

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství**

## **Vliv životaschopnosti gamet a teploty prostředí na efektivitu šlechtění polyploidních rostlin**

**Alžběta Poštulková**  
**Hlavní město Praha**

**Praha 2019**



# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství**

**Vliv životaschopnosti gamet a teploty prostředí na  
efektivitu šlechtění polyploidních rostlin**

**The effect of the gamete viability and the ambient  
temperature on the efficiency of polyploid plants  
breeding**

**Autoři:** Alžběta Poštulková

**Škola:** Gymnázium, Praha 2, Botičská 1, Botičská 1, 128 01 Praha 2

**Kraj:** Hlavní město Praha

**Konzultant:** Mgr. Magdalena Bohutínská

Praha 2019



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Praha 17. 2. 2019

.....  
Alžběta Poštulková



## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Mgr. Magdaleně Bohutínské za odborné vedení mé práce a trpělivost a obětavou pomoc při jejím zpracovávání. Velký dík patří i Mgr. Vlastě Čepelové za podnětné připomínky a pomoc při tvorbě práce ve škole.

Dále bych ráda poděkovala Katedře botaniky PřF UK, oddělení cévnatých rostlin za poskytnuté zázemí.





## **Anotace**

Neredukované gamety (pohlavní buňky obsahující dvojnásobek genetické informace, než ostatní) přispívají ke vzniku polyploidie, vlastnictví tří a více chromosomových sad. Polyploidie svým nositelům často umožňuje získávat nové vlastnosti, odlišit se od diploidních rodičů a produkovat větší pletiva a semena, což jsou vlastnosti zásadní pro evoluci mnoha rostlin a vysoce žádané u plodin. Díky neredukovaným gametám můžeme polyploidii u rostlin jednak vyvolat nebo můžeme křížit polyploidy s jejich diploidními předchůdci a tím napomoci šlechtění nových rostlin. Neredukované gamety jsou ovšem v přírodních populacích velmi vzácné. Je proto důležité lépe prozkoumat všechny faktory vzniku a životaschopnosti těchto gamet.

Ve své práci jsem se rozhodla zkoumat vliv zvýšené teploty na produkci životaschopných neredukovaných gamet. O vysokých teplotách je totiž známo, že narušují meiózu a měly by tedy ovlivňovat i samotnou tvorbu gamet. Proto jsem zkoumala četnost neredukovaných gamet v prašnicích rostlin, které byly pěstovány po různě dlouhou dobu v pěti vysokých teplotách – 20, 26, 30, 33 a 37 °C.

Z mojí práce vyplývá, že na to, jestli bude rostlina produkovat neredukovaný pyl, má největší vliv nejvyšší zkoumaná teplota, 37 °C. Ovšem i při teplotě 33 °C se neredukovaný pyl tvoří ve zvýšené míře, gamety však byly při této teplotě méně životaschopné. Pokud jde o délku vystavení vyšší teplotě, nejvyšší četnost neredukovaných gamet se vyskytovala po dvaceti dnech, tedy po dlouhodobém vystavení vyšší teplotě. Velký vliv měl i teplotní šok z přenosu do vyšší teploty, který byl měřen jako příbytek neredukovaných gamet po dvou dnech ve zvýšené teplotě. Zvýšená ploidie rostliny neměla přílišný vliv na produkci neredukovaného pylu.

Celkově moje práce ukazuje, že vystavením rostlin dlouhodobému působení vysoké teploty můžeme navodit zvýšenou produkci životaschopných neredukovaných gamet. Tyto neredukované pohlavní buňky stojí za vznikem a křížením velkého množství současných užitkových plodin (např. pšenice, brambory, káva, brukvovitá zelenina) a mohou přispět k šlechtění a křížení mnoha dalších.

## **Klíčová slova**

neredukované gamety; šlechtění plodin; polyploidie; životaschopnost gamet

## **Annotation**

Unreduced gametes (sex cells with double genetic information than others) contribute to formation of polyploidy, a possession of three or more complete chromosome sets. Polyploidy enables organisms to acquire new functions, to distinguish them from their diploid parents and produce bigger tissues and seeds, which are attributes essential for evolution of many plants and highly desirable for crops. Thanks to unreduced gametes we can induce polyploidy, or we can cross polyploids with their diploid progenitors and thus help to breed new plants. However, unreduced gametes appear in natural conditions only rarely. Therefore, it is very important to examine all factors of formation and viability of those gametes.

In my work I decided to study effect of increased temperature on production of viable unreduced gametes. High temperatures are known to effect meiosis and thus they could influence the gamete formation itself. That is why I have studied the frequency of unreduced gametes in anthers of plants grown for a different time period in five high temperatures – 20, 26, 30, 33 and 37 °C.

Here I show that the highest examined temperature 37 °C has the strongest effect on unreduced gamete production. However, 33 °C treatment also increased the unreduced pollen production to some extent. Gametes produced in that temperature were unfortunately less viable. As it comes to the length of exposure to higher temperature, the highest unreduced gamete frequency occurred after twenty days, i.e. long-term exposure to higher temperature. However, high effect has also thermal shock from moving to higher temperature, which was measured like the accrual of unreduced gametes after two days in higher temperature. Increased ploidy level of plant did not influence the unreduced gamete production much.

Overall, my work shows that by exposure of plants to long-term high temperature treatment we can induce increased production of viable unreduced gametes. These unreduced sex cells are responsible for origin and crossing of many crop plants nowadays (for example wheat, potato, coffee, brassica vegetables) and they might contribute to breeding and crossing of many others.

## **Keywords**

unreduced gametes; crop plants breeding; polyploidy; gamete viability

# Obsah

1	Úvod.....	7
2	Přehled literatury.....	8
2.1	Polyploidie .....	8
2.1.1	Autopolyploidie a allopolyploidie .....	8
2.1.2	Význam polyploidie v evoluci.....	8
2.1.3	Vznik polyploidů .....	9
2.1.4	Význam polyploidie v zemědělství.....	10
2.2	Neredukované gamety.....	11
2.2.1	Vznik.....	11
2.2.2	Vliv prostředí na vznik neredukovaných gamet .....	14
2.3	Závislost životaschopnosti neredukovaných gamet na zvýšení teploty během jejich produkce.....	14
2.4	Řeřišník písečný .....	15
3	Metodika .....	16
3.1	Cíl práce .....	16
3.2	Odběr vzorků.....	16
3.3	Příprava vzorku k mikroskopování .....	18
3.3.1	Petersonova metoda barvení .....	18
3.4	Mikroskopování a vyhodnocení vzorku.....	19
4	Výsledky .....	20
4.1	Detekce pylu podle velikosti .....	20
4.2	Variabilita v tvorbě neredukovaných gamet u <i>Arabidopsis arenosa</i> .....	21
4.3	Tvorba neredukovaných gamet a její závislost na teplotě .....	22
4.4	Vliv doby vystavení vyšší teplotě .....	27
4.4.1	Přenos do teploty 20 °C .....	28
4.4.2	Přenos do teploty 26 °C .....	28
4.4.3	Přenos do teploty 30 °C .....	29
4.4.4	Přenos do teploty 33 °C .....	29
4.4.5	Přenos do teploty 37 °C .....	29
4.4.6	Celkové zhodnocení vlivu doby vystavení vyšší teplotě .....	29
4.5	Celkový vliv teploty zobrazený pro všechny populace.....	30
4.6	Zhodnocení vlivu zvýšené teploty na životaschopnost vznikajících gamet.....	31

5	Diskuse .....	33
6	Závěr .....	34
7	Použitá literatura.....	35
8	Seznam zkratk.....	37
9	Seznam obrázků a tabulek .....	38

# 1 ÚVOD

Ve své práci se zabývám tvorbou a životaschopností neredukovaných gamet u řeřišníku písečného (*Arabidopsis arenosa*) a faktory, které ji ovlivňují. Hlavním zkoumaným faktorem je vysoká teplota a její změny. Zkoumala jsem četnost neredukovaných gamet v prašnicích rostlin, které byly pěstovány v různých teplotních podmínkách. Všechny byly původně pěstovány v 13 °C, ale poté bylo několik jednotlivců odebráno a rozmístěno do pěti různých teplot. Z nových teplot byly odebrány vzorky po dvou, pěti a dvaceti dnech. U zkoumaných teplot jsem následně porovnávala i životaschopnost gamet, které v nich byly tvořené.

Díky tomu jsem mohla zkoumat, jestli větší vliv má samotná vysoká teplota nebo teplotní šok z přesunu do ní. Další otázka, která mě zajímala, byla, jaká z teplot bude mít největší vliv. Zda mezi nimi bude rozdíl nebo bude stačit, že je teplota vyšší a bude jedno o kolik. Poslední věc, kterou jsem zkoumala, bylo, jestli jsou největší rozdíly na úrovni jedinců, populací nebo ploidii rostlin, tedy jestli více genetického materiálu ovlivňuje náchylnost k tvorbě neredukovaných gamet.

Neredukované gamety přispívají ke vzniku polyploidie u rostlin. Mnoho zemědělsky využívaných rostlin je polyploidních, a proto je důležité lépe prozkoumat způsoby, kterými dochází ke vzniku životaschopných neredukovaných gamet. Mohlo by to pomoci při šlechtění nových hospodářských plodin.

## 2 PŘEHLED LITERATURY

### 2.1 Polyploidie

Polyploidie je definována jako vlastnictví tří nebo více kompletních sad chromozomů v buňce. Organismy s takto zmnoženými chromozomovými sadami ve všech buňkách se nazývají polyploidní. Polyploidie se vyskytují v nejrůznějších skupinách eukaryot, avšak obzvláště významnou roli hraje polyploidie u rostlin, proto se o ní zmiňujeme dále. (1)

Mezi polyploidní rostliny řadíme mnoho hospodářsky využívaných druhů (např. kukuřice, banánovník, pšenice, řepka olejka, brambory, kávovník, podzemnice olejná, oves, cukrová třtina, tabák a mnoho druhů ovoce), proto je porozumění procesům spojeným s polyploidii, jejím vznikem a reprodukčními bariérami mezi polyploidními a nepolyploidními rostlinami pro pěstování a šlechtění těchto plodin zcela nezbytné. (2) (3) (4) (5)

#### 2.1.1 Autopolyploidie a allopolyploidie

Různé druhy polyploidie se nazývají podle konkrétního počtu chromozomových sad, to znamená, že rostlina, která má tři sady, je triploidní, ta, která má čtyři, tetraploidní atd. Dále se rozlišuje, jestli tyto sady pocházejí od jednoho druhu nebo ne. (1)

Autopolyploidie je znásobení sad chromozomů v rámci jednoho druhu, autopolyploidie tedy nemají předchozí diferenciaci chromozomových sad. Allopolyploidie mají znásobené chromozomové sady, které pocházejí od dvou nebo více druhů. Je však nutno podotknout, že na rozlišování autopolyploidů a allopolyploidů neexistuje pouze jeden názor. (6) (1)

Stebbins, 1947 například navrhl způsob rozlišení polyploidů, kde se bere v úvahu hlavně chování chromozomů během meiózy. Podle této teorie může docházet u autopolyploidů během meiózy k multivalentnímu spojení chromozomů, to znamená, že se spolu spojí více než dva chromozomy. K takovému spojení může dojít díky tomu, že autopolyploidie nemají rozrůzněné chromozomové sady, takže se chromozomy mohou spojit ve větším počtu (multivalentní spojení) a výsledný počet chromozomů v dceřiných buňkách je nerovnoměrný. U allopolyploidů se multivalentní spojení chromozomů vyskytuje jen zřídka a jejich cytogenetické chování je podobné diploidům, protože obsahují dva diploidní genotypy v jednom genomu. (5)

#### 2.1.2 Význam polyploidie v evoluci

Polyploidie je důležitým rysem v evoluci mnoha eukaryotických taxonomických skupin a v případě rostlin hraje v evoluci jednu z klíčových rolí (je odhadováno, že 47 % až 70 % krytosemenných rostlin je polyploidních).

Polyploidie je považována za hlavní mechanismus přizpůsobování a rozrůžňování rostlinných druhů. Byly pozorovány rozdíly ploidie mezi příbuznými jedinci i v rámci populace jednoho druhu a je dokázáno, že jednotlivé polyploidní taxony mohou mít vícenásobný původ. Tato pozorování nasvědčují tomu, že evoluce polyploidů je neustávající proces, a ne jednorázová makroevoluční událost (událost, která se v evoluci vyskytla jednou a už se neopakovala). (7)

K dokladům rozrůžňování nově vzniklých polyploidních taxonů přispívá i fakt, že polyploidi často mají vlastnosti, které nejsou obsaženy v ani jednom z genomů jejich rodičovských druhů. Některé z nových znaků mohou rostlině pomoci se adaptovat na jiné podmínky a osídlit novou ekologickou niku. (8)

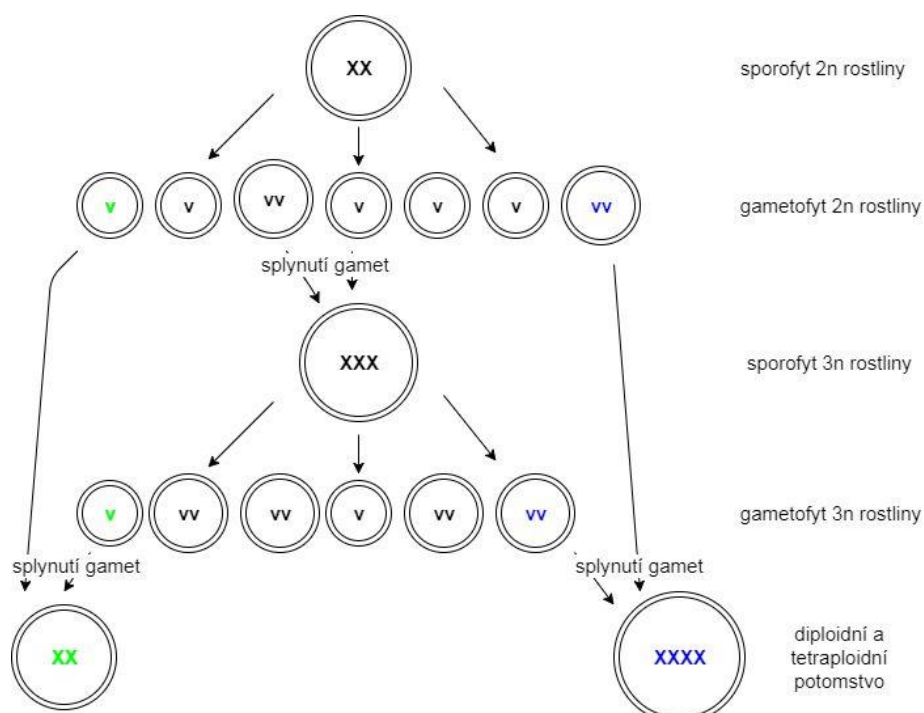
Nově vzniklý polyploid je z velké míry reprodukčně izolován od rodičů, takže vzniká nový druh, aniž by oproti nim musel mít nějakou výhodnou vlastnost. Výhodou polyploidie je i to, že polyploid má dvojnásobnou zásobu genetického materiálu, což mu umožňuje větší variabilitu genů. To je výhodné pro adaptaci v měnícím se prostředí. Polyploid může rozrůžňovat svoje geny, aniž by přišel o ty původní.

Nevýhodou nově vznikajících polyploidních druhů může být nižší životaschopnost jedinců. Buňky se například hůře vypořádají s dvojnásobným množstvím DNA. Může dojít k pozměněné regulaci genů nebo k jejich poškození. To může mít fatální následky.

K posouzení pravděpodobnosti toho, zda se nový polyploid úspěšně etabluje, potřebujeme informace o životaschopnosti a plodnosti nových cytotypů (skupiny populací v rámci jednoho druhu lišících se počtem a strukturou chromozomů), rozsahu reprodukční izolace uvnitř cytotypů a mezi nimi a o ekologické nise nových polyploidů. (1)

### 2.1.3 Vznik polyploidů

Duplikace chromozomových sad může probíhat v zásadě dvěma cestami. První, v přírodě asi častější způsob, je oplození neredukovanými gametami. Když je běžná diploidní ( $2n$ ) rostlina s redukovanými gametami oplodněna neredukovaným pylem, může křížením vzniknout nový triploid. Triploidi se mohou sloučit s rodičovskými gametami nebo dojde k samooplození a výsledkem jsou diploidní a tetraploidní genotypy a potomstvo. (1)



Obrázek 1 Vznik polyploidů přes triploidní jedince, vlastní tvorba

Rostliny také mohou produkovat neredukované gamety s dvěma kopiemi každého chromozomu, které se sloučí s jinými neredukovanými gametami a vznikají autopolyploidi. V případě diploidního pylu tetraploidi. (9)

Allopolyploidi mohou vznikat sloučením dvou neredukovaných gamet různých druhů nebo sloučením haploidních gamet dvou různých druhů. Hybridi vzniklí druhým způsobem bývají většinou neplodní, protože nelze spárovat dvě rozdílné sady chromozomů. Překonat tento problém může pomoci zdvojení genomu. (10)

Druhá cesta předpokládá duplikaci chromozomů až po oplození, v embryu nebo později během vývoje rostliny. Tento způsob je často využíván ve šlechtitelství, kde se ke znásobení chromozomových sad používají chemikálie (např. kolchicin), které brání rozestupu chromozomů k pólům dělicí se buňky. (2)

Některé výzkumy uvádějí, že neredukovaná vajíčka jsou spolehlivějším zdrojem polyploidů než neredukované gamety. Větší míru tvorby triploidů pozorovali vědci u křížení, kdy mateřské gamety byly neredukované a otcovské redukované. Mechanismy formace polyploidů však stále potřebují podrobnější výzkum. (1)

#### 2.1.4 Význam polyploidie v zemědělství

Polyploidie má velký potenciál pro využití v zemědělství. Naprostá většina hospodářských plodin je polyploidních. Neredukované gamety je možné využít při pěstování hospodářských rostlin. Jedinci produkující neredukované gamety jsou využíváni šlechtiteli k zajištění polyploidizace u řady druhů. (11)



Neredukované gamety umožňují například křížení rostlin s různou hodnotou ploidie, které selhávalo kvůli nevyváženému zastoupení rodičovských genů ve vznikajícím semenu. Tento problém lze vyřešit tím, že přimějeme rostlinu s nižší ploidii tvořit neredukované gamety, které tak mají stejné množství DNA jako redukované (tj. normální) gamety polyploidní rostliny a jsou tedy vzájemně kompatibilní. (12)

Pomocí neredukovaných gamet se dají vypěstovat nové polyploidní druhy (zvýšením polyploidie původního druhu). To by mohlo mít nevyčísitelnou hodnotu pro šlechtění díky potenciálnímu zvýšení genetické rozmanitosti rostlin.

K pěstování nových rostlin, které by produkovaly neredukované gamety, jsou využívány i chemikálie, které ovlivňují rostlinná pletiva tak, aby začala produkovat neredukované gamety. Tento způsob je však dost namáhavý a časově náročný a polyploidní takto vzniklí bývali méně životaschopní než ti, kteří vznikli pomocí sexuální polyploidizace (násobení chromozomových sad za přispění neredukovaných gamet) skrze mutace vedoucí k tvorbě neredukovaných gamet. (3)

## 2.2 Neredukované gamety

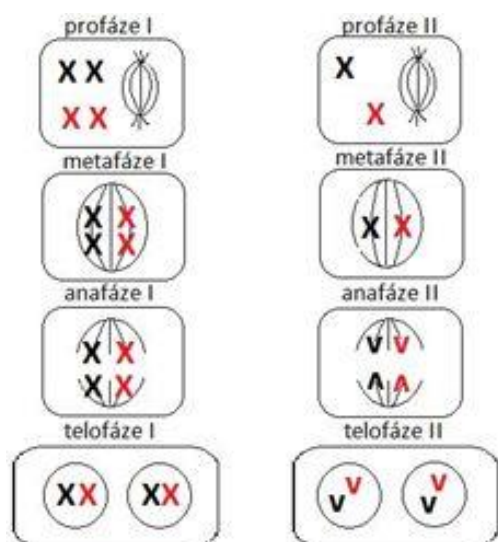
### 2.2.1 Vznik

Gamety neboli pohlavní buňky jsou u diploidních rostlin haploidní ( $n$ ). Vzácně však vznikají i neredukované gamety, které nejsou haploidní ( $n$ ), ale diploidní ( $2n$ ), což znamená, že buňka má dvojnásobný počet chromozomů. Ve své práci jsem se zaměřila na pyl, takže pojem gameta využívám ve smyslu samčí pohlavní buňky (pylové zrno).

Vznikají při meiotickém dělení stejně jako redukované gamety. Existuje mnoho způsobů, kterými může dojít kvůli poruše meiózy ke vzniku neredukované gamety. Pomocí cytologických testů bylo objeveno pět pravděpodobných způsobů vzniku  $2n$  gamet: zdvojení předcházející meióze, vynechání prvního meiotického dělení, vynechání druhého dělení, zdvojení následující po meióze a zmnožení chromozomů po prvním meiotickém dělení. (13)

Jednou z velmi dobře prozkoumaných abnormalit vedoucích ke vzniku neredukovaných gamet je porucha dělicího vřeténka. Může mít netypický geometrický tvar nebo chybět úplně. Abnormality dělicího vřeténka jsou považovány za častý důvod tvorby  $2n$  gamet u dvouděložných rostlin. (14)

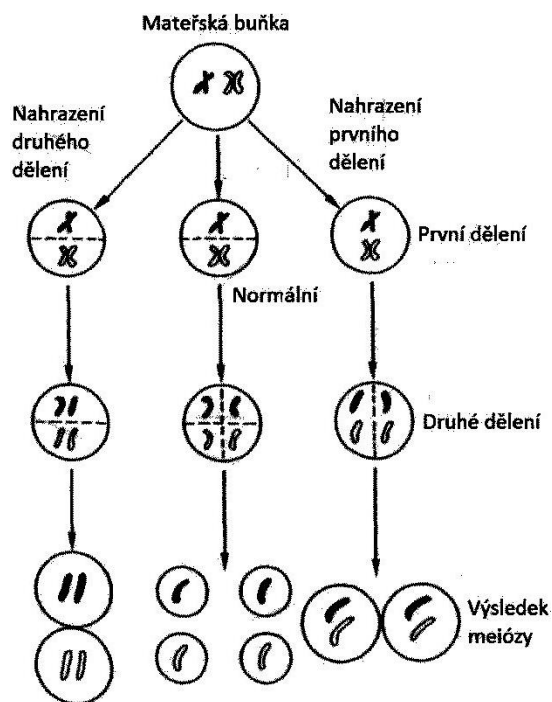
Ke vzniku neredukovaných gamet může vést i předčasná cytokineze (rozdělení buňky) před rozdělením sesterských chromatid. U některých druhů vznikly  $2n$  gamety kvůli nedokončené nebo chybějící cytokinezi na konci meiózy.



Obrázek 2 Běžný průběh meiózy; heterotypické = redukční (I) a homeotypické = ekvační (II) dělení, vlastní tvorba

Během normální meiózy dochází ke dvěma po sobě jdoucím dělením buňky. První dělení vede k rozdělení chromozomového páru a v druhém dochází k oddělení sesterských chromatid každého chromozomu. Dále jsou popsány dva nejzákladnější způsoby, kterými může poruchou v meióze dojít ke vzniku neredukované gamety (Obrázek 3). V prvním případě neprobíhá separace chromozomového páru v anafázi I. Druhé meiotické dělení probíhá normálně, tudíž se při něm sesterské chromatidy každého chromozomu od sebe vzdalují a přibližují se k protilehlým pólům.

V druhém případě dochází během prvního meiotického dělení k standardnímu rozdělení páru chromozomů. K poruše dochází až při druhém dělení, kdy nedochází k rozdělení sesterských chromatid. Rozlišit, zda výsledná neredukovaná gameta vznikla prvním nebo druhým způsobem, lze podle toho, že v prvním případě má výsledná gameta dvě chromatidy, které nejsou sesterské, zatímco v druhém případě buňka vlastní dvě sesterské chromatidy. (4)



Obrázek 3 Dva základní způsoby poruch meiózy vedoucích k vzniku neredukovaných gamet; upraveno podle (4)

Neredukované gamety představují důležitou cestu pro genový transfer mezi populacemi s různou ploidní úrovní. Při zkoumání „redukce gamet“ je důležité umět rozlišit redukovanou a neredukovanou gametu podle vzhledu.

Ty mohou být v první řadě odlišitelné podle velikosti. Neredukované gamety jsou obecně větší než běžné haploidní ( $n$ ) (Obrázek 4). Velikost neredukovaných gamet je pochopitelná vzhledem ke znásobení chromozomových sad v jádře, a tudíž zvětšení celého jádra. Velikosti gamet nelze samozřejmě srovnávat mezi různými druhy, protože jednotlivé druhy mají různě velké redukované gamety.

Redukce se ale projevuje i na celkovém tvaru buňky. U brukvovitých (čeled' s nejvýznamnějšími modelovými organismy) jsou neredukované gamety většinou kulaté a mají čtyři klíční póry, zatímco redukované mají tvar víc připomínající trojúhelník a mají jen tři póry ve sporodermě, stěně spory (pylového zrna). (15)



Obrázek 4 Obarvené redukované a jedna neredukovaná gameta; vlastní tvorba

### 2.2.2 Vliv prostředí na vznik neredukovaných gamet

Několik výzkumů prokázalo, že produkce neredukovaného pylu je ovlivňována ekologickými faktory, jako je teplota nebo dostatek vody a živin. Teplota, zejména její změny, mají velký dopad na tvorbu neredukovaných gamet.

Ramsey & Schemske uvádí, že frekvence výskytu neredukovaného pylu u náhodně zvolených rostlin, které byly pěstovány v růstové komoře s cyklicky se měnící teplotou, byla přibližně šestkrát větší než frekvence neredukovaných gamet v přírodní populaci. Bylo vybráno dvacet náhodných jedinců z přirozené populace jednoho druhu řebříčku (*Achillea borealis*). Ti byli umístěni do růstové komory, kde probíhal šestihodinový cyklus změn teploty. Rozsah teplot se pohyboval od 6 °C do 30 °C.

Jak již bylo zmíněno výše, produkce neredukovaného pylu byla v růstové komoře značně větší než v přirozeném prostředí. Přesněji dvacet z dvaceti rostlin pěstovaných v teplotních změnách tvořilo neredukované gamety s průměrnou frekvencí 0,422 %, oproti 26 rostlinách ze 75 v přírodní populaci s frekvencí 0,161 %. (1)

Belling (1925) pozoroval významné zvýšení produkce 2n pylu provázející netypická chladná období. (16)

Většině z ekologických faktorů, o kterých víme, že ovlivňují tvorbu neredukovaných gamet, jsou rostliny vystavovány ve svém přirozeném prostředí. To naznačuje, že změny životního prostředí, například klimatu, mohou mít značný vliv na dynamiku evoluce polyploidie. Velká četnost polyploidie ve velkých nadmořských výškách, vysokých zeměpisných šířkách a nedávno zaledněných oblastech může být spojena s tendencí drsných životních podmínek vyvolávat tvorbu neredukovaných gamet a polyploidů. (1)

## 2.3 Závislost životaschopnosti neredukovaných gamet na zvýšení teploty během jejich produkce

Při snaze o produkci neredukovaných gamet pomocí vysokých teplot může zároveň dojít k narušení jejich životaschopnosti, protože je známo, že vysoké teploty životaschopnost pylu snižují. (17) (18) (19) To bylo prokázáno u mnoha diploidních i polyploidních druhů rostlin a potenciálně tento jev může vést k snížení benefitů, které vysoké teploty pro tvorbu neredukovaných gamet představují.

Polyploidie může také představovat výzvu při tvorbě životaschopného pylu. Výzkum na triploidních hybridech borůvek uvádí, že méně než 1,5 % pylu produkovaného triploidy bylo životaschopného. (20)

Pro zvýšení životaschopnosti potomstva je důležité mít vyvážené zastoupení mateřského a otcovského endospermu, nejlépe v poměru 2:1. Jiné způsoby křížení končily většinou úmrtím potomstva. Tento poměr fungoval při křížení různých ploidních stupňů, ale i stejných. (4) (21)

## 2.4 Řeřišník písečný

Řeřišník písečný (*Arabidopsis arenosa* (L.) Lawalrée; *Cardaminopsis arenosa* (L.) Hayek) je rostlina řazená do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Jeho blízkým příbuzným je huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), který se používá v molekulární genetice rostlin jako modelový organismus. Z hlediska ploidie je řeřišník písečný diploidní nebo autotetraploidní. (22)

Pro mou práci je tato rostlina dobrým modelovým druhem díky několika jejím vlastnostem. Má dva různé ploidní stupně, mohu tedy srovnávat pylová zrna diploidních a polyploidních rostlin. Dobře se pěstuje a rychle produkuje pyl, což usnadňuje experimenty.

## 3 METODIKA

### 3.1 Cíl práce

Cílem mé práce bylo prozkoumat faktory ovlivňující vznik polyploidních jedinců v rostlinných populacích. Konkrétně jsem se zaměřila na vliv teploty na polyploidizaci (násobení chromozomových sad).

Výsledkem sexuální polyploidizace (násobení chromozomových sad za přispění neredukovaných gamet) bylo často vysoce výnosné potomstvo. Polyploidní potomci původních rostlin totiž velmi často převyšují svou výnosností své diploidní sourozence. (23)

### 3.2 Odběr vzorků

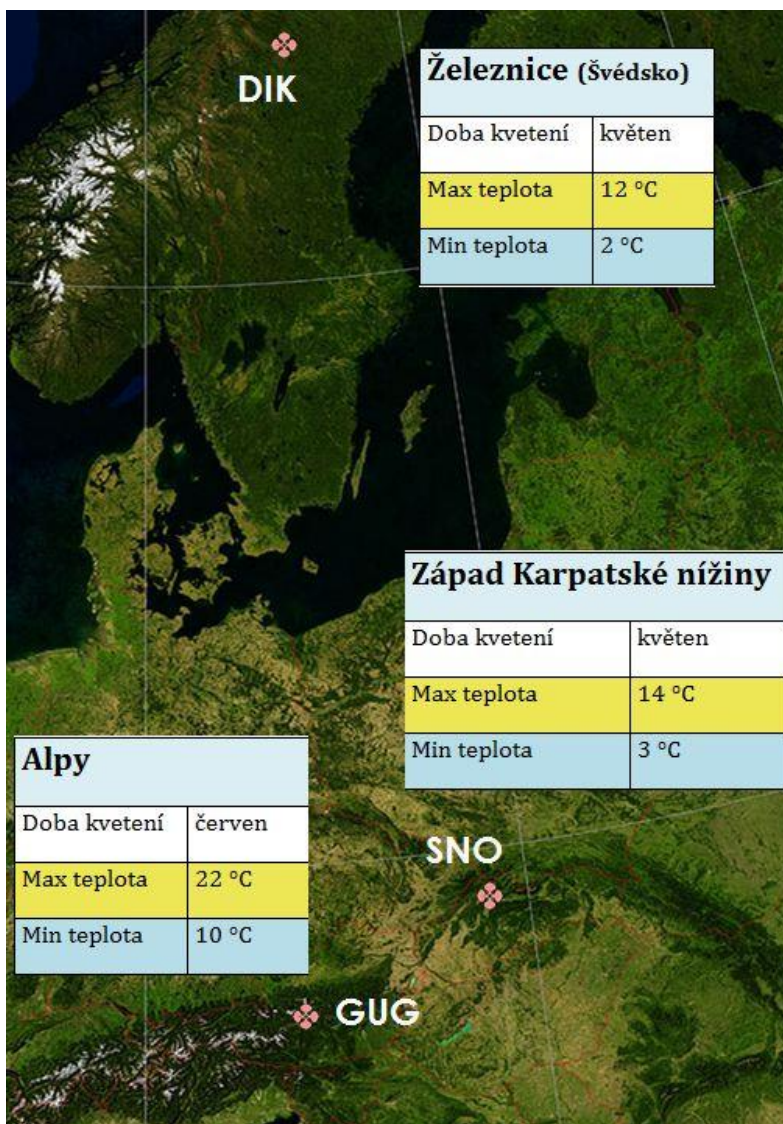
Původ populací (viz mapa níže, Obrázek 5):

- Dikanas (DIK) – tetraploidní, nadmořská výška 500 m
- Gullingtal (GUG) – tetraploidní, nadmořská výška 850 m
- Strečno (SNO) – diploidní, nadmořská výška 430 m

Vzorky jsem získala ze semenné banky Přírodovědecké fakulty UK, kde jsou uchovávány při teplotě 4 °C. Byly odebírány v době plození populací (Obrázek 5).

Semínka z jednotlivých populací byla sedm dní ponechána v klíčícím mediu (polovičně silné MS médium, 1 % sacharózy, 0,8 % agaru) a poté vyseta na substrát (složení: 50 % Arabidopsis substrát, 50 % perlit). Rostliny byly pěstovány při teplotě 13,5 °C, osvětlení 4L a délce fotoperiody 16 hodin po dobu minimálně dvou měsíců.

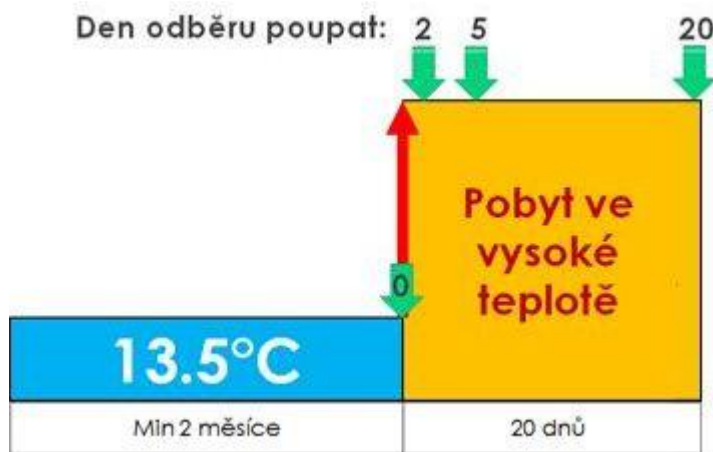
Z každé populace bylo vypěstováno šest setů rostlin (4-5 jedinců), které byly následně vystaveny vyšším teplotám (Tabulka 1). V komoře s vysokou teplotou byly ponechány 20 dní. Poupata byla odebírána před přenosem do vyšší teploty a poté po 2, 5 a 20 dnech (Obrázek 6) a fixována ve směsi 70% ethanolu a ledové kyseliny octové (3:1).



Obrázek 5 Mapa původu populací

Tabulka 1 Vystavení vybraných setů vyšším teplotám

	Původní teplota (°C)	Zvýšená teplota (°C)
Sada 1	13,5	20
Sada 2	13,5	26
Sada 3	13,5	30
Sada 4	13,5	33
Sada 5	13,5	37



Obrázek 6 Odběry vzorků

### 3.3 Příprava vzorku k mikroskopování

Z odebraných poupat jsem pomocí pinzety a preparační jehly pod binokulární lupou vypreparovala prašníky. Od každého vzorku jsem vybrala jedno poupě těsně před otevřením (Obrázek 7) a z něj jsem vypreparovala 3-6 prašníků na podložní sklíčko. Zbytek poupěte jsem odstranila, do preparátu jsem přidala kapku vody a přikryla krycím sklem.



Obrázek 7 Poupě před otevřením, vlastní tvorba

Mírným tlakem na krycí sklíčko jsem dosáhla uvolnění pylových zrn z prašníků. Uvolněná pylová zrna jsem poté obarvila.

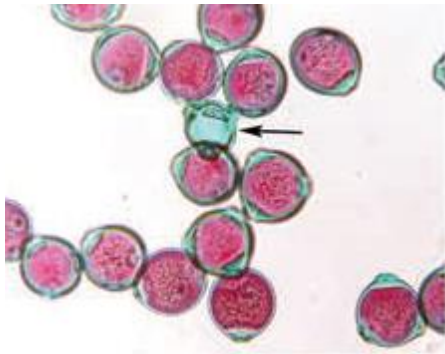
#### 3.3.1 Petersonova metoda barvení

Pro tuto metodu barvení se používá barvivo, které se skládá z: 10 ml 95% ethanolu, 1 ml malachitové zeleně (1% roztok v 95% ethanolu), 50 ml destilované vody, 25 ml glycerolu, 5 ml



kyselého fuchsinu (1% vodný roztok), 0,5 ml oranže G (1% vodný roztok) a 4 ml ledové kyseliny octové. Barvivo se doplní destilovanou vodou do 100 ml. (24)

Díky této metodě se dají snadno rozlišit životaschopné a neživotaschopné gamety. Ty první se obarví růžovou barvou a ty druhé budou světle modrozelené. Barvení je také velmi vhodné pro vizualizaci neredukovaných gamet, protože zvláště barví cytoplasmu a pylovou stěnu, a tak umožňuje jak porovnání velikosti pylu, tak počtu otvorů v jeho buněčné stěně, což jsou dva znaky, kterými se rozlišuje neredukovaný pyl od redukovaného.

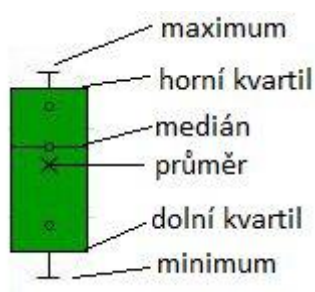


Obrázek 8 Obarvené životaschopné a jedna neživotaschopná gameta; (24)

### 3.4 Mikroskopování a vyhodnocení vzorku

Připravené a obarvené vzorky jsem pozorovala pod světelným mikroskopem Olympus s digitální kamerou DP73. Před umístěním vzorku do mikroskopu jsem pečlivě odsála přebytečnou vodu a osušila sklíčko, aby voda nenarušila pozorování. Pozorování probíhalo na zvětšení 10× nebo 20×. Pomocí programu CellSens jsem pořídila fotografie přibližně 300 zrn z každého vzorku.

Pylová zrna v jednotlivých vzorcích jsem počítala s pomocí programu ImageJ s vizuální kontrolou. K zhodnocení četnosti neredukovaných gamet jsem využila Microsoft Excel a statistický software R (R-Studio), kde mi se skriptováním pomohla školitelka. Rozhodla jsem se pro tvorbu krabicových grafů. (Obrázek 9)



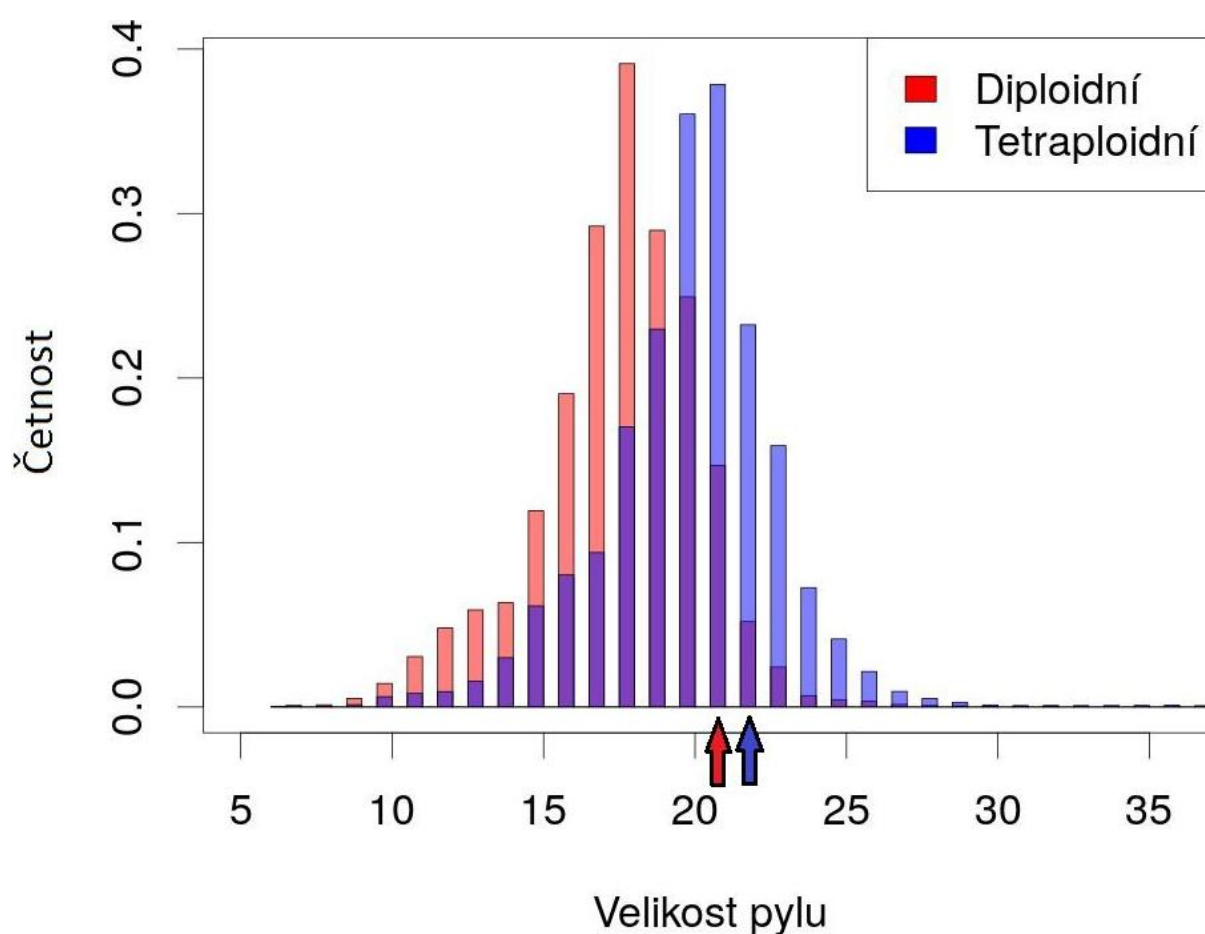
Obrázek 9 Popis krabicového grafu

## 4 VÝSLEDKY

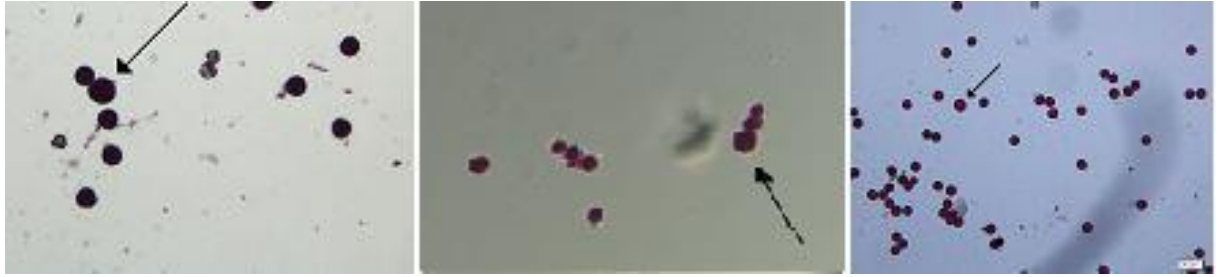
### 4.1 Detekce pylu podle velikosti

Výsledky z početního programu bylo nutné vyčistit od nežádoucích hodnot, protože program zaznamenává vše včetně např. zbytků prašníků.

Pročištěná data jsem zpracovala do formy histogramů pro jednotlivé populace a z nich jsem určila velikostní práh pro určování neredukovaných gamet (ty, které svým průměrem překročily určený práh). (Obrázek 10) Práh se nacházel v místě, kde se frekvence pylu s danou velikostí náhle skokově snížila. (Graf 1) Tedy pro diploidní populaci to bylo 21  $\mu\text{m}$  a pro tetraploidní populace to bylo 22  $\mu\text{m}$ .



Graf 1 Společný histogram pro diploidní a tetraploidní populaci  
Znázorňuje četnost pylových zrn v závislosti na jejich průměru, šipky znázorňují velikostní práh pro diploidní a tetraploidní zrna

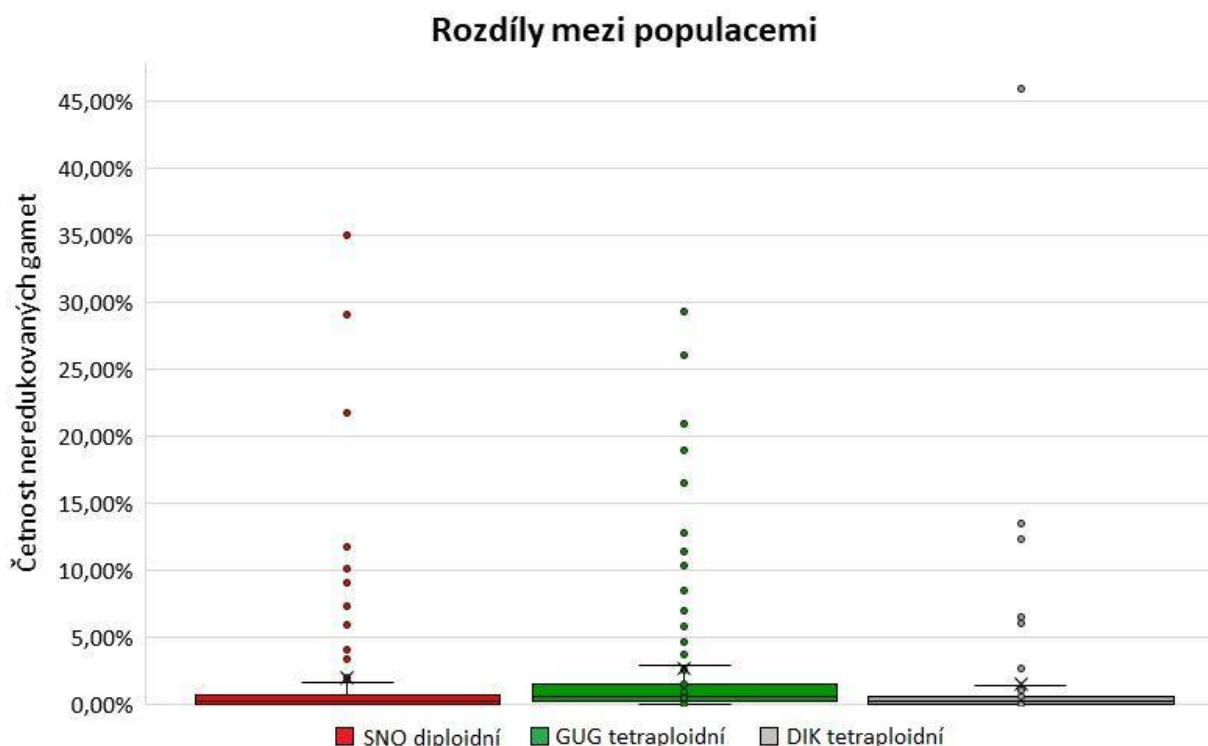


Obrázek 10 Neredukované gamety v mých vzorcích; označené šipkou, větší než redukované

## 4.2 Variabilita v tvorbě neredukovaných gamet u *Arabidopsis arenosa*

Nejdříve jsem se ptala, jestli jsou větší rozdíly v tvorbě neredukovaných gamet mezi jedinci, populacemi nebo dvěma zkoumanými ploidiemi. Předpokládala jsem, že zvýšená ploidie rostliny a příslušnost k dané populaci má větší vliv na variabilitu v tvorbě neredukovaných gamet než rozdíly mezi jedinci. To se ukázalo pravdivé jen zčásti.

Mezi jednotlivými ploidiemi jsem nepozorovala žádné konzistentní rozdíly v produkci neredukovaných gamet. Mohu tedy shrnout, že změny v produkci neredukovaných gamet se převážně projevují mezi jednotlivými populacemi.

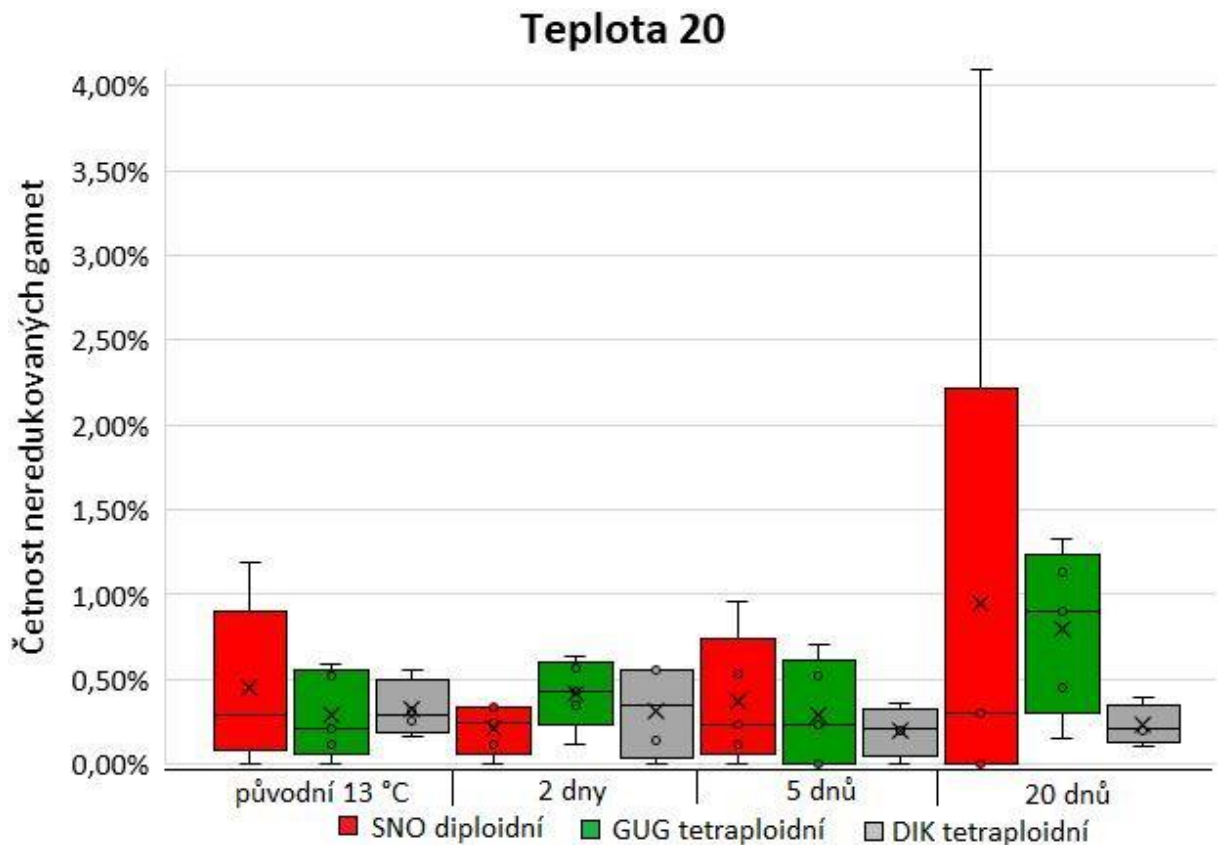


Graf 2 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých populacích; hodnocené nezávisle na teplotě nebo době vystavení vyšší teplotě

### 4.3 Tvorba neredukovaných gamet a její závislost na teplotě

Po dvoudenním vystavení rostlin teplotě 20 °C tvořily obě tetraploidní populace více neredukovaných gamet než diploidní populace (SNO). Po delším pobytu ve vyšší teplotě se u tetraploidní horské populace (GUG) zvýšily rozdíly mezi jedinci. U druhé tetraploidní populace se snížily jak rozdíly mezi jedinci, tak i produkce neredukovaných gamet.

U diploidní populace se po pěti dnech zvětšily rozdíly mezi jedinci, ale stoupla i produkce. U této populace byli po dvaceti dnech jedinci velmi rozdílní. Tetraploidní populace z Alp (GUG) sice neměla tak vysokou úroveň produkce, ale její zástupci byli vyrovnanější. U tetraploidní populace z Dikanasu se oproti pětidennímu pobytu zmenšily rozdíly mezi jedinci.

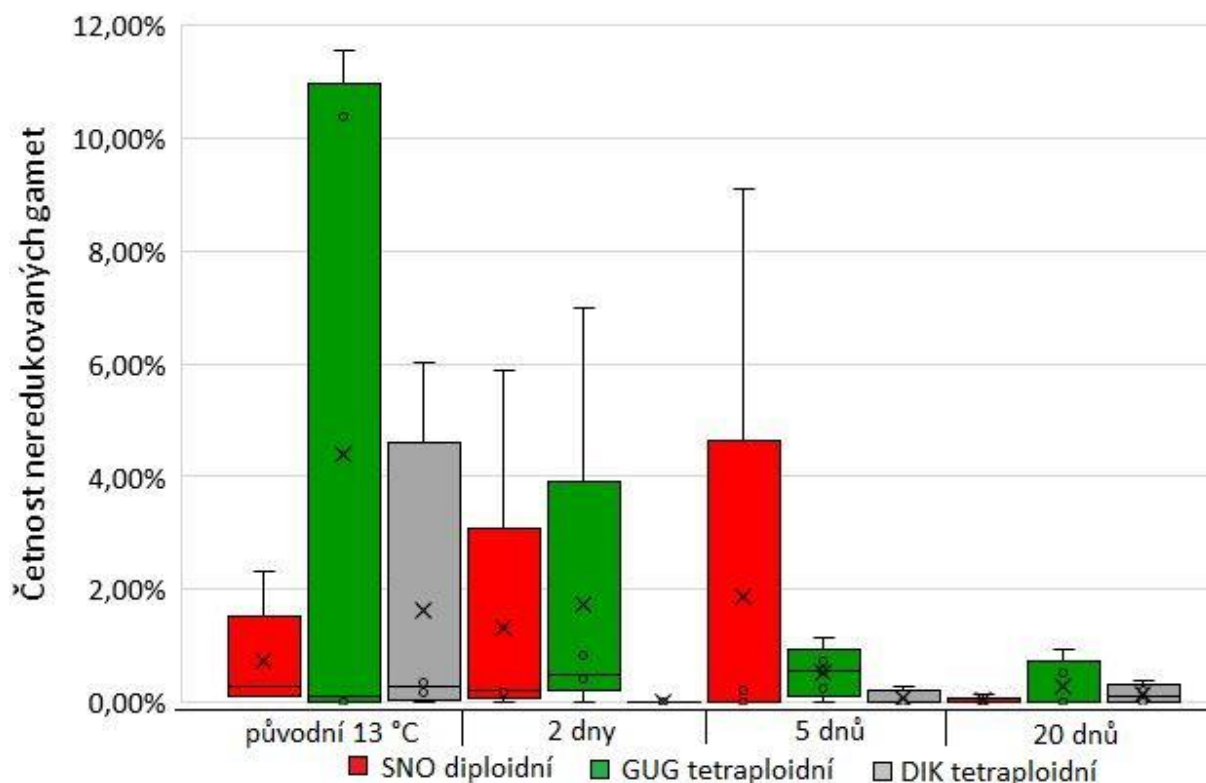


Graf 3 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 20 °C

U teploty 26 °C tvořily některé rostliny neredukovaný pyl již před přesunem do vyšší teploty. U diploidní populace (SNO) se zvyšovala produkce neredukovaného pylu i rozdíly mezi jedinci. Vrcholu dosáhla po pěti dnech a po dvaceti dnech produkce neredukovaných gamet ustala.

Obě tetraploidní populace tvořily neredukované gamety. U švédské populace (DIK) teplotním šokem tvorba ustala a delším vystavením vyšší teplotě opět stoupala. Mezi jedinci nebyly přílišné rozdíly. U druhé tetraploidní populace se postupně snižovala rozdílnost jedinců a produkce pylu. I přesto byla produkce neredukovaných gamet u této populace nejvyšší.

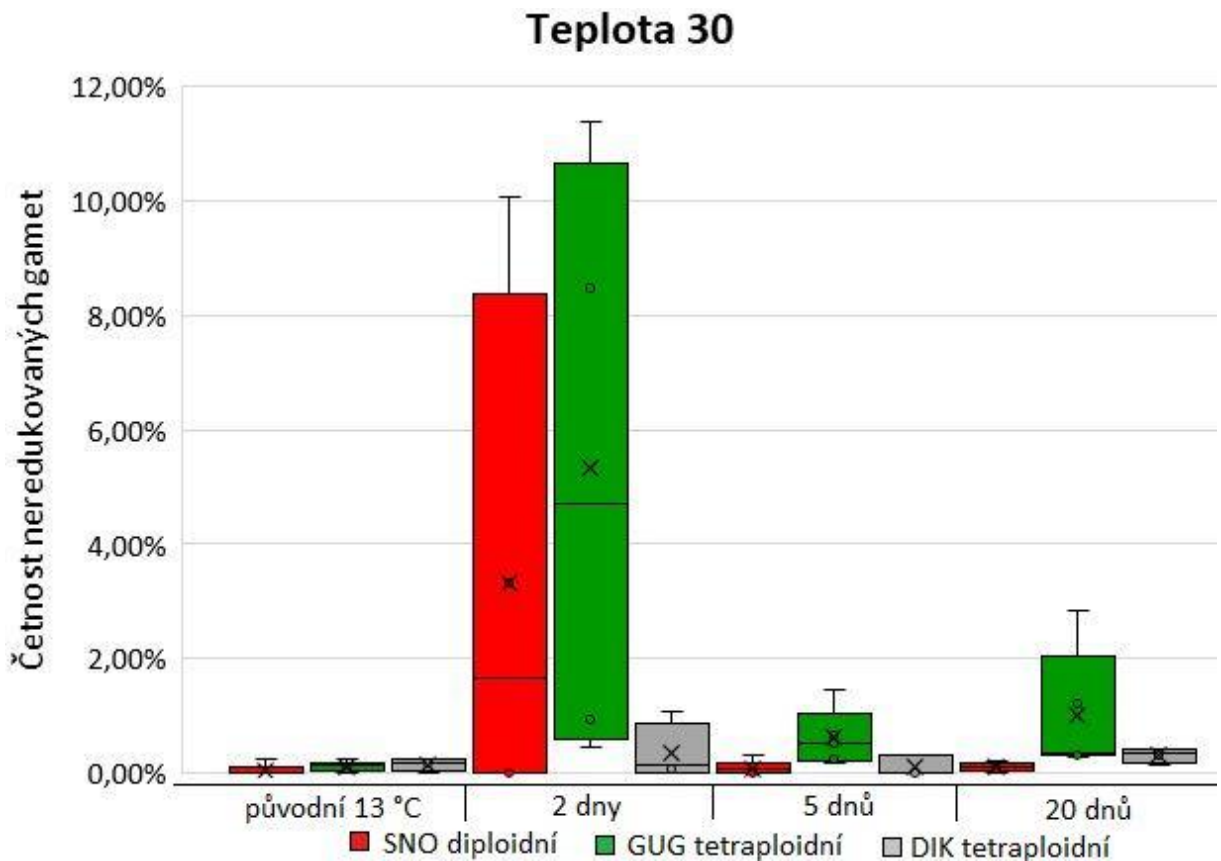
## Teplota 26



Graf 4 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 26 °C

Na teplotní šok v teplotě 30 °C reagovaly všechny populace. Nejméně ze všech se vliv teplotního šoku ukázal u tetraploidní populace (DIK). U té se delším pobytem ve vyšší teplotě zmenšovaly rozdíly mezi jedinci.

Celkově nejvýrazněji se projevila druhá tetraploidní populace z Gullingtalu. Po dvou dnech byly znatelné rozdíly mezi jedinci této populace, ale po pěti dnech se snížily. Po dvacetidenním pobytu opět mírně stouply, ale vzrostla i produkce neredukovaných gamet. Diploidní populace téměř přestala tvořit neredukované gamety již po pěti dnech.

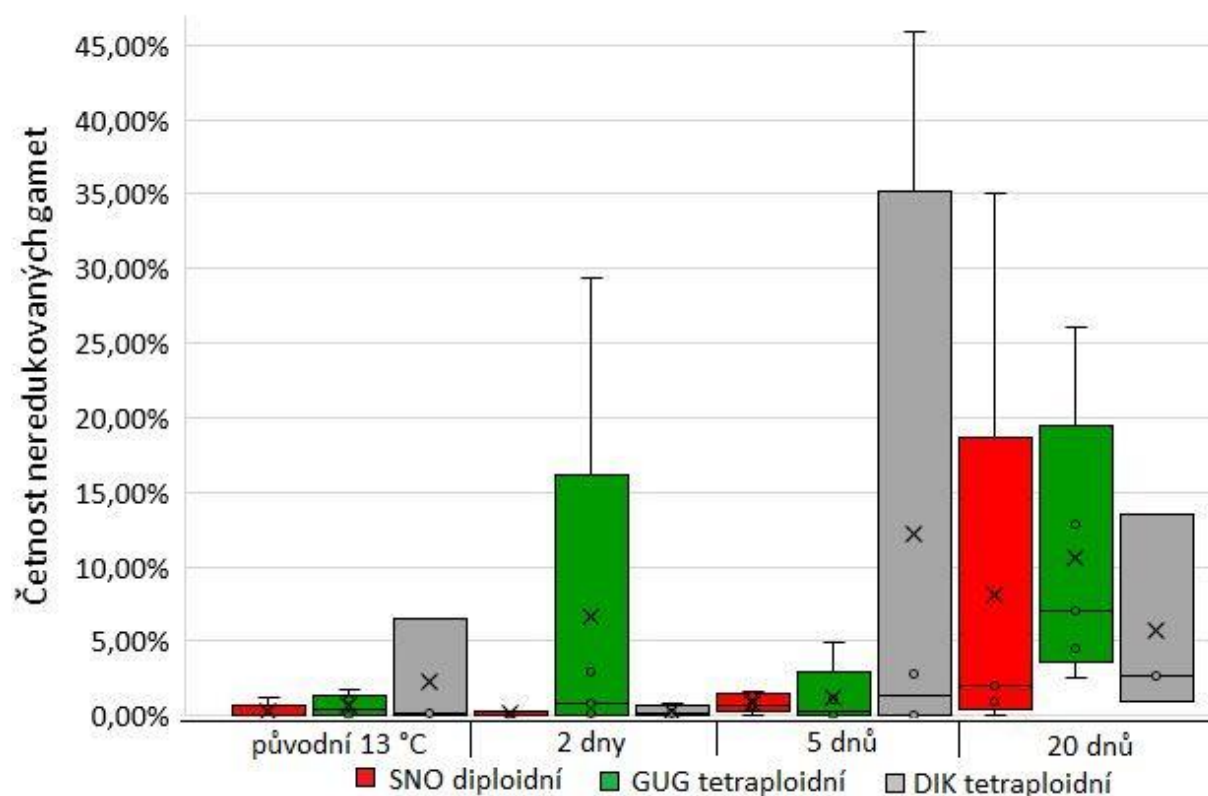


Graf 5 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 30 °C

Na teplotu 33 °C reagovala nejvýrazněji horská tetraploidní populace (GUG). Po dvoudenním pobytu tvořili někteří jedinci velké množství neredukovaných gamet. Produkce se při druhém odběru snížila, ale při pozdějším odběru byla opět vysoká.

Druhá tetraploidní populace (DIK) měla největší nárůst produkce po pěti dnech, ale byly zde značné rozdíly mezi jedinci. Ty se postupně snížily a produkce stoupla. Diploidní populace na přenos do vyšší teploty nereagovala ihned. Postupně se však začala její produkce zvyšovat. Zároveň se zvětšily rozdíly mezi jejími zástupci.

## Teplota 33

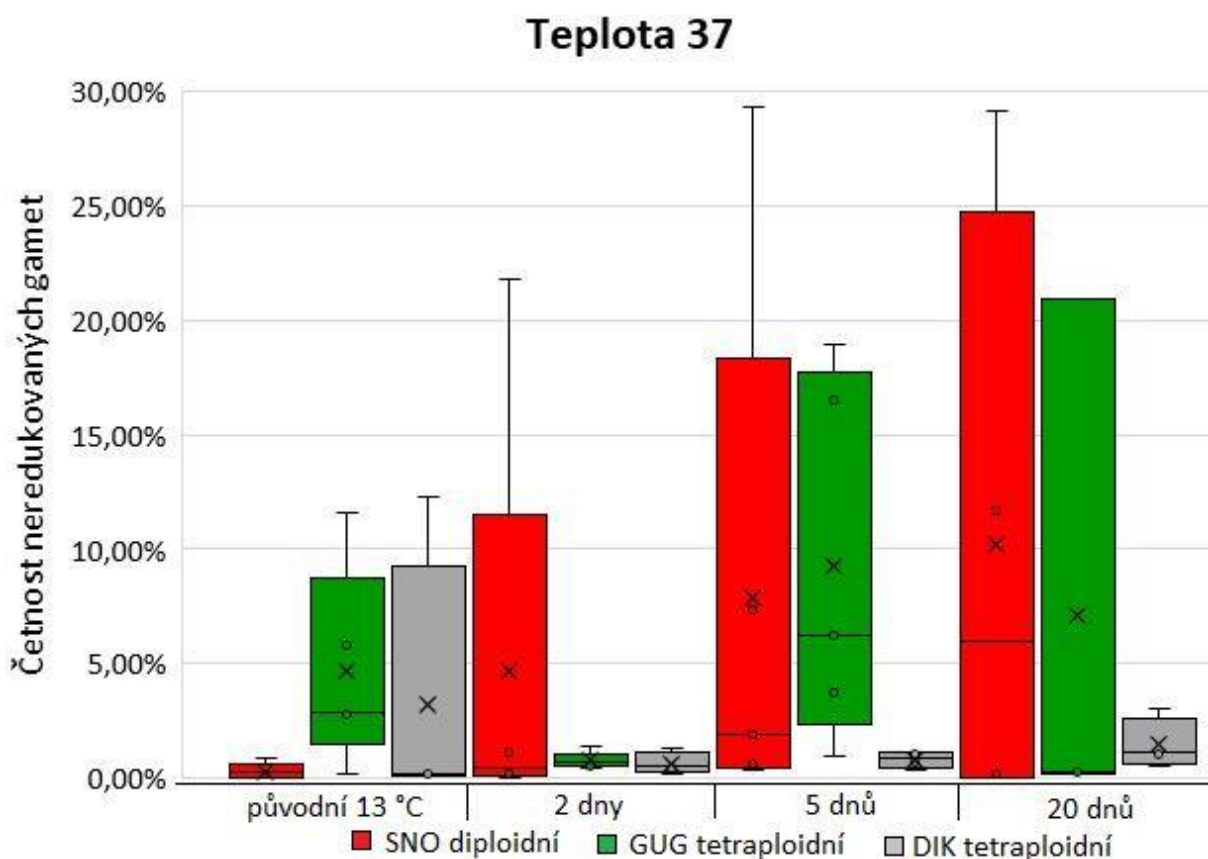


Graf 6 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 33 °C

Teplota 37 °C měla největší vliv na diploidní populaci (SNO). Po dvou dnech její jedinci začali tvořit neredukovaný pyl. Frekvence neredukovaných gamet postupně rostla nejvyšší byla po dvaceti dnech. To byly největší i rozdíly mezi jedinci.

Tetraploidní populace (GUG) po dvou dnech netvořila téměř žádné neredukované gamety. Po pěti dnech se však zvýšila jejich produkce a do dalšího odběru se zvětšily rozdíly mezi jedinci. Druhá tetraploidní populace (DIK) měla nízkou variabilitu mezi jedinci. Neustále se zvyšovala produkce neredukovaných gamet.

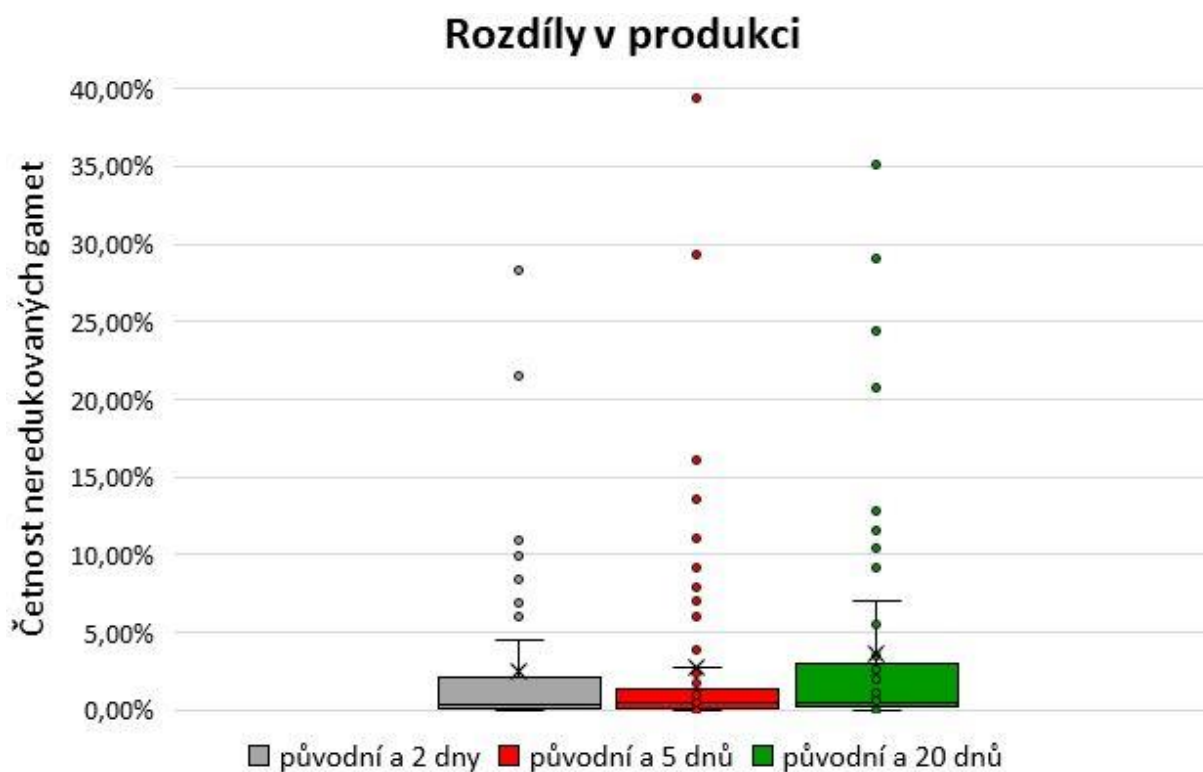




Graf 7 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 37 °C

#### 4.4 Vliv doby vystavení vyšší teplotě

Pro vyhodnocení, zda má větší vliv teplotní šok z přemístění do vyšší teploty nebo dlouhodobé vystavení této teplotě jsem porovnála změnu v produkci neredukovaných gamet po 2, 5 a 20 dnech od přenesení do vyšší teploty. Na základě zhodnocení variability v produkci neredukovaných gamet (Graf 8) jsem předpokládala, že vliv má nejen dlouhodobý pobyt v prostředí se zvýšenou teplotou, ale i teplotní šok z přesunu do něj.



Graf 8 Rozdíly v produkci mezi původními 13 °C a vyššími teplotami (20, 26, 30, 33 a 37 °C)

#### 4.4.1 Přenos do teploty 20 °C

Přesun diploidní populace (SNO) do teploty 20 °C způsobil zvýšení produkce neredukovaného pylu. S prodlužující se dobou pobytu produkce dále stoupala. (Graf 3)

Tetraploidní populace (GUG) s delším pobytem ve zvýšené teplotě tvořila stále více neredukovaných gamet. U druhé tetraploidní populace (DIK) se naopak s delší dobou vystavení snižovala tvorba neredukovaných gamet. Teplotní šok u ní způsobil, že někteří jedinci přestali tvořit neredukované gamety.

#### 4.4.2 Přenos do teploty 26 °C

Teplotní šok z přesunu do teploty 26 °C způsobil zvýšení produkce u diploidní populace (SNO). Po pěti dnech někteří jedinci tvořili velké množství neredukovaných gamet, ale při odběru po dvaceti dnech náhle produkce neredukovaného pylu ustala. (Graf 4)

U obou tetraploidních populací vlivem delšího časového období klesala frekvence neredukovaných gamet. U tetraploidní populace (DIK) způsobil přesun do zvýšené teploty zastavení tvorby neredukovaných gamet. Postupně začala znovu tvořit neredukovaný pyl. U horské tetraploidní populace (GUG) byla četnost neredukovaného pylu po dvaceti dnech vyšší.

#### 4.4.3 Přenos do teploty 30 °C

U teploty 30 °C hrál velkou roli teplotní šok z přenosu do teplejšího prostředí. U diploidní populace (SNO) se při dalších odběrech téměř neobjevovaly neredukované gamety. Horská tetraploidní populace (GUG) tvořila po dvou dnech velké množství neredukovaného pylu. Po pěti dnech se produkce snížila, ale po delším pobytu se opět začala zvyšovat. (Graf 5)

Na druhou tetraploidní populaci (DIK) měl teplotní šok nejmenší vliv, ale přesto začali někteří jedinci tvořit neredukované gamety. Postupně se tvorba neredukovaných gamet snižovala.

#### 4.4.4 Přenos do teploty 33 °C

Teplotní šok z přesunu do této teploty působil pouze u tetraploidní populace z Alp (GUG). U té se při druhém odběru snížila produkce neredukovaného pylu a po dvaceti dnech byla vyšší než při odběru po dvou dnech. (Graf 6)

Na diploidní populaci (SNO) mělo pozitivní vliv dlouhodobé vystavení zvýšené teplotě, po dvaceti dnech tvořila velké množství neredukovaných gamet. Tetraploidní populace (DIK) začala neredukované gamety tvořit až po pěti dnech a po dvaceti dnech byla jejich frekvence stále zvýšená.

#### 4.4.5 Přenos do teploty 37 °C

Po přesunu do teploty 37 °C začali jedinci diploidní populace (SNO) tvořit ve zvýšené míře neredukovaný pyl. Na zbylé dvě populace teplotní šok neměl takový vliv. U diploidní populace se četnost neredukovaných gamet postupem času dále zvyšovala. (Graf 7)

Na obě tetraploidní populace mělo větší vliv dlouhodobé vystavení vyšší teplotě. Tetraploidní populace z Alp (GUG) tvořila více neredukovaných gamet než druhá tetraploidní populace (DIK).

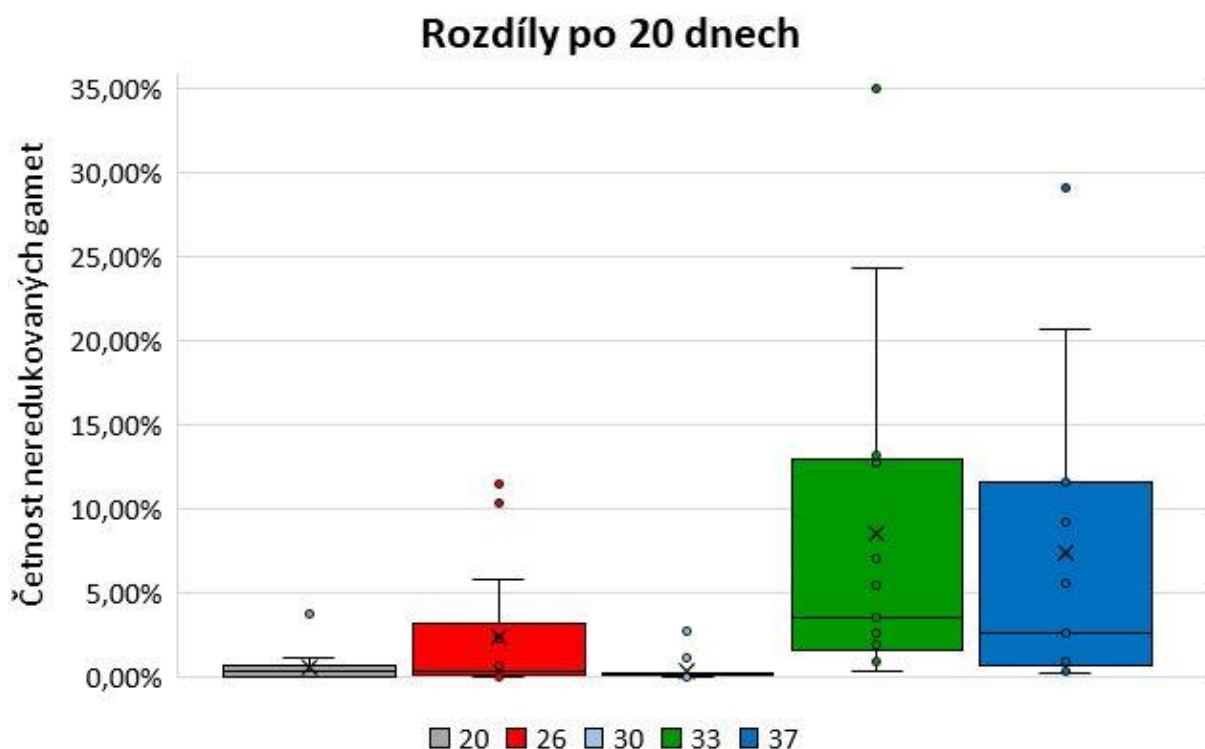
#### 4.4.6 Celkové zhodnocení vlivu doby vystavení vyšší teplotě

Z mnou zjištěných výsledků vyplývá, že na zvýšení produkce neredukovaných gamet má vliv nejen dlouhodobé vystavení vyšší teplotě, ale i teplotní šok z přemístění do zvýšené teploty. V jednom z výše uvedených grafů (Graf 8) lze pozorovat, že produkce neredukovaného pylu je nejvyšší po dvaceti dnech, ale těsně po přesunu do vyšší teploty se také tvořilo velké množství neredukovaných gamet. Nejvyšší úroveň produkce dosahovali tedy jedinci po nejdelším časovém období, tedy dvaceti dnech, ale teplotní šok jich ovlivnil jen o málo menší množství a mohl by tedy hrát určitou roli.

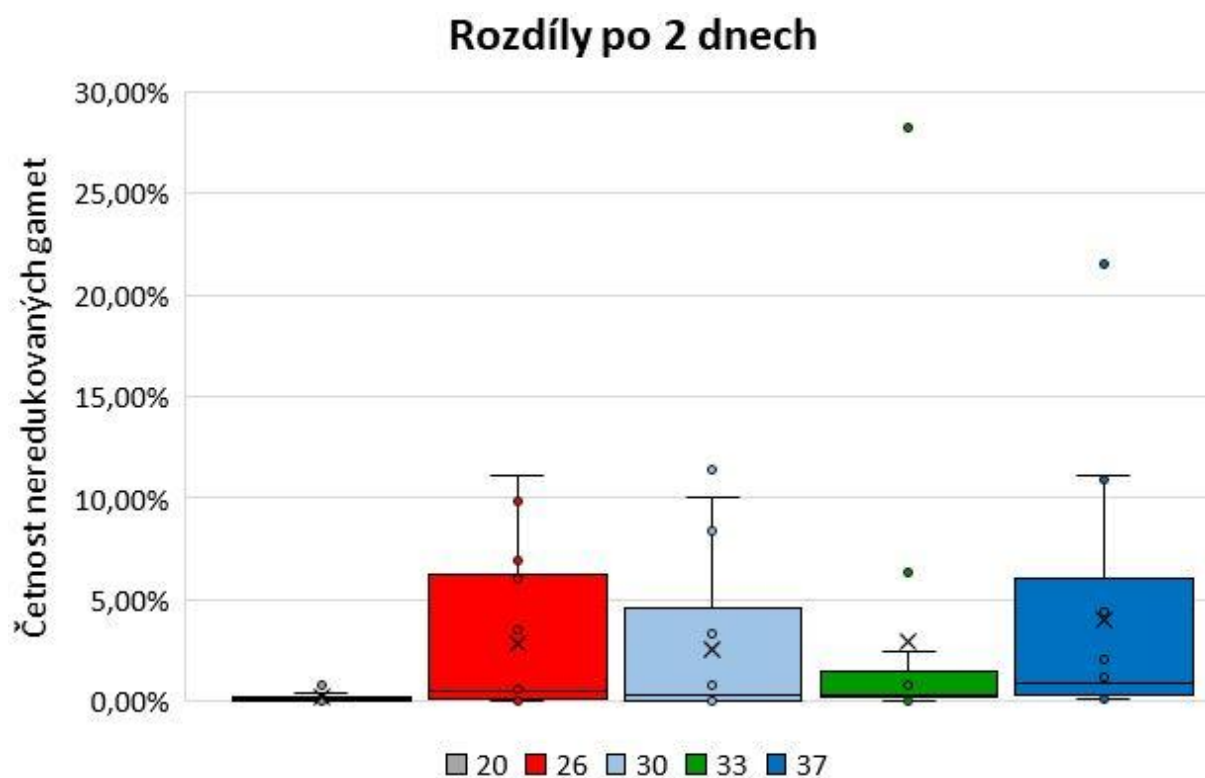
## 4.5 Celkový vliv teploty zobecněný pro všechny populace

Pro zjištění, která teplota má největší vliv na tvorbu neredukovaných gamet, jsem porovnála rozdíly mezi původní teplotou a četností neredukovaných gamet v jednotlivých teplotách po dvaceti a dvou dnech, což jsou období, která ovlivňují produkci neredukovaného pylu. (kap. 4.4, Graf 9, Graf 10) U nejkratšího časového období (2 dny) se jako nejvýraznější projevila nejvyšší zkoumaná teplota 37 °C.

Pokud jde o výsledky při porovnávání teplot po dvaceti dnech, byla nejefektivnější teplota 33 °C a těsně za ní nejvyšší teplota 37 °C. Tyto dvě teploty měly téměř srovnatelnou hodnotu výskytu neredukovaných gamet.



Graf 9 Rozdíly v produkci pro jednotlivé teploty po delším působení vyšší teploty



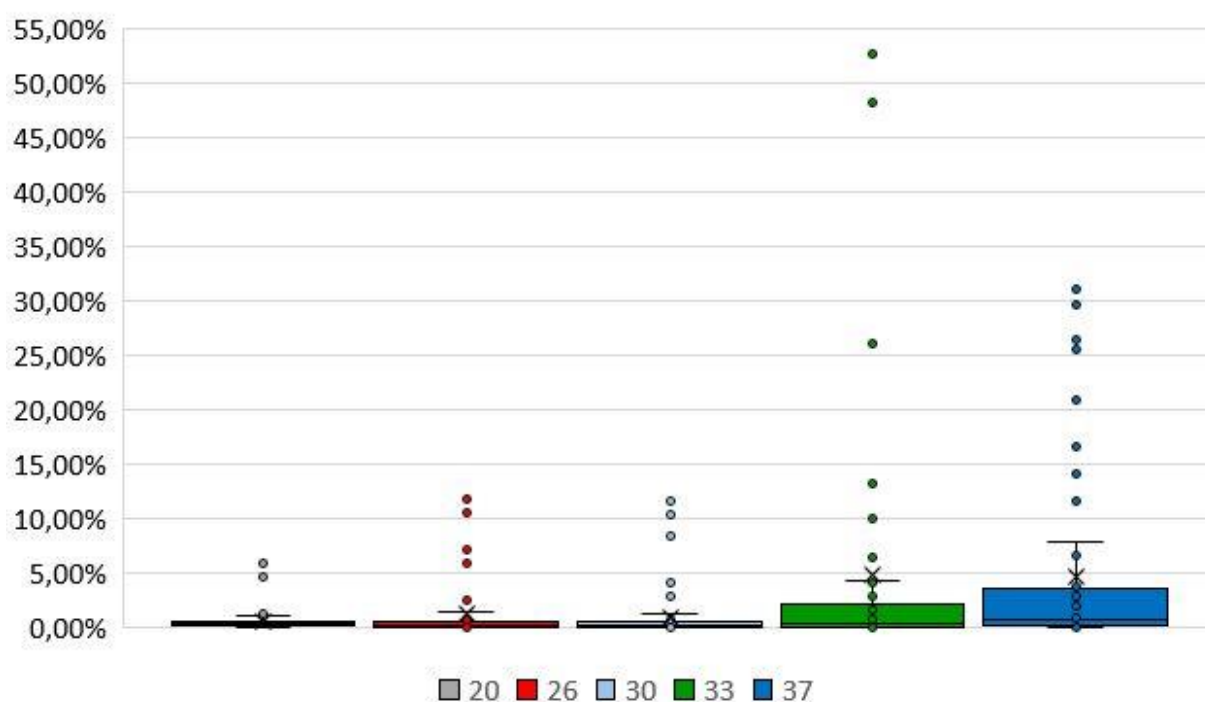
Graf 10 Rozdíly v produkci pro jednotlivé teploty pod vlivem teplotního šoku

#### 4.6 Zhodnocení vlivu zvýšené teploty na životaschopnost vznikajících gamet

Pro získání co nejpřesnější představy o vhodných podmínkách pro zvýšení tvorby neredukovaných gamet jsem se dále ptala, jaký je vliv vysoké teploty, vhodné pro tvorbu neredukovaných gamet na jejich potencionální životaschopnost. (Graf 11)

Porovnála jsem míru životaschopnosti s procentuálním zastoupením neredukovaných gamet v jednotlivých teplotách a usoudila jsem, že největší vliv na tvorbu neredukovaných gamet má nejvyšší teplota 37 °C. Překvapivě má totiž konstantně vyšší úroveň životaschopných neredukovaných gamet než nižší teplota 33 °C. Avšak teplota 33 °C by mohla být také vhodná pro zvýšení tvorby neredukovaných gamet, protože i v této teplotě se tvoří výrazné procento životaschopných neredukovaných gamet a zároveň tolik nenarušuje růst a přežití celých rostlin (vlastní pozorování).

### Poměr mezi životaschopností a neredukovaností gamet



Graf 11 Poměr mezi životaschopností a neredukovaností gamet hodnocený pro jednotlivé teploty

## 5 DISKUSE

Mé výsledky ukazují několik zajímavých poznatků. Produkce neredukovaných gamet je ovlivněna teplotou, a to jak jejím dlouhodobým působením, tak i teplotním šokem. Největší efekt má teplota 37 °C po dvou dnech a 33 °C po dvaceti dnech. Jednotlivé populace jednoho druhu se liší reakcí na zvýšenou teplotu. Na základě zhodnocení životaschopnosti gamet jsem určila, že největší vliv na tvorbu životaschopných neredukovaných gamet má teplota 37 °C.

Vliv teploty na vznik neredukovaných gamet byl již dříve zaznamenán Bellingem (16), který zjistil, že rostliny tvořily zvýšené množství neredukovaného pylu, když byly vystaveny abnormálním chladným obdobím. Pozitivní vliv nízké teploty je zpracován i Masonovou. (20) To odpovídá i mým výsledkům, že výrazná změna teploty přiměje rostliny k tvorbě neredukovaných gamet, i když moje práce se zaměřovala na zvyšování teploty.

Dále byl vliv teploty zkoumán například Justinem Ramseyem a Douglasem Schemskem. (1), (15) Ti pěstovali rostliny řebříčku (*Achillea borealis*) v růstové komoře, kde se cyklicky měnila teplota v rozmezí od 6 °C do 30 °C. Výsledky porovnali s hodnotami získanými zkoumáním náhodného výskytu tvorby neredukovaných gamet ve volně rostoucích populacích. V proměnlivých teplotních podmínkách byla produkce výrazně vyšší. Naproti tomu já jsem zkoumala, jestli mají vliv nejen změny teploty, ale i dlouhodobé působení stejné teploty, která se lišila od původní, ve které byly rostliny pěstované.

Z práce Brownfieldové a Köhlerové (3) vyplývá, že pro šlechtění polyploidních plodin, případně přenos výhodných vlastností z diploidních rostlin do polyploidních plodin, je nejlepší využití neredukovaných gamet. Takové gamety jsou ovšem za přirozených podmínek velmi vzácné. (15) Z mých výsledků vyplývá, že vystavení rostlin vysoké teplotě po dlouhou dobu může tento proces významně zjednodušit.

Co se týče zkoumané životaschopnosti, tak Dweikat & Lyrene uvádějí, že při jejich pokusech bylo méně než 1,5 % produkovaného pylu životaschopného. (20) Naproti tomu při mém výzkumu bylo velké množství neredukovaného pylu životaschopného.

Neredukované gamety byly šlechtiteli využity například k přenosu odolnosti proti napadení hádčátkem bramborovým z diploidních divokých populací brambor (*Solanum*) do genetického fondu tetraploidních kulturních plodin. To významně napomohlo ke zvýšení výnosů ze sklizně. (21) Dalšími příklady onemocnění, proti kterým byli vypěstováni odolní hybridy, jsou vadnutí způsobené bakteriemi (22), plísně (23), napadení hádčátkem (*Meloidogyne* spp.) (24) nebo hniloba (25). To podporuje mé přesvědčení, že svým výzkumem bych mohla přispět ke šlechtění nových odolnějších a výnosnějších zemědělských plodin.

## 6 ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo zjistit, jaký vliv má zvýšená teplota na tvorbu životaschopných neredukovaných gamet u rostlin. Hlavními otázkami bylo, která ze zkoumaných teplot má největší vliv a po jaké době působení je její vliv nejvýrazněji pozorovatelný. Také mě zajímalo, jestli na tvorbu neredukovaných gamet bude mít vliv, zda je rostlina tetraploidní nebo diploidní. Posledním zkoumaným aspektem byla životaschopnost neredukovaných gamet.

Z pěti zkoumaných teplot 20, 26, 30, 33 a 37 °C byly rostliny ovlivněny nejvíce tou nejvyšší, tedy 37 °C. U této teploty byly hodnoty frekvence neredukovaného pylu nejvyšší. Druhá nejvyšší teplota 33 °C však způsobovala také velmi zvýšenou tvorbu neredukovaných gamet, ale po hodnocení životaschopnosti se ukázala teplota 37 °C jako o trochu vhodnější. Dá se tedy shrnout, že nejvýhodnější je pěstovat rostliny ve výrazně zvýšené teplotě.

Co se týče vlivu doby vystavení zvýšené teplotě, mohu říci, že největší vliv má dlouhodobé působení vyšší teploty. Jedinci byli odebíráni po dvou, pěti a dvaceti dnech. U vyšších teplot (33 a 37 °C) mělo dlouhodobé vystavení vyšší teplotě (dvacet dnů) větší vliv, ale u nižších teplot hrál větší roli teplotní šok z přesunu do zvýšené teploty, tedy dvoudenní pobyt ve zvýšené teplotě.

Ploidní úroveň neměla zásadní vliv na to, jestli rostlina produkovala nebo neprodukovala neredukovaný pyl.

Provedení více výzkumů jako byl tento, je důležité pro porozumění procesům ovlivňujícím polyploidizaci. Ta je velice důležitá pro šlechtění nových hospodářských plodin, které by byly lépe využitelné.



## 7 POUŽITÁ LITERATURA

1. **Ramsey, Justin a Schemske, Douglas W.** Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1998, Sv. 29, 1, stránky 467–469, 477–478, 494–496.
2. **Skalická, Kamila.** Polyploidie dokáže s rostlinnými genomy pořádně zatřást. *Živa*. 2005, Sv. 2, stránky 49–56.
3. **Brownfield, Lynette a Köhler, Claudia.** Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *Journal of Experimental Botany*. 2011, Sv. 62, 5, stránky 1659–1668.
4. **Bretagnolle, Francois a Thompson, John D.** Tansley Review No. 78 Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*. 1995, Sv. 129, 1, stránky 1–22.
5. **Stebbins, G. Ledyard.** Types of polyploids; their classification and significance. *Advances in Genetics*. 1947, Sv. 1, stránky 403–429.
6. **Kihara, H. a Ono, T.** Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. *Z.Zellforsch.* 1926, Sv. 4, 3, stránky 475–481.
7. **Levin, Donald A.** Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*. 1983, Sv. 122, stránky 1–25.
8. **Darlington, Cyril, Dean.** *Chromosome Botany and the Origins of Cultivated Plants*. New York : Hafner, 1963.
9. **Levin, Donald A.** *The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution*. Oxford : Oxford University Press, 2002.
10. **Bomblies, Kirsten a Madlung, Andreas.** Polyploidy in the Arabidopsis genus. *Chromosome Research*. 2014, Sv. 22, 2, stránky 117–134.
11. **Ramanna, M. S. a Jacobsen, Evert.** Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – A review. *Euphytica*. 2003, Sv. 133, 1, stránky 3–18.
12. **Barcaccia, Gianni, a další.** Occurrence, inheritance and use of reproductive mutants in alfalfa improvement. *Euphytica*. 2003, Sv. 133, 1, stránky 37–56.
13. **Rhoades, Marcus M. a Dempsey, Ellen.** Induction of Chromosome Doubling at Meiosis by the Elongate Gene in Maize. *Genetics*. 1966, Sv. 54, 2, stránky 505–522.
14. **Watanabe, Kazuo a Peloquin, Stanley, J.** Cytological basis of 2n pollen formation in a wide range of 2x, 4x, and 6x taxa from tuber-bearing Solanum species. *Genome*. 1993, Sv. 36, 1, stránky 8–13.
15. **Ramsey, Justin.** Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity*. 2007, Sv. 98, 3, stránky 143–150.
16. **Belling, John.** The origin of chromosomal mutations in *Uvularia*. *Journal of Genetics*. 1925, Sv. 15, 3, stránky 245–266.
17. **Prasad, P. V. Vara, Boote, Kenneth J. a Allen Jr, Leon Hartwell.** Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology*. 2006, Sv. 139, 3, stránky 237–251.

18. **Harsant, Jeffrey, a další.** High temperature stress and its effect on pollen development and morphological components of harvest index in the C3 model grass *Brachypodium distachyon*. *Journal of Experimental Botany*. 2013, Sv. 64, 10.
19. **Paupière, Marine J., a další.** Screening for pollen tolerance to high temperatures in tomato. *Euphytica*. 2017, Sv. 213, 130.
20. **Dweikat, I. M. a Lyrene, P. M.** Production and viability of unreduced gametes in triploid interspecific blueberry hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*. říjen 1988, Sv. 76, 4, stránky 555–559.
21. **Lafon-Placette, Clément, a další.** Endosperm-based hybridization barriers explain the pattern of gene flow between *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis arenosa* in Central Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, Sv. 114, 6, stránky 1027–1035.
22. **Schmickl, Roswitha, a další.** The Evolutionary History of the *Arabidopsis arenosa* Complex: Diverse Tetraploids Mask the Western Carpathian Center of Species and Genetic Diversity. *PLoS ONE*. 2012, Sv. 7, 8.
23. **Bethke, Paul C., Halterman, Dennis A. a Jansky, Shelley.** Are We Getting Better at Using Wild Potato Species in Light of New Tools? *Crop Science*. 2017, Sv. 57, 3, stránky 1241–1258.
24. **Peterson, Ross, Slovin, Janet P. a Chen, Changbin.** A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology*. 2010, Sv. 1, 2, stránky 66–69.
25. **Holcová, Magdalena.** *Autopolyploids: particularly hopeful monsters*. Praha, Praha, Česká republika : Holcová, 2015.
26. **Mason, Annaliese S., a další.** Production of viable male unreduced gametes in. *Plant Biology*. 2011.
27. **Capo, A., a další.** Evaluation for chipping and tuber soft rot (*Erwinia carotovora*) resistance in potato clones from unilateral sexual polyploidization ( $2x \times 4x$ ). *American Journal of Potato Research*. 2002, Sv. 79, 2, stránky 139–145.
28. **Iwanaga, Masaru, a další.** Use of FDR 2n pollen to transfer resistance to root knot nematodes into cultivated 4x potatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1989, Sv. 114, stránky 1008–1013.
29. **Ortiz, Rodomiro, Franco, Javier a Iwanaga, Masaru.** Transfer of resistance to potato cyst nematode (*Globodera pallida*) into cultivated potato *Solanum tuberosum* through first division restitution 2n pollen. *Euphytica*. 1997, Sv. 96, 3, stránky 339–344.
30. **Watanabe, A. Junko, Orrillo, Matilde a Watanabe, Kazuo N.** Frequency of Potato Genotypes with Multiple Quantitative Pest Resistance Traits in  $4x \times 2x$  Crosses. *Breeding Science*. 1999, Sv. 49, 2, stránky 53–61.
31. **Watanabe, Kazuo, El-Nashaar, H. M. a Iwanaga, Masaru.** Transmission of bacterial wilt resistance by first division restitution (FDR) 2n pollen via  $4x \times 2x$  crosses in potatoes. *Euphytica*. 1992, Sv. 60, 1, stránky 21–26.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

MS médium (str. 16).....	Murashige a Skoog médium
spp. (str. 35) .....	species; skupina druhů

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 Vznik polyploidů přes triploidní jedince, vlastní tvorba.....	10
Obrázek 2 Běžný průběh meiózy; heterotypické = redukční (I) a homeotypické = ekvační (II) dělení, vlastní tvorba.....	12
Obrázek 3 Dva základní způsoby poruch meiózy vedoucích k vzniku neredukovaných gamet; upraveno podle (4).....	13
Obrázek 4 Obarvené redukované a jedna neredukovaná gameta; vlastní tvorba .....	13
Obrázek 5 Mapa původu populací.....	17
Obrázek 6 Odběry vzorků.....	18
Obrázek 7 Poupě před otevřením, vlastní tvorba.....	18
Obrázek 8 Obarvené životaschopné a jedna neživotaschopná gameta; (24).....	19
Obrázek 9 Popis krabicového grafu.....	19
Obrázek 10 Neredukované gamety v mých vzorcích; označené šipkou, větší než redukované .....	21
Graf 1 Společný histogram pro diploidní a tetraploidní populaci .....	20
Graf 2 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých populacích; hodnocené nezávisle na teplotě nebo době vystavení vyšší teplotě.....	22
Graf 3 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 20 °C ..	23
Graf 4 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 26 °C ..	24
Graf 5 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 30 °C ..	25
Graf 6 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 33 °C ..	26
Graf 7 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 37 °C ..	27
Graf 8 Rozdíly v produkci mezi původními 13 °C a vyššími teplotami (20, 26, 30, 33 a 37 °C) .....	28
Graf 9 Rozdíly v produkci pro jednotlivé teploty po delším působení vyšší teploty .....	31
Graf 10 Rozdíly v produkci pro jednotlivé teploty pod vlivem teplotního šoku.....	31
Graf 11 Poměr mezi životaschopností a neredukovaností gamet hodnocený pro jednotlivé teploty .....	32
Tabulka 1 Vystavení vybraných setů vyšším teplotám .....	17