

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Antheridiogenový systém u sleziníku routičky**

***(Asplenium ruta-muraria)***

**Bakalářská práce**

**Lucie Černochová**

Školitel: Mgr. Ondřej Horných Ph.D.

Konzultant: RNDr. Libor Ekrt Ph.D.

České Budějovice 2021

Černochová, L., 2021: Antheridiogenový systém u sleziníku routičky (*Asplenium ruta-muraria*). [Antheridiogen system in *Asplenium ruta-muraria*. Bc. Thesis, in Czech.] – 32 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:** Byla otestována přítomnost antheridiogenového systému u *Asplenium ruta-muraria*. Byla provedena kultivace se zástupci uznávaných typů antheridiogenu na 12-políčkových miskách. Dále bylo zjištěno kolik druhů antheridiogen *Asplenium ruta-muraria* ovlivňuje. Byly testovány především fylogeneticky příbuzné druhy.

**Anotation:** The presence of the antheridiogen system in *Asplenium ruta-muraria* was tested. Cultivation was performed with representatives of recognized antheridiogen types in 12-well plates. It was also determined how many species the antheridiogen of *Asplenium ruta-muraria* affects. Mainly phylogenetically related species were tested.

**Klíčová slova:** feromon, gametangia, gametofyt, klíčení spor ve tmě, kultivace, předčasná tvorba antheridií, typy antheridiogenů, určení pohlaví

**Keywords:** pheromon, gametangia, gametophyte, germination of spores in darkness, cultivation, precocious formation of antheridia, types of antheridiogens, sex determination

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2021

.....

Lucie Černochová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Ondřeji Hornychovi Ph.D. a konzultantovi RNDr. Liborovi Ekrtovi Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této bakalářské práce. Zároveň jim děkuji za poskytnutí vzorků a pomoc při sběru. Za pomoc a poskytnutí vzorků děkuji také Mgr. Kateřině Vejvodové.

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	1
3	Literární rešerše.....	2
3.1	Životní cyklus kapradin .....	2
3.1.1	Apomixie.....	4
3.2	Ontogeneze gametofytu .....	4
3.3	Faktory ovlivňující růst gametofytů .....	5
3.3.1	Antheridiogeny .....	5
3.3.2	Alelopatie .....	9
4	Materiál a metody .....	10
4.1	Ověření routičkového typu.....	11
4.2	Klíčení <i>Asplenium ruta-muraria</i> ve tmě .....	12
4.3	Reakce ostatních druhů na routičkový typ.....	12
4.4	Vyhodnocení dat.....	13
5	Výsledky.....	13
5.1	Ověření routičkového typu.....	13
5.2	Klíčení <i>Asplenium ruta-muraria</i> ve tmě .....	16
5.3	Reakce ostatních druhů na routičkový typ.....	17
6	Diskuze .....	20
6.1	Routičkový typ antheridiogenu nepotvrzen .....	20
6.2	<i>Asplenium ruta-muraria</i> ve tmě neklíčí.....	22
6.3	<i>Asplenium ruta-muraria</i> alelopaticky ovlivňuje některé druhy .....	23
7	Závěr.....	24
8	Seznam použitých zdrojů.....	24
9	Přílohy .....	31

# 1 Úvod

V každé fázi životního cyklu kapradin je růst a vývoj ovlivněn řadou abiotických a biotických faktorů. Jedním z nejstudovanějších biotických faktorů je přítomnost chemické látky zvané antheridiogen (Miller 1968, Raghavan 1989, Ranker & Haufler 2008). Antheridiogeny jsou feromony, které vylučují do okolí gametofyty s laterálním meristémem a způsobují předčasnou tvorbu antheridií (samčích gametangií) u mladších gametofytů. Jedinci jsou tak schopni zajistit dostatečné množství samčích gametofytů ve své blízkosti, podpořit outcrossing anebo usnadnit oplození v členitém terénu (Näf et al. 1975, Schneller 1979, Schneller et al. 1990, Schneller & Hess 1995). U některých druhů dokáže antheridiogen také vyvolat klíčení spor ve tmě a dá se považovat za dobrý indikátor reakce na tuto látku (Schneller 1988, Raghavan 1989, Haufler & Welling 1994). Rozeznávají jsou tři hlavní typy antheridiogenů, jako modeloví zástupci se uvádí *Pteridium aquilinum* a *Onoclea sensibilis* (AGPo typ), *Anemia phyllitidis* (AGSc typ) a *Ceratopteris* (AGCe typ). Typy jsou vymezeny tak, že každý druh reaguje pouze na jeden z typů, současně platí, že antheridiogen může ovlivňovat i druhy z jiných čeledí (Döpp 1950, Näf 1959, Raghavan 1989, Hornych et al. 2021). Schneller & Hess (1995) na základě své studie naznačují další typ antheridiogenu u *Asplenium ruta-muraria*. Bylo zjištěno, že druh nereaguje na kyselinu giberelovou, která je schopna nahradit působení AGSc typu, ale indukuje tvorbu antheridií u mladších gametofytů téhož druhu (Schneller & Hess 1995).

V této bakalářské práci je ověřována přítomnost antheridiogenového systému u *Asplenium ruta-muraria*, který byl popsán jedinou studií (Schneller & Hess 1995) jako nový typ u *Aspleniaceae*. Pokud by byl nový typ antheridiogenu potvrzen, dá se předpokládat, že ovlivňuje i jiné druhy.

## 2 Cíle práce

Cíle bakalářské práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- 1 Ověření přítomnosti antheridiogenů u sleziníku routičky (*Asplenium ruta-muraria*).
- 2 Zjištění podobnosti routičkového typu antheridiogenu s hlavními typy antheridiogenů u kapradin.

- 3 Testování vlivu sleziníku routičky (*Asplenium ruta-muraria*) na jiné druhy, zejména z čeledi *Aspleniaceae*.

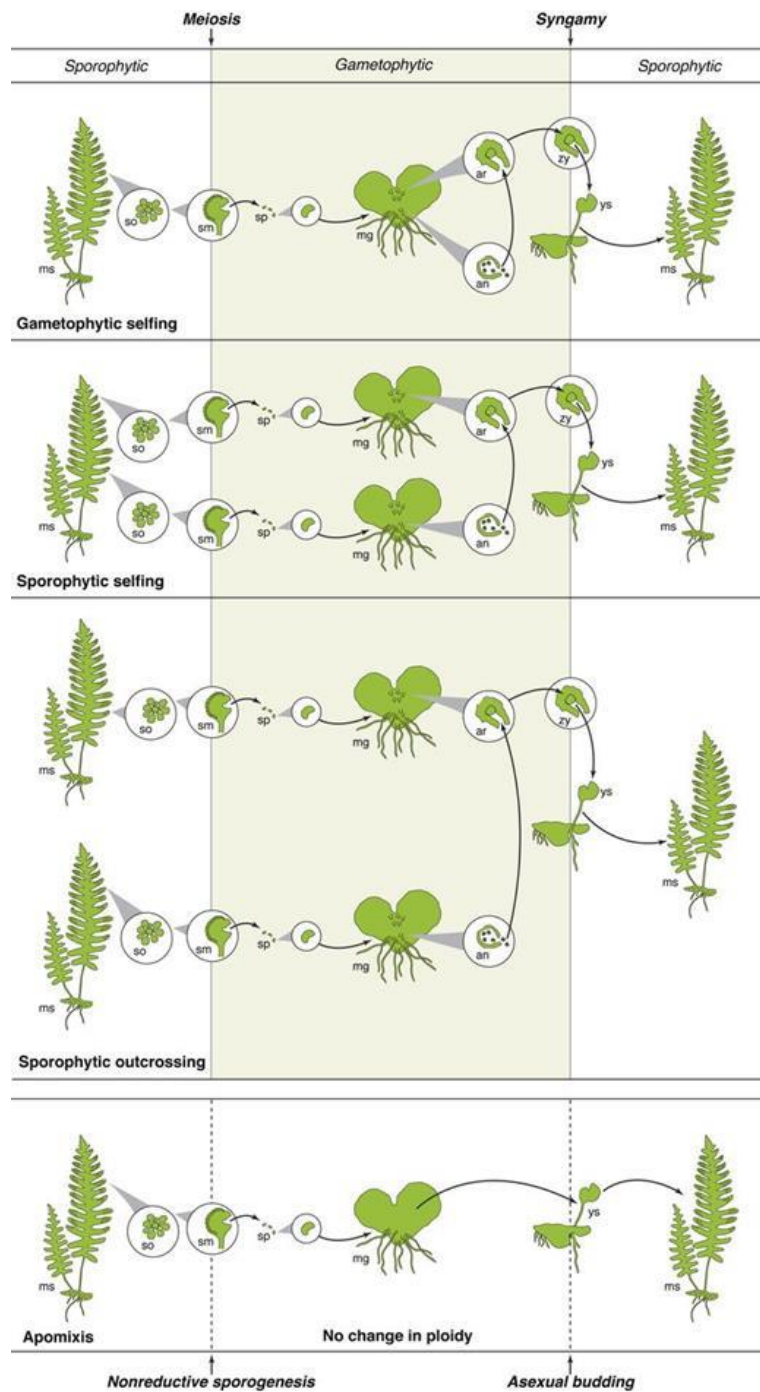
## 3 Literární řešerše

### 3.1 Životní cyklus kapradin

V životním cyklu rostlin dochází ke střídání haploidní a diploidní fáze, kdy se liší počet chromozomů v jádře buňky. U kapradin a plavuní je unikátní, že haploidní fáze (gametofyt) je zcela nezávislá na diploidní sporofytické fázi (Obr 1; Haufler et al. 2016). První buňka haploidní fáze se nazývá spora, z té klíčí vlastní gametofyt. Na gametofytech se tvoří dva typy rozmnožovacích útvarů – samčí gametangia (antheridia) se spermatozoidy a samičí gametangia (archegonia) produkující vajíčka (Raghavan 1989). Pohlavní buňky splývají za vzniku diploidní zygoty a začíná fáze sporofytická. Na sporofytu se tvoří sporangia, ve kterých meiózou (redukčním dělením) vznikají spory. Spory po opuštění výtrusnice klíčí a cyklus se uzavírá (Haufler et al. 2016). Heterosporické kapradiny produkují dva typy spor, které dávají vzniknout pouze jednopohlavním gametofytům. Většina druhů je ale homosporických a produkuje jen jeden typ spory, z nichž mohou vyklíčit gametofyty jednopohlavné i oboupohlavné (Atallah & Banks 2015, Haufler 2016).

Homosporické kapradiny se mohou pohlavně rozmnožovat třemi způsoby (Klekowski 1973, Haufler et al. 2016, Obr 1). Gametofytický (intragametofytický) selfing je samooplození gametofytů – zygota je tvořena geneticky identickými gametami, které produkuje hermafroditický gametofyt. Sporofytický (intergametofytický) selfing je samooplození sporofytu – zygota vzniká splynutím gamet z různých gametofytů, které pochází ze spor jediného sporofytu. Sporofytický outcrossing (intergametofytický crossing) je páření mezi sporofyty – gametofyty vznikají ze spor různých rodičovských sporofytů, gamety těchto odlišných gametofytů splývají za vzniku zygoty (Haufler et al. 2016). Homosporické kapradiny rozmnožující se prostřednictvím gametofytického selfingu vytvářejí 100% homozygotní sporofyty, čímž se jejich genetická variabilita snižuje. Proto se vyvinuly mechanismy podporující outcrossing na úrovni ontogeneze či feromonů (Klekowski 1969, Takeno & Furuya 1987, Atallah & Banks 2015, Sessa et al. 2016). Většina homosporických kapradin je schopna rozmnožovat se všemi třemi způsoby zmíněnými výše (Klekowski 1969,

Korpelainen 1994, Korpelainen 1996, Haufler 2002, Mehltreter et al. 2010, Sessa et al. 2016).



**Obř. 1:** Schématický přehled životního cyklu kapradin. Spory jsou u pohlavně se rozmnořujících druhů vytvářeny meioticky ve sporangiu. Po fázi klíčení a mitotickém dělení vzniká ze spory nezávislý gametofyt, který nese archegonia s vajíčky a antheridia se spermatozoidy. Po splynutí gamet se zygota mitoticky dělí a dává vzniknout sporofytu. U apomikticky se rozmnořujících druhů vznikají gametofyty z neredukovaných spor. Na gametofytu vzniká sporofyt bez oplození

a o stejné ploidii jako gametofyt. Zkratky: an, antheridium; ar, archeonium; mg, dospělý gametofyt; ms, dospělý sporofyt; sm, sporangium; so, sorus; sp, spora; ys, mladý sporofyt; zy, zygota. Převzato z Haufler et al. (2016).

### 3.1.1 Apomixie

Kromě normálního sexuálního cyklu se kapradiny mohou rozmnožovat i nepohlavně. Významným způsobem nepohlavního rozmnožování je apomixie, při které dochází k tvorbě gametofytů i sporofytů o stejné ploidní úrovni (Ranker & Haufler 2008, Grusz 2016). Tímto způsobem se rozmnožuje nejméně 3 % kapradin (Liu et al. 2012). Vzácnější způsob apomixie je aposporie, při které nedochází k tvorbě spor a základem pro vývoj gametofytu je tkáň sporofytu (Hickok et al. 1995, Ranker & Haufler 2008, Haufler et al. 2016). Častější je kombinace dvou procesů, diplosporie a apogamie. Diplosporií vznikají neredukované (diploidní) spory, z nichž poté klíčí neredukovaný gametofyt. Na takovém gametofytu vzniká sporofyt apogamicky, prostým dělením buněk bez oplození (Ranker & Haufler 2008, Grusz 2016, Haufler et al. 2016).

## 3.2 Ontogeneze gametofytu

Gametofyty jsou schopny vytvářet samčí antheridia a samičí archeonia produkující pohlavní gamety. Jedinci s oběma typy gametangií jsou označováni jako hermafrodité. Tvorba rozmnožovacích útvarů na gametofytech se mění se v rámci ontogeneze jedince (Klekowski 1969). Jedním z klíčových milníků ontogeneze je vznik tzv. laterálního meristému, pletiva dělicího se do strany. Laterální meristémy dávají gametofytu srdčitý tvar a je nutný pro tvorbu archeonií. Pořadí vzniku gametangií se ale liší mezi druhy. Klekowski (1969) navrhl 4 typy postupného utváření gametangií v průběhu ontogeneze gametofytu. Typem A je označena sekvence vývoje, kdy gametofyt nejprve tvoří antheridia, následně archeonia a z gametofytu se stává hermafrodit. Tento typ je popsán u většiny homosporických leptosporangiátních kapradin (Stokey 1951, Atkinson & Stokey 1964), např. většiny *Osmundaceae* (Stokey & Atkinson 1956, Campbell 1892) nebo u zástupců z čeledi *Marattiaceae* (Stokey 1942). Typ B se příliš neliší od typu A (po samčí fázi je ještě krátká, čistě samičí fáze), je popsán u *Scolopendrium vulgare* (Andersson-Kottö 1929). V typu C nejprve gametofyt produkuje archeonia, následně se z něj stává hermafrodit. Typ C byl zaznamenán u většiny z čeledi *Blechnaceae* (Klekowski 1969), *Lygodium*



*japonicum* (Twiss 1910) nebo *Onoclea sensibilis* (Klekowski & Lloyd 1968). Poslední popsáný typ D začíná tvorbou antheridií, následuje fáze hermafroditická, poté se vytváří archegonia, tento vývoj je opět zakončen hermafroditickou fází. Vývoj popsal Ward (1954) u *Phlebodium aureum*.

### 3.3 Faktory ovlivňující růst gametofytů

V každé fázi životního cyklu kapradin je růst a vývoj ovlivňován řadou abiotických a biotických faktorů. Gametofyt nejprve musí vyklíčit ze spory, jejichž životaschopnost je v řádu měsíců nebo let (Raghavan 1989). Důležitá je také velikost spor, teplota, pH nebo chemické složení substrátu (Fernández & Revilla 2003). Podle studií je pro klíčení spor optimální teplota v rozmezí 20-25 °C a mírně kyselé nebo neutrální pH. Důležitým faktorem ke klíčení spor je i přítomnost světla a hustota vysetých spor (Miller 1968, Raghavan 1989). Vyšší hustota jedinců v populaci obvykle znamená zhoršenou klíčivost a menší velikost gametofytů (Huang et al. 2004, DeSoto et al. 2008). Jedním z důležitých biotických faktorů je přítomnost feromonů zvaných antheridiogeny a látek alelopatických (Miller 1968, Raghavan 1989).

#### 3.3.1 Antheridiogeny

Antheridiogeny jsou feromony podobné giberelinům, které jsou vylučovány do okolí gametofyty s laterálním meristémem a indukují předčasnou tvorbu antheridií u mladších nepohlavních jedinců (Schneller et al. 1990, DeSoto et al. 2008, Haufler et al. 2016). Antheridiogeny mají také schopnost vyvolat klíčení spor ve tmě (Schneller 1988, Haufler & Welling 1994). Ne všechny druhy kapradin ale tyto feromony využívají, podle nedávné studie používá antheridiogeny celkem 64,5 % zkoumaných druhů (Hornych et al. 2021).

##### 3.3.1.1 Historie objevu

Látku, původně nazvanou jako A-substanz, poprvé objevil Döpp v roce 1950 a na jeho práci navázaly další studie (Näf 1956, 1959; Voeller 1964, Schneller et al. 1990, Yamane 1998). Následně byla substance přejmenována na antheridogen (Pringle 1961) a později na antheridiogen (Näf 1966). Döpp (1950) v kultuře gametofytů během jeho experimentu zjistil, že využití růstového média z kultivace *Pteridium aquilinum* vyvolalo předčasnou tvorbu antheridií u mladších gametofytů téhož druhu a také druhu *Dryopteris filix-mas*. Tato látka, pojmenovaná A-substanz, byla aktivní při nízkých koncentracích a rozpustná ve

vodě. Na tuto práci navázal dalšími studii (Döpp 1959, 1962), kdy zjistil, že starší gametofyty *Pteridium aquilinum* s vyvinutým laterálním meristémem jsou dobrým zdrojem antheridiogenu, ale samy na něj nereagují ani po přenesení na substrát s vyšší koncentrací. Přítomnost laterálního meristému blokuje působení antheridiogenu a zabraňuje tvorbě antheridií. Z toho lze vyvodit, že produkce a odpověď gametofytů na antheridiogen souvisí s výskytem laterálního meristému (Döpp 1959, 1962). Výskyt antheridiogenů byl potvrzen i u dalších zástupců kapradin, např. *Anemia phyllitidis* (Näf 1959, Corey 1986), *Lygodium japonicum* (Näf 1959), *Ceratopteris thalictroides* (Schedlbauer & Klekowski 1972), *Ceratopteris richardii* (Scott & Hickok 1987) nebo *Onoclea sensibilis* (Näf 1956).

### **3.3.1.2 Účinek antheridiogenu**

Antheridiogen je vylučován rychleji rostoucími nebo staršími gametofyty s vyvinutým laterálním meristémem. Tyto gametofyty současně ztrácí schopnost na antheridiogen reagovat (Näf et al. 1975, Schneller et al. 1990, Ranker & Haufler 2008, Haufler et al. 2016). Asexuální gametofyty v okolí reagují na feromon předčasnou tvorbou samčích gametangií a zpomaleným růstem (Schneller et al. 1990, Hamilton & Lloyd 1991, Ranker & Haufler 2008, Testo et al. 2015). Produkce jednopohlavných gametofytů snižuje možnost samooplození gametofytů, usnadňuje outcrossing a udržení heterozygotnosti u homosporických druhů (Takeno & Furuya 1987, Schneller et al. 1990, Chiou & Farrar 1997). Antheridiogenový systém kontroluje tvorbu pohlavních orgánů a může znamenat výhodu v prostředí, kde je dostupnost spermatozoidů nebo prostředí limitujícím faktorem. Dochází k výskytu většího počtu samčích gamet, což může usnadnit oplození v členitém terénu nebo suchém prostředí (Willson 1981, Schneller et al. 1990, Schneller & Hess 1995). Pokud je spermatozoidů v okolí dostatečné množství, mohou větší samičí gametofyty produkující antheridiogen investovat energii do tvorby vajíček a sporofytu a být konkurenčně úspěšnější (Miller 1968, Willson 1981). S počtem samců roste možnost výběru potenciálních partnerů, kteří oplodní vajíčko a zvýší variabilitu potomstva. Samice s více zralými vajíčky si mohou vybírat toho nejvhodnějšího (Willson 1981).

### 3.3.1.3 Klíčení ve tmě

Kromě ovlivnění poměru pohlaví v populaci, má antheridiogen schopnost spouštět klíčení spor ve tmě a vyvolat tvorbu antheridií (Schneller 1988, Raghavan 1989, Haufler & Welling 1994). Spory, které se nacházejí v půdě bez přístupu světla, jsou aktivovány ke klíčení antheridiogenem produkovaným dospělými gametofyty na povrchu půdy. Podzemní spory reagují na feromon tvorbou malých samčích gametofytů se spermatozoidy, které na povrchu půdy oplodní starší gametofyty s vajíčky. Aktivované podzemní spory mohou podpořit outcrossing a zvýšit genetickou variabilitu populace (Schneller 1988, Haufler & Welling 1994, Chiou & Farrar 1997). Klíčení spor ve tmě indukované antheridiogenem bylo pozorováno u několika druhů kapradin. Schneller (1988, Schneller et al. 1990) popsal temné klíčení u *Athyrium filix-femina* a *Dryopteris filix-mas*, Haufler & Welling (1994) u *Bommeria hispida*, Chiou & Farrar (1997) u několika druhů z čeledi *Polypodiaceae*. Stejný vliv na klíčení ve tmě jako antheridiogeny mají i některé gibereliny (Schraudolf 1962, Yamane 1998).

### 3.3.1.4 Typy antheridiogenů

Velmi záhy bylo objeveno, že antheridiogenů je mnoho a každý typ ovlivňuje jinou skupinu druhů. Hornych et al. (2021) vymezili antheridiogenové typy jako skupiny chemických sloučenin ovlivňující vývoj druhů jen z jedné fylogenetické skupiny. Ne všechny sloučeniny v rámci jednoho typu musí ovlivnit všechny druhy v rámci skupiny, ale pokud je jeden druh ovlivněn více sloučeninami, spadají tyto sloučeniny do jednoho typu. V rámci tohoto pojetí jsou rozeznávány tři hlavní typy antheridiogenů na základě skupin, které ovlivňují (Näf et al. 1975, Raghavan 1989, Schneller et al. 1990, Hornych et al. 2021). Typ AGPo (dříve označován jako A, nebo A<sub>Pt</sub>) se nachází u mnoha druhů řádu Polypodiales, typ AGSc (dříve B, nebo A<sub>An</sub>) u zástupců řádu Schizaeales a typ AGCe (dříve C, nebo A<sub>Ce</sub>) u rodu *Ceratopteris*.

Typ AGPo byl poprvé popsán u zástupců patřících do dvou různých čeledí, u *Pteridium aquilinum* a *Dryopteris filix-mas* (Döpp 1950). Kromě těchto druhů, které reagovaly na antheridiogen, byl vliv testován i u dalších skupin kapradin, např. u *Onoclea sensibilis* (Näf 1956, Näf et al. 1975, Raghavan 1989, Chiou & Farrar 1997). Mladé gametofyty *Onoclea sensibilis* produkují v laboratorních podmínkách samčí gametangia pouze v přítomnosti antheridiogenu a reagují na

nízké koncentrace, *Onoclea sensibilis* je proto používaným druhem pro stanovení výskytu AGPo (Näf 1956, Näf et al. 1975, Raghavan 1989, Ranker & Haufler 2008). Reakce na AGPo byla také objevena u *Athyrium filix-femina* (Schneller 1979), *Dryopteris intermedia* a *Dryopteris carthusiana* (Testo et al. 2015), *Campyloneurum angustifolium*, *Campyloneurum phyllitidis*, *Lepisorus thunbergianus*, *Microgramma heterophylla*, *Phymatosorus scolopendria*, *Polypodium pellucidum* (Chiou & Farrar 1997) a dalších druhů. Koncentrace antheridiogenu potřebná k vyvolání předčasné tvorby antheridií se u mnoha reagujících druhů liší (Näf et al. 1975, Haufler & Ranker 2008).

Řád Schizaeales je fylogeneticky nejprimitivnější skupinou tvořící antheridiogen (PPG I 2016, Hornych et al. 2021) zvaný AGSc, který byl popsán např. u *Anemia phyllitidis* (Näf 1959, Corey 1986) a *Lygodium japonicum* (Näf 1959). Chemická struktura antheridiogenů je dobře známá právě jen u řádu Schizaeales, jedná se o sloučeniny podobné giberelinům (Näf et al. 1975, Corey 1986, Yamane 1988). Proto může být antheridiogen v těchto druzích nahrazen kyselinou gibereovou, GA<sub>3</sub>, která při velmi nízké koncentraci dokázala vyvolat tvorbu antheridií v mladých gametofytech a klíčení ve tmě (Schraudolf 1962, Näf et al. 1975, Takeno & Furuya 1975, Yamane 1998). AGSc je neaktivní u druhu *Onoclea sensibilis*, který se používá pro stanovení typu Polypodiales (Näf et al. 1975).

Třetí typ antheridiogenu byl nalezen u rodu *Ceratopteris*, např. u *Ceratopteris thalictroides* (Schedlbauer & Klekowski 1972) nebo u *Ceratopteris richardii* (Scott & Hickok 1987, Hickok et al. 1995). Chemická struktura AGCe zůstává neznámá, biosyntéza ale pravděpodobně zahrnuje kroky společné s biosyntézou giberelinů (Hickok et al. 1995, Yamane 1998, Atallah & Banks 2015).

Bylo popsáno několik dalších typů, např. u *Asplenium ruta-muraria*. V kultuře vytvářely mladé gametofyty předčasně antheridia pod vlivem starších hermafroditických jedinců nebo substrátu, na kterém se nacházely starší gametofyty téhož druhu (Schneller & Hess 1995). Mladé gametofyty *Asplenium ruta-muraria* nereagovaly na GA<sub>3</sub>, stejně tak se neprojevila žádná reakce u *Asplenium trichomanes* a *Asplenium ceterach* na AGPo. To může znamenat další typ antheridiogenu u *Aspleniaceae* (Döpp 1959, Schneller & Hess 1995).

### 3.3.2 Alelopatie

Alelopatie je jev, při kterém jeden jedinec vylučuje chemické sloučeniny ovlivňující okolní jedince. U kapradin jsou tyto chemické sloučeniny vylučovány dospělým jedincem a negativně ovlivňují klíčení, růst a vývoj jiných jedinců v okolí, zejména pokud jsou v nejzranitelnější fázi klíčení spor nebo vývoje gametofytů a gamet. Dochází k interakcím, kdy gametofyt může působit na jiný gametofyt nebo sporofyt, stejně tak může sporofyt ovlivňovat jiný sporofyt nebo gametofyt (Petersen & Fairbrothers 1980, Wagner & Long 1991). Alelopatické chemikálie byly nalezeny například u gametofytů *Dryopteris filix-mas*, které inhibovaly klíčení a růst gametofytů *Dryopteris borreri* (Bell 1958) nebo u gametofytů *Osmunda cinnamomea*, které potlačují růst gametofytů *Dryopteris intermedia* (Petersen & Fairbrothers 1980). Bell & Klikoff (1979) objevily interakci mezi sporofytem a gametofytem. V jejich studii sporofyty *Polystichum acrosticoides*, *Polypodium vulgare* a *Onoclea sensibilis* inhibovaly růst gametofytů zkoumaných druhů kromě *Polypodium vulgare*. Další interakce mezi sporofytem a gametofytem byla pozorována u *Thelypteris normalis*, která zpomalila dělení buněk u gametofytů *Thelypteris normalis*, *Phlebodium aureum* a *Pteris longifolia* (Davidonis & Ruddat 1973). Takto ovlivnění jedinci se zpomaleným růstem anebo vývojem mají nižší šanci uspět oproti konkurentům s dobře vyvinutým gametofytem a sporofytem (Wagner & Long 1991).

## 4 Materiál a metody

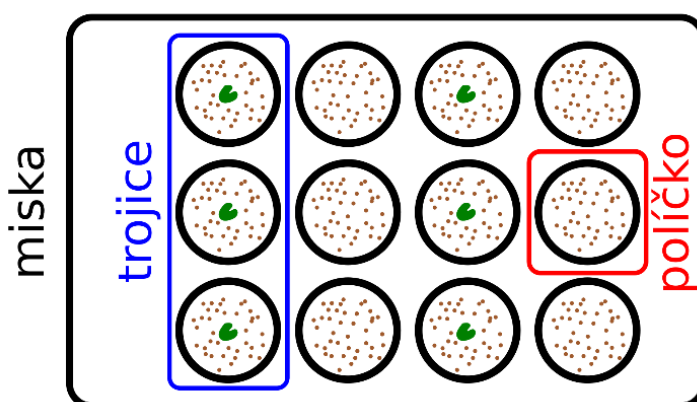
Ke kultivaci byly použity spory 12 druhů ze sedmi čeledí homosporických kapradin. Vzorokly spor byly získány sběrem, z herbářových položek nebo byly zaslány ze zahraničí ve zkumavce či v obálce (Příloha 1). Přehled druhů použitých při kultivaci jsou uvedeny v tabulce (Tab 1).

**Tab. 1:** Přehled kapradin použitých při kultivaci. Informace o sběru jsou uvedeny v Příloze 1.

Druh	Čeleď	Reakce na AG	Typ AG
<i>Anemia phyllitidis</i>	<i>Anemiaceae</i>	Známá	AGSc
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	<i>Aspleniaceae</i>	Známá	AGPo
<i>Asplenium fontatum</i>	<i>Aspleniaceae</i>	Neznámá	
<i>Asplenium onopteris</i>	<i>Aspleniaceae</i>	Neznámá	
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Aspleniaceae</i>	Neznámá	
<i>Asplenium septentrionale</i>	<i>Aspleniaceae</i>	Známá	AGPo
<i>Asplenium trichomanes</i> <i>subsp. trichomanes</i>	<i>Aspleniaceae</i>	Neznámá	
<i>Athyrium filix-femina</i>	<i>Athyriaceae</i>	Známá	AGPo
<i>Ceratopteris richardii</i>	<i>Pteridaceae</i>	Známá	AGCe
<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Dryopteridaceae</i>	Známá	AGPo
<i>Onoclea sensibilis</i>	<i>Onocleaceae</i>	Známá	AGPo
<i>Pteridium aquilinum</i>	<i>Dennstaedtiaceae</i>	Známá	AGPo

Během této práce byly vysety spory různých ovlivněných (reagujících) druhů za přítomnosti dospělých gametofytů zdrojových (ovlivňujících) druhů, které měly dost času vyloučit do prostředí svoje antheridiogeny. Postupovalo se následujícím způsobem: spory zdrojových druhů byly vysety na Petriho misky s 1% roztokem agaru a 25% MS mediem (Murashige & Skoog 1962). Misky byly uchovány v kultivačním boxu (Versatile Environmental Test Chamber MLR-352, PHC Europe B.V.) při teplotě 20°C, v režimu 12 světlo / 12 hodin tma. Na Petriho miskách byly napěstovány gametofyty. Dospělé archeconiální gametofyty byly poté přesazeny do trojice 12-políčkové misky (Obr 2) s 1% roztokem agaru a 25% MS mediem (Murashige & Skoog 1962), vedlejší trojice políček byla nechána jako kontrolní, neobsazená. Po týdnu byly vysety spory ovlivněného druhu do potenciálně ovlivněné i kontrolní trojice. Na jednu misku se tedy vešly dva páry ovlivněných + kontrolních trojic. Všechny misky byly uloženy do kultivačního boxu za stejných podmínek jako zdrojové Petriho misky.

Jednou za 14 dní byla na 12-políčkových miskách vyhodnocena přítomnost gametangií pod mikroskopem (Olympus CX 31) a to po dobu většinou 2-4 měsíců, nejméně však po následných kontrolách, kdyby byly nalezeny v rámci trojice archegonia, což značí absenci antheridiogenů v médiu. U nejistých případů bylo pozorování prováděno déle. Přítomnost gametangií byla určena pomocí 1% roztoku acetokarmínu v kyselině octové. Acetokarmín barví DNA, čímž zvýrazňuje antheridia, jelikož se jedná o útvary velikosti jedné somatické buňky, ale obsahující desítky buněk/jader. Na podložní sklíčko bylo do kapky acetokarmínového roztoku pinzetou přeneseno 10 gametofytů (vzácněji 5, pokud byl nedostatek materiálu) z každého políčka. Po dobu 30 minut se gametofyty nechaly v acetokarmínovém roztoku barvit. Poté bylo podložní sklíčko přeneseno pod mikroskop a byl určen počet asexuálních, samčích, samičích gametofytů a hermafroditů.



**Obr. 2:** Trojice s dospělým zdrojovým gametofytem a sporami ovlivněného druhu a trojice kontrolní ve 12-políčkové misce.

#### 4.1 Ověření routičkového typu

K otestování routičkového typu antheridiogenu a k ověření jeho vlivu byla kultivace prováděna se zástupci každého z třech hlavních typů antheridiogenu. Zástupci těchto typů *Anemia phyllitidis* (AGSc), *Ceratopteris richardii* (AGCe), *Pteridium aquilinum* (AGPo) a *Onoclea sensibilis* (AGPo) byly kombinovány společně s *Asplenium ruta-muraria* (Tab 2).

V rámci první části experimentu byly zdrojovými druhy *Anemia phyllitidis*, *Asplenium ruta-muraria*, *Ceratopteris richardii* a *Pteridium aquilinum*. Druhy byly párovány následovně: a) *Asplenium ruta-muraria* (zdrojový druh) byl kombinován s *Ceratopteris richardii* a *Onoclea sensibilis* (ovlivněné druhy),

b) *Anemia phyllitidis*, *Ceratopteris richardii* a *Pteridium aquilinum* (zdrojové druhy) byly kombinovány s *Asplenium ruta-muraria* (ovlivněný druh), c) jako dodatečná kontrola posloužila reakce druhů na sebe sama, s výjimkou *Pteridium aquilinum* (zdrojový druh), který byl pro účel kontroly párován s *Onoclea sensibilis* (ovlivněný druh).

**Tab. 2:** Kombinace testovaných druhů.

Druh zdrojový	Druh ovlivněný
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Ceratopteris richardii</i>
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Onoclea sensibilis</i>
<i>Anemia phyllitidis</i>	<i>Asplenium ruta-muraria</i>
<i>Ceratopteris richardii</i>	<i>Asplenium ruta-muraria</i>
<i>Pteridium aquilinum</i>	<i>Asplenium ruta-muraria</i>
<i>Anemia phyllitidis</i>	<i>Anemia phyllitidis</i>
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Asplenium ruta-muraria</i>
<i>Ceratopteris richardii</i>	<i>Ceratopteris richardii</i>
<i>Pteridium aquilinum</i>	<i>Onoclea sensibilis</i>

## 4.2 Klíčení *Asplenium ruta-muraria* ve tmě

V druhé části experimentu byl proveden test klíčivosti ve tmě na jedné 12-políčkové misce s dospělými zdrojovými gametofyty *Asplenium ruta-muraria* a ovlivněnými sporami téhož druhu (celkem dva páry ovlivněných + kontrolních dvojic). Miska byla po vysetí spor zabalena do alobalu, uschována do krabice a z 50 spor bylo určeno procento vyklíčených spor po 1 a 2 měsících pod mikroskopem. Následně byla miska kultivována na světle bez alobalu a kontrola proběhla po dalším měsíci.

## 4.3 Reakce ostatních druhů na routičkový typ

V třetí části pokusu bylo zjištěno, jaké druhy routičkový antheridiogenný typ ovlivňuje. S *Asplenium ruta-muraria* byly kombinovány především druhy fylogeneticky příbuzné, z čeledi *Aspleniaceae*, tj. *Asplenium fontanum*, *Asplenium adiantum nigrum*, *Asplenium trichomanes*, *Asplenium septentrionale*, *Asplenium onopteris*, dále *Dryopteris filix-mas* z čeledi *Dryopteridaceae* a *Athyrium filix-femina* z čeledi *Athyriaceae*.



Kombinován byl zdrojový druh *Asplenium ruta-muraria* s ovlivněnými druhy, *A. fontanum*, *A. adiantum nigrum*, *A. trichomanes*, *A. septentrionale*, *A. onopteris*, *Dryopteris filix-mas* a *Athyrium filix-femina*.

## 4.4 Vyhodnocení dat

Vyhodnocování dat probíhalo jednou za 14 dní při kontrolách pod mikroskopem (Olympus CX 31) a byl zaznamenán počet asexuálních, samčích, samičích a hermafroditických gametofytů v každém políčku z trojice. Při porovnání poměru samčích gametofytů a gametofytů s archegonií (včetně hermafroditů) v ovlivněné a kontrolní trojici byl zjištěn vývoj pohlaví v průběhu kultivace. Na základě porovnání poměru pohlaví v trojicích byla stanovena reakce u každé kombinace. Data byla vyhodnocena následovně podle reakce v ovlivněné trojici: a) druh předčasně tvoří antheridia a vyvíjí se v samce, b) druh vykazuje zrychlený vývoj a tvoří dříve archegonia, c) druh vykazuje zpomalený vývoj a tvoří archegonia později, d) druh nereaguje a v daných kontrolních týdnech se vyskytují samčí a samičí gametangia v trojici ovlivněné i kontrolní.

## 5 Výsledky

### 5.1 Ověření routičkového typu

K ověření routičkového typu byly vytvořeny dvojice se zástupci hlavních typů antheridiogenů a byla sledována jejich reakce. Jako ovlivněný druh byla místo *Pteridium aquilinum* používána *Onoclea sensibilis*, která je používaným druhem pro stanovení výskytu AGPo. Kombinace *Asplenium ruta-muraria* (zdrojový druh) a *Anemia phyllitidis* (ovlivněný druh) nebyla testována. *Asplenium ruta-muraria* nevyrostla v přítomnosti zdrojového druhu *Pteridium aquilinum*, reakci tedy nelze vyhodnotit. Přítomnost zdrojového druhu *Ceratopteris richardii* urychlila vývoj *Asplenium ruta-muraria* v samice. *Asplenium ruta-muraria* nereagovala na zdrojový druh *Anemia phyllitidis*, stejně tak nereagovala *Onoclea sensibilis* na zdrojový druh *Asplenium ruta-muraria*. Zpomalený vývoj byl zaznamenán u *Ceratopteris richardii* a *Asplenium ruta-muraria* v přítomnosti dospělého gametofytu *Asplenium ruta-muraria*. Zpomalený vývoj může být způsoben alelopatickými látkami (Tab 3).

**Tab. 3:** Přehled kombinací zdrojových a ovlivněných druhů a výsledné reakce.

Druh zdrojový	Druh ovlivněný	Reakce
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Ceratopteris richardii</i>	Zpomalený
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Onoclea sensibilis</i>	Nereaguje
<i>Anemia phyllitidis</i>	<i>Asplenium ruta-muraria</i>	Nereaguje
<i>Ceratopteris richardii</i>	<i>Asplenium ruta-muraria</i>	Zrychlený
<i>Pteridium aquilinum</i>	<i>Asplenium ruta-muraria</i>	Nevyrostlo
<i>Anemia phyllitidis</i>	<i>Anemia phyllitidis</i>	AGSc
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Asplenium ruta-muraria</i>	Zpomalený
<i>Ceratopteris richardii</i>	<i>Ceratopteris richardii</i>	Zpomalený
<i>Pteridium aquilinum</i>	<i>Onoclea sensibilis</i>	AGPo

*Asplenium ruta-muraria* (zdrojový) a *Ceratopteris richardii* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 8. týdne. Samice se objevují v ovlivněné trojici již ve 4. týdnu, v kontrole až v 6. týdnu. Výsledkem je zpomalený vývoj.

*Asplenium ruta-muraria* (zdrojový) a *Onoclea sensibilis* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 6. týdne. Během kultivace se objevilo velmi malé množství samců, téměř všechny vyhodnocené gametofyty byly samičí. *O. sensibilis* nereaguje.

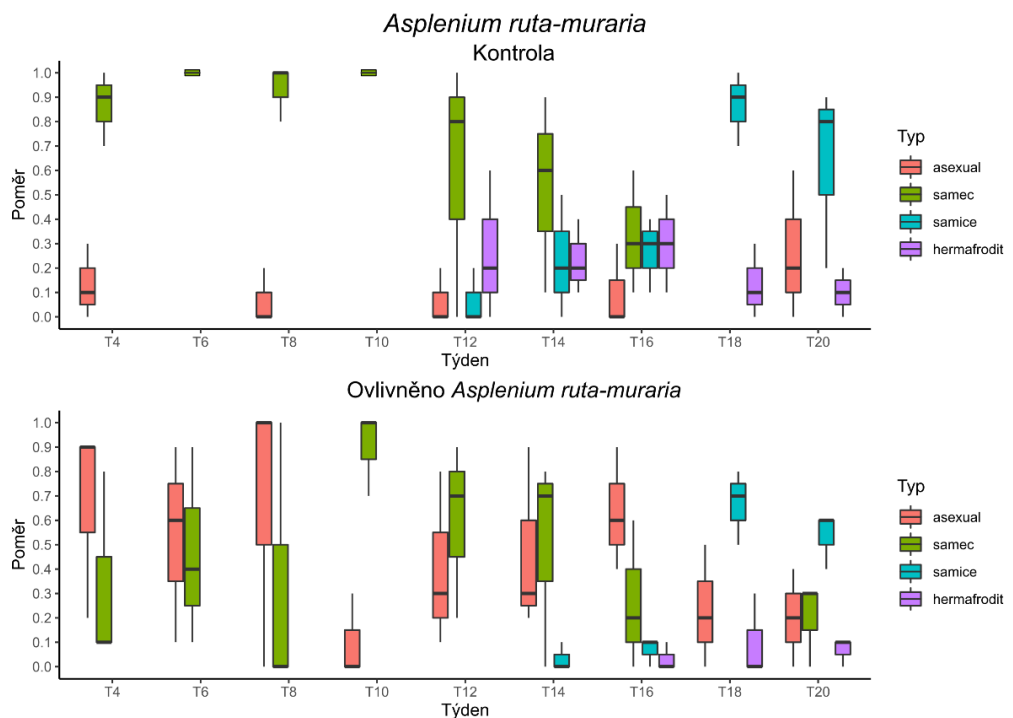
*Anemia phyllitidis* (zdrojový) a *Asplenium ruta-muraria* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 16. týdne. V kultivaci *A. ruta-muraria* se nacházely asexuální gametofyty až do 10. týdne, kdy se objevily první samci v kontrole. Při dalším pozorování se vyskytovaly samci v ovlivněné i kontrolní trojici. První samičí a hermafroditické gametofyty byly objeveny až ve 14. týdnu pozorování. *A. ruta-muraria* nereaguje.

*Ceratopteris richardii* (zdrojový) a *Asplenium ruta-muraria* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 8. do 16. týdne. V 8. týdnu byly nalezeny samčí gametangia v ovlivněné trojici, v kontrole spory neklíčily. V 10. týdnu se objevily první antheridia i v kontrole. Ve 12. týdnu se objevily první samičí gametofyty v ovlivněné trojici. V kontrole se samice objevily až 14. týden. Výsledkem je zrychlený vývoj.

*Pteridium aquilinum* (zdrojový) a *Asplenium ruta-muraria* (ovlivněný): *A. ruta-muraria* nevyrostla.

*Anemia phyllitidis* (zdrojový) a *Anemia phyllitidis* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 16. týdne. Zpočátku byly gametofyty asexuální. V 8. týdnu byla objevena první gametangia pouze v ovlivněné trojici. V 10. a 12. týdnu se v kontrole nevyskytovaly téměř žádní samci a převažovaly samice. V kontrolní trojici to bylo právě naopak. Výsledkem je přítomnost antheridiogenu.

*Asplenium ruta-muraria* (zdrojový) a *Asplenium ruta-muraria* (ovlivněný): V tomto případě byla kultivace provedena třikrát. První pozorování trvalo pouze týden, v obou trojicích se vyskytovaly samčí i samičí gametangia. *A. ruta-muraria* špatně rostlo, proto byla kultivace opakována. Při druhém pozorování, které trvalo od 4. do 20. týdne, se až do 12. týdne nacházely v kultuře pouze samčí gametofyty. Od 12. týdne se v kontrolní trojici objevily i samičí a hermafroditické gametofyty. V trojici ovlivněné byly přítomny samičí gametofyty v 16. týdnu a v 18. týdnu i hermafrodité. Při třetím opakování se v kontrolní trojici nacházely samice i hermafrodité od 10. týdne. V ovlivněné trojici byla první samice pozorována až v 16. týdnu, do té doby byly gametofyty asexuální. 18. týden bylo vyhodnocování ukončeno. Výsledkem je zpomalený vývoj (Obr 3).



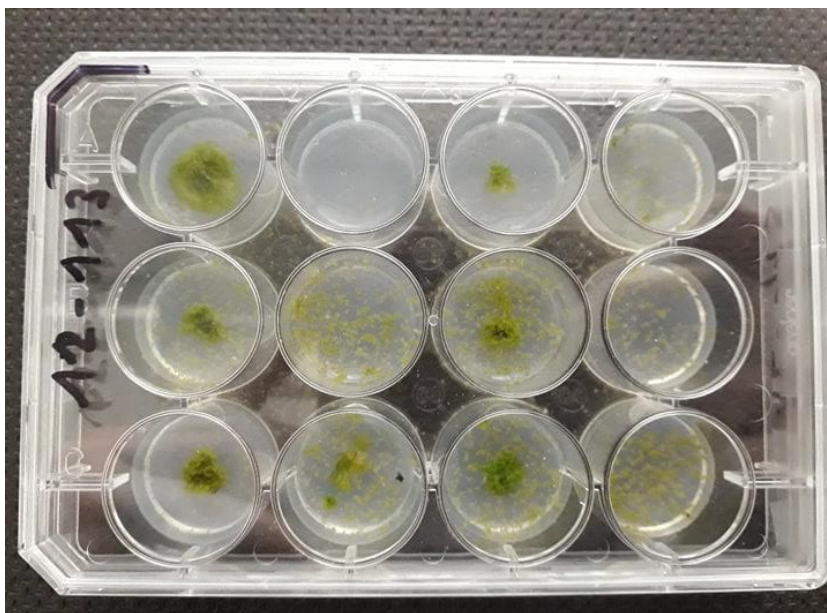
**Obr. 3:** Výsledná reakce ovlivněného druhu *A. ruta-muraria* v kombinaci se zdrojovým druhem *A. ruta-muraria*.

*Ceratopteris richardii* (zdrojový) a *Ceratopteris richardii* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 10. týdne. Již ve 4. týdnu se objevily samčí gametofyty v obou trojicích. 6. týden se v ovlivněné trojici nacházely pouze samci a v kontrole pouze samice. V 8. a 10. týdnu byli objeveni jen hermafroditické gametofyty. Výsledkem je zpomalený vývoj, není možné vyloučit, že dospělé gametofyty nevyklučovaly dostatek feromonu k ovlivnění.

*Pteridium aquilinum* (zdrojový) a *Onoclea sensibilis* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 2. do 6. týdne. První samci se objevily v kultivaci již v 2. týdnu. Ve 4. i 6. týdnu byly všechny gametofyty v ovlivněné trojici pouze samčí. V kontrolní trojici byly gametofyty samičí. Výsledkem je přítomnost antheridiogenu.

## 5.2 Klíčení *Asplenium ruta-muraria* ve tmě

Bylo testováno klíčení spor *Asplenium ruta-muraria* ve tmě, po 1 a 2 měsících byla kultivace kontrolována a klíčení spor bylo nulové. Po dalším měsíci bez alobalu na světle byla klíčivost 100%, všechny spory začaly ochotně klíčit a vytvářet zelené gametofyty, jak v trojici s dospělým gametofytem, tak v trojici kontrolní (Obr 4).



**Obr. 4:** Ilustrativní obrázek 12-políčkové misky s kultivací gametofytů *Asplenium ruta-muraria* po měsíci klíčení na světle.

### 5.3 Reakce ostatních druhů na routičkový typ

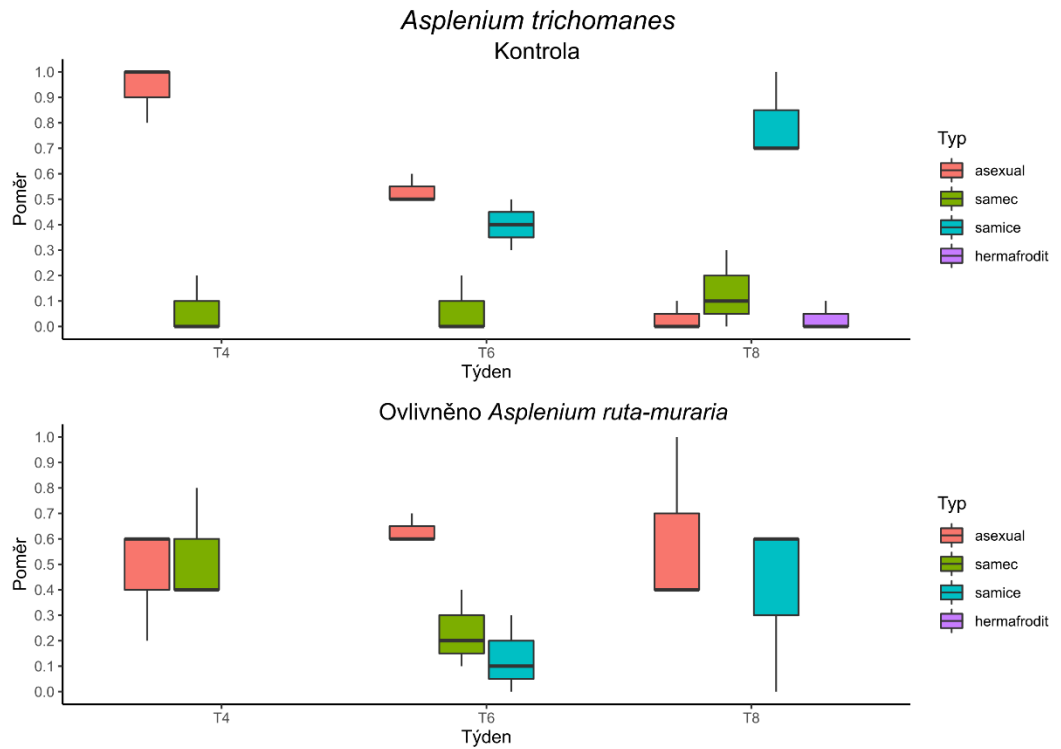
Druhy z čeledi *Aspleniaceae*, *Athyriaceae* a *Dryopteridaceae* byly kultivovány v přítomnosti dospělého gametofytu zdrojového druhu *Asplenium ruta-muraria*. Reakce byla různorodá, některé druhy nereagovaly, vykazovaly zrychlený nebo zpomalený vývoj v trojici políček s *Asplenium ruta-muraria* (Tab 4).

**Tab 4:** Přehled kombinací s *A. ruta-muraria* a výsledné reakce.

Druh zdrojový	Druh ovlivněný	Reakce
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	Zrychlený
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Asplenium fontanum</i>	Nereaguje
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Asplenium onopteris</i>	Zpomalený
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Asplenium septentrionale</i>	Zrychlený
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Asplenium trichomanes</i>	Nereaguje
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Athrium filix-femina</i>	Zpomalený
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	Zpomalený

*A. ruta-muraria* (zdrojový) a *Asplenium fontanum* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 8. týdne. Ve 4. týdnu pozorování *A. fontanum* rostlo špatně a nebyla objevena žádná gametangia. V 6. a 8. týdnu bylo nalezeno velké množství samičích gametangií v obou trojicích. *A. fontanum* nereaguje.

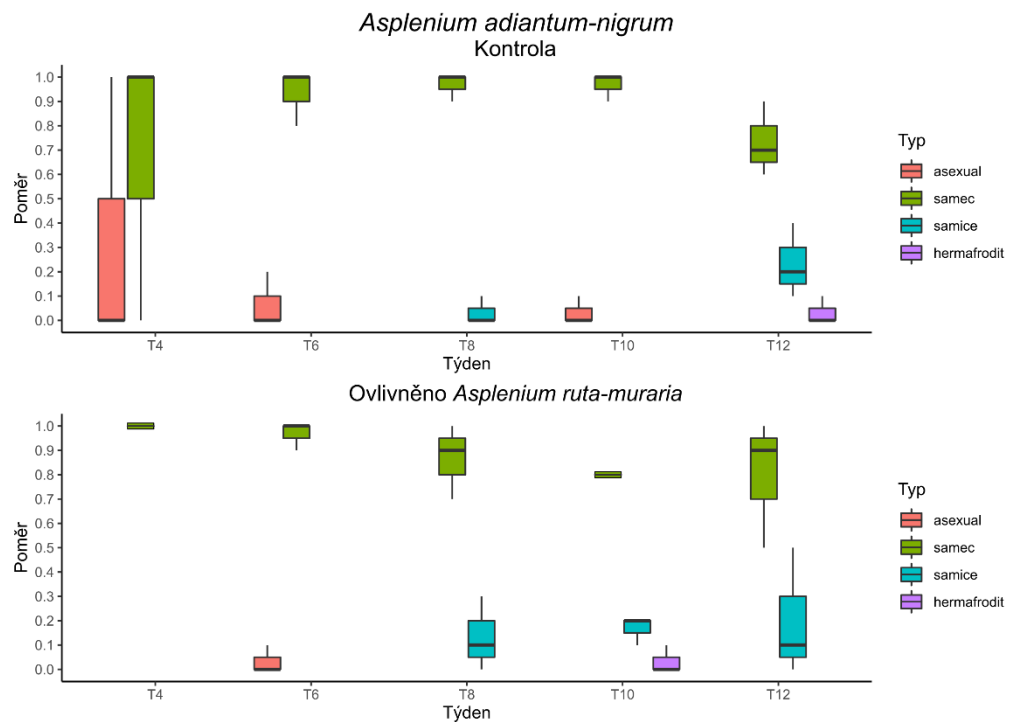
*A. ruta-muraria* (zdrojový) a *Asplenium trichomanes* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 8. týdne. 4. týden byli objeveni pouze samci, v 6. i 8. týdnu začaly převažovat samice. *A. trichomanes* nereaguje (Obr 5).



**Obr. 5:** Výsledná reakce ovlivněného druhu *A. trichomanes* v kombinaci se zdrojovým druhem *A. ruta-muraria*.

*A. ruta-muraria* (zdrojový) a *Asplenium septentrionale* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 14. týdne. Zvláštní výsledek vyšel u *A. septentrionale*, kde se v kontrolní trojici nacházeli po celou dobu vyhodnocování pouze samci. V ovlivněné trojici se objevily první samice v 8. týdnu a hermafrodité ve 12. týdnu pozorování. Výsledkem je zrychlený vývoj.

*A. ruta-muraria* (zdrojový) a *Asplenium adiantum-nigrum* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 12. týdne. Zpočátku byli objeveni pouze samci, v 8. týdnu se začaly objevovat samice v ovlivněné trojici, v kontrole až v týdnu 12. Výsledkem je zrychlený vývoj (Obr 6).



**Obř. 6:** Výsledná reakce ovlivněného druhu *A. adiantum-nigrum* v kombinaci se zdrojovým druhem *A. ruta-muraria*.

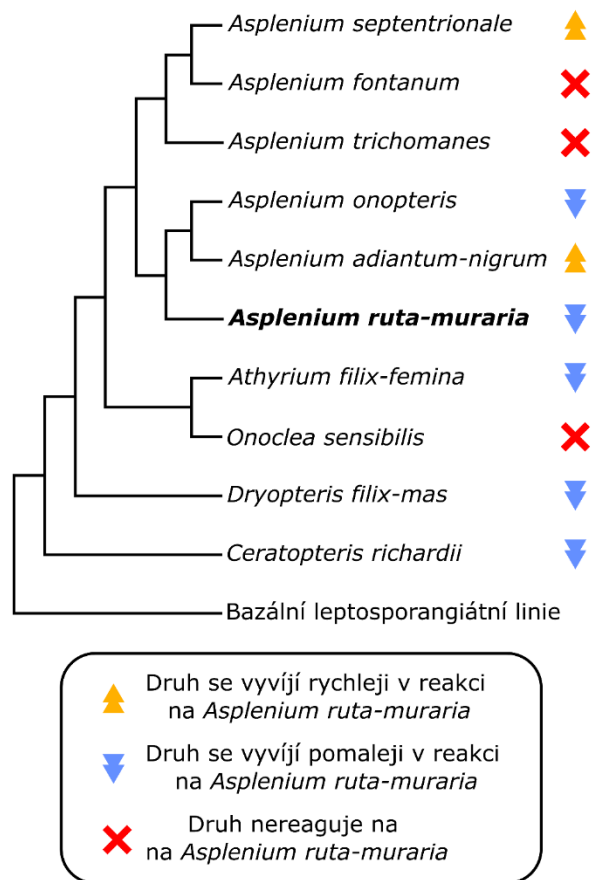
*A. ruta-muraria* (zdrojový) a *Asplenium onopteris* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 10. týdne. Zpočátku byli objeveni pouze samci, v 8. týdnu se začaly objevovat samice i hermafrodité v kontrolní trojici, v ovlivněné trojici až v týdnu 10. Výsledkem je zpomalený vývoj.

*A. ruta-muraria* (zdrojový) a *Athyrium filix-femina* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 8. týdne. Ve 4. týdnu se v kontrolní trojici objevovaly již první samice. V ovlivněné trojici až v 6. týdnu. V 8. týdnu byly pozorovány pouze samičí gametofyty v obou trojicích. Výsledkem je zpomalený vývoj.

*A. ruta-muraria* (zdrojový) a *Dryopteris filix-mas* (ovlivněný): Kultivace byla pozorována od 4. do 10. týdne. V kontrole se samice objevují ve 4. týdnu, v ovlivněné trojici v 6. týdnu. Výsledkem je zpomalený vývoj.

Na fylogenetickém stromě byla zaznamenána reakce všech taxonů kombinovaných se zdrojovým druhem *Asplenium ruta-muraria*. Místo *Pteridium aquilinum* byla použita *Onoclea sensibilis* jako zástupce antheridiogenového typu AGPo. Fylogenetický trend nebyl objeven a *A. ruta-muraria* některé druhy

neovlivňuje nebo na ně působí jiným způsobem než pomocí antheridiogenu (Obr 7).



Obr. 7: Fylogenetický strom s druhy testovanými na *Asplenium ruta-muraria*.

## 6 Diskuze

### 6.1 Routičkový typ antheridiogenu nepotvrzen

V rámci této bakalářské práce byla ověřována přítomnost antheridiogenového systému u *Asplenium ruta-muraria*, který byl popsán jedinou studií (Schneller & Hess 1995). Schneller & Hess (1995) na základě svých pozorování dospěli k závěru, že *Asplenium ruta-muraria* má vlastní typ antheridiogenu, který ovlivňuje tvorbu antheridií. V jejich experimentu byly k devět dní staré kultuře přidávány dospělé hermafroditické gametofyty nebo kousek agaru ze starší kultury. Po přemístění starších jedinců začaly mladší gametofyty po třech dnech produkovat pouze samčí gametangia. V případě kultury s přidáním kouskem agaru trvala reakce o pár dní déle a samčí gametofyty se vyskytovaly jen v několika kultivačních miskách, a to pouze v blízkosti agaru. Byl navržen



předpoklad, že v takovém případě kousek agaru obsahoval nízkou koncentraci feromonu potřebného k vyvolání reakce (Schneller & Hess 1995). Stejný výsledek v této bakalářské práci nebyl objeven a přítomnost antheridiogenu u *Asplenium ruta-muraria* se nepotvrdila. V našem případě *A. ruta-muraria* antheridiogen netvořila, odlišnost ve výsledcích může být dána rozdíly v rámci druhu jako např. u *Phlebodium aureum*, kdy nebyla jednoznačně potvrzena odpověď na antheridiogen. *Phlebodium aureum* v některých případech reagovala na AGPo (Chiou & Farrar 1997), v jiných studiích nikoli (Näf 1956, Voeller 1964). U epifytického druhu *Hemionitis palmata* byla objevena odlišnost v odpovědi na antheridiogen mezi populacemi a mezi jedinci v rámci populace, což může souviset s rozmanitostí stanoviště (Ranker 1987). Výsledky testů na antheridiogen bývají v rámci druhu konzistentní (Hornych et al. 2021), ale nemusí to tak být vždy. V bakalářské práci byl pozorován zpomalený vývoj, který může být vysvětlen působením alelopatických látek. Látky produkované staršími jedinci působí jako inhibitory růstu a snižují konkurenci ve svém okolí (Petersen & Fairbrothers 1980, Wagner & Long 1991). Takový účinek byl pozorován např. u gametofytů *Dryopteris filix-mas* (Bell 1958) nebo u sporofytů *Onoclea sensibilis* (Bell & Klikoff 1979), které zpomalovaly vývoj u jiných druhů.

Předčasná tvorba antheridií byla potvrzena u *Onoclea sensibilis*, která reaguje na antheridiogen produkovaný *Pteridium aquilinum*. *Onoclea sensibilis* spontánně netvoří antheridia a je proto používána k identifikaci antheridiogenové aktivity jako např. ve studii Chiou & Farrar (1997). Výskyt antheridiogenu byl také prokázán u *Anemia phyllitidis* předčasnou tvorbou antheridií. To se shoduje s pozorováním kultury spor a minimálně měsíc starých gametofytů *Anemia phyllitidis* (Näf 1959). Schneller & Hess (1995) použili ve své práci GA<sub>3</sub>, který přidali k *Asplenium ruta-muraria* po třech týdnech od vysetí spor. Kyselina gibberelová GA<sub>3</sub> nahrazuje působení AGSc. Některé kultury vykazovaly zvláštní růst, gametofyty byly malé a ani po 20 dnech nebyla pozorována žádná gametangia. Dospěli tak k závěru, že *Asplenium ruta-muraria* nereaguje na AGSc typ. V této bakalářské práci nebyl experiment prováděn s GA<sub>3</sub>, ale s dospělými gametofyty *Anemia phyllitidis*. První gametangia se objevila až v 10. týdnu, reakce na AGSc nebyla pozorována, stejně jako v již zmíněné studii. První objev antheridiogenu v rodu *Ceratopteris* učinil Schedlbauer & Klekowski

(1972). Rod *Ceratopteris* je skupina vodních kapradin s rychlým životním cyklem a největšími sporami z homosporických kapradin (Hickok et al. 1995). Gametofyty v jejich kultuře s *Ceratopteris thalictroides* zpočátku vytvářely hermafrodity a samce, z nichž se poté staly také hermafrodité (Schedlbauer & Klekowski 1972). V námi pěstované kultuře *Ceratopteris richardii* se v kontrole objevily také samičí gametofyty. Dospělé gametofyty v ovlivněné trojici byly pravděpodobně mrtvé a nevylučovaly antheridiogen, proto se vyskytovalo samců poměrně málo a brzy se staly všechny gametofyty hermafroditickými, jak uvádí Cheruiyot (2009) a Ganger et al. (2015). Starší hermafroditické gametofyty s dobře vyvinutým laterálním meristémem vylučují antheridiogen a tím vyvíjí a udržují tvorbu samců. Jakmile je zdroj antheridiogenu dodáván v malé dávce nebo odstraněn jsou samci přeměněni v hermafrodity a začínají produkovat vlastní antheridiogen (Cheruiyot 2009, Ganger et al. 2015). Produkce antheridiogenu je u rodu *Ceratopteris* výhodná z hlediska vyšší tvorby jednopohlavných gametofytů, hojnosti samčích gamet ve vodním prostředí a podpory křížení.

## **6.2 *Asplenium ruta-muraria* ve tmě neklíčí**

Důležitým faktorem ke klíčení výtrusů kapradin je přítomnost světla. Některé druhy jsou schopny vyklíčit i ve tmě. Ve svrchní vrstvě půdy se nachází mnoho životaschopných spor, které jsou aktivovány ke klíčení antheridiogenem. Z vyklíčených spor se stanou samci nesoucí spermatozoidy, tím zvýší pravděpodobnost outcrossingu a podpoří variabilitu v populaci (Raghavan 1989, Weinberg & Voeller 1969, Schneller 1988). Například Chiou and Farrar 1997 testovali vliv antheridiogenů na klíčení ve tmě u čeledi *Polypodiaceae*: kultivační misky byly zabaleny do alobalu, umístěny ve tmě a po měsíci rozbaleny, stejně jako v našem případě s 12-políčkovou miskou s *Asplenium ruta-muraria*. Druhy z čeledi *Polypodiaceae* klíčily ve tmě a produkovaly antheridia zejména pod vlivem *Pteridium aquilinum* (Chiou & Farrar 1997). Ke klíčení ve tmě dochází i u spor *Pteridium aquilinum*, *Dryopteris filix-mas*, *Athyrium filix-femina* a *Anemia phyllitidis*. Po přenesení na světlo se začínají tvořit zelené gametofyty (Schneller 1979, Schneller et al. 1990). Klíčení spor ve tmě je poměrně dobrým indikátorem reakce na antheridiogen, u *Asplenium ruta-muraria* ale nedošlo k vyklíčení spor ve tmě ani po dvou měsících. Spory začaly klíčit až následně na světle, což znamená, že spory byly schopné klíčit, ale nebyly ve tmě pomoci

antheridiogenů aktivované. Přesto antheridiogen není jediným faktorem ovlivňujícím klíčení ve tmě, některé druhy mohou vyklíčit i bez něj, např. *Pteridium aquilinum* spontánně vyklíčí ve tmě i bez přítomnosti feromonu (Weinberg & Voeller 1969), proto je důležitá kontrola.

### **6.3 *Asplenium ruta-muraria* alelopaticky ovlivňuje některé druhy**

V bakalářské práci bylo testováno sedm druhů ze tří čeledí, které byly kombinovány s druhem bazických skal *Asplenium ruta-muraria*. *A. trichomanes* obývá podobná stanoviště a v početných populacích se může vyskytovat i společně s *A. ruta-muraria* (Pangua et al. 2003). V kultuře nebyla pozorována žádná reakce *A. trichomanes* na starší gametofyty *A. ruta-muraria*. Ve studii (Döpp 1959) se neprojevila žádná reakce *A. trichomanes* ani na AGPo. V bakalářské práci nereagovalo ani *A. fontanum*, který zpočátku v kultivaci špatně rostl. *Dryopteris filix-mas* a *Athyrium filix-femina* byly dalšími zkoumanými druhy v této práci. Je známo, že v těchto druzích indukuje tvorbu antheridií i temné klíčení spor antheridiogen AGPo, objevený poprvé u *Pteridium aquilinum* (Döpp 1950). Oba druhy reagují na jedince stejného druhu a mohou se ovlivňovat navzájem (Schneller 1979, 1988). To je důkaz, že antheridiogen může ovlivňovat i druhy z jiných čeledí. *Athyrium filix-femina* i *Dryopteris filix-mas* reagovali na dospělé gametofyty *Asplenium ruta-muraria* zpomaleným vývojem, což může být důsledek alelopatických látek vylučovaných dospělými jedinci. Zpomalený vývoj v ovlivněných trojicích byl pozorován také u *A. onopteris*. Naopak zrychlený vývoj v samice u *A. adiantum-nigrum* a *A. septentrionale* byl překvapující. Zejména výsledek u *A. septentrionale*, kdy v průběhu kultivace byly v kontrolní trojici pouze samci a ani jednou samičí gametofyty, může být dílem náhody.

Podle současné studie používá antheridiogeny celkem 64,5 % z 208 zkoumaných druhů (Hornych et al. 2021). Stále neznámá zůstává chemická struktura některých typů antheridiogenů. Několik studií naznačuje podobnost s gibereliny, které mohou nahradit antheridiogen a vyvolat klíčení ve tmě (Yamane 1998, Nář et al. 1975, Attalah & Banks 2015). Kromě chemické struktury antheridiogenů je třeba věnovat více pozornosti i alelopatickým látkám při dalších studiích.

## 7 Závěr

1. Kultivací byla zjištěna přítomnost antheridiogenového systému u *Anemia phyllitidis*, *Ceratopteris richardii* a *Pteridium aquilinum*. Porovnáním s hlavními typy antheridiogenů bylo zjištěno, že námi testovaný *Asplenium ruta-muraria* nemá vlastní antheridiogen, výsledky se ale liší v rámci druhu. Nedošlo k ovlivnění mladších gametofytů a časnější tvorbě antheridií. Reakce mladých gametofytů *Asplenium ruta-muraria* na dospělce vlastního druhu je jiná než u zavedených typů antheridiogenů. *Asplenium ruta-muraria* v kultivaci vlastního druhu reagovala zpomaleným vývojem v samice. Zpomalený vývoj by mohl být vysvětlen alelopatickými látkami, které dospělí jedinci druhu vylučují.

2. Vyvolat klíčení spor ve tmě je jednou ze schopností antheridiogenu. Spory *Asplenium ruta-muraria* po nevyklíčily ve tmě ani po dvou měsících. Umístěním kultivační misky na světlo začaly spory klíčit v zelené gametofyty. Tím se potvrdilo, že námi testovaná *A. ruta-muraria* antheridiogeny netvoří.

3. Druhy z čeledi *Aspleniaceae*, *Dryopteridaceae* a *Athyriaceae* vykazují odlišné reakce v přítomnosti ovlivňujícího gametofytu *Asplenium ruta-muraria*. Druhy byly označeny jako nereagující neboli necitlivé na routičkový typ antheridiogenu, některé druhy vykazují zpomalený nebo zrychlený vývoj gametangií v přítomnosti ovlivňujícího gametofytu. Na základě vytvořeného fylogenetického stromu není zřejmý žádný trend vývoje. Nelze vyloučit, že část výsledků způsobily náhodné vlivy.

## 8 Seznam použitých zdrojů

Andersson-Kottö I. (1929): A genetical investigation in *Scolopendrium vulgare*. - *Hereditas* 12: 109-178.

Atallah N. M. & Banks J. A. (2015): Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes. - *Frontiers in Plant Science* 6: 1-6.

Atkinson L. R. & Stokey A. G. (1964): Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. - *Phytomorphology* 14: 51-70.

Bell P. R. (1958): Variations in the germination-rate and development of fern spores in culture. - *Annals of Botany* 22: 503-511.

- Bell S. & Klikoff L. G. (1979): Allelopathic and autopathic relationships among the ferns *Polystichum acrostichoides*, *Polypodium vulgare*, and *Onoclea sensibilis*. - American Midland Naturalist 102: 168-171.
- Campbell D. H. (1892): On the prothallium and embryo of *Osmunda claytoniana* L. and *O. cinnamomea* L. - Annals of Botany 6: 49-94.
- Cheruiyot D. J. & Schwartz B. W. (2007): Conversion of male gametophytes to hermaphrodites in the fern *Ceratopteris richardii*. - BIOS 78: 58-61.
- Chiou W.-L. & Farrar D. R. (1997): Antheridiogen production and response in Polypodiaceae species. - American Journal of Botany J Bot 84: 633-640.
- Corey E. J., Myers A. G., Takahashi N., Yamane H. & Schraudolf H. (1986): Constitution of antheridium-inducing factor of *Anemia phyllitidis*. - Tetrahedron Letters 27: 5083-5084.
- Davidonis G. H. & Ruddat M. (1973): Allelopathic compounds, thelypterin A and B in the fern *Thelypteris normalis*. - Planta 111: 23-32.
- DeSoto L., Quintanilla L. G. & Méndez M. (2008): Environmental sex determination in ferns: effects of nutrient availability and individual density in *Woodwardia radicans*. - Journal of Ecology 96: 1319-1327.
- Döpp W. (1950): Eine die Antheridienbildung bei Farnen fördernde Substanz in den Prothallien von *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. - Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 63: 139-147.
- Döpp W. (1959): Über eine hemmende und eine fördernde Substanz bei der Antheridienbildung in den Prothallien von *Pteridium aquilinum*. - Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 72: 11-24.
- Döpp W. (1962): Weitere Untersuchungen über die Physiologie der Antheridienbildung bei *Pteridium aquilinum*. - Planta 58: 483-508.
- Fernández H. & Revilla M. A. (2003): In vitro culture of ornamental ferns. - Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 1-13.
- Ganger M. T., Girouard J. A., Smith H. M., Bahny B. A., & Ewing S. J. (2015): Antheridiogen and abscisic acid affect conversion and *ANII* expression in *Ceratopteris richardii* gametophytes. - Botany 93: 109-116.

- Grusz A. L. (2016): A current perspective on apomixis in ferns. - *Journal of Systematics and Evolution* 54: 656-665.
- Hamilton R. G. (1989): Too many thoughts, too few observations? - *Evolutionary Trends in Plants* 3: 7-8.
- Hamilton R. G. & Lloyd R. M. (1991): Antheridiogen in the wild: The development of fern gametophyte communities. - *Functional Ecology* 5: 804-809.
- Haufler C. H. (2002): Homospory 2002: An odyssey of progress in pteridophyte genetics and evolutionary biology. - *BioScience* 52: 1081-1093.
- Haufler C. H. & Welling C. B. (1994): Antheridiogen, dark spore germination, and outcrossing mechanisms in *Bommeria* (Adiantaceae). - *American Journal of Botany* 81: 616-621.
- Haufler C. H., Pryer K. M., Schuettpelz E., Sessa E. B., Farrar D. R., Moran R., Schneller J. J., Watkins J. E., & Windham M. D. (2016): Sex and the single gametophyte: revising the homosporous vascular plant life cycle in light of contemporary research. - *BioScience* 66: 928-937.
- Hickok L. G., Warne T. R., & Fribourg R. S. (1995): The biology of the fern *Ceratopteris* and its use as a model system. - *International Journal of Plant Sciences* 156: 332-345.
- Hornych O. (2020): Reproduction and hybridization in ferns. České Budějovice. Disertace. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- Hornych O., Testo W. L., Sessa E. B., Watkins J. E., Company C. E., Pittermann J., & Ekrt L. (2021): Insights into the evolutionary history and widespread occurrence of antheridiogen systems in ferns. - *New Phytologist* 229: 607-619.
- Huang Y.-M., Chiou H.-M., & Chiou W.-L. (2004): Density affects gametophyte growth and sexual expression of *Osmunda cinnamomea* (Osmundaceae: Pteridophyta). - *Annals of Botany* 94: 229-232.
- Klekowski E. J. (1969): Reproductive biology of the Pteridophyta. II. Theoretical considerations. - *Botanical Journal of the Linnean Society* 62: 347-359.

- Klekowski E. J. (1973): Sexual and subsexual systems in homosporous pteridophytes: A new hypothesis. - *American Journal of Botany* 60: 535-544.
- Klekowski E. J., Jr. & Lloyd R. M. (1968): Reproductive biology of the Pteridophyta I. General considerations and a study of *Onoclea sensibilis* L. - *Botanical Journal of the Linnean Society* 60: 315-324.
- Korpelainen H. (1994): Growth, sex determination and reproduction of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott gametophytes under varying nutritional conditions. - *Botanical Journal of the Linnean Society* 114: 357-366.
- Korpelainen H. (1996): Intragametophytic selfing does not reduce reproduction in *Dryopteris filix-mas*. - *Sex Plant Reproduction* 9: 117-122.
- Liu H.-M., Dyer R. J., Guo Z.-Y., Meng Z., Li J.-H., & Schneider H. (2012): The evolutionary dynamics of apomixis in ferns: A case study from Polystichoid ferns. - *Journal of Botany* 2012: 1-11.
- Mehltreter K., Walker L. R., & Sharpe J. (Eds). (2010): *Fern ecology*. - Cambridge University Press, Cambridge; New York.
- Miller J. H. (1968): Fern gametophytes as experimental material. - *Botanical Review* 34: 361-440.
- Murashige T & Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. - *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Näf U. (1956): The demonstration of a factor concerned with the initiation of antheridia in polypodiaceous ferns. - *Growth* 20: 91-105.
- Näf U. (1959): Control of antheridium formation in the fern species *Anemia phyllitidis*. - *Nature* 184: 798-800.
- Näf U. (1966): On dark-germination and antheridium formation in *Anemia phyllitidis*. - *Physiologia Plantarum* 19: 1079-1088.
- Näf U., Nakanishi K., & Endo M. (1975): On the physiology and chemistry of fern antheridiogens. - *Botanical Review* 41: 315-359.
- Pangua E., Quintanilla L. G., Sancho A., & Pajarón S. (2003): A comparative study of the gametophytic generation in the *Polystichum aculeatum* group (Pteridophyta). - *International Journal of Plant Sciences* 164: 295-303.

- Petersen R. L. & Fairbrothers D. E. (1980): Reciprocal allelopathy between the gametophytes of *Osmunda cinnamomea* and *Dryopteris intermedia*. - American Fern Journal 70: 73-78.
- PPG I. (2016): A community-derived classification for extant lycopods and ferns. - Journal of Systematics and Evolution 54: 563-603.
- Pringle R. B. (1961): Chemical nature of antheridiogen-A, a specific inducer of male sex organ in certain fern species. - Science 133: 284.
- Raghavan V. (1989): Developmental biology of fern gametophytes. - Cambridge University Press, Cambridge; New York.
- Ranker T. A. (1987): Experimental systematics and population biology of the fern genera *Hemionitis* and *Gymnopteris* with reference to *Bommeria*. Ph.D. dissertation, University of Kansas, Lawrence.
- Ranker T. A. & Haufler C. H. (2008): Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes. - Cambridge University Press, Cambridge; New York.
- Sessa E. B., Testo W. L., & Watkins J. E. (2016): On the widespread capacity for, and functional significance of, extreme inbreeding in ferns. - New Phytologist 211: 1108-1119.
- Schedlbauer M. D. & Klekowski E. J. (1972): Antheridogen activity in the fern *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. - Botanical Journal of the Linnean Society 65: 399-413.
- Schneller J. J. (1979): Biosystematic investigations on the lady fern (*Athyrium filix-femina*). - Plant Systematics and Evolution 132: 255-277.
- Schneller J. J. (1988): Spore bank, dark germination and gender determination in *Athyrium* and *Dryopteris*: results and implications for population biology of Pteridophyta. - Botanica Helvetica 98: 77-86.
- Schneller J. J., Haufler C. H. & Ranker T. A. (1990): Antheridiogen and natural gametophyte populations. - American Fern Journal 80: 143-152.
- Schneller J. J. & Hess A. (1995): Antheridiogen system in the fern *Asplenium ruta-muraria* (Aspleniaceae; Pteridophyta). - Fern Gazette 15: 64-70.



- Schraudolf H. (1962): Die Wirkung von Phytohormonen auf Keimung und Entwicklung von Farnprothallien. I. Auslösung der Antheridienbildung und Dunkelkeimung bei Schizaeaceen durch Gibberellinsäure. - Biologisches Zentralblatt 6: 731-740.
- Scott R. J. & Hickok L. G. (1987): Genetic analysis of antheridiogen sensitivity in *Ceratopteris richardii*. - American Journal of Botany 74: 1872-1877.
- Stokey A. G. (1942): Gametophytes of *Marattia sambucina* and *Macroglossum smithii*. - Botanical Gazette 103: 559-569.
- Stokey A. G. (1951): The contribution of the gametophyte to classification of the homosporous fern. - Phytomorphology 1: 39-58.
- Stokey A. G. & Atkinson L. R. (1956): The gametophyte of the *Osmudaceae*. - Phytomorphology 6: 19-40.
- Takeno K. & Furuya M. (1975): Bioassay of antheridiogen in *Lygodium japonicum*. - Development, Growth and Differentiation 17: 9-18.
- Takeno K. & Furuya M. (1987): Sporophyte formation in experimentally-induced unisexual female and bisexual gametophytes of *Lygodium japonicum*. - Botanical Magazine Tokyo 100: 37-41.
- Testo W. L., Watkins J. E., & Barrington D. S. (2015): Dynamics of asymmetrical hybridization in North American wood ferns: reconciling patterns of inheritance with gametophyte reproductive biology. - New Phytologist 206: 785-795.
- Twiss E. M. (1910): The prothallia of *Anemia* and *Lygodium*. - Botanical Gazette 49: 168-181.
- Voeller B. R. (1964): Antheridiogens in ferns. - In *Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale*. Gif-sur-Yvette, Paris, France: 665-684.
- Wagner H. B. & Long K. E. (1991): Allelopathic effects of *Osmunda cinnamomea* on three species of *Dryopteris*. - American Fern Journal 81: 134-138.
- Ward M. (1954): Fertilization in *Phlebodium aureum*. J. Sm. - Phytomorphology 4: 1-17.

Weinberg E. & Voeller B. (1969): External Factors Inducing Germination of Fern Spores. - *American Fern Journal* 59: 153-167.

Willson M. F. (1981): Sex expression in fern gametophytes: Some evolutionary possibilities. - *Journal of Theoretical Biology* 93: 403-409.

Yamane H. (1998): Fern antheridiogens. - In *International Review of Cytology* 184: 1-32.

## 9 Přílohy

**Příloha 1:** Souhrnný přehled všech vzorků použitých v bakalářské práci včetně místa sběru nebo zaslání spor.

Species	Locality/Source	GPS coord	Coll. date	Collector	Voucher	Note
<i>Anemia phyllitidis</i>	Spore Exchange of AFS		2019-09	Aikins, B.		
<i>Asplenium ruta-muraria</i>	CZE: Kutná Hora, wall in town	49°56'45.299"N, 15°15'22.268"E	2020-08-03	Hornych, O.	CBFS 9708	
<i>Asplenium fontanum</i>	CZE: Hrádek u Znojma, obvodová zeď komplexu rotundy sv. Oldřicha a kostela sv. Petra a Pavla při JZ okraji obce	48°46'18.000"N, 16°16'2.000"E	2019-09-22	Ekrt, L.	herb. L. Ekrt 7116; CBFS 9713	FerDa: 542; field ID. 19-74; duplikát v MJ; celkem ca 78 různověkých trsů
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i>	ESP: Deba, along forest path in forest ca 2.1 km ENE of the church in the Deba town	43°17'45.000"N, 2°19'38.000"W	2019-06-23	Ekrt, L.	herb. L. Ekrt 7275	FerDa: 503; spores well developed of tetraploid size ca 40 um
<i>Asplenium trichomanes</i> subsp. <i>trichomanes</i>	CZE: Dolní Třebonín, rocky outcrop in the Vltava valley	48°52'25.705"N, 14°21'53.816"E	2020-07-29	Hornych, O.; Černochová, L.	CBFS 9711	ploidy: 2x (spores)
<i>Asplenium septentrionale</i>	CZE: Kutná Hora, rocky outcrop in Vrchlice valley	49°56'9.872"N, 15°15'41.690"E	2020-08-01	Hornych, O.	CBFS	
<i>Asplenium onopteris</i>	GRC: Island of Scopelos, Glossa, slope above road ca 1,5 km ENE of the town centrum	39°10'45,1"N, 023°38'07,1"E	2019-08-16	Vejvodová, K.	herb. L. Ekrt 7127; CBFS 9712	fiel ID 1K
<i>Athyrium filix-femina</i>	CZE: Hlavňov, okolí jeskyně Kovárna, ca 420 m JZZ od vrcholu Supí hnízdo (702 m)	50°33'45.292"N, 16°16'14.089"E	2010	Ekrt, L.	CBFS 9709	CZE: Telč, in garden cult. 23
<i>Ceratopteris richardii</i>	Carolina Biological Supplied Company		Ordered 2020-05			

<i>Dryopteris filix-mas</i>	CZE: Stožec, v rezervaci Stožec asi 750 m V od vrcholu kopce Stožec	48°52'0.000"N, 13°49'0.000"E	2005	Ekrt, L.	herb. L. Ekrt 3859; CBFS 9710	CZE: Telč, in garden cult. 27; spočítány chromozómy (2n=164) - V. Jarolímová v r. 2007
<i>Onoclea sensibilis</i>	CZE: Hejnice, Ferdinandov: ca 570 m SZ od rozcestí Ferdinandov, okraj lesní cesty na kraji obce, u arboreta	50°52'9.137"N, 15°9'57.240"E	2020-07-05	Vejvodová, K.	CBFS 8998	
<i>Pteridium aquilinum</i>	CZE: Sykovec	49°36'24.5"N, 16°2'9.4"E	2020-09	Hornych, O.		