

Vyřešení poslední biosystematické záhady u kapradin? Příběh z evoluce rodu puchýřník

Význačný anglický pteridolog John D. Lovis označil agregát druhů kolem puchýřníku křehkého (*Cystopteris fragilis*) za pravděpodobně „nejhroživější biosystematický problém u kapradin“. I přesto, že tento výrok zazněl před více než 40 lety a mezitím byla využita řada moderních metodických přístupů k této skupině (jako průtoková cytometrie nebo molekulární analýzy), můžeme říct, že je toto tvrzení stále platné v rámci temperátních kapradin. Nové poznatky nám však ukázaly spoustu dosud neznámých aspektů, a jak to i často bývá, kolik toho ještě nevíme. Dodnes se pozornost na celý rod puchýřník (a zejména p. křehký) soustředila hlavně na území Severní Ameriky, kde se detailněji zabývali rekonstrukcí příbuzenských vztahů mezi jednotlivými druhy a odhalili nesmírně složitou polyploidní evoluční historii. Co je v pozadí „nejhroživějšího“ kapradinového hlavolamu, se pokoušíme zjistit i u nás v Evropě. V následujícím článku proto shrneme dosavadní znalosti o puchýřnících, jejich evoluci a aktuální pokroky ve studiu, které částečně pomohly objasnit poslední záhadu v pteridologickém výzkumu, a přiblížíme tuto téměř všudypřítomnou, ale na druhou stranu botanicky unikátní kapradinu.

Fylogeneze rodu *Cystopteris*

Puchýřník je rod izosporických kapradin (produkujících výtrusy nerozlišené velikosti podle pohlaví), kterému je dnes vyhrazena samostatná čeleď puchýřníkovité (*Cystopteridaceae*). Kromě rodu puchýřník do této čeledi řadíme převážně asijské rody *Acystopteris* (rozšířen v tropické a temperátní jihovýchodní a východní Asii), *Cystoathyrium* (jediný druh *C. chinense* popsán v r. 1963 v Číně) a v Evropě běžný bukovník (*Gymnocarpium*).

Fylogeneze rodu puchýřník je rozdělena do pěti podpořných vývojových větví.

První patří okruhu puchýřníku horského (*C. montana*), který stojí na fylogenetickém stromě odděleně od zbytku rodu. Druhá vývojová větev je věnována puchýřníku sudetskému (*C. sudetica*, obr. 1). Tento vzácný druh má sice široký eurasijský areál, pro vědu byl však popsán z Hrubého Jeseníku z okolí hory Praděd v r. 1855. V současnosti se na našem území stále vyskytuje. V dřívější době byl udáván jako nezcitlivý, později jako vyhynulý a v r. 2011 byl znovuobjeven na jedné lokalitě v Hrubém Jeseníku (Martin Kočí; Hadinec a Lustyk 2012). Tyto dvě izolované linie puchýřní-

ků jsou unikátní i morfologicky, kdy tvoří plazivý oddenek (rhizom) s jednotlivými listy, nikoli listovou růžicí jako ostatní skupiny, proto je někteří autoři řadí do samostatného rodu *Rhizomatopteris*. Třetí větev patří okruhu puchýřníku cibulkatého (*C. bulbifera*), jehož zástupci se vyskytují především v Severní Americe. Právě jim byla do současné doby věnována největší pozornost. I s puchýřníkem cibulkatým se můžeme na území České republiky potkat, neboť byl zavlečen do Českého krasu. Poznáme ho velmi snadno podle charakteristických pacibulek vyrůstajících na listech, díky nimž se může rozmnožovat vegetativně. Z této skupiny byl později vyřazen *C. protrusa* a stojí dnes jako sesterský k celému komplexu p. křehkého.

Poslední, avšak taxonomicky nejkomplikovanější skupinou je agregát, tedy komplex příbuzných druhů (za jehož druhové jméno píšeme zkratku agg.), puchýřník křehký (*C. fragilis* agg.). Ten se může pyšnit kosmopolitním rozšířením, setkáme se s ním na 6 kontinentech (chybí na Antarktidě). Výjimečný geografický výskyt této skupiny je umocněn skutečností, že puchýřník křehký najdeme v nejšířším rozsahu zeměpisné délky mezi všemi kapradinami na světě vůbec. Roste tedy unikátně jak v nejsevernějších subarktických oblastech, tak v nejnižnějších subantarktických oblastech. Určujícími hnacími motory evoluce jsou u *C. fragilis* agg. polyploidie v kombinaci s hybridizací (tzv. allopolyploidní speciace). Vztahy uvnitř agregátu jsou komplikované, obsahuje mnoho druhů a poddruhů lišících se počtem sad chromozomů v buňce, tedy ploidní úrovní – od diploidů (dvě sady) až po oktoploidy (8 sad; počty chromozomů jednotlivých ploidií uvádí tab. 1 a jejich ploidie byla zjištěna pomocí průtokové cytometrie, viz obr. 2). Zajímavé je, že diploidní puchýřník (např. *C. protrusa*) je záležitostí Severní Ameriky a v Evropě nebyl ani v rozsáhlém vzorku asi 6 tisíc jedinců v rámci intenzivního cytogeografického průzkumu (geografické struktury polyploidizace, obr. 3) nalezen. Puchýřník křehký v úzkém pojetí tak představuje kapradinu, která diverzifikovala na tetraploidní úrovni, a to umlčením přebytečných genů (genový silencing), čímž se z něj postupně stal opět funkční diploid. Recentní molekulární studie Carla J. Rothfelse z Kalifornské univerzity potvrdila řadu linií, jež jsou různě izolované, liší se ploidní úrovní (několik diploidních a minimálně pět tetraploidních linií) a jejich speciace probíhá odděleně. Výsledky mimo jiné ukázaly na širokou škálu nerozlišovaných typů (až 9 dosud neznámých diploidních linií), které nebyly do současné doby taxonomicky zhodnoceny.

Na území Evropy se v literatuře tradičně udávají čtyři druhy (spíše mikrospeciace – kvůli velmi nepatrným až nepostřehnutelným rozdílům v morfologických znacích). Nejběžnější a kosmopolitně rozšířený je puchýřník křehký (obr. 4), jedna z mála



1

1 Puchýřník sudetský (*Cystopteris sudetica*) byl pro vědu popsán v r. 1855 z Hrubého Jeseníku a v tomto pohorí znovuobjeven r. 2011, mnohem běžnější je ale na Slovensku. Lokalita Velký Kysel, Slovenský ráj. Foto T. Urfus

kapradin mající ostnitě perisporium – obal okolo výtrusu neboli spory (obr. 7a). Dvěma rozdíly (viz dále) se od p. křehkého liší puchýřník hladký (*C. dickieana*, obr. 5). Ve velkých nadmořských výškách je běžným zástupcem puchýřníků vápencový (*C. alpina*, obr. na 2. str. obálky). Posledním a pro nás trochu exoticky vyhlížejícím je puchýřník prosvítavý (*C. diaphana*).

Puchýřník hladký – samostatný druh, nebo mikrospecie v rámci p. křehkého?

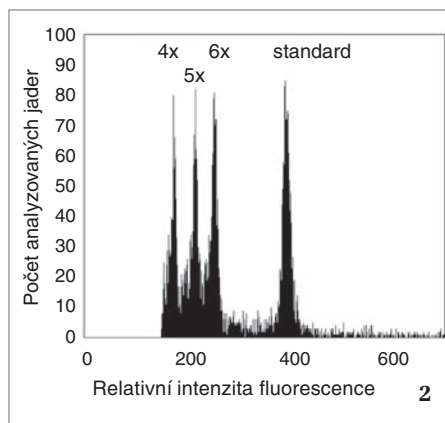
Puchýřník hladký byl poprvé popsán ze Skotska v r. 1848 na základě odlišné architektury jednotlivých lístků na listu a povrchu výtrusů. Tamní populace na velmi specifické typové lokalitě (místa, odkud byl druh pro vědu popsán), kterou je ústí mořské jeskyně u města Aberdeen (obr. 5 a 6), totiž mají vzájemně se překrývající, tupě zaoblené lístky, zatímco puchýřník křehký má lístky na konci tupé nebo zašpičatělé a vzájemně se nepřekrývající. Ale hlavní znak oddělující tyto dva druhy od sebe je patrný i v samotném názvu puchýřníku hladkého – jeho výtrusy nemají ostnitě výrůstky, jako má p. křehký (obr. 7a), ale jsou bradavičnaté (obr. 7b).

Od doby jeho popsání probíhají debaty, jestli si zaslouží status samostatného druhu, nebo jde o varietu či poddruh v rámci p. křehkého. Jedním ze silných argumentů proti uznání samostatného druhu je námitka k rozlišovacímu znaku na listech, neboť podobných tvarů je při své velké morfoloogické variabilitě schopen také p. křehký. Druhý znak na povrchu výtrusů není o nic spolehlivější, protože byly vzácně nalezeny populace p. křehkého mající bradavičnaté výtrusy. Problematika se dále prohlubuje tím, že listem morfoloogicky odlišní jedinci p. hladkého se vyskytují pouze na typové lokalitě ve Skotsku a v jejím blízkém okolí, což je pravděpodobně dáno specifickým mikroklimatem dané lokality. Co se týče jejich ploidní úrovně, rostliny jsou tetraploidní (mají čtyři sady chromozomů) stejně jako p. hladký ze Severní Ameriky, kde byly vzácně dokumentovány rostliny hexaploidní (se 6 sadami).

První molekulární studie postavená na izozymech, která využívá rozdílů mezi druhy v zastoupení enzymů v buňce, samostatnost p. hladkého nepotvrdila. Nevýhodou této studie však bylo použití jedinců lišících se pouze charakterem povrchu výtrusů, nikoli jedinců pocházejících z typové lokality. Když byly do analýz zahrnuty rostliny z typové lokality, výsledek dopadl úplně stejně jako v případě první práce. Také naše studie využívající pokročilejší molekulární metodu (analýzu variability v chloroplastové DNA) přišla s podobným výsledkem, a není proto nutno zachovávat puchýřníku hladkému status samostatného druhu.

Exotika v Evropě – puchýřníky vápencový a prosvítavý

Na území Evropy se vyskytují dva puchýřníky se specifickým typem rozšíření. Puchýřník vápencový roste ve velkých nadmořských výškách pohoří Evropy a Malé Asie. Sice byl dříve popisován jako poddruh nebo varieta p. křehkého, ale liší se od něj na první pohled velmi jemně členěnými listy, třikrát až čtyřikrát zpeřenými,



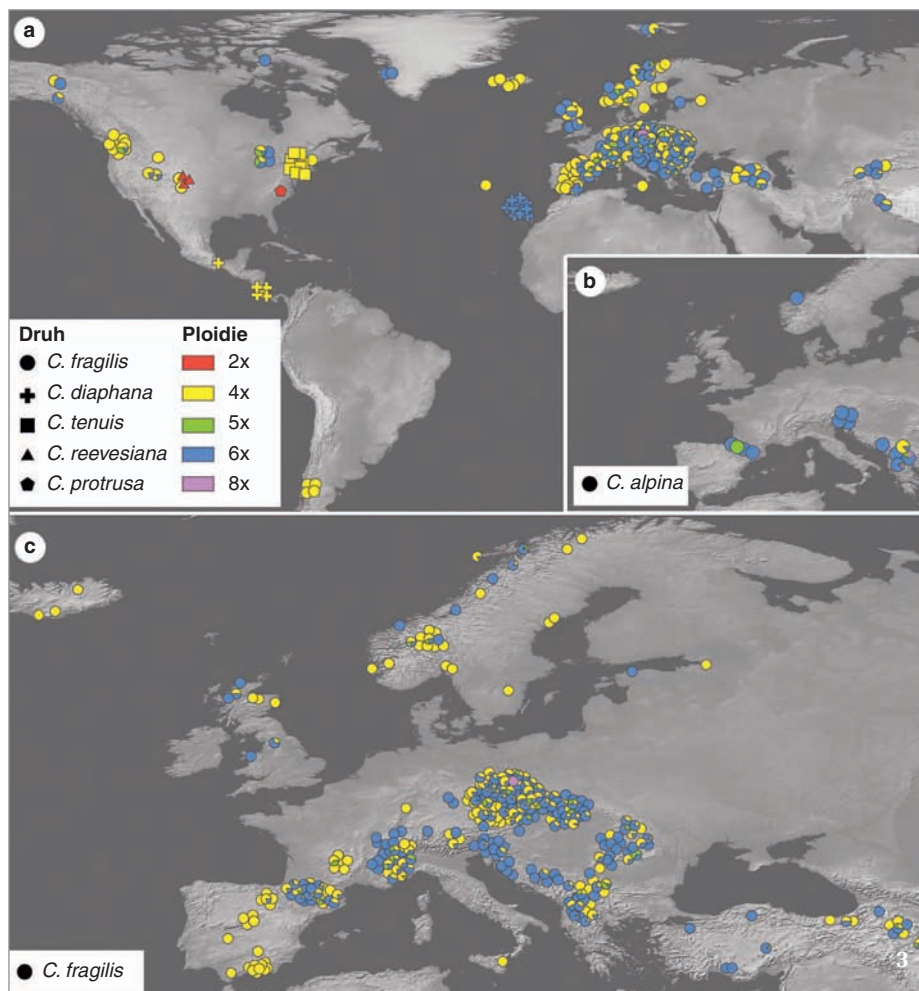
takže vypadají jako „petržel“. Druhý znak, který mají společný s puchýřníkem prosvítavým, je zakončení žilek na listech v zářezu mezi jednotlivými zuby lístku – tento znak odlišuje oba druhy od p. křehkého, kterému končí žilky na špičce lístku. Úplně posledním znakem jsou krátké

a tupé ostny na výtrusech. Dosud se ve všech evropských květenách uváděl hexaploidní cytotyp, zatímco studie Kristýny Hanušové a kol. (2019) potvrdila tetraploidní, pentaploidní a oktoploidní rostliny pocházející z Makedonie (viz tab. 1).

Druhým exotickým zástupcem je puchýřník prosvítavý, s hlavním rozšířením v tropickém pásu Starého a Nového světa (celá Střední a Jižní Amerika), v Evropě se vyskytuje v oblasti Makaronésie (Azorské ostrovy, Kanárské ostrovy, Madeira), v jižním Španělsku a Portugalsku. Jedna populace byla zaznamenána ve Velké Británii, ale není úplně jisté, zda tam jde o původní lokalitu, nebo o rozšíření z místa, kde se puchýřník pěstoval pro zahradnické účely (roznos zralých výtrusů větrem). Na základě rozšíření druhu určitě nepřekvapí, že jeho listy vytrvávají přes zimu a je jedním ze stálezelených puchýřníků. Na rozdíl od ostatních druhů rodu má o něco větší genom, ale při stejném počtu chromozomů, a hustě ostnitý povrch

Tab. 1 Počet chromozomů jednotlivých evropských druhů komplexu puchýřníku křehkého (*Cystopteris fragilis* agg.), + symbolizuje přítomnost ploidního počtu u daného druhu. Základní chromozomové číslo (x) rodu puchýřník je 42.

Počet chromozomů	2x = 84 (diploid)	4x = 168 (tetraploid)	5x = 210 (pentaploid)	6x = 252 (hexaploid)	8x = 336 (oktoploid)
p. křehký (<i>C. fragilis</i>)		+	+	+	+
p. hladký (<i>C. dickieana</i>)		+		+	
p. vápencový (<i>C. alpina</i>)		+	+	+	+
p. prosvítavý (<i>C. diaphana</i>)	+	+		+	





2 Histogram analýzy z průtokového cytometru, kdy jsou najednou analyzovány tři běžné ploidy puchýřníku křehkého (*C. fragilis*) vyskytující se v České republice spolu s tzv. interním standardem, kterým je bob obecný (*Vicia faba* cv. Inovec). Díky poměru píku vzorku a standardu (u kterého známe velikost genomu) lze zjistit velikost genomu analyzovaného puchýřníku a následně odvodit jeho ploidii (4x – tetraploid, 5x – pentaploid, 6x – hexaploid). Orig. J. Ptáček

3 Geografická distribuce diversity ploidních úrovní komplexu p. křehkého a příbuzných druhů (*C. tenuis*, *C. reevesiana* a *C. protrusa* ve Spojených státech amerických). Znaky představují jednotlivé druhy a barvy jejich ploidii. Sběry puchýřníků na celosvětové úrovni (obr. a), lokality a ploidie p. vápencového (*C. alpina*, b), detailní pohled na sebrané populace p. křehkého v Evropě (c). Úpraveno podle: K. Hanušová a kol. (2019)

4 Kosmopolitně rozšířený puchýřník křehký je nejběžnějším zástupcem celého komplexu na území Evropy.

5 Puchýřník hladký (*C. dickieana*) z typové lokality u města Aberdeen ve východním Skotsku

6 Mořská jeskyně Cove Bay se specifickým mikroklimatem u Aberdeenu hostí dosud bohatou tetraploidní populaci puchýřníku hladkého. Foto L. Ekrt (obr. 5 a 6)

výtrusů (obr. 7c). Jednotlivé ostny jsou velmi blízko sebe, p. křehký má ostny naopak delší a dále od sebe.

Evoluce komplexu v Severní Americe a její odraz v evropském pohledu

Jak už bylo zmíněno výše, na obtížné taxonomické uchopitelnosti agregátů puchýřníku křehkého se významně podílejí dva evoluční procesy. Prvním z nich je polyploidizace (znásobení chromozomové sádky v buňce) a s ní spojená allopolyploidní speciace, která spolu s hybridizací (křížením mezi druhy) vedla k retikulární neboli síťovité evoluci celého komplexu. Důsledkem takové evoluce jsou morfologicky podobné a těžko rozeznatelné druhy. Obdobně spletitá evoluce není typická jen pro komplex puchýřníku křehkého, ale objevuje se i v dalších agregátech kapradin, jako je osladič obecný (*Polypodium vul-*



gare) nebo netík dlanitý (*Adiantum pedatum*). Na základě vztahů amerických puchýřníků si můžeme udělat představu a vytvořit hypotézy o situaci na evropském kontinentě, a to u p. křehkého se širokou škálou cytotypů.

Samotný tetraploidní puchýřník křehký pravděpodobně vznikl hybridizací mezi diploidním *C. reevesiana* a neznámým diploidním druhem *C. „hemifragilis“*, který nebyl do současné doby nalezen a zřejmě již vyhynul. Z tohoto neznámého diploida vzešel ještě tetraploidní *C. tenuis*, jenž byl dlouhou dobu považován pouze za varietu p. křehkého, než byl prohlášen za samostatný druh. Právě takto se vysvětluje vznik tetraploidního p. křehkého (čtyři sady chromozomů, $4x = 168$), což je nejčastěji se vyskytující ploidie ve střední Evropě (51 % případů).

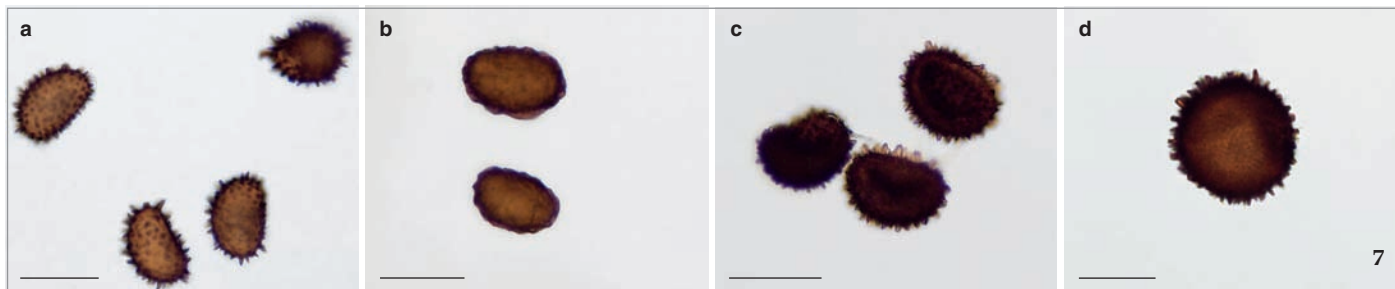
U hexaploidního severoamerického druhu *C. laurentiana* se předpokládá allopolyploidní původ – vznik zkřížením tetraploidního p. křehkého a diploidního p. cibulkatého (*C. bulbifera*). Situace u hexaploidního p. křehkého je do jisté míry stále nevyřešenou otázkou a jako nápoděva může sloužit *C. laurentiana*. Pokud bychom předpokládali allopolyploidní původ (viz výše) splynutím diploidní redukované a tetraploidní neredukované gamety, pak bychom při mikroskopickém

pozorování chromozomů v meióze očekávali kromě bivalentů (sdružených párů zdvojených homologních chromozomů v profázi meiózy) i univalenty (nespárované chromozomy v profázi). Avšak studie zabývající se počtem chromozomů poukazuje na fakt, že přítomnost 84 bivalentů a 42 univalentů u hexaploidního cytotypu pouze indikuje, že jeden z předků byl tetraploid. Další možností je hybridizace mezi haploidní a diploidní gametou za vzniku triploidního cytotypu, který zdvojením chromozomové sádky (autopolyploidizací) vytvoří hexaploidní sporofyt. Zatím nebyl s jistotou potvrzen ani jeden ze scénářů a původ hexaploidního puchýřníku křehkého stále není dostatečně objasněn. Jednou z teoretických možností je i vznik z dávno vyhynulých zástupců, o jejichž existenci se můžeme pouze dohadovat.

Pentaploid nejspíše vzešel z hybridizace mezi tetraploidem a hexaploidem. Jelikož všechny tyto cytotypy mohou růst společně a byly pozorovány univalentní chromozomy, zdá se tato hypotéza velmi pravděpodobná. Pentaploid byl dlouhou dobu přehlížen (jeho frekvence se pohybuje kolem 3 %) a chromozomy u něj byly spočítány teprve v poslední době. Naopak o oktoploidním cytotypu se píše v téměř každé druhé publikaci o puchýřnících a uvádějí se i jeho chromozomové počty. V rámci zevrubného cytogeografického průzkumu byl však objeven pouze jeden oktoploidní jedinec, a to dokonce z lokality v České republice (populace puchýřníků v Novém Městě nad Metují). O jeho původu dosud nevíme nic bližšího a můžeme se jenom domnívat, zda vznikl autopolyploidizací tetraploida, nebo splynutím dvou neredukovaných gamet. Avšak role neredukovaných gamet ve speciaci kapradin je stále téměř neznámý jev, na rozdíl od jejich významu v evoluci krytosemenných rostlin.

Ploidně smíšené populace – kuchyně mikroevolučních procesů?

Jak jsme již zmínili, na území střední Evropy se vyskytují ve zvýšené míře ploidně smíšené populace puchýřníku křehkého. Ze tří cytotypů (tetraploidního, pentaploidního a hexaploidního) se skládá 26,7 % všech zkoumaných populací. Pokud se podíváme pouze na tetraploidy a hexaploidy, pak jde už o 40 % populací. Uvedená čísla nás navádějí k nezodpovězeným



otázkám a hypotézám ohledně vzniku pentaploidního a hexaploidního cytotypu. K výzkumu bylo zapotřebí doposud téměř nepoužívané experimentální hybridizace gametofytů o různých ploidiích (heteroploidní hybridizace). Tyto pokusy potvrdily pouze ve dvou případech (z celkového počtu 200 analyzovaných nově vzniklých sporofytů) křížení tetraploidního a hexaploidního puchýřníku za vzniku pentaploidního sporofytu (obr. 8). Hybridizace mezi ploidiemi je tedy vzácná a hlavním způsobem rozmnožování podle kultivačních experimentů je zřejmě gametofytické samooplození (oplození v rámci jednoho gametofytu). V takových podmínkách se každý cytotyp chová jako samostatné individuum a mezi sebou interagují jen vzácně, což by mohlo částečně naznačovat samostatnost obou cytotypů.

Dosud jsme se však nezmínili o rozmnožování pentaploidního cytotypu. U hybridů sexuálních druhů s lichým počtem chromozomů se vytvářejí především nevyvinuté (abortované) výtrusy. Na druhou stranu, vlastnictví lichého počtu sad chromozomů vede některé kapradiny k nepohlavnímu apomiktickému rozmnožování, to však do současné doby nebylo u puchýřníku křehkého uváděno. Již detailní pohled na spodní stranu listu odhaluje rozdílné množství výtrusnic u některých pentaploidních puchýřníků (sterilní jedinec na obr. 9 a apomiktický na obr. 10) v porovnání s hexaploidem (obr. 11). S pomocí kultivace gametofytů a metody průtokové cytometrie všech částí životního cyklu kapradin lze odhalit, jestli se daná kapradina rozmnožuje pohlavně, nebo apomikticky. Ačkoli má pentaploidní cytotyp velké množství výtrusů neschopných dalšího vývoje, v malém množství produkuje výtrusy o stejném počtu chromozomů jako mateřský sporofyt (neredukované výtrusy, obr. 7d). Z nich se pak vyvine gametofyt s neredukovanou sadou chromozomů, u kterého se nevytvářejí zárodečníky (archegonia), jehož jedinou možností je dát vzniknout novému sporofytu z buněk proklu (neboli gametofytu; zelené gametofyty lze pozorovat na obr. 8 a 12). Nově vzniklý sporofyt má stejný počet chromozomů jako mateřský sporofyt. Kombinace experimentální kultivace a průtokové cytometrie tak napomohla k prvnímu potvrzení apomixie v čeledi puchýřníkovitých.

Závěrem

Díky intenzivnímu výzkumu jedné z posledních biosystematických záhad kapradin na území Evropy jsme se ve znalostech procesů probíhajících v populacích kapradin posunuli o něco dál. Zavedení nových nebo obnovení téměř zapomenutých



7 Srovnání struktury povrchu výtrusů tří zástupců komplexu puchýřníku křehkého z Evropy. Puchýřník křehký s ostnatými výtrusy (ostnovýtrusná forma, obr. a), p. hladký s bradavičnatými výtrusy (hladkovýtrusná forma p. křehkého, b) a p. prosvítavý (*C. diaphana*) s hustě ostnatými výtrusy (c). Neredukovaný výtrus (o stejném počtu chromozomů jako mateřský sporofyt, tzv. diplospora, d) pentaploidní rostliny puchýřníku křehkého o délce 60,63 μm , který je zřetelně větší než výtrusy s redukováným počtem chromozomů. Pro srovnání je průměrná hodnota u tetraploidů 42,25 μm a hexaploidů 49,04 μm . Měřítka odpovídají 40 μm .

8 Pravděpodobnost, že dojde k přenosu spermatozoidů (pohyblivých samčích pohlavních buněk) z jednoho gametofytu na druhý (zvláště mezi gametofyty o různé ploidií), je velmi malá a hlavním způsobem rozmnožování je gametofytické samooplození – oplození v rámci jednoho gametofytu. Na snímku dva gametofyty s nově vznikajícím sporofytem

9 Pohled na spodní stranu listu pentaploidního puchýřníku jen s několika výtrusnicemi uspořádanými v jednotlivých výtrusnicových kupkách krytých pohárkovitou a celokrajnou ostěrou (bílá blanka). U takové rostliny se podíl výtrusů neschopných dalšího vývoje blíží 100 %.

10 Spodní strana listu apomiktického pentaploidního puchýřníku. Výtrusnice jsou vyvinutější (proti obr. 9) a pomocí mikroskopického pozorování a experimentální kultivace byly potvrzeny neredukované výtrusy.

11 Výtrusnicové kupky hexaploidního puchýřníku jsou plné jednotlivých výtrusnic, na této mikrofotografii jasně patrných (můžete srovnat se stavem u sterilního pentaploidu na obr. 9).

12 Petriho miska s vyklíčenými gametofyty (prokly) puchýřníku křehkého. Snímky J. Ptáčka, není-li uvedeno jinak

metod přineslo mnoho nových poznatků o významu polyploidizace a reprodukčních strategiích u kapradin. Velkou zásluhu má na tom metoda průtokové cytometrie, díky níž můžeme velmi snadno a rychle odhalit ploidiu rostlin, u kapradin navíc všech částí životního cyklu, což umožňuje komplexní náhled na celou problematiku.

Výzkum byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt č. 912613).

Seznam použité literatury najdete na webové stránce Živy. K dalšímu čtení např. Živa 2009, 5: 204–208 nebo 2017, 6: 282–285.