

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta**



Bakalářská práce

Karyologická studie *Agrostis stolonifera* v České republice

**Magdalena Kubešová
2004**

školitel: Ing. Milan Štech, Ph.D.

Kubešová, M. (2004): Karyologická studie *Agrostis stolonifera* v České republice. (Bakalářská diplomová práce.) [Caryological study of *Agrostis stolonifera* in the Czech Republic. – Bc. Thesis, in Czech] – 29 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

The presence of different ploidy levels in *Agrostis stolonifera* (*Poaceae*) was studied at the territory of the Czech Republic. Classic cytological method and flow cytometry were successfully applied. The relationships between ascertained ploidy levels and their morphological, ecological and geographical characteristics were discussed. The thesis includes the review of polyploidy in plants and application of flow cytometry in plant taxonomy.

Tato práce byla podporována projektem FRVŠ G4 b 1850/ 2003.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou diplomovou práci vypracovala samostatně jen s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích dne 13. 5. 2004

M. Kubešová

Poděkování

Mé díky patří zejména školiteli Milanu Štechovi, který mi pomohl jak se sběrem materiálu tak s jeho zpracováním. Především mu však děkuji za cenné odborné rady a neskonalou ochotu a trpělivost při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD., který mi umožnil pracovat na PARÚ AV ČR a využívat průtokový cytometr. Zejména mu pak děkuji za to, že byl ochoten věnovat svůj čas, aby se podařilo zvládnout potřebnou metodiku. To se podařilo i díky cenným radám Jana Sudy, PhD., kterému tímto také děkuji. Děkuji také všem ostatním přátelům a známým, kteří mi během psaní této práce přispěli radou či jakoukoli jinou podporou.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce.....	3
3 Literární přehled.....	4
3.1 Karyologické poměry u vyšších rostlin	4
3.2 Karyologické poměry u rodu <i>Agrostis</i> se zaměřením na <i>A. stolonifera</i>	10
3.3 Průtoková cytometrie v rostlinné taxonomii.....	13
4 Metodika.....	16
4.1 Materiál.....	16
4.2 Počítání chromozomů.....	16
4.3 Průtoková cytometrie.....	16
5 Výsledky.....	18
5.1 Materiál.....	18
5.2 Počítání chromozomů.....	18
5.3 Průtoková cytometrie.....	18
5.4 Morfologické, ekologické a geografické vazby.....	19
6 Diskuse.....	20
7 Závěr.....	24
8 Literatura.....	25

Přílohy

1. Seznam lokalit
2. Fotografie chromozomů
3. Protokol z průtokového cytometru
4. Histogram z průtokové cytometrie
5. Mapa rozšíření zjištěných ploidních úrovní *Agrostis stolonifera* v ČR

1 Úvod

Ve střední Evropě má botanický výzkum poměrně dlouholetou tradici, díky němuž je zdejší květena celkem dobře prostudována. Taxonomické hodnocení mnohých skupin je však stále nejasné a botanikové hledají způsoby, jak vyřešit rozlišování taxonů u tzv. kritických skupin. Jedná se převážně o rostliny s komplikovaným reprodukčním mechanismem, kde se uplatňují procesy jako např. apomixie – *Rubus* (*Rosaceae*), *Taraxacum* (*Asteraceae*), introgrese – *Quercus* (*Fagaceae*) (Briggs et Walters 2001). Vymezení a rozlišování jednotlivých taxonů je často obtížné z důvodu nesnadného morfologického rozlišení jednotlivých taxonů, které často pramení z relativně jednoduché stavby těla. Ta má za následek nedostatek použitelných morfologických znaků, které by byly charakteristické pouze pro určité taxony. Mezi takové rostliny patří např. zástupci čeledi *Cyperaceae* či *Poaceae*. Právě čeleď *Poaceae* je velmi druhově bohatá čeleď obsahující asi 10000 druhů v 600–700 rodech a obsahuje mnoho taxonů, jejichž vymezení není dodnes vyřešené.

Největší problémy se v rámci čeledi *Poaceae* vyskytují především u rodů, které mají velký počet druhů. Jedním z druhově nejbohatších rodů trav je rod *Agrostis*, který zahrnuje asi 220 druhů (Frey 1997). Přesný počet druhů není znám, protože u odlišných autorů nalézáme různá pojetí druhů v tomto rodě, což má za následek nomenklatorické nejasnosti. Determinace jednotlivých druhů je často velmi obtížná, protože využití již tak malého počtu použitelných znaků komplikuje značná morfologická i ekologická variabilita. V neposlední řadě k taxonomickým obtížím přispívá také výskyt mezidruhové hybridizace. Rozvoj moderních molekulárně biologických metod v posledních desetiletích umožňuje u těchto kritických skupin používat jako další hledisko také variabilitu genomu. Při posuzování variability genomu tohoto rodu bylo zjištěno, že v evoluci druhů rodu *Agrostis* se uplatňuje u různých druhů v rozdílné míře proces polyploidizace. Při řešení taxonomie tohoto rodu je proto nutné stanovit výskyt různých ploidních úrovní a posoudit důsledky procesu polyploidizace při evoluci jednotlivých druhů rodu *Agrostis*.

Na území České republiky se vyskytuje 7 původních druhů rodu *Agrostis*. Nejvariabilnějším druhem je zde *Agrostis stolonifera*. Jedná se o výběžkatý druh vyskytující se na různých biotopech po celém území ČR a vyznačující se poměrně značnou morfologickou variabilitou. Dostál (1989) uvádí tři poddruhy tohoto druhu, u nichž udává různé ploidní úrovně ($2n= 28, 35, 56, 70$). Z České republiky byl však doposud znám pouze výskyt tetraploidních jedinců s 28 chromozomy (Měsíček et Jarolímová 1992). V posledních letech bylo publikováno mnoho

zahraničních studií zabývajících se touto problematikou a výsledkem většiny z nich bylo nalezení tří ploidních úrovní u druhu *Agrostis stolonifera*. S rozvojem moderních metod umožňujícím zpracování většího množství materiálu se nabízí možnost prohloubit znalosti o výskytu ploidních úrovní druhu *Agrostis stolonifera* v České republice a posoudit souvislost mezi popisovanými nižšími taxony a ploidní úrovní. Výsledky této práce by měly přispět k vyřešení taxonomického hodnocení druhu *Agrostis stolonifera* v České republice, které bude publikováno v Květeně ČR.

2 Cíle práce

- 1) vytvoření literárního přehledu
 - a) význam polyploidizace u rostlin
 - b) dosavadní poznatky o karyologických poměrech *Agrostis stolonifera*
 - c) využití průtokové cytometrie v rostlinné taxonomii

- 2) zjištění ploidních úrovní *Agrostis stolonifera* na území České republiky
 - a) nashromáždění materiálu z populací z různých biotopů a geografických oblastí ČR
 - b) počítání chromozomů klasickou cytologickou metodou
 - c) použití metody průtokové cytometrie

- 3) posouzení případných morfologických, ekologických a geografických vazeb u zjištěných cytotypů

3 Literární přehled

3.1 Karyologické poměry u vyšších rostlin

Snaha o vytvoření systému, který by co nejlépe popisoval vztahy mezi rostlinami, vede systematiky k používání nových hledisek při řešení taxonomie rostlin. Proto jsou dnes brány ohledy také na různé vnitřní charakteristiky, jakými jsou např. biochemické složení či charakteristika genomu. Pomocí nich lze odhalit i procesy, které proběhly, aniž by pozměnily morfologickou stavbu rostlin, a tím mohou lépe vypovídat o evoluční historii rostlin.

S rozvojem cytologických metod se ukázalo užitečné využívat k posuzování taxonů počet chromozomů. Určování počtu chromozomů se provádí již více než 100 let. Ke všeobecnému přehledu o karyologické situaci v genomu rostlin velmi přispěla díla A. a D. Löve, kteří vytvořili přehledné seznamy chromozomových čísel mnoha rostlin z různých částí Evropy (např. Löve et Löve 1948, 1961). U cévnatých rostlin jsou známa chromozomová čísla od $2n=4$ u druhu *Happlopappus gracilis* (Asteraceae) (Briggs et Walters 2001) do $2n=1440$ u kapradiny *Ophioglossum reticulatum* (Khandelwal 1990). Rozsáhlejší znalosti o počtu chromozomů umožňují uvědomit si některé obecné platnosti o genomu rostlin. Bylo zjištěno, že u rostlin existuje značná variabilita ve velikosti genomu. V různých skupinách rostlin jsou však počty chromozomů variabilní v různé míře a počet chromozomů může kolísat i v rámci jednoho druhu.

Základními dvěma stavy počtu chromozomů jsou aneuploidie a euploidie. Při aneuploidii se v genomu jedince vyskytují počty chromozomů, které neodpovídají násobku základního chromozomového čísla (došlo zde ke změně počtu jednotlivých chromozomů). Při euploidii genom obsahuje určitý počet kompletních chromozomových sad (mění se zde počet celých chromozomových sad). Za výchozí se považuje diploidní stav, kdy je genom složen ze dvou chromozomových sad. Zvyšování počtu chromozomových sad procesem zvaným polyploidizace se zdá být významným mechanismem v evoluci rostlin. Při polyploidii se v buňkách organismu vyskytují nejméně tři sady chromozomů. Ke zmnožení sad chromozomů může dojít v důsledku somatického zdvojení nebo výskytu neredukovaných gamet při křížení. K somatickému zdvojení může dojít v zygote, embryu či v meristémech a výsledkem pak může být polyploidní jedinec či pouze určité pletivo. Ačkoliv známe dost příkladů, kdy došlo k somatickému zdvojení genomu, zdá se, že tento způsob polyploidizace je méně častý. Při vzniku polyploida se nejčastěji uplatňují neredukované gamety (Thompson et Lumaret 1992). Polyploidizace je jedním ze způsobů tzv. saltační speciace, kdy nové druhy vznikají náhle a ne postupnou adaptací (Briggs

et Walters 2001). Původně se předpokládalo, že polyploidizace je spíše vzácný proces. Dnes se zdá, že v přírodě během evoluce poměrně často dochází k situaci, která u organismů vytváří podmínky spouštějící proces polyploidizace. Ten může probíhat několika různými způsoby a výsledkem jsou různými mechanismy vzniklé typy polyploidů. Otto et Whitton (2000) uvádějí, že polyploidizace u rostlin by mohla být nejčastějším mechanismem jejich sympatrické speciace. Polyploidizace se v průběhu vývoje populací vyskytuje často opakovaně a u mnoha rostlin došlo k vícenásobné polyploidizaci. Tito polyploidní vyšších řádů se obvykle vyznačují větší mírou aneuploidie, která vzniká zřejmě během meiozy (Briggs et Walters 2001). U některých rodů vznikly polyploidní řady jako je tomu např. u rodu *Rumex* (*Polygonaceae*) – základní chromozomové číslo je 10 a jednotlivé druhy mají od $2n = 2x = 20$ (*R. sanguineus*), přes $2n = 4x = 40$ (např. *R. obtusifolius*) až po $2n = 20x = 200$ (*R. hydrolapatum*) (Briggs et Walters 2001). U některých druhů proběhla následná redukce ploidní úrovně i počtu jednotlivých chromozomů. Polyploidizace je v evoluci rostlin bezesporu velmi významným procesem, a proto v posledních letech bylo publikováno mnoho prací shrnujících dosavadní poznatky o její úloze v rostlinných populacích (viz např. Thompson et Lumaret 1992; Mable 2003; Soltis et Soltis 2003).

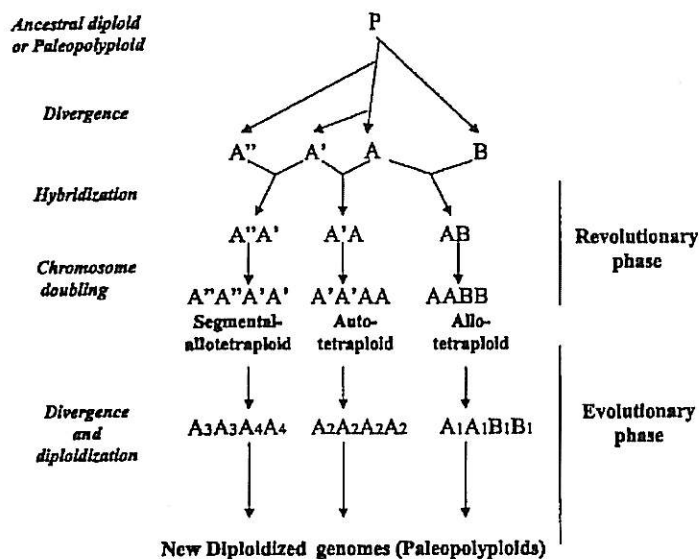
Znalosti o ploidních úrovních rostlin jsou stále neúplné a většina výzkumů byla prováděna jen na rostlinách v mírném pásu. Někteří vědci na základě dosavadních studií odhadují, že více než 80 % vyšších rostlin je polyploidních (Briggs & Walters 2001), přičemž v různých skupinách se polyploidizace uplatnila v různé míře. U kapradin se předpokládá, že až 95 % druhů je polyploidních (Grant 1981). U některých kapradin jsou známé vysoké počty chromozomů – např. *Ophioglossum reticulatum* (*Ophioglossaceae*) má $2n = 1440$ a Khandelwal (1990) předpokládá, že se jedná o 96ploidní druh. U jehličnanů je výskyt polyploidie velmi vzácný (Grant 1981) a u cykasů nebyl vůbec prokázán (Delevoryas 1980). Masterson (1994) porovnávala velikost prùdchů, která je většinou pozitivně korelována s ploidní úrovní, u fosilních a dnes rostoucích rostlin a došla k závěru, že asi 70 % všech krytosemenných rostlin prošlo alespoň jednou procesem polyploidizace. Z dvouděložných rostlin je znám největší počet chromozomů u *Sedum suaveolans* (*Crassulaceae*) s $2n =$ přibližně 640, zřejmě 80ploidní druh (Uhl, 1978). U jednoděložných bylo nejvíce chromozomů zaznamenáno u druhu *Voaniola gerardii* (*Areaceae*) s $2n =$ asi 596, zřejmě 50ploidní druh (Johnson et al. 1989).

Nejnovější studie dále potvrzují, že polyploidizace se uplatňuje přibližně při 2–4 % všech speciálních procesů u krytosemenných rostlin a zhruba v 7 % u kaprad'orostů (Otto & Whitton

2000). S rozvojem genomových studií se ukazuje, že i druhy doposud hodnocené jako diploidní, prošly kdysi polyploidizací. Příkladem jsou např. *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) a *Oryza sativa* (*Poaceae*). Ačkoliv jejich genomy jsou velmi malé a nevykazují znaky polyploidních rostlin, také u těchto rostlin s malým genomem byl studiem genomu zjištěn jeho polyploidní původ. Při studiích obsahu DNA v genomech organismů se ukazuje, že velká část jaderné DNA u eukaryot je nadbytečná a soudí se, že během evoluce došlo u většiny organismů k duplikaci jednotlivých úseků či celého genomu. U rostlin se za nejčastější mechanismus duplikace genů považuje polyploidizace, kdy dochází v jednom okamžiku k duplikaci celého genomu (Lawton-Rauh 2003).

Na základě doby, kdy došlo k polyploidizaci, a míry možného rozlišení polyploidního původu, rozlišujeme polyploidy na paleopolyploidy a neopolyploidy. Paleopolyploidy jsou dávno ustálené polyploidy s bisomickou dědičností (tj. při segregaci gamet se při meioze tvoří bivalenty), jejichž předci již nemohou být rozpoznáni cytologickými metodami ani DNA markery. Výskyt polyploidizace u těchto organismů je možné stanovit pouze pomocí bioinformačních systémů, které umí odhalit podobnost a kolinearitu mezi geny, které divergovaly před desítkami milionů let (Gaut 2001). Neopolyploidy jsou relativně nedávno vzniklé polyploidy, u nichž je možné odhalit jejich diploidní předky. Dalším kritériem v třídění polyploidů bývá původ chromozomových sad v polyploidním jedinci. Tradičně bývají rozlišovány dva typy polyploidů. Allopolyploid, který vznikl sloučením genomu po mezidruhové hybridizaci, a autopolyploid vzniklý znásobením chromozomových sad jednoho genomu. Odlišení těchto dvou typů polyploidů se provádí nejčastěji pozorováním průběhu meiozy. U autopolyploida pocházejí všechny sádky chromozomů ze stejného původního genomu, a proto je zde více shodných chromozomů než u diploida. To má často za následek tvorbu multivalentů a univalentů při meioze. Autopolyploid se tedy vyznačuje tzv. tetrasomickou dědičností (tj. tvoří při meioze multivalenty). Allopolyploid obsahuje genomy, které jsou do jisté míry odlišné, a proto při meioze vytvářejí pravidelné bivalenty a je pro něj tedy charakteristická bisomická dědičnost. Autopolyploidie je mnohem častější, než se původně předpokládalo, přesto se však vyskytuje v menší míře než allopolyploidie.

Na základě různé evoluční historie se však „původní“ genomy, které spoluvytvářejí genom polyploida, mohou lišit v různé míře, a proto existují také typy polyploidů, u nichž se tvoří multivalenty jen u některých částí genomu. Takové polyploidy označujeme jako segmentární allopolyploidy (segmental allopolyploids). Vznik různých typů polyploidů ilustruje obr. 1.



Obr. 1: Vznik různých typů polyplodů (převzato z Levy et Feldman 2002)

Grant (1981) vylíčil v rámci autopolyploidů a allopolyploidů ještě několik podtypů:

Autopolyploid – striktní (AAAA)

– mezi různými liniemi jednoho druhu (AAA'A')

Allopolyploid – segmentární (AAA_sA_s)

– genomový (AABB)

– autoallopolyploid (AAAABB)

Striktní autopolyploid vzniká znásobením chromozomové sádky jednoho původního genomu. Vzniklé chromozomové sady jsou tedy zcela identické a mohou způsobovat problémy při meioze, kdy tvoří multivalenty a univalenty místo bivalentů.

Při křížení jedinců různých vnitrodruhových linií jsou si genomy natolik podobné, že se vzniklý jedinec chová jako striktní autopolyploid.

Allopolyploidi vznikají křížením rozdílných genomů. Míra odlišnosti genomu mezi druhy je však různá, a proto existují i allopolyploidi, jejichž části genomu jsou shodné a párují se jako u autopolyploida, části genomu se však párují tak, že vytvářejí bivalenty. Takové allopolyploidy Grant (1981) označuje jako segmentární.

Genomovým allopolyploidem je myšlen polyploid vzniklý křížením druhů s odlišným genomem, který při meioze vykazuje pravidelné párování.

Autoallopolyploid vzniká následnou autopolyploidizací allopolyploidního genomu.

Při hledání důvodu, proč se polyploidizace v evoluci vyšších rostlin uplatňuje v tak rozsáhlé míře, bylo nalezeno již mnoho výhod, které polyploidizace poskytuje. Polyploidizace může pomoci překlenout sterilitu hybridů. Dobrým příkladem je např. *Spartina anglica* (*Poaceae*). Na konci 19. století byl v Anglii zaznamenán výskyt sterilního křížence, který vznikl zřejmě zkřížením zavlečeného severoamerického druhu *Spartina alternifolia* ($2n=62$) a původního druhu *Spartina maritima* ($2n=60$). Výsledkem hybridizace byli sterilní diploidní jedinci označovaní jako *Spartina* × *townsendii*. Procesem polyploidizace zjevně došlo k duplikaci genomu křížence a v populacích vznikl allopolyploid nazvaný *Spartina anglica* ($2n=120, 122, 124$), který je fertilmím, dobře prospívajícím druhem, který se dokonce na slaniskách a v ústí řek ve Francii a v Anglii chová invazně a ohrožuje původní diverzitu tamějších společenstev. Většina výhod, které může přinášet polyploidie, spočívá ve změnách na úrovni genomu či jednotlivých sekvencí. Důsledky těchto změn se však často projeví i na morfologických, fyziologických a ekologických vlastnostech rostlin. Předpokládá se, že některé výhody mohou plynout především z duplikace genů, fixace heterozygotních znaků a omezení dopadu inbrední deprese (Barrett 1989). U některých druhů je polyploidizace spojena s radikální genomovou přestavbou, která může změnit expresi genů či spustit aktivaci transpozonů a retrotranspozonů (Levy et Feldman 2002). Polyploidizace může také vést k intenzivnějšímu využívání stanoviště, protože polyploidní jedinec svými intermediárními vlastnostmi může využívat část stanoviště, která neodpovídá požadavkům ani jednoho z rodičů, čímž může bez omezení koexistovat se svými diploidními předky. Jinou možností uplatnění polyploida je vytlačení rodičů díky lepším vlastnostem, které získal polyploidizací (Rodriguez 1996). Rozdílné výhody nalezneme u auto- a allopolyploidů. Výhodou allopolyploida je fixování heterozygotnosti. Allopolyploid vlastně představuje permanentního hybrida, který může exprimovat geny obou rodičů a může např. vytvářet nové kombinace heterodimerických proteinů. Zvýšená biochemická flexibilita může znamenat evoluční výhodu (Levin 1983). Protože se většinou vyznačují větší variabilitou také v morfologických i demografických znacích, mohou polyploidi osidlovat i stanoviště, která by byla pro diploidní předky svými podmínkami zcela nevyhovující. To však platí jen v některých konkrétních případech a rostoucí počet studií této problematiky ukazuje, že allopolyploidní

potomek může vykazovat vyšší i nižší fitness, nebo může mít stejnou fitness jako jeho diploidní předci (Cruzan et Arnold 1993; Emms et Arnold 1997). U autopolyploidů může představovat selekční výhodu vyšší míra heterozygostnosti v porovnání s diploidními předky vyplývající z tetrasomické dědičnosti. Autopolyploid je schopen udržet 3 či 4 alely na 1 lokusu (Soltis et al. 2003).

Již mnoho prací se zabývalo vztahem mezi morfologickou a anatomickou stavbou rostliny a ploidní úrovní. Bylo zjištěno, že polyploidizace způsobuje zvětšení velikosti buněk. Není ovšem obecnou pravdou, že by zapříčiňovala zvětšení rostliny jako celku. Např. u mnoha trav mají polyploidní rostliny menší vzrůst, který vznikl tím, že došlo k redukci stébel a výběžků. U některých rostlin se zdá být dobrým ukazatelem ploidní úrovně velikost podpurných buněk průduchů a zralých pylových zrn, což lze využít k odhadu ploidního stupně u jedinců, u nichž nelze stanovit ploidní úroveň přímým počítáním chromozomů či jinými metodami (např. u herbářových položek). Ze známých studií také vyplývá, že rychlost růstu je u autotetraploidů většinou menší, což má za následek pozdější nástup kvetení. U některých autopolyploidů se doba kvetení prodlužuje. Změna doby květu spolu s morfologickými změnami mohou ovlivňovat interakce s opylovači a herbivory. Tím, že jsou polyploidi preferováni jinými druhy opylovačů, se může zamezit zpětnému křížení polyploida s jeho diploidními předky, které se u některých populací může vyskytnout. Tato nová bariéra pak může napomáhat udržení polyploida v populaci. Izolace polyploida způsobená odlišnou dobou kvetení a preferencí jinými opylovači může vést až ke vzniku selekčních tlaků, které jsou jiné než u diploidních předků. V některých případech mohou být důsledkem takového vývoje i geograficky oddělené populace různých ploidii, mezi nimiž neprobíhá žádný tok genů (Segraves et Thompson 1999).

Zajímavé jsou výsledky studií zabývajících se vztahem mezi životní formou a stupněm ploidie. Obecně platí, že polyploidizace se ve větší míře uplatňuje u rostlin vytrvalých než u jednoletků. U vytrvalých druhů dále platí, že polyploidní jsou spíše druhy výběžkaté než trsnaté. Stebbins (1971) jako důkaz toho, že diploidní druhy jsou buď jednoleté nebo vytrvalé a trsnaté, zatímco známé výběžkaté druhy jsou tetra-, hexa- či víceploidní, odkazuje na situaci v rodech *Agrostis*, *Agropyron*, *Bromus*, *Calamagrostis*, *Elymus*, *Festuca*, *Phragmites*, *Spartina*. U rodu *Agrostis* však tato závislost v mnoha případech neplatí – např. *A. stolonifera* i *A. capillaris* jsou oba tetraploidní či víceploidní, přičemž *A. stolonifera* je druh výběžkatý, zatímco *A. capillaris* je trsnatý a oba druhy jsou přitom vytrvalé. *Agrostis canina* naopak představuje vytrvalý diploidní druh, který je ve velké míře výběžkatý.

Dalším cílem mnoha studií bylo posouzení souvislosti ploidie a reprodukčního mechanismu. Dosavadní studie dokazují, že u polyploidů se vyskytuje samooplození ve větší míře než u jejich diploidních příbuzných. Autogamie totiž polyploidnímu jedinci umožní udržení se v populaci bez potřeby druhého polyploidního jedince, se kterým by se musel křížit (odkazy na konkrétní studie viz Thompson et Lumaret 1992). U asexuálního rozmnožování má u allopolyploida velký význam apomixie, která vzniklému polyploidnímu hybridovi může pomoci překlenout reprodukční obtíže spojené s možným snížením fertility nepravidelnostmi při meioze (Kellogg 1990).

Ačkoliv se v dnešní době užívají i metody, které posuzují variabilitu genomu na nižší úrovni než jsou chromozomy a zkoumají přímo jednotlivé alely nebo sekvence genů, u mnoha druhů rostlin není znám ani počet chromozomů. Navíc metody zabývající se složením genomu na úrovni genů jsou nákladné a vyžadují speciální vybavení a biochemické vzdělání. Stanovení počtu chromozomů popř. ploidní úrovně zůstává nadále relativně nenáročnou a přitom přínosnou metodou.

3.2 Karyologické poměry u rodu *Agrostis* se zaměřením na *A. stolonifera*

U čeledi *Poaceae* se předpokládá, že naprostá většina druhů je polyploidních (Levy et Feldman 2002). K divergenci zhruba 10 000 druhů, které tuto čeleď tvoří, došlo asi před 50–70 miliony let (Huang et al. 2002) a během vývoje této čeledi se uplatnily všechny hlavní typy polyploidizace.

Rod *Agrostis*

Rod *Agrostis* popsal Karl Linné v roce 1753. V jeho pojetí obsahoval 12 druhů, z nichž některé dnes náležejí k jiným rodům (*Apera*, *Calamagrostis*). Linné druhy odlišil zejména na základě přítomnosti či absence osin, podle tvaru a barvy květenství a podle vzrůstu stébla a vegetativních výhonů. Nebral ohled na charakteristiky jazýčku, kvítků ani na typ vegetativních výběžků (Widén 1971). Dnes rod *Agrostis* zahrnuje asi 220 druhů vyskytující se na obou polokoulích, zejména však v temperátní zóně a v horách tropických oblastí (Clayton et Renvoize 1986). V rámci čeledi *Poaceae* se řadí rod *Agrostis* do podčeledi *Pooideae* Macfarlane et Watson. Někteří autoři rozlišují v této podčeledi tribus *Aveneae* Dumort., kam řadí rod *Agrostis*

do subtribu *Alopecuroinae* Dumort. (Clayton et Renvoize 1986). Někdy však bývá tento rod řazen do samostatného tribu *Agrostideae* Kunth. (např. Björkman 1960, Tutin 1980, Frey 1993).

Základní chromozomové číslo je 7. Rozsáhlou studii karyologie rodu *Agrostis* publikoval Björkman v roce 1960. V této práci uvádí počty chromozomů u mnoha druhů. Rod *Agrostis* je jedním z rodů, během jehož vývoje se vytvořily polyploidní řady, a proto se zde vyskytují diploidní až dekaploidní cytotypy. Doposud byly zjištěny rostliny mající 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 70 chromozomů (Frey 1997). Zdá se, že velkou rolí ve vývoji tohoto rodu má kromě polyploidizace i vnitrodruhová hybridizace (Widén 1971). Frey (1997) ve svém shrnutí o dosavadních karyologických poznatcích zhruba poloviny popsaných druhů rodu *Agrostis* uvádí, že asi 79 % ze zkoumaných druhů se jeví jako karyologicky uniformní, tj. byli zde zaznamenáni pouze jedinci jediné ploidní úrovně. U zbývajících 21 % byly zaznamenány polyploidní řady od diploidů po dekaploidy v rámci jednoho druhu. Také byl zjištěn výskyt aneuploidních jedinců, který je i zde stejně jako u mnoha jiných rodů rostlin častější u polyploidů vyšších řádů. U některých druhů se vyskytují B-chromozomy, jejichž počet bývá od 1 do 10. Nejčastěji se vyskytují u diploidů, vzácně u tetraploidů a u vyšších ploidních úrovní byly zaznamenány jen výjimečně (Frey 1997).

U několika druhů rodu *Agrostis* byla hledána souvislost mezi počtem chromozomů a morfologickými charakteristikami. Ve většině případů však nebyla potvrzena. Drobné morfologické rozdíly byly nalezeny převážně jen u vnitrodruhových taxonů, které mají různé (euploidní či aneuploidní) počty chromozomů (Frey 1997).

Agrostis stolonifera

Agrostis stolonifera je vytrvalý klonální druh vegetativně se rozmnožující pomocí výběžků. Při sexuální reprodukci je většinou obligátně allogamický (Davies 1953). Osidluje různé biotopy od slanisek, písečných dun přes ornou půdu až po rašelinné mokřady. Vyznačuje se velkou morfologickou variabilitou (Stuckey et Banfield 1946), a proto patří mezi nejvariabilnější druhy rodu *Agrostis*. Vymezení tohoto druhu se v různých zdrojích často velmi odlišuje a také nomenklatura tohoto druhu prošla složitým vývojem.

A. stolonifera je jedním z druhů, u kterého byl zaznamenán výskyt více cytotypů. Björkman (1954) spočítal chromozomy u více než 900 rostlin převážně ze severských zemí (ale také z Velké Británie, Islandu a Švýcarska) a podařilo se mu zachytit výskyt tří ploidních úrovní –

tetraploidní ($2n=28$), pentaploidní ($2n=35$) a hexaploidní ($2n=42$). Zachytil také výskyt B-chromozomů a potvrdil výskyt aneuploidů, který zaznamenali již Stuckey et Banfield (1946) a Juhl (1952). V poslední době výskyt aneuploidů potvrzují i studie Kik et al. (1993). Pozdější výzkumy zatím neodhalily výskyt dalších ploidních úrovní u *Agrostis stolonifera*.

Björkman (1954) dále u zjištěných ploidních úrovní porovnával tvorbu gamet.

U tetraploidních jedinců zaznamenal pouze tvorbu euploidních gamet. Vyšetřením potomstva pentaploidů a hexaploidů, které vzniklo samooplozením, zjistil, že jedinci těchto dvou ploidí mohou tvořit funkční gamety ale s různým počtem chromozomů. Lze tedy předpokládat, že u pentaploidů a hexaploidů velké nepravidelnosti během meiozy mohou vést až k tvorbě nefunkčních gamet. Tetraploidní *Agrostis stolonifera* je považován za původně allotetraploidní cytotyp (AABB) vzniklý mezidruhovou hybridizací a pentaploidi i hexaploidi vznikají z unilaterálních (AAB nebo ABB) či neredukovaných (AABB) gamet, které se vzácně tvoří u tetraploidů (Jones 1956).

Z území dnešní České republiky je *A. stolonifera* uváděn jako součást české květeny již např. Čelakovským v roce 1867. Poslední podrobnější zpracování *A. stolonifera* v České republice poskytuje Dostál (1989), který tento druh člení na tři poddruhy: *A. stolonifera* subsp. *stolonifera* s 28 chromozomy, subsp. *prorepens* s 35 a 70 chromozomy a subsp. *maritima* s 56 chromozomy. Dostál však zřejmě pouze převzal údaje ze zahraniční literatury. Jediný údaj o počtu chromozomů u rostlin z území České republiky nalezneme v publikaci Měsíček et Jarolímová (1992), kde byl zaznamenán pouze výskyt tetraploidních jedinců s $2n=28$.

Tutin (1980) uvádí pro situaci v Evropě u *A. stolonifera* chromozomová čísla 28, 30, 32, 35, 42, 44, 46. V okolí České republiky nejpodrobnější zpracování rodu *Agrostis* nalezneme v Německu. Garcke (1972) uvádí u *A. stolonifera* 3 poddruhy s rozdílnou ploidní úrovní: subsp. *stolonifera* s $2n=28$, subsp. *prorepens* s $2n=70$ a subsp. *maritima* s $2n=56$. Rothmaler (2002) uvádí počty 28, 35 a 42. Tyto tři ploidní úrovně udává také Conert (1989), který rozlišuje 5 variet: *stolonifera*, *palustris*, *pseudopungens*, *marina*, *maritima*. Bohužel však neudává vztah ploidní úrovně a variety. V nedávno vydaném chromozomovém atlasu rostlin Německa je však uveden pouze výskyt tetraploidů s 28 chromozomy (Albers 1998). V dokumentovaném seznamu chromozomových čísel rostlin Rakouska (Dobeš et Vitek 2000) není *Agrostis stolonifera* uveden. Ve Slovenské republice byl zjištěn výskyt tetraploidních jedinců, kteří pocházeli z lokalit ve Vysokých Tatrách a v Podunajské nížině (Májovský et al. 1987). Frey (1997) ve svém přehledu u *Agrostis stolonifera* uvádí počty chromozomů 28, 30, 32, 33, 35, 41, 42, 44, 46.

V evropské literatuře lze tedy najít u *Agrostis stolonifera* ploidní úrovně s počty chromozomů 28, 35, 42, 56, 70 (+ aneuploidní počty). V recentních studiích jsou však uváděny pouze tři ploidní úrovně (4x, 5x, 6x). Vzhledem k problematické taxonomii tohoto druhu, počty chromozomů 56 a 70 možná patří jiným druhům.

V posledních letech je zájem soustředěn na stanovení případných morfologických, ekologických či geografických vazeb jednotlivých cytotypů, bližší výzkum reprodukčních mechanismů a odhalení příčin, které vedou ke vzniku a udržení různých ploidních úrovní v populacích (viz Kik et al. 1990a, 1990b, 1991, 1992, 1993). Zkoumáním počtu chromozomů *A. stolonifera* a dalších druhů rodu *Agrostis* se zabývali i Bonos et al. (2002), kteří ke stanovení ploidních úrovní úspěšně využili metodu průtokové cytometrie. Získané informace o velikosti genomu použili pro posouzení vztahu k morfologickým parametrům.

3.3 Průtoková cytometrie v rostlinné taxonomii

V posledních desetiletích se část zájmu rostlinných taxonomů a evolučních biologů soustředí na velikost a složení rostlinného genomu. Tyto charakteristiky nám mohou vypovědět mnohé o evolučních vztazích a mechanismech evoluce u rostlin. Zájem je dnes soustředěn přímo na jednotlivé geny či sekvence rostlinného genomu. Pro hodnocení taxonů na druhové úrovni nám však může poskytnout cenné informace i stanovení počtu chromozomů či relativního obsahu DNA. Klasické cytologické metody jsou však již nedostačující. Snaha o zpracování většího množství materiálu, zachycení větších detailů a možnost použití nových hledisek vede k aplikaci řady molekulárně biologických metod i na rostlinné organismy.

Jednou z takových moderních metod je i průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM). Tato metoda umožňuje třídit buňky či jejich části a měřit u nich různé parametry. Principem je roztržení obarvených částic na základě intenzity fluorescence barviva navázaného na měřených částicích. Průtokový cytometr tvoří několik základních částí – zdroj světla, průtoková komůrka, optický systém, snímací část, elektronická část zpracovávající signál a počítač (Ormerod 1994).

Tato metoda začala být používána asi v 60. až 70. letech 20. století (Doležel 1997). Původně byla používána zejména imunology v biomedicínských laboratořích pro třídění a počítání krevních částic, dnes se užívá i v mnoha jiných biologických odvětvích. Veškeré buňky či částice vzorku jsou měřeny jednotlivě, což je zajištěno tím, že částice vzorku se v přístroji pohybují pomocí tzv. unášecí tekutiny. Rozdílem rychlosti pohybu vzorku a unášecí tekutiny se jednotlivé

částice řadí za sebou a tenkou kapilárou procházejí jednotlivě. Při průchodu kapilárou jsou osvětleny laserem (popř. arc lampou) monochromatickým světlem o určité vlnové délce, která způsobí excitaci použitého barviva. Výběrem barviva do jisté míry určujeme, jaký parametr bude měřen. Užívají se tři typy barviv: interkalační barviva, která se váží přímo na DNA (např. propidiumjodid), barviva, která se váží na A-T vazby (např. DAPI) a barviva specifická pro G-C vazby (např. mithramycin) (Doležel 1991). Po excitaci barviva následuje fluorescence při jiné vlnové délce. Míra fluorescence je měřena pomocí přímého a postranního snímače a odpovídá velikosti a pórovitosti částice. Elektronická část přístroje zpracuje signály ze snímačů a počítač zpracuje získaná data nejčastěji do přehledného histogramu.

Velkou výhodou průtokové cytometrie je analýza desítek až tisíců částic během několika minut. Navíc parametry jsou stanovovány pro jednotlivé částice, ne např. pro celou populaci buněk, proto se neztrácí detailní informace o mezibuněčných i vnitrobuněčných rozdílech. Je však mít na paměti, že analyzované částice musí být izolované z tkání a pletiv, a proto při přípravě vzorků dochází vždy k porušení přirozených interakcí mezi částicemi.

Také v rostlinné taxonomii se průtoková cytometrie ukázala být velmi užitečnou metodou. První publikovaná studie, ve které byla metoda průtokové cytometrie použita na rostlinný materiál, byla publikována Hellerem již v roce 1973, tato aplikace byla však až do počátku 80. let 20. století zcela ojedinělá. Klíčovým okamžikem pro rozvoj aplikace průtokové cytometrie na analýzu rostlinného materiálu bylo vyřešení problému izolace jednotlivých buněk a jejich částí z kompaktního rostlinného pletiva. Tento problém vyřešil v roce 1983 David Galbraith se svými kolegy, kteří přišli na velmi jednoduchý postup izolace jader, kdy stačí kousek rostlinného pletiva nasekat v petriho misce v hypotonickém roztoku, který obsahuje detergent. Po přidání barviva je vzorek připraven k analýze (Galbraith 1983). Dnes se používají různé modifikace této jednoduché metody.

V rostlinné taxonomii se průtoková cytometrie využívá především ke stanovení relativní či absolutní velikosti genomu (popř. obsahu DNA), zjištění poměru AT:GC vazeb, odhalení struktury chromatinu, posouzení vlivu radiace apod. (Suda 2004). Zvláště užitečné se ukázaly být analýzy ploidního stupně. K určování ploidní úrovně většinou stačí určit relativní obsah DNA porovnáním vzorku se standardem o známém počtu chromozomů. Určením stupně ploidie můžeme odhalit složení populací, odlišit blízké příbuzné druhy, v některých případech i odhalit aneuploidní jedince a křížence. Dále je možné tento druh analýzy využít ke studiu způsobu rozmnožování a k rozlišení pohlaví u sterilních dvoudomých rostlin s různými pohlavními

chromozomy (např. *Rumex*, *Silene*). Velkým přínosem je možnost determinace hybridních jedinců vzniklých při homoploidním křížení. V tomto případě k odhalení hybridního jedince stačí, aby se rodiče křížence lišili asi ve 3–5 % genomu (Suda 2004).

Vlastní analýza v průtokovém cytometru je velmi rychlá a umožňuje zpracování několika stovek až tisíců rostlinných buněk během několika minut. Celková náročnost využívání této metody je dána spíše přípravou rostlinného vzorku, z kterého je nejprve nutné izolovat jádra. Používanými metodami jsou mechanická izolace jader a izolace protoplastu enzymatickou lyzí buněčné stěny (Doležel et al. 1989). Velkou výhodou je nedestruktivnost této metody, protože k analýze obvykle stačí jen malé množství pletiva (řádově stovky miligramů až několik gramů) a v některých případech je možné analyzovat i suchý materiál (např. rostliny z herbáře) (Suda 2004). Tuto metodu je možné aplikovat také na různé *in vitro* kultury rostlinných buněk (Doležel et al. 1989).

4 Metodika

4.1 Materiál

Byl nashromážděn materiál z populací, které pocházely z různých geografických míst České republiky, z různých nadmořských výšek i z různých biotopů. Z populací byly vybírány všechny morfologicky či fenologicky odlišné typy, které byly pěstovány odděleně avšak za shodných podmínek. Rostliny byly pěstovány na pokusném pozemku, pro analýzy v podzimním a zimním období byly rostliny pěstovány v klimaboxu.

4.2 Počítání chromozomů

Klasickou cytologickou metodou je počítání obarvených chromozomů pod světelným mikroskopem. U druhu *Agrostis stolonifera* bylo použito metody podle Krahlcové (1998). Chromozomy byly počítány z buněk kořenových špiček pěstovaných rostlin. Pro navození kondenzace chromozomů a buněčného dělení byly konce kořínků vloženy na 4 hodiny do nasyceného roztoku paradichlorbenzenu. Následně byly kořínky ponechány ve fixační směsi tvořené denaturovaným etanolem a 96% ledovou kyselinou octovou v poměru 3:1. V této směsi byly kořínky uchovány v lednici minimálně do druhého dne. Před vlastním pozorováním byly kořínky přendány do macerační směsi koncentrované 96% HCl a etanolu v poměru 1:1. Po uplynutí dvou minut byly kořínky vypírány ve vodě. Z kořínků byla poté uříznuta mléčně zbarvená kořenová špička, která byla rozmáčknuta krycím sklíčkem v kapce laktopropionorceinu naředěném destilovanou vodou v poměru 3:2. Asi po 10 minutách působení barviva byly připravené preparáty pozorovány pod optickým mikroskopem se zvětšením 10 x 100. Chromozomy byly počítány v metafázi mitoticky dělících se jader. U preparátů s větším počtem buněk, v nichž se vyskytovaly mitózy s kondenzovanými chromozomy, byly chromozomy počítány nejméně u třech buněk.

4.3 Průtoková cytometrie

K analýzám byl použit průtokový cytometr EPICS XL-MCL. Tento přístroj neumožňuje analýzy v oblasti UV záření, a proto byl zvolen postup, ve kterém se jako barvivo užívá propidiumjodid (PI). K přípravě vzorku bylo použito pletivo listových pochev popř. listových čepelí. Úprava vzorku byla provedena podle metodiky, kterou uvádí Doležel (2003). K přibližně 300 mg rostlinného materiálu byly přidány 2 ml roztoku OTTO I, ve kterém se pletivo rozsekalo. Vzorek byl přefiltrován přes síťovinu Uhelon (průměr ok 42 μ m) a k analýze byl odebrán 1 ml

suspenze. K němu bylo přidáno 0,5 ml roztoku OTTO II, do kterého bylo těsně před použitím přidáno barvivo propidiumjodid. Použitá koncentrace barviva byla 50 μg / 1 ml roztoku OTTO II. Poté byl vzorek analyzován v průtokovém cytometru. Vlnová délka použitá k excitaci barviva byla 380 nm. Jako standard, se kterým byl vždy vzorek porovnáván byla používána rostlina o známém počtu chromozomů, který byl předtím stanoven klasickým počítáním chromozomů pod optickým mikroskopem. Ze získaných histogramů byla stanovována ploidní úroveň daného vzorku.

Příprava roztoku Otto I:

4,2 g (0,1M) monohydrát kyseliny citronové

1 ml (0,5% (v/v)) Tween 20

doplnit vodou do 200 ml

skladovat při 4°C

Příprava roztoku Otto II:

28,65 g (0,4M) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

doplnit vodou do 200 ml

skladovat při pokojové teplotě

5 Výsledky

5.1 Materiál

Podářilo se nashromáždit rostliny ze 44 populací z různých míst České republiky a tři rostliny pochází ze dvou populací Slovenské republiky (Seznam lokalit viz Příloha 1). Z některých populací bylo odebráno více rostlin (zejména různých morfologických typů), celkem bylo tedy analyzováno 77 jedinců *Agrostis stolonifera*.

5.2 Počítání chromozomů

Chromozomy byly počítány u několika desítek rostlin. Tato pracná a časově náročná metoda však u některých rostlin nepřinesla žádné výsledky. Přesto se touto metodou podařilo najít 3 ploidní úrovně: tetraploidní rostliny s 28 chromozomy, pentaploidní s 35 chromozomy a rostliny hexaploidní s 42 chromozomy (Fotografie chromozomů viz Příloha 2). Přes rozvoj tzv. moderních taxonomických metod je klasické počítání chromozomů stále nezbytnou součástí zkoumání genomu, protože umožňuje stanovení standardu, který je nutný pro ostatní metody. Při nedostatečné citlivosti cytometru a vysokém počtu chromozomů je klasické počítání chromozomů také zatím jediným způsobem, jak stanovit aneuploidní stav počtu chromozomů.

5.3 Průtoková cytometrie

Bylo provedeno několik desítek opakovaných analýz (Protokol z průtokového cytometru viz Příloha 3) a podařilo se jednoznačně stanovit stupeň ploidie u 77 jedinců *Agrostis stolonifera*. Stejně jako při klasickém počítání chromozomů se podařilo nalézt tři ploidní úrovně: tetraploidní s 28 chromozomy, pentaploidní s 35 chromozomy a hexaploidní s 42 chromozomy (Histogram viz Příloha 4). Nejčastější byl v našem vzorku výskyt hexaploidů – 35 jedinců, pentaploidní byly rostliny ve 20 případech a tetraploidních jedinců bylo 22. U některých rostlin je podezření, že se jedná o aneuploidní jedince. Vzhledem k citlivosti používaného přístroje je však nutné tuto možnost ověřit pomocí klasického počítání chromozomů nebo na jiném průtokovém cytometru. U pentaploidů a hexaploidů je však vzhledem k poměrně vysokému počtu chromozomů rozlišení aneuploidů již za hranicí citlivosti metody průtokové cytometrie.

5.4 Morfologické, geografické a ekologické vazby

Z dosavadních výsledků nejsou zatím znatelné žádné morfologické vazby. Rozličné ploidní úrovně byly stanoveny i u rostlin stejných morfologických typů. Naproti tomu se jednotlivé ploidní úrovně jeví nerozlišitelné – jedinci všech ploidních úrovní mohou např. ve stejné míře tvořit výběžky i bohatě kvést.

Bylo zjištěno, že jednu populaci mohou tvořit i jedinci různých cytotypů. Na několika lokalitách byla populace tvořena jedinci dvou ploidních úrovní, přičemž byl zaznamenán výskyt kombinací 4x5x a 4x6x. Na jedné lokalitě pak byly zjištěny všechny tři ploidní úrovně. Vzhledem k tomu, že se rostliny s různou ploidní úrovní vyskytují i v rámci jedné populace, nebyly prozatím pouhým odlišením jednotlivých ploidí nalezeny žádné rozdílné ekologické vazby jednotlivých ploidních úrovní. Nebyly však provedeny žádné podrobnější studie.

Ze získaných výsledků je patrné, že jednotlivé karyotypy mají na území ČR sympatrický areál a všechny tři ploidní úrovně se víceméně vyskytují na celém území ČR (Mapka rozšíření zjištěných ploidních úrovní viz Příloha 5).

6 Diskuse

Podařilo se stanovit výskyt tří ploidních úrovní, který je ve shodě s výsledky prací z jiných částí Evropy (např. Björkman 1954, Kik et al. 1992). Některé histogramy poukazují na možnost výskytu aneuploidů, který zaznamenali i Stuckey et Banfield (1946), Juhl (1952), Björkman (1954), Kik et al. (1993). Tato možnost bude ověřena klasickou cytologickou metodou počítání chromozomů. Kik et al. (1993) zaznamenali také variabilitu počtu chromozomů i mezi buňkami jednoho jedince (rozdíl mezi jednotlivými klony). Předpokládají, že u jedinců vyšší ploidie (5x, 6x) se zřejmě vyskytují nepravidelnosti v meioze, které mohou zapříčinit vznik klonů s různým počtem chromozomů. Nelze vyloučit, že tento jev se vyskytl také u analyzovaných rostlin během této studie, protože u některých jedinců byla šířka peaku v histogramu neobvykle široká.

Metodu průtokové cytometrie úspěšně aplikovali na rod *Agrostis* také Bonos et al. (2002), kteří stanovovali obsah 2C DNA u 6 druhů rodu *Agrostis*, mimo jiné i u druhu *Agrostis palustris*, u kterého uvádějí synonymum *Agrostis stolonifera* var. *palustris*. U tohoto druhu potvrdili výskyt tetraploidních rostlin. Zjistili také, že některé druhy se liší v obsahu DNA, ačkoli stupeň ploidie mají stejný. Během zpracování této studie byl také zaznamenán mírný posun v obsahu DNA mezi tetraploidním cytotypem *Agrostis stolonifera* a některými dalšími tetraploidními druhy z České republiky. Podrobnější výzkum ostatních druhů vyskytujících se v ČR by měl následovat v budoucnosti.

Ačkoli nebyla provedena četná morfometrická měření, zdá se, že jednotlivé cytotypy nevykazují patrné rozdíly v morfologických parametrech. Korelaci mezi obsahem DNA (stupněm ploidie) a morfologickými parametry hledali u studovaných druhů také Bonos et al. (2002). Měřili výšku rostliny, délku laty, délku čepele, šířku čepele a vzdálenost mezi bází prýtu a nejvyšším internodiem. Statisticky průkazná byla pouze pozitivní korelace obsahu DNA a délky čepele. Ostatní morfologické charakteristiky zřejmě nevypovídají o stupni ploidie.

Zajímavé závěry poskytují studie, které byly prováděny v Holandsku na třech či čtyřech populacích *Agrostis stolonifera*, které se vyskytují na rozdílných biotopech (Kik et al. 1990a, 1990b, 1991, 1992, 1993). Kik et al. (1990a, 1990b) porovnávali morfologické a růstové charakteristiky u 4 populací *A. stolonifera*, které rostly na zcela odlišných biotopech. Podařilo se nalézt souvislost mezi charakterem výběžků a stanovištěm – jedinci rostoucí na louce tvořili málo dlouhých a silných výběžků, na slanisku byly rostliny s větším počtem krátkých a tenkých výběžků, na písčité duně rostliny tvořily málo dlouhých a tenkých výběžků. Na polderu se vyskytovaly všechny tři biotypy. Při porovnávání vnitropopulační variability byly nalezeny

průkazné rozdíly mezi jednotlivými populacemi. Nejmenší proměnlivost vykazovala populace na louce, zřejmě kvůli absenci sexuálního rozmnožování. Při přesazovacích pokusech se však ukázalo, že charakteristiky jako přežití, růst a kvetení jsou dány zejména faktory prostředí spíše než příslušností k populaci, ze které rostlina pochází. Další publikovaná práce uváděla do souvislosti rozdíly mezi relativní rychlostí růstu a genotypem (Kik et al. 1991). Korelace mezi relativní rychlostí růstu a přežitím genotypu však nebyla statisticky průkazná.

Kik et al. (1992) porovnávali populace *Agrostis stolonifera* na ještě nižší úrovni, kdy prokázali rozdílné cytotypové složení 4 různých populací. Populace pocházely z louky, slaniska, polderu a písčiny dun. V populaci na louce zaznamenali velký podíl tetraploidních jedinců (5x, 6x) a malý podíl tetraploidů. Na písčiny dunách zachytili pouze výskyt tetraploidních úrovní a na slanisku a polderu se vyskytovali jedinci všech ploidních úrovní zhruba ve stejné míře. Kik et al. (1993) rozšířili dosavadní výsledky ještě informací o míře kolísání počtu chromozomů v rámci genotypu. Posuzovali při tom populace ze stejných biotopů i konkrétních lokalit. Zjistili, že u jednotlivých populací se vyskytuje rozdílný rozsah počtu chromozomů u genotypů. Na louce zaznamenali široké rozpětí počtu chromozomů u jednotlivých genotypů, zatímco na písčiny dunách bylo velmi malé. Polder a slanisko vykazovali střední hodnoty. Z výsledků obou těchto studií lze vyvozovat některé závěry o různém uplatnění se jednotlivých cytotypů na rozdílných biotopech. Kik et al. (1992, 1993) diskutují možnost, že populace na písčiny dunách jsou víceméně stabilní, a tudíž pod menším selekčním tlakem, který by mohl vyvolávat polyploidizaci, kdežto na ostatních biotopech, kde se rostliny potýkají se silnou konkurencí, se lépe uplatňují víceploidní jedinci. Častý výskyt tetraploidů na biotopech vystavených disturbancím a stresu vysvětlují tím, že na těchto biotopech se lépe uplatní jedinci s generativním rozmnožováním, kteří produkují hodně malých semen. A právě tetraploidi bývají plně plodní, kdežto u jedinců vyšších ploidních úrovní předpokládají výskyt nefunkčních gamet, který pramení z častých nepravidelností při meioze, které zaznamenal Björkman (1954). Aston (1962) navíc uvádí, že hexaploidní jedinci v porovnání s tetraploidními vytvářejí více vegetativní biomasy. Takové tendence zachytili u pentaploidů a hexaploidů také Kik et al. (1992) na slanisku a polderu, ačkoli výsledky nebyly statisticky průkazné. To by odpovídalo domněnce, že na relativně stabilních biotopech se uplatí spíše vyšší ploidie. V těchto biotopech totiž v silné konkurenci ob stojí spíše rostliny s vegetativním rozmnožováním, které jsou dlouhověké, schopné mohutného vegetativního růstu (s produkcí větších a silných výběžků).

Ačkoli mnoho studií předpokládá, že pentaploidi a hexaploidi jsou méně plodní, dosavadní výsledky této studie tento fakt nepotvrzují. Ve studovaném materiálu vytvářeli jedinci všech tří ploidií četná květenství i tvořili obilky. Plody byly sesbírány a budou použity pro další studie (např. klíčivosti semen u různých ploidií a k vyšetření počtu chromozomů).

Vzhledem ke klonálnímu růstu *Agrostis stolonifera* a zvolené metodice nelze podíl různých ploidií v populaci hodnotit kvantitativně, protože sbírání jedinců mohou náležet jednomu genotypu. K odlišení jednotlivých genotypů by bylo třeba použít jiné metody (např. izozymové analýzy).

Přestože citované výzkumy probíhaly i na biotopech, které se v ČR nevyskytují, lze předpokládat, že jedinci různých ploidií neosidlují rozdílné biotopy ve stejné míře ani na území ČR. Důležité je zjistit, čím a za jakých podmínek se spouští proces polyploidizace. Dosavadní studie spíše předpokládají, že vznik vyšších ploidií je dán vzácnými nepravidelnostmi při vzniku gamet u tetraploida (Jones 1956). Kik et al. (1993) však diskutují také možnou souvislost polyploidizace s hybridizací. Pokud by se skutečně uplatňovala hybridizace, lze předpokládat, že rostliny *A. stolonifera* s vyšší ploidií se budou vyskytovat na stanovištích, kde rostou i jiné druhy rodu *Agrostis* a kde jsou porušeny přirozené bariéry bránící mezidruhovému křížení.

Ze získaných výsledků nelze vyvodit žádné geografické vazby jednotlivých ploidií, je však zajímavé, že ve vysokohorských polohách sudetských pohoří se zatím podařilo zaznamenat jen výskyt hexaploidních jedinců. Tento fakt však může plynout z malého počtu vzorků. Pokud by se však dalším výzkumem skutečně potvrdil výskyt pouze hexaploidních jedinců, mohl by být další ukázkou rozdílného osidlování biotopů nižšími a vyššími ploidií. Tyto závěry jsou však velmi spekulativní a je třeba rozšířit počet pozorování z této oblasti.

Je zajímavé, že rostliny z jihomoravských slanisek se vyznačují některými odlišnými znaky, které si zatím udržují i během pěstování na pokusném pozemku ve stejných podmínkách s rostlinami z ostatních lokalit. Mají jiný vzrůst, šedé listy, které jsou štětinovité, ± svinuté, s poměrně ostrou špičkou. Podle dosavadních výsledků všechny studované rostliny z jihomoravských slanisek mají 28 chromozomů, jedná se tedy o tetraploidní populace. Bylo by vhodné provést morfometrická šetření a posoudit možnost případného posuzování tohoto typu jako vnitrodruhového taxonu *Agrostis stolonifera*. Je zajímavé, že fyziognomií v podstatě odpovídají popisu *Agrostis stolonifera* subsp. *maritima*. Takto označil Dostál (1989) nápadně

odlišné zavlečené rostliny z ostravských hald, u kterých uvádí jako oblast původního výskytu písčité pobřeží Severního a Baltského moře.

Z dosavadních výsledků dále vyplývá, že ostatní poddruhy popisované Dostálem (1989), tj. subsp. *stolonifera* a *prorepens*, se nejeví jako samostatné nižší taxony. Podařilo se dokázat, že stejnému morfotypu odpovídají různé ploidie a zdá se, že některé znaky jako např. mohutnost rostlin a zejména míra výběžkatosti závisí na faktorech prostředí (nejspíš obsahu živin v půdě). Jedná se tedy spíše o různé morfologicky odlišné ekotypy.

7 Závěr

Tato studie poskytuje základní informace o výskytu různých ploidních úrovní *Agrostis stolonifera* na území České republiky. Podařilo se zaznamenat výskyt 3 ploidních úrovní v České republice a 2 ploidních úrovní z území Slovenské republiky. Na několika lokalitách se vyskytovaly dvě ploidní úrovně v jedné populaci, na jedné lokalitě pak všechny tři zaznamenané ploidie. Všechny tři stupně ploidie jsou rozšířené víceméně po celém území České republiky. Z výsledků této práce nejsou patrné morfologické, ekologické ani geografické vazby zjištěných ploidii. Na základě výsledků některých publikovaných studií však nelze vyloučit, že se jednotlivé ploidní úrovně neuplatňují na rozdílných biotopech ve stejné míře.

Další výzkum by měl zahrnovat rozšíření poznatků o *Agrostis stolonifera* (zejména rozšíření počtu vzorků) a posouzení morfologicky stabilních tetraploidních populací, které se vyskytují na jihomoravských slaniskách. Dalším cílem je rozšířit výzkum o aplikaci průtokové cytometrie také na většinu ostatních druhů rodu *Agrostis* vyskytujících se na území ČR a výsledky publikovat. Získání poznatků o ploidní úrovni jednotlivých druhů by mohlo vnést jasnější náhled zejména na problematiku vnitrodruhových taxonů. Výsledky budou využity při zpracování rodu *Agrostis* v České republice, které bude publikováno v díle Květena ČR.

8 Literatura

- Albers F.(1998): Chromosomenatlas. In: Haeupler H. et Wisskirchen R.: Standardliste der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. – Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart.
- Aston J. L. (1962): Evolutionary divergence in the *Graminae*, with special reference to *Agrostis stolonifera* L. – Ph. D. thesis, University College of North Wales, Bangor [non vidi].
- Barrett S. Ch. (1989). In: Otte D. et Endler J. A. [eds.]: Speciation and its Consequences. – Sinauer [non vidi].
- Björkman S. O. (1954): Chromosome studies in *Agrostis* II. – *Hereditas* 40 (2), 254–258.
- Bonos S. A., Plumley K. A. et Meyer W. A. (2002): Ploidy determination in *Agrostis* using flow cytometry and morphological traits. – *Crop Science* 42 (1), 192–196.
- Briggs D. et Walters S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. – Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc – [český překlad Havránek P., Rybka V. et Konvička M.].
- Clayton W. D. et Renvoize S. A. (1986): Genera graminum. Grasses of the world. – Her Majesty's Stationery Office, London [non vidi].
- Conert H. J.(1989). In: Hegi G.: Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Lieferung 5, Juli '89, Band I, Teil 3. – Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- Cruzan M. B. et Arnold M. L. (1993): Ecological and genetic associations in an *Iris* hybrid zone. – *Evolution* 47: 1432–1445.
- Davies E. (1953): The breeding affinities of some British species of *Agrostis*. – *British Agricultural Bulletin* 5: 313–316 [non vidi].
- Delevoryas T. (1980): Polyploidy in gymnosperms. In: Lewis W. H. [ed.]: Polyploidy: biological relevance. – Plenum Press, New York [non vidi].
- Dobeš Ch. et Vitek E. (2000): Documented Chromosome Number Checklist of Austrian Vascular Plants. – Verlag des Naturhistorischen Museums Wien, Wien.
- Doležel J. (1991): Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. – *Phytochemical Analysis* 2: 143–154.
- Doležel J. (1997): Application of flow cytometry for the study of plant genomes. – *Journal of Applied Genetics* 38: 285–302.
- Doležel J. (2003): DNA Flow Cytometry principles and applications (<http://www.ueb.cas.cz/Olomouc1/lcgcm/index.htm>).

- Doležel J., Binarová P. et Lucretti S. (1989): Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. – *Biologia Plantarum* (Praha) 31 (2): 113–120.
- Dostál J. (1989): *Nová květena ČSSR II.* – Academia, Praha.
- Emms S. K. et Arnold M. L. (1997): The effect of habitat on parental and hybrid fitness: transplant experiments with Louisiana irises. – *Evolution* 51: 1112–1119.
- Frey L. (1997): Karyology of the genus *Agrostis* (*Poaceae*) – a review. – *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 42 (2), 361–400.
- Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P. et Firoozabady E. (1983): Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. – *Science* 220: 1049–1051.
- Garcke A. (1972): *Illustrierte Flora (Deutschland und angrenzende Gebiete).* – Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- Gaut B. S. (2001): Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses. – *Genome Research* 11(1): 55–66 [non vidi].
- Grant V. (1981): *Plant Speciation.* – Columbia University Press, New York [non vidi].
- Heller F. O. (1973): DNS- Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometric. – *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86: 437–441 [non vidi].
- Huang S., Sirikhachornkit A., Su X., Faris J., Gill B., Haselkorn R. et Gornicki P. (2002): Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/ Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (12): 8133–8138.
- Johnson M. A. T., Kenton A. Y., Bennett M. D. et Bradham P. E. (1989): *Voaniola gerardii* has the highest known chromosome number in the monocotyledons. – *Genome* 32: 328–333 [non vidi].
- Jones K. (1956): Species differentiation in *Agrostis*. II. The significance of chromosome pairing in the tetraploid hybrids of *A. canina* subsp. *montana* Hartm., *A. tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. – *Journal of Genetics* 54: 377–393 [non vidi].
- Kellogg E. A. (1990): Variation and species limits in agamospermous grasses. – *Systematic Botany* 15: 112–123.

- Khandelwal S. (1990): Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. – Botanical Journal of the Linnean Society 102: 205–217 [non vidi].
- Kik C., Jongman M. et Van Andel J. (1991): Variation of Relative Growth Rate and Survival in Ecologically Contrasting Populations of *Agrostis stolonifera*. – Plant Species Biology 6, 47–54.
- Kik C., Linders T. E. et Bijlsma R. (1992): The distribution of cytotypes in ecologically contrasting populations of the clonal perennial *Agrostis stolonifera*. – Evolutionary trends in plants 6 (2), 93–98.
- Kik C., Linders T. E. et Bijlsma R. (1993): Ploidy level and somatic chromosome number variation in *Agrostis stolonifera*. – Acta Botanica Neerlandica 42 (1), 73–80.
- Kik C., Van Andel J. et Joenje W. (1990b): Life-history variation in ecologically contrasting populations of *Agrostis stolonifera*. – Journal of Ecology 78, 962–973.
- Kik C., Van Andel J., Van Delden W., Joenje W. et Bijlsma R. (1990a): Colonization and differentiation in the clonal perennial *Agrostis stolonifera*. – Journal of Ecology 78, 949–961.
- Krahulcová A. (1998): Karyologie cévnatých rostlin při aplikaci metod klasického barvení chromozómů. – Průhonice (<http://botany.natur.cuni.cz/pdf/karyologie.pdf>).
- Lawton-Rauh A. (2003): Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. – Molecular Phylogenetics and Evolution 29: 396–409.
- Levin D. A. (1983): Polyploidy and novelty in flowering plants. – The American Naturalist 122 (1), 1–25.
- Levy A. A. et Feldman M. (2002): The impact of polyploidy on grass genome evolution. – Plant Physiology 130: 1587–1593.
- Löve Á. et Löve D. (1948): Chromosome numbers of northern plant. – Ingólfsprent, Reykjavík.
- Löve Á. et Löve D. (1961): Chromosome numbers of Central and Northwest European plant species. – Opera Botanica 5: 1–581.
- Mable B. K. (2003): Breaking down taxonomic barriers in polyploidy research. – Trends in Plant science 8 (12): 582–590.
- Májovský J. et al. (1987): Karyotaxonomický prehľad flóry Slovenska. – Veda, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava.

- Masterson J. (1994): Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. – *Science* 264: 421–423.
- Měsíček J. et Jarolímová V. (1992): List of chromosome numbers of the Czech vascular plants. – Academia, Praha.
- Ormerod M. G. (1994): Flow Cytometry. – *Microscopy Handbooks* 29. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Otto S. P. et Whitton J. (2000): Polyploid incidence and evolution. – *Annual Review of Genetics* 34: 401–437.
- Rodriguez D. J. (1996): A model for the establishment of polyploidy in plants. – *American Naturalist* 147: 33–46.
- Rothmaler W. (2002): *Exkursionsflora von Deutschland. Band 4. Gefäßpflanzen: Kritischer Band.* – Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Segraves K. A. et Thompson J. N. (1999): Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. – *Evolution* 53 (4): 1114–1127.
- Soltis D. E., Soltis P. S. et Tate J. A. (2003): Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. – *New Phytologist* 161: 173–191.
- Stebbins G. L. (1971): *Chromosomal evolution in higher plants.* – Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.
- Stuckey I. H. et Banfield W. G. (1946): The morphological variations and the occurrence of aneuploids in some species of *Agrostis* in Rhode Island. – *American Journal of Botany* 33: 185–190.
- Suda J. (2004): An employment of flow cytometry into plant biosystematics. PhD. Thesis. – Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Botany.
- Thompson J. D. et Lumaret R. (1992): The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. – *Trends in Ecology & Evolution* 7 (9): 302–307.
- Tutin T. G.: *Agrostis L.* – In: Tutin T. G. Heywood V. H. Burges N. A. Moore D. M. Valentine D. H. Walters S. M. et Webb D. A. [ed.]: *Flora Europaea. Volume 5 (Alismataceae to Orchidaceae).* – Cambridge University Press.
- Uhl C. H. (1978): Chromosomes of Mexican *Sedum*. II. Section *Pachysedum*. *Rhodora* 80: 491–512 [non vidi].

Widén K.-G. (1971): The genus *Agrostis* L. in eastern Fennoscandia. Taxonomy and distribution.
– Flora Fennica 5. Helsingfors, Helsinki.

Přílohy

Příloha 1: Seznam lokalit

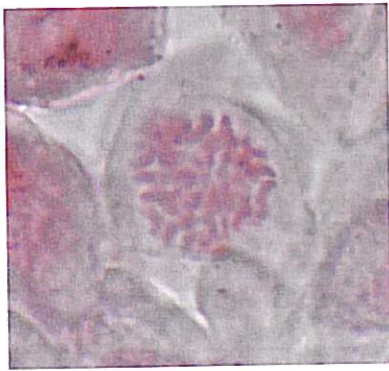
číslo lokality	fytochorion ČR	kvadrant	lokalita	ploidie	počet analyzovaných rostlin
1	11a	5754d	Lysá nad Labem: okraj silnice vedoucí k psinci 1,5 km SZ železniční stanice; 2:15 m n. m.; 50°12'28" N, 14°49'55" E; 13.9.2003	6x	1
2	12	5653c	Mělnická Vrutice: cesta v PR Polabská čerňava 250 m ZJZ od železniční zastávky; 185 m n. m.; 50°20'32" N, 14°32'38" E; 13.9.2003	6x	1
3	12	5653c	Mělnická Vrutice: okraj silnice v obci, 300 m SV od železniční zastávky; 190 m n. m.; 50°20'43" N, 14°32'58" E; 13.9.2003	6x	1
4	12	5653c	Velký Borek: okraj silnice v obci; 175 m n. m.; 50°20'39" N, 14°31'03" E; 13.9.2003	6x	1
5	15c	5959a	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce; 233 m n. m.; 50°04'42" N, 15°34'52" E; 24.7.2003	5x	5
6	15c	5961c	Pardubice, Spojil: okraj lesní cesty ca 1,5 km V kaple v obci; 230 m n. m.; 50°02'32" N, 15°50'32" E; 25.7.2003	5x	1
7	15c	5961c	Pardubice, Veská: písčivna při okraji lesa ca 600 m SSZ obce; 230 m n. m.; 50°02'42" N, 15°51'14" E; 25.7.2003	6x	3
8	17a	7165c	Dobré Pole: PR Slanisko Dobré Pole na JZ okraji obce, porost mezi rybníčkem a cestou oddělující fotbalové hřiště; 180 m n. m.; 48°49'20" N, 16°31'54" E; 23.8.2002	4x	1
9	18a	7166c	Bulhary: cesta v louce k NPR Křivé jezero ca 2 km SZ obce; 170 m n. m.; 48°50'40" N, 16°43'40" E; 29.5.2003	6x	1
10	18a	7266a	Sedlec: NPR Slanisko u Nesytů, louka pod železniční zastávkou; 175 m n. m.; 48°46'33" N, 16°41'50" E; 23.8.2002	4x	2
11	18b	7068d	Ratíškovice: břeh rybníčku Hlaniček na JZ okraji obce; 210 m n. m.; 48°55'02" N, 17°09'31" E; 30.5.2002	4x	1
12	24a	5840d	Hájek: PR SOOS, porost u Císařského pramene 0,5 km SV obce; 430 m n. m.; 50°08'57" N, 12°25'01" E; 19.5.2003	4x	1
13	32	6048a	Zvíkovec: okraj zeleně značené turistické lesní cesty 0,7 km JV od obce; 345 m n. m.; 49°57'00" N, 13°41'46" E; 25.9.2003	4x	2
14	32	6048c	Podmokly: okraj zeleně značené polní cesty 0,5 km SSZ od obce; 380 m n. m.; 49°56'49" N, 13°42'03" E; 25.9.2003	4x	1
15	35b	6549b	Vyšice: okraje lesní cesty ca 500 m S od osady Chrástí; 505 m n. m.; 49°27'52" N, 13°59'56" E; 30.7.2003	4x / 5x / 6x	3 / 2 / 6

16	36a	6548b	Lnáře: SZ část dna protřezného rybníka Podhájský v obci; 460 m n. m.; 49°27'20" N, 13°47'12" E; 21.6.2003	4x / 5x	1 / 2
17	37e	6747b	Hejná: cesta při okraji lesa na Z úpatí vrchu Pučanka ca 1,25 km JJZ obce; 517 m n. m.; 49°16'52" N, 13°39'56" E; 18.7.2003	4x	1
18	37k	7051d	Bohouškovice: okraj cesty u posledního stavení na S okraji cesty; 535 m n. m.; 48°55'28" N, 14°18'48" E; 21.8.2003	4x	1
19	37k	7051d	Chmelná: v obci; 545 m n. m.; 48°56'06" N, 14°16'44" E; 21.8.2003	5x	1
20	37k	7051d	Rojšín: ruderál u JZ cípu návsi; 550 m n. m.; 48°54'54" N, 14°15'02" E; 22.8.2003	6x	1
21	37l	7251c	Světlík: porost v rybníku Světlík 0,5 km SSV od obce; 740 m n. m.; 48°44'08" N, 14°12'46" E; 27.8.2002	6x	1
22	38	6750c	Sudoměř u Písku: vlhká cesta pod hrází rybníka Škaredý, ca 950 m JV železniční zastávky v obci; 380 m n. m.; 49°14'38" N, 14°04'04" E; 30.11.2003	5x	1
23	38	7052c	Hradce: břeh rybníku 400 m JZ od obce; 485 m n. m.; 48°55'55" N, 14°21'24" E; 17.8.2003	5x	1
24	38	7052c	Hradce: pole 0,5 km J od obce, 300 m SZ od vrchu Švehlavy (519,2); 500 m n. m.; 48°55'46" N, 14°21'32" E; 17.8.2003	6x	1
25	38	7052c	Hradce: rybník 400 m JZ od obce; 485 m n. m.; 48°55'55" N, 14°21'24" E; 17.8.2003	6x	2
26	39	7053b	Kaliště: vlhká louka ca 1 km VJV obce; 500 m n. m.; 48°57'42" N, 14°35'16" E; říjen 2001	5x	1
27	39	6854a	Vlkov: cesta kolem pískovny na levém břehu Lužnice ca 1,1 km kaple v obci; 410 m n. m.; 49°09'22" N, 14°42'33" E; 23.11.2003	6x	1
28	39	6854a	Vlkov: okraj pole poblíž Vlkovského přespou, ca 950 m SZ kaple v obci; 410 m n. m.; 49°09'26" N, 14°42'45" E; 23.11.2003	6x	1
29	39	7054b	Branná: okraj lesní cesty ca 2 km JZ kostela v obci; 456 m n. m.; 48°57'10" N, 14°45'41" E; 7.8.2003	4x / 6x	1 / 1
30	39	7154a	Horusice: kaluž v luční cestě východně od rašeliníště Ruda ca 3 km JV železniční zastávky Horusice; 420 m n. m.; 49°08'52" N, 14°41'37" E; 23.11.2003	4x	1
31	66	6260c	Bílék: 0,5 km JJV od kostela, za ohybem červené turistické značky na východ, na cestě; 535 m n. m.; 49°42'02" N, 15°44'07" E; 24.7.2003	6x	1
32	67	6548d	Ústrašín: prameniště v louce ca 1,7 km JZ kostela v obci; 570 m n. m.; 49°22'25" N, 15°08'48" E; 5.10.2003	5x	1
33	67	6856d	Lomy: okraj cesty ca 250 m JV železniční zastávky Kunžak; 608 m n. m.; 49°06'36" N, 15°09'50" E; 8.8.2003	5x	1

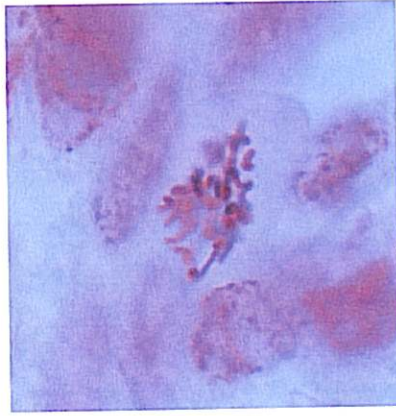
34	67	6858d	Hříšice: lesní cesta ca 1,8 km S kostela v obci; 540 m n. m.; 49°07' N, 15°29' E; 10.8.2002	5x	1
35	67	6956c	Nový Vojňov: lesní cesta ca 750 m Z hotelu Peršlák; 500 m n. m.; 49°01'14" N, 15°00'54" E; 9.8.2003	5x	1
36	67	6958a	Dolní Němčice: zemědělský areál na severním okraji obce; 530 m n. m.; 49°05'58" N, 15°23'45" E; 10.8.2002	4x	1
37	73b	6167a	Zábřeh: bývalá pískovna na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie; 285 m n. m.; 49°52'26" N, 16°52'28" E; 10.8.2003	4x / 6x	2 / 2
38	88b	7047b	Šumava, Bučina: prameniště při cestě u zaniklé osady Chaloupky ca 1,6 km JV hraničního přechodu; 1052 m n. m.; 48°57'24" N, 13°35'53" E; 17.7.2003	5x	1
39	88d	7266a	Stožec: smrkový les ca 2,4 km SSV železniční zastávky; 980 m n. m.; 48°52'44" N, 13°50'00" E; 2.11.2003	4x	1
40	88g	7251c	Světlík: okraj zeleně značené turistické cesty 1,3 km JZ od obce; 775 m n. m.; 48°43'30" N, 14°11'44" E; 27.8.2002	6x	1
41	93b	5260c	Krkonoše, Luční bouda: okraj cesty 0,5 km SV Luční boudy; 1425 m n. m.; 50°44'10" N, 15°42'12" E; 27.7.2003	6x	1
42	93b	5260c	Krkonoše, Luční bouda: vyschlá mokřina u dřevěné lávky na Úpském rašeliništi, 1km SV Luční boudy; 1440 m n. m.; 50°44'15" N, 15°42'38" E; 27.7.2003	6x	1
43	97	5868d	Jeseníky, Červenohorské sedlo: trávník na pravé straně silnice vedle rozcestníku u dřevěné boudy; 1000 m n. m.; 50°07'32" N, 17°09'17" E; 11.8.2003	6x	6
44	97	5969a	Praděd: levý okraj červeně značené tur. cesty z Pradědu, ca 800 m JZ od vrcholu (za odbočkou modré tur. značky); 1415 m n. m.; 50°04'41" N, 17°13'13" E; 11.8.2003	6x	1

číslo lokality	země	lokalita	ploidie	počet analyzovaných rostlin
1	SR	Vernár: luční cesta ca 50 m JV železniční zastávky Vernár; 940 m n. m.; 48°52'55" N, 20°14'15" E; 20.8.2003	4x	1
2	SR	Závod: louky ve východní části rezervace Abrod ca 600 m J železniční zastávky Závod; 160 m n. m.; 48°31'30" N, 17°00'20" E; 22.8.2002	4x / 5x	1 / 1

Příloha 2: Fotografie chromozomů



Tetraploid- $2n = 4x = 28$ (lokalita č. 11)



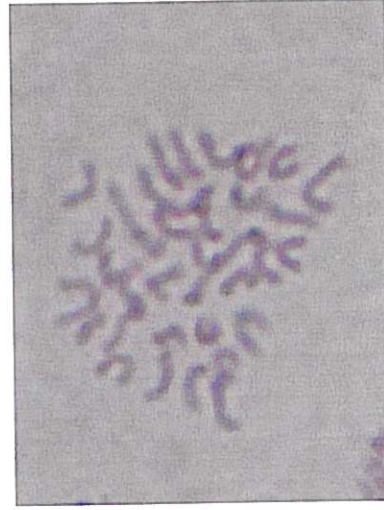
Tetraploid- $2n = 4x = 28$ (lokalita č. 8)



Tetraploid- $2n = 4x = 28$ (lokalita č. 36)



Pentaploid- $2n = 5x = 35$ (lokalita č. 15)



Pentaploid- $2n = 5x = 35$ (lokalita č. 15)



Hexaploid- $2n = 6x = 42$ (lokalita č. 31)

Příloha 3: Protokol z průtokového cytometru

parazitologie

COULTER(R) EPICS(R) Listmode Replay Flow Cytometry Report
C:\XL\LMD\LMD\Z0007028.LMD, XL V4025, Run time protocol

03Dec03 12:14:31

kytky-M11an

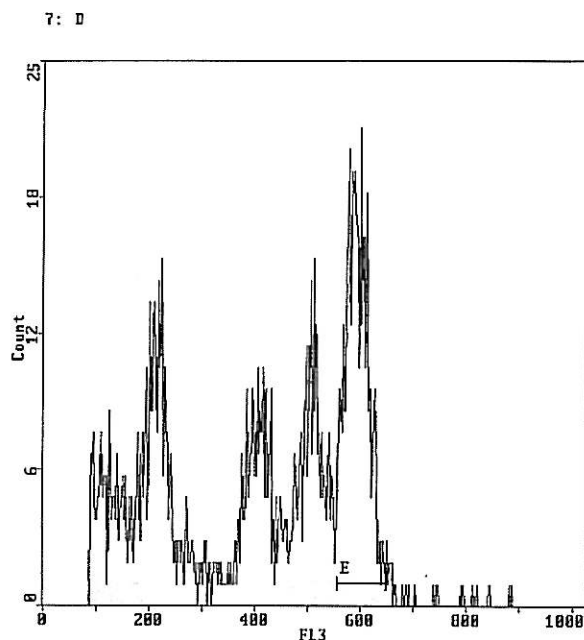
Z0007028

Agrostis4E

DP ID: TO

377 seconds, 136549 events

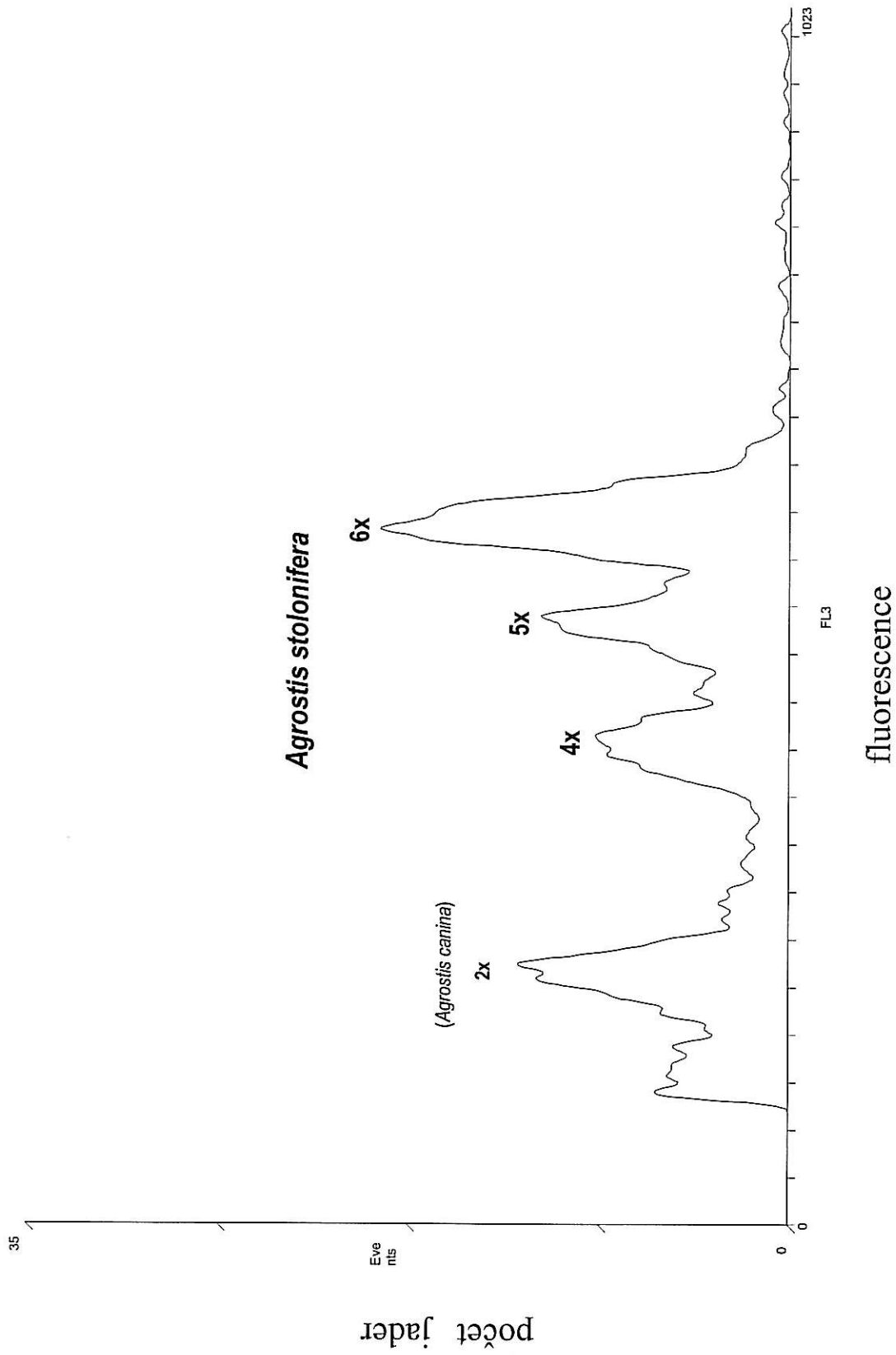
Manual Stop



Stats: Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Med X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max	Min X
7	E E	28.3	1050	592.4	576.0	25	0.42	556.0	648.0	594.2

Příloha 4: Histogram z průtokové cytometrie



Příloha 5: Mapa zjištěných ploidních úrovní *Agrostis stolonifera* v České republice

