 3). Signifikantní rozdíly byly nalezeny v populacích H20 a H42. Oproti tomu byly rozdíly mezi ošetřeními kyselinou salicylovou a kontrolou minimální, lišily se pouze průměry jednotlivých populací (viz obr. 5-B). Nápadný zde byl velký vliv iniciální biomasy v modelu (viz tab. 3).

V případě **pravděpodobnosti vykvetení** byl vytvořen generalizovaný lineární model s binomickým rozdělením (s funkcí link). Projevil se zde stejný trend, jako ve výše zmíněných znacích. V případě srovnání rostlin s přidanými živinami a kontrolou byl statisticky významný vliv ošetření a v případě srovnání rostlin z ošetření kyselinou salicylovou a kontrolou se jako statisticky signifikantní projevil vliv populace (viz tab. 3). V obou případech se také projevil vliv iniciální biomasy v modelu jako významný. Nejvíce rostlin vykvetlo v ošetření N a to vždy alespoň 50 % rostlin (viz obr. 6). Rostliny z ošetření S měly pravděpodobnost vykvetení vyšší než 50 % pouze v případě populace H33. Kontrolních rostlin v žádném z ošetření nevykvetlo více než 50 %. V případě populací H87 a H99 pak vykvetly jen rostliny z ošetření s přidanými živinami. Nápadná je i zvýšená pravděpodobnost vykvetení v ošetření kyselinou salicylovou u populace H33.

Obrázek 6 - Graf pravděpodobnosti kvetení triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* v pěti populacích a třech ošetřeních (K = kontrolní ošetření, N = ošetření s přidanými živinami a S = ošetření s kyselinou salicylovou; na vodorovné ose jsou zobrazené zkratky populací; vertikální čáry vyznačují konfidenční intervaly)



Další dva generativní znaky byly testovány pomocí modelů jen v ošetření s přidanými živinami, protože ve zbylých dvou ošetřeních nevykvetl dostatek rostlin. Na obrázcích jsou nicméně zobrazeny i průměry v obou netestovaných ošetřeních pro populace H20, H33 a H42 (viz obr 5-C, D, E a F).

Ve **výšce vykvetlých rostlin** v ošetření N se projevil statisticky významně vliv populace (viz tab. 4). Nápadné je to v případě populace H99 a H87 (jen v ošetření N), kdy vykvetlé rostliny byly o něco menší než u ostatních populací (viz obr. 5-C).

V případě **počtu dnů do kvetení** v ošetření N se projevil jako významný vliv populace (viz tab. 4). U populace H99 je nápadná delší doba potřebná k vykvetení, než u zbývajících populací (viz obr. 5-E). Populace H99 se významně odlišuje od H33, H42 a H87, ale ne od populace H20 (Tukey HSD test, $p < 0,05$).

3.2 Individuální hmotnost semen a velikost úboru

3.2.1 Individuální hmotnost semen

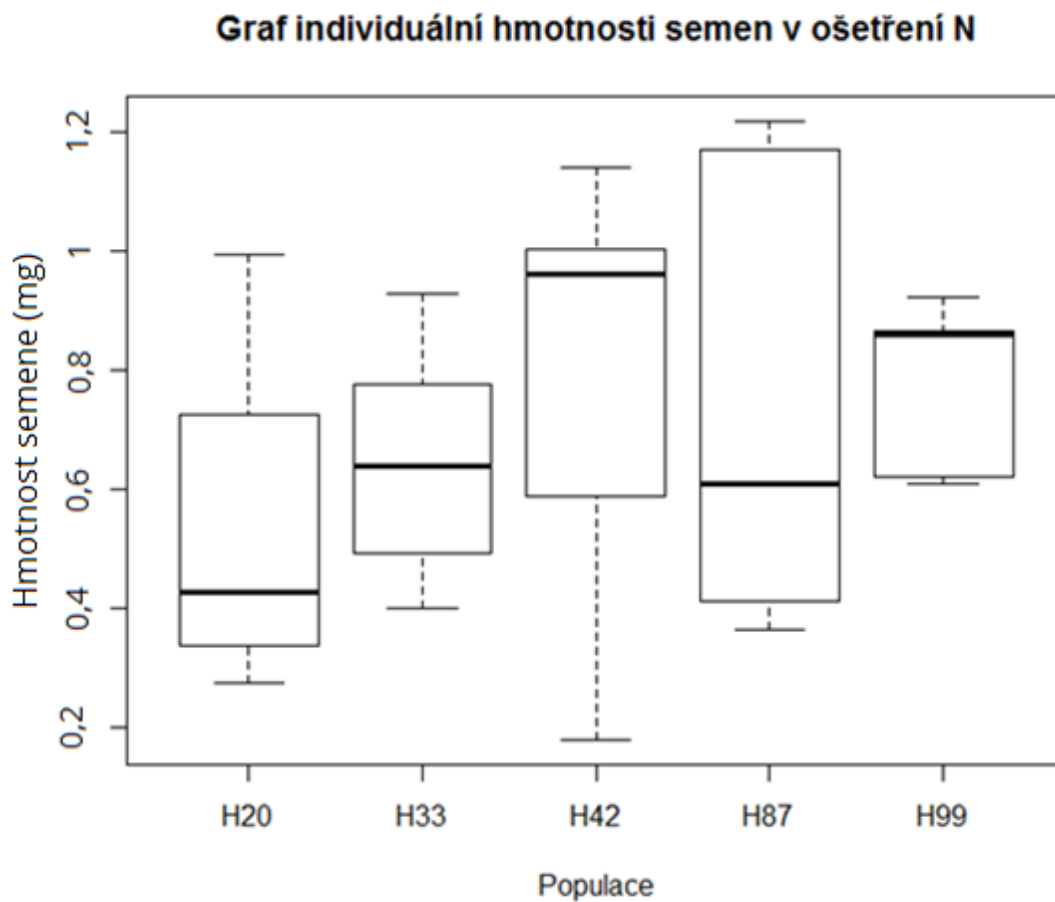
Celkové srovnání individuální hmotnosti semen je znázorněno v tab. 5. Z tabulky je patrné, že v kontrole a v ošetření kyselinou salicylovou nevykvetlo dostatečné množství rostlin pro srovnávání všech ošetření.

Tabulka 3 - Počty vykvetlých triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* z pěti populací v jednotlivých ošetřeních (K = kontrolní, N = zvýšená koncentrace živin, S = kyselina salicylová) v kultivačním experimentu I. Uváděn je počet vykvetlých rostlin z celkového počtu rostlin, které byly v dané populaci a ošetření k dispozici.

Ošetření	Populace				
	H20	H33	H42	H87	H99
K	4/9	5/9	1/7	0/9	0/8
N	4/9	7/8	5/7	5/10	5/8
S	1/9	7/9	2/8	0/10	0/8
Celkem	9/27	19/26	8/22	5/29	5/24

Pro zhodnocení individuální hmotnosti semen byla použita ANOVA a Tukey HSD test ($p > 0,05$). Vzhledem k nedostatku opakování v kontrole a ošetření kyselinou salicylovou bylo v analýze variance použito jen ošetření s přidanými živinami (viz obr. 7). Mezi populacemi nebyl v ošetření s přidanými živinami signifikantní rozdíl (ANOVA a Tukey HSD test, $p > 0,05$).

Obrázek 7 - Boxplot hmotnosti semene v pěti populacích triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* v ošetření s přidanými živinami (tlustá čára označuje medián).

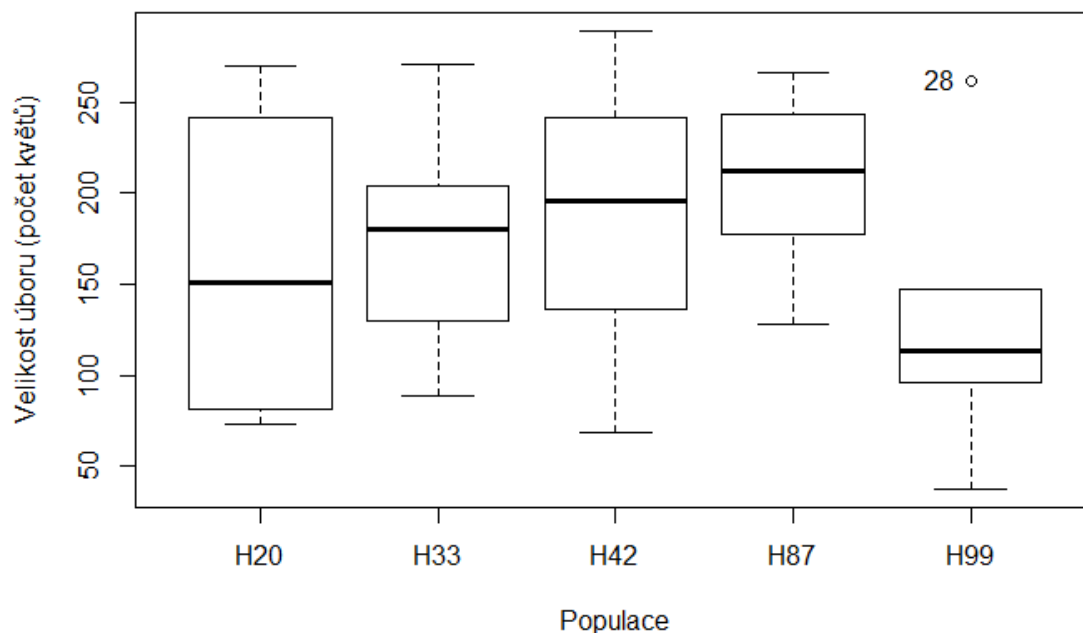


3.2.2 Velikost úboru

Stejně jako u individuální hmotnosti semen byly u velikosti úboru také srovnávány jen rostliny z ošetření s přidanými živinami z důvodu nedostatku opakování v ošetřeních K a S (viz obr. 8). Mezi populacemi v ošetření N nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly (ANOVA a Tukey HSD test, $p > 0,05$).

Obrázek 8 - Boxplot velikosti úboru (počtu květů na úbor) u pěti triploidních apomiktických populací druhu *Hieracium alpinum* v ošetření se zvýšenou koncentrací živin (tlusté čáry označují medián).

Graf velikosti úboru (měřeno jako počet květů na úbor) v ošetření N



3.3 Klíčení potomků rostlin z kultivačního experimentu I

3.3.1 Celková klíčivost

Počty dostupných opakování (misek) jsou uvedeny v tab. 6. Je patrné, že klíčení nelze srovnávat celkově ve všech skupinách (nevykvetlo na to dost rostlin v kultivačním experimentu I) a bylo tak nutno dále přistoupit k vytvoření dvou podvýběrů – srovnání populace H33 ve všech mateřských ošetřeních a populací H33, H42 a H99 v mateřském ošetření s přidanými živinami.

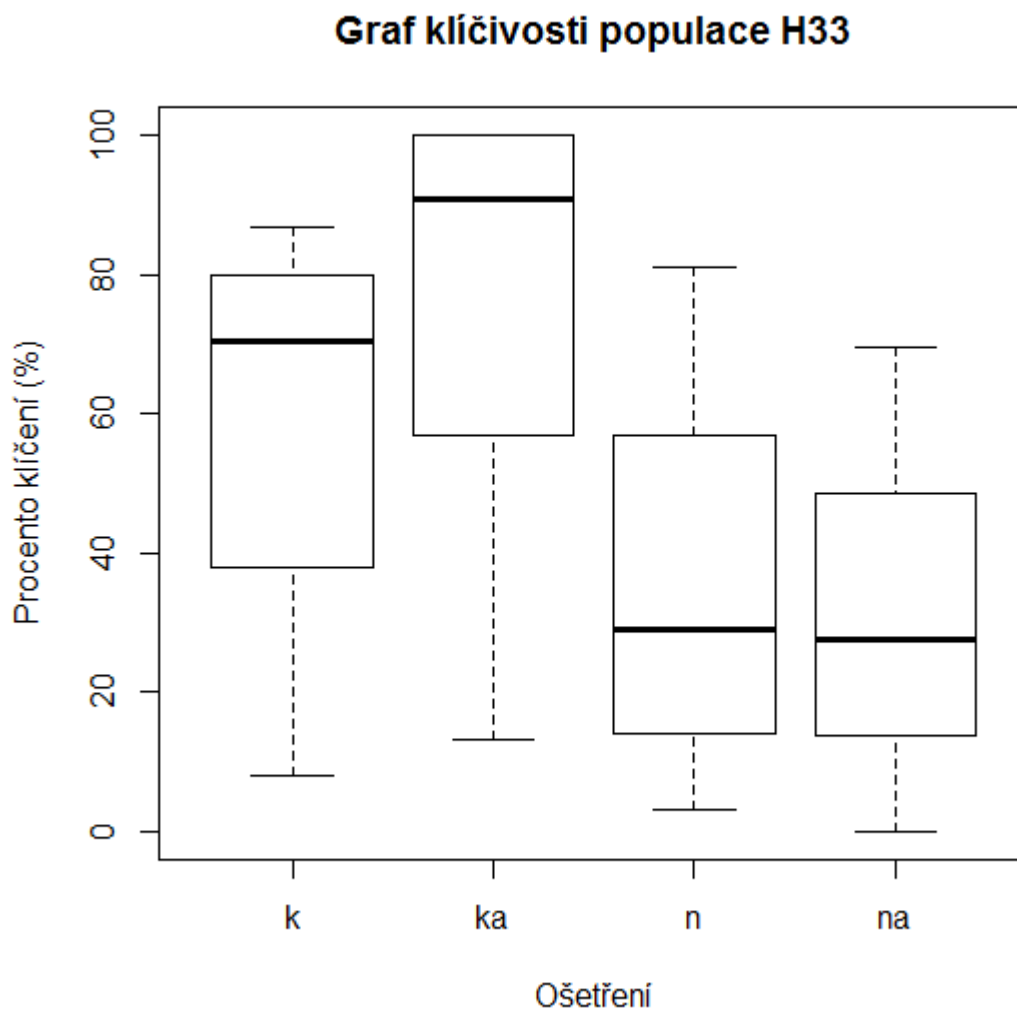
Tabulka 4 - Počty dostupných opakování (misek se semeny triploidních apomiktických populací *Hieracium alpinum*) v klíčícím experimentu (K = kontrolní ošetření, N = zvýšená koncentrace živin, KA = kontrolní ošetření a 5-azacytidin, NA = zvýšená koncentrace živin a 5-azacytidin).

Mateřské ošetření	Populace			
	H20	H33	H42	H99
K	2	5	1	1
N	1	6	8	3
KA	0	5	1	1
NA	0	4	5	1
Celkem	3	20	15	6

3.3.2 Klíčivost populace H33

Z obr. 9 je patrné, že semena rostlin z populace H33 o něco lépe klíčila z ošetření K a KA než z N a NA. Rozdíly však nejsou signifikantní (ANOVA a Tukey HSD test, $p > 0,05$).

Obrázek 9 - Boxplot procenta klíčení triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* z populace H33 podle ošetření (tlustá čára označuje medián).

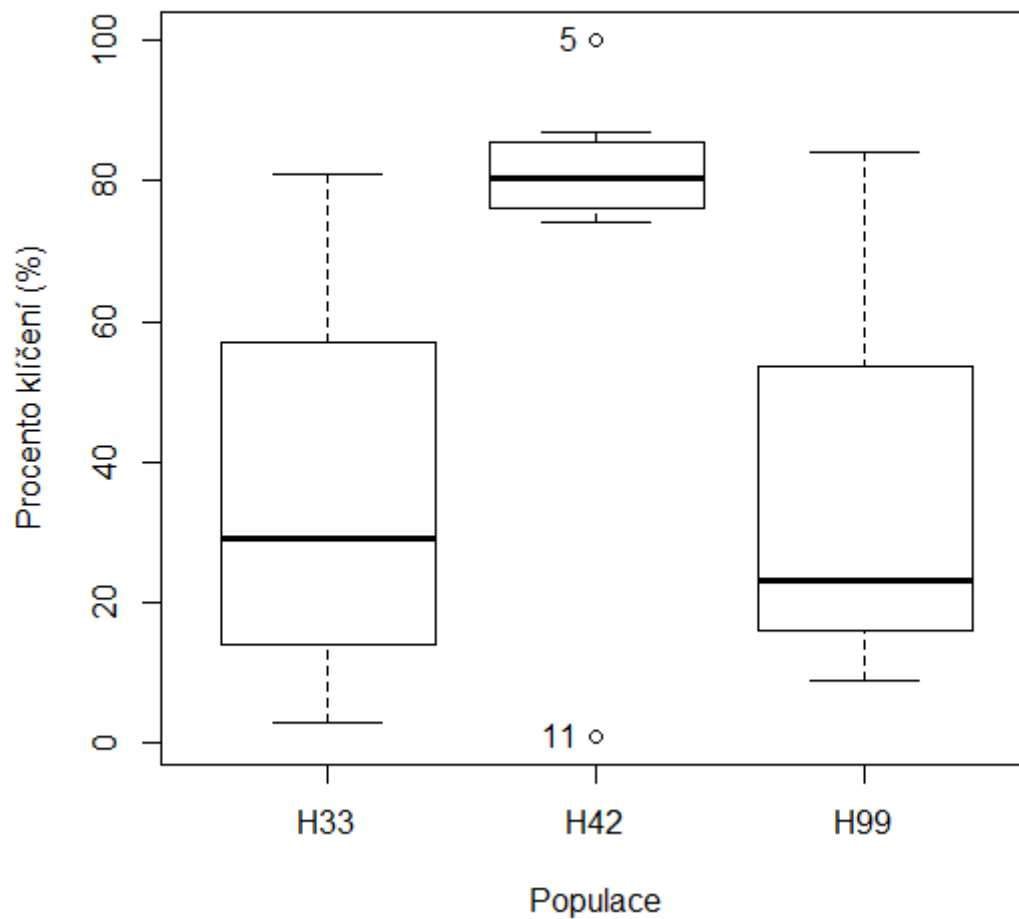


3.3.3 Klíčivost populací H33, H42 a H99 v ošetření s přidanými živinami

Klíčivost populací H33, H42 a H99 byla srovnávána v ošetření s přidanými živinami. Na obr. 10 je vidět, že populace H42 měla vyšší průměrnou klíčivost než ostatní populace, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný (ANOVA, Tukey HSD test, $p > 0,05$).

Obrázek 10 - Boxplot klíčivosti tří populací triploidních apomiktických rostlin druhu *Hieracium alpinum* v mateřském ošetření s přidáním živinami (tlustá čára označuje medián).

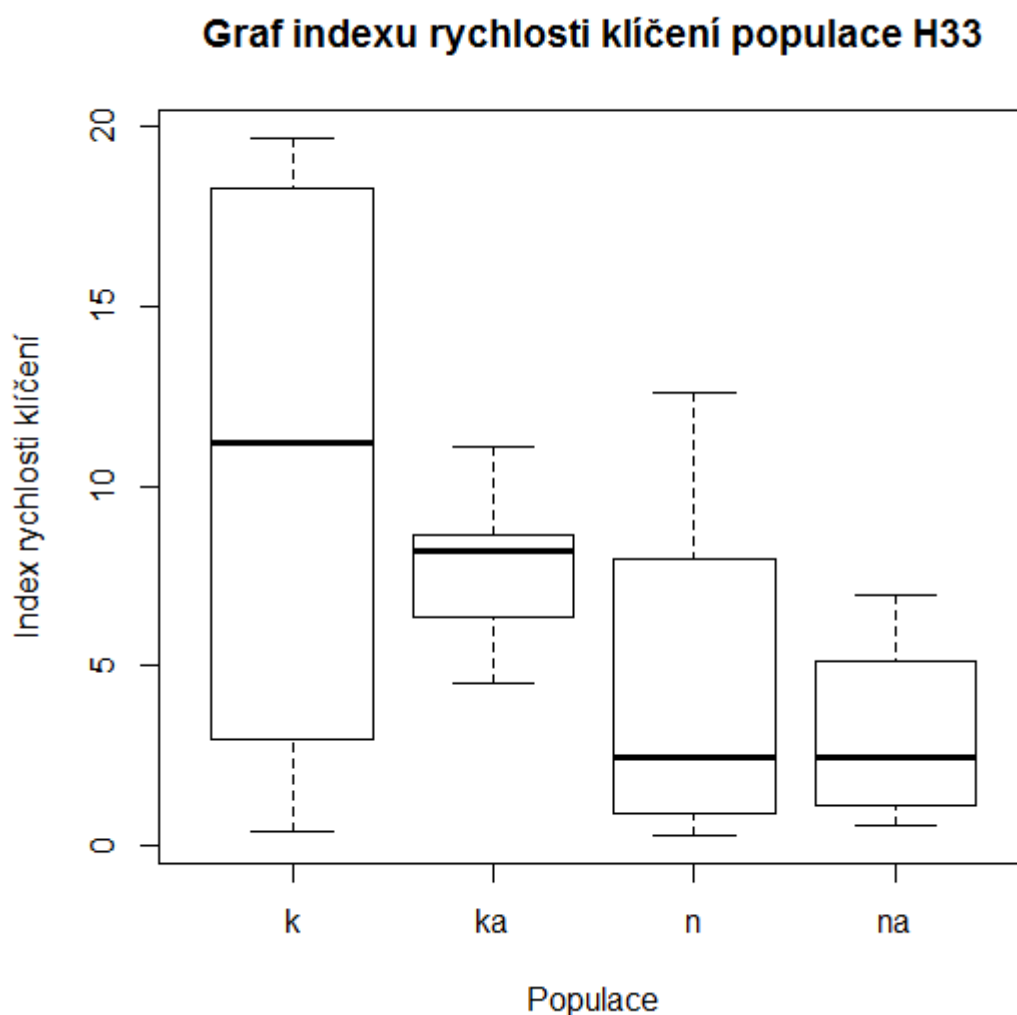
Graf klíčivosti populací H33, H42 a H99 v ošetření N



3.3.4 Index rychlosti klíčení populace H33

V populaci H33 měly nejnižší mediány indexu rychlosti klíčení misky z ošetření N a NA (viz obr. 11). Rozdíly mezi ošetřeními nebyly signifikantní (ANOVA a Tukey HSD test, $p > 0,05$).

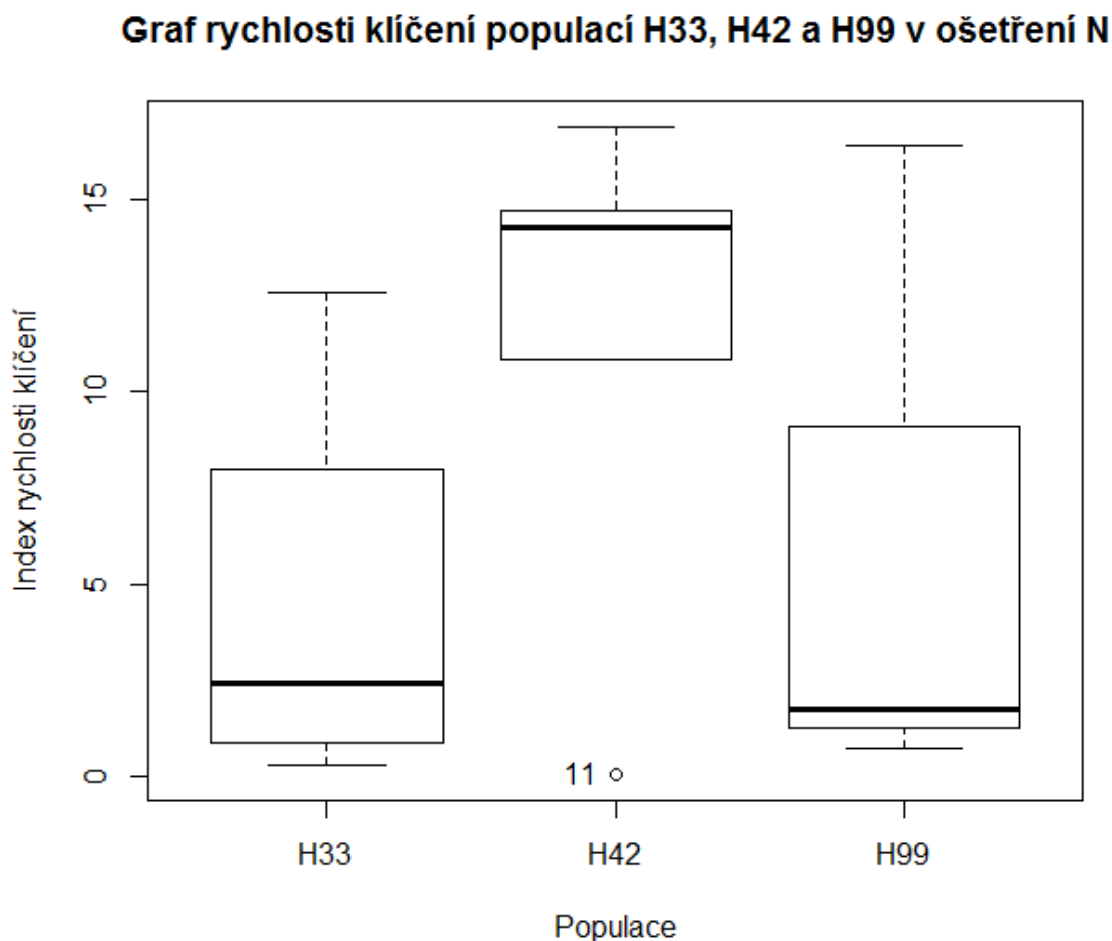
Obrázek 11 - Boxplot indexu rychlosti klíčení triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* z populace H33 ve čtyřech mateřských ošetřeních (K = kontrola, N = přidané živiny, KA = kontrola s 5-azacytidinem a NA = přidané živiny a 5-azacytidin; tlustá čára označuje medián)



3.3.5 Index rychlosti klíčení populací H33, H42 a H99 v mateřském ošetření N

V indexu rychlosti klíčení populací H33, H42 a H99 v mateřském ošetření s přidanými živinami (viz obr. 12) je patrný rozdíl mezi populací H42 a ostatními populacemi. Tento rozdíl však není signifikantní (ANOVA a Tukey HSD test, $p > 0,05$).

Obrázek 12 - Boxplot indexu rychlosti klíčení triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* ze třech populací v mateřském ošetření s přidáním živinami (tlustá čára označuje medián). Na horizontální ose jsou uvedeny zkratky jednotlivých populací.



3.3.6 Modely vysvětlující klíčivost

Vzájemný vztah mateřského ošetření a klíčení v populaci H33 byl testován lineárním modelem, testujícím efekt mateřského ošetření a přidání 5-azacytidinu na klíčivost. Efekt mateřského ošetření ani 5-azacytidinu nebyl signifikantní (ANOVA, $p > 0,05$).

Vzájemný vztah populace a klíčení v populacích H33, H42 a H99 byl testován lineárním modelem, testujícím efekt populace na klíčivost. Efekt populace nebyl signifikantní (ANOVA, $p > 0,05$).

3.4 Kultivační experiment II

V této části jsou zpracovány výsledky kultivačního experimentu II, který proběhl v roce 2016 ve skleníku Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Benátské 2.

3.4.1 Modely transgenerační paměti z kultivačního experimentu II

Tabulka 5 - Výsledky lineárních modelů testujících efekt mateřského ošetření, ošetření F1 potomků a aplikace 5-azacytidinu na funkční vlastnosti F1 potomků triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* pocházejících ze tří populací. Uvedeny jsou F hodnoty, spodní index označuje stupně volnosti; znaménka signifikance: * p < 0,10, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Iniciální biomasa byla použita jako kovariáta; navíc je uváděn reziduální počet stupňů volnosti v tabulce jako RSV. Šipky označují směr změny v daném ošetření (nahoru znamená zvýšení a dolů znamená snížení hodnot dané vlastnosti). SLA je specifická listová plocha, LDMC je obsah sušiny v listech.

Závislá proměnná/faktory	Finální biomasa	SLA	LDMC
Populace H20			
Transformace	log	log	log
Ošetření matky	0,7702 ₁	3,897 ₁ *	1,753 ₁
Ošetření F1 potomků	11,464 ₁ ***↑	1,861 ₁	1,943 ₁
Ošetření matky × Ošetření F1 potomků	0,951 ₁	0,047 ₁	0,239 ₁
5-azacytidin	netestováno	netestováno	netestováno
Iniciální biomasa	0,795 ₁	0,805 ₁	5,242 ₁ *
RSV	21	21	21
Typ testu	ANOVA	ANOVA	ANOVA
Populace H33			
Transformace	log	log	log
Ošetření matky	0,049 ₁	0,928 ₁	0,123 ₁
Ošetření F1 potomků	140,294 ₁ ***↑	0,557 ₁	5,292 ₁ *↓
Ošetření matky × Ošetření F1 potomků	0,342 ₁	0,127 ₁	0,032 ₁
5-azacytidin	0,178 ₁	4,287 ₁ *↓	6,949 ₁ **↑
Iniciální biomasa	3,773 ₁ *	0,933 ₁	0,021 ₁
RSV	156	156	156
Typ testu	ANOVA	ANOVA	ANOVA
Populace H42			
Transformace	log	log	log
Ošetření matky	0,001 ₁	0,080 ₁	0,110 ₁
Ošetření F1 potomků	318,738 ₁ ***↑	8,762 ₁ **↓	13,662 ₁ ***↓
Ošetření matky × Ošetření F1 potomků	0,238 ₁	0,012 ₁	0,001 ₁
5-azacytidin	0,731 ₁	2,765 ₁ *	4,064 ₁ *↓
Iniciální biomasa	0,001 ₁	1,518 ₁	0,766 ₁
RSV	184	184	184
Typ testu	ANOVA	ANOVA	ANOVA

Tabulka 6 - Výsledky lineárních modelů testujících efekt mateřského ošetření, ošetření F1 potomků a aplikace 5-azacytidinu na funkční vlastnosti F1 potomků triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum*, pocházejících ze tří mateřských rostlin. Uvedeny jsou F hodnoty, spodní index označuje stupně volnosti, znaménka signifikance: * p < 0,10, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Iniciální biomasa byla použita jako kovariáta; navíc je uváděn reziduální počet stupňů volnosti v tabulce jako RSV. Šipky označují směr změny v daném ošetření (nahoru znamená zvýšení a dolů znamená snížení hodnot dané vlastnosti). SLA je specifická listová plocha, LDMC je obsah sušiny v listech.

Závislá proměnná/faktory	Finální biomasa	SLA	LDMC
Mateřská rostlina H33-2			
Transformace	log	log	log
Ošetření matky	0,304 ₁	0,170 ₁	1,647 ₁
Ošetření F1 potomků	82,712 ₁ ***↑	1,540 ₁	2,526 ₁
Ošetření matky × Ošetření F1 potomků	0,172 ₁	0,287 ₁	1,152 ₁
5-azacytidin	0,478 ₁	1,662 ₁	3,961 ₁ *
Iniciální biomasa	1,655 ₁	0,001 ₁	1,421 ₁
RSV	69	69	69
Typ testu	ANOVA	ANOVA	ANOVA
Mateřská rostlina H33-22			
Transformace	log	log	log
Ošetření matky	0,433 ₁	1,199 ₁	0,041 ₁
Ošetření F1 potomků	33,913 ₁ ***↑	0,106 ₁	1,872 ₁
Ošetření matky × Ošetření F1 potomků	1,525 ₁	2,104 ₁	2,074 ₁
5-azacytidin	netestováno	netestováno	netestováno
Iniciální biomasa	3,152 ₁ *	0,009 ₁	0,271 ₁
RSV	57	57	57
Typ testu	ANOVA	ANOVA	ANOVA
Mateřská rostlina H42-25			
Transformace	log	log	log
Ošetření matky	0,003 ₁	0,096 ₁	0,219 ₁
Ošetření F1 potomků	239,388 ₁ ***↑	0,597 ₁	15,721 ₁ ***↓
Ošetření matky × Ošetření F1 potomků	0,226 ₁	1,333 ₁	0,250 ₁
5-azacytidin	5,922 ₁ *↓	8,173 ₁ **↑	5,333 ₁ *↓
Iniciální biomasa	0,001 ₁	6,737 ₁ *	2,402 ₁
RSV	119	119	119
Typ testu	ANOVA	ANOVA	ANOVA

Tabulka 7 - Výsledek lineárního modelu testujícího efekt dvou ošetření, dvou populací (H33 a H42) a přítomnosti 5-azacytidinu na iniciální biomasu triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* v kultivačním experimentu II. Zobrazeny jsou statistiky F a stupně volnosti (malé indexy). Iniciální biomasa byla použita jako kovariáta. Znaménka signifikance: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Navíc je uváděn reziduální počet stupňů volnosti v tabulce jako RSV.

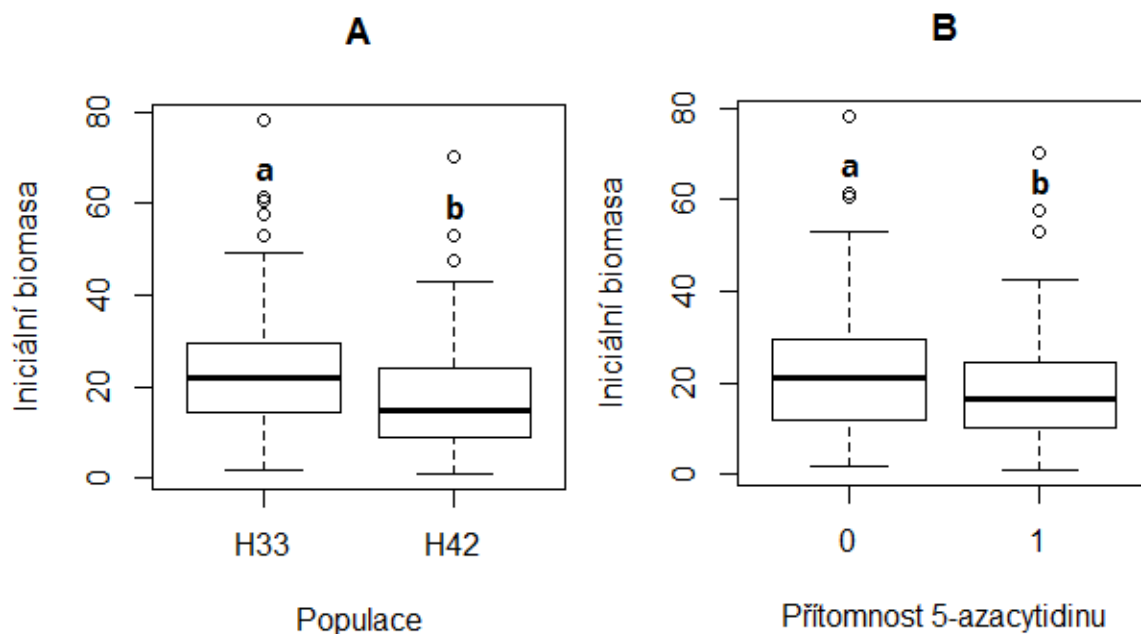
Závislá proměnná/faktory	Iniciální biomasa
Mateřské ošetření	0,051 ₁
Populace	26,724 ₁ ***
Mateřské ošetření × Populace	1,413 ₁
5-azacytidin	9,632 ₁ **↓
Typ testu	ANOVA
RSV	359

3.4.2 Výsledky funkčních vlastností v modelech Kultivačního experimentu II

Lineární modely byly vytvořeny pro jednotlivé populace H20, H33 a H42 a pro mateřské rostliny H33-2, H33-22 a H42-25 (viz tab. 7 a 8). V populaci H20 nebyl dostatek rostlin pro vytvoření ošetření s 5-azacytidinem, byly proto srovnávány jen rostliny z kontroly a ošetření s přidanými živinami. Stejná situace platí i v případě mateřské rostliny H33-22. Signifikantní efekty v modelech jsou zobrazeny na boxplotech a rozdíly byly testovány pomocí Welchova t-testu ($p > 0,05$).

V modelu pro **iniciální biomasu**, měřenou před založením ošetření F1 potomků, se projeví jako signifikantní efekty populace a aplikace 5-azacytidinu (viz tab. 9). V modelu byly použity pouze populace H33 a H42, protože jen u nich byl aplikován 5-azacytidin. Iniciální biomasa byla statisticky významně vyšší v populaci H33 (viz obr. 13-A). Aplikace 5-azacytidinu iniciální biomasu signifikantně snižovala (viz obr. 13-B).

Obrázek 13 - Boxploty iniciální biomasy dvou populací (H33 a H42) triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* ve 2 mateřských ošetřeních (K = kontrola a N = přidané živiny) na obr.13-A a podle přidání 5-azacytidinu (0 = nepřítomnost, 1 = přítomnost) na obr. 13-B. Tlusté čáry označují medián; různá písmena v obrázku označují statisticky signifikantní rozdíly. Iniciální biomasa uváděna v arbitrárních jednotkách.



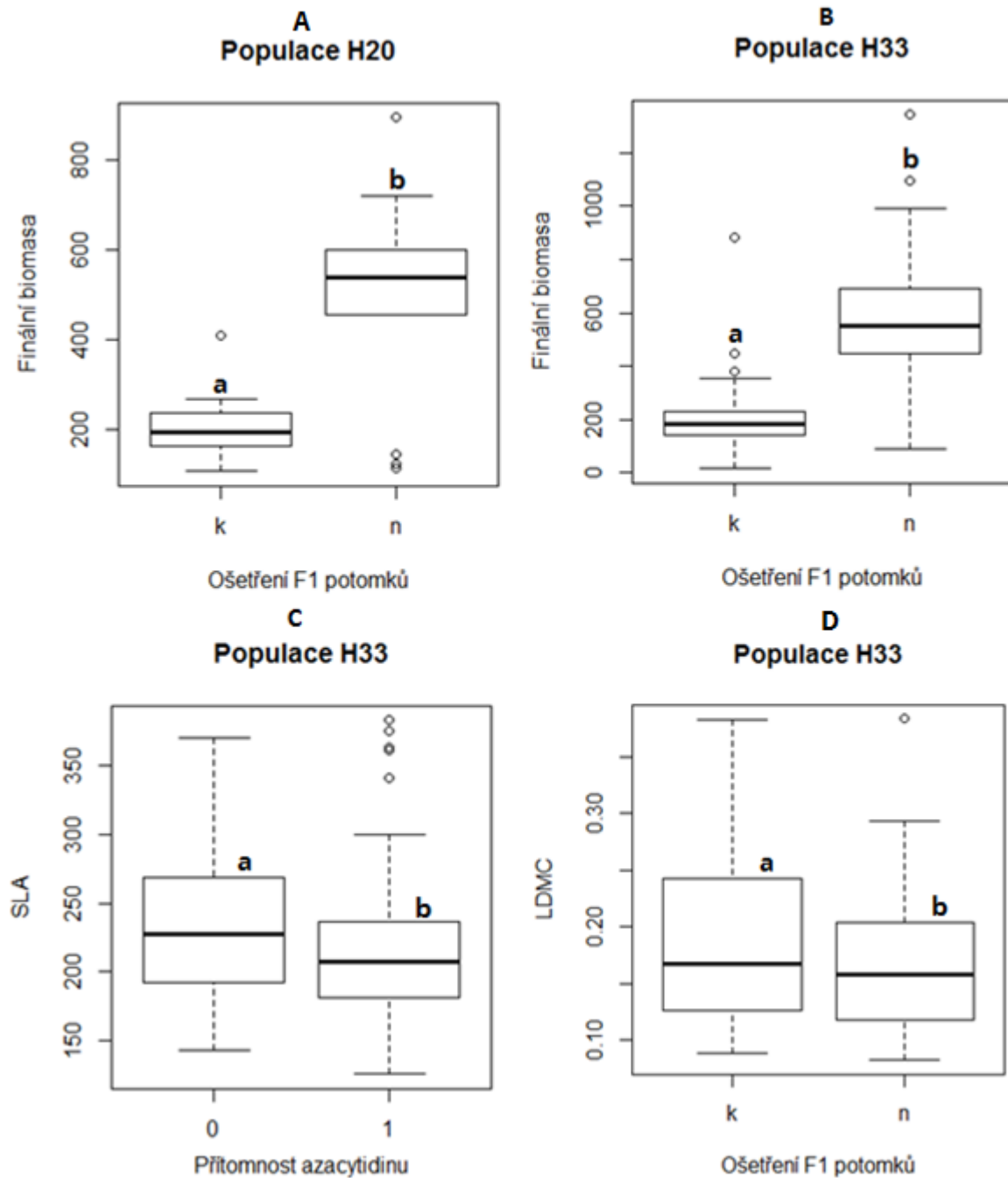
Všechny populace i mateřské rostliny reagovaly statisticky signifikantně na přidání živin zvýšením **finální biomasy** (viz tab. 7 a 8). Nejslabší reakce na přidané živiny se objevila u populace H20. U mateřské rostliny H42-25 se navíc projevil jako signifikantní i vliv 5-azacytidinu, kdy jeho přidání významně snižovalo finální biomasu (viz tab. 8). U všech populací došlo přidáním živin k signifikantnímu zvýšení finální biomasy (viz obr. 14-A, B a 15-B). Stejně tak i u všech mateřských rostlin (viz obr. 16-B, C a D).

Listové znaky na přidání živin nereagovaly tak výrazně jako finální biomasa. Přidání živin mělo významný vliv na **specifickou listovou plochu (SLA)** pouze v případě populace H42 (viz tab. 7). Rostliny s přidanými živinami zde dosahovaly nižších hodnot než kontrola (viz obr. 15-C). Mateřské šetření mělo na SLA marginální vliv v případě populace H20. Aplikace 5-azacytidinu měla statisticky signifikantní vliv na SLA v případě populace H33 a mateřské rostliny H42-25 a marginální vliv v případě populace H42. Aplikace 5-azacytidinu u populace H33 hodnoty specifické listové plochy významně snižovala (viz obr. 14-C) a naopak u mateřské rostliny H42-25 je signifikantně zvyšovala (viz obr. 17-B).

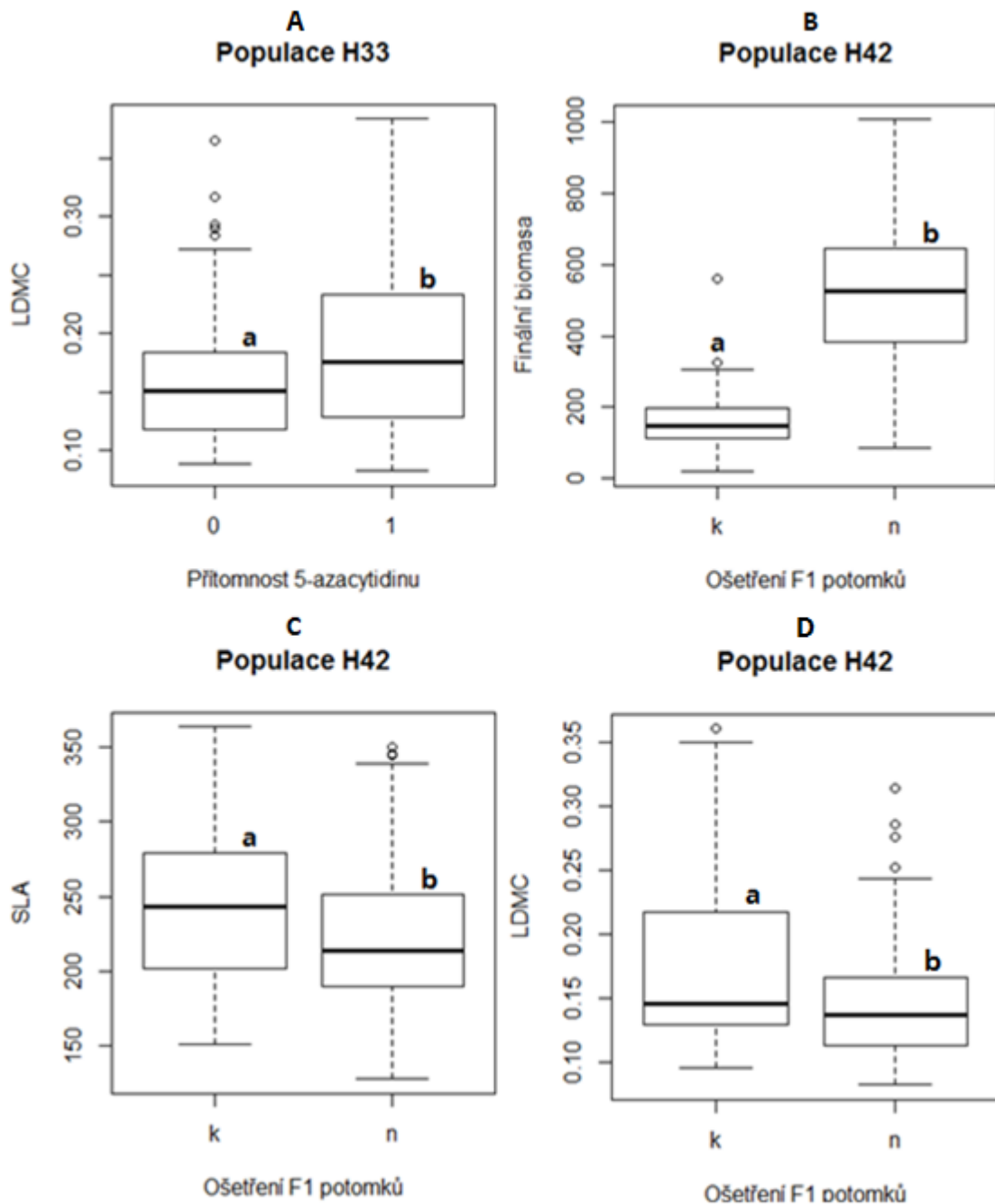
Obsah sušiny v listech (LDMC) byl signifikantně ovlivněn ošetřením s přidanými živinami v populacích H33 a H42 a v mateřské rostlině H42-25 (viz tab. 7 a 8). U obou

populací, a i v případě mateřské rostliny H42-25 přidané živiny statisticky významně obsah sušiny v listech snižovaly (viz obr. 14-D, 15-D a 17-C). LDMC byl dále signifikantně ovlivněn přidáním 5-azacytidinu u populací H33, H42 (viz tab. 7), mateřské rostliny H42-25 a marginálně ovlivněn v případě mateřské rostliny H33-2 (viz tab. 8). Aplikace 5-azacytidinu u populace H33 (viz obr. 15-A) významně zvyšovala hodnoty LDMC a u populace H42 je významně snižovala (viz obr. 16-A). U mateřské rostliny H42-25 aplikace 5-azacytidinu hodnoty LDMC signifikantně snižovala (viz obr. 17-D).

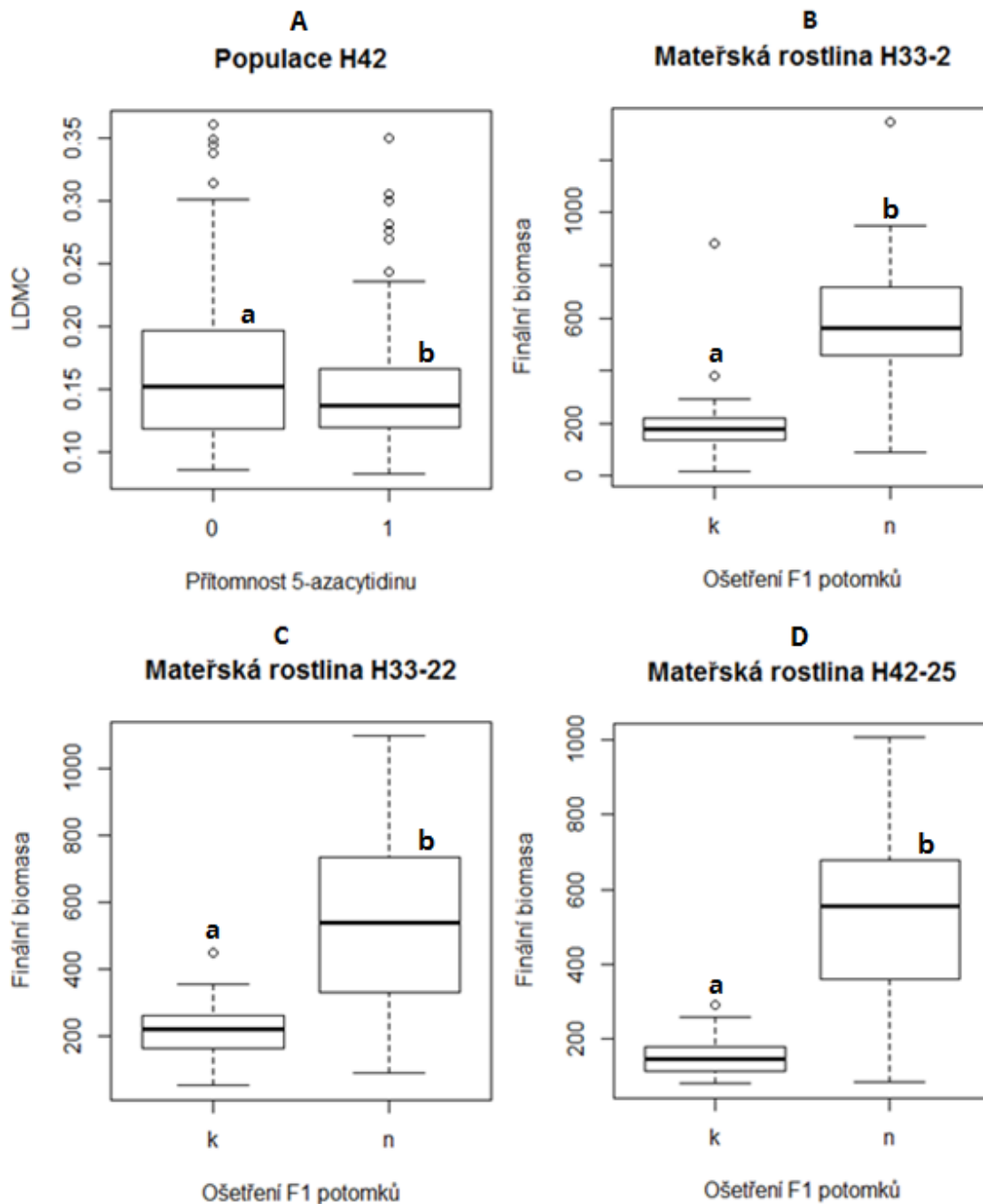
Obrázek 14 - Boxploty fenotypových vlastností tří populací triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* ve 2 mateřských ošetřeních (K = kontrola a N = přidané živiny) a 2 ošetřeních F1 potomků (K = kontrola, N = přidané živiny) a podle přidání 5-azacytidinu (0 = nepřítomnost, 1 = přítomnost). Tlusté čáry označují medián; různá písmena označují statisticky signifikantní rozdíly). SLA je specifická listová plocha (cm²/g), LDMC je obsah sušiny v listech (poměr sušina/čerstvá biomasa), finální biomasa uváděna v arbitrárních jednotkách.



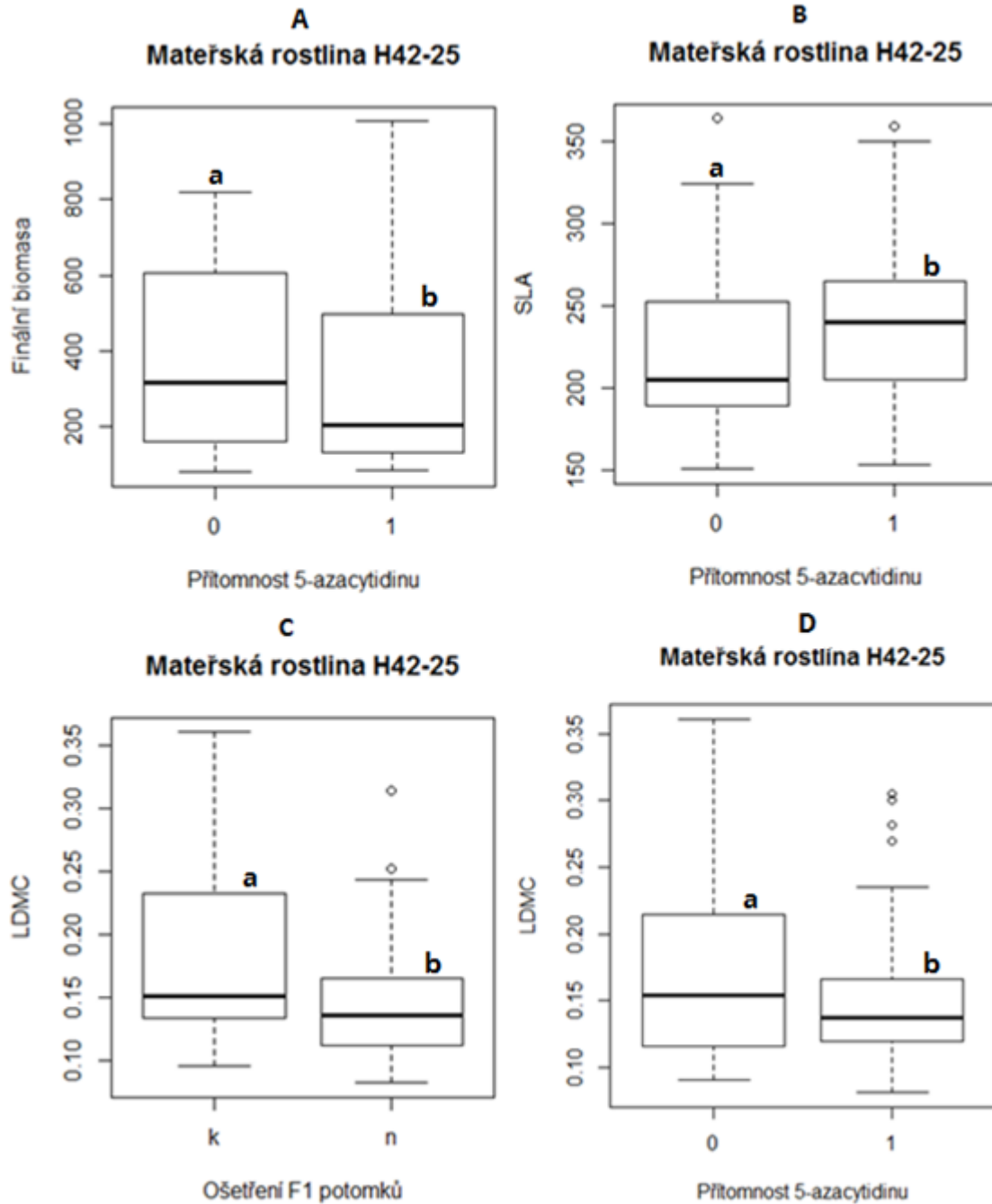
Obrázek 15 - Boxploty fenotypových vlastností tří populací triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* ve 2 mateřských ošetřeních (K = kontrola a N = přidané živiny) a 2 ošetřeních F1 potomků (K = kontrola, N = přidané živiny) a podle přidání 5-azacytidinu (0 = nepřítomnost, 1 = přítomnost). Tlusté čáry označují medián; různá písmena označují statisticky signifikantní rozdíl). SLA je specifická listová plocha (cm²/g), LDMC je obsah sušiny v listech (poměr sušina/čerstvá biomasa), finální biomasa uváděna v arbitrárních jednotkách.



Obrázek 16 - Boxploty fenotypových vlastností tří populací triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* ve 2 mateřských ošetřeních (K = kontrola a N = přidané živiny) a 2 ošetřeních F1 potomků (K = kontrola, N = přidané živiny) a podle přidání 5-azacytidinu (0 = nepřítomnost, 1 = přítomnost). Tlusté čáry označují medián; různá písmena označují statisticky signifikantní rozdíly). SLA je specifická listová plocha (cm²/g), LDMC je obsah sušiny v listech (poměr sušina/čerstvá biomasa), finální biomasa uváděna v arbitrárních jednotkách.



Obrázek 17 - Boxploty fenotypových vlastností tří populací triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* ve 2 mateřských ošetřeních (K = kontrola a N = přidané živiny) a 2 ošetřeních F1 potomků (K = kontrola, N = přidané živiny) a podle přidání 5-azacytidinu (0 = nepřítomnost, 1 = přítomnost). Tlusté čáry označují medián; různá písmena označují statisticky signifikantní rozdíl). SLA je specifická listová plocha (cm²/g), LDMC je obsah sušiny v listech (poměr sušina/čerstvá biomasa), finální biomasa uváděna v arbitrárních jednotkách.



4. Diskuze

Epigenetická variabilita může být náhodná, nebo indukována změnami v prostředí (Verhoeven a Preite 2014). Tato práce pracuje s hypotézou, že u apomiktických linií *Hieracium alpinum* lze vnějším vlivem (v tomto případě různou úrovní živin a kyselinou salicylovou) indukovat transgenerační efekt mateřských rostlin na potomstvo. Tato hypotéza se už dříve potvrdila v případě asexuálních apomiktických linií *Taraxacum officinale* při vystavení různým druhům stresu (Verhoeven a van Gurp 2012).

4.1 Kultivační experiment I

4.1.1 Reakce rostlin na ošetření přidanými živinami

Na hodnoty všech vlastností mělo významný vliv ošetření přidanými živinami. Rostliny silně reagovaly především zvýšením biomasy a průměrného počtu listů. Tyto dvě vlastnosti byly pozitivně korelovány ($r = 0,69$, Spearmanův korelační koeficient). Méně nápadné pak byly rozdíly u SLA, LDMC a pravděpodobnosti kvetení. Zároveň byl patrný vliv ovšem i v případě dalších generativních znaků, jako je výška vykvetlých stonků a počet dnů do kvetení. Ošetření přidanými živinami mělo totiž zásadní vliv na úspěšné kvetení rostlin.

Silná reakce celkové **biomasy** na zvýšenou koncentraci živin je dobře známý fakt (Goldberg a Miller 1990). Z ekologického pohledu má vyšší dostupnost živin přímý efekt skrze zvýšenou nadzemní biomasu na zvýšenou nadzemní kompetici (Wilson a Tilman 1991). Na gradientu produktivity od méně do více produktivních prostředí se mění charakter kompetice z podzemní na nadzemní (Tilman 1986). Podzemní kompetice totiž probíhá především o živiny a nadzemní hlavně o světlo (Tilman 1986). V souladu s tím probíhá i rozdělování biomasy rostlinou zprvu do podzemních částí a při zvýšení živin do nadzemních částí (Cambui et al. 2011). To je také známo jako teorie optimálního přerozdělování (optimal partitioning theory) a ta říká, že rostliny by měly investovat do orgánů, kterými získávají limitující zdroje (Bloom et al. 1985). Z konkrétních populací reagovaly signifikantním zvýšením populace H33, H42 a H99. U populace H20 a H87 existoval stejný trend, ale rozdíl byl nesignifikantní. Je tedy patrná různá reakce populací na přidání živin. Různé populace tedy mohou mít různou plasticitu nebo různou efektivitu využití živin. Nebyl měřen žádný index plasticity, rostliny z různých populací ale často

reagovaly různě. Např. populace H87 a H99 měly větší rozdíl mezi ošetřeními v případě SLA (viz obr. 4-A), populace H42 nebyla vůbec variabilní v LDMC (viz obr. 4-C), populace H99 byla minimálně variabilní ve finální biomase (viz obr. 4-E). Efektivita využití živin je vyjadřována různými způsoby u různých autorů (Baligar et al. 2001) a je běžně definována např. jako poměr sklizně na jednotku živin, tzv. poměr efektivity živin (Baligar a Fageria 2015). Různé reakce různých populací na množství živin tak mohou odrážet podmínky na lokalitách a s nimi související adaptace. Ty pak mohou odrážet např. vyšší efektivitu využití živin u populací z prostředí stresovaných živinami.

Vyšší hodnoty SLA jsou spojeny s vyšší produktivitou, ale listy takových rostlin jsou zároveň méně trvalé a herbivorie je může postihovat výrazněji (Grime et al. 1996). SLA figuruje v LHS schématu rostlinných strategií (Westoby 1998) jako zásadní proměnná určující stav úrodnosti půdy. Vyšší hodnoty jsou časté v prostředích s větším množstvím živin a disturbancí, obecně pak u rostlin označovaných jako r-stratégové (Lavorel et al. 2007). Nižší hodnoty se pak mohou objevovat např. u stresovaných rostlin, nebo rostlin živinami limitovaných (Lavorel et al. 2007). To může vysvětlovat vyšší hodnoty SLA v ošetření s přidávanými hodnotami, signifikantní rozdíl byl však pouze v případě populace H99. SLA zde bylo signifikantně vyšší v ošetření se zvýšenou koncentrací živin oproti kontrole (viz obr. 4-A). U většiny rostlin se však změny skrze SLA příliš neprojevíly a tento znak by se tak pro apomiktické rostliny *Hieracium alpinum* dal považovat za spíše konzervativní.

Obsah sušiny listu (LDMC) je v literatuře označován za lepší prediktor pozice organismu na ose využití živin, než SLA (Wilson et al. 1999). Hlavním důvodem je asi blízký vztah (nepřímá úměra) SLA a tloušťky listu, která reaguje především na stín (Hodgson et al. 2011). To vedlo některé autory ke zpochybnění výpovědní hodnoty SLA v ekologických experimentech, a naopak k upozornění na větší ekologickou validitu LDMC (Witkowski a Lamont 1991, Wilson et al. 1999). Vyšší hodnoty LDMC jsou také typické pro listy rostlin odolnějších vůči fyzickému stresu (Cornelissen et al. 2003). To je v souladu s teorií, že r-stratégové mají větší hodnoty SLA a při nižších investicích na jednotku plochy tedy mají nižší hodnoty LDMC (Lavorel et al. 2007). Zvýšení SLA a snížení LDMC je v literatuře zdokumentovaný důsledek přidání živin, hlavně dusíku (Ackerly a Bazzaz 1995, Al Haj Khaled et al. 2005). Dalším rysem je to, že LDMC je v experimentech méně variabilní znak než SLA (Wilson et al. 1999). To se ale nedá říct v případě studovaných rostlin v této práci, kdy v LDMC byly často variabilnější než SLA. V případě LDMC byl

kromě efektu ošetření v kultivačním experimentu I signifikantní i efekt populace a interakce populace a ošetření. Na rozdíl od SLA je však z obr. 4-C patrný opačný trend u populace H33 (ukazující spíše na reakci typickou pro stres) a pouze v případě populace H99 (stejně jako u SLA) se rozdíl mezi ošetřením N a K projevil jako signifikantní.

4.1.2 Reakce rostlin na ošetření aplikací kyseliny salicylové

Rostliny na ošetření kyselinou salicylovou oproti kontrole nereagovaly. Ani v jednom případě nebyl u žádné populace a u žádného znaku zjištěn statisticky významný rozdíl. Naměřené rozdíly tak odrážejí v podstatě rozdíly mezi jednotlivými populacemi. Např. populace H99 je viditelně nejmenší s nejmenším počtem listů (viz obr. 4-F a 5-B). Aplikace kyseliny salicylové vedla v řadě studií ke zvýšenému růstu např. u *Glycine max*, *Zea mays*, *Matricaria chamomilla* nebo *Triticum aestivum* (Rivas-San Vicente a Plasencia 2011). Tento rostlinný hormon se ovšem podílí i na odpovědích na stres vyššími koncentracemi toxických látek. Například u rostlin *Brassica napus* jeho aplikace u takto postižených rostlin zvyšovala velikost kořenů i stonků (Jazi et al. 2011). Kyselina salicylová také dokáže snížit negativní dopady stresu u rostlin stresovaných nedostatkem vody a zvyšuje jejich velikost a plochu listů (Sayyari et al. 2013). Obecně se dají najít důkazy o zvýšené odolnosti rostlin s aplikovanou kyselinou salicylovou na stres, ať už nedostatkem vody (Singh a Usha 2003) nebo např. zvýšenou salinitou (El-Tayeb 2005, Gunes et al. 2007). Příkladů aplikace kyseliny salicylové jako samostatného faktoru příliš není. Např. u rostlin *Amaranthus tricolor* však pozitivně ovlivňovala růst a výtěžek (Khandaker et al. 2011). To je v rozporu s výsledkem kultivačního experimentu I, kde nebyla zaznamenána vůbec žádná reakce na aplikaci této látky. *Hieracium alpinum* je rostlina vyskytující se ve stresovaných prostředích (suchem, vysokou mírou UV záření, mrazem). Je tedy možné, že má sama o sobě dostatek tohoto hormonu, aby se s těmito stresy vyrovnávala a exogenní aplikace kyseliny salicylové už jí příliš neovlivní.

4.1.3 Generativní znaky rostlin

Pravděpodobnost kvetení rostlin byla v kultivačním pokusu I závislá především na ošetření. Kromě signifikantního efektu přidaných živin se ukázal být signifikantní i efekt iniciální biomasy. Nejlépe kvetly rostliny v ošetření s přidanými živinami. Přidání živin se ukázalo tak zásadní, že ve dvou populacích (H87 a H99) rostliny z jiných ošetření (kontrola a přidaná kyselina salicylová) dokonce za celou dobu nevykvetly. Stalo se tak i přes

několikanásobnou aplikaci univerzálního hnojiva na všechny rostliny po změření finální biomasy. To bylo aplikováno k urychlení produkce semen. Nejpřekvapivější je vysoká pravděpodobnost kvetení populace H33 v ošetření s kyselinou salicylovou, přesahující 80 %. Může se jednat o genetickou lokální adaptaci v delším časovém měřítku, ale i místní dočasnou epigenetickou adaptaci, zvyšující fitness rostlinám napadaných herbivory (Agrawal 2002). I přes tento fakt ale není z výsledků patrný jakýkoliv další vliv (např. ve fenotypových vlastnostech), který by mohlo ošetření kyselinou salicylovou na populaci H33 mít. Kyselina salicylová byla přitom už dříve zdokumentována jako faktor, vedoucí u některých druhů k dřívějšímu kvetení (Rivas-San Vicente a Plasencia 2011).

V případě výšky vykvetlých rostlin i počtu dnů do kvetení se neprojevíly statisticky signifikantní rozdíly mezi ošetřeními u populací H20, H33 a H42. Výška vykvetlých rostlin, ani doba do kvetení nejspíše na ošetření u *Hieracium alpinum* příliš nereaguje. Tyto vlastnosti se pouze mírně, ale statisticky významně (viz tab. 3) liší mezi populacemi. Za zmínku stojí, že populace H99 ze Skandinávie má nejmenší průměrnou výšku vykvetlých stonků (viz obr. 5-C) a potřebuje v průměru nejvíce dnů do kvetení (viz obr. 5-E), přičemž kvetla jen s přidanými živinami. Interpretaci komplikuje skutečnost, že dostatek opakování pro srovnání všech populací bylo jen v ošetření s přidanými živinami, kde se jako významný ukázal u výšky stonků i u počtu dnů do kvetení efekt populace, ale překvapivě ne iniciální biomasy (oproti pravděpodobnosti kvetení). Vzhledem k výsledkům jiných studií by se dalo předpokládat, že přidání živin pozitivně ovlivní výšku rostlin (Tilman 1986, Tilman 1987). Výsledek v této práci by se dal snad vysvětlit fyziologií rostlin *Hieracium alpinum*, kdy stonek tvoří pouze kvetoucí rostliny a produkce stonků nastává, až když rostlina kvete. Znamená to, že živiny jsou u tohoto druhu spíše investovány do růstu listů a ve výšce stonku se tolik neprojevují. Jejich přidání má pak u *Hieracium alpinum* vliv pouze na to, zda rostlina vůbec vykvetne. Situace vypadá podobně i u počtu dnů potřebných ke kvetení, kdy bez ohledu na ošetření potřebovala populace H99 v průměru k vykvetení nejvíce dnů. Celkově působí generativní znaky v kultivačním experimentu I konzervativním dojmem oproti těm vegetativním, bez většího vlivu ošetření.

Žádné větší statisticky významné rozdíly se neprojevíly ani u velikosti úboru. Všechny rostliny nešlo vzhledem k nedostatku opakování srovnávat. Největší velikost úboru se objevila u rostlin z populací H33 a H42 v ošetření kyselinou salicylovou (nelišily se ale statisticky významně). V jedné studii druhu *Amaranthus tricolor* bylo zaznamenáno zvýšení výnosu po aplikaci kyseliny salicylové (Khandaker et al. 2011). Jinde bylo

zaznamenáno zlepšení kvality i kvantity plodů např. u *Lycopersicum esculentum* (Karlıdag et al. 2009) nebo *Fragaria × ananassa* (Javaheri et al. 2012). Výše zmíněné vyšší hodnoty v populacích H33 a H42 po aplikaci kyseliny salicylové v této práci jsou tak v souladu s těmito predikcemi. Naproti tomu při srovnání velikosti úboru v ošetření s přidanými živinami nebyl mezi populacemi nalezen statisticky významný rozdíl (viz obr. 8). Může se tak jednat o další důkaz konzervativnosti generativních znaků u druhu *Hieracium alpinum*.

Stejná situace jako u velikosti úboru se objevila i u individuální hmotnosti semen. Mezi populacemi nebyl opět nalezen významný rozdíl. Z toho se dá usuzovat, že případný transgenerační přenos je u tohoto druhu způsoben spíše skrze modifikace epigenetických značek na DNA, než skrze zaopatření semen (tzv. seed provisioning; Herman a Sultan 2011). Zaopatření semene je fenomén, při kterém dochází k investici různého množství lipidů, uhlovodíků, bílkovin a minerálů mateřskou rostlinou do semen svých potomků (Herman a Sultan 2011). Mateřská rostlina tak může v kvalitě potomstva odrážet např. svůj světelný nebo živinový režim a podle toho v jejich kontextu produkovat dobře nebo hůře zásobená semena. Zdokumentováno však bylo i lepší zaopatření semen z rostlin vystavených stresu (Roach and Wulf 1987). U druhu *Potentilla tanacetifolia* přidání živin mateřským rostlinám významně snižovalo hmotnost semen (Li et al. 2011). U druhu *Nicotiana attenuata* se ukázal podobný trend, a navíc tím byla snížena i velikost rostlin vzešlých z těchto semen (Van Dam a Baldwin 2001), což poukazuje na poměrně zásadní vliv mateřského prostředí na fenotyp potomků. Z výsledků individuální hmotnosti semen tedy opět vyplývá, že *Hieracium alpinum* je druh sice plastický v reakci na prostředí např. skrze biomasu, ale v reprodukční strategii (velikost semen, velikost úboru atd.) je pravděpodobně spíše konzervativní.

4.2 Klíčení potomků rostlin z kultivačního experimentu I

Výsledky nepotvrdily původní hypotézu, že klíčení semen apomiktických linií *Hieracium alpinum* je ovlivněno více prostředím mateřských rostlin než jejich příslušností k určité populaci. Vzhledem k výše zmíněnému omezení získaným materiálem z kultivačního pokusu I nemohl být vytvořen ideální design, umožňující uspokojivé srovnání všech rostlin ve všech ošetřeních.

V rámci klíčení, indexu rychlosti klíčení a rychlosti klíčení nebyl zjištěn významný vliv mateřského ošetření na klíčení potomků. Ani v jednom případě nebyl u měřených

parametrů nalezen signifikantní výsledek. Lze se tedy domnívat, že množství dostupných živin mateřských rostlin neovlivňuje klíčení potomků u tohoto druhu. Nejlépe klíčila semena z populace H42 (až na jednu výjimku vždy nad 75 % naklíčených semen). Nejhůře klíčila semena z populace H99 (až na jednu výjimku vždy pod 25 % naklíčených semen). Pouze u klíčení populace H33 byla patrná různá klíčivost podle toho, zda bylo mateřské ošetření N nebo K (viz obr. 9). Tento rozdíl ale nebyl statisticky signifikantní. Existují příklady vlivu mateřského ošetření na klíčení potomků. Stepní druhy *Stipa krylovii* a *Artemisia frigida* měly na živiny v mateřském ošetření opačnou reakci, *S. krylovii* měla sníženou klíčivost, pokud její mateřské rostliny měly více dusíku a fosforu a u *A. frigida* tomu bylo opačně (Li et al. 2017). U druhu *Potentilla tanacetifolia* pak přidání živin mateřským rostlinám negativně ovlivnilo klíčení potomků (Li et al. 2011). Rychlejší klíčení semen z rostlin ošetřených vyšším množstvím dusíku bylo zdokumentováno u druhu *Nicotiana attenuata* (Van Dam a Baldwin 2001). Tento trend se objevil i u *Chenopodium album*, ale ne u *Abutilon theophrasti* (Fawcett a Slife 1978). Pokud tedy u rostlin mateřské ošetření ovlivňuje klíčení, může být tento vliv různého rázu a nejspíše je úzce spjatý s ekologií daného druhu a nedá se příliš zobecnit.

V charakteristikách klíčivosti semen z kultivačního experimentu I se neprojevíly žádné rozdíly v klíčivosti mezi semeny z mateřských ošetření K a N a stejnými semeny s přidaným 5-azacytidinem ani v jedné populaci. Aplikace 5-azacytidinu se projevuje změnami ve fenotypu rostlin, zahrnujícími např. změny v době kvetení, změny výšky rostliny a změny počtu květů (Bossdorf et al. 2010, Boyko et al. 2010). Neexistuje moc dokladů o vlivu 5-azacytidinu na klíčení semen. V jednom experimentu, zkoumajícím vzorec metylace DNA v souvislosti s klíčením, bylo pozorováno zkrácení doby potřebné ke klíčení o jeden den při aplikaci 5-azacytidinu u parazitické rostliny *Phelipanche ramosa* (Lechat et al. 2015). To má jistou logiku, protože ve stejné studii bylo zdokumentováno postupné snížení metylace (přítomnosti 5-metyl cytidinu) na úrovni celého genomu předtím, než rostliny začaly klíčit (Lechat et al. 2015). Aplikace 5-azacytidinu tedy mohla urychlit už tak přítomnou metylaci, předcházející klíčení semen. I u *Plantago lanceolata* v experimentálním ověření parentálních efektů bylo klíčení silně ovlivněno rodičovským prostředím, a navíc čím vyšší byla teplota rodičovského prostředí, tím lepší byla klíčivost potomků (Lacey a Herr 2000).

Epigenetické děje mohou mít zásadní význam pro klíčivost rostlin. Velmi nápadně se to projevilo u druhu *Campanula americana*, kdy prostředí rodičů a jeho korelace

s prostředím potomků může ovlivňovat, zda další generace bude klíčit na podzim nebo až na jaře (Galloway 2005). Jedná se tedy nejen o změnu v rámci délky klíčení, ale i změnu životní historie rostliny.

Semena by měla být schopna klíčit napříč nejširšími ekologickými podmínkami, vymezujícími jejich distribuci, pokud nejsou dormantní (Finch-Savage a Leubner-Metzger 2006). Znamená to, že dormantní semeno nebude klíčit v příhodných podmínkách po určitý čas (Baskin a Baskin 2004). Populace H99 až na jednu miskou ve všech ošetřeních klíčila s výrazným časovým odstupem a přítomnost dormance by to mohla vysvětlit. Dormance však nebyla nijak vyhodnocována ani analyzována. U skandinávských populací triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* se ale jinde dormance skutečně projevila v experimentálním klíčení (Hartmann, nepublikováno). Zeměpisná šířka měla vliv na dormanci u druhu *Arabidopsis thaliana*, ale populace ve vyšších zeměpisných šířkách měly dormanci kratší (Debieu et al. 2013). Stejná situace panovala u druhu *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (Wagmann et al. 2012). Časový odklad klíčení populace H99 v této práci je tedy v rozporu s těmito studii. Na druhou stranu tyto druhy nezasahují do tak vysokých zeměpisných šířek (ani nadmořských výšek) a zmíněnou potenciální dormanci severských populací *Hieracium alpinum* mohou proto postrádat.

Existuje řada studií, dokazujících existenci velkých vnitrodruhových rozdílů v klíčivosti (Pezzani a Montaña 2006, Karlsson a Milberg 2007). To je v souladu s teorií o lokálním přizpůsobení a vnitrodruhové variabilitě v měřitelných funkčních vlastnostech (Bazzaz 1996). Možným vlivem je např. zeměpisná poloha a nadmořská výška, jejichž podobnost podmínek spolu částečně pozitivně koreluje. Toto vše pak může způsobit větší efekt populace (a tedy asi i lokální adaptace) na vyklíčení většího množství semen než mateřské ošetření.

4.3 Kultivační experiment II

Dosavadní studie transgenerační paměti u rostlin se soustředily především na odpovědi rostlin na stres (Chinnusamy a Zhu 2009, Sultan et al. 2009, Boyko et al. 2010, Verhoeven et al. 2010, Boyko a Kovalchuk 2011, Herman a Sultan 2011, Khraiwesh et al. 2012). Pokud bylo předmětem studia množství živin, téměř vždy se jednalo o stres způsobený nedostatkem živin (Sultan 1996, Verhoeven et al. 2010, Latzel a Klimešová

2010, Kou et al. 2011, Verhoeven a van Gurp 2012). Studie, zabývající se transgeneračním efektem přidaných živin mateřských rostlin na jejich potomstvo, jsou spíše výjimkami (Miao et al. 1991, Wulff et al. 1999, Lau et al. 2008, Li et al. 2011). Zvýšené depozice dusíku přitom patří mezi významné faktory člověkem ovlivněných změn v ekosystémech (Nadelhoffer et al. 1999) a do budoucna je odhadován trend jejich zvyšování (Bobbink et al. 2010). Existuje přitom řada důkazů o snižování diverzity rostlin, způsobené právě zvýšenými depozicemi dusíku (Phoenix et al. 2006, Hautier et al. 2009). Toto postupné zvyšování je dokonce označováno za třetí nejdůležitější hnací kolo člověkem ovlivněných změn v ekosystémech (Sala et al. 2000). V této práci bylo použito k indukci transgeneračního efektu ošetření živin a kyselinou salicylovou v rámci v té době probíhajícího projektu Vítka Latzela z Botanického ústavu AV ČR, v. v. i.

Pro apomiktické rostliny druhu *Hieracium alpinum* je přitom plastická evoluční reakce na změny prostředí podle stávajícího evolučního paradigmatu velmi omezená. Podle něho by totiž jedinou možností evoluční změny u apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* mohly být pouze vzácné somatické mutace, tvořící nové linie. Tato práce pracuje s hypotézou, že jejich omezená genetická variabilita by mohla být doplněna variabilitou epigenetickou. Ta by mohla skrze transgenerační přenos informace o prostředí do potomků poskytovat alternativní způsob evoluce a zvyšovat tak jejich evoluční potenciál (Castonguay a Angers 2012, Verhoeven a Preite 2014), pokud by byl tento přenos přítomen v následujících generacích. To by pak mohlo vést k zvýšené šanci těchto linií přežít ve změněném prostředí, např. právě při zvýšení atmosférických depozic dusíku a s nimi související zvýšenou kompeticí o světlo a kompetitivním vyloučením málo plastických druhů. Prokázání vlivu epigenetických mechanismů na plastickou odpověď na množství živin by znamenalo prokázání jejich nedoceněné role v evoluci a reakcích na změny prostředí (Zhang et al. 2013) u apomiktických rostlin *Hieracium alpinum*.

Nejdůležitějším zjištěním v této práci je tedy nepotvrzení transgeneračního přenosu informace o prostředí rodičů na potomky triploidních apomiktických rostlin v F1 generaci a tedy vyloučení této možnosti. Rostliny reagovaly plasticky na ošetření přidanými živinami v F1 generaci především zvýšením biomasy (ve všech případech). To je v souladu s jinými studiemi (Goldberg a Miller 1990). Na tuto reakci ale nemělo statisticky významný vliv prostředí jejich rodičů u žádné ze studovaných populací ani mateřských rostlin (viz tab. 7 a 8). Z pohledu na rozdíly mezi kontrolou a přidanými živinami přitom je v reakci

biomasy zřejmá fenotypová plasticita. Ta u tohoto druhu v rámci reakce na živiny však pravděpodobně není doplněna epigenetickou složkou (viz níže).

Stejná situace panuje i u obou dalších zkoumaných fenotypových znaků SLA a LDMC. V jejich rámci navíc statisticky významně reagovaly pouze některé populace a mateřské rostliny. Změnou SLA reagovala pouze populace H42 a změnou LDMC reagovaly populace H33 a H42 a mateřská rostlina H42-25. Snížení LDMC u populace H42 a H33 a mateřské rostliny H42-25 bylo přitom v souladu s publikovanými studiemi (Lavorel et al. 2007), kdy rostliny z produktivnějších prostředí s více živinami mají nižší hodnoty LDMC (méně investic do pletiv listů). Překvapivým zjištěním naopak bylo, že u populace H42 došlo k významnému snížení hodnot SLA po přidání živin. To je v rozporu s predikcemi, že by zvýšení živin mělo být provázeno zvýšením hodnot SLA (Cornelissen et al. 2003, Lavorel et al. 2007). Naopak reakce populace H42 může naznačovat, že rostliny byly úrovní živin spíše stresovány. Rostliny snášející stres mají totiž zpravidla nižší hodnoty SLA (Lavorel et al. 2007).

4.3.1 Aplikace demetylačního činidla 5-azacytidinu

V kultivačním experimentu II se také ukázal v několika modelech jako statisticky významný vliv aplikace demetylačního činidla 5-azacytidinu (hlavně u listových znaků). V případě biomasy tomu tak bylo v případě mateřské rostliny H42-25, kdy došlo k statisticky významnému snížení biomasy. Větší vliv v experimentu měl 5-azacytidin v případě listových znaků SLA a LDMC. V případě SLA aplikace 5-azacytidinu snižovala její hodnoty u populace H33 a u mateřské rostliny H42-25 je naopak zvyšovala. V případě LDMC došlo u populace H33 ke zvýšení hodnot sušiny listu a u populace H42 naopak ke snížení hodnot. U mateřské rostliny H42-25 aplikace 5-azacytidinu hodnoty LDMC snižovala. Nápadný je přitom opačný trend změny SLA a LDMC v případě populace H33 a mateřské rostliny H42-25. U populace H33 snížení SLA a zvýšení LDMC ukazuje na reakci typickou pro stresované rostliny.

Stres a snížení biomasy jsou zdokumentované důsledky aplikace 5-azacytidinu (resp. jeho analogu zebularinu) na rostliny v jiných studiích (Verhoeven a van Gurp 2012). To je v souladu i s pozorovaným snížením iniciální biomasy po jeho aplikaci na začátku kultivačního experimentu II (viz tab. 9, obr. 13-B). U listových znaků je ale situace složitější, minimálně v jedné studii došlo ke zvýšení hodnot SLA po aplikaci zebularinu (Verhoeven a van Gurp 2012). Demetylase DNA přitom u různých organismů nevykazuje

jasné ekologické trendy. Naopak vede např. u různých druhů, populací a v jedné práci dokonce uvnitř různých linií rostlin *Arabidopsis thaliana* k různým reakcím (Bossdorf et al. 2010). Demethylace DNA tedy spíše zvyšuje epigenetickou různorodost a když následuje po stresu, může touto cestou tvořit vhodnou variabilitu pro přírodní výběr (Day a Bonduriansky 2011). Dalším možným vysvětlením pozorovaného trendu je narušení lokální epigenetické adaptace rostlin z populací H33 a H42. Existuje totiž řada důkazů pro zásadní roli metylace DNA v lokálních adaptacích např. u druhů *Arabidopsis thaliana* (Dubin et al. 2015) a *Quercus lobata* (Platt et al. 2015). Demethylace DNA pak může tuto lokální epigenetickou adaptaci odstranit a rostliny mohou vykazovat opačné trendy. Celkově statistická významnost aplikace 5-azacytidinu v modelech v této práci podtrhuje důležitost metylace DNA v reakcích rostlin na živiny a jejich změny v prostředí (Verhoeven a van Gurp 2012).

Dosavadních studií transgeneračního přenosu informace o úrovni živin v prostředí do potomků (pokud se nejedná o živinový stres) je minimum a jejich výsledky si do jisté míry vzájemně odporují. V jedné studii byl zaznamenán vliv mateřského ošetření zvýšenou koncentrací CO₂ a přidání živin a ukázalo se, že rostliny s přidávanými živinami reagují pozitivněji růstem na zvýšenou koncentraci CO₂ v prostředí potomků (Lau et al. 2008). Neplatilo to ovšem v případě přežívání druhu *Poa pratensis* a snížené přežívání bylo patrné i u dalších druhů s přidávanými mateřskými živinami v prostředí potomků se zvýšenou koncentrací CO₂ (Lau et al. 2008). V jiné práci bylo prokázáno, že ošetření mateřských rostlin živinami ovlivňuje charakteristiky klíčení u druhu *Potentilla tanacetifolia* (Li et al. 2011). Potomci měli více semen o menší hmotnosti a hůře klíčily a v kontextu této práce je důležité, že mateřské ošetření živinami nemělo téměř vůbec vliv na biomasu semenáčků potomků (Li et al. 2011). To je srovnatelný výsledek s výsledkem iniciální biomasy v této práci, kdy mateřské ošetření z kultivačního experimentu I nemělo signifikantní vliv na biomasu rostlin (měřeno ještě než byly aplikovány živiny v kultivačním experimentu II; viz tab. 9). V jiné práci menší množství mateřských živin pozitivně ovlivňovalo biomasu květních klasů u druhu *Plantago major*, když dostávaly puls živin (Miao et al. 1991). Rostliny z vyšší úrovně mateřských živin už ovlivněny nebyly (Miao et al. 1991), což poukazuje na odlišnosti v plasticitě fenotypových reakcí podle mateřského ošetření živinami. V jiné studii se ukázalo, že u části zkoumaných linií druhu *Chenopodium album* měly rostliny pěstované v mateřském ošetření s přidávanými živinami zvýšenou výšku, hmotnost, plochu listů a hmotnost listů, když byly pěstovány v ošetření s přidávanými

živinami (Wulff et al. 1999). Opět se v této studii ukázal fakt, že semena z prostředí s více živinami hůře klíčily (Wulff et al. 1999). To vše svědčí o možných komplexních reakcích v rámci epigenetické paměti na množství živin v mateřském prostředí rostlin. Zároveň je patrný nedostatek studií, dávajících do kontextu fenotypovou plasticitu (měřenou skrze funkční vlastnosti) a transgenerační paměť úrovně živin dospělých rostlin. Většina dosavadních publikovaných studií se soustředí buď úplně, nebo alespoň s větším důrazem na charakteristiky semen a případně semenáčků.

Zde je vhodné poznamenat, že tento typ práce sebou přináší v každém kroku riziko nevyváženosti designu kvůli nedostatku materiálu. V kultivačním experimentu I se to projevilo tím, že přednostně kvetly rostliny v ošetření živinami a o dost méně v kontrole a ošetření kyselinou salicylovou (viz obr. 6). Dalším problematickým krokem bylo pak klíčení, kdy opět některé misky nevyklíčily (nebo neklíčily dost na vysazení ve všech ošetřeních) a dále tak omezovaly získaný materiál z kultivačního experimentu I. Získaný materiál tedy nepokrýval ideálně ošetření u všech mateřských rostlin (proto se daly testovat vegetativní znaky v kultivačním experimentu II na úrovni 3 populací a 3 mateřských rostlin). Další omezení vyplývá z povahy práce, kdy pro uspokojivé studium epigenetické variability by bylo ideálně třeba experimenty vést několik let a sledovat možný transgenerační přenos a jeho efektivitu v následujících generacích. Transgenerační efekt živin by se mohl objevit až v dalších generacích i přes svou nepřítomnost ve zkoumané F1 generaci. Podobná práce by však byla extrémně časově i finančně náročná.

Schopnost reagovat na případné zvyšování dusíku na lokalitách apomiktických rostlin druhu *Hieracium alpinum* je tak podle výsledků této práce dána pouze jejich plasticitou a při větších změnách by pro tento druh mohly změny prostředí mít katastrofální důsledky. Rostliny by nemusely být schopny dostatečně reagovat evoluční změnou a mohlo by jim hrozit kompetitivní vyloučení ze strany druhů s většími schopnostmi kompetice o světlo. Tuto predikci na základě výsledků v této práci by však bylo třeba doplnit kompetitivními experimenty v terénu pro přesný popis důsledků nepřítomnosti epigenetické složky plasticity v reakci na změny živin u apomiktických rostlin *Hieracium alpinum*.

5. Závěr

Triploidní apomiktické rostliny *Hieracium alpinum* reagovaly v kultivačním experimentu I změnami vegetativních a generativních znaků na přidání živin, ale ne na přidání kyseliny salicylové. Po přidání živin došlo ke zvýšení biomasy a počtu listů. Méně pak rostliny reagovaly prostřednictvím listových znaků. Pravděpodobnost kvetení pozitivně ovlivňovalo ošetření přidanými živinami. Vyprodukovaná semena těchto rostlin se nelišila mezi mateřskými ošetřeními v hmotnosti ani v jejich počtu. To může vypovídat o plasticitě ve vegetativních znacích, ale o jisté konzervativnosti ve znacích generativních u triploidních apomiktických rostlin zkoumaného druhu *Hieracium alpinum*.

Mateřské ošetření přidanými živinami nemělo vliv na klíčení, rychlost klíčení ani index rychlosti klíčení u zkoumaných rostlin. Vliv na tyto klíčící charakteristiky neměla ani aplikace demetylačního činidla 5-azacytidinu.

V následném kultivačním experimentu II se ani u jedné populace a ani u jedné mateřské rostliny neprojevil signifikantní vliv mateřského ošetření. Rostliny reagovaly stejně jako v kultivačním experimentu I na přidání živin skrze zvýšení biomasy, méně pak listovými znaky SLA a LDMC. Triploidní apomiktické rostliny druhu *Hieracium alpinum* tedy pravděpodobně na změny živin v prostředí reagují spíše fenotypovou plasticitou, ale ne transgeneračními efekty. Demetylace DNA prostřednictvím 5-azacytidinu naopak měla signifikantní vliv především na hodnoty listových znaků. To potvrzuje zdokumentovaný vliv metylace DNA na fenotypové znaky a na přizpůsobování se rostlin změnám v prostředí v jiných studiích.

6. Seznam citované literatury

- Aalfs, J. D. & Kingston, R. E. (2000). What does ‚chromatin remodeling‘ mean? *Trends in Biochemical Sciences*, 25(11), 548–555.
- Ackerly, D. D. & Bazzaz, F. A. (1995). Self-shading and carbon gain in seedlings of a tropical pioneer tree. *Ecology*, 101(3), 289–298.
- Agrawal, A. A. (2002). Herbivory and maternal effects: Mechanisms and consequences of transgenerational induced plant resistance. *Ecology*, 83(12), 3408–3415.
- Agrawal, A. A., Laforsch, C. & Tollrian, R. (1999). Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature*, 401(6748), 60–63.
- Al Haj Khaled, R., Duru, M., Theau, J. P., Plantureux, S. & Cruz, P. (2005). Variation in leaf traits through seasons and N-availability levels and its consequences for ranking grassland species. *Journal of Vegetation Science*, 16(4), 391–398.
- Al-Mudaris, M. A. (1998). Notes on various parameters recording the speed of seed germination. *Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics*, 99(2), 147–154.
- Angers, B., Castonguay, E. & Massicotte, R. (2010). Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: How to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology*, 19(7), 1283–1295.
- Baker, H. G. (1965). Characteristics and mode of origin of weeds. In Baker, H. G. & Stebbins G. L. (eds.), *The genetics of colonizing species*, 147–172. New York: Academic Press.
- Baligar, V. C., Fageria, N. K. & He, Z. L. (2001). Nutrient use efficiency in plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(7–8), 921–950.
- Baligar, V.C. & Fageria, N. K. (2015). Nutrient use efficiency in plants: An overview. In Rakshit, A., Singh, H. B. & Sen, A. (2015). *Nutrient use efficiency: From basics to advances*, 1-17. India: Springer, eBook.
- Baskin, J. M. & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1), 1–16.
- Baulcombe, D. C. & Dean, C. (2014). Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9), 1–19.
- Bazzaz, F. A. (1996). *Plants in changing environments*, 1-332. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bender, J. (2004). Chromatin-based silencing mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 521–526.

- Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R. & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & Development*, 23(7), 781–783.
- Bergman, B. (1941). Studies on the embryo sac mother cell and its development in *Hieracium* subg. *Archieracium*. *Svensk botanisk Tidskrift*, 35, 1–42.
- Bloom, A. J., Chapin III, F. S. & Mooney, H. A. (1985). Resource Limitation in Plants-- An Economic Analogy. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16(1), 363–392.
- Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M., Bustamante, M., Cinderby, S., Davidson, E., Dentener, F., Emmett, B., Erisman, J-W., Fenn, M., Gilliam, F., Nordin, A., Pardo, L. & De Vries, W. (2010). Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: A synthesis. *Ecological Applications*, 20(1), 30–59.
- Bonduriansky, R. & Day, T. (2009). Nongenetic inheritance and its evolutionary implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), 103–125.
- Bossdorf, O., Arcuri, D., Richards, C. L. & Pigliucci, M. (2010). Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Evolutionary Ecology*, 24(3), 541–553.
- Boyko, A., Blevins, T., Yao, Y., Golubov, A., Bilichak, A., Ilnytskyy, Y., Hollander, J., Meins, F. & Kovalchuk, I. (2010). Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins. *PLoS ONE*, 5(3), e9514.
- Boyko, A. & Kovalchuk, I. (2011). Genome instability and epigenetic modification – heritable responses to environmental stress? *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 260–266.
- Castonguay, E. & Angers, B. (2012). The key role of epigenetics in the persistence of asexual lineages. *Genetics Research International*, 2012(1), 1-9.
- Cervera, M. T., Ruiz-García, L. & Martínez-Zapater, J. M. (2002). Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(4), 543–552.
- Cambui, C. A., Svennerstam, H., Gruffman, L., Nordin, A., Ganeteg, U. & Näsholm, T. (2011). Patterns of plant biomass partitioning depend on nitrogen source. *PLoS ONE*, 6(4), 1–7.
- Chen, L. & Chen, J. (2008). Changes of cytosine methylation induced by wide hybridization and allopolyploidy in *Cucumis*. *Genome*, 51(10), 789–799.
- Chinnusamy, V. & Zhu, J.-K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 1–7.

- Cornelissen, J. H. C., Lavorel S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D. E., Reich, P. B., ter Steege, H., Morgan, H. D., van der Heijden, M. G. A., Pausas, J. G. & Poorter, H. (2003). Handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 51(4), 335–380.
- Cosendai, A.-C., Wagner, J., Ladinig, U., Rosche, C. & Hörandl, E. (2013). Geographical parthenogenesis and population genetic structure in the alpine species *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). *Heredity*, 110(6), 560–569.
- Cubas, P., Vincent, C. & Coen, E. (1999). An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*, 401(6749), 157–161.
- Day, T. & Bonduriansky, R. (2011). A unified approach to the evolutionary consequences of genetic and nongenetic inheritance. *The American Naturalist*, 178(2), E18–36.
- Debieu, M., Tang, C., Stich, B., Sikosek, T., Effgen, S., Josephs, E., Schmitt, J., Nordborg, M., Koornneef, M. & de Meaux, J. (2013). Co-variation between seed dormancy, growth rate and flowering time changes with latitude in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 8(5), 1–12.
- Dekker, J. (2006). The three „C“ s of chromosome conformation capture: Controls, controls, controls. *Nature Methods*, 3(1), 17–21.
- Delaney, T. P. (1997). Genetic dissection of acquired resistance to disease. *Plant Physiology*, 113(1), 5–12.
- Diez, C. M., Roessler, K. & Gaut, B. S. (2014). Epigenetics and plant genome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 18(1), 1–8.
- Dubin, M. J., Zhang, P., Meng, D., Remigereau, M.-S., Osborne, E. J., Paolo Casale, F., Drewe, P., Kahles, A., Jean, G., Vilhjálmsson, B., Jagoda, J., Irez, S., Voronin, V., Song, Q., Long, Q., Rättsch, G., Stegle, O., Clark, R. M. & Nordborg, M. (2015). DNA methylation in *Arabidopsis* has a genetic basis and shows evidence of local adaptation. *eLife*, 4(e05255).
- El-Tayeb, M. A. (2005). Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 45(3), 215–224.
- Eldredge, N. & Gould, S. J. (1972). Punctuated equilibria: An alternative to phyletic gradualism. In Schopf, T. J. M. (ed.), *Models in Paleobiology*, 82–115. San Francisco: Freeman, Cooper and Company.
- Fawcett, R. S. & Slife, F. W. (1978). Effects of field applications of nitrate on weed seed germination and dormancy. *Weed Science*, 26(6), 594–596.
- Fenaux, P. (2005). Inhibitors of DNA methylation: Beyond myelodysplastic syndromes. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2(supplement 1), S36-S44.
- Feng, S., Jacobsen, S. E. & Reik, W. (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330(6004), 620–627.

- Finch-Savage, W. E. & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, *171*(3), 501–523.
- Galloway, L. F. (2005). Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New Phytologist*, *166*(1), 93–100.
- Garnier, E. & Navas, M. L. (2012). A trait-based approach to comparative functional plant ecology: Concepts, methods and applications for agroecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *32*(2), 365–399.
- Goldberg, D. E. & Miller, T. E. (1990). Effects of different resource additions on species-diversity in an annual plant community. *Ecology*, *71*(1), 213–225.
- Grant-Downton, R. T. & Dickinson, H. G. (2005). Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany*, *96*(7), 1143–1164.
- Grant-Downton, R. T. & Dickinson, H. G. (2006). Epigenetics and its implications for plant biology 2. The ‘epigenetic epiphany’: Epigenetics, evolution and beyond. *Annals of Botany*, *97*(1), 11–27.
- Grime, J. P., Cornelissen, J. H. C., Thompson, K. & Hodgson, J. G. (1996). Evidence of a causal connection between anti-herbivore defence and the decomposition rate of leaves. *Oikos*, *77*, 489–494.
- Grossniklaus, U., Kelly, W. G., Kelly, B., Ferguson-Smith, A. C., Pembrey, M. & Lindquist, S. (2013). Transgenerational epigenetic inheritance: How important is it? *Nature Reviews Genetics*, *14*(3), 228–235.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E. G. & Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, *164*(6), 728–736.
- Hautier, Y., Niklaus, P. A. & Hector, A. (2009). Competition for light causes plant biodiversity loss after eutrophication. *Science*, *324*(5927), 636–638.
- Herman, J. J. & Sultan, S. E. (2011). Adaptive transgenerational plasticity in plants: Case studies, mechanisms, and implications for natural populations. *Frontiers in Plant Science*, *2*, 1–10.
- Hodgson, J. G., Montserrat-Martí, G., Charles, M., Jones, G., Wilson, P., Shipley, B., Sharafi, M., Cerabolini, B. E. L., Cornelissen, J. H. C., Band, S. R., Bogard, A., Castro-Díez, P., Guerrero-Campo, J., Palmer, C., Pérez-Rontomé, M. C., Carter, G., Hynd, A., Romo-Díez, A., de Torres Espuny, L. & Royo Pla, F. (2011). Is leaf dry matter content a better predictor of soil fertility than specific leaf area? *Annals of Botany*, *108*(7), 1337–1345.
- Holeski, L. M. (2007). Within and between generation phenotypic plasticity in trichome density of *Mimulus guttatus*. *Journal of Evolutionary Biology*, *20*(6), 2092–2100.

- Holeski, L. M., Jander, G. & Agrawal, A. A. (2012). Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 27(11), 618–626.
- Holoch, D. & Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 16(2), 71–84.
- Chrtek, J., Jr. (1997). Taxonomy of the *Hieracium alpinum* Group in the Sudeten Mts., the West and the Ukrainian East Carpathians. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 32(1), 69–97.
- Chrtek, J., Jr. (2004). *Hieracium* L. – In: Štěpánek J. & Štěpánková J. (eds.), *Květena České republiky* 7, 540–701. Praha: Academia.
- Chrtek, J., Jr., Mráz, P. & Severa, M. (2004). Chromosome numbers in selected species of *Hieracium* s. str. (*Hieracium* subgen. *Hieracium*) in the Western Carpathians. *Preslia*, 76(2), 119–139.
- Chrtek, J., Jr. & Plačková, I. (2005). Genetic variation in *Hieracium alpinum* (Asteraceae) in the Krkonoše Mts (West Sudeten Mts, Czech Republic). *Biologia (Bratislava)*, 60(4), 1–5.
- Jablonka, E. & Lamb, M. J. (2002). The changing concept of epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 981, 82–96.
- Jablonka, E. & Lamb, M. J. (2008). Soft inheritance: Challenging the modern synthesis. *Genetics and Molecular Biology*, 31(2), 389–395.
- Jablonka, E. & Raz, G. (2009). Transgenerational epigenetic inheritance: Prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly Review of Biology*, 84(2), 131–176.
- Jablonka, E. (2012). Epigenetic variations in heredity and evolution. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(6), 683–688.
- Jablonka, E. (2013). Epigenetic inheritance and plasticity: The responsive germline. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 111(2-3), 99–107.
- Jacinto, F. V., Ballestar, E. & Esteller, M. (2008). Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): Hunting down the DNA methylome. *BioTechniques*, 44(1), 35–43.
- Javaheri, M., Mashayekhi, K., Dadkhah, A. & Tavallaee, F. Z. (2012). Effects of salicylic acid on yield and quality characters of tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(16), 1184–1187.
- Jazi, S. B., Yazdi, H. L. & Ranjbar, M. (2011). Effect of salicylic acid on some plant growth parameters under lead stress in *Brassica napus* var. *Okapi*. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 1(3), 177–186.

- Jones, P. A. (1985). Effects of 5-azacytidine and its 2'-deoxyderivative on cell differentiation and DNA methylation. *Pharmacology & Therapeutics*, 28(1), 17–27.
- Kalisz, S. & Purugganan, M. D. (2004). Epialleles via DNA methylation: Consequences for plant evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(6), 309–314.
- Karlıdag, H., Yildirim, E. & Turan, M. (2009). Exogenous applications of salicylic acid affect quality and yield of strawberry grown under antifrost heated greenhouse conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(2), 270–276.
- Karlsson, L. M. & Milberg, P. (2007). A comparative study of germination ecology of four *Papaver* taxa. *Annals of Botany*, 99(5), 935–946.
- Khandaker, L., Masum Akond, A. & Oba, S. (2011). Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compounds in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.). *Vegetable Crops Research Bulletin*, 74(1), 77–86.
- Khraiwesh, B., Zhu, J.-K. & Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2), 137–148.
- Kou, H. P., Li, Y., Song, X. X., Ou, X. F., Xing, S. C., Ma, J., Von Wettstein, D. & Liu, B. (2011). Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 168(14), 1685–1693.
- Lacey, E. P. & Herr, D. (2000). Parental effects in *Plantago lanceolata* L. III. Measuring parental temperature effects in the field. *Evolution*, 54(4), 1207–1217.
- Latzel, V. & Klimešová, J. (2010). Transgenerational plasticity in clonal plants. *Evolutionary Ecology*, 24(6), 1537–1543.
- Latzel, V., Zhang, Y., Karlsson Moritz, K., Fischer, M. & Bossdorf, O. (2012). Epigenetic variation in plant responses to defence hormones. *Annals of Botany*, 110(7), 1423–1428.
- Lau, J. A., Peiffer, J., Reich, P. B. & Tiffin, P. (2008). Transgenerational effects of global environmental change: Long-term CO₂ and nitrogen treatments influence offspring growth response to elevated CO₂. *Oecologia*, 158(1), 141–150.
- Lavorel, S., Díaz, S. & Cornelissen, J. (2007). Plant functional types: Are we getting any closer to the Holy Grail? In: Canadell, J. G., Pataki, D. E. & Pitelka, L. F. (eds.), *Terrestrial Ecosystems in a Changing World*, 149–160. Berlin: Heidelberg.
- Lechat, M. M., Brun, G., Montiel, G., Véronési, C., Simier, P., Thoiron, S., Pouvreau, J.-B. & Delavault, P. (2015). Seed response to strigolactone is controlled by abscisic acid-independent DNA methylation in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel. *Journal of Experimental Botany*, 66(11), 3129–3140.

- Lee, H. S. & Chen, Z. J. (2001). Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6753–6758.
- Li, Y., Yang, H., Xia, J., Zhang, W., Wan, S. & Li, L. (2011). Effects of increased nitrogen deposition and precipitation on seed and seedling production of *Potentilla tanacetifolia* in a temperate steppe ecosystem. *PLoS ONE*, 6(12), 1–8.
- Li, Y., Hou, L., Song, B., Yang, L. & Li, L. (2017). Effects of increased nitrogen and phosphorus deposition on offspring performance of two dominant species in a temperate steppe ecosystem. *Scientific Reports*, 7, 1–11.
- Lynch, M. (1984). Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *Quarterly Review of Biology*, 59(3), 257–290.
- Lynch, M., Bürger, R., Butcher, D. & Gabriel, W. (1993). The mutational meltdown in asexual populations. *The Journal of Heredity*, 84(5), 339–44.
- Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V. & Ton, J. (2012). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, 158(2), 844–853.
- Macleod, D., Clark, V. H. & Bird, A. (1999). Absence of genome-wide changes in DNA methylation during development of the zebrafish. *Nature Genetics*, 23(2), 139–140.
- Miao, S. L., Bazzaz, F. A. & Primack, R. B. (1991). Effects of maternal nutrient pulse on reproduction of two colonizing *Plantago* species. *Ecology*, 72(2), 586–596.
- Mousseau, T. & Fox, C. W. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(10), 403–407.
- Mráz, P., Chrtek, J., Jr. & Šingliarová, B. (2009). Geographical parthenogenesis, genome size variation and pollen production in the arctic-alpine species *Hieracium alpinum*. *Botanica Helvetica*, 119(1), 41–51.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research*, 106(1), 2–9.
- Nadelhoffer, K. J., Emmett, B. A., Gundersen, P., Kjønaas, O. J., Koopmans, C. J., Schleppi, P., Tietema, A. & Wright, R. F. (1999). Nitrogen deposition makes a minor contribution to carbon sequestration in temperate forests. *Nature*, 398(6723), 145–148.
- Paszkowski, J. & Grossniklaus, U. (2011). Selected aspects of transgenerational epigenetic inheritance and resetting in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(2), 195–203.
- Pezzani, F. & Montaña, C. (2006). Inter- and intraspecific variation in the germination response to light quality and scarification in grasses growing in two-phase mosaics of the Chihuahuan Desert. *Annals of Botany*, 97(6), 1063–1071.

- Phoenix, G. K., Hicks, W. K., Cinderby, S., Kuylenstierna, J. C. I., Stock, W. D., Dentener, F. J., Giller, K. E., Austin, A. T., Lefroy, R. D. B., Gimeno, B. S., Ashmore, M. R. & Ineson, P. (2006). Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: The need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology*, 12(3), 470–476.
- Pigliucci, M. (2007). Do we need an extended evolutionary synthesis? *Evolution*, 61(12), 2743–2749.
- Platt, A., Gugger, P. F., Pellegrini, M. & Sork, V. L. (2015). Genome-wide signature of local adaptation linked to variable CpG methylation in oak populations. *Molecular Ecology*, 24(15), 3823–3830.
- R Development Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.
- Rapp, R. A. & Wendel, J. F. (2005). Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist*, 168(1), 81–91.
- Richards, E. J. (2006). Inherited epigenetic variation — revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 7(5), 395–401.
- Rivas-San Vicente, M. & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321–3338.
- Roach, D. A. & Wulff, R. D. (1987). Maternal Effects in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 209–235.
- Sala, O. E., Chapin III, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D. M., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Leroy Puff, N., Sykes, M. T., Walker, B. H., Walker, M. & Wall, D. H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287(5459), 1770–1774.
- Sayyari, M., Ghavami, M., Ghanbari, F. & Kordi, S. (2013). Assessment of salicylic acid impacts on growth rate and some physiological parameters of lettuce plants under drought stress conditions. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(17), 1951–1957.
- Schrey, A. W., Richards, C. L., Meller, V., Sollars, V. & Ruden, D. M. (2012). The role of epigenetics in evolution: The extended synthesis. *Genetics Research International*, 2012, 1–3.
- Singh, B. & Usha, K. (2003). Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, 39(2), 137–141.
- Skawińska, R. (1963). Apomixis in *Hieracium alpinum* L. *Acta Biologica Cracoviensia*, 5, 7–14.

- Sultan, S. E. (1996). Phenotypic plasticity for offspring traits in *Polygonum persicaria*. *Ecology*, 77(6), 1791–1807.
- Sultan, S. E., Barton, K. & Wilczek, A. M. (2009). Contrasting patterns of transgenerational plasticity in ecologically distinct congeners. *Ecology*, 90(7), 1831–1839.
- Sasaki, M., Anast, J., Bassett, W., Kawakami, T., Sakuragi, N. & Dahiya, R. (2003). Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: A sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(2), 305–309.
- Stelmach, A. & Nerlich, B. (2015). Metaphors in search of a target: The curious case of epigenetics. *New Genetics and Society*, 34(2), 196–218.
- Štorchová, H., Chrtek, J., Jr., Bartish, I. V., Tetera, M., Kirschner, J. & Štěpánek, J. (2002). Genetic variation in agamosperous taxa of *Hieracium* sect. *Alpina* (Compositae) in the Tatry Mts. (Slovakia). *Plant Systematics and Evolution*, 235(1-4), 1–17.
- Takeda, S. & Paszkowski, J. (2006). DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Chromosoma*, 115(1), 27–35.
- Thu, K. L., Pikor, L. A., Kennett, J. Y., Alvarez, C. E. & Lam, W. L. (2010). Methylation analysis by DNA immunoprecipitation. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3), 522–531.
- Tilman, D. (1986). Nitrogen-limited growth in plants from different successional stages. *Ecology*, 67(2), 555–563.
- Tilman, D. (1987). Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients. *Ecological Monographs*, 57(3), 189–214.
- Van Dam, N. M. & Baldwin, I. T. (2001). Competition mediates costs of jasmonate-induced defences, nitrogen acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotiana attenuata*. *Functional Ecology*, 15(3), 406–415.
- Vergeer, P., Wagemaker, N. & Ouborg, N. J. (2012). Evidence for an epigenetic role in inbreeding depression. *Biology Letters*, 8(5), 798–801.
- Verhoeven, K. J. F., Jansen, J. J., van Dijk, P. J. & Biere, A. (2010). Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist*, 185(4), 1108–1118.
- Verhoeven, K. J. F. & van Gorp, T. P. (2012). Transgenerational effects of stress exposure on offspring phenotypes in apomictic dandelion. *PLoS One*, 7(6), 1–8.
- Verhoeven, K. J. F. & Preite, V. (2014). Epigenetic variation in asexually reproducing organisms. *Evolution*, 68(3), 644–655.

- Waddington, C. H. (2012). The epigenotype (reprint). *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10–13.
- Wagmann, K., Hautekèete, N. C., Piquot, Y., Meunier, C., Schmitt, S. E. & Van Dijk, H. (2012). Seed dormancy distribution: Explanatory ecological factors. *Annals of Botany*, 110(6), 1205–1219.
- Walker, E. L. (1998). Paramutation of the *r1* locus of maize is associated with increased cytosine methylation. *Genetics*, 148(4), 1973–1981.
- Welch, M. D. & Meselson, M. (2000). Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science*, 288(5469), 1211–1215.
- Westoby, M. (1998). A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant and Soil*, 199(2), 213–227.
- Whittle, C. A., Otto, S. P., Johnston, M. O. & Krochko, J. E. (2009). Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in *Arabidopsis thaliana*. *Botany*, 87(6), 650–657.
- Wilson, P. J., Thompson, K. & Hodgson, J. G. (1999). Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytologist*, 143(1), 155–162.
- Wilson, S. D. & Tilman, D. (1991). Components of plant competition along an experimental gradient of nitrogen availability. *Ecology*, 72(3), 1050–1065.
- Witkowski, E. T. F. & Lamont, B. B. (1991). Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia*, 88(4), 486–493.
- Wulff, R. D., Causin, H. F., Benitez, O. & Bacalini, P. A. (1999). Intraspecific variability and maternal effects in the response to nutrient addition in *Chenopodium album*. *Canadian Journal of Botany*, 77(8), 1150–1158.
- Yaish, M. W., Peng, M. & Rothstein, S. J. (2014). Global DNA methylation analysis using methyl-sensitive amplification polymorphism (MSAP). In: Sanchez-Serrano, J. J. & Salinas, J. (eds.), *Arabidopsis Protocols*, vol 82, 285–299. New York: Humana Press.
- Zagris, N. & Podimatas, T. (1994). 5-Azacytidine changes gene expression and causes developmental arrest of early chick embryo. *International Journal of Developmental Biology*, 38(4), 741–744.
- Zhang, Y. Y., Fischer, M., Colot, V. & Bosserdorf, O. (2013). Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, 197(1), 314–322.

7. Seznam obrázků

Obrázek 1 - Grafické znázornění průběhu diplomové práce.	23
Obrázek 2 - Grafické znázornění molekuly cytidinu, 5-metyl cytidinu a 5-azacytidinu.	26
Obrázek 3 - Experimentální design kultivačního experimentu II	28
Obrázek 4 - Grafy srovnávající populační průměry měřených znaků v kultivačním experimentu I (1).....	34
Obrázek 5 - Grafy srovnávající populační průměry měřených znaků v kultivačním experimentu I (2).....	35
Obrázek 6 - Graf pravděpodobnosti kvetení v kultivačním experimentu I.....	37
Obrázek 7 - Boxplot hmotnosti semene v kultivačním experimentu I.....	39
Obrázek 8 - Boxplot velikosti úboru (počtu květů na úbor) v kultivačním experimentu I	40
Obrázek 9 - Boxplot klíčivosti populace H33.....	41
Obrázek 10 - Boxplot klíčivosti populací H33, H42 a H99 v ošetření N	42
Obrázek 11 - Boxplot indexu rychlosti klíčení populace H33	43
Obrázek 12 - Boxplot indexu rychlosti klíčení populací H33, H42 a H99 v ošetření N.....	44
Obrázek 13 - Boxploty iniciální biomasy v kultivačním experimentu II.....	48
Obrázek 14 - Boxploty fenotypových vlastností v kultivačním experimentu II (1).	50
Obrázek 15 - Boxploty fenotypových vlastností v kultivačním experimentu II (2).	51
Obrázek 16 - Boxploty fenotypových vlastností v kultivačním experimentu II (3).	52
Obrázek 17 - Boxploty fenotypových vlastností v kultivačním experimentu II (4)	53
Obrázek 18 - Ukázka fenotypové reakce rostlin na ošetření z kultivačního pokusu I.	78
Obrázek 19 - Pohled na kultivační pokus II ve skleníku (1).....	78
Obrázek 20 - Pohled na kultivační pokus II ve skleníku (2).....	79

8. Seznam tabulek

Tabulka 1 - Charakteristiky populací ze kterých byla použita semena k transgeneračnímu pokusu.	22
Tabulka 2 - Počty dostupných ošetření (misek v růstové komoře) z kultivačního experimentu I.	27
Tabulka 3 - Výsledky lineárních modelů v kultivačním experimentu I (1).	31
Tabulka 4 - Výsledky lineárních modelů v kultivačním experimentu I (2).	31
Tabulka 5 - Počty vykvetlých rostlin v kultivačním experimentu I.	38
Tabulka 6 - Počty dostupných opakování v klíčícím experimentu	40
Tabulka 7 - Výsledky lineárních modelů v kultivačním experimentu II (1).	45
Tabulka 8 - Výsledky lineárních modelů v kultivačním experimentu II (2).	46
Tabulka 9 - Výsledek lineárního modelu iniciální biomasy v kultivačním experimentu II.	47

9. Přílohy

Obrázek 18 - Ukázka fenotypové reakce triploidních apomiktických rostlin *Hieracium alpinum* z pěti populací (zkratky H42, H99, H87, H33 a H20) ve třech ošetřeních (S = ošetření kyselinou salicylovou, K = kontrola, N = ošetření přidanými živinami) z kultivačního pokusu I.



Obrázek 19 - Pohled na kultivační pokus II ve skleníku



Obrázek 20 - Pohled na kultivační pokus II ve skleníku

