

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Zbytková sexualita fakultativně apomiktického druhu

Pilosella officinarum



Diplomová práce

Markéta Skácelová

Studijní program: biologie, studijní obor: botanika

Forma studia: prezenční

Vedoucí práce: prof. RNDr. František Krahulec, CSc.

Olomouc 2014

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Markéta Skácelová

Název práce: Zbytková sexualita fakultativně apomiktického druhu *Pilosella officinarum*

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

Vedoucí práce: prof. RNDr. František Krahulec, CSc.

Rok obhajoby: 2014

Abstrakt: Rod *Pilosella* (syn. *Hieracium* subgen. *Pilosella*) je charakteristický velkým počtem ploidních úrovní, hybridizací a rozmanitostí systémů reprodukce. Jedním ze způsobů rozmnožování je pomocí asexuálně vzniklých semen, tzv. apomixe (agamospermie). Fakultativní apomikty někdy od tohoto způsobu ustoupí a dojde k sexuálnímu oplození u samičí rostliny. Současné studie ukazují, že apomiktické rostliny produkují variabilnější potomstvo než sexuální jedinci. Cílem této práce bylo zjistit, zda je to tak i u *P. officinarum* (6x, apomikt). Tento druh byl použit v reciprokém křížení v experimentálních podmínkách s *P. bauhini* (4x, sexuální). Oba tyto druhy byly sbírány ve Slovenské republice. Pomocí stanovení DNA ploidie na cytometru bylo zjištěno, že v potomcích *P. officinarum* převažují hexaploidy z apomixe s minimem hybridních oktoploidů (2n+n hybridů). Mezi potomky *P. bauhini* pak tetraploidy s minimem pentaploidních hybridů. Vysoký podíl tetraploidů ukazuje na vliv tzv. *mentor effectu*, kdy dojde k prolomení self-inkompatibility směsí vlastního a cizího pylu. Výsledky byly srovnány se studií z České republiky, kde šlo o křížení druhů *P. officinarum* (4x, sexuální) a *P. bauhini* (6x, apomikt).

Klíčová slova: *Pilosella officinarum*, zbytková sexualita, mentor effect, DNA ploidní úroveň, variabilita potomstva

Počet stran: 44

Počet příloh: 5

Jazyk: čeština

Bibliographic identification

Writer's first and last name: Markéta Skácelová

Thesis title: Residual sexuality of facultative apomictic species *Pilosella officinarum*

Thesis type: Diploma thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

Supervisor: prof. RNDr. František Krahulec, CSc.

Year of thesis presentation: 2014

Abstract: The genus of *Pilosella* (syn. *Hieracium* subgen. *Pilosella*) is distinguished by a great number of ploidy levels, hybridization and a variety of reproduction systems. One of the ways of reproduction is through asexual seeds, so-called apomixis (agamospermy). Facultative apomicts sometimes back off this kind of reproduction and then there occurs sexual fertilization in a female plant. The current data studies reflect that apomictic plants produce more variable progeny than sexual individuals. The aim of this thesis was to find out whether this also happens to *P. officinarum* (6x, apomict). This species was used in a reciprocal cross in the experimental conditions with *P. bauhini* (4x, sexual). Both of these species were collected in the Slovak Republic. By means of determination of DNA ploidy level by cytometer, there was found out that in progeny of *P. officinarum*, there prevail hexaploids from apomixis with minimum octoploid hybrids ($2n + n$ hybrids). Among the progeny of *P. bauhini*, there predominate then tetraploids with minimum pentaploid hybrids. A high rate of the tetraploids points to the influence of the so-called mentor effect, when it comes to the breakdown of self-incompatibility in the mixture of self and alien pollen. The results were compared to the study from the Czech Republic which was concerned about crossing species of *P. officinarum* (4x, sexual) and *P. bauhini* (6x, apomict).

Keywords: *Pilosella officinarum*, residual sexuality, mentor effect, DNA ploidy level, variability of progeny

Number of pages: 44

Number of appendices: 5

Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Františka Krahulce, CSc. s použitím citované literatury.

V Olomouci 11. 8. 2014

Podpis:

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	VIII
SEZNAM TABULEK.....	IX
SEZNAM ZKRATEK.....	X
PODĚKOVÁNÍ.....	XI
1 ÚVOD	1
1.1 ROLE ZBYTKOVÉ SEXUALITY U APOMIKTICKÉHO KOMPLEXU PILOSELLA.....	2
2 CÍLE PRÁCE.....	5
3 MATERIÁL A METODY.....	6
3.1 CHARAKTERISTIKA STUDOVANÝCH DRUHŮ.....	6
3.2 SBĚR ROSTLIN.....	8
3.3 EXPERIMENTÁLNÍ KŘÍŽENÍ PILOSELLA OFFICINARUM A P. BAUHINI	9
3.3.1 Práce se sesbíranými nažkami.....	11
3.4 STANOVENÍ DNA PLOIDNÍ ÚROVNĚ	12
4 VÝSLEDKY	14
4.1 MATEŘSKÉ ROSTLINY JAKO STANDARD	14
4.2 PODÍL ZBYTKOVÉ SEXUALITY A VARIABILITA KLONŮ P. OFFICINARUM.....	16
5 DISKUSE.....	19
5.1 ZASTOUPENÍ CYTOTYPŮ POTOMSTVA V PŘÍRODĚ.....	19
5.2 VÝBĚR STANDARDŮ	20
5.3 ZBYTKOVÁ SEXUALITA A DALŠÍ JEVY V ROZMNOŽOVÁNÍ.....	21
5.3.1 <i>P. officinarum</i> jako mateřská rostlina.....	21
5.3.1.1 Polyhaploidní rostliny.....	22
5.3.2 <i>P. bauhini</i> jako mateřská rostlina a vliv mentor effectu	23
5.3.3 Potomstvo s nejasným stupněm ploidity.....	24
5.4 SROVNÁNÍ S VÝSLEDKY KŘÍŽENÍ KOMPLEMENTÁRNÍCH ROSTLIN (PROVEDENÝCH R. ROSENBAUMOVOU).....	25
5.5 VYŠŠÍ STUPNĚ PLOIDÍ.....	28
6 ZÁVĚR.....	30
7 LITERATURA.....	31
PŘÍLOHA 1: PŘEHLED KŘÍŽENÍ MEZI PILOSELLA OFFICINARUM A P. BAUHINI.....	37
PŘÍLOHA 2: SESBÍRANÉ NAŽKY A VZEŠLÉ SEMENÁČKY	38

PŘÍLOHA 3: MAPA ROZŠÍŘENÍ CYTOTYPŮ <i>P. OFFICINARUM</i>.....	39
PŘÍLOHA 4: FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE	40
PŘÍLOHA 5: TABULKY HODNOT Z DRUHÉHO MĚŘENÍ NA CYTOMETRU	42

Seznam obrázků

OBRÁZEK 1 - <i>PILOSELLA BAUHINI</i> ; © F. KRAHULEC.....	6
OBRÁZEK 2 - <i>PILOSELLA OFFICINARUM</i> ; © F. KRAHULEC.....	7
OBRÁZEK 3 - LOKALITY SESBÍRANÝCH ROSTLIN.....	9
OBRÁZEK 4 - MODEL RECIPROKÉHO KŘÍŽENÍ U <i>P. OFFICINARUM</i> A <i>P. BAUHINI</i>	10
OBRÁZEK 5 - HODNOTY MĚŘENÍ MATEŘSKÝCH ROSTLIN V HISTOGRAMECH.....	15
OBRÁZEK 6 - PŘÍKLAD HISTOGRAMŮ POTOMKŮ PLOIDNĚ ODLIŠNÝCH OD MATEŘSKÝCH ROSTLIN	18
OBRÁZEK 7 – SROVNÁNÍ PROPORCÍ JEDNOTLIVÝCH TYPŮ POTOMKŮ Z RECIPROKÉHO KŘÍŽENÍ	27
OBRÁZEK 8 - CYTOTYPY <i>P. OFFICINARUM</i> V ČESKÉ REPUBLICE, SLOVENSKU A SV MAĎARSKU.....	39
OBRÁZEK 9 - ZAKRYTÍ ROSTLIN PŘI EXPERIMENTÁLNÍM KŘÍŽENÍ Z PRŮHONIC	40
OBRÁZEK 10 - KLÍČÍCÍ SEMENÁČEK; © AUTOR PRÁCE.....	40
OBRÁZEK 11 - SEMENÁČKY PŘED PŘESAZENÍM DO SADBOVAČE; © AUTOR PRÁCE.....	41
OBRÁZEK 12 - VĚTŠÍ SEMENÁČE V SADBOVAČI; © AUTOR PRÁCE.....	41

Seznam tabulek

TABULKA 1 - MODEL RECIPROKÉHO KŘÍŽENÍ U <i>P. OFFICINARUM</i> A <i>P. BAUHINI</i>	11
TABULKA 2 - HODNOTY MĚŘENÍ MATEŘSKÝCH ROSTLIN POUŽITÝCH K MĚŘENÍ JAKO STANDARD.....	14
TABULKA 3 - HODNOTY TEORETICKÉHO INDEXU A GENOMU	14
TABULKA 4 - FREKVENCE CYTOTYPŮ ZMĚŘENÉHO POTOMSTVA.....	16
TABULKA 5 - PŘEHLED ROSTLIN PLOIDNĚ ODLIŠNÝCH OD MATEŘSKÝCH ROSTLIN.....	17
TABULKA 6 - SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ EXPERIMENTÁLNÍHO KŘÍŽENÍ S VÝSLEDKY R. ROSENBAUMOVÉ	26
TABULKA 7 – SROVNÁNÍ RECIPROKÝCH KŘÍŽENÍ	28
TABULKA 8 - PŘEHLED EXPERIMENTÁLNÍHO KŘÍŽENÍ.....	37
TABULKA 9 - POČTY NAŽEK A SEMENÁČKŮ.....	38
TABULKA 10 – HODNOTY MĚŘENÍ PRO VZORKY (SEMENÁČE) OD MATEŘSKÉ ROSTLINY BA_1940.....	42
TABULKA 11 – HODNOTY MĚŘENÍ PRO VZORKY (SEMENÁČE) OD MATEŘSKÉ ROSTLINY BA_1959.....	43
TABULKA 12 – HODNOTY MĚŘENÍ PRO VZORKY (SEMENÁČE) OD MATEŘSKÉ ROSTLINY PI_1939	43
TABULKA 13 – HODNOTY MĚŘENÍ PRO VZORKY (SEMENÁČE) OD MATEŘSKÉ ROSTLINY PI_1960	43
TABULKA 14 – HODNOTY MĚŘENÍ PRO VZORKY (SEMENÁČE) OD MATEŘSKÉ ROSTLINY PI_2052	44
TABULKA 15 – HODNOTY MĚŘENÍ PRO VZORKY (SEMENÁČE) OD MATEŘSKÉ ROSTLINY PI_2076	44

Seznam zkratek

cca - přibližně

BA – *Pilosella bauhini*

CV – koeficient variace

ČR – Česká republika

DNA – deoxyribonukleová kyselina

pg – pikogramy

PI – *Pilosella officinarum*

PI – propidium jodid

SI – self-inkompatibilita

SK – Slovenská republika (Slovensko)

SV / VSV / SZ – severovýchod, východoseverovýchod, severozápad

Zkratky použité v citované literatuře jsou uváděny podle portálu *Web of Science*.

Poděkování

Za pomoc při zpracování mé diplomové práce chci poděkovat především svému vedoucímu práce prof. RNDr. Františku Krahlcovi, CSc. Děkuji také RNDr. Anně Krahlcové, CSc. za pomoc při výběru vhodné metodiky a za uvedení do problematiky v měření na cytometru. Za seznámení s celou prací na cytometru a cenné rady děkuji Mgr. Michalovi Hronešovi. Dále děkuji Fytopatologickému oddělení za poskytnutí zázemí v jejich části skleníku a pomoc při pečování o rostliny. Za kontrolu anglického překladu abstraktu děkuji Mgr. Evě Vilímkové. V neposlední řadě děkuji mé rodině za podporu během celého studia. Za trpělivost, se kterou mě podporovali a pomáhali mi během tvorby mé diplomové práce. Děkuji také svému příteli a dalším lidem, kteří mi byli oporou.



© web2.mendelu.cz

Věda je účinná protilátka proti jedu nekritického myšlení a pověr.

(Adam Smith, 1723 – 1790)

1 Úvod

Rod *Pilosella* (syn. *Hieracium* subgen. *Pilosella*) řadíme z hlediska středoevropské flóry ke složitějším. Dosud popsané množství taxonů je způsobeno velkým počtem ploidních úrovní (cytotypů), hybridizací a rozmanitostí systémů reprodukce. Taxony jsou většinou popsány na úrovni poddruhů. Tato skupina je předmětem zájmu botaniků již přes 150 let, práce s druhy tohoto rodu stála i u počátků genetiky (Mendel 1869). Například společně s rody *Erigeron*, *Taraxacum* nebo druhem *Hypericum perforatum* (Matzk et al. 2001, van Dijk et al. 2003) patří mezi významné z hlediska studia apomixe dvouděložných rostlin. Podle nomenklatury byl tento rod vyčleňován jako podrod rodu *Hieracium*. Toto se týkalo především střední Evropy. V posledních letech je řazen jako samostatný rod (Bräutigam & Greuter 2007). V této práci je uznáván současný trend.

V rodu *Pilosella* (Hill) Gray rozlišujeme dva typy druhů. Nazýváme je základní druhy a přechodné druhy. Přechodné druhy jsou zřejmě hybridního původu. Dalšími hybridy mohou být propojeny s druhy základními. Od současných přechodných druhů se starobylejší druhy této skupiny mírně liší morfologicky i rozšířením. Základní druhy jsou podle dřívějších taxonomických studií charakterizovány specifickými morfologickými znaky. Znaků přechodných druhů jsou kombinací dvou a více základních druhů. Základních druhů je přibližně 25.

Rod *Pilosella* je charakterizován velkou variabilitou a kombinacemi různých reprodukčních systémů (Koltunow 1993). Způsoby reprodukce můžeme rozdělit podle způsobu vzniku a fúze gamet a podle původu gamet (Krahulec et al. 2011a). První způsob zahrnuje vznik redukovaných (n) či neredukovaných ($2n$) gamet, které mohou dále vstupovat do sexuálního procesu (fúze gamet) nebo se semeno vytvoří partenogeneticky (haploidní či somatická partenogeneze (agamospermie)). Pro experimentální práci je důležitá i ta okolnost, že endosperm vzniká autonomně, tj. není pro jeho vznik důležité opylení.

Agamospermií a vegetativním rozmnožováním vznikají jedinci, kteří jsou identičtí se svou mateřskou rostlinou (klony). V dnešní době věda agamospermií (apomixií) označuje rozmnožování pomocí asexuálně vzniklých semen. Haploidní partenogenezi vzniká potomstvo z mateřské redukované gamety, které má tedy poloviční počet

chromozomů, než má mateřská rostlina. Potomstvo může vzniknout i z neredukovaných gamet. Jednoduchý přehled způsobů reprodukce je uveden na obr. 4, tab. 1. Partenogenetický vývoj embrya je jeden ze základních elementů apomixie u rostlin (Rosenbaumová et al. 2012). Současné experimenty s křížením ukazují u recentních hybridů nižší pronikavost apomixie a produkci více polyhaploidních a hybridních potomků. Naopak je tomu u stabilizovaných hybridogenních taxonů stejného původu (Krahulec et al. 2008; Krahulcová et al. 2011).

Pokud se podíváme na reprodukční systémy z pohledu původu gamet, rozlišujeme autogamii a alogamii. Autogamie (samoopylení) byla u rodu *Pilosella* popírána. V případě, že se na blizně vyskytuje současně pyl vlastní i cizí rostliny, dojde k potlačení inhibice klíčení pylu vlastní rostliny (potlačení autoinkompatibility). Celý tento proces označujeme jako tzv. *mentor effect* (Krahulcová et al. 1999).

Překrývající se účinky polyploidie (základní chromosomové číslo $x = 9$), hybridizace, fakultativní apomixie a klonální růst způsobují změny v přírodních populacích tohoto polyploidního agamického komplexu (Krahulcová et al. 2000, Fehrer et al. 2007). Studie polyploidních populací apomiktických a sexuálních biotypů u rodu *Pilosella* ukázala, že fakultativně apomiktické matky mají rozmanitější způsoby reprodukce než matky sexuální (Krahulcová et al. 2009a, 2014; Rosenbaumová & Krahulec 2014). Ve zmíněné studii byly vybrány dva druhy z populací na lokalitách Praha-Vysočany a Kamenný kopec u Brna. Jedná se o *Hieracium bauhini* a *H. pilosella*. Role vysoce polyploidních $2n+n$ hybridů vzniklých mezi fakultativně apomiktickou matkou a sexuálním pylem otce je možným zdrojem polyploidizace a způsobů rozmnožování v přirozených populacích rodu *Pilosella*.

1.1 Role zbytkové sexuality u apomiktického komplexu *Pilosella*

U fakultativních apomiktů převažuje produkce semen asexuálním způsobem. Tento způsob obchází meiózu (Tucker & Koltunow 2009). Někdy může být kombinován s občasným sexuálním oplozením u samičí rostliny, apomiktické rostliny také slouží jako zdroj pylu, který vytvářejí meiosou. Zbytkovou sexualitou je v této práci myšlený vznik potomků jiným způsobem, než agamospermií (splynutím redukovaných nebo neredukovaných gamet, haploidní partenogenezí). Závislost na oplodnění nezesnadňuje

pouze experimentální studie rodu (*Hieracium* subgen. *Pilosella*), ale také zkoumání procesů, které modelují populační strukturu v prostředí (Krahulcová et al. 2014). Apomiktické rozmnožování je výhodné pro upevnění a šíření upraveného genotypu v přirozeném prostředí těchto rostlin. Genetická diverzita zlepšuje kolonizační schopnost a umožňuje také reagovat na změny prostředí fakultativně apomiktických rostlin produkcí nových genotypů.

Většina studií o zbytkové sexualitě byla zaměřena na apomiktické rostliny potenciálně agrikurního významu (Krahulcová et al. 2014), naopak u planě rostoucích apomiktů je stále špatně prozkoumaná. V přirozeném prostředí Chapman et al. (2000) zaznamenali, že zbytková sexualita se stala zdrojem variability u potomků *Pilosella officinarum* na Novém Zélandu. Rostlina zde byla zavlečená v 19. století jako komplex obsahující pouze polyploidní apomikty. Expres apomixe nebo sexuality, zvláště u hybridů z apomiktických a sexuálních rodičů, se může lišit mezi jednotlivými hybridními genotypy (Krahulcová et al. 2011). Bylo dokonce zjištěno, že početné populace fakultativních apomiktů a sexuálních druhů *Pilosella* mohou společně koexistovat a hybridizovat (např. Krahulec et al. 2004, 2008; Křišťálová et al. 2010). Zdá se, že zbytková sexualita přispívá k formování nových biotypů v hybridizujících populacích. Konkrétní výskyt zbytkové sexuality v rodu *Pilosella* byl zaznamenán, pokud byla při křížení použita mateřská apomiktická rostlina (např. *P. aurantiaca*, *P. caespitosa*, *P. bauhini*) nebo apomiktický biotyp *P. officinarum*.

Systematické studium zbytkové sexuality bylo u nás zahájeno studiem potomstva vzniklého křížením *P. rubra* (hexaploid, apomikt) a *P. officinarum* (tetraploid, sexuální dárce pylu) (Krahulcová et al. 2004, 2011; Krahulec et al. 2006; Rosenbaumová et al. 2012). Použitá kombinace cytotypů byla stejná, jakou jsem použila v této práci, protože umožnila rozlišit vzniklé cytotypy podle kombinace ploidií gamet.

Pro tuto práci byly populace sbírány ve Slovenské republice (viz Metodika). Byly pečlivě vybírány tak, aby jednotlivé ploidie vyhovovaly uspořádání experimentu. Některé z těchto kombinací se v přírodě vyskytují a několik produktů křížení zde také normálně roste. V České republice (oblast Čech) je velmi podobná situace (Rosenbaumová & Krahulec 2014). Oba druhy rostlin (*P. bauhini* a *P. officinarum*) mají obdobný stejný stupeň ploidiie a způsob rozmnožování. V Čechách je však hexaploidním apomiktem *P. bauhini* a *P.*

officinarum je tetraploidní sexuální; na Slovensku je *P. bauhini* tetraploidní a sexuální a *P. officinarum* hexaploidní apomikt. V této práci i ve studii v Čechách bylo použito více opakování, tedy kombinace více různých genotypů. Tímto složením ploidii můžeme zjistit způsob vzniku již podle velikosti ploidie potomků. Není však možné zjistit autogamii u apomiktické matky, která se vyskytuje jen v malém procentu. Křížící se sexuální a fakultativně apomiktické biotypy, které mají rozdílnou ploidii a žijí spolu v rozdílném prostředí, poskytují systém vhodný pro hodnocení jejich role v diverzifikaci potomstva, zvláště s ohledem na ploidní stupeň a způsob reprodukce (Krahulcová et al. 2009a).

2 Cíle práce

Rozmanitost rozmnožovacích způsobů v rodu *Pilosella* je velmi zajímavým jevem. Především fakultativně apomiktické rostliny tvoří významný článek z hlediska evoluce. Variabilita jejich potomstva na úrovni ploidii je mnohem větší než u typů zcela sexuálních, které mají pravidelnou meiózu. Tato práce se zaměřuje na velikost stupně zbytkové sexuality *Pilosella officinarum*.

Hlavní cíle práce jsou následující:

- 1) Zjistit stupeň zbytkové sexuality hexaploidního apomikta *P. officinarum* jako mateřské rostliny pomocí reciprokého křížení.
- 2) Ověřit variabilitu mezi klony *P. officinarum*.
- 3) Zjistit, které typy potomstva se v přírodě (ne)vyskytují.
- 4) Zjistit, zda jsou rozdíly ve výsledcích křížení ve srovnání s reciprokým křížením *P. bauhini* (6x, apomikt) a *P. officinarum* (4x, sexuál) provedeným R. Rosenbaumovou (Rosenbaumová & Krahulec 2014).

3 Materiál a metody

3.1 Charakteristika studovaných druhů

Jestřábník Bauhinův

Pilosella bauhini (Schult.) Arv. – Touv. subsp. *magyarica* (Peter) S. Bräut

Jedná se o vytrvalou bylinu tvořící přizemní růžici s řapíkatými listy. Tvoří dlouhé nadzemní výběžky (až 30 cm). Často bývají fialově naběhlé. Listy výběžků se směrem ke konci zmenšují. Lodyhu má přímou, podélně rýhovanou. Listy jsou celokrajné, lysé nebo na okraji a střední žilce s jednoduchými chlupy. Úbory má malé. Stopky úborů jsou většinou lysé, vzácně s jednotlivými stopkatými žlázkami a hvězdovitými někdy i jednoduchými chlupy (subsp. *bauhini* má stopky úborů hustě plstnaté hvězdovitými chlupy). Počet úborů je většinou 10 - 35. Zákrov spíše válcovitý, krytý žlázkami a chlupy jako úbor. Květy (obr. 1) jsou jazykovité s plochou ligulou. Ligula je žlutá, až 9 mm dlouhá. Plodem jsou hnědočerné nažky, až 2 mm dlouhé. Rostliny použité v experimentu byly sexuální a tetraploidní ($2n = 36$).

Pilosella bauhini obsazuje různé typy stanovišť s nezapojenou vegetací. Většinou na výslunných místech – travnaté a kamenité svahy, křoviny. Často se šíří na druhotných stanovištích, jako jsou nádraží, násypy komunikací, lomy ad. Výskyt je často vázán na raná sukcesní stádia. Podrobnější údaje o tomto druhu jsou uvedeny v práci Rotreklové (Rotreklová et al. 2005).



Obrázek 1 - *Pilosella bauhini*; © F. Krahulec

Jestřábník chlupáček

Pilosella officinarum F. W. SCHULTZ

Vytrvalá bylina tvořící růžice a jeden úbor. Její nadzemní výběžky jsou až 30 cm dlouhé. Mohou se větvit a jsou hustě pokryté jednoduchými i hvězdovitými chlupy. Lodyhu má přímou nebo vystoupavou. Často je krytá jednoduchými chlupy s šedavou dolní částí. Spolu s nimi se vyskytují hvězdovité chlupy a stopkaté žlázy se světlejší hlavičkou. Listy jsou celokrajné, na líci s roztroušenými chlupy. Na rubu jsou hustě pokryté bělavými plstnatými hvězdovitými chlupy. Uspořádány jsou do růžice na dlouhém řapíku. *P. officinarum* vytváří pouze jeden úbor, až 11 mm dlouhý. Zákrov je většinou bez jednoduchých chlupů. Četné jsou černé stopkaté žlázy a hvězdovité chlupy. Květy mají plochou ligulu, až 15 mm dlouhou. Barva liguly je žlutá (obr. 2). Vnější strana okrajových ligul má podélné červené proužky. Plodem jsou nažky hnědočerné barvy, dlouhé až 2.1 mm.

Na lokalitách, odkud rostliny pocházely, se vyskytovaly apomiktické pentaploidy a hexaploidy. V experimentech byly využity jen hexaploidní rostliny, kde se dalo předpokládat především hexaploidní potomstvo. Podrobné údaje o rozšíření cytotypů tohoto druhu v České a Slovenské republice i v celé Evropě jsou uvedeny v práci Mráz et al. (2008).

Tento druh má širokou ekologickou amplitudu. Nejčastěji vyhledává sušší travnatá a skalnatá místa, písčiny, vřesoviště, louky a světlé lesy, především suché bory, teplomilné a acidofilní doubravy. Hexaploidní cytotyp se však často vyskytuje i na bazických podkladech.



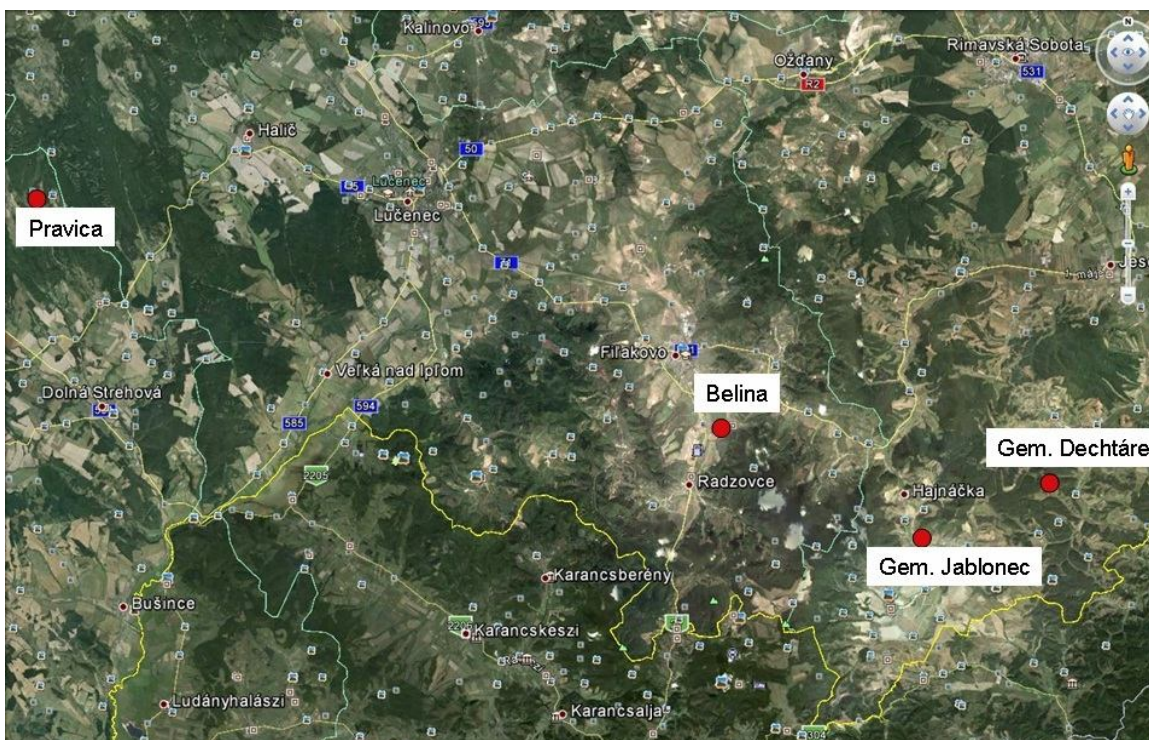
Obrázek 2 - *Pilosella officinarum*; © F. Krahulec

3.2 Sběr rostlin

Rostliny použité k experimentu byly sbírány na jihu středního Slovenska, a to na těchto lokalitách (viz obr. 3):

- Filakovo, Belina – travnaté svahy okolo hřbitova VSV od obce (235 m.n.m.). 1939 PI ($2n = 6x$, apomikt) a 1940 BA ($2n = 4x$, sexuální). Sbíráno: Krahulec F., Urfus T. a Krahulcová A. 26. 5. 2011.
- Rimavská Sobota, obec Gemerské Dechtáre – travnaté svahy (spraše) na SV okraji obce, bývalé fotbalové hřiště (234 m.n.m.). 1952 PI ($2n = 6x$, apomikt) a 1955 BA ($2n = 4x$, sexuální). Sbíráno: Krahulec F., Urfus T. a Krahulcová A. 26. 5. 2011.
- Rimavská Sobota – travnaté svahy (spraš) podél severního okraje cesty spojující obce Dubno a Gemerský Jablonec (238 m.n.m.). 1960 PI ($2n = 6x$, apomikt) a 1959 BA ($2n = 4x$, sexuální). Sbíráno: Krahulec F., Urfus T. a Krahulcová A. 26. 5. 2011.
- Velký Krtíš – podél turistické stezky (červené), cca 0.75-1 km S od obce Pravica, cca 14 km Z od města Lučenec (390 m.n.m.). 1972 BA ($2n = 4x$, sexuální). Sbíráno: Krahulec F., Urfus T. a Krahulcová A. 26. 5. 2011. 2049, 2051, 2052 a 2076 PI ($2n = 6x$). Všechny tyto rostliny patřily k jednomu klonu. Sbíráno: Krahulec F. a Urfus T., červen 2012.

Rostliny byly poskytnuty ze sbírky rostlin v Botanickém ústavu Akademie věd České republiky v Průhonicích. Rostliny jsem přechovávala v květináčích ve skleníku v Olomouci.



Obrázek 3 - Lokality sesbíraných rostlin

3.3 Experimentální křížení *Pilosella officinarum* a *P. bauhini*

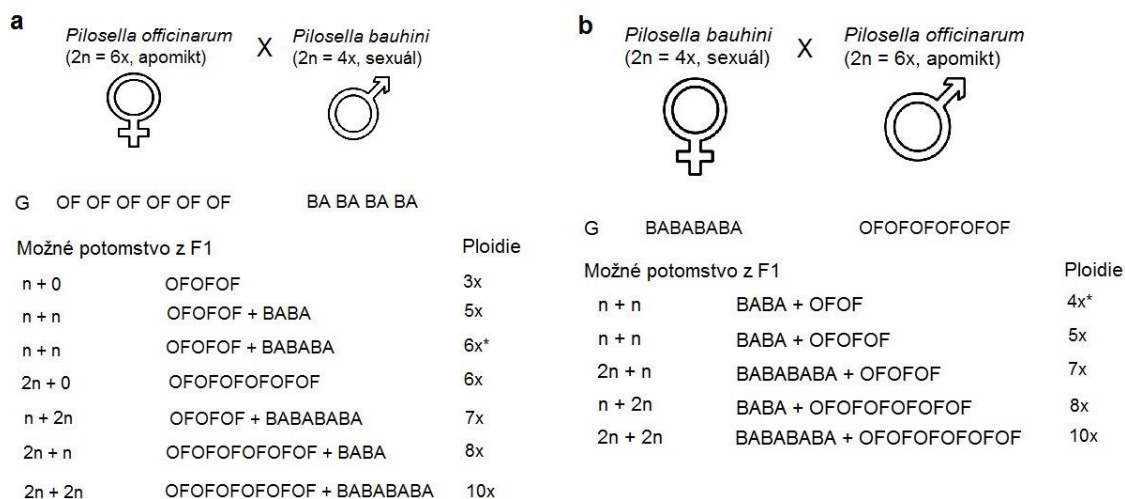
Samotný experiment byl proveden reciprokým křížením mezi *Pilosella officinarum* a *P. bauhini* (viz obr. 4, tab. 1) ke zjištění možné zbytkové sexuality u potomků *P. officinarum*. Křížení probíhalo v květnu až červnu roku 2013 v experimentálních podmínkách ve studeném skleníku v Olomouci. *Pilosella officinarum* byla křížena s *P. bauhini* v těchto kombinacích (konkrétní přehled je v tab. 8 v Příloze 1):

- 1939 PI x 1940 BA
- 1960 PI x 1940 BA/1959 BA/1972 BA
- 2049 PI x 1959 BA
- 2051 PI x 1972 BA
- 2052 PI x 1972 BA
- 2076 PI x 1940 BA/1959 BA/1972 BA

Přednostně byly kříženy rostliny ze stejných lokalit. Vzhledem ke špatnému růstu některých klonů *P. bauhini* byly ke křížení použity i jiné rostliny.

Květenství rodičovských rostlin jsem zakryla nylonovými síťovanými sáčky umístěnými na drátěných spirálách (obr. 9, Příloha 4). Zakrytí květů posloužilo jako ochrana před zanesením pylu z dalších květů nebo proniknutí opylovače z venku. Opylování jsem uskutečnila důsledným společným třením rodičovských úborů. Jednotlivé květy v úborech se otevírají postupně od okraje k centru květu. Proto jsem opylení mateřského úboru udělala ještě dvakrát nebo třikrát, vždy další den od prvního opylení. Pokaždé s novým úborem ze stejného dárce pylu. Pro lepší přehled jsem na květní stopky navázala barevné bavlnky. Jejich barvu jsem zaznamenala k příslušné opylené dvojici a datu opylení. Zralé nažky jsem sklízela o dva až tři týdny později. Uložila jsem je do papírových obálek označených kombinací křížení, pořadovým číslem, datem prvního opylení a barvy bavlnky. Před další prací s nažkami jsem je uskladnila v lednici. Zároveň jsem vytrídila nezralé nebo prázdné nažky.

Pokud jde o další rostliny, které jsem použila při křížení, tak z některých jsem žádné nažky nesesbírala. Konkrétně jde o tyto rostliny: PI_2049, PI_2051 (rostliny pochází ze stejného klonu) a BA_1972.



Obrázek 4 - Model reciprokého křížení u *P. officinarum* a *P. bauhini*. Zobrazení možných výsledných potomků a jejich ploidie. **a** Křížení s *P. officinarum* jako mateřskou rostlinou. **b** Křížení s *P. bauhini* jako mateřskou rostlinou. * Potomci vzniklí autogamií (n + n = 6x; n + n = 4x).

Tabulka 1 - Model reciprokého křížení u *P. officinarum* a *P. bauhini*. Zobrazení možných výsledných potomků, kombinací gamet a jejich ploidie. **a** Křížení s *P. bauhini* jako mateřskou rostlinou. **b** Křížení s *P. officinarum* jako mateřskou rostlinou. * Potomci vzniklí autogamií ($n + n = 6x$; $n + n = 4x$).

a

		<i>P. officinarum</i> ♂* ($2n = 6x$)		
<i>P. bauhini</i> ♀* ($2n = 4x$)	Gamety		$n = 3x$	$2n = 6x$
	$n = 2x$ $2n = 4x$	$n + n = 4x^*$	$n + n = 5x$ $2n + n = 7x$	$n + 2n = 8x$ $2n + 2n = 10x$

b

		<i>P. bauhini</i> ♂* ($2n = 4x$)		
<i>P. officinarum</i> ♀* ($2n = 6x$)	Gamety		$n = 2x$	$2n = 4x$
	$n = 3x$ $2n = 6x$	$n + 0 = 3x$ $n + n = 6x^*$ $2n + 0 = 6x$	$n + n = 5x$ $2n + n = 8x$	$n + 2n = 7x$ $2n + 2n = 10x$

3.3.1 Práce se sesbíranými nažkami

Sesbírané nažky jsem na jaře roku 2014 vysela do květináčů. Každý květináč byl označen štítkem s číslem obálky, do které byly nažky uloženy, datem výsevu a původem mateřské rostliny (např. 14 PI1939 6. 3. 2014). Jakmile začaly vzešlé semenáčky tvořit první pravé listy (obr. 10, Příloha 4), aplikovala jsem v zálivce Previcur Energy. Tento přípravek je vhodný k ošetření mladých rostlin před houbami ze třídy *Oomycetes* (např. rody *Peronospora* spp., *Pythium* spp.), způsobující např. padání semenáčků.

V době, kdy už měly rostlinky vytvořenou menší růžice listů (obr. 11, Příloha 4) (od 8. 4. 2014), jsem je přepikýrovala do malých sadbovačů (cca 5×5 cm) (obr. 12, Příloha 4). Každá rostlinka byla označena stejně jako při výsevu, ale pro přehled jsem přidala pořadová čísla rostlin ze stejné sady (např. 14.1 PI1939 8. 4. 2014). Jakmile rostliny vytvořily bohatší růžice listů, mohla jsem je začít měřit na cytometru nažek (viz kapitola 3.4).

Celkově jsem napěstovala 252 rostlin z 932 vyšetých (srovnání v tab. 9, Příloha 2). V sadbovačích uhynulo cca 5 rostlin. Během pěstování byly rostliny vystaveny škodlivému vlivu škůdců (molice skleníková, třásněnka). To se projevuje hlavně na kvalitě listů u potomků sebraných od *Pilosella bauhini*.

3.4 Stanovení DNA ploidní úrovně

DNA ploidní úroveň byla stanovena (Suda et al. 2006; Doležel et. al 2007) u všech semenáčků z vyšetých nažek. Pro účely stanovení ploidní úrovně jsem z rostliny odebírala zdravý list. Listy jsem vybírala starší, z okrajové části růžice. Protože mám rostliny uschovány ve školních sklenících, přenášela jsem si celé sadbovače sebou do laboratoře.

Samotné měření jsem provedla pomocí průtokového cytometru BD Accuri C6 (©BD Biosciences) vybaveného modrým laserem stejné značky (488 nm, 20 mW). Použila jsem metodu vnitřního standardu (Doležel & Bartoš 2005; Doležel et. al 2007). Jako standard byly použity listy kukuřice (*Zea mays* L. 'CE-777' $2C = 5,43$ pg; Lysák & Doležel 1998) a listy mateřských rostlin. Pomocí listů hrachu byla hlídána optimální úroveň CV (3 %). Pokud hodnota přesáhla 3 %, byl přístroj znovu kalibrován.

Část listu (cca 0.5×0.5 cm) jsem společně s přibližně stejným množstvím standardu homogenizovala ostrou žiletkou v Petriho misce spolu s 550 μ l pufru LB01 s pH 7.5. Standardní složení pufru je 15 mM Tris, 2 mM Na_2EDTA , 20 mM NaCl, 80 mM KCl, 0.5 mM spermin tetrahydrochlorid, 0,1% (v/v) Triton X-100, 15 mM β - merkaptoetanol. K potlačení interference fenolických sloučenin s barvicí se DNA se do pufru přidává ještě PVP (polyvinylpyrrolidon; 10 g / 500 ml). Vzniklý homogenát jsem přefiltrovala přes nylonový filtr do kyvety. Poté jsem do homogenátu přes pipetu přidala 250 μ l fluorochromu propidium jodid (PI), který se interkalárně váže na řetězec DNA bez preference přítomných bází (Doležel & Bartoš 2005; Doležel et. al 2007). Měření jsem provedla v červnu 2014.

Protože měření s kukuřicí mohlo zakrýt případnou přítomnost triploidního potomka, bylo měření zopakováno ještě jednou v červenci 2014. Standard byly pouze listy mateřských rostlin. Abych měla přehled, kde přesně leží na histogramu z měření pík standardu (mateřské rostliny), provedla jsem jejich samostatné měření se *Zea* jako standardem ($2C = 5.43$ pg) (viz kapitola 4.1).

Z tohoto měření jsem zjistila přesné údaje o velikosti genomu mateřských rostlin. Byla tedy stanovena celková velikost genomu ($2C$). Velikost genomu byla spočítána z poměrů pík standardu a studovaného vzorku dle vzorce: absolutní velikost genomu vzorku ($2C$) = (pozice píku vzorku / pozice píku standardu) \times absolutní velikost genomu

standardu (2C) [pg DNA] (Tesařová 2012). Stejně tak byly počítány velikosti genomů potomků. Avšak pro počítání byla použita absolutní velikost standardu teoretických velikostí genomu. Tyto teoretické velikosti byly spočítány jako průměr změřených hodnot rodičů: *P. officinarum* (10.48 pg) a *P. bauhini* (7.17 pg). Samotné indexy jsou počítány jako pozice píku vzorku / pozice píku standardu.

Při druhém měření jsem rostliny neměřila samostatně, ale po skupinkách v počtu 3 až 4 rostlin. Počet jsem občas upravovala také podle morfologické podobnosti. Některé rostliny z prvního měření jsem znovu změřit nemohla. Tlak škůdců a počasí s vysokými teplotami zapříčinili jejich špatný stav nevhodný k měření.

4 Výsledky

4.1 Mateřské rostliny jako standard

Rostliny sesbírané ve Slovenské republice byly pro účely měření na cytometru přeměřeny samostatně se *Zea* jako standardem, abych věděla, kde přesně leží jejich píky. Tyto mateřské rostliny byly použity jako standard pro měření vypěstovaných rostlin (tab. 2, obr. 5). Z tohoto měření byly vypočítány teoretické hodnoty velikosti genomu a indexy (tab. 3)

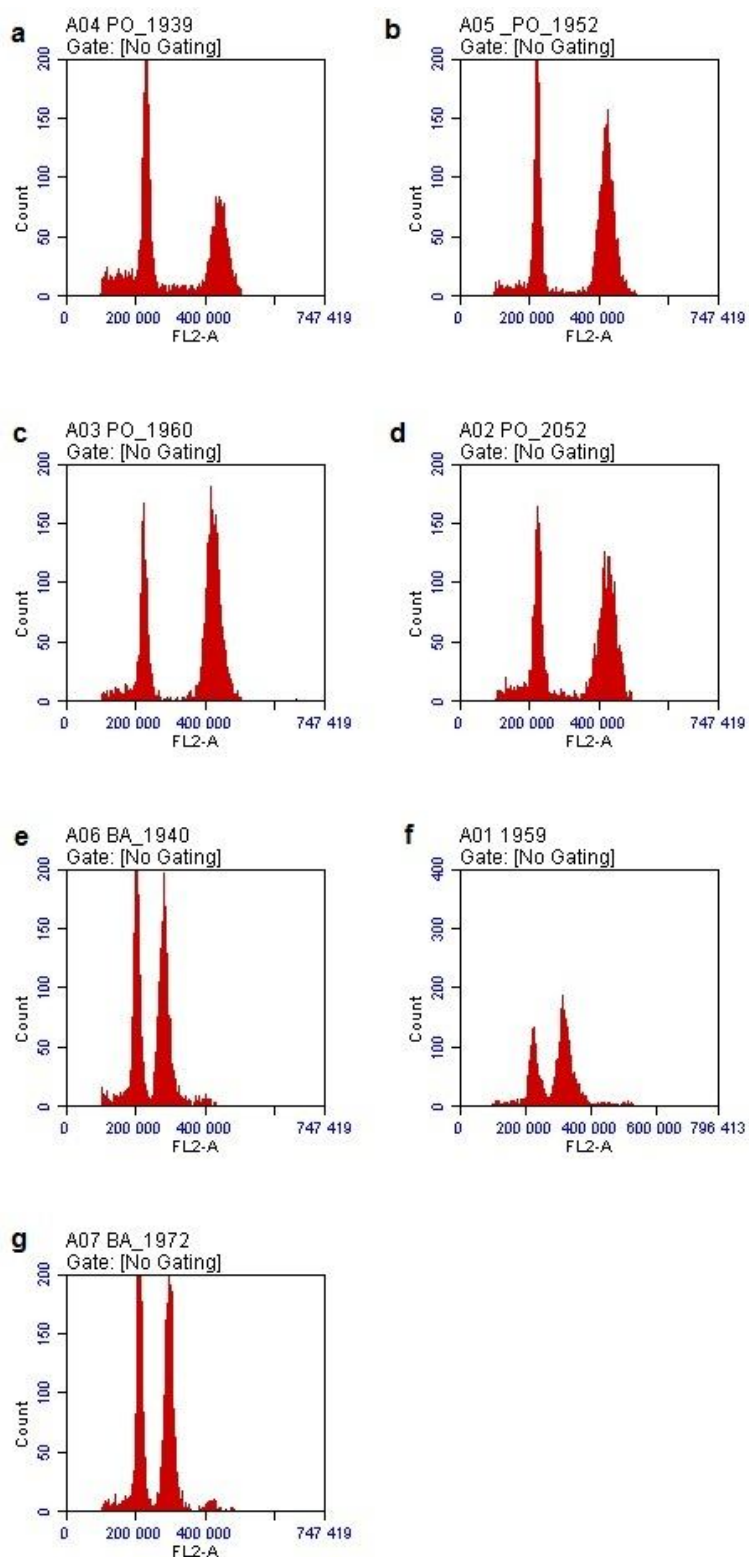
Tabulka 2 - Hodnoty měření mateřských rostlin použitých k měření jako standard

ID	Index	Ploidie	Genom	Standard	Poznámka
PO_1939	0.515305	6	10.53745	Zea	
PO_1952	0.523038	6	10.38165	Zea	
PO_1960	0.522805	6	10.38628	Zea	
PO_2052	0.520553	6	10.43121	Zea	
PO_2076	/	/	/	/	neměřeno ^a
BA_1940	0.720855	4	7.53272	Zea	
BA_1959	0.701538	4	7.740142	Zea	
BA_1972	0.710962	4	7.63754	Zea	

a - rostlina uhynula v roce 2013 po sběru nažek

Tabulka 3 - Hodnoty teoretického indexu a genomu

Ploidie	Index	Genom
3x	0.26	5.10
4x	0.70	7.17
5x	0.62	8.87
6x	0.48	10.48
7x	0.97	12.64
8x	0.88	13.98
10x	1.23	17.74



Obrázek 5 - Hodnoty měření mateřských rostlin v histogramech. Píky mateřských rostlin jsou v histogramech vpravo. **(a - d)** píky mateřských rostlin *P. officinarum*. **(e - f)** píky mateřských rostlin *P. bauhini*.

4.2 Podíl zbytkové sexuality a variabilita klonů *P. officinarum*

V prvním měření bylo zanalyzováno pomocí průtokové cytometrie 252 potomků. Do druhého měření nepřežilo nebo bylo ve špatném stavu 8 potomků a nebyli zahrnuti do dalšího měření. Celkem bylo zanalyzováno 244 potomků (přehled výsledků měření – Příloha 5). Rostliny byly vypěstovány z nažek získaných sprášením čtyř skupin *P. officinarum* (PI_1939, PI_1960, PI_2052 a PI_2076) s *P. bauhini*.

V potomstvu fakultativně apomiktické rostliny *P. officinarum* se vyskytovaly dvě ploidní úrovně: hexaploidy a oktoploidy. Převažovaly hexaploidní rostliny, vzniklé apomiktickou cestou. Ze 126 zanalyzovaných potomků vypěstovaných z nažek *P. officinarum* jich bylo hexaploidních 124, což je 98.4 %. Celkový počet jedinců s nehexaploidním cytotypem byl 2, tedy 1.6 %. Konkrétní počty jedinců a jejich procentuální zastoupení je v tab. 4.

V potomstvu sexuální rostliny *P. bauhini* se vyskytovaly dvě ploidní úrovně: tetraploidy a pentaploidy. Převažovaly tetraploidní rostliny, vzniklé autogamií. Ze 113 zanalyzovaných potomků vypěstovaných z nažek *P. bauhini* jich bylo 109 tetraploidních, tedy 96.5 %. Celkový počet jedinců z netetraploidním cytotypem byl 4, což je 3.5 %. Konkrétní počty jedinců a jejich procentuální zastoupení je v tab. 4.

Tabulka 4 - Frekvence cytotypů změřeného potomstva

Mateřská rostlina <i>Pilosella officinarum</i>									
	PI 1939		PI 1960		PI 2052		PI 2076		
	PJ	% ZS	PJ	% ZS	PJ	% ZS	PJ	% ZS	
6x	63	100	38	97.4	14	100	9	90	
8x	—	—	1	2.6			1	10	
Celkem	63	100	39	100	14	100	10	100	

Mateřská rostlina <i>Pilosella bauhini</i>					
	BA 1940		BA 1959		
	PJ	% ZS	PJ	% ZS	
4x	105	98.1	4	66.7	
5x	2	1.9	2	33.3	
Celkem	107	100	6	100	

PJ - počet jedinců

% ZS - procento změřených semenáčků

4x, 5x, 6x - tetraploidy, penta-, hexa-

Jednotlivé klony od *P. officinarum* nemají téměř žádnou variabilitu. Mezi převažujícími hexaploidy se občas objevily oktoploidní rostliny. Zvláštní je přítomnost tetraploidů. Celkem vznikly tři rostliny: 1 od klonu PI_1960 a 2 od PI_2076. Zřejmě jde o vznik díky nepravidelné meióze, tedy o polyhaploida s vyšším počtem chromosomů. Pro další práci bude lépe chromosomy přepočítat. Tyto rostliny jsem do tab. 4 nezahrnula. Klony od *P. bauhini* jsou naopak o něco více variabilnější než *P. officinarum*. Velký rozdíl to však není, pokud se podívám na celkový počet zanalyzovaných rostlin a počet hybridů rozdílných od matky. Do tab. 4 jsem ještě nezahrnula 2 potomky od BA_1940. Jedná se o nonaploida a oktoploida. Nonaploid je při této kombinaci ploidii a způsobů rozmnožování rostlin použitých při křížení dost neobvyklý jako potomek od *P. bauhini*. Je zde ještě možnost, že došlo k chybě při výsevu nažek. Pokud dosadíme při výpočtu indexu místo standardu *P. bauhini* standard *P. officinarum* a velikost ploidie potenciální mateřské rostliny (6x) vydělíme tímto indexem dostaneme dekaploidní velikost nejasného potomka. Pro další práci tedy bude ještě lepší přeměřit rostlinu na cytometru s *P. officinarum* jako standardem nebo přepočítat chromosomy. Celkový přehled potomků odlišných od mateřských rostlin je v tab. 5, příklady histogramů potomků na jsou obr. 6.

Tabulka 5 - Přehled rostlin ploidně odlišných od mateřských rostlin. Tmavě žlutě jsou zvýrazněni potomci od *P. bauhini*, světlě žlutě od *P. officinarum*.

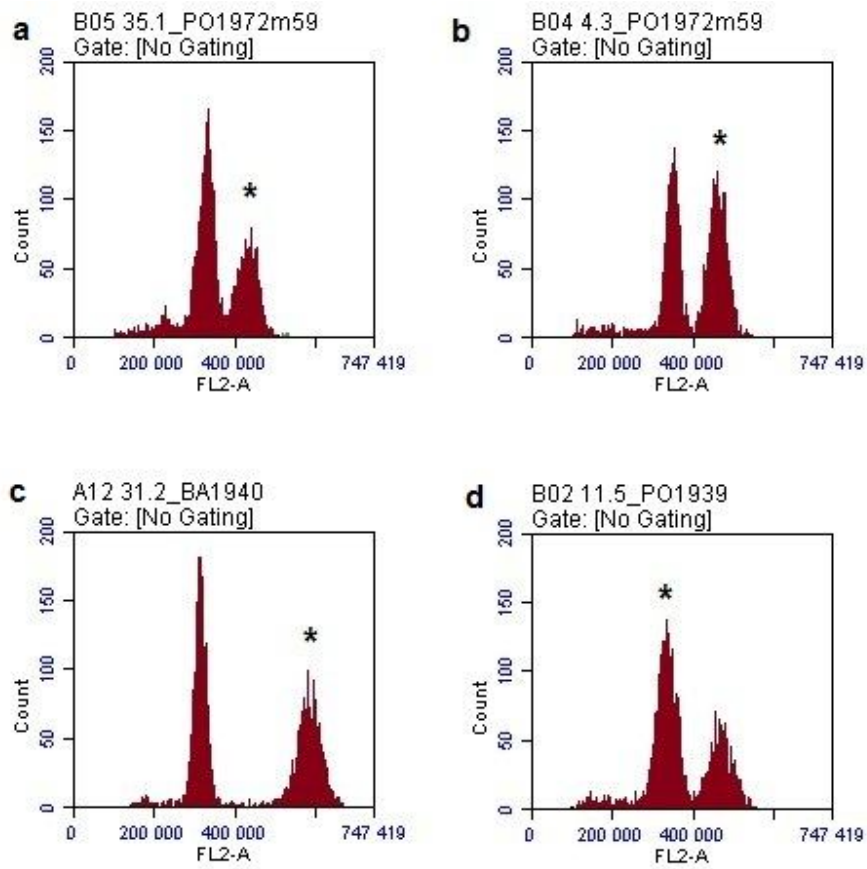
ID	Index	Ploidie	Genom	Standard	Poznámky
21.1	0.788258	5	9.096006	bez ST	
31.1	0.873784	5	8.205689	BA_1940	
31.2	0.53511	8	13.3991	BA_1940	
33.2	0.433004	9	16.55875	BA_1940	
4.3	0.755458	5	9.490935	BA_1972	nedostatek BA_1959*
35.1	0.755393	5	9.491742	BA_1972	nedostatek BA_1959*
10.19	1.532658	4	6.837796	PI_1960	
10.20	0.728792	8	14.37996	PI_1960	
12.6	0.735957	8	14.23997	PI_1939	
11.5	1.403474	4	7.467185	PI_1939	
11.6	1.393657	4	7.519783	PI_1939	

* - standard mat. rostliny BA_1959 nahrazen BA_1972, důvod: špatný stav rostliny

bez ST - rostlina byla měřena samostatně pro lepší vyobrazení píku

BA - *P. bauhini*

PI - *P. officinarum*



Obrázek 6 - Příklad histogramů potomků ploidně odlišných od mateřských rostlin. * píky potomků: **(a - b)** potomci od *P. bahini* s ploidii 5x a **c** s ploidii 8x. **d** potomek od *P. officinarum* s ploidii 4x (nejasný polyhaploid).

5 Diskuse

5.1 Zastoupení cytotypů potomstva v přírodě

Na každé lokalitě na Slovensku byly nalezeny pentaploidní rostliny (Krahulec, Krahulcová & Urfus, ústní sdělení), ale jiné ploidie nalezeny nebyly. Podíl hybridních rostlin byl podstatně menší než na lokalitách v ČR (Krahulcová et al. 2014). Podle uvedených výsledků z mého měření je možné, že zde působí reprodukční bariéry proti přirozené hybridizaci (viz kapitola 5.3.2).

Z práce Rosenbaumová & Krahulec (2014) vychází, že kromě převažujících apomiktických potomků a potomků z autogamie se vyskytují také další ploidní úrovně. Nažky, ze kterých byli napěstováni potomci byly sesbírány u vesnice Valov v České republice. Pocházely z těchto mateřských rostlin: *P. bauhini* (6x, fakultativní apomikt) a *P. officinarum* (4x, sexuální). Ze 472 napěstovaných rostlin od *P. bauhini* vzešly tyto cytotypy: 6x z apomixy (92.4 %), 8x (3 %), 5x (2.5 %), 3x (1.3 %), 7x a 10x (obojí 0.4 %). U *P. officinarum* pak ze 318 rostlin převažovali tetraploidi z autogamie (4x; 98.7 %) a pouhé 1.3 % pentaploidů (5x). Tyto vypěstované rostliny pak sloužily k hybridizačnímu experimentu, jehož výsledky srovnávám a diskutuji v kapitole 5.4.

Na lokalitě Praha-Vysočany podél železnice převažovaly tetraploidy, bez ohledu na klonální strukturu (Krahulcová et al. 2009a). U *P. officinarum* (sexuální) i *P. bauhini* (apomikt) převažovaly cytotypy 4x a 5x u mateřských rostlin. Hybridy se pohybovaly v rozsahu od tetraploidů po oktoploidy. Naopak na další studované lokalitě na Kamenném kopci u Brna zcela převládaly pentaploidní a hexaploidní rostliny. U *P. officinarum* se vyskytovaly pouze hexaploidy. Zato však měly velkou variabilitu biotypů – sexuální, apomiktické a se sterilními semeny. Sexuální biotyp převažoval. Mezi rostlinami *P. bauhini* převažovaly apomiktičtí pentaploidy.

Z hlediska většího geografického měřítka je zajímavý rozdíl mezi střední Evropou a oblastí Balkánu (Bulharsko, SZ Rumunsko) (Krahulcová et al. 2009b). Na Balkánu má *P. officinarum* formy 4x, 5x a 6x a *P. bauhini* pouze 5x. Oba druhy zde mají společné to, že zde rostou pouze jako apomikté. Ve střední Evropě najdeme jak apomikty, tak sexuální typy.

Zajímavou odpověď na to, proč jsou rozdíly v rozšíření cytotypů *P. officinarum* mezi mou prací a prací R. Rosenbaumové dává studie Mráz et al. (2008). Tato práce se zabývala výskytem tohoto druhu na 336 lokalitách v České republice (ČR), Slovenské republice (SK) a v SV Maďarsku. K tomu bylo přidáno 18 lokalit z Bulharska, Gruzie, Irska, Itálie, Rumunska a Ukrajiny. Sbírané rostliny (1059) byly prozkoumány cytologicky a měřeny na cytometru. Bylo zjištěno, že v západní části ČR se vyskytují převážně sexuální tetraploidy (4x). Naopak SK a východní část naší republiky osidlují apomiktické pentaploidy (5x) a hexaploidy (6x, převažují) (viz obr. 8, Příloha 3). Signifikantní rozdíl byl také zaznamenán ve vertikálním rozšíření těchto cytotypů. Cytotypy 6x se vyskytují do 500 m.n.m. a 5x až do 1000 m.n.m. Současná distribuce *P. officinarum* je zřejmě daná klimatickými změnami během Pleistocénu a následnou postglaciální migrací. Je možné, že je ve skutečnosti amfidiploid (chová se, jakoby byla diploidní, ale ve skutečnosti její jádro obsahuje 2 x 2 sady chromozómů), který pravděpodobně pochází z hybridizace diploidních taxonů ze sekce *Pilosellina* (Mráz et al. 2008).

5.2 Výběr standardů

V prvním měření (červen 2014) na cytometru byla k mateřským rostlinám pro lepší přehlednost jako další standard použita *Zea*. Tím se však mohla zakrýt případná přítomnost triploidů. Ale podařila se tak ověřit velikost genomu při měření se *Zea*, které zjistil ve svém měření Suda et al. (2007).

Pro další měření (červenec 2014) už byly použity jako standard pouze mateřské rostliny, ze kterých byly sesbírány a napěstovány semenáčky pro samotné měření. Pro lepší přehled, kde na histogramu leží jejich píky, byly mateřské rostliny proměřeny se *Zea* jako standard. Z nich byly vypočítány podle modelu reciprokého křížení teoretické hodnoty velikosti genomů možných potomků (tab. 3). Pokud byl na histogramu pouze jeden pík, měl potomek stejnou ploidiu s mateřskou rostlinou. Pokud ne, byla ještě velikost ploidiie dopočítána podle vzorce: ploidiie mateřské rostliny / index.

5.3 Zbytková sexualita a další jevy v rozmnožování

Termínem zbytková sexualita obvykle označujeme občasný výskyt sexuálního rozmnožování u fakultativně apomiktických mateřských rostlin (Asker & Jerling 1992). Jak jsem již uvedla dříve, sexuálním způsobem dojde ke vzniku potomstva prostřednictvím redukované nebo neredukované gamety. Takové potomstvo označujeme jako $n + n$, $n + 2n$, $2n + n$ a $2n + 2n$, kde první symbol označuje samičí gamety. Další reprodukční způsob je pak apomixie a haploidní partenogeneze, tvořící toto potomstvo bez oplodnění: $2n + 0$ z neredukované a $n + 0$ z redukované vaječné buňky. Ač je rod *Pilosella* známý častou hybridizací, jsou zde evidentně mechanismy, které ji brzdí. To je vidět na vysokém podílu potomků sexuálních mateřských rostlin vzniklých autogamicky v této práci i v práci R. Rosenbaumové (Rosenbaumová & Krahulec 2014), kdy u experimentu s materiálem z Čech šlo o *P. officinarum*, u rostlin ze Slovenska o *P. bauhini*.

5.3.1 *P. officinarum* jako mateřská rostlina

Dříve byly apomiktické druhy považovány za slepou evoluční větev (Darlington 1939 – viz Richards 1996). Dnes se naopak ukazuje jejich nemalý význam z hlediska produkce variabilního potomstva, dokonce variabilnějšího než jaké produkují čistě sexuálně se rozmnožující jedinci.

Množství potomstva, které vyklíčilo ze sklizených nažek z experimentálního křížení bylo poměrně nízké (22.9 % z 590 nažek). Většina potomstva vznikla apomikticky, tedy bez přispění sexuální *P. bauhini* (tab. 6, obr. 7). Celková diverzita potomků vzniklých s *P. bauhini* byla velmi nízká (tab. 6, obr. 7). Otázkou zůstává, jestli by potomstvo bylo variabilnější, pokud by semen vyklíčilo více. Potomstvo tedy bylo kromě hexaploidů zastoupeno malým množstvím oktoploidů. Naopak o něco více variabilní bylo potomstvo od sexuální *P. bauhini*. Tento fakt je zajímavý, protože doposud publikované práce podporovaly myšlenku, že apomiktické rostliny produkují variabilnější potomstvo (např. Chapman et al. 2000; Krahulcová et al. 2004, 2011; Rosenbaumová et al. 2012).

V rodu *Pilosella* se vysoká variabilita apomiktů povedla prokázat experimentálním reciprokým křížením mezi hexaploidním fakultativním apomiktem *P. rubra* a tetraploidním sexuálem *P. officinarum*. Potomstvo *P. rubra* bylo v rozsahu triploidů až oktoploidů. Naopak sexuální *P. officinarum* vytvořilo pouze tetraploidy z autogamie, pentaploidní

hybridy a jednoho heptaploidního hybridu (Krahulcová & Krahulec 2000; Krahulcová et al. 2004, 2011; Rosenbaumová et al. 2012).

Práce od Krahulcová et al. (2014) studovala zbytkovou sexualitu na druzích *P. officinarum* (4x, sexuální), *P. aurantiaca* (4x, fakultativní apomikt) nebo *P. bauhini* (5x, fakult. apomikt). Tyto druhy společně koexistují na lokalitách, ze kterých byly sbírány (ČR a Německo). Byla ověřována jak populační struktura rodičovských rostlin, tak struktura potomků z křížení. Vysoká variabilita potomků (2x – 9x) byla potvrzena u apomiktických mateřských rostlin (embrya), u vypěstovaných potomků (semenáčů) byla variabilita nižší (3x – 7x). Sexuální mateřské rostliny měly vcelku variabilní potomstvo u embryí (4x – 8x), zato u semenáčů byly pouze typy 4x (Krahulcová et al. 2014).

Další reciproké křížení hexaploidní fakultativně apomiktické *P. bauhini* a tetraploidní sexuální *P. officinarum* ukázalo stejně jako v mé práci vysoké množství apomikticky vzniklých rostlin. Diverzita ploidních úrovní se však pohybovala od triploidů až po oktoploidní rostliny (Rosenbaumová & Krahulec 2014).

5.3.1.1 Polyhaploidní rostliny

Z křížení mezi *P. officinarum* a *P. bauhini* byli zaznamenáni tetraploidní potomci od hexaploidního apomikta *P. officinarum* (viz kapitola 4.2). Zřejmě nejde o čisté tetraploidní rostliny. Při vzniku embrya došlo k nepravděpodobné mióze a s největší pravděpodobností jde o polyhaploida s vyšším počtem chromosomů. Pro lepší představu v další práci bude lépe přepočítat chromosomy těchto rostlin.

V rodu *Pilosella* jsou polyhaploidy zaznamenány jak z hybridizace, tak z emaskulačních experimentů. Experimentálně vzniklé polyhaploidy bývají občas sterilní (Krahulcová & Krahulec 2000; Krahulec et al. 2011b; Rosenbaumová & Krahulec 2014). Navíc Krahulec et al. (2006) zjistili silnou selekci proti polyhaploidům během klíčení a časnému vývoji semenáčků u *P. rubra* (6x, apomikt).

V přírodě jsou polyhaploidy velmi těžko zachytitelné (Krahulcová et al. 2004; Krahulec et al. 2006). Doposud byl v přírodě zaznamenán polyhaploid ze Šumavy (ČR), který byl triploidní a rostl v blízkosti nestabilních recentních hybridů od *P. auranticaca* a *P. officinarum* (Krahulec et al. 2008). Další pravděpodobný trihaploid byl nalezen při analýze hybridního roje mezi *P. polymastix* a *P. officinarum* ze středních Čech (Krahulec et

al. 2014). Ze sběru nažek na lokalitě u vesnice Valov byly vypěstovány triploidní polyhaploidy, které také v menší míře vznikly během experimentálního křížení (Rosenbaumová & Krahulec 2014). Naopak z hybridizace mezi *P. aurantiaca* (4x, apomikt) a *P. bauhini* (5x, apomikt) jako mateřské rostliny s *P. officinarum* (4x, sexuální) nevzešly žádné polyhaploidní rostliny (Krahulcová et al. 2014). Zde se však jednalo o analýzu hybridních rojů z terénu.

5.3.2 *P. bauhini* jako mateřská rostlina a vliv *mentor effectu*

Z experimentálního křížení s *P. bauhini* (mateřská rostlina) vyklíčilo 34.2 % (ze 342) sesbíraných nažek. Celkový počet sesbíraných nažek oproti *P. officinarum* byl velmi nízký a při třídění se většina ukázala jako špatně vyvinutá. Většina potomků byla tvořena tetraploidními jedinci ($n + n$) z autogamie. Hybridy byly v malé míře zastoupeny pentaploidy.

Právě podíl tetraploidů vzniklých autogamií je zde velmi významný. Self-inkompatibilita (SI) je jedním z hlavních a většinou účinných mechanismů pro předcházení samosprašení u kvetoucích rostlin (Barrett 1988). Sexuální členové z rodu *Pilosella* jsou obecně považováni za self-inkompatibilní (SI) především v přírodních podmínkách (Gadella 1987). Tento byl vyvozen díky křížení sexuálního tetraploida *P. officinarum* (semena z rodičů bez předchozí emaskulace) a sexuálně diploidní *P. peleteriana*. Z křížení žádné matroklínální (= dědění vlastností výhradně po matce) tetraploidní rostliny nevzešly (Gadella 1987). Self-inkompatibilita se dá zlomit směsí vlastního a cizího pylu a dojde tak k samosprašnosti (Krahulcová et al. 1999), tzv. *mentor effect*. Volba autogamie je možná jedna z cest při rozmnožování, která blokuje přirozenou hybridizaci právě díky *mentor effectu*. Je pravděpodobné, že se v přirozeném prostředí může uplatnit například v hybridních zónách, což může mít roli v reprodukční izolaci a hybridní speciaci (Desrochers & Rieseberg 1998). Kromě těchto účinků může SI selhat také díky opožděnému opylení nebo vysokým teplotám (Richards 1997).

Prolomení self-inkompatibility popsali Krahulcová et al. (1999) u sexuální, tetraploidní *P. officinarum* a diploidní *P. lactucella*. Konkrétně získali 13.6 % z 22 rostlin F1 generace u *P. officinarum* a 6.2 % ze 128 rostlin u *P. lactucella*. Naopak z křížení *P. lactucella* (mateřská rostlina) a *P. aurantiacum* nebylo zaznamenáno žádné autogamicky

vzniklé potomstvo, což je zajímavé, protože toto křížení se stejnými rostlinami provedl již mnohem dříve Christoff (1942) a podařilo se mu získat 6 matroklinních rostlin.

V rodu *Hieracium* s. str. byla SI popsána u diploidních druhů (2x) *H. alpinum* a *H. umbellatum* pomocí izolačního experimentu. Stejně tak se SI podařilo zlomit díky hybridizaci diploidních *H. alpinum* (mateřská rostlina) a *H. transsilvanicum*. A také při křížení mezi *H. alpinum* (mateřská rostlina) a diploidní *P. lactucella* (Mráz 2003).

Účinky *mentor effectu* byly popsány také u druhu *Helianthus* sect. *Helianthus* (Desrochers & Rieseberg 1998). Byla zkoumána jeho role v reprodukční izolaci a speciaci u tohoto druhu, kde je jinak normálně běžná hybridizace (např. Rieseberg 1991). Práce byla provedena na druzích *H. annuus* (mateřská rostlina) a *H. petiolaris* subsp. *petiolaris*. Použitím směsi vlastního a cizího pylu bylo docíleno překonání self-inkompatibility. Tato skutečnost je významná při pěstitelských pokusech, například jako způsob generování rostlin vzniklých samoopylením nebo k vytváření skupin pro genetické studie SI u rodu *Helianthus*. Zde i přes účinky *mentor effectu* není hybridizace významně ovlivněná. (Seiler G., Gardner K. – viz Desrochers & Rieseberg 1998).

Mimo čeleď *Asteraceae* byl vliv *mentor effectu* studován také u komplexu *Ranunculus auricomus* (Hörandl & Temsch 2009). Přesněji, jaký vliv má spolu s ploidními bariérami na introgresi apomixe do sexuálních druhů. Křížení bylo provedeno s diploidními sexuálními jedinci a apomiktickými tetra- a hexaploidními dárci pylu. Z výsledků vyplývá, že spojení diploida a tetraploida vyvolává vzájemné obohacování (introgresi). Naopak zkřížení diploida a hexaploida spustí *mentor effect*. Introgrese apomixe byla více blokována ploidními bariérami než *mentor effectem*.

Navíc se zdá, že druhy (či jedinci v daném rodu) použité jako dárci pylu pro mateřské rostliny se mohou v překonávání SI lišit. Zřejmě závisí na kombinaci rodičovských druhů a/nebo jedincích, a také na podmínkách prostředí (Krahulcová et al. 1999).

5.3.3 Potomstvo s nejasným stupněm ploidie

Z experimentálního křížení vzešlo několik rostlin s nejasnými stupni ploidie. Těmto rostlinám budou pro další práci přepočítány chromosomy. Mezi potomky *P. officinarum* byly zaznamenány tři rostliny odpovídající tetraploidům (mateřská rostlina PI_1939

a PI_1960) (viz kapitola 5.2.1.1). Dalšími spornými výskyty byly hybridy od *P. bauhini* (mateřská rostlina BA_1940). Prvním z nich byl oktoploid, který mohl vzniknout jako $n + 2n$ nebo ve vzácném případě autogamií ($2n + 2n$). Podle výpočtu s průměrnými hodnotami genomů mateřských rostlin dostaneme tyto velikosti genomů oktoploidů: $n + 2n = 13.98$ pg a $2n + 2n = 14.34$ pg. Tento oktoploid tedy vznikl klasickou hybridizací. Druhým je nonaploid. Tento výsledek je však hodně neobvyklý od 4x sexuální *P. bauhini* v kombinaci toho křížení. Ještě je možné, že jde o dekaploida od *P. officinarum*, kdy mohlo při výsevu dojít k přenosu nažky do špatného květináče. Dekaploidní potomek by přitom nebyl nic překvapivého, protože jej při svém výzkumu zachytili i Rosenbaumová & Krahulec (2014). Bude tedy nutné rostlinu znovu přeměřit na cytometru a případně přepočítat chromosomy.

5.4 Srovnání s výsledky křížení komplementárních rostlin (provedených R. Rosenbaumovou)

Jak už jsem uvedla v kapitole 1.1, práce R. Rosenbaumové (Rosenbaumová & Krahulec 2014) se zabývá studiem populací z rodu *Pilosella* v Čechách (ČR). Kombinace cytotypů a způsobů reprodukce *P. officinarum* (4x, sexuální) a *P. bauhini* (6x, apomikt) jsou komplementární s těmi, se kterými jsem pracovala.

Výnos z křížení s tetraploidní, sexuální *P. officinarum* byl velmi malý. Z F1 generace bylo vypěstováno 321 semenáčků. Převážně (84.7 %) byly tvořeny pentaploidními hybridy ($n + n$) s *P. bauhini*. Z autogamie vznikl zbytek tohoto potomstva – tetraploidy ($n + n$).

Po křížení s hexaploidní, apomiktickou *P. bauhini* vzešlo 1059 semenáčků v F1 generaci. Variabilita tohoto potomstva byla mnohem vyšší. Rozsah ploidie šel od triploidů až oktoploidům. Převažovaly hexaploidy (93.3 %) vzniklé pravděpodobně apomikticky ($2n + 0$), ale také mohly vzniknout autogamií ($n + n$). Hybridy byly nejméně zastoupeny heptaploidy ($n + 2n$; 0.2 %), oktoploidy ($2n + n$; 0.8 %) a nejvíce pentaploidy ($n + n$; 4.6 %). Partenogeneticky vzniklé potomstvo z redukované samičí gamety *P. bauhini* zahrnovalo triploidy ($n + 0$; 1.1 %).

Rostliny, se kterými jsem provedla experimentální křížení byly sesbírány na Slovensku (viz obr. 3). K dispozici jsem měla *P. officinarum* (6x, fakultativní apomikt) a *P. bauhini* (4x, sexuální).

Výnos z křížení hexaploidní, apomiktickou *P. officinarum* byl překvapivě velmi malý. Z F1 generace jsem vypěstovala pouze 135 semenáčků. Z nich bylo celkem změřeno 129. Tento počet je vztažen ke druhému měření na cytometru, které je počítáno do celkové analýzy. Potomstvo bylo tvořeno převážně hexaploidy (98.4 %), kteří pravděpodobně vznikly apomikticky ($2n + 0$). Nevylučuje se zde ani kombinace s autogamií ($n + n$). Minimální byl podíl hybridních rostlin: tetraploidy (do celkového počtu nezahrnuty, viz kapitola 4.2) a oktoploidy (1.6 %; $2n + n$).

Po křížení s tetraploidní, sexuální *P. bauhini* vzešlo celkem 117 semenáčků. Vzhledem k celkovému počtu nažek (tab. 9, Příloha 2) je výnos z F1 generace proti *P. officinarum* větší. V potomstvu převažovaly tetraploidní rostliny (95.6 %), které zřejmě vznikly autogamií ($n + n$). Hybridní potomstvo bylo zastoupeno: pentaploidy ($n + n$) s *P. officinarum*, oktoploidem a nonaploidem (do celkového počtu nezahrnuti, viz kapitola 4.2). Pro lepší porovnání experimentálního křížení odkazuji na tab. 6, tab. 7 a obr. 7.

Tabulka 6 - Srovnání výsledků experimentálního křížení s výsledky R. Rosenbaumové (Rosenbaumová & Krahulec 2014)

Plo_POT	Mateřské rostliny_SM				Mateřské rostliny_RR			
	<i>P. officinarum</i> (6x)		<i>P. bauhini</i> (4x)		<i>P. officinarum</i> (4x)		<i>P. bauhini</i> (6x)	
	PJ	%	PJ	%	PJ	%	PJ	%
3x	—	—	—	—	—	—	12	1.1
4x	—	—	109	96.5	49	15.3	—	—
5x	—	—	4	3.5	272	84.7	49	4.6
6x	124	98.4	—	—	—	—	988	93.3
7x	—	—	—	—	—	—	2	0.2
8x	2	1.6	—	—	—	—	8	0.8
Celkem	126	100	113	100	321	100	1059	100

Plo_POT - ploidy potomků

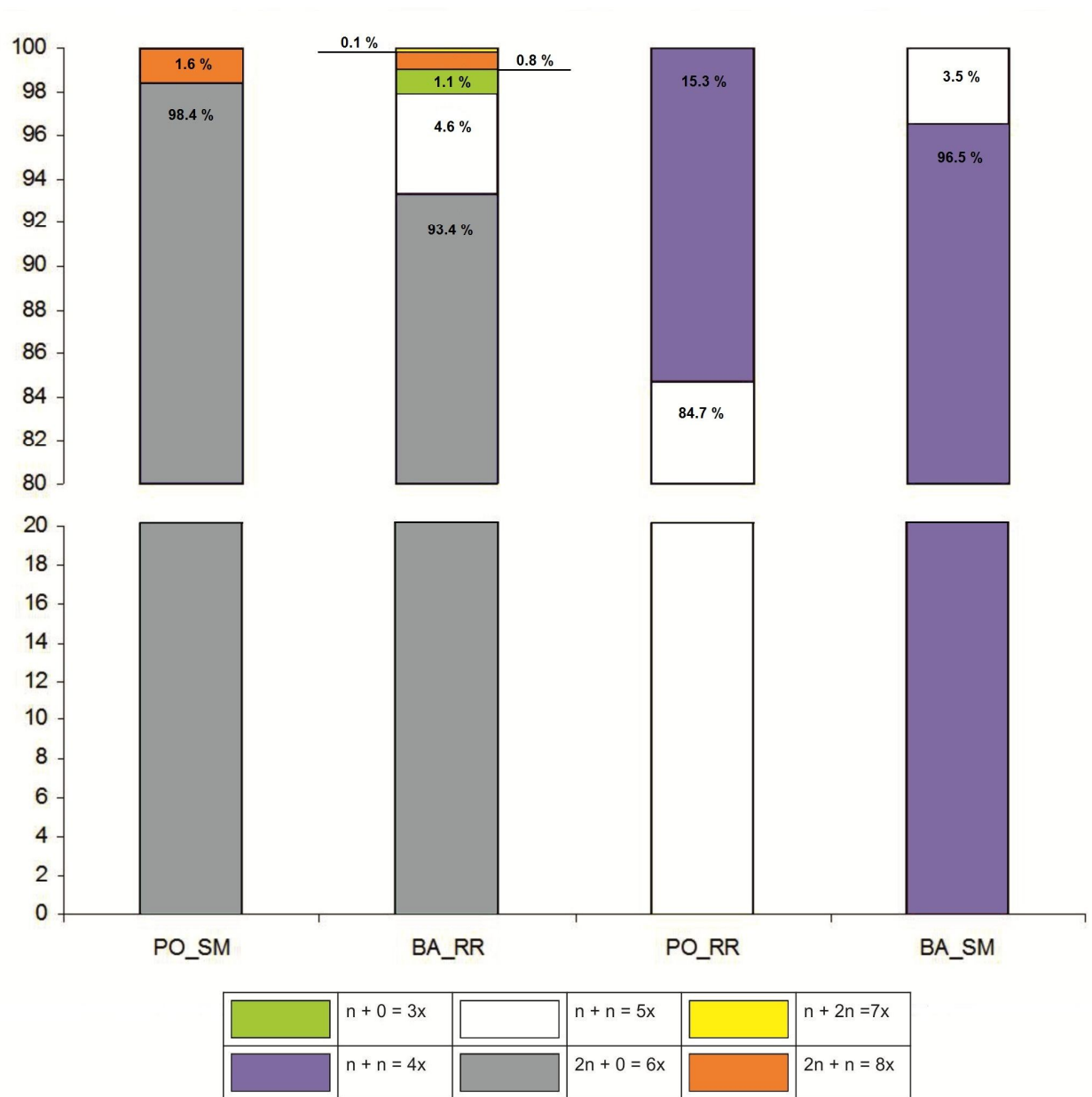
Mateřské rostliny_SM - rostliny získané z experimentu Markéty Skácelové

Mateřské rostliny_RR - rostliny získané z experimentu Radky Rosenbaumové

PJ - počet jedinců

% - počet jedinců v procentech

3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x - triploidy, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, okto-



Obrázek 7 – Srovnání proporcí jednotlivých typů potomků z reciprokého křížení. Pro lepší přehlednost je *osa y* rozdělena na dvě části. **PO_SM, BA_SM** – potomci *P. officinarum* (6x) a *P. bauhini* (4x) z experimentálního křížení Markéty Skácelové. **PO_RR, BA_RR** – potomci *P. officinarum* (4x) a *P. bauhini* (6x) z experimentálního křížení Radky Rosenbaumové.

Tabulka 7 – Srovnání reciprokých křížení. **a** - srovnání potomstva, které může vzniknout při experimentálním reciprokém křížení z práce Markéty Skácelové. Tmavě oranžové zvýraznění je potomstvo, které reálně vzniká. **b** - srovnání potomstva, které může vzniknout při experimentálním reciprokém křížení z práce Radky Rosenbaumové. Tmavě oranžové zvýraznění je potomstvo, které reálně vzniká.

a

		<i>P. officinarum</i> ♂* (2n = 6x)		
<i>P. bauhini</i> ♀* (2n = 4x)	Gamety	n = 3x	2n = 6x	
	n = 2x	n + n = 4x (a)	n + n = 5x	n + 2n = 8x
	2n = 4x		2n + n = 7x	2n + 2n = 10x
		<i>P. bauhini</i> ♂* (2n = 4x)		
<i>P. officinarum</i> ♀* (2n = 6x)	Gamety	n = 2x	2n = 4x	
	n = 3x	n + 0 = 3x	n + n = 5x	n + 2n = 7x
	2n = 6x	n + n = 6x (a)	2n + 0 = 6x	2n + n = 8x
			2n + 2n = 10x	

b

		<i>P. bauhini</i> ♂* (2n = 6x)		
<i>P. officinarum</i> ♀* (2n = 4x)	Gamety	n = 3x	2n = 6x	
	n = 2x	n + n = 4x (a)	n + n = 5x	n + 2n = 8x
	2n = 4x		2n + n = 7x	2n + 2n = 10x
		<i>P. officinarum</i> ♂* (2n = 4x)		
<i>P. bauhini</i> ♀* (2n = 6x)	Gamety	n = 2x	2n = 4x	
	n = 3x	n + 0 = 3x	n + n = 5x	n + 2n = 7x
	2n = 6x	n + n = 6x (a)	2n + 0 = 6x	2n + n = 8x
			2n + 2n = 10x	

5.5 Vyšší stupně ploidii

Vyššími stupni ploidie jsou zde myšleny úrovně nad hexaploidy. Obecně jsou vyšší ploidie v přírodě vzácné, a to i přesto, že se pravidelně objevují ve výsledcích experimentálních křížení (např. Bicknell et al. 2003; Krahulcová et al. 2004). Tyto stupně vznikají z neredukovaných gamet, nejčastěji ze samičí neredukované gamety (Krahulcová et al. 2004, 2011b). Tato skutečnost se také prokázala v práci Rosenbaumová & Krahulec (2014), kdy u apomiktické matky byl podíl potomstva z neredukované gamety dokonce až osmkrát vyšší než u neredukované samičí gamety. V této práci byl podíl potomstva s vyšší ploidii velmi zanedbatelný. Pouze dvě oktoploidní rostliny byly zaznamenány u *P. officinarum* (mateřská rostlina, apomikt) z experimentálního křížení na rostlinách ze Slovenska.

Oktoploidy byly dosud nalézány jako nejvyšší stupeň ploidie u hybridních rojů *P. officinarum* a *P. bauhini* (Krahulcová & Krahulec 2000; Rotreklová et al. 2002). Nově byl zaznamenán dekaploid na lokalitě u vesnice Valov. Jednalo se o záznam ze sesbíraných a vypěstovaných nažek, dospělý jedinec nalezen nebyl (Rosenbaumová & Krahulec 2014). Studium hybridních rojů fakultativně apomiktické *P. bauhini* a sexuální *P. officinarum* ukázalo nejen oktoploidy, ale i heptaploidy (Krahulcová et al. 2014).

Otázkou zůstává proč jsou stále hybridy s vyšší ploidii v přírodě vzácností. Vysvětlení podává několik studií vysoce polyploidních hybridů z křížení mezi sexuálními a apomiktickými jedinci. Z těchto prací vyplývá: (a) nově vzniklé $2n + n$ hybridy měly nestabilní genom; (b) hybridy obsahovaly celý genom mateřské apomiktické rostliny ($2n$), ale zároveň se projevila variabilita potomstva; (c) vytvářely tedy potomstvo s nižší s nižší ploidii, než je jejich vlastní ($n + n$ nebo haploidní partenogeneze) (Krahulec et al. 2008; Krahulcová et al. 2009a, 2011b). To by mohl být jeden z důvodů, proč jsou vyšší stupně ploidii v přírodě vzácností (Rosenbaumová & Krahulec 2014).

6 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala zbytkovou sexualitou u fakultativně apomiktického, hexaploidního druhu *Pilosella officinarum*. Tento jev má za následek tvorbu variabilnějšího potomstva než sexuálně se rozmnožující jedinci. Pro zjištění stupně zbytkové sexuality posloužilo experimentální křížení se sexuální, tetraploidní *P. bauhini*. Oba tyto druhy byly sbírány na lokalitách ve Slovenské republice.

Zbytková sexualita se u *P. officinarum* příliš neprojevila. Tedy, mezi potomky převažovaly hexaploidy z apomixy. Minimální podíl představovaly hybridní oktaploidy. Zajímavé bylo složení potomstva od *P. bauhini*. Zde se vyskytovaly hlavně tetraploidy z autogamie. Hybridní pentaploidy byly v menšině. Převaha tetraploidů svědčí o značném vlivu tzv. *mentor effectu*. Ten u sexuálně self-inkompatibilního (SI) jedince dokáže SI prolomit směsí cizího a vlastního pylu. Mezi potomstvem obou druhů se ukázalo několik jedinců s nejasným stupněm ploidie. Těmto druhům budou pro další práci přepočítány chromosomy.

Výsledky práce byly srovnány s prací provedenou v České republice. Zde byla zbytková sexualita zkoumána u fakultativně apomiktické, hexaploidní *P. bauhini* a sexuální tetraploidní *P. officinarum*. Výsledky obou prací byly podobné především z hlediska silného výskytu potomků z autogamie.

7 Literatura

Asker S., Jerling L. (1992): Apomixis in plants. – CRC Press, Boca Raton

Barrett, S. C. H. (1988): The evolution, maintenance, and loss of self-incompatibility systems. In: J. Lovett Doust and L. Lovett Doust [eds.] (1988): Reproductive ecology of plants: patterns and strategies, 98-124. – Oxford University Press, Oxford, ISBN 0-19-506394-5

Bicknell R. A., Lambie, S. C., Butler, R. C. (2003): Quantification of progeny classes in two facultatively apomictic accessions of *Hieracium*. – Hereditas, 138: 11–20

Bräutigam S., Greuter W. (2007): A new treatment of *Pilosella* for the Euro-Mediterranean flora [Notulae ad floram euro-mediterraneam pertinentes 24]. – Willdenowia, 37(1): 127-137

Darlington C. D. (1939): The evolution of genetic systems. – Oliver and Boyd, Edinburgh

Desrochers A. M., Rieseberg L. H. (1998): Mentor effects in wild species of *Helianthus* (Asteraceae). – Am J Bot, 85(6): 770-775

Doležel J., Bartoš J. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. – Ann Bot-London, 95: 99-110

Doležel J, Greilhuber J., Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – Nat Protoc, 2(9): 2233-2244

Fehrer L., Krahulcová A., Krahulec F., Chrtek J. Jr., Rosenbaumová R., Bräutigam S. (2007): Evolutionary aspects in *Hieracium* subgenus *Pilosella*. Grossniklaus U., Hörandl E., Sharbel T., van Dijk P. (eds.) (2007): Apomixis: Evolution, mechanisms and perspectives. Regnum Vegetabile, Koelts, Königstein, p. 359-390

Gadella T. W. J. (1987): Sexual tetraploid and apomictic pentaploid populations of *Hieracium pilosella* (Compositae). – *Plant Syst Evol*, 157: 219-246

Hörandl E., Temsch E. M. (2009): Introgression of apomixis into sexual species is inhibited by mentor effects and ploidy barriers in the *Ranunculus auricomus* complex. – *Ann Bot-London*, 104: 81-89

Chapman H. M., Parh D., Oraguzie N. (2000): Genetic structure and colonizing success of a clonal, weedy species, *Pilosella officinarum* (Asteraceae). – *Heredity*, 84: 401-409

Christoff M. (1942): Die genetische Grundlage der apomiktischen Fortpflanzung bei *Hieracium aurantiacum* L. Z. – *Indukt. Abstammungs-Vererbungsbl.*, 80: 103-125

Chrtek J. (2004): 11. Hieracium L. – jestřábník. In: Slavík B., Štěpánková J. (eds.) (2004): *Květena České republiky 7.* – Academia, Praha, p. 540-702, ISBN 80-200-1161-7

Koltunow A. M. (1993): Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. – *The Plant Cell*, 5:1425-1437

Krahulcová A., Chrtek J., Krahulec F. (1999): Autogamy in *Hieracium* subgen. *Pilosella*. *Folia Geobot*, 34: 373-376

Krahulcová A., Krahulec F. (2000): Offspring diversity in *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae): new cytotypes from hybridization experiments and from open pollination. *Fragm Florist Geobotanica*, 45(1–2):239–255

Krahulcová A., Krahulec F., Chapman H. (2000): Variation in *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae): what do we know about its sources? – *Folia Geobot*, 35: 319-338

Krahulcová A., Papoušková S., Krahulec F. (2004): Reproduction mode in the allopolyploid facultatively apomictic hawkweed *Hieracium rubrum* (Asteraceae, *H.* subgen. *Pilosella*). – *Hereditas*, 141:19-30

Krahulcová A., Rotreklová O., Krahulec F., Rosenbaumová R., Pláčková I. (2009a): Enriching ploidy level diversity: the role of apomictic and sexual biotypes of *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae) that coexist in polyploid populations. – *Folia Geobot*, 44: 281-306.

Krahulcová A., Vladimirov V., Krahulec F., Bräutigam S. (2009b): The agamic complex of *Pilosella* (Asteraceae) in Bulgaria and SW Romania: variation in ploidy level and breeding systems. – *Phytologia Balcanica*, 15(3): 377-384

Krahulcová A., Krahulec F., Rosenbaumová R. (2011): Expressivity of apomixis in $2n+n$ hybrids from an apomictic and a sexual parent: insights into variation detected in *Pilosella* (Asteraceae: Lactuceae). *Sex Plant Reprod*, 24: 63-74

Krahulcová A., Rotreklová O., Krahulec F. (2014): The detection, rate and manifestation of residual sexuality in apomictic populations of *Pilosella* (Asteraceae, Lactucaceae). – *Folia Geobot*, 49: DOI 10.1007/s12224-013-9166-0

Krahulec F., Krahulcová A., Fehrer J., Bräutigam S., Pláčková I., Chrtek J. jun (2004): The Sudetic group of *Hieracium* subgen. *Pilosella* in the Krkonoše Mts: a synthetic view. – *Preslia*, 76: 223–243

Krahulec F., Krahulcová A., Papoušková S. (2006): Ploidy level selection during germination and early stage of seedling growth in the progeny of allohexaploid facultative apomict, *Hieracium rubrum* (Asteraceae). – *Folia Geobot*, 41: 407-416

Krahulec F., Krahulcová A., Fehrer J., Bräutigam S., Schuhwerk F. (2008): The structure of the agamic complex of *Hieracium* subgen. *Pilosella* in the Šumava Mts and its comparison with other regions in Central Europe. – *Preslia*, 80:1-26

Krahulec F., Krahulcová A., Rosenbaumová R. (2011a): Diversita reprodukčních systémů v rodu *Pilosella* (chlupáček) a její odraz ve složení populací. *Zprávy Čes. Bot. Společ.*, 25: 7-19

Krahulec F., Krahulcová A., Rosenbaumová R., Plačková I. (2011b): Production of polyhaploids by facultatively apomictic *Pilosella* can result in formation of new genotypes via genome doubling. – *Preslia*, 83: 471–490

Krahulec F., Krahulcová A., Hlaváček R. (2014): Rare hybrid swarm of *Pilosella polymastix* × *P. officinarum*: cytotype structure and modes of reproduction. – *Preslia*, 86: 179-192

Křišťálová V., Chrtek J., Krahulcová A., Bräutigam S., Krahulec F. (2010): Populations of species of *Pilosella* in ruderal habitats in the city of Prague: frequency, chromosome numbers and mode of reproduction. – *Preslia*, 82: 437–464

Lysák M. A., Doležel J. (1998): Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (*Poaceae*). – *Caryologia*, 52: 123-132

Matzk F, Meister A, Brutovská R, Schubert I (2001): Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. – *Plant J* 26:275–282

Mendel G. (1869): On *Hieracium*-Hybrids Obtained by Artificial Fertilization. In: Robbins R. J. (eds.) (2000): Electronic Scholarly Publishing Project (<http://www.esp.org>)

Mráz P. (2003): Mentor effects in the genus *Hieracium* s. str. (Compositae, Lactuceae). – *Folia Geobot*, 38: 345-350

Mráz P., Šingliarová B., Urfus T., Krahulec F. (2008): Cytogeography of *Pilosella officinarum* (Compositae): Altitudinal and longitudinal differences in ploidy level distribution in the Czech Republic and Slovakia and the general pattern in Europe. – *Ann Bot-London*, 101: 59-71

Richards A. J. (1996): Genetic variability in obligate apomicts of the genus *Taraxacum*. – *Fol Geo Phyto*, 31: 405-414

Richards A. J. (1997): *Plant breeding systems*. – Ed 2. Chapman and Hall, London, ISBN 0-412-57450-0

Riesberg, L. H. (1991): Homoploid reticulate evolution in *Helianthus*: evidence from ribosomal genes. *Am J Bot*, 78: 1218-1237

Rosenbaumová R., Krahulcová A., Krahulec F. (2012): The intriguing complexity of parthenogenesis inheritance in *Pilosella rubra* (Asteraceae, Lactuceae). *Sex Plant Repris*, 25: 185-196

Rosenbaumová R., Krahulec F. (2014): Sexual reproduction as a source of ploidy level variation in the model agamic complex of *Pilosella bauhini* and *P. officinarum* (Asteraceae: Lactuceae). – *Plant Syst Evol* DOI 10.1007/s00606-014-1072-2

Rotreklová O., Krahulcová A., Vaňková D., Peckert T., Mráz P. (2002): Chromosome numbers and breeding systems in some species of *Hieracium* subgen. *Pilosella* from Central Europe. – *Preslia*, 74: 27–44

Rotreklová O., Krahulcová A., Mráz P., Mrázová V., Mártonfiiová L., Peckert T., Šingliarová B. (2005): Chromosome numbers and breeding systems of some European species of *Hieracium* subgen. *Pilosella*. – *Preslia*, 77: 177–195

Rotreklová O., Krahulcová A., Mráz P., Mrázová V., Mártonfiiová L., Peckert T., Šingliarová B. (2005): Chromosome numbers and breeding systems of some European species of *Hieracium* subgen. *Pilosella*. – *Preslia*, 77: 177–195

Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Krahulec F. (2006): Ploidy level versus DNA ploidy level: An appeal for consistent terminology. – *Taxon*, 55(2): 447–450

Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Rosenbaumová R., Peckert T., Krahulec F. (2007): Genome size variation and species relationships in *Hieracium* sub-genus *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. – *Ann Bot-London*, 100: 1323-1335

Tesařová M. (2012): Stanovení velikosti genomu u vybraných druhů rodu *Rubus* metodou průtokové cytometrie [Bakalářská práce]. Olomouc: Univerzita Palackého, PřF, Katedra botaniky

Tucker M. R., Koltunow A. M. G. (2009): Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. – *Funct Plant Biol*, 36:490-504

van Dijk P. J., van Baarlen P., de Jong J. H. (2003): The occurrence of phenotypically complementary apomixis-recombinants in crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*). – *Sex Plant Repris*, 16:71-76

Příloha 1: Přehled křížení mezi *Pilosella officinarum* a *P. bauhini*

Tabulka 8 - Přehled experimentálního křížení

Datum*	Kombinace křížení		Barva bavlnky 1	Počet opylení	Barva bavlnky 2	Počet opylení	Barva bavlnky 3	Počet opylení
	<i>Pilosella officinarum</i>	<i>Pilosella bauhini</i>						
20.5.2013	1939	1940	růžová	2				
	2051	1972	TM modrá	1				
	2076	1972	SV zelená	3	hnědá	1		
	2076	1959	fialová	3	čemá	1		
21.5.2013	1960	1940	žlutá	1				
	1960	1940	červená	1				
	2052	1972	bílá	1				
22.5.2013	2049	1959	SV modrá	2				
27.5.2013	1960	1959	SV modrá+SV zelená	2				
	1960	1940	červená+fialová+ bílá	1				
	1960	1940	červená+fialová	2				
30.5.2013	1939	1940	růžová+hnědá	2	čemá+žlutá	1		
	1939	1940	růžová+hnědá	2	čemá+žlutá	1		
	1939	1940	růžová+hnědá	2	čemá+žlutá	1	SV modrá+bílá	2
3.6.2013	1960	1972	TM modrá+červená	1				
6.6.2013	1939	1940	SV modrá+růžová	2	SV modrá+žlutá	1		
19.6.2013	2076	1940	žlutá+červená	1				

* - datum prvního dne opylení květu

SV -
světle

TM - tmavě

Příloha 2: Sesbírané nažky a vzešlé semenáčky

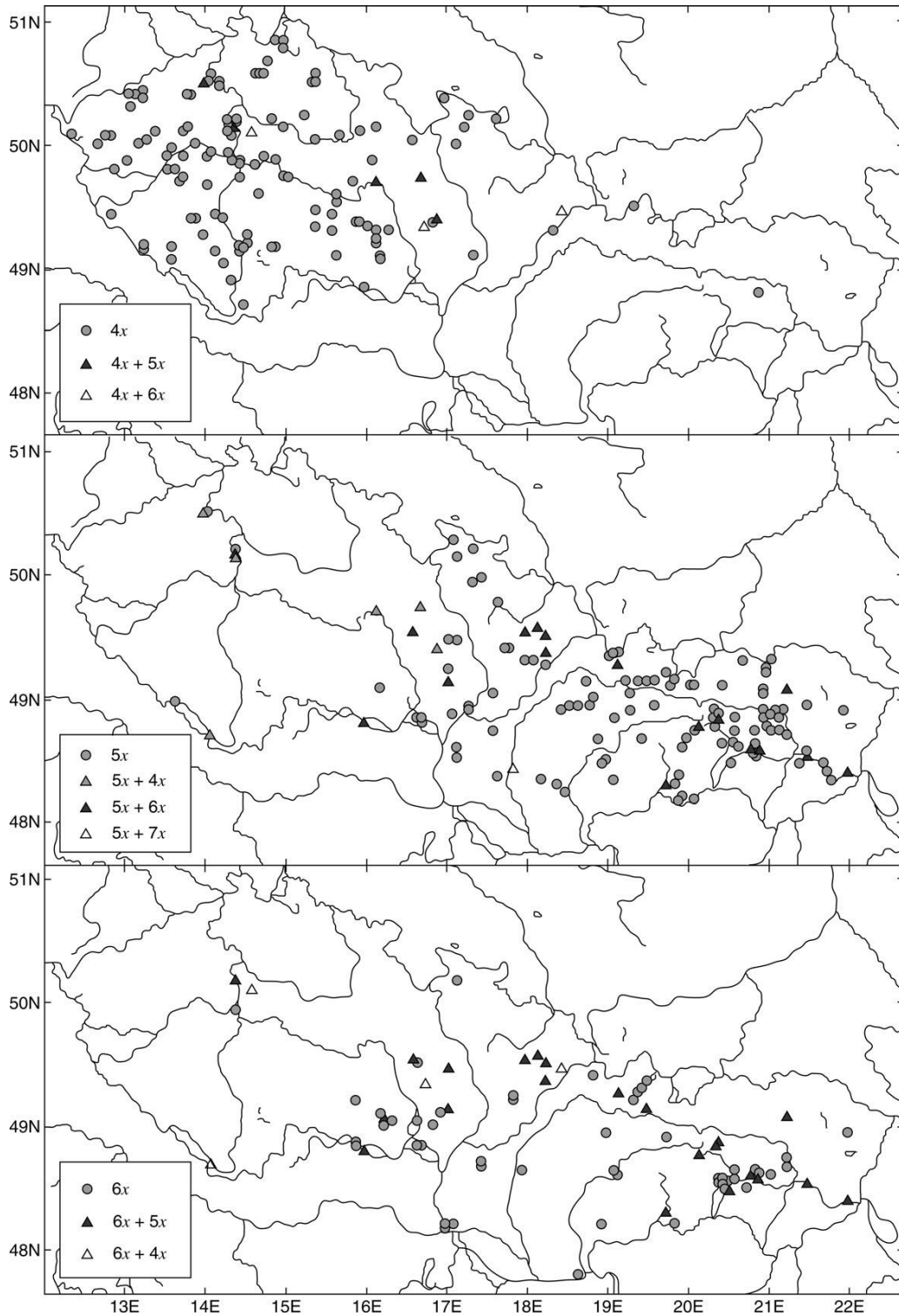
Tabulka 9 - Počty nažek a semenáčků

Pořadové číslo	PO	Semenáčky
1	75	7
2	77	2
9	62	16
10	80	21
11	28	6
12	38	6
13	0	0
14	65	37
18	0	0
19	55	14
25	23	1
42	27	10
43	60	15
Celkem PO*	590	135
Pořadové číslo	BA	Semenáčky
3	8	0
4	9	5
5	0	0
6	43	10
7	20	8
8	21	5
15	0	0
16	0	0
17	0	0
20	13	8
21	10	5
22	0	0
23	0	0
24	0	0
26	1	0
27	0	0
28	16	7
29	15	10
30	16	4
31	16	3
32	12	6
33	15	3
34	9	4
35	13	2
36	6	2
37	11	8
38	21	2
39	29	4
40	20	8
41	18	13
Celkem BA**	342	117
CELKEM	932	252

PO* - nažky *Pilosella officinarum*

BA** - nažky *Pilosella bauhini*

Příloha 3: Mapa rozšíření cytotypů *P. officinarum*



Obrázek 8 - Cytotypy *P. officinarum* v České republice, Slovensku a SV Maďarsku (Mráz et al. 2008)

Příloha 4: Fotografická dokumentace



Obrázek 9 - Zakrytí rostlin při experimentálním křížení z Průhonic. Na fotografii je *P. aurantiaca* a její potomci.



Obrázek 10 - Klíčící semenáček; © autor práce



Obrázek 11 - Semenáčky před přesazením do sadbovače; © autor práce



Obrázek 12 - Větší semenáče v sadbovači; © autor práce

Příloha 5: Tabulky hodnot z druhého měření na cytometru

Tabulka 10 – Hodnoty měření pro vzorky (semenáče) od mateřské rostliny BA_1940

ID	Index	Ploidie	Genom	Standard	Poznámky
6.1 - 4	1	4	P	BA_1940	
6.5 - 8	1	4	P	BA_1940	
6.9 - 10	1	4	P	BA_1940	
7.1 - 4	1	4	P	BA_1940	
7.5 - 8	1	4	P	BA_1940	
8.1_2	1	4	P	BA_1940	
8.3 - 5	1	4	P	BA_1940	
20.1 - 3	1	4	P	BA_1940	
20.4 - 6	1	4	P	BA_1940	
20.7	1	4	P	BA_1940	
20.9	1	4	P	BA_1940	
21.1	0.788258	5	9.096006	bez ST	
21.2	1	4	P	bez ST	21.3 má ploidii 4x
21.4	1	4	P	BA_1959	místo BA_1940
21.5	1	4	P	BA_1959	místo BA_1940
28.1	1	4	P	BA_1940	
28.2 - 4	1	4	P	BA_1940	
28.5	1	4	P	BA_1940	
28.6	1	4	P	BA_1940	
28.7	1	4	P	BA_1940	
29.1_2	1	4	P	BA_1940	
29.3_4	1	4	P	BA_1940	
29.6 - 7	1	4	P	BA_1940	
29.8 - 10	1	4	P	BA_1940	
30.1 - 2	1	4	P	BA_1940	
30.3 - 4	1	4	P	BA_1940	
31.1 - 3	1	4	P	BA_1940	31.3 má ploidii 4x
31.1	0.873783987	5	8.205689	BA_1940	
31.2	0.535110447	8	13.3991	BA_1940	podobný výsledek k tomu z 28. 5. 2014
32.1_2	1	4	P	BA_1940	
32.3 - 6	1	4	P	BA_1940	
33.2	0.433003811	9	16.55875	BA_1940	
33.3	1	4	P	BA_1940	
34.1 - 2	1	4	P	BA_1940	
34.3 - 4	1	4	P	BA_1940	
36.1 - 2	1	4	P	BA_1940	
37.1_3_4	1	4	P	BA_1940	
37.2_7	1	4	P	BA_1940	
37.5_6_8	1	4	P	BA_1940	
38.1 - 2	1	4	P	BA_1940	
39.1 - 5	1	4	P	BA_1940	
40.1 - 3	1	4	P	BA_1940	
40.4 - 7	1	4	P	BA_1940	
40.8	1	4	P	BA_1940	
41.1 - 4	1	4	P	BA_1940	

41.5 - 8	1	4	P	BA_1940
41.9 - 11	1	4	P	BA_1940
41.12 - 13	1	4	P	BA_1940

P - píky vzorků se kryly s píkem standardu

1 - vzorky byly stejné jako standard

Tabulka 11 – Hodnoty měření pro vzorky (semenáče) od mateřské rostliny BA_1959

ID	Index	Ploidie	Genom	Standard	Poznámky
4.3	0.75545768	5	9.490935	BA_1972	nedostatek BA_1959
4.4	1	4	P	BA_1959	4.1/4.2 mají ploidi 4x
4.5	1	4	P	BA_1959	
35.1	0.75539347	5	9.491742	BA_1972	nedostatek BA_1959

P - píky vzorků se kryly s píkem standardu

1 - vzorky byly stejné jako standard

Tabulka 12 – Hodnoty měření pro vzorky (semenáče) od mateřské rostliny PI_1939

ID	Index	Ploidie	Genom	Standard	Poznámky
14.1 - 5	1	6	P	PI_1939	
14.6 - 10	1	6	P	PI_1939	
14.11 - 15	1	6	P	PI_1939	
14.16 - 20	1	6	P	PI_1939	
14.21 - 25	1	6	P	PI_1939	
14.26 - 28	1	6	P	PI_1939	
14.29 - 31	1	6	P	PI_1939	
14.32 - 35	1	6	P	PI_1939	
14.36 - 38	1	6	P	PI_1939	
42.1 - 5	1	6	P	PI_1939	bez 42.4 (†)
42.6 - 10	1	6	P	PI_1939	
43.1 - 4	1	6	P	PI_1939	
43.5 - 8	1	6	P	PI_1939	
43.9 - 12	1	6	P	PI_1939	
43.13 - 15	1	6	P	PI_1939	

P - píky vzorků se kryly s píkem standardu

1 - vzorky byly stejné jako standard

† - mrtvá rostlina

Tabulka 13 – Hodnoty měření pro vzorky (semenáče) od mateřské rostliny PI_1960

ID	Index	Ploidie	Genom	Standard	Poznámky
1.3 - 6	1	6	P	PI_1960	
2.1	1	6	P	PI_1960	
10.1 - 3	1	6	P	PI_1960	
10.4 - 10.8	1	6	P	PI_1960	
10.10 - 12	1	6	P	PI_1960	
10.13 - 17	1	6	P	PI_1960	
10.18	0.946673	6	10.96051	PI_1960	
10.19	1.532657703	4	3.542865436	PI_1960	

10.20	0.728792217	8	7.450683295	PI_1960
19.1 - 4	1	6	P	PI_1960
19.5 - 8	1	6	P	PI_1960
19.9 - 11	1	6	P	PI_1960
19.13 - 14	1	6	P	PI_1960
25.1	1	6	P	PI_1960

P - pÍky vzorků se kryly s pÍkem standardu

1 - vzorky byly stejné jako standard

Tabulka 14 – Hodnoty měření pro vzorky (semenáče) od mateřské rostliny PI_2052

ID	Index	Ploidie	Genom	Standard	Poznámky
9.1 - 4	1	6	P	PI_2052	
9.5	1	6	P	PI_2052	R je velmi špatném stavu
9.6 - 11	1	6	P	PI_2052	
9.14 - 16	1	6	P	PI_2052	

P - pÍky vzorků se kryly s pÍkem standardu

1 - vzorky byly stejné jako standard

R - rostlina

Tabulka 15 – Hodnoty měření pro vzorky (semenáče) od mateřské rostliny PI_2076

ID	Index	Ploidie	Genom	Standard	Poznámky
12.1 - 3	1	6	P	PI_1960	mÍsto PI_2076
12.4 - 5	1	6	P	PI_1960	mÍsto PI_2076
12.6	0.735956769	8	14.23997	PI_1939	
11.1 - 4	1	6	P	PI_1960	mÍsto PI_2076
11.5	1.403473996	4	7.467185	PI_1939	
11.6	1.393657309	4	7.519783	PI_1939	

P - pÍky vzorků se kryly s pÍkem standardu

1 - vzorky byly stejné jako standard