

→ Hroda

Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Bakalářská práce

1996

MARTINA ODVODYOVÁ

Karyologická diferenciace

Achillea millefolium

na hadcovém podkladu

na Českomoravské vrchovině.

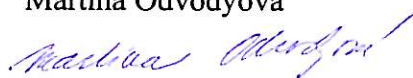
Vedoucí práce: RNDr. Lubomír Hrouda, CSc.

Konzultant: RNDr. Jindřich Chrtek

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala
samostatně, pouze s pomocí uvedené literatury.

16. května 1996

Martina Odvodyová



Ráda bych poděkovala svému školiteli, Dr. L. Hroudovi, dále pak Dr. J. Chrtkovi ml. z Botanického ústavu AV v Průhonicích za laskavé vedení práce a cenné rady, Mgr. M. Štechovi za pomoc při odběru rostlin v terénu. Děkuji také všem zahradníkům v Průhonicích za zalévání řebříčků a Šárce Jahodové za pomoc při zpracování příloh.

ÚVOD

Do souhrnného druhu (species collectiva) *A. millefolium* L. patří většina našich českých řebříčků. Po fylogenetické stránce se tato velká skupina rozpadá ve dva hlavní typy: *tanacetifolia* a *millefolium* (SPUDILOVÁ, 1956). Nelze tu mluvit o druzích nebo mikrospeciích, protože i když jsou obě skupiny v typických exemplářích velmi rozdílné morfologicky, existuje mezi nimi plynulá řada přechodných typů, tedy takových, které nesou některé z charakteristických znaků obou skupin a nejsou původu hybridního (DABROWSKA, 1982). Kromě toho nejsou zvláště charakterizovány geograficky. Nejdůležitější morfologické rozlišovací znaky v této skupině jsou typy a způsoby dělení listů, tvar a hustota úkrojků a šířka a zubatost listového větene (SPUDILOVÁ, 1956). Tato skupina je extrémně variabilní, téměř každý jedinec je jiný. Těžko lze zachytit kombinaci znaků, která by charakterizovala relativně stálou kvalitativní odlišnost jednotlivých typů. Souhrnný druh *Achillea millefolium* je polyploidní komplex, který zahrnuje diploidní, tetraploidní, hexaploidní a oktoploidní typy. Základní chromozómové číslo je $n=9$ (EHRENDORFER, 1959).

A. millefolium je z ekologického hlediska velmi nenáročný druh. Obsazuje relativně vlhká stanoviště, louky, pastviny, trávníky, okraje křovin, příkopy cest, sutě, jeho ekologická amplituda zahrnuje vlhká místa až suchá stanoviště.

A. millefolium (species collectiva) obsahuje tyto evropské a euroasijské druhy (EHRENDORFER, 1973):

A. setacea W. et K. (diploid)

A. asplenifolia (tetraploid) Vent.

A. roseo-alba EHRENDF. (di- a tetraploid)

A. collina J. BECKER ex RCHB. (tetraploid)

A. millefolium L. (hexaploid)

A. distans W. et K. ex WILLD. (hexaploid)

A. stricta SCHLEICHER ex GREMLI (hexaploid)

A. pannonica SCHEELE (oktoploid).

Ehrendorfer tedy rozlišuje jednotlivé druhy tohoto příbuzenstva nejen podle morfologických znaků, ale i podle ploidie. Vznik druhu *A. millefolium* nebyl přes rozsáhlé výzkumy dosud uspokojivě vysvětlen. Analýzy karyotypu ukázaly rozsáhlé homologie všech druhů tohoto příbuzenstva (DABROWSKA, 1989).

V současné době vlastně neexistuje uznávané pojetí dělení agregátu *A. millefolium*, v rámci příbuzenstva nejsou striktně rozčleněny podruhy. d/

Byl vysloven předpoklad, že hexaploidní typy jsou většinou synantropnějšího charakteru (EHRENDORFER, 1959), měly by se tedy vyskytovat na stanovištích většinou vytvořených člověkem, kolem cest, na pastvinách, sečených loukách a podobně. Naproti tomu na hadcích by měly vegetovat refugiální, fylogeneticky původnější a hlavně tetraploidní typy. Pokud by platil předpoklad vazby ploidie na hadcový či nehadcový podklad a tím vlastně i vazby typů z příbuzenstva *A. millefolium* na podloží, měla by většina vzorků ze studovaných hadcových lokalit být tetraploidní.

S tímto souvisí i úvaha o evolučním stáří hexa- a tetraploidních typů. Protože hadce procházely v holocénu stabilním geologickým vývojem, nebyly nikdy zalesněny a jsou tedy v porovnání se zalesněnými stanovišti konzervativnějším podkladem, dá se usuzovat, že tetraploidní jedinci vyskytující se na těchto lokalitách by měli být evolučně starší. Neexistují však žádné vědecké podklady, které by vyloučily, že se nejedná o rostliny zavlečené z jiných okolních substrátů.

CÍL PRÁCE

Ve sledovaném území se ostrůvkovitě vyskytují hadce mezi jiným podkladem. V materiálu odebraném v těchto lokalitách je současně i změna karyologické diference druhu *Achillea millefolium*. Moje práce má zejména zjistit:

- A) zda existuje vztah mezi karyologickou diferenciací a vazbou na podklad
- B) zda existuje tok genů mezi populacemi jednotlivých ploidii.

MATERIÁL A METODY

Chromozómy lze opticky sledovat při mitóze či meiozi. Pro můj materiál z kořenových meristémů je důležité mitotické dělení. Při něm dochází v buňkách ke změnám, které vedou nakonec k vytvoření dvou dceřiných jader. Životní cyklus jádra je rozdělen do pěti fází. Jsou to: profáze, metafáze, anafáze, telofáze a interfáze, kterou je označováno období, kdy se jádro nedělí, je klidové. V **interfázi** má jádro víceméně kulovitý tvar a chromozómy jsou v tomto stádiu opticky nezjistitelné. Dochází k podélnému dělení chromozómů. Barvitelná část v jádře, chromatin, se skládá z euchromatinu a heterochromatinu, který je barvitelný i v interfázi.

Opticky lze chromozómy sledovat již v první fázi jaderného dělení, v **profázi**, což je způsobeno chemickými změnami v chromozómu (sycení deoxyribonukleovou kyselinou). Chromozómy se stále více spiralizují, zkracují se a jsou zřetelnější. Rozpouští se jaderná membrána a tvoří se achromatické vřetenko. Chromozómy se pak pohybují do středu buňky a shromáždí se v ekvatoriální rovině. Tato fáze se nazývá **metafáze**. Soubor takto sestavených chromozómů nazýváme ekvatoriální deskou. Místa připojení chromozómů na vlákna vřetenka jsou uspořádána centrálně, to poskytuje nejvhodnější přehled o počtu chromozómů. V mikroskopu lze zřetelně pozorovat podélné dělení chromozómů. Právě v této fázi se tvoří figury optimální pro počítání. V **anafázi** dochází k rozchodu jednotlivých polovin chromozómů. Obě poloviny pak postupují k pólům. Jejich počet a tvar zůstal stejný. A konečně v **telofázi** se chromozómy seřazují na pólech dělicího vřetenka. Poté se znovu shlukují a dojde k tvorbě jádra a jaderné membrány.

MATERIÁL

Rostlinky byly odebírány začátkem listopadu na šesti lokalitách, materiál ze zbylých tří lokalit mi byl poskytnut Botanickým ústavem v Průhonicích (Tab.1.)

Tabulka č.1. Určení lokalit.

<i>LOKALITA</i>	<i>FYTOGEOGRAFICKÝ OKRES</i>	<i>MAPA č.</i>
POLNÁ I.	Českomoravská vrchovina	4
POLNÁ II.	Českomoravská vrchovina	4
CHLUMEČEK	Šumavsko-novohradské podhůří	3
ŠELMBERK	Středočeská pahorkatina	1
DOLNÍ KRÁLOVICE	Hornosázavská pahorkatina	5
ŽELEZNÉ HORKY	Hornosázavská pahorkatina	2
STARÉ RANSKO	Hornosázavská pahorkatina	2
TICHONICE	Hornosázavská pahorkatina	5
GULSEN	Rakousko, Steimark, obec Kraubath	

Rostliny byly vysazeny na pokusných plochách v Botanickém ústavu AV v Průhonicích, kde byly pěstovány přes celou zimu. Vzorke pro mikroskopování byly odebrány v dubnu, kdy došlo k vzestupu teplot nad 10°C. Kořenový systém rostlinek byl opatrně oprán a zbaven částec

substrátu a byly z něj ostříhány mladé kořínky, ve kterých se dalo předpokládat začínající dělení buněk.

Zdrojem mitóz a tedy materiálem vhodným pro sledování chromozómů bývají kořenové meristémy, kde nacházíme dělicí se buňky.

METODY

Preparáty byly připravovány **roztakovou metodou**, která vyžaduje fixaci a maceraci, barvení a potom roztlačení skalpelem na přiložené krycí sklíčko (Pazourková, Pazourek, 1960).

Ještě před vlastní fixací jsem použila p-dichlorbenzenu **předpůsobení**. Jde o ovlivnění ještě živého materiálu tak, aby byl získán co největší počet metafází. Jde především o rozrušení dělicího vřeténka, jednotlivé chromozómy jsou uvolněny a dojde tedy k jejich snadnému rozprostření. Na část kořínků bylo působeno p-dichlorbenzenem a na část 1-bromnaftalenem. Předpůsobení trvalo nejméně čtyři hodiny.

Fixace je pochod, při němž má být objekt co nejrychleji a nejšetrněji usmrcen a učiněn odolným proti dalším vlivům. Tekutina, kterou fixujeme, musí buňky usmrcovat co nejrychleji, aby v nich nemohly nastat nekrotické změny. Důležité rovněž je, aby rychle pronikala celým fixovaným objektem. Dále musí všechny detailní struktury zachovávat v původním stavu. Fixačním činidlem byl roztok koncentrované kyseliny octové v ethanolu v poměru 1:3. Vzorky byly fixovány 4 hodiny. Od této chvíle byly vzorky uchovávány v chladničce za konstantní teploty 4 °C.

Macerace je rozrušení středních vrstev buněčné stěny, která spojuje buňky, a ty pak snadno od sebe oddělíme poklepáním nebo tlakem na přiložené krycí sklíčko. Buňky jsou pak prakticky v jedné rovině. Pro maceraci byla použita koncentrovaná kyselina chlorovodíková, zředěná ethanolom v poměru 1:1. Macerace vzorků v tomto roztoku byla prováděna dvě minuty.

Pro **barvení** bylo užito barviva orceinu rozpuštěného v kyselině octové. Řadí se tedy mezi acetobarviva. Ten je vhodný pro čerstvé i pro trvalé preparáty. U orceinu se nevyskytuje přebarvování plazmy a intenzita

zbarvení se dá dobře regulovat. Trvanlivost připraveného roztoku bývá dobrá, pouze je třeba jej občas přefiltrovat. Základní roztok je 1% ve 45% kyselině octové. Chromozómy byly počítány pomocí světelného mikroskopu, při zvětšení 1:1600. Obrázky byly pořízeny pomocí kreslicího přístroje.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Z většiny lokalit byla spočítána ploidie pouze u jedné rostliny pro špatný růst kořenových meristémů, který byl zapříčiněn nepříznivým počasím při odběru z pokusných záhonů či špatnou vitalitou jedinců.

Výsledné ploidie jsou zaznamenány v tabulce č. 2.

<i>LOKALITA</i>	<i>HADCE</i>	<i>PLOIDIE</i>	<i>POČET CHROM.</i>
POLNÁ I.	-	6n	54
POLNÁ II.	+	6n, 4n	54, 36
CHLUMEČEK	+	6n	54
ŠELMBERK	+	6n	54
DOL. KRÁLOVICE	+	6n	54
TICHONICE	+	5n	45
STARÉ RANSKO	+	6n	54
ŽELEZNÉ HORKY	+	6n	54
GULSEN	+	6n	54

Veškerý odebraný materiál patří taxonomicky do jedné skupiny *A. millefolium*, které by mělo být hexaploidní (EHRENDORFER, 1973), přesto byla ve dvou případech napočítána odlišná ploidie než 6n.

Jak je vidět z Tabulky č. 2, většina vzorků je hexaploidních nezávisle na tom, zda pocházejí z hadcové lokality či nikoliv. Žádný vztah mezi ploidii a geologickým podkladem tedy nebyl zjištěn. Hadce tedy pravděpodobně nepůsobí selektivně na typy s různou ploidii.

Zajímavými se jeví výsledky z hadcové lokality Polná II., kde byl nalezen tetraploidní i hexaploidní počet chromozómů. Na této lokalitě by

mohla být předpokládána souvislost s areálem druhu *A. collina*, který je tetraploidní (EHRENDORFER, 1973). Tato rostlina se sem mohla rozšířit z jihu Moravy, kde se běžně nalézá. Odtud by se na sledovanou lokalitu dostala údolími řek.

Na lokalitě Železné Horky byl nalezen pentaploid. Daly by se vyslovit další hypotézy o existenci tohoto typu. Jedná-li se o křížence $4n$ a $6n$, mělo by být zjištěno, zda je to kříženec z první generace potomků, zda se nalézá pouze v místech výskytu tetra- a hexaploidních typů, zda je fertilní, zda je schopen se šířit nezávisle na rodičích a jestli ano, zda se nejedná o samostatný taxon. Zde by měly být vykonány další podrobnější taxonomické studie celých populací, které by měly být prováděny ve vegetační sezóně, proto již v této práci, která probíhala po dobu jedné sezóny, nejsou zahrnuty.

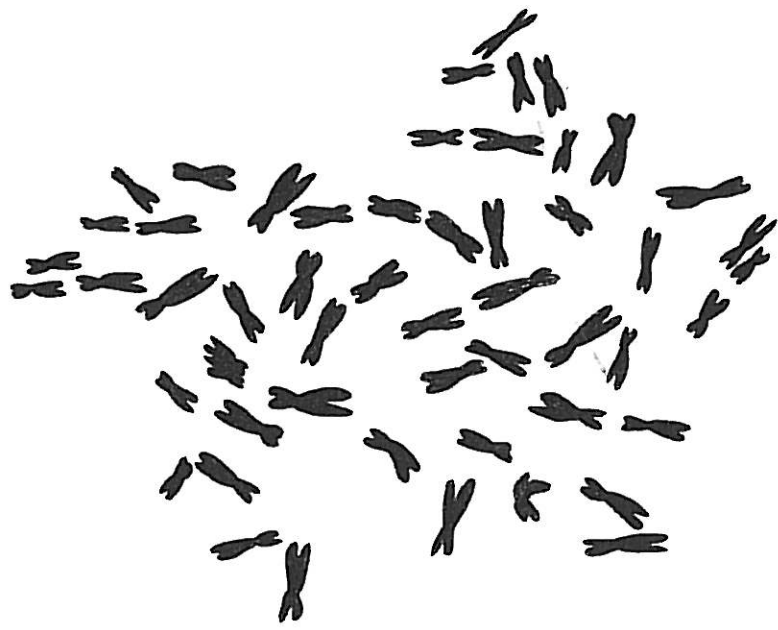
ZÁVĚR

U většiny jedinců odebraných na studovaných lokalitách byl nalezen hexaploidní počet chromozómů, pouze na jedné hadcové lokalitě Polná II. byl nalezen hexaploidní i tetraploidní počet chromozómů. Tento jev se dá vysvětlit různými hypotézami o invazi jiných druhů či toku genů. Na lokalitě Železné Horky byl objeven pentaploid, který by možná mohl být křížencem jedince hexa- a tetraploidního. Byly navrženy další studie populací tohoto pentaploidního typu.

Žádná vazba tetraploidních jedinců na hadcový podklad nebyla prokázána. Vztah mezi ploidií a geologickým podkladem tak, jak byl předpokládán, zřejmě neexistuje.

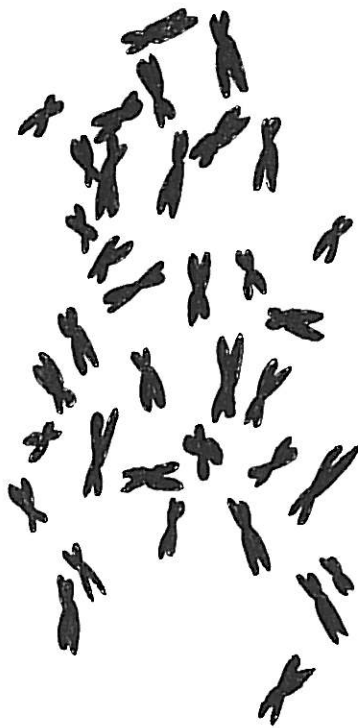
LITERATURA

- BISTE Ch. (1978): Zytotaxonomische Untersuchungen des Formenkreises *Achillea millefolium* (Asteraceae) in der DDR. FEDDES REPERTORIUM, 88 (9-10): 533-613
- DABROWSKA J. (1982): Beobachtungen zur Morphologie der Keimpflanzen von sechzehn Taxa der Gattung *Achillea* L., die die natürlichen Di-, Tetra-, Hexa- und Oktoploidie repräsentieren. FEDDES REPERTORIUM, 93 (1-2): 77-97
- DABROWSKA J. (1989): The chromosome numbers of several taxa of the genus *Achillea*. ACTA SOC. BOT. POLONIAE, 58 (2): 163-177
- EHRENDORFER F. (1959): Mechanismen der Mikro-Evolution bei diploidien und polyploiden Sippen von *Achillea*. BER. DT. BOT. GES., 72 (11-12)
- EHRENDORFER F. (1973): Liste der Gefäßpflanzen Mitteleuropas, Stuttgart
- PAZOURKOVÁ Z., PAZOUREK J. (1960): Rychlé metody botanické mikrotechniky. ČAVZ, Praha
- SPUDILOVÁ V. (1957): Studie k monografii rodu *Achillea* v Československu, IV., V. PŘÍRODOVĚDECKÝ SBORNÍK OSTRAVSKÉHO KRAJE, 18: 101-106, 190-199



10 μ m

Obr.1. Chlumeček - hexaploid



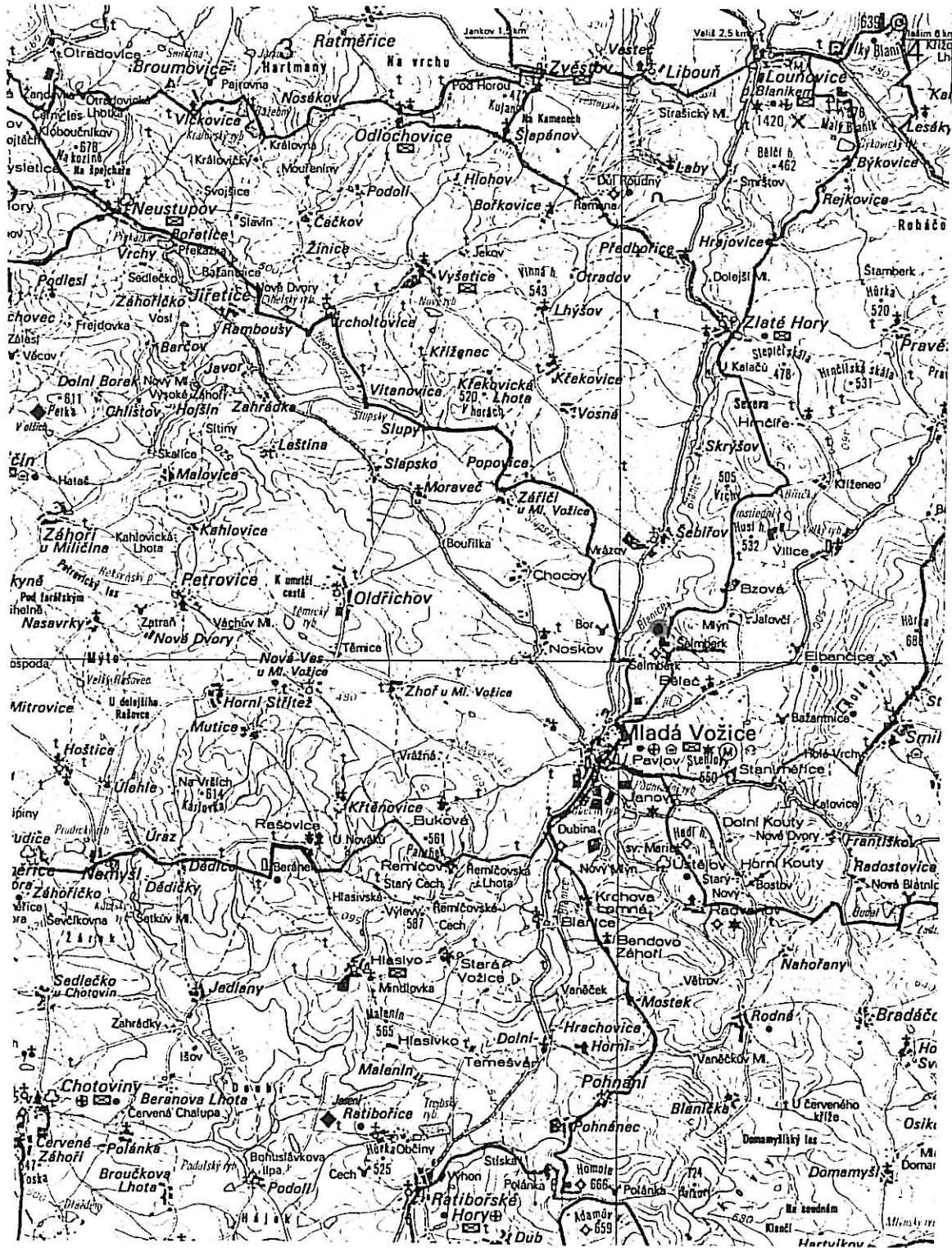
10 μ m

Obr. 2. Polná - tetraploid



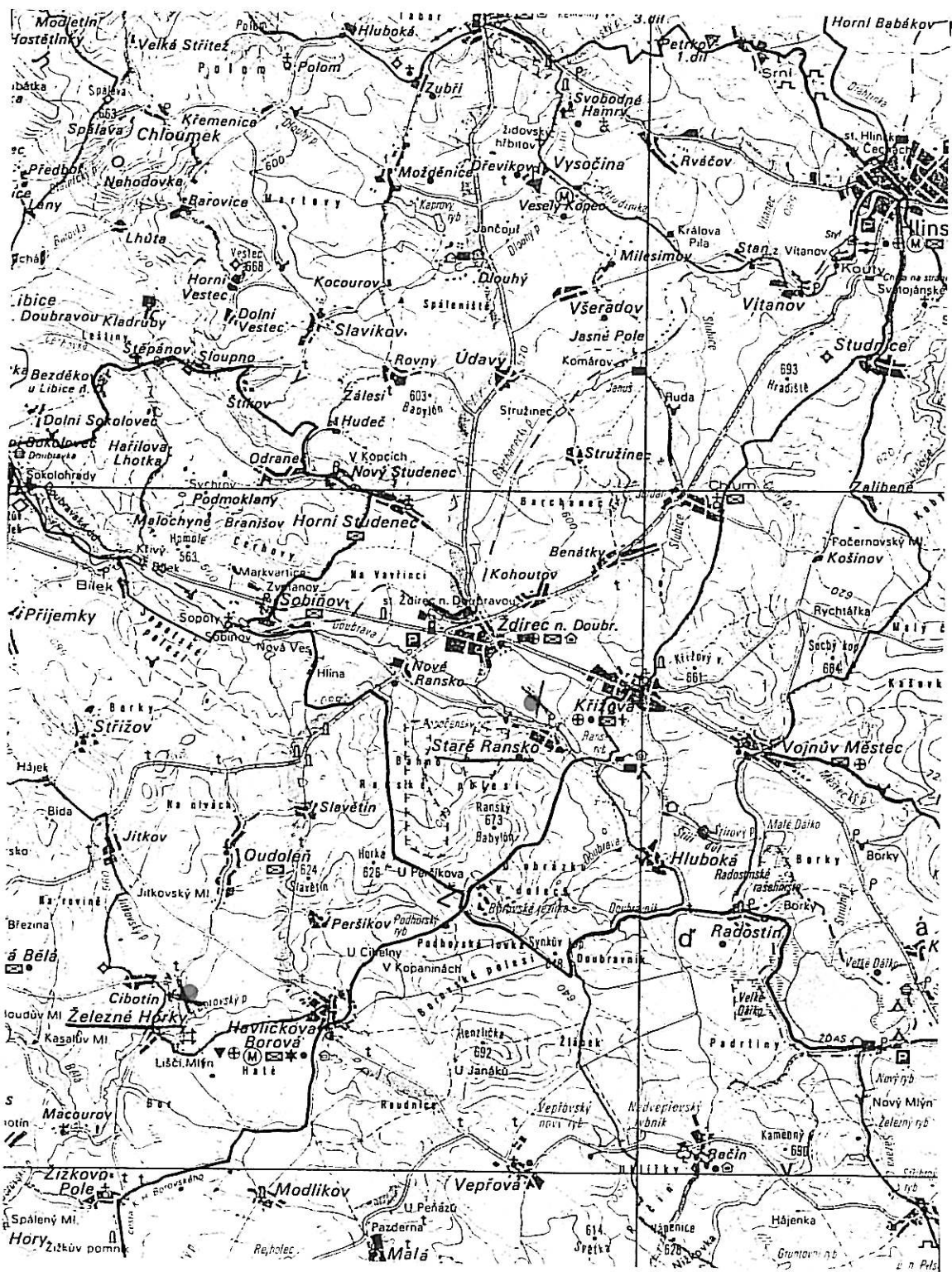
10 μm

Obr. 3. Železné Horky - pentaploid

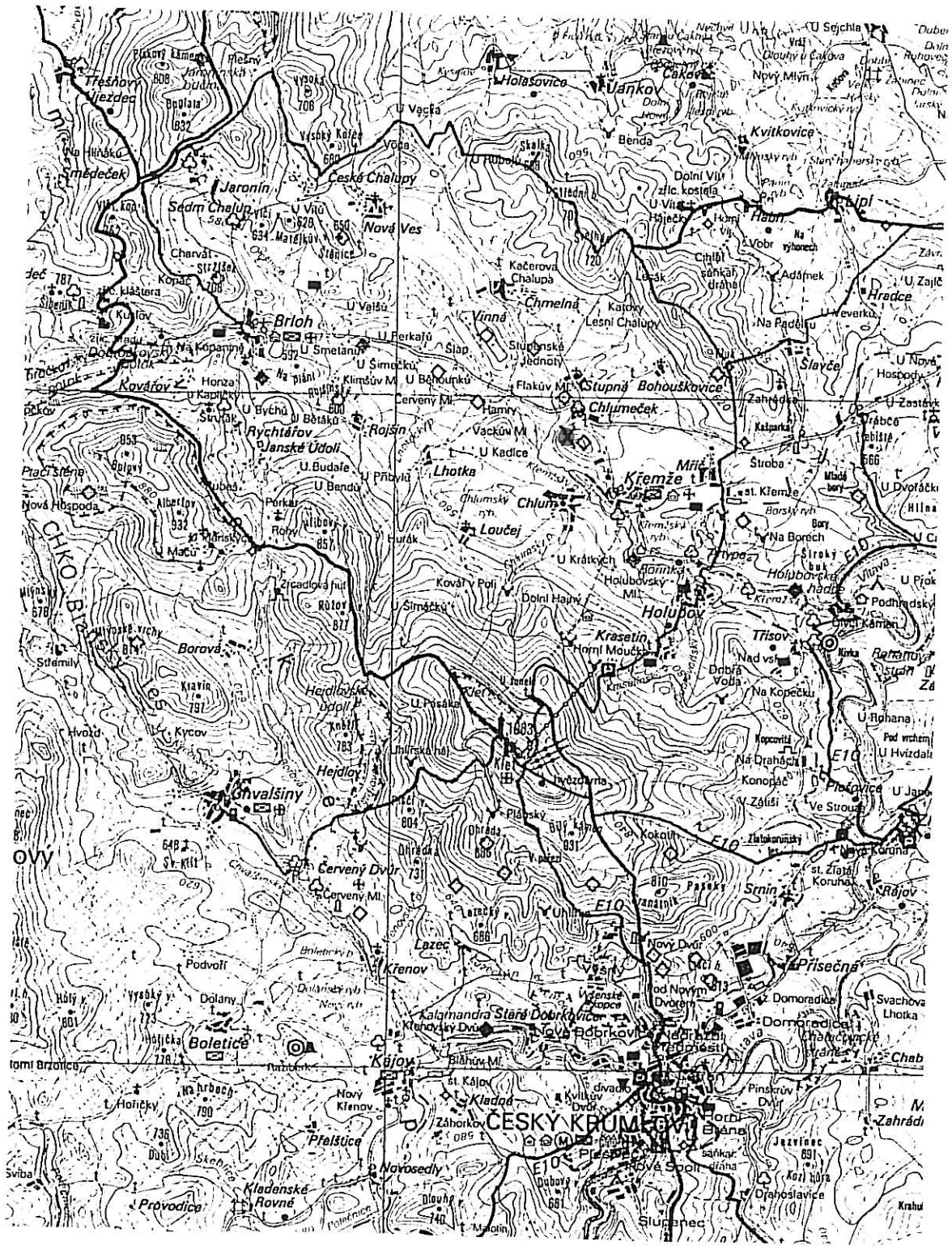


Mapa č. 1. Šelmberek

Měřítko 1:100 000

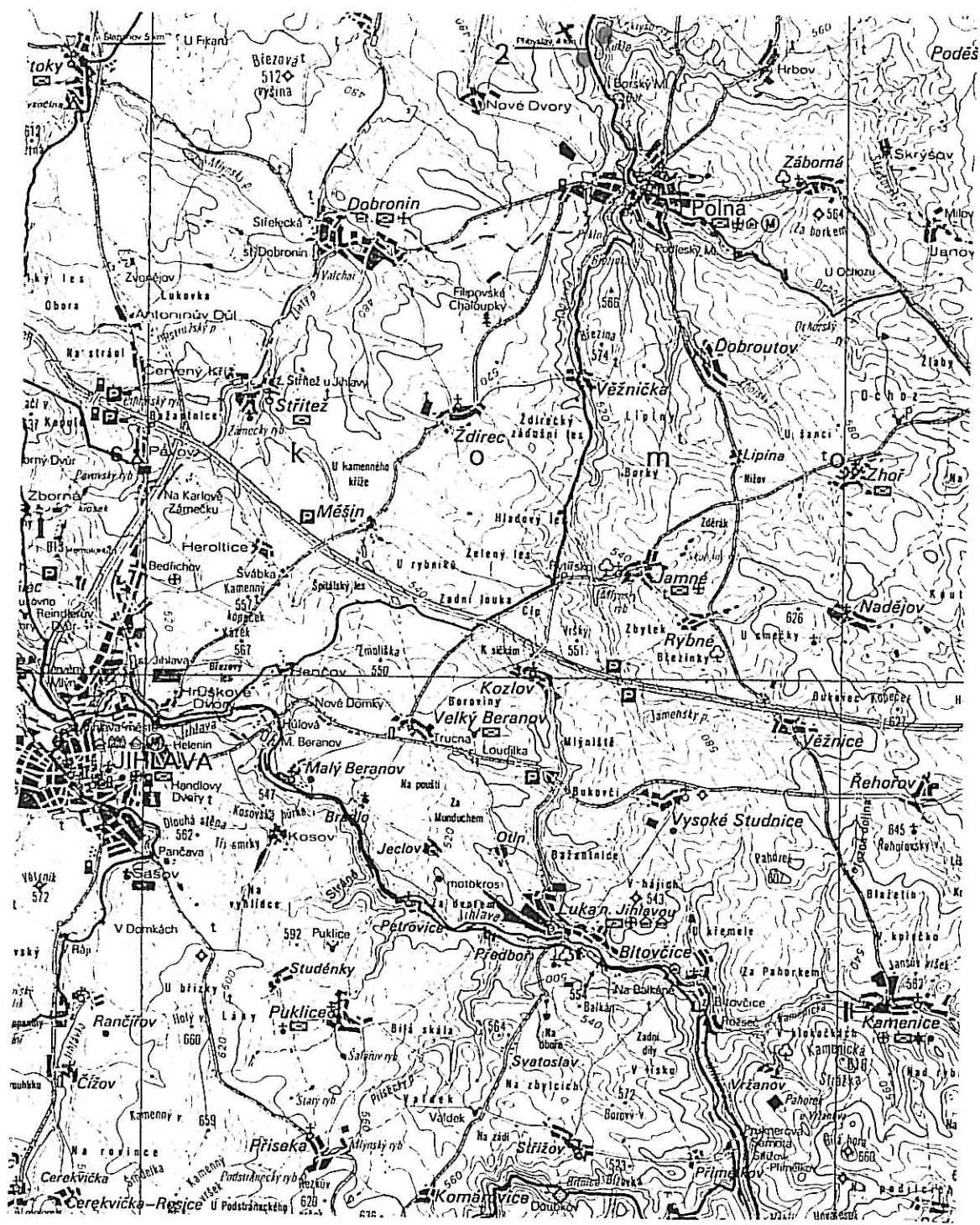


Mapa č. 2. Železné Horky a Staré Ransko Měřítko 1:100 000



Mapa č. 3. Chlumec

Měřítko 1:100 000



Mapa č. 4. Polná I. a Polná II.

Měřítko 1:100 000



Mapa č. 5. Tichonice a Dolní Královice Měřítko 1:100 000