

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

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

## **Jak šlechtit polyploidní rostliny aneb vliv teploty na vznik neredukovaných gamet**

**Alžběta Poštulková  
Hlavní město Praha**

**Praha 2018**



# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

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

**Jak šlechtit polyploidní rostliny aneb vliv teploty  
na vznik neredukovaných gamet**

**How to breed polyploid plants: the effect of tempera-  
ture on unreduced gamete formation**

**Autoři:** Alžběta Poštulková

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

**Kraj:** Hlavní město Praha

**Konzultant:** Mgr. Magdalena Holcová

Praha 2018



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a 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.

V Praze 14. 3. 2018

.....

Alžběta Poštulková



## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Mgr. Magdaleně Holcové 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 PřFUK, 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 těchto gamet.

Ve své práci jsem se rozhodla zkoumat vliv zvýšené teploty, o které je známo, že narušuje meiózu a měla by tedy ovlivňovat i samotnou tvorbu gamet. Proto jsem zkoumala četnost neredukovaných gamet v prašnicích rostlin, které byly pěstovány po různě dlouhou dobu ve třech vysokých teplotách – 20, 30 a 37 °C.

Z mé práce vyplývá, že na to, jestli bude rostlina produkovat neredukovaný pyl, má největší vliv nejvyšší zkoumaná teplota, 37 °C. Ovšem i při teplotě 30 °C se neredukovaný pyl tvoří ve zvýšené míře. Pokud jde o délku vystavení vyšší teplotě, nejvyšší četnost neredukovaných gamet se vyskytovala po dvaceti dnech, tedy po dlouhodobém vystavení vyšší 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 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

## **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 of those gametes.

In my work I decided to study effect of increased temperature, which is known to effect meiosis and thus it 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 three high temperatures – 20, 30 and 37 °C.

Here I show that the highest examined temperature 37 °C has the strongest effect on unreduced gamete production. However, 30 °C treatment also increased the unreduced pollen production to some extent. 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. 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 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

# Obsah

1	Úvod.....	6
2	Přehled literatury.....	7
2.1	Polyploidie a užitkové rostliny.....	7
2.1.1	Auto- a alopolyploidie.....	7
2.1.2	Význam polyploidie v evoluci a její potenciální výhody pro užitkové rostliny ...	8
2.1.3	Vznik polyploidů .....	9
2.2	Neredukované gamety.....	10
2.2.1	Vznik.....	10
2.2.2	Vliv prostředí na vznik neredukovaných gamet .....	12
2.2.3	Význam polyploidie v zemědělství.....	13
2.3	Řeřišník písečný .....	13
3	Metodika .....	14
3.1	Cíl práce .....	14
3.2	Odběr vzorků.....	14
3.3	Příprava vzorku k mikroskopování .....	16
3.3.1	Petersonova metoda barvení .....	16
3.4	Mikroskopování a vyhodnocení vzorku.....	17
4	Výsledky .....	18
4.1	Detekce pylu podle velikosti.....	18
4.2	Variabilita v tvorbě neredukovaných gamet u <i>Arabidopsis arenosa</i> .....	19
4.3	Tvorba neredukovaných gamet a její závislost na teplotě .....	20
4.4	Vliv doby vystavení vyšší teplotě .....	23
4.4.1	Přenos do teploty 20 °C .....	24
4.4.2	Přenos do teploty 30 °C .....	24
4.4.3	Přenos do teploty 37 °C .....	25
4.4.4	Celkové zhodnocení vlivu doby vystavení vyšší teplotě .....	25
4.5	Celkový vliv teploty zobrazený pro všechny populace.....	25
5	Diskuse.....	27
6	Závěr .....	28
7	Použitá literatura .....	29
8	Seznam obrázků a tabulek .....	31

# 1 ÚVOD

Ve své práci se zabývám tvorbou 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 pěstované v 13 °C, ale potom se několik jednotlivců odebralo a rozmístilo do tří různých teplot. Z nových teplot byly odebrány vzorky po dvou, pěti a dvaceti dnech.

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 neredukovaných gamet. Mohlo by to pomoci při šlechtění nových hospodářských plodin.

## 2 PŘEHLED LITERATURY

### 2.1 Polyploidie a užitkové rostliny

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. (Ramsey & Shemske, 1998)

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 polyploidí, jejím vznikem a reprodukčními bariérami mezi polyploidními a nepolyploidními rostlinami pro pěstování a šlechtění těchto plodin zcela nezbytné. (Skalická, 2005) (Brownfield & Köhler, 2010) (Bretagnolle & Thompson, 1995) (Stebbins, 1947)

V tomto literárním přehledu chci ukázat, že polyploidie je klíčová v evoluci velké části rostlin, a tedy i rostlin užitkových. Pochopení výhod a nevýhod polyploidie z evolučního hlediska nám může pomoci pochopit její význam a potenciální využití u plodin. Z hlediska šlechtění plodin je klíčová otázka jejich schopnosti se vzájemně křížit, kterou se zabývá celá má práce, proto vysvětlím, jak funguje rozmnožování mezi rostlinami s jinou ploidní úrovní, pomocí neredukovaných gamet a ukážu, co je z literatury známo o tomto procesu, způsobech jeho ovlivnění prostředím (především teplotou, kterou se ve své práci zabývám) a jeho využití v zemědělství.

#### 2.1.1 Auto- a alopolyploidie

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. (Ramsey & Shemske, 1998)

Autopolyploidie je znásobení sad chromozomů v rámci jednoho druhu, autopolyploidie tedy nemají předchozí diferenciaci chromozomových sad. Alopolyploidie mají znásobené chromozomové sady, které pocházejí od dvou nebo více druhů. Je však nutno podotknout, že na rozlišování autopolyploidie a alopolyploidie neexistuje pouze jeden názor. (Kihara & Ono, 1926) (Ramsey & Shemske, 1998)

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 chromozomy spojí na více místech. K takovému spojení může dojít díky tomu, že autopolyploidie nemají rozrůzněné chromozomové sady, takže se chromozomy mohou spojit na více místech (multivalentní spo-

jení) a výsledný počet chromozomů v dceřiných buňkách je nerovnoměrný. U alopolyploidů se multivalentní spojení chromozomů vyskytuje jen zřídka a jejich cytogenetické chování je podobné diploidům, protože obsahují dva diploidní genotypy v jednom genomu. (Stebbins, 1947)

### **2.1.2 Význam polyploidie v evoluci a její potenciální výhody pro užitkové rostliny**

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). (Levin, 1983)

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. (Darlington, 1963)

Je velmi časté, že volně rostoucí předchůdce užitkové rostliny je diploidní, ale následným šlechtěním plodiny dojde k polyploidizaci. Plodiny jsou tedy se svým mateřským druhem velice blízce příbuzné, mohou však jako polyploidii získat nové (lidmi ceněné) vlastnosti. Tak je tomu například u bramboru nebo pšenice. (Levin, 1983)

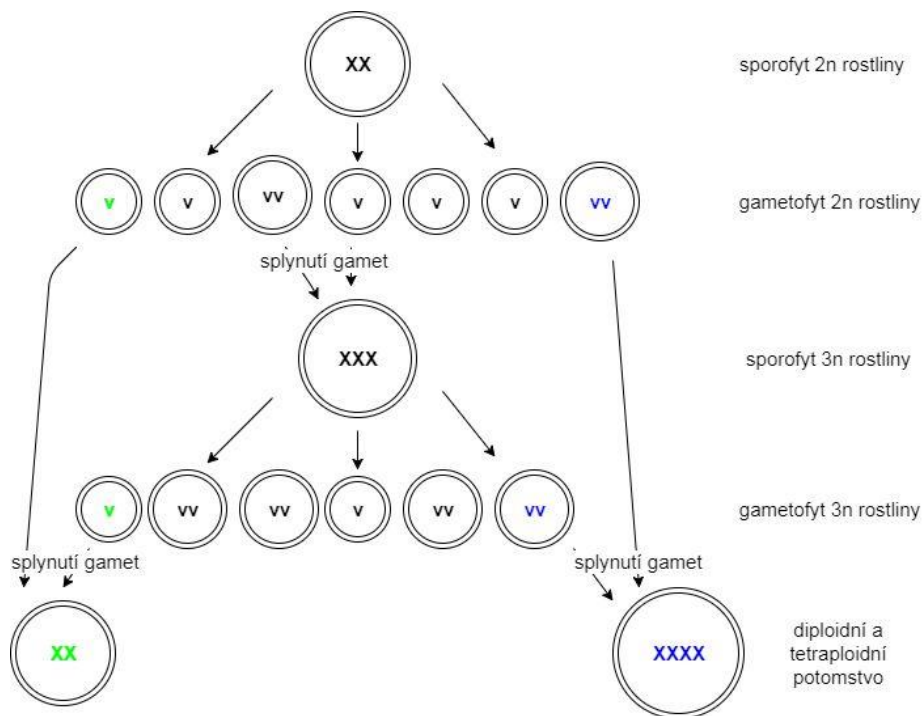
Nově vzniklý polyploid je z velké míry reprodukčně izolován od rodičů, takže vzniká nový druh, aniž by oproti nim musel mít nějakou výhodnou vlastnost. Výhodou polyploidie je i to, že polyploid má dvojnásobnou zásobu genetického materiálu, což mu umožňuje větší variabilitu genů. To je výhodné pro adaptaci 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.

K posouzení pravděpodobnosti toho, zda se nový polyploid úspěšně etabluje, potřebujeme informace o životaschopnosti a plodnosti nových buněčných typů, rozsahu reprodukční izolace uvnitř buněčných typů a mezi nimi a o ekologické nise nových polyploidů. (Ramsey & Shemske, 1998)

### 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. (Ramsey & Shemske, 1998)



Obr. 1 Vznik polyploidů přes triploidní jedince (není-li uvedeno jinak, obrázek autorka)

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. (Levin, 2002)

Alopolyploidi mohou vznikat sloučením dvou neredukovaných gamet různých druhů nebo sloučením haploidních gamet dvou různých druhů. Hybridi vzniklé druhým způsobem bývají většinou neplodní, protože nelze spárovat dvě rozdílné sady chromozomů. Překonat tento problém může pomoci zdvojení genomu. (Bomblies & Madlung, 2014)

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. (Skalická, 2005)

Některé výzkumy uvádějí, že neredukovaná vajíčka jsou spolehlivějším zdrojem polyploidů než neredukované gamety. Větší míru tvorby triploidů pozorovali vědci u křížení, kdy mateř-

ské gamety byly neredukované a otcovské redukované. Mechanismy formace polyploidů však stále potřebují podrobnější výzkum. (Ramsey & Shemske, 1998)

## 2.2 Neredukované gamety

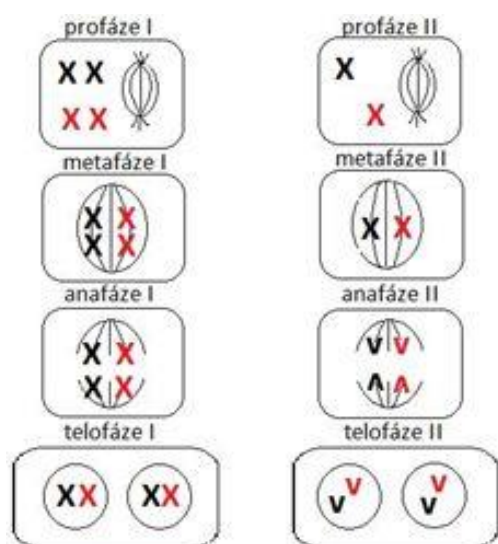
### 2.2.1 Vznik

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 sudý počet chromozomů.

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. (Rhoades & Dempsey, 1966)

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. (Watanabe & Peloquin, 1993)

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.



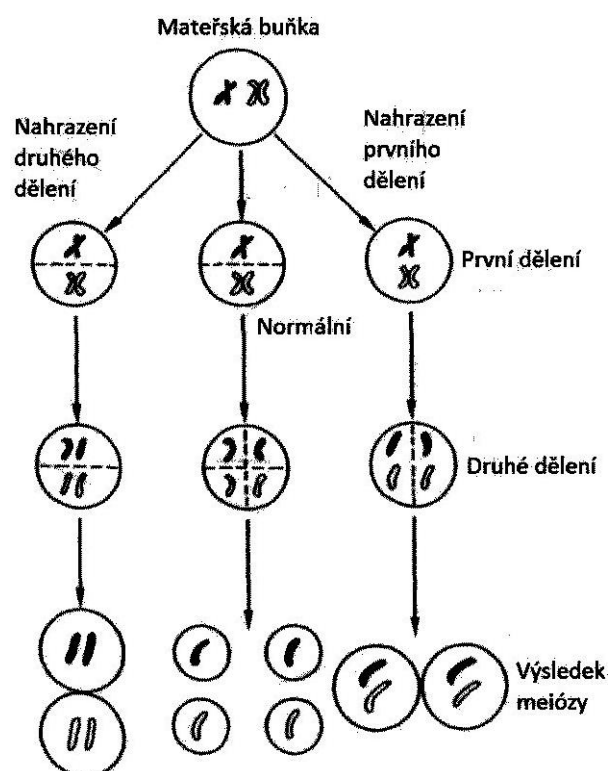
Obr. 2 Běžný průběh meiózy; heterotypické = redukční (I) a homeotypické = ekvační (II) dělení

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 chroma-



tid každého chromozomu. Dále jsou popsány dva nejzákladnější způsoby, kterými může poruchou v meióze dojít ke vzniku neredukované gamety (Obr. 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. (Bretagnolle & Thompson, 1995)

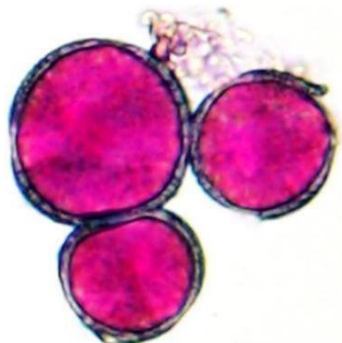


Obr. 3 Dva základní způsoby poruch meiózy vedoucích k vzniku neredukovaných gamet, upraveno podle (Bretagnolle & Thompson, 1995)

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 ( $n$ ) (Obr. 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 různé velké redukované gamety.

Redukce se ale projevuje i na celkovém tvaru buňky. U brukvovitých (čeled' s nejdůležitějšími 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). (Ramsey, 2007)



Obr. 4 Obarvené redukované a jedna neredukovaná gameta, autor: Magdalena Holcová

### 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 (nepublikovaná data) 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 přírodní 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 přírodním 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 %. (Ramsey & Shemske, 1998)

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

Většině z ekologických faktorů, o kterých víme, že ovlivňují tvorbu neredukovaných gamet, jsou rostliny vystavovány ve svém přírodním 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. (Ramsey & Shemske, 1998)

### 2.2.3 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. (Ramanna & Jacobsen, 2003)

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 ploidií tvořit neredukované gamety, které tak mají stejné množství DNA jako redukované (tj. normální) gamety polyploidní rostliny a jsou tedy vzájemně kompatibilní. (Barcaccia, et al., 2003)

Pomocí neredukovaných gamet se dají vypěstovat nové polyploidní druhy (zvýšením polyploidie původního druhu). To by mohlo mít nevyčíslitelnou 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 vzniklé bývali méně životaschopní než ti, kteří vznikli pomocí sexuální polyploidizace skrze mutace vedoucí k tvorbě neredukovaných gamet. (Brownfield & Köhler, 2010)

## 2.3 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. (Schmickl, et al., 2012)

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. Také patří do čeledi brukvovitých, kam patří mnohé druhy plodin a jejich divoce rostoucí předchůdci, což zvyšuje šanci, že mé výsledky budou bezprostředně využitelné pro tyto druhy.

## 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. (Bethke, et al., 2017)

### 3.2 Odběr vzorků

Původ populací (viz mapa níže, Obr. 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 (Obr. 5).

Semínka z jednotlivých populací byla sedm dní ponechána v klíčícím mediu (polovičně silné MS medium, 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.

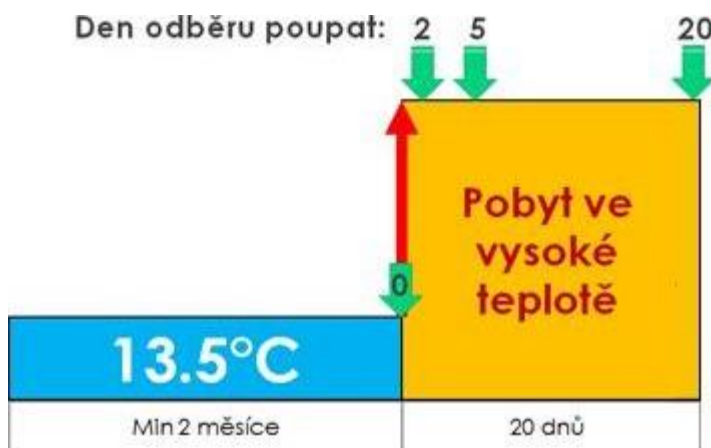
Z každé populace bylo vypěstováno šest setů rostlin (4-5 jedinců), které byly následně vystaveny vyšším teplotám (Tab. 1). V komoře s vysokou teplotou byly ponechány 20 dní. Poupata byla odebírána před přenosem do vyšší teploty a poté po 2, 5 a 20 dnech (Obr. 6) a fixovány ve směsi 70% ethanolu a ledové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



Obr. 5 Mapa původu populací, vlastní tvorba

Tab. 1 Vystavení vybraných setů vyšším teplotám

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



Obr. 6 Odběry vzorků, vlastní tvorba

### 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 (Obr. 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.



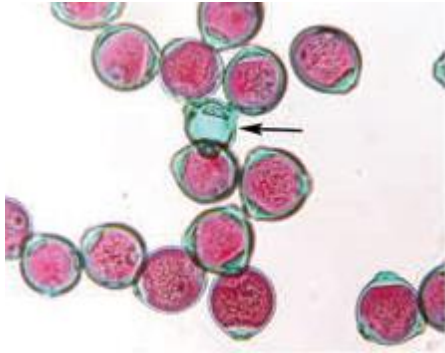
Obr. 7 Poupě před otevřením, vlastní tvorba

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. (Peterson, et al., 2010)

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.



Obr. 8 Obarvené životaschopné a jedna neživotaschopná gameta; (Peterson, et al., 2010)

### 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.

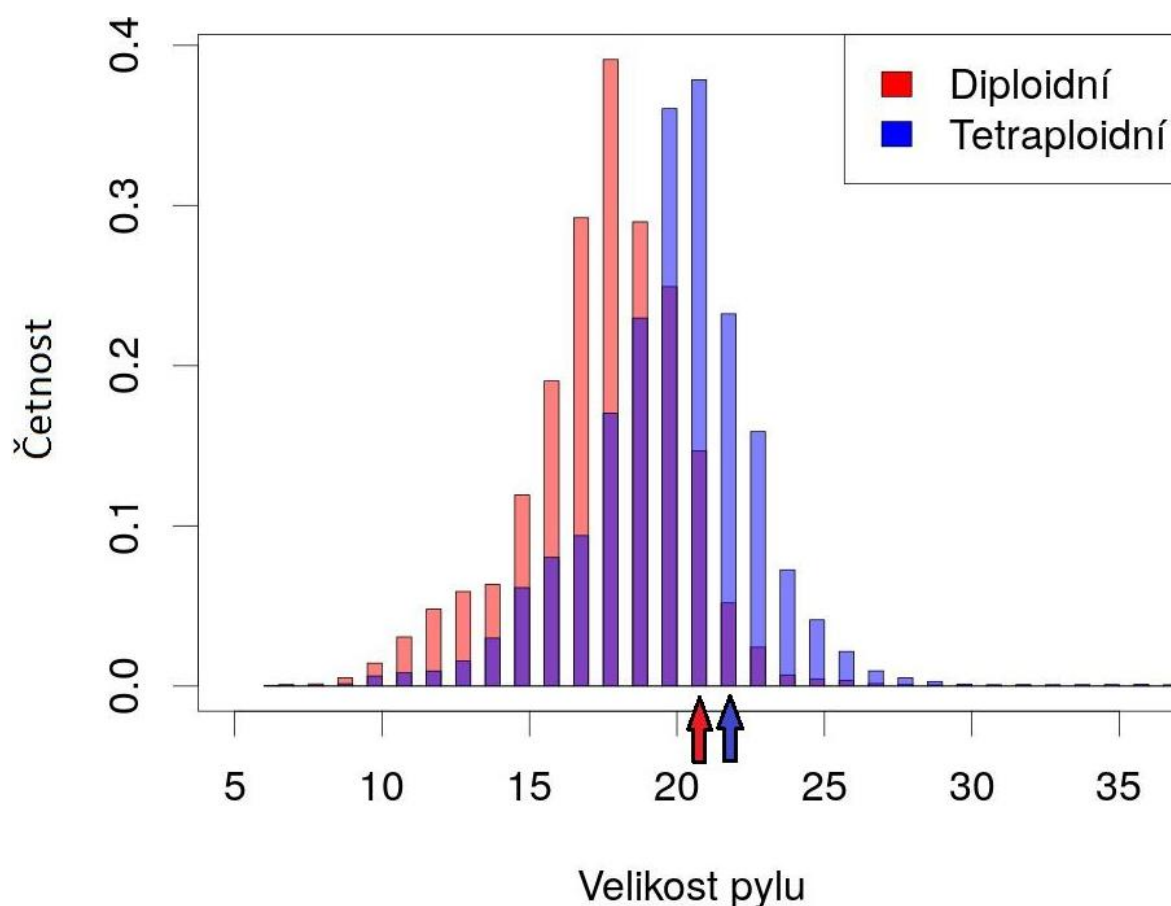
Pylová zrna v jednotlivých vzorcích jsem počítala s pomocí programu ImageJ s vizuální kontrolou. K zhodnocení četnosti neredukovaných gamet jsem využila Microsoft Excel a pro tvorbu krabicových grafů statistický software R (R-Studio), kde mi se skriptováním pomohla školitelka.

## 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.

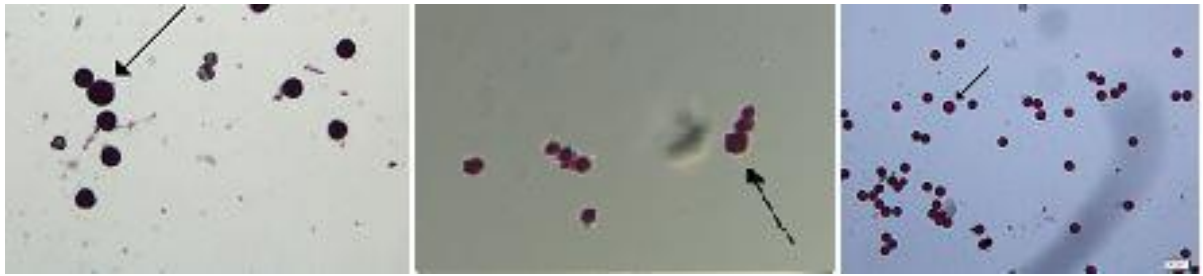
Pročištěná data jsem zpracovala do formy histogramů pro jednotlivé populace a z nich jsem určila velikostní práh pro určování neredukovaných gamet (ty, které svým průměrem překročily určený práh). (Obr. 9) Práh se nacházel v místě, kde se frekvence pylu s danou velikostí náhle skokově snížila. (Graf 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, vlastní tvorba



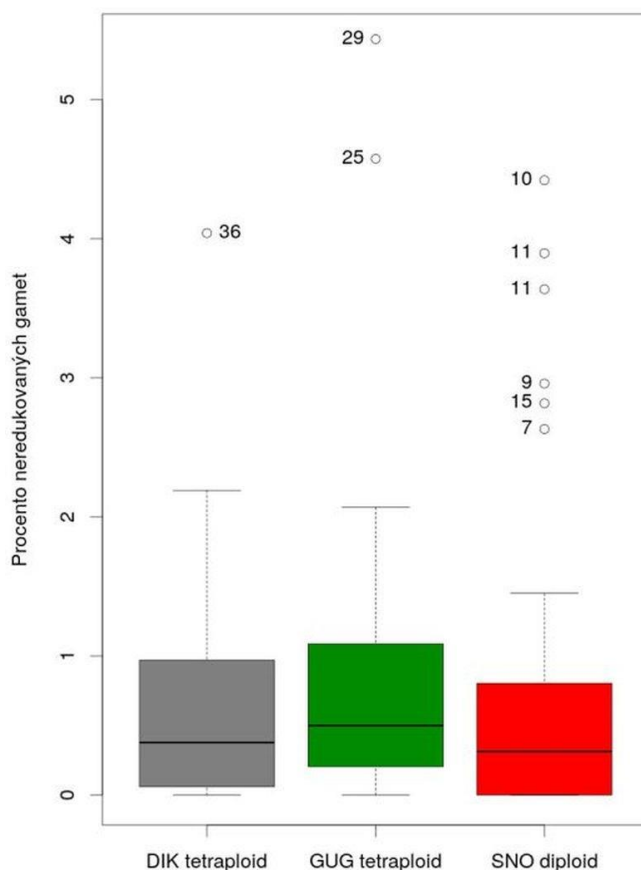


Obr. 9: Neredukované gamety v mých vzorcích; označené šipkou, větší než redukované  
Zleva odběr po dvaceti dnech z 20 °C, 30 °C a 37 °C

## 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)



Graf 2 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých populacích

Hodnocené nezávisle na teplotě nebo době vystavení vyšší teplotě

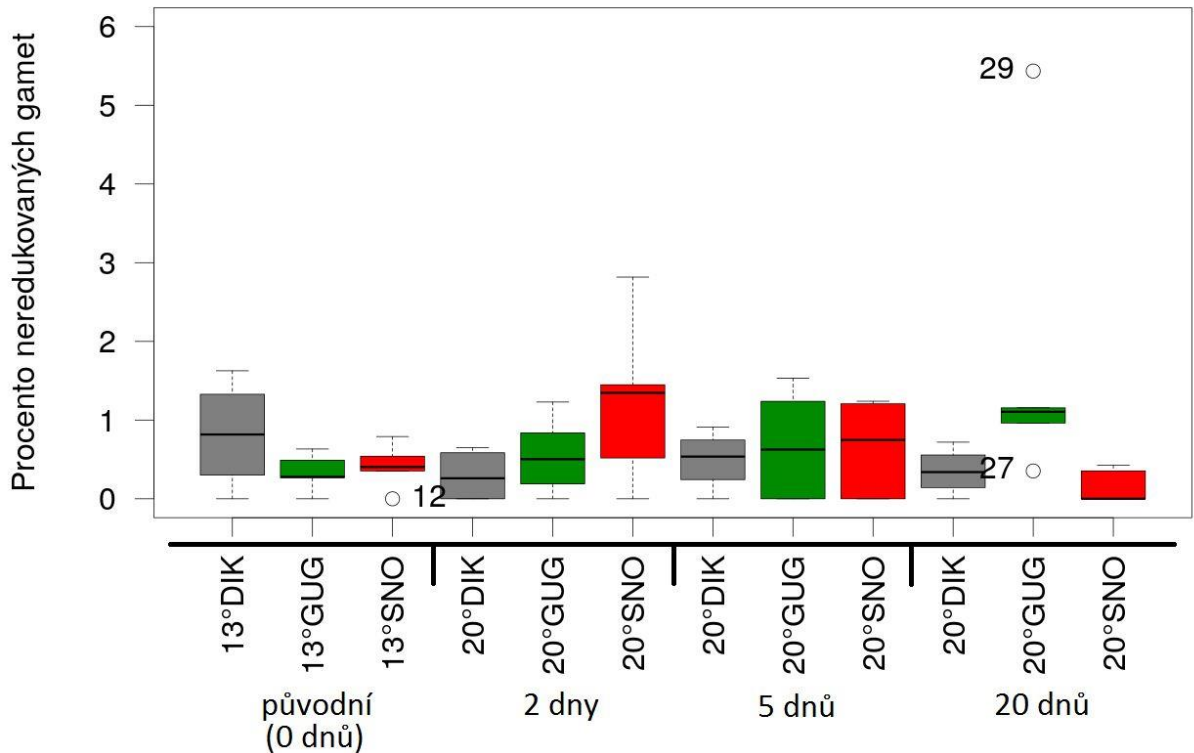
Při pěstování rostlin v 20 a 30 °C byla nízká variabilita mezi jedinci uvnitř populace a vysoká mezi populacemi po stabilizaci v dané teplotě (před přenosem z 13 °C a po dvacetidenním pobytu), což jsem předpokládala. Naproti tomu po okamžitém teplotním skoku se zvýšily rozdíly mezi jedinci v rámci populace, což odporuje mému předpokladu (Graf 3 a Graf 4). V případě nejvyšší zkoumané teploty 37 °C byla vysoká variabilita jak mezi jedinci, tak mezi populacemi. (Graf 5)

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

Pěstování v teplotě 20 °C mělo na rozptyl jedinců největší vliv po 5 dnech. To se zvětšily rozdíly mezi jednotlivými rostlinami u diploidní (SNO) i u tetraploidní (GUG) populace. Po dalším pobytu v této teplotě se však produkce u obou populací začala ustalovat na podobných hodnotách. Tedy jedinci jednotlivé populace produkovali podobné množství neredukovaného pylu. Avšak tyto dvě populace se mezi sebou lišily. Jedinci tetraploidní populace (GUG) ustálili svou tvorbu na vyšších hodnotách. Téměř všichni příslušníci tetraploidní populace tedy při této teplotě tvořili větší množství neredukovaných gamet.

U druhé tetraploidní populace (DIK) se rozdíly mezi jejími jednotlivci postupně snižovaly. Při posledním odběru byly rozdíly mezi jednotlivci srovnatelné s diploidní populací (SNO), ale produkce gamet byla nepatrně vyšší.

## Teplota 20°



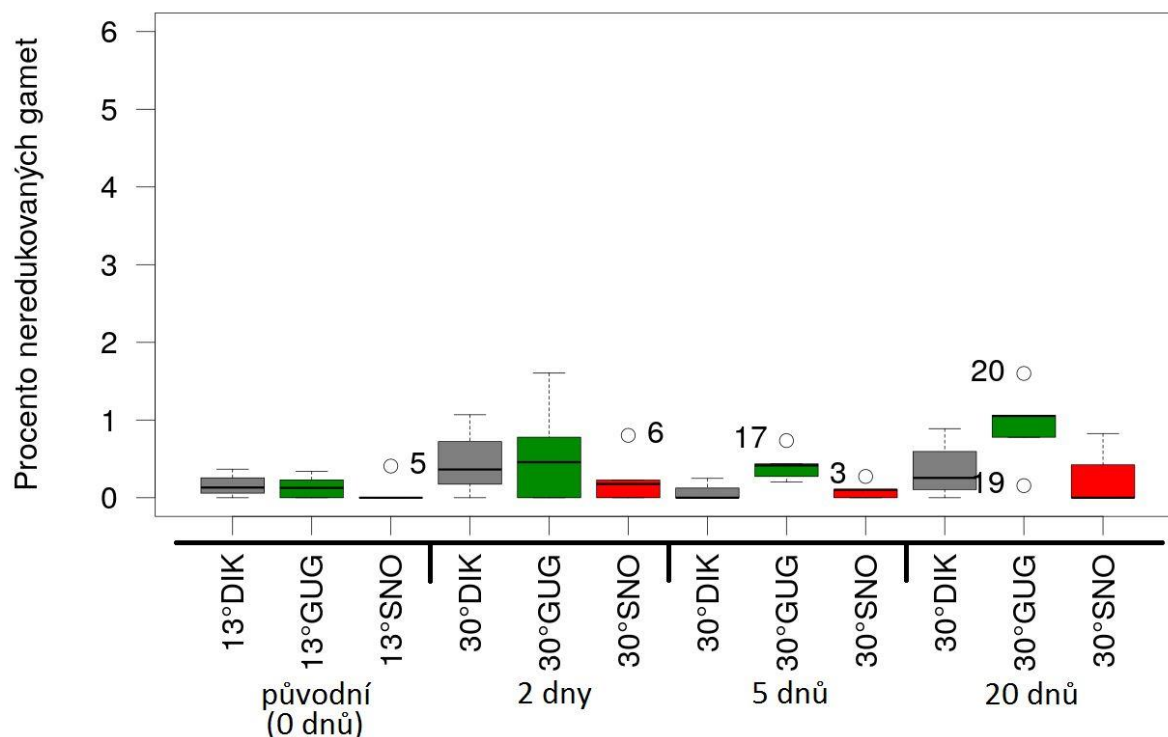
Graf 3 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 20 °C

Po dvoudenním pobytu v teplotě 30 °C začali jedinci z diploidní populace (SNO) produkovat malý podíl neredukovaného pylu. Při dalším odběru po pěti dnech byly rozdíly mezi jedinci i produkce menší. Delší pobyt ve zvýšené teplotě způsobil, že někteří jedinci začali tvořit větší množství neredukovaného pylu, ale u většiny jedinců se neredukované gamety nevyskytly.

Nejvýrazněji ze všech tří populací reagovala tetraploidní populace (GUG). Někteří její jedinci reagovali na přemístění okamžitou tvorbou neredukovaného pylu, jiní však ne, takže se zvětšily rozdíly mezi jednotlivci. Během dalšího působení zvýšené teploty se však rozdíly uvnitř populace zmenšily a jedinci začali všichni produkovat neredukovaný pyl. Při posledním odběru tvořila tato populace výrazně více neredukovaného pylu než jedinci diploidní populace.

U druhé tetraploidní populace (DIK) byla výsledná produkce pylu sice vyšší než u diploidů, ale rozdíly mezi jedinci byly větší. Frekvence neredukovaných gamet byla u této populace nižší než u první tetraploidní populace (GUG).

## Teplota 30°



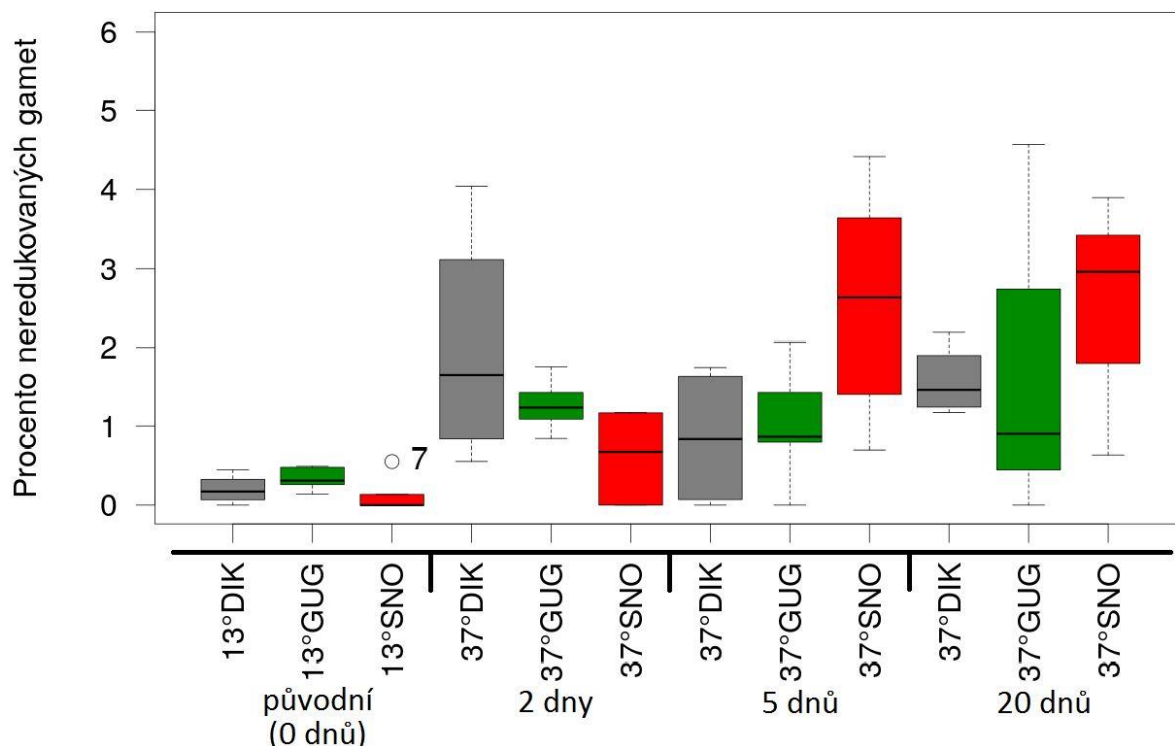
Graf 4 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 30 °C

V nejvyšší zkoumané teplotě se nejvýrazněji projevila diploidní populace (SNO). Bezprostřední teplotní šok měřený po dvou dnech způsobil, že neredukované gamety tvořili pouze někteří jedinci. Po pětidenním vystavení této teplotě začali i zbylí jedinci tvořit neredukované gamety. Rozdíly uvnitř populace se zvětšily, ale všichni jedinci měli vysoký podíl neredukovaného pylu. V době posledního odběru se rozdíly mezi jedinci začínaly snižovat.

Na tetraploidní populaci (GUG) měl velký vliv teplotní šok po dvou dnech. Všichni jedinci začali okamžitě produkovat neredukované gamety. Čím déle byly rostliny vystaveny vyšší teplotě, tím větší vznikaly rozdíly mezi jedinci v populaci.

V tetraploidní populaci (DIK) začali také tvořit neredukované gamety všichni jedinci. Byly mezi nimi, ale značné rozdíly, které se postupem času snižovaly. V porovnání s druhou tetraploidní populací tvořila tato větší množství neredukovaného pylu.

## Teplota 37°

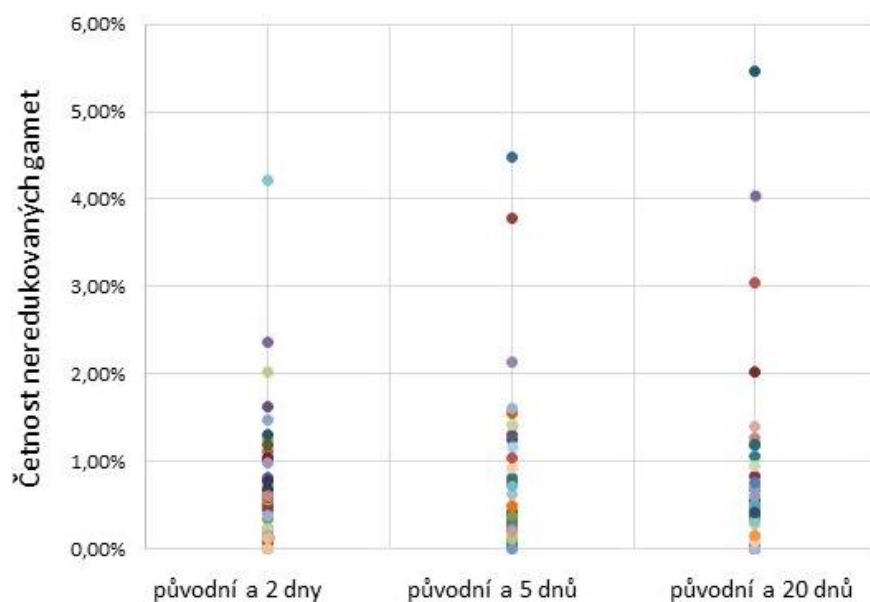


Graf 5 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 37 °C

### 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 hodnocení variability v produkci neredukovaných gamet (Graf 6) jsem předpokládala, že efektivnější je dlouhodobější pobyt v prostředí se zvýšenou teplotou.

## Rozdíly v produkci



Graf 6 Rozdíly v produkci mezi původními 13 °C a vyššími teplotami (20, 30 a 37 °C)  
Jeden bod znázorňuje jednoho jedince bez ohledu na jeho příslušnost k populaci

### 4.4.1 Přenos do teploty 20 °C

Přenos diploidní populace (SNO) do teploty 20 °C způsobil zvýšení produkce neredukovaného pylu. Čím déle byly rostliny vystaveny této teplotě, tím menší byla frekvence výskytu neredukovaného pylu. (Graf 3)

Přesunutím tetraploidní horské populace (GUG) do teploty 20 °C začaly nejprve vznikat rozdíly mezi jedinci, protože někteří zareagovali okamžitou tvorbou neredukovaného pylu a jiní ne. Delší působení vyšší teploty (20 dnů) přinutilo začít s tvorbou všechny jedince a jejich rozdíly se výrazně zmenšily.

Tetraploidní populace (DIK) rostoucí na švédské železnici na přenos mezi teplotami zvýšenou tvorbou nezareagovala. Naopak se četnost neredukovaných gamet snížila.

### 4.4.2 Přenos do teploty 30 °C

Když byly rostliny diploidní populace (SNO) vystaveny teplotě 30 °C, začaly produkovat větší podíl neredukovaného pylu. Nejvyšších hodnot dosahovaly po dvaceti dnech, ale byly mezi nimi patrné rozdíly. (Graf 4)

Nejvýrazněji na přemístění reagovali jedinci tetraploidní populace (GUG). Po dvou dnech začalo mnoho jedinců tvořit větší množství neredukovaného pylu, ale čtvrtina jedinců produkovala stále redukovaný pyl. Po pěti dnech se rozdíly mezi jedinci zmenšily a při odběru po dvaceti dnech byla četnost výskytu neredukovaných gamet nejvyšší a rozdíly nebyly příliš výrazné, až na dva extrémní jedince.

Tetraploidní populace (DIK) reagovala na přenos zvýšením produkce neredukovaného pylu. Později se produkce opět snížila téměř na nulu, ale při posledním odběru již mnoho jedinců opět tvořilo větší množství zkoumaných gamet.

#### **4.4.3 Přenos do teploty 37 °C**

Při přemístění diploidních jedinců (SNO) do nejvyšší zkoumané teploty 37 °C se postupně začala zvyšovat produkce neredukovaného pylu. Po pěti dnech někteří jedinci tvořili velké množství neredukovaného pylu, ale byly značné rozdíly mezi jedinci. Celková produkce této populace byla ale nejvyšší po dvaceti dnech, kdy se zmenšily rozdíly mezi jedinci. (Graf 5)

Horské tetraploidní populaci (GUG) s prodlužujícím se pobytem v 37 °C stoupala i produkce neredukovaného pylu. Její maximum bylo nejvyšší, ale rozdíly mezi jednotlivými rostlinami byly větší než u diploidní populace.

Pro železniční tetraploidní populaci (DIK) měl nejvýraznější vliv na tvorbu zkoumaných gamet samotný přenos, tedy teplotní šok. Později se tvorba sice snižovala, ale ustalovala se na stále dost vysokých hodnotách oproti původní nepatrné produkci.

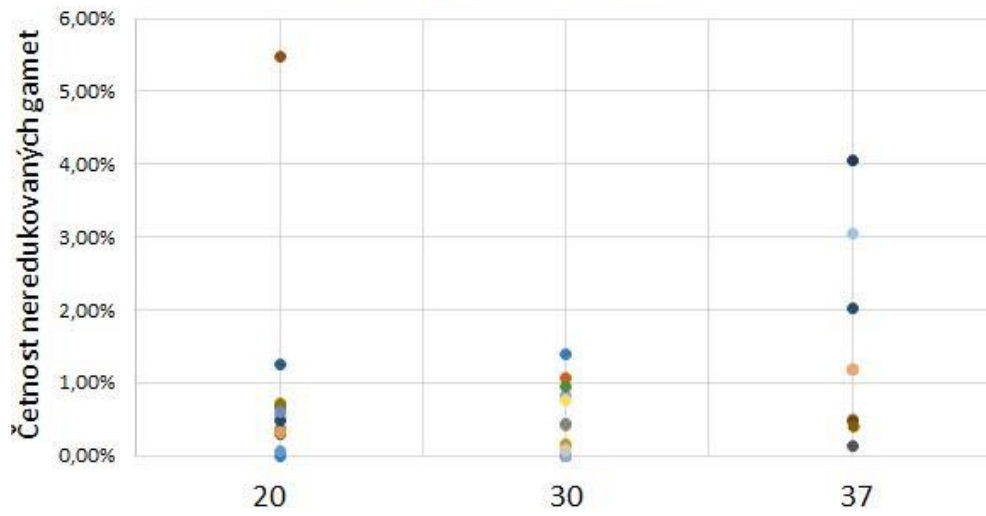
#### **4.4.4 Celkové zhodnocení vlivu doby vystavení vyšší teplotě**

Po posouzení všech výsledků jsem dospěla k názoru, že na zvýšení produkce neredukovaných gamet má větší vliv delší pobyt ve vysoké teplotě. Teplotní šok z přemístění tedy nemá na rostliny tak velký dopad. V jednom z výše uvedených grafů (Graf 6) lze pozorovat zvyšování produkce neredukovaných gamet v závislosti na delším čase stráveném ve vyšší teplotě. Nejvyšší tvorba nastávala u jedinců právě po nejdelším časovém období, tedy dvaceti dnech.

#### **4.5 Celkový vliv teploty zobecněný pro všechny populace**

Pro rozhodnutí, která teplota má největší vliv na tvorbu neredukovaných gamet, jsem porovnávala rozdíly mezi původní teplotou a frekvencí výskytu neredukovaných gamet v jednotlivých teplotách po dvaceti dnech, u kterých jsem zaznamenala nejvyšší vliv. (kap. 4.4, Graf 7) Nejvyšších hodnot dosáhli jedinci, kteří byli přeneseni do teploty 37 °C. Dvě rostliny sice přenos nepřežily, ale i tak mé výsledky jednoznačně ukazují, že teplota 37 °C má nejvýraznější vliv na tvorbu neredukovaných gamet.

## Rozdíly po 20 dnech



Graf 7 Rozdíly v produkci pro jednotlivé teploty po delším působení vyšší teploty  
Jeden bod znázorňuje jednoho jedince bez ohledu na příslušnost k populaci



## 5 DISKUSE

Mé výsledky ukazují několik zajímavých poznatků. Produkce neredukovaných gamet je ovlivněna teplotou, a to především jejím dlouhodobým působením. Největší efekt má teplota 37 °C po dvaceti dnech. Jednotlivé populace jednoho druhu se liší reakcí na zvýšenou teplotu.

Vliv teploty na vznik neredukovaných gamet byl již dříve zaznamenán Bellingem (Belling, 1925), který zjistil, že rostliny tvořily zvýšené množství neredukovaného pylu, když byly vystaveny abnormálním chladným obdobím. Pozitivní vliv nízké teploty je zpracován i Masonovou. (Mason, et al., 2011) 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. (Ramsey & Shemske, 1998), (Ramsey, 2007) 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 mých výsledků vyplývá, že má dlouhodobé působení dokonce větší vliv než teplotní změny.

Z práce Brownfieldové a Köhlerové (Brownfield & Köhler, 2010) 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. (Ramsey, 2007) Z mých výsledků vyplývá, že vystavení rostlin vysoké teplotě po dlouhou dobu může tento proces významně zjednodušit.

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. (Ortiz, et al., 1997) Dalšími příklady onemocnění, proti kterým byli vypěstováni odolní hybridy, jsou vadnutí způsobené bakteriemi (Watanabe, et al., 1992), plísně (Watanabe, et al., 1999), napadení hádčátkem kořenovým (Iwanaga, et al., 1989) nebo hniloba (Capo, et al., 2002). 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 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.

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. Ve všech teplotách byla produkce nejvyšší po dvaceti dnech, tedy dlouhodobém působení. Teplotní šok tedy takový vliv nemá.

Ze tří zkoumaných teplot 20, 30 a 37 °C byly rostliny ovlivněny nejvíce tou nejvyšší, tedy 37 °C. u této teploty byly hodnoty frekvence neredukovaného pylu nejvyšší.

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

- Barcaccia, G., Tavoletti, S., Mariani, A. & Veronesi, F., 2003. Occurrence, inheritance and use of reproductive mutants in alfalfa improvement. *Euphytica*, Červen, pp. 37-56.
- Belling, J., 1925. The origin of chromosomal mutations in *Uvularia*. *Journal of Genetics*, Červenec, pp. 245-266.
- Bethke, P. C., Halterman, D. A. & Jansky, S., 2017. Are We Getting Better at Using Wild Potato Species in Light of New Tools?. *Crop Science*, 16 Červen, pp. 1241-1258.
- Bombliès, K. & Madlung, A., 2014. Polyploidy in the *Arabidopsis* genus. *Chromosome Research*, Issue 22, p. 117–134.
- Bretagnolle, F. & Thompson, J. D., 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*.
- Brownfield, L. & Köhler, C., 2010. Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *Journal of Experimental Botany*, 25 Listopad.
- Capo, A. a další, 2002. Evaluation for chipping and tuber soft rot (*Erwinia carotovora*) resistance in potato clones from unilateral sexual polyploidization (2x × 4x). *American Journal of Potato Research*, Březen, pp. 139-145.
- Darlington, C. D., 1963. *Chromosome Botany and the Origins of Cultivated Plants*. New York: Hafner.
- Holcová, M., 2015. *Autopolyploids: particularly hopeful monsters*, Praha: Holcová.
- Iwanaga, M., Jutala, P., Ortiz, R. & Guevara, E., 1989. Use of FDR 2n pollen to transfer resistance to root knot nematodes into cultivated 4x potatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, pp. 1008-1013.
- Kihara, H. & Ono, T., 1926. Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der *Rumex*-Arten. *Z.Zellforsch*, Issue 4, pp. 475-481.
- Levin, D. A., 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*, Červenec, pp. 1-25.
- Levin, D. A., 2002. The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. *Oxford University Press*.
- Mason, A. S., Nelson, M. N., Yan, G. & Cowling, W. A., 2011. Production of viable male unreduced gametes in. *Plant Biology*.
- Ortiz, R., Franco, J. & Iwanaga, M., 1997. Transfer of resistance to potato cyst nematode (*Globodera pallida*) into cultivated potato *Solanum tuberosum* through first division restitution 2n pollen. *Euphytica*, 8 Duben, pp. 339-344.
- Peterson, R., Slovin, J. P. & Chen, C., 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology*, červenec, pp. 66-69.
- Ramanna, M. & Jacobsen, E., 2003. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – A review. *Euphytica*, 11 Červen, pp. 3-18.
- Ramsey, J., 2007. Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity*.

- Ramsey, J. & Shemske, D. W., 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, pp. 467-469, 477-478, 494-496.
- Rhoades, M. M. & Dempsey, E., 1966. Induction of Chromosome Doubling at Meiosis by the Elongate Gene in Maize. *Genetics*, Srpen, pp. 505-522.
- Schmickl, R. a další, 2012. The Evolutionary History of the Arabidopsis arenosa Complex: Diverse Tetraploids Mask the Western Carpathian Center of Species and Genetic Diversity. *PLOS ONE*, 3 Srpen.
- Skalická, K., 2005. Polyploidie dokáže s rostlinnými genomy pořádně zatřást. *Živa*, pp. 49-56.
- Stebbins, G. L., 1947. Types of polyploids; their classification and significance. *Adv. Genet*, Issue 1, p. 403–429.
- Watanabe, A. J., Orrillo, M. & Watanabe, K. N., 1999. Frequency of Potato Genotypes with Multiple Quantitative Pest Resistance Traits in  $4x \times 2x$  Crosses. *Breeding Science*, Červen, pp. 53-61.
- Watanabe, K., El-Nashaar, H. & Iwanaga, M., 1992. Transmission of bacterial wilt resistance by first division restitution (FDR)  $2n$  pollen via  $4x \times 2x$  crosses in potatoes. *Euphytica*, 10 Únor, pp. 21-26.
- Watanabe, K. & Peloquin, S., 1993. Cytological basis of  $2n$  pollen formation in a wide range of  $2x$ ,  $4x$ , and  $6x$  taxa from tuber-bearing Solanum species. *Genome*, Únor, pp. 8-13.

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1 Vznik polyploidů přes triploidní jedince (není-li uvedeno jinak, obrázek autorka).....	9
Obr. 2 Běžný průběh meiózy; heterotypické = redukční (I) a homeotypické = ekvační (II) dělení.....	10
Obr. 3 Dva základní způsoby poruch meiózy vedoucích k vzniku neredukovaných gamet, upraveno podle (Bretagnolle & Thompson, 1995) .....	11
Obr. 4 Obarvené redukované a jedna neredukovaná gameta, autor: Magdalena Holcová.....	12
Obr. 5 Mapa původu populací, vlastní tvorba .....	15
Obr. 6 Odběry vzorků, vlastní tvorba .....	15
Obr. 7 Poupě před otevřením, vlastní tvorba .....	16
Obr. 8 Obarvené životaschopné a jedna neživotaschopná gameta; (Peterson, et al., 2010).....	17
Obr. 9: Neredukované gamety v mých vzorcích; označené šipkou, větší než redukované .....	19
Graf 1: Společný histogram pro diploidní a tetraploidní populaci .....	18
Graf 2 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých populacích .....	19
Graf 3 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 20 °C ..	21
Graf 4 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 30 °C ..	22
Graf 5 Procentuální zastoupení neredukovaných gamet v jednotlivých odběrech pro 37 °C ..	23
Graf 6 Rozdíly v produkci mezi původními 13 °C a vyššími teplotami (20, 30 a 37 °C).....	24
Graf 7 Rozdíly v produkci pro jednotlivé teploty po delším působení vyšší teploty .....	26
Tab. 1 Vystavení vybraných setů vyšším teplotám .....	15