

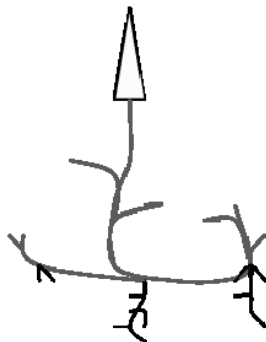
**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta**



**Magisterská diplomová práce**

**Fenotypová plasticita a cytotypy *Agrostis stolonifera*  
v České republice**

**Magdalena Kubešová  
2007**



**vedoucí práce: Ing. Milan Štech, PhD.**

Kubešová, M. (2007): Fenotypová plasticita a cytotypy *Agrostis stolonifera* v České republice. (Magisterská diplomová práce.) [Phenotypic plasticity and cytotypes of *Agrostis stolonifera* in the Czech Republic. – Ms. Thesis, in Czech] – 46 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

## **Anotace**

Presence and range of phenotypic plasticity in the *Agrostis stolonifera* polyploid complex (*Poaceae*) was studied in the territory of the Czech Republic. Plants were cultivated under different experimental conditions. Stomatal size of different *Agrostis stolonifera* cytotypes was measured. Flow cytometry was applied for genome size estimation. Ploidy levels were determined for more than 150 samples of *Agrostis stolonifera* as well as several specimens of *Agrostis canina*, *A. capillaris*, *A. gigantea*, *A. rupestris* and *A. vinealis*. Absolute DNA content was estimated in all studied species. Isozyme analysis was used to test the possibility of the hybrid origin of pentaploid individuals of *Agrostis stolonifera* species.

Tato práce byla podporována grantem Mattoni Awards for Studies of Biodiversity and Conservation Biology 2005 a projektem GAČR 206/07/0706.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2007

---

## Poděkování

Je mou milou povinností poděkovat svému školiteli Milanu Štechovi za pomoc se sběrem dat a zejména za mnohé rady, které mi uděloval v průběhu celého magisterského studia. Vzhledem k jeho pracovnímu vytížení mu pak zejména děkuji za nalezení času, síly a trpělivosti při dokončování této práce.

Děkuji Pavlovi Trávníčkovi z Laboratoře průtokové cytometrie Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích, že mi nejen umožnil ale také mě naučil používat průtokový cytometr. Za značnou pomoc při stanovení velikosti genomu na průtokovém cytometru děkuji Petrovi Vítovi a Tomáši Urfusovi z Laboratoře cytometrie PřF UK.

Petrovi Kouteckému patří velký dík za zvládnutí metody isozymové analýzy ve zbrusu nové Laboratoři molekulární biologie rostlin BF JU a za pomoc při její aplikaci na psinečky. Hlavně si ale cením jeho ochoty poradit mi s čímkoliv od určování rostlin, přes poskytování literatury až po pomoc se zpracováním dat během celého mého studia. Filipovi Kolářovi děkuji za nadšení kdykoli pomoci a jeho babičce patří dík za ušití pytlíčků pro opylovací pokus. Za hladký průběh pokusů jsem vděčná Honzovi Košnarovi a Simče Šafarčíkové, kteří se v mé nepřítomnosti starali o pokusy. Za radu se statistickým zpracováním výsledků děkuji Šuspovi.

Samozřejmě děkuji své rodině, že naprosto toleruje veškeré mé abnormální chování vyplývající z nadšení k biologii a ještě mě v tom všestranně podporuje. A nesmím zapomenout ani na všechny kamarády, kteří mi v průběhu psaní této práce poskytovali občas velmi potřebné odreagování a podporu, ať už se jednalo o cokoli.

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Literární přehled</b> .....	<b>3</b>
3.1 Běžné druhy rodu <i>Agrostis</i> v ČR.....	3
3.2 Fenotypové projevy polyploidie.....	4
3.3 Počítání chromosomů.....	5
3.4 Průtoková cytometrie.....	6
3.4.1 Stanovení ploidie a DNA-ploidie.....	7
3.4.2 Absolutní velikost jaderného genomu.....	8
3.5 Analýza izozymů.....	9
<b>4 Metodika</b> .....	<b>12</b>
4.1 Materiál.....	12
4.2 Počítání chromosomů.....	12
4.3 Stanovení velikosti genomu.....	13
4.3.1 Stanovení ploidie a DNA-ploidie.....	13
4.3.2 Stanovení absolutní velikosti genomu.....	14
4.4 Velikost průduchů.....	15
4.5 Kultivační experimenty.....	15
4.5.1 Vliv substrátu.....	15
4.5.2 Vliv vlhkostních poměrů a sešlapu.....	17
4.6 Analýza izozymů.....	18
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>20</b>
5.1 Počítání chromosomů.....	20
5.2 Velikost genomu.....	20
5.2.1 Stanovení ploidie a DNA-ploidie.....	20
5.2.2 Absolutní velikost jaderného genomu.....	23
5.3 Velikost průduchů.....	25
5.4 Kultivační experimenty.....	26
5.4.1 Vliv substrátu.....	26
5.4.2 Vliv vlhkostních poměrů a sešlapu.....	29
5.5 Analýza izozymů.....	32
5.6 Opylovací experiment.....	33
<b>6 Diskuse</b> .....	<b>35</b>
6.1 Počítání chromosomů.....	35
6.2 Velikost genomu.....	35
6.3 Velikost průduchů.....	36
6.4 Fenotypová plasticita morfologických znaků.....	36
6.4.1 Vliv substrátu.....	36
6.4.2 Vliv vlhkostních poměrů a sešlapu.....	37
6.5 Analýza izozymů.....	39
<b>7 Závěr</b> .....	<b>40</b>
<b>8 Seznam literatury</b> .....	<b>41</b>

### Přílohy:

*Příloha 1: Seznam lokalit*

*Příloha 2: Kultivační experimenty*

*Příloha 3: Mapka rozšíření zjištěných cytotypů *Agrostis stolonifera* v ČR*

*Příloha 4: Zymogramy enzymového systému SOD*

## 1 Úvod

Polyplloidizace má v evoluci rostlin velký význam. Je zřejmě nejčastějším mechanismem sympatrické speciace rostlin (Otto et Whitton 2000) a ukazuje se, že i mnohé druhy považované za diploidy alespoň jednou v minulosti podstoupily tento proces (Bowers et al. 2003). Význam polyplloidizace a její vliv na genotypové i fenotypové charakteristiky rostlinného života je v posledních letech častým předmětem biosystematických studií (např. Soltis et al. 2003).

U mnoha rodů byl zaznamenán výskyt celé řady polyplloidních cytotypů. Polyplloidní komplex představuje i rod *Agrostis* z čeledi *Poaceae*. Základní chromosomové číslo je  $x = 7$  a v přírodě se vyskytují jedinci diploidního až oktoploidního cytotypu (Frey 1997). Psineček výběžkatý (*Agrostis stolonifera*) je příkladem výskytu několika cytotypů u jednoho druhu. Je proto vhodným modelem pro hledání rozdílů mezi cytotypy. Tato práce se zabývá významem polyplloidie u druhu *Agrostis stolonifera* a snaží se posoudit existující cytotypy z nejrůznějších hledisek.

*Agrostis stolonifera* je vytrvalý klonální druh s intenzivní tvorbou nadzemních výběžků. Vyznačuje se velkou morfologickou variabilitou (Stuckey et Banfield 1946), je schopen obývat nejrůznější biotopy a hybridizovat s jinými druhy (Jones 1953, 1956; Davies 1953; Björkman 1954; Belanger et al. 2003). U druhu byly zjištěny tři cytotypy lišící se ploidní úrovní (Björkman 1954). Není proto divu, že tento druh bývá označován jako taxonomicky problematický a že jeho vnitrodruhová variabilita je chápána různými autory odlišně. V České republice roste hojně na nejrůznějších stanovištích – lze ho nalézt na cestách, trávnících, loukách, pastvinách i slaniskách, březích vodních toků a nádrží, od nížin až do hor. Vyskytují se zde všechny tři cytotypy. Základní studie o karyologických poměrech a rozšíření různých plodných úrovní druhu *Agrostis stolonifera* v České republice byla provedena v rámci bakalářské práce (Kubešová 2004), na niž tato studie navazuje. Na základě výrazné fenotypové variability byly popsány mnohé vnitrodruhové taxony *A. stolonifera*. Např. Dostál (1989) rozlišuje tři poddruhy lišící se kromě morfologických a ekologických charakteristik i ploidní úrovní. Pokud by takto vymezené taxony skutečně existovaly, znamenalo by to úzkou korelaci morfologických i ekologických vlastností rostlin s ploidií.

Prvním cílem práce je posoudit fenotypovou variabilitu vybraných anatomických a morfologických znaků druhu *Agrostis stolonifera*. Kultivační experimenty by měly určit, zda je morfologická variabilita dána schopností vytvořit různé morfotypy v závislosti na určitých ekologických podmínkách, či zda odlišné formy jsou spíše pevně určeny genetickou výbavou jedinců. Cílem je posoudit morfologickou variabilitu také s ohledem na jednotlivé cytotypy a odhalit případné korelace mezi stupněm ploidie a vybranými anatomickými a morfologickými charakteristikami.

Další otázkou, jež vyplynula po shromáždění dostatečného materiálu, je původ pentaploidních jedinců, kteří se jeví být morfologicky variabilní. Na základě morfologických charakteristik některých jedinců lze předpokládat, že se na jejich vzniku podílela hybridizace s jiným druhem rodu (*A. capillaris*).

Oblíbeným předmětem současných biosystematických studií je stanovení absolutní velikosti genomu. U druhů rodu *Agrostis* a jejich cytotypů vyskytujících se v České republice zatím nebyl obsah DNA buď vůbec publikován, nebo velikost genomu není vztažena k určité ploidii a počtu chromozomů, proto je její stanovení dalším z cílů této práce. U druhu *A. stolonifera*, který je zastoupený třemi cytotypy, bude zajímavé posoudit, zda se s narůstajícím stupněm ploidie obsah DNA monoploidní sádky chromosomů zmenšuje či zvyšuje, protože obě tyto varianty jsou možné (Leitch et Bennett 2004).

## 2 Cíle práce

Na základě předchozí studie (Kubešová 2004) a uvedené problematiky vyplynulo následujících 5 cílů. Stanovení relativní i absolutní velikosti genomu se zabývá všemi běžnými druhy rodu *Agrostis* v ČR, ostatní cíle jsou zaměřeny na druh *A. stolonifera*.

- 1) Doplnit údaje o výskytu různých cytotypů *A. stolonifera* v ČR + stanovit relativní obsah DNA cytotypů ostatních běžných druhů *Agrostis* v ČR (počítání chromosomů / FCM / rozšíření cytotypů)
- 2) Stanovení absolutní velikosti genomu běžných druhů *Agrostis* v ČR (FCM)
- 3) Korelace stupně ploidie a velikosti průduchů *A. stolonifera*
- 4) Vliv ploidního stupně a podmínek prostředí (substrát, vlhkost, sešlap) na morfologickou variabilitu (kultivační experimenty)
- 5) Původ pentaploidů *A. stolonifera* (analýza izozymů)

### 3 Literární přehled

#### 3.1 Běžné druhy rodu *Agrostis* v ČR

Rod *Agrostis* zahrnuje asi 220 druhů (Conert in Hegi 1989). Jedná se celosvětově rozšířený rod vyskytující se zejména v temperátních oblastech a v horách tropů (Frey 1997). V České republice je zastoupen 7 původními druhy. Šest z těchto druhů je předmětem této studie, není zahrnut pouze *Agrostis alpina* – v ČR nejvzácnější druh rodu vyskytující se na jediné lokalitě.

Druh *Agrostis stolonifera* je polyploidní komplex, u něž byly zaznamenány tři cytotypy: tetraploidní ( $2n = 4x = 28$ ), pentaploidní ( $2n = 5x = 35$ ) a hexaploidní ( $2n = 6x = 42$ ) (Björkman 1954). Jedná se o allopolyploidní druh. Ze studia meiózy a hybridizačních pokusů vyplývá, že *Agrostis stolonifera* má z části shodný genom s druhem *A. capillaris*. Tato část genomu allotetraploidního druhu *A. capillaris* a *A. stolonifera* pochází pravděpodobně ze společného diploidního předka (Jones 1953). U druhu *A. stolonifera* byl zaznamenán výskyt B-chromosomů (Björkman 1954) a aneuploidie (Stuckey et Banfield 1946; Juhl 1952; Björkman 1954; Kik et al. 1993). Druh je uváděn jako allogamický s neúplnou autoinkompatibilitou. V nepřítomnosti cizího pylu je vzácně schopen samoopylení (Davies 1953). Může se bez velkých obtíží křížit s jinými druhy (*A. canina*, *A. capillaris*, *A. castellana* a *A. gigantea* – Davies 1953; Jones 1953, 1956; Björkman 1954; Belanger et al. 2003) a dokonce i s jinými rody (*Polypogon* – Björkman 1954, 1960). V České republice je zastoupený všemi třemi známými cytotypy (Kubešová 2004).

*Agrostis canina* je taxonomicky problematický druh zahrnující několik poddruhů a v literatuře najdeme mnoho různých vymezení a nomenklatorických pojetí tohoto druhu. Nejčastější je diploidní cytotyp (Frey 1997). U diploidního poddruhu *A. canina* var. *fascicularis* Björkman (1951) zaznamenal výskyt B-chromosomů u 25 z 80 zkoumaných rostlin. Z dosavadních studií vyplývá, že i v České republice je tento druh zastoupen diploidním cytotypem (Kirschner et al. 1982, Mičieta in Frey 1997).

*Agrostis capillaris* se zdá být poměrně karyologicky uniformní tetraploidní druh. Výskyt aneuploidních počtů chromosomů a B-chromosomů zde byl zaznamenán poměrně vzácně, a to u morfologicky odlišných jedinců (Frey 1997).

*Agrostis gigantea* je v Evropě zastoupen tetraploidními, nejčastěji však hexaploidními cytotypy (Frey 1997). Jedná se o allopolyploidní druh. Hexaploidní jedinci vykazují při meiotickém párování shodnost jedné ze tří částí genomu s *A. capillaris* a podobnost jiné části s *A. stolonifera* (Jones 1956).

U druhu *Agrostis rupestris* byl zjištěn diploidní, triploidní a tetraploidní cytotyp. Opakovaně byla zaznamenána přítomnost B-chromosomů (Frey 1997). Pro Českou republiku zatím neexistují publikované údaje. Ze sousedního Slovenska a Polska jsou udávány všechny tři cytotypy (Frey 1997).

*Agrostis vinealis* je druh považovaný za blízce příbuzný druhu *A. canina*, hodnocený často jako jeho vnitrodruhový taxon. V literatuře jsou uváděny nejčastěji údaje o tetraploidním cytotypu, z České republiky je však znám hexaploidní cytotyp (Kirschner et al. 1982, Holub in Měsíček et Jarolímová 1992).

### 3.2 Fenotypové projevy polyploidie

Polyplodizace se významně podílí na evoluci rostlinného genomu (Otto et Whitton 2000). Může způsobit velké změny na nejrůznějších úrovních – od genetických, přes buněčné, anatomické, morfologické, až po promítnutí se do fenologických a ekologických charakteristik rostlin (Soltis et al. 2003).

Již mnoho prací se zabývalo souvislostmi mezi anatomickými a morfologickými znaky a stupněm ploidie u krytosemenných rostlin (např. Stebbins 1971). Velikost jader s narůstajícím počtem chromosomových sad narůstá a odráží se i ve velikosti buňky. U mnoha druhů rostlin z různých čeledí byla prokázána pozitivní korelace ploidie s velikostí pylových zrn [např. *Achillea* (*Asteraceae*) – Ramsey 2007, *Crotalaria* (*Fabaceae*) Almada et al. 2006, *Corydalis* (*Fumariaceae*) – Fukuhara 2000] a délkou průduchů [např. *Acacia* (*Fabaceae*) – Beck et al. 2003, *Ulex* (*Fabaceae*) – de Oliveira et al. 2004]. Tato korelace byla prokázána také u řady taxonů čeledi *Poaceae* – *Triticum* (Rajendra et al. 1978), *Hordeum* (Borrino et Powell 1988), *Triticeae* (Limin et Fowler 1989; Singh et Sethi 1995), *Phleum* (Joachimiak et Grabowska-Joachimiak 2000), *Aegilops* (Aryavand et al. 2003). Zatímco velikost průduchů je tím větší, čím vyšší je stupeň ploidie, počet průduchů na jednotku plochy listu je s ploidí korelován negativně. Ačkoliv rozmístění průduchů může být určováno také faktory prostředí – intenzita světla, sucho (Miskin et Rasmusson 1970; Wang et Clarke 1993), byly pro frekvenci i velikost průduchů zjištěny vysoké hodnoty dědivosti (Bhagwat et Bhatia 1993; Singh et Sethi 1995). Aryavand et al. (2003) u *Aegilops neglecta* dokonce považuje frekvenci a velikost průduchů zjištěnou standardním a jednotným způsobem za metodu, kterou lze bezpečně (alespoň na území Turecka) odlišit dvě různé ploidní rasy bez karyologických metod. U tohoto druhu se totiž velikosti průduchů u dvou existujících ploidí (4x, 6x) nepřekrývají a cytotypy jsou reprodukčně izolovány. Studie porovnávající anatomické znaky cytotypů *Agrostis stolonifera* zatím nebyly publikovány.

Bonos et al. (2002) hledali morfologické znaky korelující s ploidí, které by bylo možno využívat pro odlišení příbuzných druhů rodu *Agrostis* lišících se stupněm ploidie. Zabývali se druhy *A. canina* L. subsp. *canina*, *A. canina* L. subsp. *montana* (Hartm.) Hartm., *A. palustris* Huds. (*A. stolonifera* var. *palustris* (Huds.) Farw.), *A. tenuis* Sibth. (*A. capillaris* L.), *A. castellana* Boiss. & Reut. a *A. alba* L. Z měřených znaků – výška rostliny, délka laty, délka a šířka listové čepele a délka stébla od báze k nejvyššímu internodiu byla délka listové čepele jedinou charakteristikou, která byla pozitivně korelována s obsahem DNA a počtem chromosomů. U druhu *Agrostis stolonifera* většina autorů považuje tři cytotypy za morfologicky nerozlišitelné (Björkman 1954; Kik et al. 1992).

*Agrostis stolonifera* je druh s poměrně širokou ekologickou amplitudou obsazující nejrozličnější biotopy. V České republice ho nalezneme od nížin až do hor (Kubát et al. 2002) jak na písčitéch tak na živinami bohatých půdách. Obsazuje suchá, středně vlhká až mokřadní stanoviště a je dokonce schopen růst v kalužích či na březích rybníků s výběžky vsplývajícími přímo na vodní hladině. Jakožto hemikryptofyt je schopen odolávat disturbancím zasahujících nadzemní prýty, proto může růst na místech ovlivněných sešlapem, pastvou i kosením. Jeho schopnost tvorby velkého počtu vegetativních výběžků a vytváření souvislého porostu je přímo komerčně využívána pro tvorbu trávníků, zvláště pak na golfových hřištích (Fei et Nelson 2004).



Kik et al. (1990a, 1990b, 1992, 1993) ve svých studiích pracovali s populacemi *Agrostis stolonifera* ze čtyř odlišných stanovišť – louka, přímořské slanisko, polder, písečná duna. Zjistili statisticky průkazné rozdíly mezi rostlinami z odlišných populací ve vegetativních i generativních znacích a provedli reciproční přesazovací experimenty. Znaky odlišující původní populace se ukázaly být určované podmínkami stanoviště a výrazně se projevoval vliv biotopu, do něhož byly rostliny přesazeny. Dalším zjištěním bylo, že zkoumané populace se liší v zastoupení cytotypů. Na písečné duně byl zaznamenán pouze tetraploidní cytotyp, v ostatních populacích byly nalezeni jedinci všech tří ploidních úrovní. Autoři diskutují ekologický význam stupně ploidie s ohledem k míře disturbancí a stability stanoviště. Na základě předchozích studií předpokládají, že pentaploidní a hexaploidní jedinci jsou kvůli časté tvorbě aneuploidních gamet funkčně sterilní, zato jsou však schopni vytvořit více vegetativní biomasy (Aston 1962). Björkman (1954), z jehož práce autoři vycházejí, skutečně zjistil vyšší podíl aneuploidů u potomstva pentaploidních a hexaploidních jedinců, přesto však oba cytotypy označuje jako fertillní. V nestabilních biotopech (písečná duna) tyto autoři vysvětlují výskyt pouze tetraploidních jedinců jejich velkou produkcí fertillních potomků. Na nestabilním disturbovaném biotopu totiž generativní rozmnožování minimalizuje riziko vymření. U stabilních biotopů autoři vysvětlují přítomnost vyšších ploidii selekčními tlaky ve prospěch vegetativního rozmnožování. Předpokládají, že pentaploidi a hexaploidi při svém vegetativním rozmnožování vytvářejí větší výběžky, a tudíž v takových společenstvech lépe snášejí konkurenci. Cytotypy se po pěstování ve shodných podmínkách a po přesazení nelišily v měřených morfologických ani „life-history“ znacích (přežití, růst = počet výběžků, míra kvetení). Kromě posuzování tetraploidních vs. netetraploidních cytotypů Kik et al. (1993) studovali u rostlin konkrétní počty chromosomů. Zjistili, že počet chromosomů ( $2n$ ) je značně variabilní a liší se nejen v rámci různých jedinců shodné ploidie ale dokonce u výběžků vypěstovaných z jedné mateřské rostliny. Vyšší proměnlivost v počtu chromosomů byla zjištěna u jedinců vyšší ploidní úrovně, což podporuje hypotézu o vyšší míře nepravidelnostech v průběhu buněčného dělení u vyšších ploidních úrovní. Ta je však udávána zejména u meiotického dělení (Stebbins 1971), zde však autoři pracují s mitotickými buňkami. Některé zjištěné odchylky v počtu chromosomů však mohou být dány i použitou metodou počítání chromosomů. Z měřených morfologických znaků měli zástupci vyšších stupňů ploidie tendenci tvořit více výběžků 2. a 3. řádu a více vegetativní biomasy, nicméně rozdíly nebyly statisticky průkazné.

### 3.3 Počítání chromosomů

Karyologické metody patří mezi poměrně pracné a časově náročné metody, nicméně stále v některých ohledech nenahraditelné (Krahulcová 1998). Např. při určování ploidie byla tato metoda nahrazena rychlejší a účinnější obrazovou a průtokovou cytometrií. Ta však pracuje pouze s porovnáváním se standardem o známém počtu chromosomů. Pokud jsou při cytometrické analýze odhaleny určité odchylky od očekávaného stupně ploidie, můžeme usuzovat, že se jedná o aneuploidního jedince. Při větším počtu chromosomů (přibližně od 20) se však chyba přístroje může rovnat odchylce vzniklé chybějícím chromosomem, proto by měl u takových vzorků případný výskyt aneuploida ověřen karyologickým spočítáním chromosomů (Suda 2004).

### 3.4 Průtoková cytometrie

V posledních desetiletích se část zájmu rostlinných biosystematiků a evolučních biologů soustředí na velikost a složení rostlinného genomu. Tyto charakteristiky nám mohou vypovědět mnohé o evolučních vztazích a mechanismech evoluce u rostlin. Předmětem zájmu jsou dnes přímo jednotlivé geny či sekvence rostlinného genomu. Pro hodnocení fylogeneticky blízkých taxonů (zejména druhů) nám však může poskytnout cenné informace i stanovení počtu chromosomů či 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 metod je i průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM). Tato metoda umožňuje měřit optické parametry u izolovaných částic, které jsou jednotlivě unášeny v kapalině skrze místo, kde jsou osvětleny (Suda 2004). Na základě intenzity fluorescence barviva navázaného na měřených částicích (jádrech) je tak možné určit rozdíly v optických parametrech částic.

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. Průtokový cytometr tvoří několik základních částí – zdroj světla, průtoková komůrka, optický systém, snímací část, elektronická část zpracovávající signál a počítač (Ormerod 1994). Veškeré částice vzorku jsou měřeny jednotlivě, což je zajištěno tím, že částice 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 (Doležel 1991): interkalační barviva, která se váží přímo na DNA (např. propidium jodid), barviva, která se váží na A-T vazby (např. DAPI) a barviva specifická pro G-C vazby (např. mithramycin). Po excitaci barviva je emitováno fluorescenční záření o jiné vlnové délce. Míra fluorescence je po průchodu emitovaného záření souborem filtrů změřena fotodetektorem. Získaný optický signál je převeden na analogový signál. Tyto signály jsou zpracovány do digitální podoby a výsledkem je počítačový výstup. Vizualizace výsledků je nejčastěji provedena pomocí dvourozměrných histogramů. Na horizontální ose je obvykle vynesena intenzita signálu (nejčastěji fluorescence), vertikální osa vyjadřuje počet částic s příslušnou intenzitou signálu. Důležitým parametrem vyjadřujícím přesnost analýzy je tzv. koeficient variance. Popisuje kvalitu histogramového píku a umožňuje porovnávání píků získaných na odlišných fluorescenčních kanálech. Jeho hodnota se zvyšuje s nepřesnostmi při izolaci jader, barvení i měření průtokovým cytometrem. Čím nižší CV, tím větší přesnost měření. Za optimální hodnoty jsou považovány hodnoty CV do 3 % (Doležel et Bartoš 2005), ale pro určitý typ studií postačí i analýzy s vyšším CV (Suda et al. in Doležel et al. 2007). Velkou výhodou průtokové cytometrie je analýza velkého počtu částic (jedná se o tisíce až desetitisíce) během několika minut.

Průtoková cytometrie se ukázala být užitečnou metodou také v botanice. 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 průtokové cytometrie v botanice bylo vyřešení problému izolace jednotlivých jader z rostlinných buněk, které jsou na rozdíl od živočišných buněk obaleny pevnou buněčnou stěnou. 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 hypotonickém roztoku, který obsahuje detergent. Po přidání barviva je vzorek připraven k analýze (Galbraith et al. 1983). Dnes se používají různé modifikace této metody.

V rostlinné biosystematice se průtoková cytometrie používá především ke stanovení relativní (např. stupeň ploidie) či absolutní velikosti jaderného genomu (DNA C-hodnota, Cx-hodnota) (Suda 2004; Suda et al. in Doležel et al. 2007). Určení velikosti genomu se stanovuje na základě porovnání intenzity fluorescence vzorku a standardu o známém počtu chromosomů či přímo se známou velikostí genomu vyjádřenou v pg. Nejčastěji se používá tzv. interní standard, který je analyzován zároveň se vzorkem. Oproti jiným metodám má použití průtokové cytometrie pro stanovení obsahu jaderné DNA řadu výhod. V porovnání s klasickými karyologickými postupy jsou to zejména možnost stanovit obsah DNA u mitoticky neaktivních buněk, rychlá příprava vzorků a možnost zpracování velkého množství materiálu, snadné odhalení smíšených vzorků a endopolyploidie a díky nedestruktivnosti metody možnost pracovat s ohroženými či vzácnými druhy (Suda et al. in Doležel et al. 2007). 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). V některých případech je možné analyzovat i suchý materiál (např. rostliny z herbáře, silikagelu) (Suda 2004) či fixované rostlinné pletivo nebo fixovaná jádra. Metodu FCM je možné aplikovat také na různé *in vitro* kultury rostlinných buněk (Doležel et al. 1989). U mnoha rostlin je však nejlepší a někdy i jedinou možností použít čerstvý materiál (Doležel et Bartoš 2005). Problémy s užitím průtokové cytometrie vznikají zejména u rostlin s vysokým obsahem určitých sekundárních metabolitů. Tyto látky mohou znemožňovat obarvení buněk či jejich částí. Často také vykazují autofluorescenci, která pak překrývá signály z fluorescenčních sond navázaných na analyzovaných částicích (Doležel et al. in Doležel et al. 2007).

#### 3.4.1 Stanovení ploidie a DNA-ploidie

Polyplodizace je u cévnatých rostlin velmi rozšířený proces, který se promítá do jejich fenotypového a reprodukčního chování (Levin 2002, Otto et Whitton 2000). Zvláště u heteroploidních taxonů se jeví její určování pomocí průtokové cytometrie velmi užitečné. Určováním stupně ploidie můžeme např. odhalit cytotypové složení populací, odlišit blízké příbuzné druhy lišící se ploidní úrovní, stanovit způsob rozmnožování, v některých případech i odhalit aneuploidní jedince a křížence (Suda et al. in Doležel et al. 2007).

Průtoková cytometrie umožňuje rychle a účinně stanovit cytotypy rostlin. Základním předpokladem užití této metody je pozitivní korelace obsahu jaderné DNA se stupněm

ploidie. Pokud je naším cílem zjistit ploidní úroveň, obsah jaderné DNA je porovnán s obsahem jaderné DNA u vzorku o známé ploidii a vyjádřen jako násobek základní chromosomové sádky. U některých rostlin však rozdíl v počtu chromosomů mezi různými cytotypy neodpovídá jejich rozdílu ve fluorescenci. Např. počet chromosomů diploidního cytotypu je dvojnásobně menší než u tetraploidního, při FCM však může ve fluorescenci tetraploid vykazovat 1,5 násobný rozdíl. Proto neznáme-li přímý vztah mezi počtem chromosomů a obsahem jaderné DNA, měli bychom stupně ploidie určené metodou FCM označovat jako DNA-ploidie a odlišovat je od ploidních stupňů určených počítáním chromosomů (Suda et al. 2006).

Standard používaný při stanovení ploidie by měl mít velikost genomu co nejpodobnější (ale bez překryvu) studovaným rostlinám a měl by se lišit od všech zkoumaných ploidií podobnou měrou (Suda et al. in Doležel et al. 2007). Pro stanovení stupně ploidie mnohdy stačí analýzy, kdy CV dosahuje hodnot 5 – 10 %. Pokud však nějaký vzorek vykazuje posun v intenzitě fluorescence, k ověření aneuploidie je třeba pracovat s analýzami zahrnujícími více než 5000 jader, kdy CV nepřekročilo hodnotu 3 % (Roux et al. 2003). Pro ověření výsledků a obecně pro snížení pravděpodobnosti chyby je vždy lépe kombinovat výsledky měření obsahu jaderné DNA s počítáním chromosomů a to nejen v případě aneuploidie a ploidie (Obermayer et Greilhuber 2006).

#### 3.4.2 Absolutní velikost jaderného genomu

Velikost jaderného genomu vyjadřuje obsah DNA v jádře. Je jednou z důležitých charakteristik organismů, která může nezávisle na genové konstituci významně ovlivňovat mnohé jejich vlastnosti (Bennett et Leitch 1995, 2005b; Bennett et al. 2000). Dříve byla velikost genomu určována náročnými chemickými extrakcemi, postupně však byla tato metoda nahrazena rychlými a účinnějšími metodami – nejprve Feulgenovou mikrodensitometrií, pak průtokovou cytometrií a v poslední době je oblíbenou metodou obrazová cytometrie. V této práci je ke stanovení velikosti genomu použita průtoková cytometrie.

Obsah jaderné DNA se vyjadřuje pomocí tzv. C-hodnoty, kterou zavedl v roce 1950 Swift. Nicméně její přesná definice byla publikována až o téměř 30 let později. C-hodnota udává množství DNA v haploidním nereplikovaném jádře, odpovídá tedy množství DNA na gametické úrovni (Bennett et Smith 1976). Vyjadřuje se v jednotkách pikogramů (pg) či počtu megapárů bazí (Mpb). Tyto jednotky jsou přitom vzájemně převoditelné – 1 pg = 978 Mpb. Velikost jaderného genomu u somatických buněk diploidních organismů odpovídá hodnotě 2C, u polyploidních organismů pak násobku C-hodnoty odpovídajícímu stupni ploidie. Kromě C-hodnoty je definována Cx- hodnota, která vyjadřuje množství jaderné DNA monoploidní chromosomové sádky. U polyploidů se stanoví jako 2C-hodnota / stupeň ploidie a odpovídá tedy obsahu DNA vztahujícímu se k základnímu chromosomovému číslu x (např. u tetraploida  $2n = 4x$ ,  $1Cx = 2C / 4$ ) (Greilhuber et al. 2005).

Velikost jaderného genomu cévnatých rostlin se mezi druhy liší (Bennett et Leitch 2005c). Dosavadní studie ukazují, že u krytosemenných rostlin rozdíl ve velikosti jaderného genomu mezi různými druhy může být až 2000násobný (Doležel et al. in Doležel et al. 2007). Těsné korelace mezi velikostí jaderného genomu a vlastnostmi rostlin se projevují již

na buněčné úrovni a dále se promítají do jejich fenotypových, fenologických i ekologických vlastností (Bennett 1972). V botanice se stanovení velikosti genomu používá zejména k odlišení druhů se stejným počtem chromosomů, určení rodičů hybridu či diploidních předků allopolyploidů, odhalení agmatoploidie (neletální fragmentace chromosomů, kdy se nemění velikost genomu, ale narůstá počet chromosomů).

Při stanovení absolutní velikosti rostlinného genomu jsou nároky na preciznost práce vyšší než u stanovení ploidie. Porovnávání výsledků je možné jen při důsledném dodržování určitých postupů (Bennett et al. 2000; Doležel et Bartoš 2005): i) jako interní standard by se měl používat druh o známém obsahu DNA, jehož absolutní velikost genomu se nejvíce blíží velikosti genomu studovaného druhu; ii) jednotlivé analýzy by měly vyhodnocovat alespoň 5000 jader a šířka píku by měla odpovídat CV nižšímu než 3 %; iii) velikost genomu by měla být stanovena ze tří jedinců analyzovaných v různé dny; iv) měl by být používán fluorochrom, který není básově specifický (např. propidium jodid). Při porovnávání absolutní velikosti genomu mezi dvěma druhy by měl být splněn předpoklad, že se jedná o blízce příbuzné druhy (Leitch et Bennett 2004).

Rostoucí počet studií a zájem o velikost rostlinného genomu byl podnětem pro vytvoření online databáze. V roce 1997 byla spuštěna první verze Angiosperm DNA C-values Database (Bennett et Leitch 2005a). Obsahuje C-hodnoty i počty chromosomů krytosemenných rostlin s příslušnými odkazy na zdroje, z nichž uvedené údaje pocházejí. V současné době databáze shrnuje údaje o velikosti genomu 4427 druhů krytosemenných rostlin (Bennett et Leitch 2005a), nicméně mnoho údajů není příliš spolehlivých.

Ačkoliv rod *Agrostis* zahrnuje asi 220 druhů (Conert in Hegi 1989), databáze uvádí velikost genomu jen pro 8 druhů tohoto rodu. Z druhů vyskytujících se v České republice je uvedena C-hodnota pro druhy *A. canina*, *A. capillaris*, *A. gigantea* a *A. stolonifera*. Přitom pouze pro *A. capillaris* je velikost genomu přiřazena k určité ploidii a počtu chromosomů [4x – 28 chromosomů (Mowforth 1986), 6x – 42 chromosomů (Bennett et al. 1982)]. U druhu *Agrostis capillaris* je však v poměrně velkém počtu studií uváděn pouze tetraploidní cytotyp (Frey 1997). Uvedené údaje tedy pravděpodobně patří jiného druhu.

### 3.5 Analýza izozymů

Isozymy (isoenzymy) jsou odlišné formy enzymu kódované týž genem. Katalyzují v organismu stejné reakce a liší se v elektroforetické mobilitě (Markert et Moller 1959). Slouží jako snadno čitelné biochemické markery, jejichž variabilita může odrážet variabilitu na úrovni genů. Vyznačují se mendelovskou dědičností a kodominantním vztahem mezi alelami, což umožňuje poměrně snadnou interpretaci výsledků analýz (Weeden et Wendel in Soltis et Soltis 1989). Podmnožinou izozymů jsou allozymy – alelické formy téhož enzymu kódované v jednom lokusu (Kirschner et al. 2000). Principem metody izozymové analýzy je jednoduchá extrakce enzymů z čerstvého rostlinného pletiva, jejich rozdělení na gelu při elektroforéze a obarvení enzymově specifickými barvivy. Výsledkem je tzv. zymogram – obrazec rozložení proteinů na gelu (Acquaah 1992).

Analýza izozymů je v biologii užívána k řešení nejrůznějších otázek (Soltis et Soltis 1989; Acquaah 1992). Používá se zejména k odlišení heterozygotů a homozygotů, stanovení jejich zastoupení v populaci, k odlišení jednotlivých klonů, k odhalení hybridů a jejich rodičů,

ke stanovení způsobu rozmnožování (Weeden et Wendel in Soltis et Soltis 1989). Zvláště v kombinaci s genetickými, morfologickými či biogeografickými daty mohou izozymové analýzy při určitých studiích nahradit dražší, časově i pracností náročné DNA metody.

Analýzu izozymů je možné aplikovat na diploidní i polyploidní rostliny. Při studiu polyploidie je možné izozymovými analýzami rozhodnout, zda zkoumaný druh či jedinec je diploidní či polyploidní (Weeden et Wendel in Soltis et Soltis 1989). U diploidního organismu totiž převažuje jednoduchá exprese genů kódujících izozymy. Naopak u polyploidních jedinců se projeví zmnožení těchto genů a znásobení produkce izozymů. Duplikace genů se však vyskytuje také u diploidních organismů (i když v menší míře), je proto třeba mít na zřeteli, že ne vždy vyšší produkce izozymů značí polyploidii. Navíc výskyt diploidního a polyploidního stavu představuje v přírodě koloběh – diploidní jedinci podléhají polyploidizaci, přičemž v dlouhodobějším měřítku pak ztrácejí projevy polyploidie a jejich genom se začíná chovat jako diploidní, který může opakovaně podstoupit polyploidizaci (Otto et Whitton 2000). Dávno vzniklý polyploid tedy nemusí vykazovat expresi zduplikovaných genů, protože procesem diploidizace bylo takové chování u zmnožených genů potlačeno (Weeden et Wendel in Soltis et Soltis 1989).

Jako jednoznačnější a spolehlivější metoda se jeví izozymová analýza, použijeme-li ji k odlišení autopolyploidů od allopolyploidů. Při autopolyploidizaci dochází ke zmnožení chromosomové sady diploidního předka, proto je autopolyploid přesnou kopií diploida. Má pouze více stejných chromosomových sad. Allopolyploidní jedinec vzniká zkombinováním genomů (chromosomových sad) dvou odlišných diploidních předků a následným zmnožením této kombinace. Pokud při společné analýze polyploidního jedince s potenciálním diploidním předkem zkoumané izozymy polyploida neodhalují žádnou unikátní alelu chybějící u diploida, můžeme usuzovat na autopolyploidizaci. Autopolyploidní vznik indikují také absence fixované heterozygotnosti a projevy polysomické dědičnosti – když se např. u tetraploida gen vyskytuje ve čtyřech kopiích, může být exprimován vícekrát než u diploida, tudíž i produkce izozymů je vyšší. Naopak fixovaná heterozygotnost a bisomická dědičnost (kdy se geny exprimují ve stejné či podobné míře jako u diploida) charakterizují allopolyploidy (Weeden et Wendel in Soltis et Soltis 1989).

U allopolyploidů se navíc izozymové analýzy používají k odhalení druhého parentálního diploidního předka, který se podílel na vzniku polyploida. Stačí porovnat výskyt izozymů u allopolyploida a obou jeho potenciálních diploidních rodičů. Vzhledem k tomu, že izozymy jsou biochemické markery, nemusejí však výsledky analýzy přinášet obraz skutečného stavu na molekulární úrovni. Situaci totiž může zkomplikovat gene silencing („umlčení“ genu, kdy gen je sice přítomen, ale není exprimován) (Weeden et Wendel in Soltis et Soltis 1989). Nepřítomnost nějakého izozymu je pak mylně považována za důkaz chybějícího genu. Také záleží na době vzniku polyploida, neboť s narůstajícím stářím polyploida se zvyšuje pravděpodobnost výskytu mutací, které ho mohou odlišit od diploidního předka, z něhož vznikl. U dávno vzniklých polyploidů tedy není možné určit diploidní předky, neboť nedokážeme rozhodnout, zda polyploidní organismus vznikl z dodnes žijících diploidů, ale již se natolik divergoval, že mezi jejich genomy existují rozdíly, nebo zda vznikl z nějakých jiných dnes již nežijících diploidů (Weeden et Wendel in Soltis et Soltis 1989).

Metoda izozymové analýzy je u polyploidních jedinců používána také pro studium současné hybridizace (např. Rosenbaumová et al. 2004). Pokud existují rozdíly v zastoupení alel izozymů u potenciálních rodičů, můžeme na základě izozymové analýzy hybridů i rodičů odhalit případné křížení (Crawford in Soltis et Soltis 1989). K tomuto účelu je použita metoda izozymové analýzy také v této práci.

Pentaploidní jedinci *Agrostis stolonifera* jsou morfologicky variabilní a zdá se, že existuje více typů pentaploidů. Vzhledem k existenci populací *A. stolonifera* s výskytem všech tří ploidií (Kubešová 2004) i smíšených populací s příbuzným *A. capillaris*, by mohl skutečně existovat dvojí způsob, jak pentaploidi vznikají. Jedním typem pentaploidů by mohli být jedinci *A. stolonifera* vzniklí křížením tetraploidních a hexaploidních jedinců *A. stolonifera*, případně pocházející čistě z gamet hexaploida, který vytváří gamety s různým počtem chromosomů (Björkman 1954). Druhý typ pentaploidů by mohli představovat jedinci vzniklí křížením tetraploidního *A. capillaris*, s nímž je *A. stolonifera* schopen se křížit (Davies 1953, Jones 1953), s hexaploidním *A. stolonifera*. Hybridní vznik pentaploidů by mohl být dokázán existencí enzymového systému, jehož alely přítomné u pentaploidních jedinců a zároveň u jedinců *A. capillaris* se nevyskytují u hexaploidních a tetraploidních cytotypů *A. stolonifera*. Úspěšné užití analýzy izozymů u zástupců čeledi *Poaceae* bylo již několikrát publikováno, ať už k posouzení genetické variability (Yanaka et al. 2005), způsobu rozmnožování – autogamie vs. alogamie (Oja et al. 2003, Oja 2005) či odhalení původu allopolyploida (Refoufi et al. 2005). Také existují práce, ve kterých byla tato metoda použita přímo u obou studovaných druhů – Kik et al. (1990a) použili izozymovou analýzu k identifikaci klonů *Agrostis stolonifera* a za stejným účelem byla tato metoda aplikována také na druh *Agrostis capillaris* (Rothanzl 2002).

## 4 Metodika

### 4.1 Materiál

Rostliny *A. stolonifera* i ostatních druhů rodu *Agrostis* použité v této práci byly sbírány po celém území České republiky (a v několika případech i v zahraničí). V průběhu let 2004 – 2006 bylo nasbíráno do venkovní sbírky vytvořené při předchozí studii dalších několik desítek rostlin. Snahou bylo získat rostliny z nejrůznějších populací lišících se geografickým umístěním i ekologickými podmínkami. Z populací byly vybírány všechny morfologicky či fenologicky odlišné typy. Rostliny byly pěstovány odděleně avšak za shodných podmínek na pokusném pozemku Katedry botaniky BF JU.

Celkový materiál zahrnuje 177 rostlin. Jedná se o 155 jedinců *A. stolonifera*, 9 jedinců *A. capillaris*, 6 jedinců *A. canina*, 3 jedince *A. gigantea*, 3 jedince *A. vinealis* a 1 jedince *A. rupestris*. V příloze 1 je uveden Seznam lokalit a zjištěný stupeň ploidie všech rostlin, které byly analyzovány průtokovým cytometrem a případně užívány k dalším pokusům a měřením uváděným v této práci. U jednotlivých podkapitol je vždy uveden výpis rostlin (číslovaných podle Seznamu lokalit), se kterými se v dané části studie pracovalo. Většina materiálu pochází z území České republiky, jen několik rostlin bylo sebráno v Rakousku a na Slovensku.

### 4.2 Počítání chromosomů

Chromosomy byly počítány na roztlakových preparátech v meristemických buňkách apikálních částí kořenů. Preparáty byly vytvořeny podle metodiky přípravy preparátů barvených laktopropionorceinem (Krahulcová 1998). Jako materiál byly používány rostliny pěstované na pokusné ploše. Odnož počítané rostliny byla zasazena do písku a pěstována v klimaboxu. Po několika dnech z ní byly odebrány konce nově narostlých kořenů, které byly omyty a následně naloženy do předpůsobícího roztoku. Vzorky byly vkládány do předpůsobení v ranních hodinách. Během jednotlivých počítání byly u druhu *A. stolonifera* a *A. canina* postupně vyzkoušeny roztoky 4 různých chemikálií v koncentracích, za teploty a po dobu působení uvedených v tab. 1. Kořeny byly po uplynutí doby působení promyty v případě  $\alpha$ -bromnaftalenu v 45% kyselině octové, při použití ostatních chemikálií ve vodě. Dalším krokem byla fixace ve směsi kvasného etanolu a 96 % ledové kyseliny octové v poměru 3:1. Ve fixační směsi byly kořinky ponechány ve 4 °C do druhého dne. Při vlastní přípravě preparátu byly vzorky umístěny na dobu 2 – 4 minuty (podle tloušťky kořenu) do macerační směsi o složení 96 % HCl a kvasný etanol v poměru 1:1. Macerace byla zastavena promytím vzorku ve vodě. Z kořinky byla poté oddělena po maceraci mléčně zbarvená vrcholová část (meristemická pletiva) a ta byla umístěna na podložní skličko do kapky laktopropionorceinu (naředěného destilovanou vodou v poměru 3:2). Po 10 minutách působení barviva byl vzorek přikryt krycím sklíčkem a roztlačen. Vzniklý preparát byl prohlížen ve světelném mikroskopu s maximálním zvětšením 15 × 100. U buněk s větším počtem mitotických figur byly chromosomy počítány alespoň ve třech buňkách.



chemikálie	koncentrace vodného roztoku	doba působení	teplota
$\alpha$ -bromnaftalen	nasycený	15 min / 3 hod	20 °C
kolchicin	0,1%	30 min / 3 hod	20 °C
p-dichlorbenzen	nasycený	3 hod	20 °C
8- hydroxychinolin	0,002M	3 hod	20 °C

Tab. 1: Použité způsoby předpůsobení

### 4.3 Stanovení velikosti genomu

#### 4.3.1 Stanovení ploidie a DNA-ploidie

[materiál: stanovení ploidie bylo provedeno u všech rostlin uvedených v Seznamu lokalit v příloze 1]

Stanovení ploidní úrovně bylo provedeno průtokovým cytometrem Partec Ploidy Analyzer II v Laboratoři průtokové cytometrie Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích. Jako materiál bylo používáno čerstvé listové pletivo z rostlin pěstovaných na pokusné ploše. Coby interní standard byl používán hrách *Pisum sativum* cv. Ctirad ( $2C = 9,09 \text{ pg}$ ) (Lysák et Doležel 1998). Pro stanovení stupně ploidie byla použita metodika přípravy vzorků podle Otto (1990). Asi 20 mg listového pletiva vzorku bylo s přibližně 10 mg standardu ostrou žiletkou rozsekáno v 0,5 ml vychlazeného pufru Otto I.

#### Otto I

monohydrát kyseliny citronové (0,1M)      4,2 g  
 Tween 20 [0,5% (v/v)]                              1 ml  
 doplnit vodou do 200 ml

Poté byl vzorek přefiltrován přes síťovinu Uhelon (průměr ok 42  $\mu\text{m}$ ). Před vlastní cytometrickou analýzou byl do vzorku přidán 1 ml pufru Otto II s fluorochromem DAPI.

#### Otto II

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0,4M)                              28,65 g  
 doplnit vodou do 200 ml

#### Barvení pomocí DAPI

Otto II    10 ml  
 DAPI (zásobní roztok, 1 mg/ml)                      400  $\mu\text{l}$   
 $\beta$ -merkaptoetanol                                      20  $\mu\text{l}$

Pro stanovení ploidie bylo u každého vzorku změřeno minimálně 3000 jader. Analýzy, kdy koeficient variance (CV) dosáhl hodnoty větší než 3 %, byly opakovány. Získané histogramy byly vyhodnoceny programem FlowMax 2.4d (Partec).

### 4.3.2 Stanovení absolutní velikosti genomu

[materiál: 2, 4, 5, 6, 8, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 48, 58, 61, 75, 101, 117, 133, 160, 169, 176, 177, 178]

Určení absolutní velikosti jaderného genomu bylo provedeno průtokovým cytometrem Partec CyFlow v Cytometrické laboratoři PŘF UK. Obsah jaderné DNA vyjádřený pomocí C-hodnoty a velikost genomu v podobě Cx-hodnoty byly stanoveny u všech cytotypů *Agrostis stolonifera* (4x, 5x, 6x) a dále u *A. canina*, *A. capillaris*, *A. gigantea*, *A. rupestris* a *A. vinealis*.

Coby interní standard byl používán hrách *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 9,09 pg), pouze u druhu *A. vinealis* musela být kvůli překrývající se velikosti genomu vzorků a hrachu použita kukuřice *Zea mays* cv. CE-777 (2C = 5,43 pg) (Lysák et Doležel 1998).

Příprava vzorku se ve většině krocích shodovala s přípravou vzorku pro stanovení DNA ploidní úrovně. Lišila se pouze v několika detailech: pletiva byla nasekána v 1 ml pufru Otto I a po přefiltrování byl vzorek centrifugován (5 min / 15000 rpm). Supernatant byl odstraněn, k peletu bylo přidáno 100 µl Otto I a vzorek byl protřepán. Před analýzou byl do vzorku přidán 1 ml pufru Otto II s fluorochromem propidium jodid a vzorek byl přibližně 15 minut inkubován za pokojové teploty.

#### Barvení pomocí PI

Otto II	10 ml
propidiumjodid (zásobní roztok, 1 mg/ml)	500 µl
RNáza II (zásobní roztok, 1 mg/ml)	500 µl
β-merkaptóetanol	20 µl

U známých cytotypů byla provedena minimálně tři měření na třech různých rostlinách od každého cytotypu. Výjimkou je *A. rupestris*, u kterého byl obsah DNA třikrát měřen pouze na jediné rostlině, protože sbírka materiálu obsahuje jen jednoho jedince tohoto druhu. Absolutní velikost genomu byla určena také u dvou jedinců, kteří při určení ploidie vykazovaly jiný poměr ke standardu. Tři opakovaná měření byla provedena vždy v jiný den avšak za použití stejného postupu. Absolutní velikost genomu byla odečítána z analýz zahrnujících 5000 jader. Pokud koeficient variance dosahoval hodnot vyšších než 5 %, analýzy byly další den opakovány. Také pokud byl rozdíl mezi měřeními v rámci cytotypu vyšší než 2 %, nejvíce odlišný vzorek byl z analýzy vyloučen a znovu podroben analýze následující den. Pouze v jediném případě byl akceptován rozdíl 2,1 %, protože se i přes mnohá opakování analýz nepodařilo dosáhnout lepšího výsledku.

Získané histogramy byly vyhodnoceny programem FlowMax 2.4d (Partec). Ze všech měření příslušejících jednomu cytotypu byla vypočítána průměrná 2C-hodnota, střední chyba průměru C-hodnoty (SE) a 1Cx-hodnota.

#### 4.4 Velikost průduchů

[materiál: 21, 23, 26, 27, 28, 29, 33, 34, 35, 45, 48, 54, 57, 58, 60, 63, 65, 66, 67, 73, 74, 75, 76, 80, 88, 90, 92, 98, 100, 102, 104, 121, 126, 127, 132, 133, 134, 138, 139, 144, 145, 146, 147, 151, 153, 154, 155, 168]

Velikost průduchů byla měřena u 48 rostlin různých stupňů ploidie (17 jedinců 4x, 14 jedinců 5x, 17 jedinců 6x) pěstovaných ve stejných podmínkách. Z každé rostliny bylo ze dvou různých náhodně vybraných vegetativních výběžků odebráno po jednom listu. Oba listy byly vždy sebrány ze střední části výběžku, musely být ve stejné fenologické fázi, plně rozvinuté a nepoškozené. Pro stanovení místa měření byla zkušebně porovnána délka průduchů na svrchní i spodní straně listu a délky průduchů v bazální, střední a koncové části listu. Nejmenší variabilitu vykazovala data získaná ze střední části spodní strany listu. Na základě zkušebního měření byl také určen optimální počet měření na jednom listu, který byl stanoven na 15. Preparát byl tedy připravován ze střední části spodní strany listu. Asi 1 cm<sup>2</sup> byl potřen bezbarvým lakem na nehty a po zaschnutí byla tato plocha přelepena lepicí páskou, jejímž strhnutím byl získán otisk pokožky listu. Tento otisk byl prohlížen ve světelném mikroskopu při zvětšení 10 × 40. Na každém preparátu byla měřicím okulárem změřena délka 15 průduchů. Celkem tedy byla u 48 rostlin stanovena délka 30 průduchů ze dvou odlišných listů.

Získaná data byla zpracovaná programem Statistica 7.0 metodou jednocestné analýzy variance podle Lepše (1996). Testovány byly následující nulové hypotézy:

- 1) H<sub>0</sub>: délka průduchů u různých ploidních úrovní se neliší
- 2) H<sub>0</sub>: délka průduchů u různých rostlin se neliší
- 3) H<sub>0</sub>: délka průduchů u listu 1 a 2 sbíraných z jedné rostliny se neliší

#### 4.5 Kultivační experimenty

V období od července do října 2007 byly provedeny na venkovní pokusné ploše dva kultivační experimenty. Příloha 2 obsahuje obrázky ilustrující oba pokusy.

##### 4.5.1 Vliv substrátu

[materiál: 20, 21, 34, 35, 45, 48, 51, 52, 56, 58, 60, 63, 64, 65, 80, 98, 100, 101, 102, 116, 123, 127, 132, 137, 138, 144, 150, 153, 160, 164]

V tomto pokusu byly rostliny pěstovány ve čtyřech substrátech odlišných obsahem živin a fyzikálními parametry. Čtyři různé substráty byly: písek, směs písku a zahradnického substrátu 1:1, zahradnický substrát a přihnojený zahradnický substrát. Substrát byl přihnojen kombinovaným hnojivem NPK (7g na květináč, tj. dávka 1000 kg / ha). Pro pokus bylo použito 10 rostlin od každé ploidie (4x, 5x, 6x). V květináčích o objemu 2,5 l byly od každé rostliny pěstovány 4 klony, každý v jiném substrátu. Klony byly odebrány jako jednotlivé výběžky, které byly zastříženy do srovnatelné délky a počtu nodů, takže se jednalo o zhruba čtyřcentimetrové výhony. Celkem experiment probíhal ve 120 květináčích uspořádaných

do latinského čtverce. Rostliny byly pravidelně zalévány a kvůli rohovému efektu byly květináče jedenkrát za 14 dní přemístovány.

Rostliny během probíhajícího pokusu vytvořily pouze vegetativní prýty. Po ukončení pokusu byly u každé rostliny stanoveny následující charakteristiky: počet všech nadzemních výběžků, počet větvených výběžků, délka nejdelšího výběžku, u tří náhodně vybraných výběžků pak délka výběžku, délka čepele jeho druhého listu a šířka čepele druhého listu. Délka výběžku byla měřena od báze výběžku k poslednímu nodu. Šířka čepele listu byla stanovena v nejširší části listu, tj. ve spodní polovině listu. Veškerá nadzemní biomasa pokusných rostlin byla ušřížena, sušena 24 hodin při 80 °C a zvážena na předvážkách.

Data byla vyhodnocena programem Statistica 7.0 metodou obecného lineárního modelu (GLM) s hierarchickým uspořádáním a interakcí.

Závislé proměnné: naměřené charakteristiky

Kategoriální proměnné: ploidie (3 hladiny), rostlina (30 hladin), substrát (4 hladiny)

Faktor s náhodným efektem: rostlina

Interakce: ploidie(rostlina) – rostlina vnořená do ploidie

substrát × ploidie – interakce mezi substrátem a ploidii

K přiblížení rozložení dat normálnímu rozdělení byly měřené charakteristiky (kromě délky nejdelšího výběžku, která měla normální rozložení) transformovány podle Marhold et Suda (2002) následujícím způsobem:

logaritmická transformace

počet výběžků, délka výběžku, váha nadzemní biomasy –  $x' = \ln x$

odmocninná transformace

délka čepele listu, šířka čepele listu –  $x' = \sqrt{x}$

počet větvených výběžků –  $x' = \sqrt{(x+1)}$

Testovány byly následující nulové hypotézy:

H<sub>0</sub> (ploidie): rostliny odlišných ploidní úrovní se v měřených charakteristikách neliší

H<sub>0</sub> (substrát): rostliny pěstované v různých substrátech se v měřených charakteristikách neliší

H<sub>0</sub> ploidie (rostlina): jednotlivé rostliny v rámci stejné ploidní úrovně se v měřených charakteristikách neliší

H<sub>0</sub> (substrát × ploidie): každý cytotyp reaguje na rozdílný substrát stejně (neexistuje interakce mezi ploidii a substrátem)

Za limitní hodnotu pro zamítnutí nulové hypotézy byla zvolena 5 % hladina významnosti.

#### 4.5.2 Vliv vlhkostních poměrů a sešlapu

[materiál: 20, 22, 23, 25, 30, 34, 35, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 61, 63, 64, 68, 69, 70, 80, 82, 94, 96, 97, 101, 116, 117, 123, 127, 129, 136, 137, 144, 150, 157, 159, 164, 169, 171, 172]

Pro tento pokus bylo použito 12 rostlin od každé ploidie (4x, 5x, 6x) a 4 pentaploidní rostliny podezřelé z hybridního původu. Z každé rostliny byly odebrány 4 klony (odnože), které byly zastřiženy do srovnatelné délky a počtu nodů. Ty byly pěstovány v květináči o objemu 2,5 l ve směsi zahradnického substrátu a písku v poměru 1:1. Po uchycení odnoží (po 14 dnech od zasazení) začaly být prováděny zásahy simulující odlišné ekologické podmínky stanoviště. Kvůli praktické realizaci experimentu bylo celkem 160 použitých květináčů rozmístěno do 8 řad se 4 bloky tvořenými vždy 5 květináči. Na pětici květináčů byl vždy prováděn totožný zásah. Jeden ze čtveřice klonů každé rostliny byl pěstován v květináči s podmiskou, bez vlivu disturbance a pravidelně zaléván, tedy v „normálních“ podmínkách, proto bude dále tento typ managementu označován jako *kontrola*. Druhý klon byl pěstován ve vodě – pětice květináčů byla postavena do plastové vany, kde byla hladina vody po celou dobu experimentu udržována tak, aby dosahovala až po okraj květináčů, zásah *mokro*. Třetí klon nebyl zaléván a květináč byl postaven bez podmisky přímo na zem, čímž byl klon během období bez deště vystaven značnému suchu (zásah *sucho*). Čtvrtý klon byl pravidelně každé tři dny ovlivňován disturbancí simulující sešlap (zásah *disturbance*): při simulaci byl na květináč z výšky asi 30 cm třikrát upuštěn igelitový pytel s pískem, čímž došlo k udusání půdy a ohnutí či přímo zlomení listů a vzrostných vrcholů. Jedenkrát za 14 dní byly květináče v rámci bloků náhodně přemísťovány.

Také při tomto experimentu rostliny vytvořily pouze vegetativní prýty. Po ukončení pokusu byly u každé rostliny stanoveny obdobné charakteristiky jako u předchozího pokusu: počet všech nadzemních výběžků, počet větvených výběžků, počet kořenujících výběžků, délka nejdelšího výběžku, u tří náhodně vybraných výběžků délka výběžku, délka čepele jeho druhého listu a šířka čepele druhého listu. Délka výběžku byla měřena od báze výběžku k poslednímu nodu. Šířka čepele listu byla stanovena v nejširší části listu, tj. ve spodní polovině listu. Veškerá nadzemní biomasa pokusných rostlin byla ustřižena, sušena 24 hodin při 80 °C a zvážena na předvážkách. Z květináčů byly také vypreparovány kořeny, které byly následně vmyty, sušeny 24 hodin při 80 °C a následně zváženy na analytických vahách.

Data byla vyhodnocena programem Statistica 7.0 metodou obecného lineárního modelu (GLM) s hierarchickým uspořádáním a interakcí.

Závislé proměnné: naměřené charakteristiky

Kategoriální proměnné: ploidie (3 hladiny), rostlina (30 hladin), zásah (4 hladiny)

Faktor s náhodným efektem: rostlina

Interakce: ploidie(rostlina) – rostlina vnořená do ploidie

zásah × ploidie – interakce mezi zásahem a ploidií

K přiblížení rozložení dat normálnímu rozdělení byly měřené charakteristiky transformovány podle Marhold et Suda (2002) následujícím způsobem:

logaritmická transformace

počet výběžků, délka výběžku, váha nadzemní biomasy, váha podzemní biomasy –  $x' = \ln x$

odmocninná transformace

počet větvených výběžků, počet kořenujících výběžků, délka nejdelšího výběžku, délka čepele listu, šířka čepele listu –  $x' = \sqrt{x}$

Testovány byly následující nulové hypotézy:

H<sub>0</sub> (ploidie): rostliny odlišných ploidní úrovní se v měřených charakteristikách neliší

H<sub>0</sub> (zásah): rostliny pěstované v různých typech zásahu se v měřených charakteristikách neliší

H<sub>0</sub> ploidie (rostlina): jednotlivé rostliny v rámci stejné ploidní úrovně se v měřených charakteristikách neliší

H<sub>0</sub> (zásah × ploidie): každý cytotyp reaguje na každý typ zásahu stejně (neexistuje interakce mezi ploidii a zásahem)

Za limitní hodnotu pro zamítnutí nulové hypotézy byla zvolena 5 % hladina významnosti.

#### 4.6 Analýza izozymů

[materiál: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 23, 41, 42, 61, 68, 69, 70, 101, 103, 107, 117, 133, 148, 151, 152, 156, 157, 159, 161, 167, 169]

K testování hypotézy o vzniku pentaploidních jedinců byla použita izozymová analýza. Pokud se v určitých lokusech potenciální rodič *Agrostis capillaris* (4x) liší od *Agrostis stolonifera* (4x a 6x), mohla by tato metoda dokázat hybridní vznik pentaploidních jedinců. Do analýz byly zahrnuty jedinci *Agrostis capillaris* (4x) a jedinci všech tří plodných úrovní *A. stolonifera* (4x, 5x, 6x).

Celkem bylo analyzováno 29 rostlin (15 vzorků na jeden gel a jeden vzorek byl vždy opakovaně použit na druhém gelu, aby bylo možné gely srovnávat): 8 jedinců *A. capillaris* (4x), 5 jedinců *A. stolonifera* (4x), 6 jedinců *A. stolonifera* (5x) a 10 jedinců *A. stolonifera* (6x). K analýze byly vybrány jak typické rostliny pocházející z populací jednoho druhu, tak rostliny z míst společného výskytu *A. capillaris* a *A. stolonifera* i rostliny z populací *A. stolonifera* složených z jedinců všech tří plodných úrovní. Isozymové analýzy byly prováděny v Laboratoři molekulární biologie rostlin BF JU v Českých Budějovicích. Metodika analýz byla provedena podle Kirschner et al. (2000) za použití extrakčního pufru Luzula.

Extrakční pufr Luzula (100 ml)

75 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5	100 ml
kyselina askorbová	50 mg
polyvinylpyrrolidon (PVP)	4 g
dithioerythritol (DTE)	120 mg
merkapt ethanol	100 µl

Materiál na vzorky byl získán z rostlin pěstovaných ve shodných podmínkách v klimaboxu. K extrakci enzymů bylo použito 60 – 80 mg čerstvého listového pletiva. Ve vychlazených třecích miskách bylo pletivo rozdrveno v 750  $\mu$ l extrakčního pufru Luzula spolu s 1/8 cm<sup>3</sup> látky Dowex-Cl (1-X8). Poté byly vzorky centrifugovány 10 minut při 14000 rpm. Supernatant byl oddělen a uložen do hlubokomrazicího boxu do -80 °C.

Pro elektroforézu byla použita aparatura HOEFER 600 SE. 40  $\mu$ l od každého vzorku bylo nanášeno na polyakrylamidový gel skládající se ze složky 8,16% separačního a 4% koncentračního gelu. Počáteční proud byl 80 mA, po 1 hodině (tj. zhruba po projití vzorků rozhraním mezi separačním a koncentračním gelem) bylo zvýšeno na 100 mA.

#### Separací gel (8,16%; 62 ml – na 2 gely)

separační gelový pufr, pH 8,9	18,1 ml
akrylamid (10% zásobní roztok)	12,6 ml
H <sub>2</sub> O destilovaná	30,7 ml
10% APS	289 $\mu$ l
10% TEMED	289 $\mu$ l

#### Koncentrační gel (4%; 12 ml – na 2 gely)

koncentrační gelový pufr, pH 6,9	11,12 ml
akrylamid (10% zásobní roztok)	1,24 ml
10% APS	71 $\mu$ l
10% TEMED	71 $\mu$ l

Po skončení elektroforézy byly gely opláchnuty destilovanou vodou a poté byly barveny různé enzymatické systémy prostřednictvím substrátově specifické reakce probíhající za definované teploty v termostatu.

Laboratoř molekulární biologie rostlin je zcela nové pracoviště, proto vzhledem k prvotnímu zavádění této metody bylo nutné vybrat enzymatické systémy, o kterých bylo již známo, že jsou použitelné pro studovaný rod. Pro analýzy byly tedy zvoleny některé enzymatické systémy používané Rothanzlem (2002). Autor úspěšně použil systémy ADH, AAT, EST, LAP k identifikaci klonů tetraploidního druhu *A. capillaris*. Protože však mým cílem nebylo odlišovat klony, ale odhalit případného mezidruhového křížence, byly vyzkoušeny i jiné enzymatické systémy.

Postupně bylo analyzováno 6 enzymatických systémů – ADH, AAT, EST, 6-PGDH, SKDH, SOD. Detekční barvení systémů ADH, AAT, SOD, EST bylo aplikováno na všechny vzorky. Ostatní systémy již na prvním gelu nevykazovaly vhodnou variabilitu, proto u zbývajících vzorků nebyly stanovovány.

Po obarvení byly gely opláchnuty destilovanou vodou či příslušným pufrem (v případě AAT byl gel na dobu asi 1 hodiny nejprve umístěn do fixačního roztoku) a poté byly fixovány pro další uchování umístěním mezi dva celofánové archy a přibližně 3 dny sušeny. Posledním krokem bylo vyhodnocení získaných zymogramů.

## 5 Výsledky

### 5.1 Počítání chromosomů

Počet chromosomů byl určen u většiny studovaných druhů. Pouze u druhu *Agrostis rupestris* se nepodařilo určit ani přibližný počet chromosomů. V ostatních případech byl určen buď přesný počet chromosomů, nebo alespoň stupeň ploidie (*A. vinealis*). Byly zaznamenány tyto počty chromosomů: *A. canina* –  $2n = 14$ ; *A. capillaris* –  $2n = 28$ ; *A. gigantea* –  $2n = 42$ ; *A. stolonifera* –  $2n = 28, 35, 42$ ; *A. vinealis*  $2n = \pm 42$ . Jedinci se známým počtem chromosomů posloužily pro stanovení poměru píků hrachu (interního standardu) a vzorků cytotypů *Agrostis* při průtokové cytometrii.

Chromosomy byly také počítány při podezření na aneuploidní počet chromosomů. Analýzy průtokovým cytometrem opakovaně prokázaly u jednoho vzorku *A. canina* odlišný poměr obsahu DNA ke standardu než u ostatních diploidních cytotypů *A. canina* ( $2n = 2x = 14$ ). Karyologické počítání chromosomů však potvrdilo výskyt 14 chromosomů (viz obr. 1).

Aplikace různých metodik (předpůsobící látky, doba předpůsobení – podrobněji viz metodika) u *A. stolonifera* a *A. canina* nepřineslo žádné odlišné výsledky. Počet mitotických figur i kvalita preparátu byly při použití různých postupů v rámci druhu velmi podobné. Obecně lze říci, že diploidní druh *A. canina* ve všech roztocích tvořil a udržoval si mnohem větší počet mitóz než *A. stolonifera*.

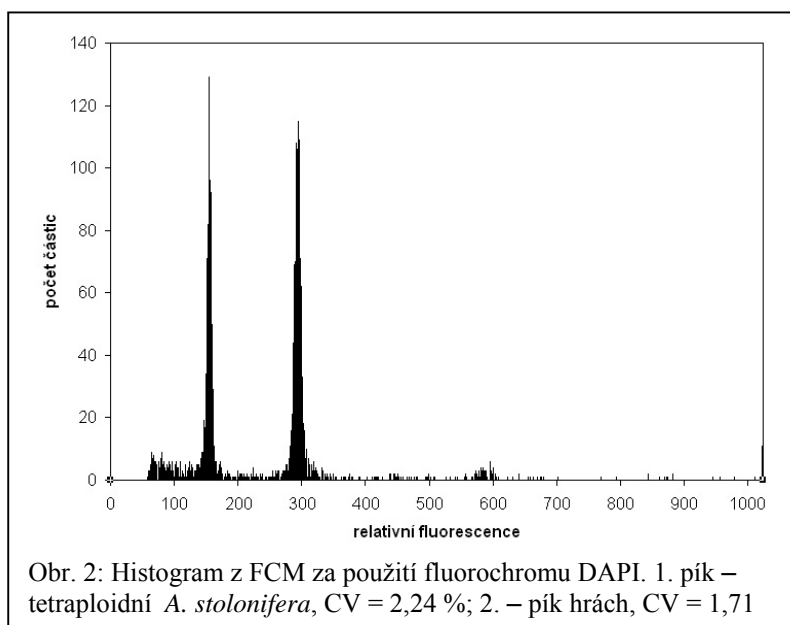


Obr. 1: Chromosomy u diploidního *A. canina* ( $2n = 2x = 14$ )

### 5.2 Velikost genomu

#### 5.2.1 Stanovení ploidie a DNA-ploidie

U 155 vzorků *Agrostis stolonifera* byl stanoven stupeň ploidie. Jednalo se o nově sebrané rostliny či vzorky, u nichž v předchozí studii nebyla ploidní úroveň stanovena jednoznačně. Ve vzorcích byly zastoupeny všechny tři známé cytotypy. Bylo zjištěno 53 tetraploidních (obr. 2), 52 pentaploidních (obr. 3) a 50 hexaploidních jedinců (obr. 4). Jeden pentaploidní jedinec měl

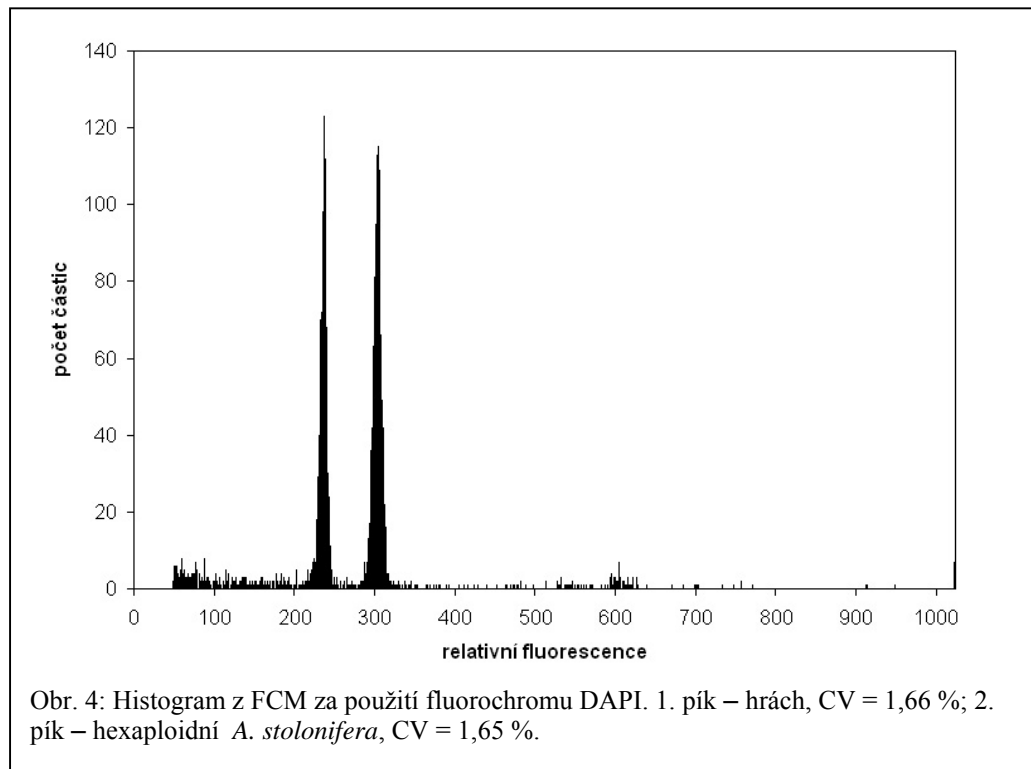
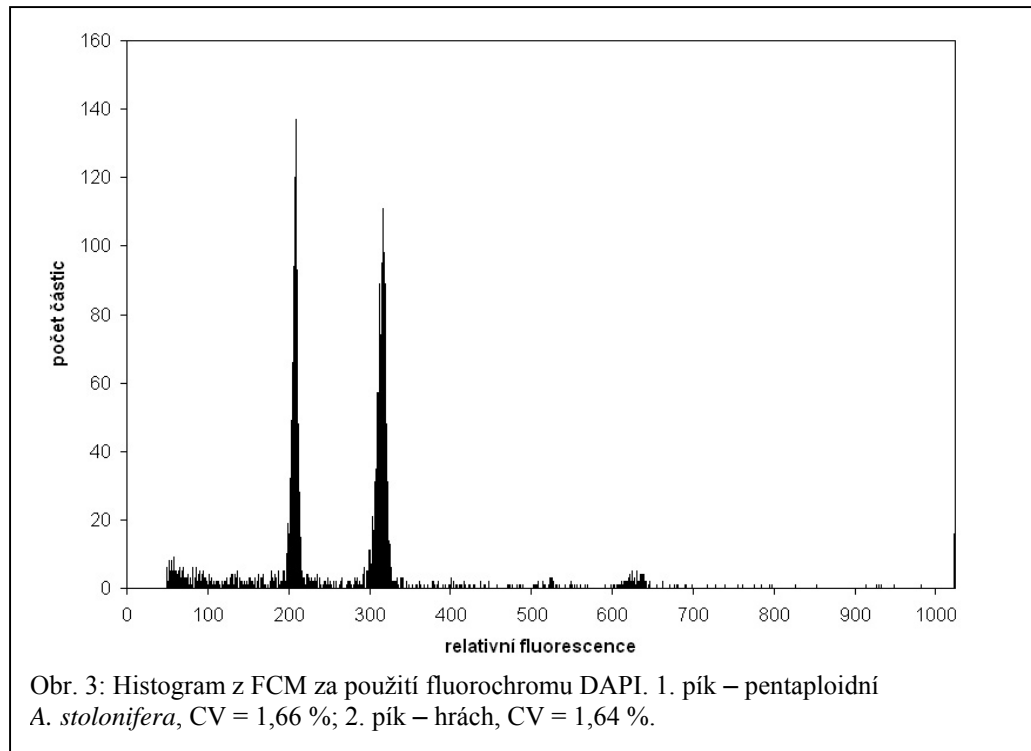


Obr. 2: Histogram z FCM za použití fluorochromu DAPI. 1. pík – tetraploidní *A. stolonifera*, CV = 2,24 %; 2. – pík hrách, CV = 1,71

opakovaně poměr ke standardu přibližující se tetraploidním jedincům. Je tedy možné, že se



jednalo o aneuploidní rostlinu. Podařilo se nalézt další populace složené z jedinců dvou i všech tří ploidních úrovní. *Agrostis stolonifera* je druh s intenzivním klonálním růstem, který rostlinám umožňuje vytvářet rozsáhlé souvislé porosty. Proto ve smíšených populacích nejsou výjimkou shluky rostlin s propletenými rametami odlišných ploidii.



Mapka rozšíření cytotypů *A. stolonifera* v příloze 3 zobrazuje výskyt 110 jedinců *A. stolonifera*. Ani navýšení materiálu oproti předchozí studii neukázalo žádnou jednoznačnou geografickou vazbu cytotypů. Všechny cytotypy se vyskytují na celém území České republiky.

V rámci této práce byl materiál rozšířen také o rostliny z vyšších poloh Hrubého Jeseníku, Krkonoše a Šumavy. Účelem bylo ověření, zda ve vyšších nadmořských výškách dominují hexaploidní cytotypy. V souboru 21 rostlin z nadmořských výšek 730 – 1440 m n. m. jsou sice skutečně nejhojněji zastoupeni hexaploidní jedinci (10 z 21), nicméně podobně častý je také výskyt pentaploidů (8 z 21). V Krkonoších i na Šumavě se podařilo nalézt i tetraploidní jedince (4 z 21). Z takto malého souboru dat a zjištěného zastoupení cytotypů nelze vyčíst převahu žádného ploidního stupně. Tabulka 2 shrnuje údaje o cytotypech ve vyšších nadmořských výškách. Číslo lokality odkazuje na přesnou lokalitu uvedenou v Seznamu lokalit v příloze 1.

pohoří	číslo lokality	nadm. výška	ploidie
Jeseníky	31	1210	6x
Jeseníky	32	1000	6x
Jeseníky	60	1070	6x
Jeseníky	61	1000	6x
Jeseníky	115	1010	5x
Jeseníky	116	1060	6x
Jeseníky	117	1320	6x
Jeseníky	118	765	5x
Krkonoše	51	810	5x
Krkonoše	53	1000	4x
Krkonoše	65	1425	6x
Krkonoše	66	1440	6x
Krkonoše	101	780	5x
Krkonoše	136	1300	4x
Krkonoše	137	1198	4x
Šumava	64	770	5x
Šumava	71	1040	5x
Šumava	94	1060	4x
Šumava	97	760	6x
Šumava	138	1052	5x
Šumava	169	730	5x

Tab. 2: Cytotypy ve vyšších nadmořských výškách

U 60 jedinců dalších studovaných druhů rodu *Agrostis* byl určen stupeň ploidie. Všech 19 analyzovaných vzorků *Agrostis canina* patří diploidnímu cytotypu. Jeden vzorek (rostlina č. 6) opakovaně vykazoval větší poměr k hrachu (tedy nižší relativní obsah DNA). Protože tento posun byl opakovaně zjištěn při třech analýzách provedených v odlišných měsících, nejedná se zřejmě o pouhý artefakt způsobený chybou měření. U vzorku proto byla pro ověření menší velikosti genomu stanovena C-hodnota a Cx-hodnota (viz následující kapitola).

Analýzy 24 vzorků *A. capillaris* z různých částí ČR potvrdily, že se jedná o druh karyologicky uniformní. Všechny vzorky příslušely tetraploidnímu cytotypu.

U jedné rostliny rodu *Agrostis* připomínající nejvíce *A. capillaris* byla zjištěná DNA-heptaploidní úroveň ( $2n = 7x = 49$ ). Rostlina se ovšem v některých znacích od *A. capillaris* liší, a proto se může jednat o hybrida. Tato ploidní úroveň nebyla dosud u *A. capillaris* udávána a jedná se o jedince s nejvyšší ploidí rodu *Agrostis* v ČR vůbec. U potenciálního heptaploidního jedince byla stanovena také absolutní velikost genomu.

Všech šest analyzovaných jedinců *A. gigantea* náleží hexaploidnímu cytotypu. Jediná analyzovaná rostlina druhu *A. rupestris* odpovídá DNA-tetraploidnímu cytotypu. Při analýzách *A. vinealis* všech 10 vzorků mělo hexaploidní cytotyp.

### 5.2.2 Absolutní velikost jaderného genomu

Podarilo se stanovit obsah DNA u všech 6 běžných druhů rodu *Agrostis* v České republice. K úplnosti chybí jen analýza na jediné lokalitě rostoucího *A. alpina* a nedávno objeveného nového druhu pro ČR – *A. scabra*. Přehled obsahu jaderné DNA u cytotypů druhů *A. canina*, *A. capillaris*, *A. gigantea*, *A. rupestris*, *A. stolonifera* a *A. vinealis* uvádí tabulka 3. Zahnut je i vzorek *A. canina* vykazující při stanovení ploidie nižší relativní obsah DNA a zřejmě hybridní jedinec připomínající *A. capillaris* odpovídající DNA-heptaploidnímu cytotypu. Rozsah 1Cx-hodnot kolísá od 1,39 pg u potenciálního aneuploida až k 1,66 pg u DNA-heptaploida. Pomineme-li tyto netypické jedince, rozmezí 1Cx-hodnot je 1,50 – 1,65 pg. Koeficient variance dosahoval u vzorků hodnot 1,41 – 5 %, u standardu 1,2 – 4 %. Rozdíly mezi měřeními v rámci jednoho cytotypu se pohybovaly v rozmezí 0,14 – 2,1 %.

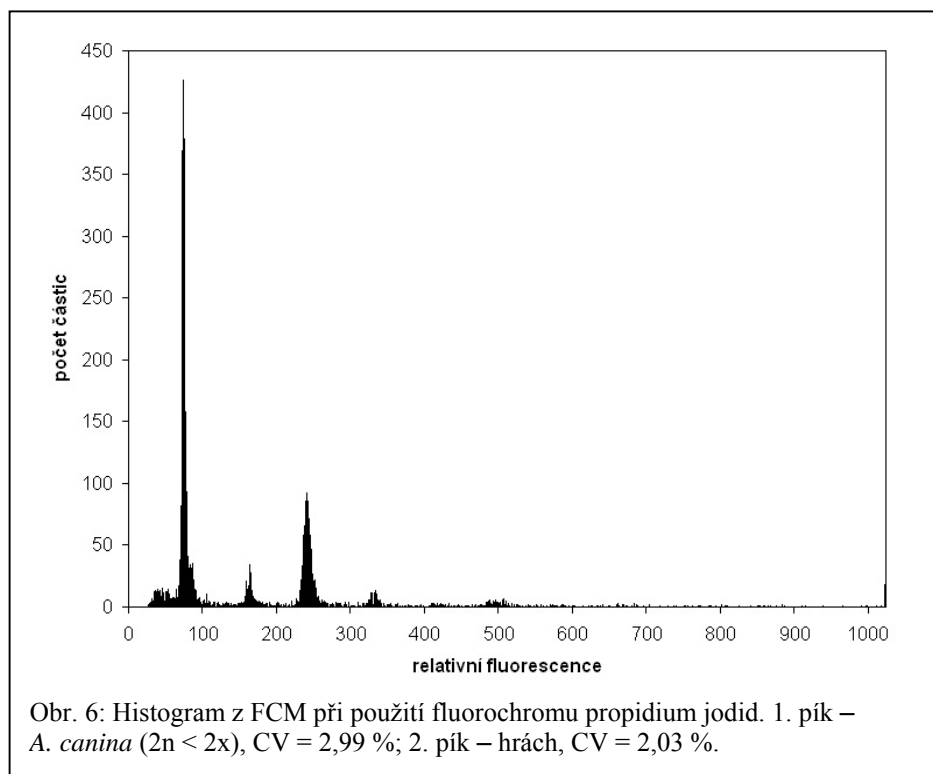
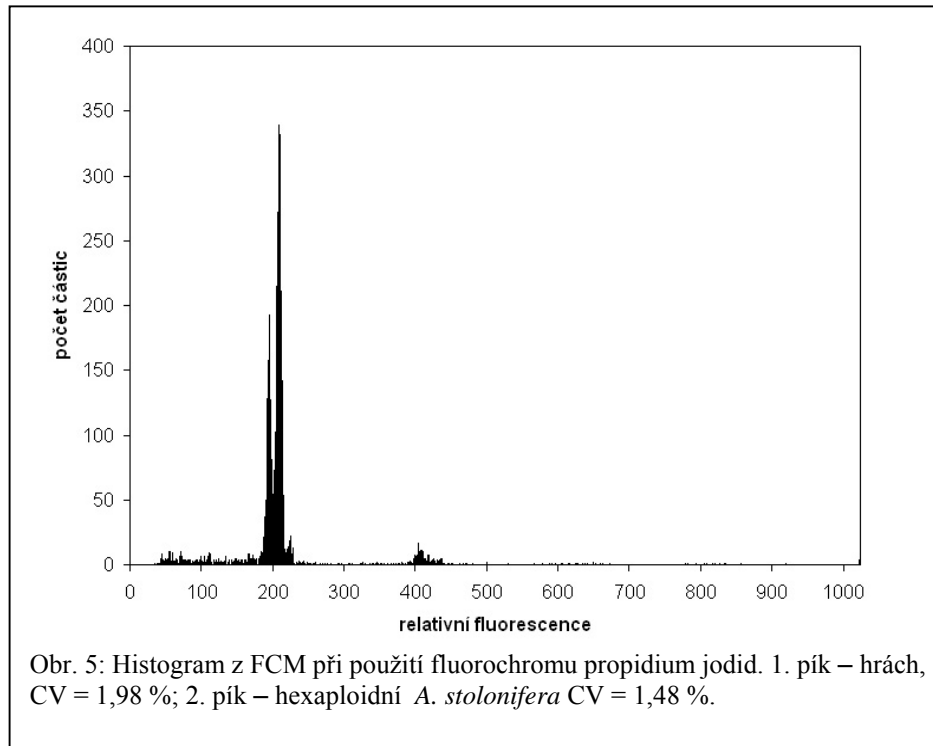
druh	počet rostlin	ploidie	2C-hodnota ± SE (pg)	1Cx-hodnota (pg)
<b>A. canina</b>	3	2x	3,02 ± 0,02	1,51
A. canina	1	< 2x	2,78 ± 0,02	1,39
<b>A. capillaris</b>	3	4x	6,49 ± 0,02	1,62
A. capillaris?	1	7x	11,59 ± 0,02	1,66
<b>A. gigantea</b>	3	6x	9,79 ± 0,02	1,63
<b>A. rupestris</b>	1	4x	6,02 ± 0,02	1,50
<b>A. stolonifera</b>	3	4x	6,36 ± 0,01	1,59
<b>A. stolonifera</b>	3	5x	7,98 ± 0,03	1,60
<b>A. stolonifera</b>	3	6x	9,80 ± 0,03	1,63
<b>A. vinealis</b>	3	6x	9,89 ± 0,07	1,65

Tab. 3: Výsledky stanovení absolutní velikosti genomu

U druhu *A. stolonifera* zastoupeného třemi cytotypy (obr. 5) se zvyšujícím se stupněm ploidie roste velikost monoploidního genomu. Mezi cytotypy odlišných druhů však tato závislost neplatí.

Jedinec *A. canina*, u kterého byl zaznamenán nižší relativní obsah DNA má o 8 % nižší 2C-hodnotu než ostatní diploidní jedinci tohoto druhu (obr. 6). Takový rozdíl ve velikosti genomu při  $2n = 2x = 14$  již může odpovídat ztrátě jednoho celého chromosomu.

U jedince DNA-heptaploidního cytotypu je zjištěná 1Cx-hodnota vztažená k heptaploidnímu stupni ploidie větší než u ostatních cytotypů.



### 5.3 Velikost průduchů

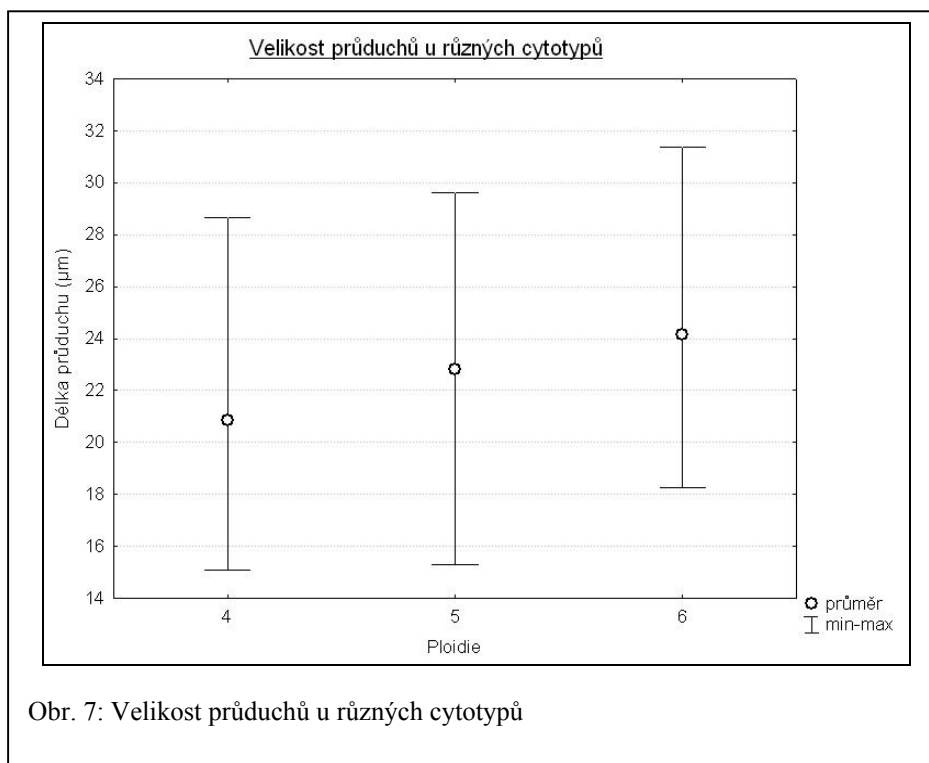
Analýza variance prokázala vysoce průkazné rozdíly v délce průduchů u odlišných cytotypů a mezi jednotlivými rostlinami. Naopak neprokázala rozdíl mezi dvěma listy sbíranými na jedné rostlině.

Výsledky statistické analýzy jsou shrnuty v tabulce 4, která ukazuje sumy čtverců, počet stupňů volnosti, průměrnou hodnotu sumy čtverců, velikost F-hodnoty a p-hodnoty. Největší podíl na celkové variabilitě dat má variabilita mezi rostlinami, naopak u rozdílů mezi listy byla variabilita nejmenší.

	SS	stupně volnosti	MS	F	p
<b>ploidie</b>	2738,1	2	1369,0	249,4	0,00
<b>rostlina</b>	6837,4	47	145,5	53,5	0,00
<b>list</b>	15,6	1	15,6	2,11	0,146589

Tab. 4: Výsledky analýzy variance

Délka průduchů je se stupněm ploidie korelována pozitivně, tedy čím vyšší ploidie, tím větší délky průduchy dosahují (obr. 7). Největší rozsah hodnot byl zaznamenán u pentaploidů.



Tabulka 5 ukazuje základní statistické charakteristiky hodnot délky průduchů u různých cytotypů.

ploidie	počet měření	průměr (μm)	medián (μm)	minimum (μm)	maximum (μm)	standardní odchylka
4x	510	20,87	20,50	15,07	28,65	2,31
5x	420	22,81	22,50	15,31	29,64	2,34
6x	510	24,13	24,10	18,25	31,37	2,37

Tab. 5: Základní statistické charakteristiky souboru dat s délkou průduchů

## 5.4 Kultivační experimenty

### 5.4.1 Vliv substrátu

V průběhu experimentu přežilo všech 30 rostlin (10 rostlin 4x, 10 rostlin 5x, 10 rostlin 6x) a to vždy minimálně dva ze čtyř klonů. Celkově ze 120 klonů přežilo a bylo vyhodnoceno 115 klonů: 37 klonů 4x, 40 klonů 5x, 38 klonů 6x.

Tabulka 6 shrnuje stanoviska k nulovým hypotézám z hlediska jednotlivých testovaných charakteristik.

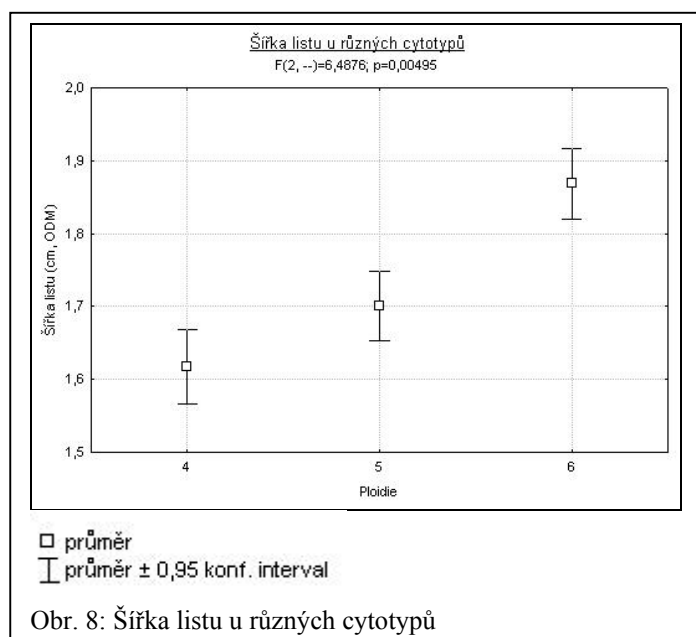
POKUS I	ploidie	rostlina (ploidie)	substrát	ploidie*substrát
počet výběžků	P	P	VP	N
počet větvených výběžků	N	VP	VP	N
délka nejdelšího výběžku	VP	N	VP	N
délka výběžku	N	P	VP	N
délka čepele listu	N	VP	VP	N
šířka čepele listu	VP	VP	VP	N
váha nadzemní biomasy	P	N	VP	N

P – průkazné ( $p < 0,05$ ) VP – vysoce průkazné ( $p < 0,01$ ) N – neprůkazné ( $p > 0,05$ )

Tab. 6: Výsledky statistické analýzy 1.pokusu

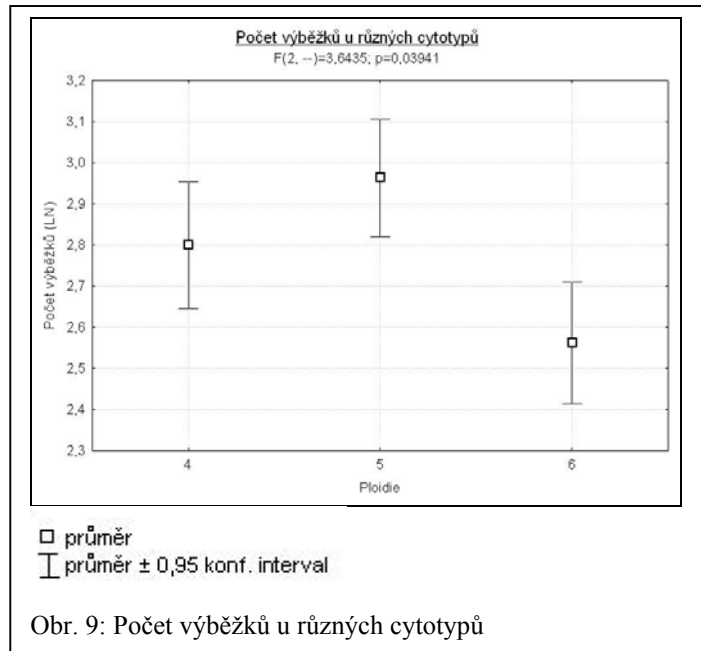
Rozdíly mezi ploidiemi byly prokázány u počtu výběžků, délky nejdelšího výběžku, šířky listu a váhy nadzemní biomasy.

Délka nejdelšího výběžku, šířka listu (obr. 8) a váha nadzemní biomasy se jeví být pozitivně korelované se stupněm ploidie. Největší počet výběžků (obr. 9) však vytvořily pentaploidní rostliny, nejméně hexaploidní jedinci.

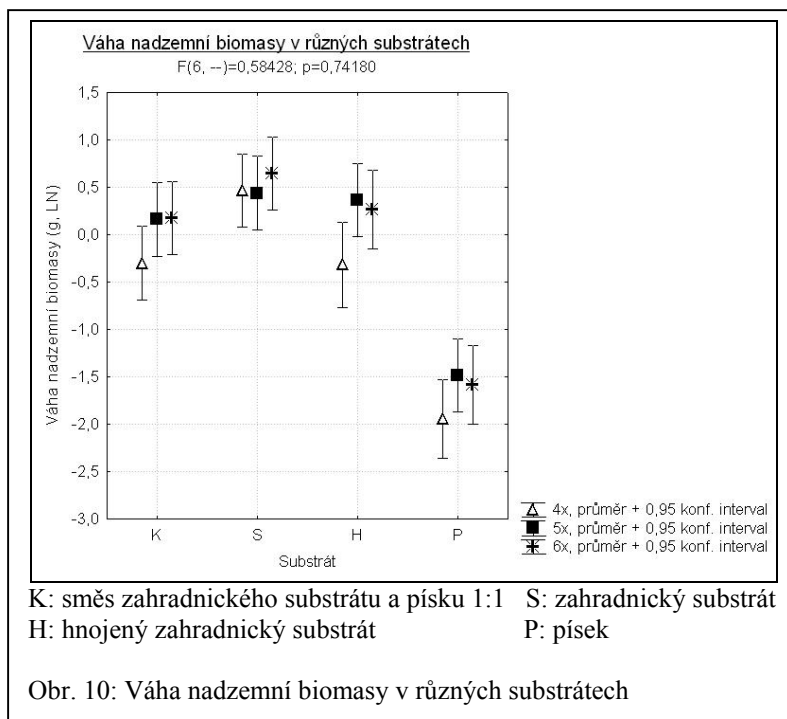


Obr. 8: Šířka listu u různých cytotypů

Všechny měřené charakteristiky vykazovaly vysoce průkazný vliv substrátu, tj. rostliny se v odlišných substrátech v měřených charakteristikách lišily. Velikost hodnot měřených charakteristik klesala u všech cytotypů nejčastěji v pořadí: zahradnický substrát → hnojený zahradnický substrát → směs zahradnického substrátu a písku → písek. Vezmeme-li v úvahu, že bylo měřeno sedm charakteristik u tří cytotypů, tento sled substrátů byl zaznamenán ve 12 z 21 případů (příklad uvádí obr. 10). V pěti případech rostliny v daném morfologickém znaku dosahovaly nejvyšších hodnot v hnojeném substrátu a ve 4 případech byly vyšší hodnoty naměřeny ve směsi zahradnického substrátu a písku než v hnojeném substrátu. V 16 z 21 případů tedy z pohledu zkoumaných znaků nejlépe rostly v zahradnickém substrátu a ve všech případech nejnižších hodnot dosahovaly rostliny pěstované v písku. Tento substrát představuje nejméně vhodné podmínky, kde se kromě nižšího obsahu živin a značné kyselosti projevuje vliv sucha kvůli malé schopnosti zadržovat vodu. Ve většině případů se sled substrátů pro jednu určitou morfologickou charakteristiku lišil u rozdílných cytotypů. Např. tetraploidní cytotyp dosáhl největšího počtu výběžků v zahradnickém substrátu, kdežto hexaploidní v hnojeném substrátu. Pouze u délky nejdelšího výběžku se všechny cytotypy shodovaly v sekvenci substrátů, což ilustruje obr. 11. Zároveň tento graf vyjadřuje pozitivní korelaci délky nejdelšího výběžku se stupněm ploidie.

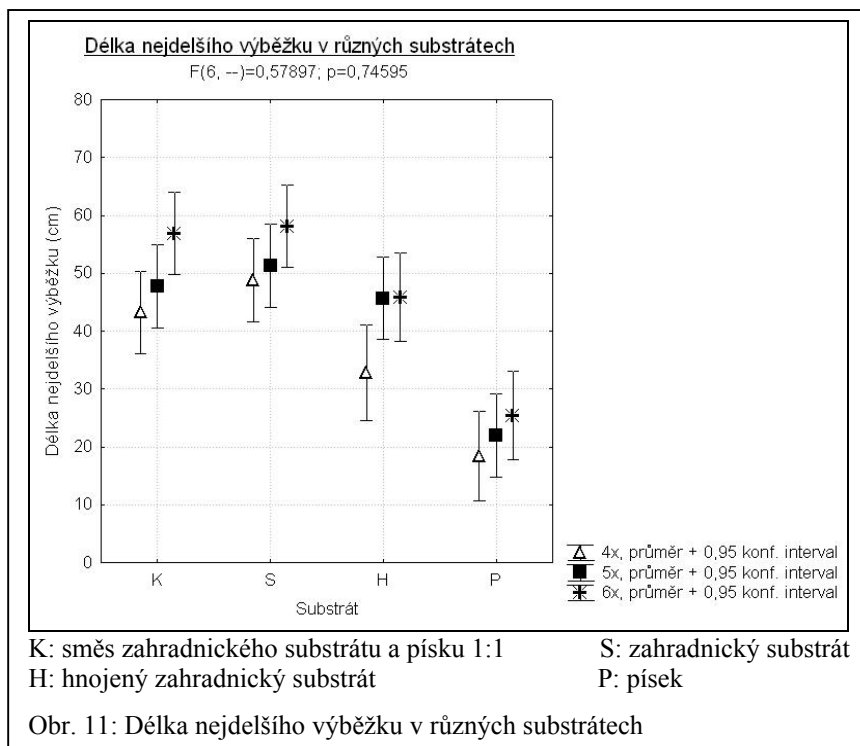


substrátu a ve 4 případech byly vyšší hodnoty naměřeny ve směsi zahradnického substrátu a písku než v hnojeném substrátu. V 16 z 21 případů tedy z pohledu zkoumaných znaků nejlépe rostly v zahradnickém substrátu a ve všech případech nejnižších hodnot dosahovaly rostliny pěstované v písku. Tento substrát představuje nejméně vhodné podmínky, kde se kromě nižšího obsahu živin a značné kyselosti projevuje vliv sucha kvůli malé schopnosti zadržovat vodu. Ve většině případů se sled substrátů pro jednu určitou morfologickou charakteristiku lišil u rozdílných cytotypů. Např. tetraploidní cytotyp dosáhl největšího počtu výběžků v zahradnickém substrátu, kdežto hexaploidní v hnojeném substrátu. Pouze u délky nejdelšího výběžku se všechny cytotypy shodovaly v sekvenci substrátů, což ilustruje obr. 11. Zároveň tento graf vyjadřuje pozitivní korelaci délky nejdelšího výběžku se stupněm ploidie.



U většiny charakteristik kromě délky nejdelšího výběžku a váhy nadzemní biomasy se od sebe odlišovaly jednotlivé rostliny v rámci ploidii.

Interakce mezi substrátem a stupněm ploidie nebyla zjištěna u žádného měřeného znaku. Rostliny odlišných cytotypů tedy reagovaly na odlišný substrát shodně.



Tabulka č. 7 uvádí základní statistické charakteristiky dat získaných v tomto pokusu.

POKUS I	ploidie	počet měření	průměr	medián	minimum	maximum	rozsah	standardní odchylka
počet výběžků	4x	37	20,32	19,00	4,00	54,00	50,00	12,02
	5x	40	21,95	20,00	5,00	49,00	44,00	10,97
	6x	38	15,37	13,50	4,00	41,00	37,00	9,48
počet větvených výběžků	4x	37	4,11	4,00	0,00	17,00	17,00	3,78
	5x	40	6,00	5,50	1,00	17,00	16,00	4,33
	6x	38	4,61	3,00	0,00	21,00	21,00	4,48
max. délka výběžku (cm)	4x	37	36,29	38,20	4,80	65,40	60,60	16,36
	5x	40	41,68	46,50	9,00	70,10	61,10	14,79
	6x	38	46,74	52,60	12,90	87,30	74,40	19,41
délka výběžku (cm)	4x	111	10,94	5,60	0,70	47,30	46,60	11,56
	5x	120	13,08	7,95	0,60	43,40	42,80	12,35
	6x	114	16,00	8,30	0,40	81,50	81,10	17,30
délka čepele listu (cm)	4x	111	7,72	7,20	1,50	16,60	15,10	3,55
	5x	120	7,78	7,65	1,80	19,30	17,50	3,38
	6x	114	8,55	8,35	1,40	18,80	17,40	3,54
šířka čepele listu (cm)	4x	111	2,68	2,60	0,70	5,50	4,80	1,08
	5x	120	3,00	2,80	1,10	5,80	4,70	1,11
	6x	114	3,61	3,40	1,20	6,70	5,50	1,20
váha nadzemní biomasy (g)	4x	37	0,92	0,88	0,04	2,73	2,69	0,70
	5x	40	1,30	0,97	0,18	4,55	4,38	1,13
	6x	38	1,35	1,21	0,08	4,43	4,35	1,04

Tab. 7: Základní statistické charakteristiky dat 1. pokusu



### 5.4.2 Vliv vlhkostních poměrů a sešlapu

Experiment byl založen se 40 rostlinami (12 rostlin 4x, 12 rostlin 5x, 12 rostlin 6x, 4 rostliny potenciálních pentaploidních hybridů). Všechny tyto rostliny rostly až do ukončení pokusu a ze 160 klonů přežilo 159. Nicméně všechny 4 klony rostliny č. 23 vykazovaly nápadně nižší hodnoty morfologických znaků, proto všechny klony této rostliny byly ze závěrečných analýz vypuštěny (pravděpodobně se jednalo o rostlinu napadenou rzí). Kvůli obrovské variabilitě v morfologických znacích a nepoměrně menšímu zastoupení potenciálních pentaploidních hybridů (pouze 4 rostliny, tj. 16 klonů) byly nakonec z analýz tyto rostliny vynechány a uvedené statistické analýzy tedy pracují s 35 rostlinami, tj. 139 klonů (48 klonů 4x, 48 klonů 5x a 43 klonů 6x).

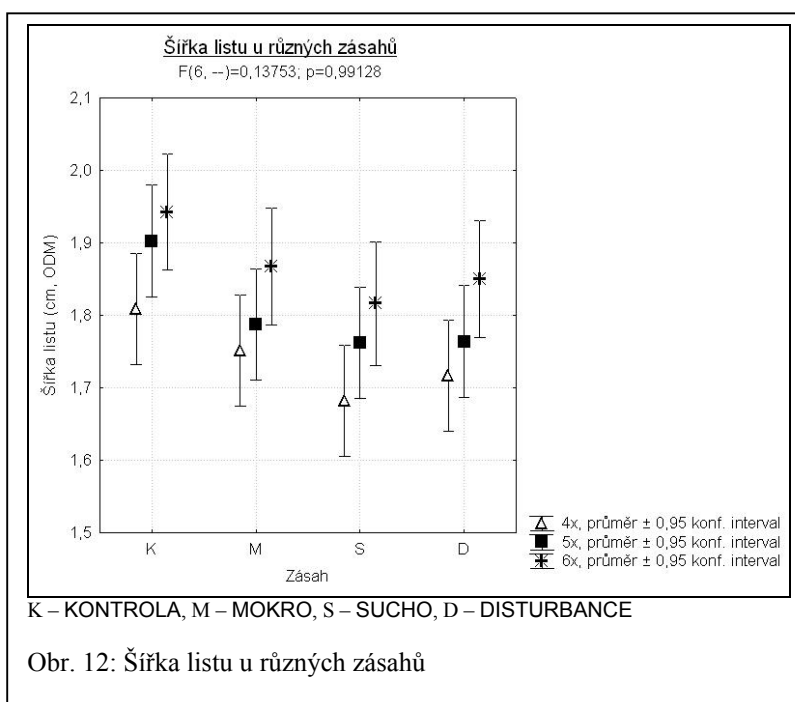
Výsledná stanoviska k nulovým hypotézám shrnuje tabulka 8.

POKUS II	ploidie	rostlina (ploidie)	zásah	ploidie*zásah
počet výběžků	N	VP	VP	N
počet větvených výběžků	N	VP	N	N
počet kořenujících výběžků	N	VP	VP	N
délka nejdelšího výběžku	N	VP	VP	N
délka výběžku	N	VP	VP	N
délka čepele listu	N	VP	VP	N
šířka čepele listu	N	VP	VP	N
váha nadzemní biomasy	N	N	VP	N
váha podzemní biomasy	N	VP	VP	N

**P** – průkazné ( $p < 0,05$ ) **VP** – vysoce průkazné ( $p < 0,01$ ) **N** – neprůkazné ( $p > 0,05$ )

Tab. 8: Výsledky statistické analýzy 2. pokusu

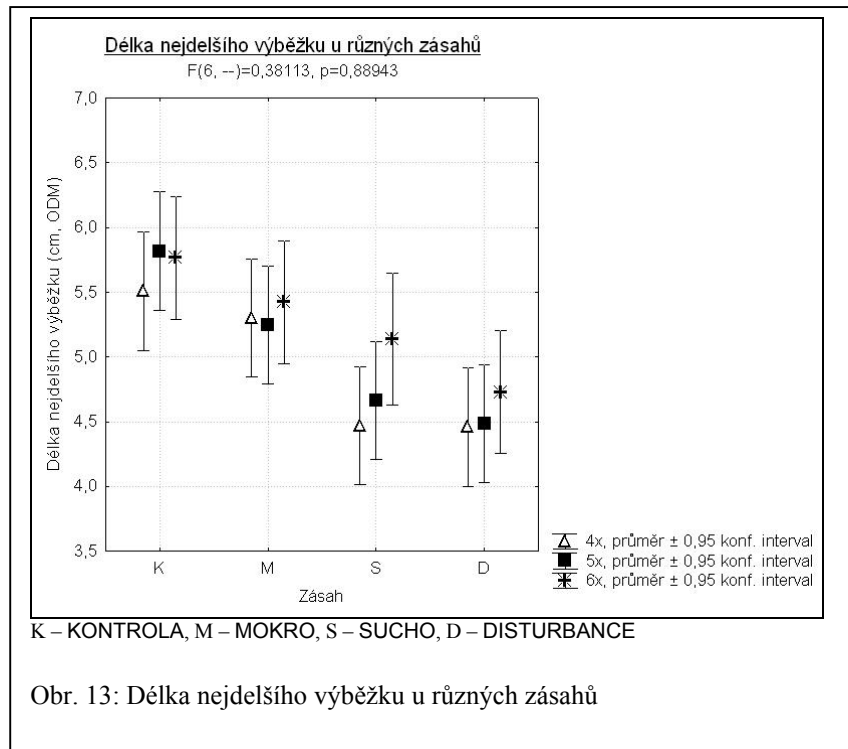
Rostliny různých ploidní úrovní se v měřených charakteristikách nelišily. Zato kromě počtu větvených výběžků byl odhalen vysoce průkazný vliv zásahu, tedy rostliny se lišily v závislosti na podmínkách, ve kterých rostly. Mezi rostlinami v rámci určitého stupně ploidie existuje značná variabilita, proto kromě váhy nadzemní biomasy je rozdíl mezi rostlinami vysoce průkazný.



Interakce mezi stupněm ploidie a typem zásahu nebyla zjištěna ani v jediném případě. Rostliny různých cytotypů tedy na rozdílné zásahy reagovaly stejně.

Měřené znaky dosahovaly ve většině případů nejvyšších hodnot u zásahu *kontrola*, nižší hodnoty byly u zásahu *mokro* a nejnižších hodnot dosahovaly buď v případě zásahu *sucho* či

*disturbance* (srovnej obr. 12 a obr. 13). První graf zároveň vyjadřuje pozitivní korelaci šířky listu se



Obr. 13: Délka nejdelšího výběžku u různých zásahů

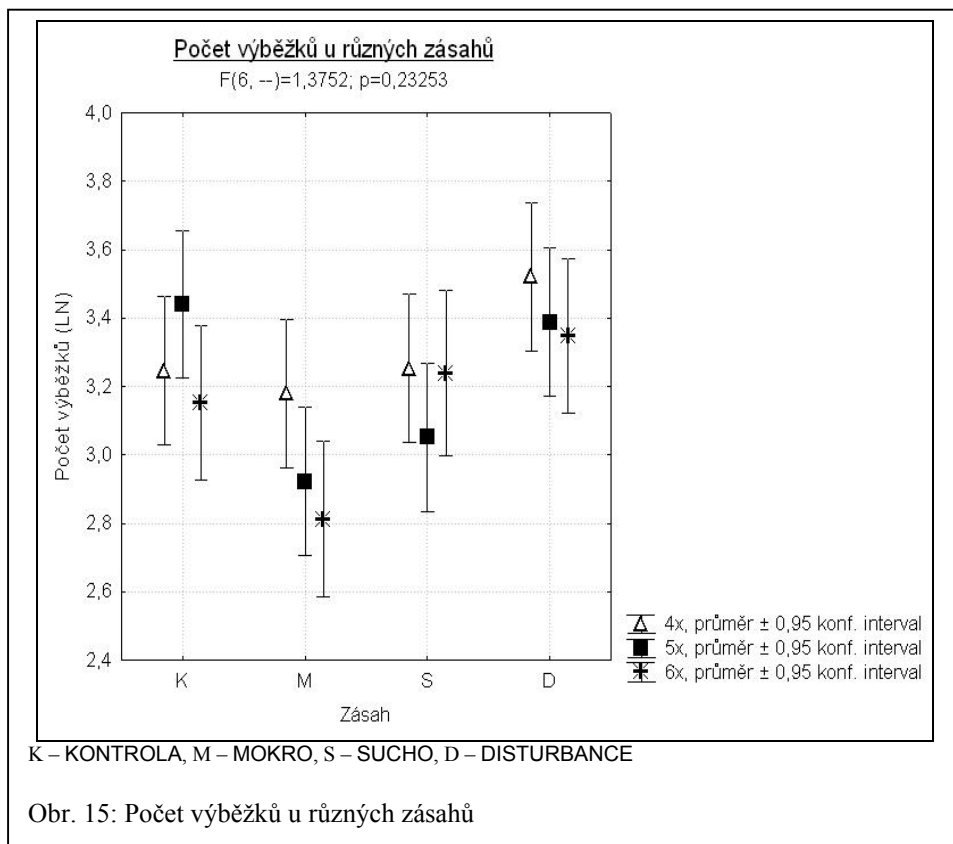
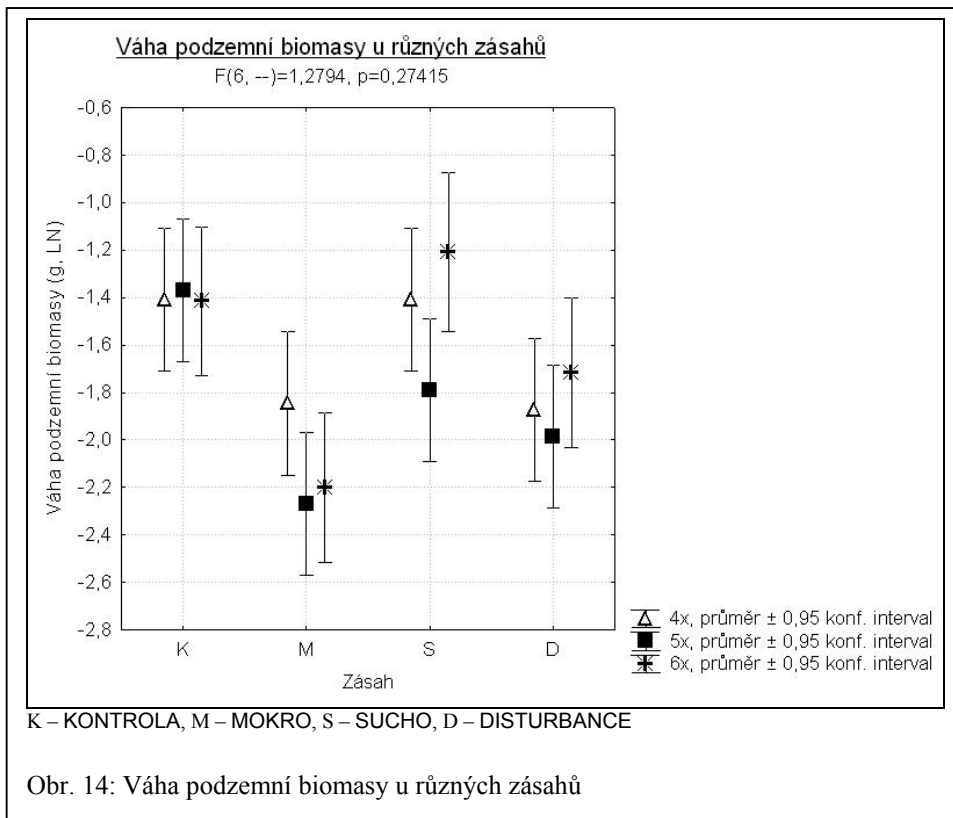
stupněm ploidie, avšak rozdíly mezi ploidiemi nebyly průkazné. Jednotlivé cytotypy dosahovaly nejvyšších hodnot v měřených znacích v odlišných zásazích. Výrazně odlišný gradient hodnot u zásahů však nalezneme u váhy podzemní biomasy (obr. 14). Nejmenší kořenovou biomasu produkovaly podle očekávání rostliny pěstované ve vodě (*mokro*), největších hodnot dosáhla váha biomasy u hexaploidů ovlivněných suchem, nicméně poměrně vyšší hodnoty byly naměřeny také u některých rostlin v podmínkách *kontrola*.

Rostliny pěstované ve vodě tvořily v rámci všech cytotypů nejmenší počet výběžků (viz obr. 15). Celkový vzhled těchto rostlin byl nápadně odlišný od rostlin pěstovaných v jiných zásazích, a to bez ohledu na cytotyp rostlin.

Tabulka č. 9 uvádí základní statistické charakteristiky dat získaných v tomto pokusu.

#### Shrnutí obou pokusů

Na základě předložených výsledků se dá říci, že morfologická variabilita druhu *Agrostis stolonifera* je do značné míry ovlivňována typem substrátu, vlhkostními podmínkami i sešlapem. Ekologické podmínky mají patrný vliv na morfologické znaky klonů jedné rostliny. Příslušnost k cytotypu se ve většině zkoumaných znaků na vegetativních prýtech neprojevuje, cytotypy na ekologické podmínky reagují stejně.



POKUS II	ploidie	počet měření	průměr	medián	minimum	maximum	rozsah	standardní odchylka
počet výběžků	4x	48	29,79	28,50	12,00	58,00	46,00	12,89
	5x	48	26,77	24,00	9,00	58,00	49,00	11,61
	6x	43	25,56	24,00	10,00	52,00	42,00	12,22
počet větvených výběžků	4x	48	3,73	3,00	0,00	12,00	12,00	3,13
	5x	48	4,60	4,00	1,00	10,00	9,00	2,29
	6x	43	4,07	3,00	0,00	11,00	11,00	2,49
počet kořenujících výběžků	4x	48	3,58	3,50	0,00	13,00	13,00	2,98
	5x	48	4,10	4,00	0,00	11,00	11,00	2,82
	6x	43	3,63	3,00	0,00	13,00	13,00	2,44
max. délka výběžku (cm)	4x	48	25,88	26,05	8,10	53,40	45,30	12,41
	5x	48	26,46	26,65	4,00	43,10	39,10	9,20
	6x	43	28,92	27,40	12,80	56,90	44,10	11,10
délka výběžku (cm)	4x	144	8,32	4,35	1,20	42,10	40,90	8,57
	5x	144	7,93	5,10	0,80	31,50	30,70	6,95
	6x	129	8,77	5,50	1,10	44,40	43,30	7,73
délka čepele listu (cm)	4x	144	7,19	7,00	1,10	14,80	13,70	2,51
	5x	144	6,30	6,10	2,40	17,70	15,30	2,25
	6x	129	7,12	7,00	2,40	12,10	9,70	2,19
šířka čepele listu (cm)	4x	144	3,10	2,90	1,30	5,60	4,30	0,99
	5x	144	3,32	3,25	1,60	5,40	3,80	0,93
	6x	129	3,57	3,60	1,60	6,80	5,20	0,93
váha nadzemní biomasy (g)	4x	48	0,76	0,66	0,16	2,04	1,89	0,44
	5x	48	0,80	0,69	0,07	2,15	2,08	0,48
	6x	43	0,98	0,83	0,33	2,22	1,89	0,54
váha podzemní biomasy (g)	4x	48	0,24	0,19	0,06	0,58	0,52	0,15
	5x	48	0,19	0,17	0,02	0,50	0,49	0,11
	6x	43	0,24	0,17	0,05	0,74	0,69	0,16

Tab. 9: Základní statistické charakteristiky dat 2. pokusu

## 5.5 Analýza izozymů

Celkem bylo analyzováno 6 enzymatických systémů: ADH, AAT, EST, 6-PGDH, SKDH, SOD. Všechny tyto systémy byly dobře barvitelné a výsledné proužky na gelu čitelné. Většina z těchto systémů však byla velmi variabilní a nevykazovala žádné jednoznačné rozdíly mezi zkoumanými druhy. Např. systém 6-PGDH byl naopak téměř uniformní. Pouze jediný enzymatický systém – SOD vykazoval určitý rozdíl mezi zkoumanými druhy.

Superoxid dismutáza (SOD) E.C. 1.15.1.1 je enzym, který je na gelu viditelný po negativním barvení. To znamená, že po aplikaci barviva se obarví gel a místa proužků patřící SOD zůstanou neobarvená. Kvartérní strukturou tohoto enzymu je dimer či tetramer (Baum et Scandalios 1981). Příloha 4 ukazuje zymogramy, na nichž je analyzováno 28 vzorků (14 vzorků na každém zymogramu). Na obou gelech jsou vždy viditelné dva lokusy enzymu. Na prvním gelu je patrné, že prvních pět vzorků se od zbývajících odlišuje v obou lokusech. První tři vzorky jsou z rostlin *A. capillaris*, následující dva patří tetraploidním rostlinám

ze smíšené populace *A. stolonifera*. Na druhém gelu se v obou lokusech nápadně odlišují vzorky 1 – 5, přičemž 2. vzorek má ve spodním lokusu ještě o jeden proužek více. Všechny tyto lišící se vzorky patří rostlinám *A. capillaris*. Pomineme-li pro tuto chvíli ony dvě rostliny ze smíšené populace, jejichž morfologie připomíná spíše *A. capillaris* (viz dále), v případě SOD se rostliny *A. capillaris* a *A. stolonifera* liší v heterozygotnosti. V podstatě stejná alela u vzorků *A. capillaris* se vyskytuje také u vzorků *A. stolonifera*, u nichž jsou však i další alely. Vzorky 8 – 11 na prvním gelu patří potenciálním pentaploidním hybridům. Tyto vzorky se neshodují v žádném lokusu se vzorky *A. capillaris* a vykazují heterozygotnost jako vzorky *A. stolonifera*. Alely přítomné u *A. capillaris* se neliší od části alel *A. stolonifera*, pouze jsou přítomné v homozygotním stavu. Kombinací homozygotních *A. capillaris* s heterozygotními *A. stolonifera* by potenciální hybridi měli být heterozygotní, a tudíž se podobat rodiči druhu *A. stolonifera*. Potenciální hybridi jsou skutečně heterozygotní, nicméně to může být dáno také variabilitou enzymu v rámci druhu *A. stolonifera*. Proto na základě analýzy SOD nemůžeme stále vyloučit možnost hybridního vzniku těchto pentaploidů.

Dva vzorky z populace *A. stolonifera*, které jsou homozygotní stejně jako *A. capillaris*, problém také neřeší. Mohou být buďto důkazem, že i v populacích *A. stolonifera* se mohou vyskytovat jedinci s homozygotním zastoupením alel SOD, nebo je možné, že se jedná o rostliny náležící spíše druhu *A. capillaris* či o hybridy, protože některé jejich morfologické znaky mají intermediární charakter.

Na 2. zymogramu je také patrná odlišnost 11. vzorku, kterému chybí alela v horním lokusu. Jedná se o hexaploidní cytotyp *A. stolonifera* s poměrně typickým vzhledem svého druhu. Tento vzorek by mohl dokazovat, že enzymatický systém SOD je variabilní i mezi typickými jedinci *Agrostis stolonifera*.

## 5.6 Opylovací experiment

Jedním z cílů této práce bylo původně také ověření fertility cytotypů *Agrostis stolonifera* pomocí opylovacího experimentu. Vzhledem k tomu, že se experiment nezdařil, není zmiňován v jiných kapitolách této práce. Přesto však považuji za vhodné zmínit podněty vedoucí k jeho provedení a zejména pak popsat metodiku, aby se jiní botanikové mohli vyvarovat některých chyb.

Již v roce 2005 bylo ve skleníku (v květináčích o objemu 2,5 l) pěstováno 5 rostlin od každé ploidie za účelem vypěstování generativních prýtů, na kterých by v průběhu července a srpna proběhl opylovací experiment. Rostliny ve skleníku v sezóně 2005 však trpěly značně vysokými teplotami a mohutně se na nich rozvinula rez, proto vůbec nevytvořily generativní prýty a i jejich vegetativní části rostly mnohem hůře (některé rostliny dokonce zahynuly) než u rostlin pěstovaných na venkovním záhonu.

Následující sezónu jsem se proto rozhodla provést opylovací experiment přímo venku na pokusné ploše. V červenci 2006 bylo vybráno od každé ploidie 10 rostlin tvořících generativní prýty. Na každé rostlině byly vybrány 4 laty, na které byly nasunuty zavazovací váčky vyrobené ze síťoviny Uhelon (průměr ok 42  $\mu\text{m}$ ). Aby tíha váčku nezlomila stéblo s latou, byl vždy sáček přivázán k rákosové tyčce zapíchnuté podél stébla. Během kvetení ostatních pokusných rostlin o známé ploidii, byly z těchto rostlin sbírány laty a pyl byl

štetcem vkládán do opylovacích váčků. Do váčku č. 1 nebyl dáván žádný pyl, do váčku č. 2 byl dáván pyl z tetraploidních jedinců, do váčku č. 3 z pentaploidních jedinců a do váčku 4 byl přidáván pyl hexaploidů. Pyl byl do váčků vkládán během rozkvětu po dobu 7 dní denně, poté v 3 denních intervalech.

Váček 1 na každé rostlině sloužil jako kontrola – pro zohlednění případného vlivu opylovacího váčku a potvrzení neschopnosti autogamie. Výsledky různých studií zabývajících se autogamií druhu *A. stolonifera* se totiž liší. Davies (1953) uvádí, že *A. stolonifera* je druh s autoinkompatibilitou pylových zrn, i když v nepřítomnosti cizího pylu může dojít k autogamii, Björkman (1954) ve své práci předkládá výsledky ze samoopylení pentaploidních a hexaploidních jedinců, Fei et Nelson (2004) ve své práci při skleníkovém experimentu zaznamenali skutečně jen velmi vzácný výskyt autogamicky vzniklých obilek.

Bohužel venkovní experiment narazil na nepřízeň počasí a časté přívalové deště a bouřky poškodily značnou část stébel s opylovacími váčky a zřejmě opakovaně způsobily vymytí pylu z váčků. U většiny květenství se nevytvořily žádné obilky, což mohlo být způsobeno poškozením laty nebo vymytím dodávaného pylu nebo reprodukční bariérou mezi ploidiemi (případně problémy s meiozou u některých cytotypů). Vzhledem k podmínkám pokusu však nejsem schopná možné příčiny odlišit a získaná data proto nelze řádně vyhodnotit. Poučením pro příště necht' mi je provádět opylovací experiment v chráněném prostoru (nejlépe v klimaboxu) a použít raději speciální hybridizační vaky, např. jaké uvádí ve své práci o *A. stolonifera* Fei et Nelson (2004).

## 6 Diskuse

### 6.1 Počítání chromosomů

Při ověření aneuploidního počtu chromosomů u jednoho vzorku *Agrostis canina* bylo napočítáno 14 chromosomů. Tento počet však odpovídá euploidnímu cytotypu. Ovšem situaci komplikuje fakt, že u druhu *A. canina* je udáván výskyt tzv. B-chromosomů. Björkman (1951) u *A. canina* var. *fascicularis* zaznamenal výskyt přídatných chromosomů u 25 z 80 zkoumaných rostlin. Dokonce u tohoto taxonu rozlišil dva typy přídatných chromosomů – první typ jsou chromosomy dosahující asi 1/3 velikosti normálních chromosomů, druhý typ představují ještě menší až tečkovité chromosomy. V metafázních figurách mitotických buněk vzorku bylo možné rozlišit 14 chromosomů, nicméně preparáty neměly dostatečnou kvalitu, aby bylo možné vyloučit, že některé ze 14 napočítaných objektů nepatří B-chromosomům. Pokud totiž chromosomy nejsou natočeny všechny ve stejné rovině tak, aby bylo možné porovnat jejich velikost, nemůžeme přítomnost B-chromosomů vyloučit, a tedy nemůžeme potvrdit ani vyvrátit hypotézu o aneuploidním jedinci.

### 6.2 Velikost genomu

V předchozí studii data o rozšíření jednotlivých cytotypů ukázala, že v nejvyšších polohách České republiky, kde se podařilo *Agrostis stolonifera* nalézt, byl zastoupen pouze hexaploidní cytotyp (Kubešová 2004). Rozšíření studovaného materiálu však ve vyšších nadmořských výškách odhalilo výskyt i ostatních cytotypů. Conert (1989) u *A. stolonifera* uvádí, že tento druh v Alpách vystupuje až do nadmořské výšky 2800 m. V České republice byl během této studie nalezen nejvýše ve 1440 m n. m. a to na břehu říčky, tedy na pravidelně zaplavovaném stanovišti. I v ostatních případech byl tento druh v horách nejčastěji nalezen v biotopech ovlivněných disturbancemi, převážně však na antropogenních stanovištích. Rostliny zde rostou zejména na cestách, na neasfaltových parkovištích, kde je vegetační kryt narušován auty, v bezprostřední blízkosti horských chat na disturbovaných místech (staveniště, sešlapávané trávníky). *A. stolonifera* je v ČR do vyšších nadmořských výšek nejspíš zavlékán člověkem a zřejmě zde mohou přežít všechny cytotypy. Protože v ostatních částech republiky rozšíření cytotypů nejeví žádné jednoznačně interpretovatelné rozložení, převaha hexaploidů v horách by mohla skutečně vypovídat o lepším přežívání hexaploidů v těchto podmínkách.

U krytosemenných rostlin mají polyploidní jedinci často menší Cx-hodnotu než jejich diploidní příbuzní, což poukazuje na selekční tlak vedoucí po polyploidizaci ke ztrátě DNA (Leitch et Bennett 2004). Studované druhy rodu *Agrostis* jsou zástupci různých sekcí rodu (Widén 1971) a většinou se jedná o allopolyploidní druhy s rozdílnými rodičovskými genomy, proto nemůžeme jejich absolutní velikosti genomu jednoduše porovnávat (Leitch et Bennett 2004). Porovnání různých cytotypů však umožňuje polyploidní komplex *A. stolonifera*. U tohoto druhu byla zjištěna pozitivní korelace velikosti monoploidního genomu se stupněm ploidie. Jones (1956) odvozuje původ pentaploidních a hexaploidních jedinců přímo z tetraploidního cytotypu (AABB) prostřednictvím „nevyvážených“ (AAB či ABB) či neredukovaných (AABB) gamet. Jeden z diploidních předků tetraploidního cytotypu byl nejspíš shodný s rodičem *A. capillaris* (Jones 1956). Absolutní velikost

tetraploidních cytotypů *A. capillaris* a *A. stolonifera* se přibližně shoduje, což může potvrzovat blízkou příbuznost.

U druhu *A. rupestris* se nepodařilo napočítat standard se známým počtem chromosomů, proto u něj byla stanovena pouze DNA-ploidie (Suda et al. 2006). V literatuře jsou z území střední Evropy známy diploidní, triploidní i tetraploidní cytotypy. U zkoumaného vzorku zjištěná 2C-hodnota přibližně odpovídá 4násobku 1Cx-hodnoty u rodu *Agrostis*, tj. čtyřnásobné velikosti monoploidní sádky chromosomů. Absolutní velikost genomu zkoumaného vzorku tedy odpovídá DNA-tetraploidnímu jedinci. Nicméně v literatuře velmi často uváděná přítomnost B chromosomů nám neumožňuje dávat výsledky průtokové cytometrie do souvislosti s nějakým konkrétním počtem chromosomů.

Při interpretaci výsledků je však třeba mít na paměti, že koeficienty variance některých peaků dosahovaly v několika případech poměrně vysokých hodnot (maximální CV standardu = 4 %, maximální hodnota vzorku = 5 %). Optimální hodnota při určování absolutní velikosti genomu je přitom  $CV \leq 3 \%$  (Doležel et Bartoš 2005), proto výsledky podrobnějšího porovnání by mohly být zavádějící.

### 6.3 Velikost průduchů

Pozitivní korelace délky průduchů se stupněm ploidie u *Agrostis stolonifera* se shoduje s výsledky studií na jiných taxonech z čeledi *Poaceae* i jiných skupin. Aryavand et al. (2003) u *Aegilops neglecta* považují délku průduchů za anatomický znak, který je možné na území Turecka použít pro odlišení cytotypů bez karyologických a cytometrických technik. U druhu *A. stolonifera* byl však zjištěn poměrně značný překryv hodnot délky průduchů různých cytotypů a jen nejmenší a nejvyšší hodnoty se vyskytují u odlišných ploidii. Proto tento znak samotný nelze použít pro rozlišení cytotypů.

### 6.4 Fenotypová plasticita morfologických znaků

#### 6.4.1 Vliv substrátu

Výsledky ukazují, že u pokusu se substráty ze čtyř morfologických charakteristik, ve kterých se rostliny různých ploidních úrovní průkazně lišily, jsou tři s ploidii pozitivně korelované – maximální délka výběžku, šířka listu a váha nadzemní biomasy. U těchto znaků tedy platí, že čím vyšší ploidie, tím vyšších hodnot dosahovaly. Zbývající charakteristika – počet výběžků byl největší u pentaploidů (cytotypu středního stupně ploidie) a jednoznačně nejnižší u hexaploidů. Negativní korelace znaku s ploidii nebyla prokázána u žádné měřené charakteristiky, ačkoli je známá z více studií. Zvláště u trav bývá uváděn např. nižší vzrůst ploidně vyšších cytotypů způsobený redukcí počtu stébel a výběžků (Stebbins 1971). Rozsah hodnot ve většině znaků rostl s narůstajícím stupněm ploidie. Opačný trend byl zaznamenán jen u počtu výběžků.

Pozitivní korelaci váhy vegetativní biomasy s ploidii u *Agrostis stolonifera* zaznamenal ve své práci již Aston (1962), když porovnával na území Británie tetraploidní a hexaploidní jedince. Také Kik et al. (1992) u tohoto druhu uvádějí tendenci netetraploidních jedinců tvořit větší počet některých výběžků a více vegetativní biomasy, ačkoli rozdíly nebyly statisticky průkazné. Tato korelace je ve shodě s obecným trendem vyšších ploidii tvořit větší orgány vyplývající z větší velikosti buněk u vyšších ploidii (Stebbins 1971, Bennett 1972).



Všechny statisticky průkazné rozdíly v měřených znacích a stupni ploidie podporují hypotézu, že jedinci vyšších ploidních úrovní se rozmnožují spíše vegetativně. Zvláště u lichých ploidií se předpokládají větší selekční tlaky upřednostňující vegetativní rozmnožování, čímž by mohla být vysvětlena tvorba největšího počtu výběžků právě u pentaploidních jedinců. Jones (1958) u cytotypů *Holcus mollis* ve Velké Británii také zjistil, že pentaploidní cytotyp je oproti tetraploidním cytotypům sterilní a rozmnožuje se pouze vegetativně. Nicméně jiná studia ukazuje, že ve Francii pentaploidní jedinci *Holcus mollis* vznikají jiným způsobem a nejsou zcela sterilní (Jones et Carroll 1962).

Podle očekávání rostliny nejhůře rostly v písku, coby substrátu s nejméně vhodnými vlastnostmi pro růst rostlin (nízké pH, nižší obsah živin, stres suchem). Kupodivu však nejlepší podmínky pro růst představoval čistý zahradnický substrát a ne hnojený zahradnický substrát, tedy podmínky s vyšším obsahem živin. V průběhu experimentu (zvláště v červenci) bylo extrémně teplé počasí a i přes pravidelnou závlahu docházelo ke značnému vysychání substrátu. Vyšší obsah NPK za těchto okolností tedy mohl rostlinám vytvořit velmi nepříznivé podmínky kvůli vysokému obsahu iontů v půdním roztoku a znesnadnění příjmu vody.

#### 6.4.2 Vliv vlhkostních poměrů a sešlapu

Experiment odhalil vysoce průkazný vliv zásahu na měřené morfologické znaky. Zejména rostliny pěstované ve vodě se svým vzhledem od rostlin z jiných zásahů nápadně odlišovaly. Rostliny všech cytotypů ve vodě v největší míře tvořily dlouhé, často z nodů kořenující výběžky (obr. 18) a naopak tvořily nejméně výběžků. Tento morfotyp odpovídá taxonu *A. stolonifera* subsp. *prorepens* uváděném jako součást české flóry Dostálem (1989). Tento poddruh je popisován jako rostlina s dlouhými výběžky, často kořenujícími v kolénkách, někdy ve vodě plovoucí, obývající podmáčené pastviny, rašeliniště a zaplavované břehy vod. Taxon by měl být zastoupen jedinci s 35 a 70 chromosomy (Dostál 1989), tedy pentaploidními a dekaploidními jedinci, přičemž zjištění dekaploidních jedinců nebylo dosud v jiné klíčové práci u *A. stolonifera* publikováno, a to ani v review zabývajících se touto tematikou (Frey 1997). Jedná se tedy nejspíš o mylný údaj. Nicméně definice poddruhu svými morfologickými i ekologickými vlastnostmi odpovídá morfotypu, který během experimentu vytvořila většina rostlin pěstovaných ve vodě (obr. 17). A přitom k pokusu byly použity rostliny různých cytotypů, pocházející původně z široké škály biotopů a v posledních letech pěstované ve shodných podmínkách. Odlišování poddruhu *A. stolonifera* subsp. *prorepens* je tedy zřejmě ukázkou přiřazení taxonomického významu vlastnostem determinovaným převážně ekologickými podmínkami.



Obr. č. 17: Typický vzrůst rostliny pěstované ve vodě



Obr. č. 18: Nadzemní výběžek rostliny pěstované ve vodě. Šipky ukazují kořeny vytvořené v nodech výběžku.

U obou pokusů je však mít na zřeteli, že delší trvání experimentu a zahrnutí znaků na generativních částech rostliny by mohlo vést k jiným závěrům. Nicméně ani studie Kik et al. (1992), kdy rozdíly mezi cytotypy byly vyhodnocovány po více než jednom roce, neprokázala rozdíly. Rostliny byly v uvedené práci po určité době pěstování ve shodných podmínkách přesazovány na přírodní stanoviště lišící se v mnoha parametrech (míra disturbance, zapojení vegetace, obsah živin,...), a přesto se neprojevily žádné odlišné charakteristiky cytotypů. Autoři však cytotypy rozdělili jen do dvou kategorií – tetraploidi (4x) a netetraploidi (5x, 6x).

Malý podíl morfologických znaků, které by odlišovaly ploidie napovídá, že většina morfologické variability cytotypů *Agrostis stolonifera* je způsobena fenotypovou, případně vnitrocytotypovou variabilitou.

### 6.5 Analýza izozymů

Použité enzymatické systémy bohužel neumožnily vyvodit jakékoli definitivní závěry o případném hybridním vzniku některých pentaploidních jedinců *A. stolonifera*. Většina enzymatických systémů se u zkoumaných druhů nelišila, což může být dáno blízkou příbuzností těchto druhů. Jones (1953) předpokládá, že oba druhy mají společného jednoho diploidního předka, proto se genom jejich tetraploidních cytotypů z jedné poloviny shoduje. Malé rozdíly ve složení genomu se proto mohou odrážet i na úrovni izozymů.

Pouze komplex SOD vykazoval rozdíly mezi *A. capillaris* a většinou vzorků *A. stolonifera*. Nicméně ne zcela jednoznačně. U dvou tetraploidních jedinců *A. stolonifera* byl totiž zjištěn homozygotní stav alel SOD stejně jako u jedinců *A. capillaris*. To může být důkazem toho, že také jedinci *A. stolonifera* mohou být v tomto znaku homozygotní, a tudíž enzymatický systém SOD je pouze dalším komplexem, který neodlišuje studované druhy. Tito dva jedinci však pocházející z populace *A. stolonifera* tvořené všemi cytotypy a vykazují některé intermediární morfologické znaky, kterými se podobají spíše druhu *A. capillaris*. Navíc z těchto populací byly sebrány i dva analyzované potenciální pentaploidní hybridy. Populace by tedy mohla být tvořena nejen pentaploidy ale i tetraploidy hybridního původu. V populaci jsou zastoupeny i hexaploidní jedinci, kteří plně odpovídají vymezení druhu *A. stolonifera*. A to jak morfologicky (poléhavé výběžky, dlouhý jazýček, lata v obrysu trojúhelníkovitá), tak karyologicky ( $2n = 6x$ ). Pentaploidi se už některými znaky podobají jedincům *A. capillaris* – jsou spíše trsnaté, bez poléhavých výběžků, lata v obrysu spíše oválná, na rozdíl od *A. capillaris* (4x) však mají dlouhý jazýček a  $2n = 5x$ . Tetraploidní jedinci v těchto populacích však vykazují některé podobné znaky jako pentaploidi (dlouhý jazýček), proto jejich příslušnost k druhu *A. stolonifera* je také sporná. Výsledek analýzy SOD, který tyto jedince řadí spíše k *A. capillaris* proto může napovídat, že skutečně mají něco společného s druhem *A. capillaris* (hybridi, introgrese?). Toto je však čistě spekulativní úvaha, kterou je třeba podložit či vyvrátit dalšími analýzami – např. analýzou cpDNA.

## 7 Závěr

Podářilo se rozšířit materiál o dalších zhruba 150 vzorků *Agrostis stolonifera* a upřesnit znalosti o rozšíření cytotypů druhu. Cytotypy *A. stolonifera* se zdají být na území České republiky zhruba stejně hojné a nejeví žádné odlišné geografické vazby. Metodou průtokové cytometrie byly určeny také ploidní úrovně a absolutní velikosti genomu dalších 5 běžných druhů rodu *Agrostis* v České republice. U druhu *A. stolonifera* byl prokázán rostoucí obsah DNA monoploidní sádky chromosomů s narůstajícím stupněm ploidie.

Kultivační experimenty prokázaly vliv odlišných typů substrátu (hladina živin, fyzikální vlastnosti), dostupnosti vody a sešlapu na většinu měřených morfologických charakteristik. Rozdíly mezi cytotypy v různých podmínkách byly prokázány jen u menšiny měřených znaků (počet výběžků, délka nejdelšího výběžku, šířka listu a váha nadzemní biomasy). Morfologická variabilita *A. stolonifera* je tedy z významné části dána ekologickými podmínkami.

Na úrovni anatomických znaků byla prokázána pozitivní korelace mezi cytotypem a délkou průduchů. V délce průduchů mezi různými cytotypy však existují velké překryvy hodnot, proto samotný tento kvantitativní znak nelze používat k určení cytotypu.

Hypotézu o vzniku některých pentaploidních jedinců *A. stolonifera* hybridizací mezi tetraploidním *A. capillaris* a hexaploidním *A. stolonifera* se nepodařilo analýzou izozymů podpořit. Ačkoli izozymové analýzy neobjasnily řešenou problematiku, považují za osobní přínos poznání a zvládnutí této metody.

## 8 Seznam literatury

- Acquaah G. (1992):** Practical protein electrophoresis for genetic research. Dioscorides Press, Portland, Oregon. 131 pp.
- Aryavand A., Ehdaie B., Tran B., Waines J. G. (2003):** Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. Genetic Resources and Crop Evolution, 50: 175–182.
- Baum J. A., Scandalios J. G. (1981):** Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutase of maize. Archives of Biochemistry and Biophysics, 206: 249–264.
- Beck S. L., Dunlop R. W., Fossey A. (2003):** Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). Botanical Journal of The Linnean Society, 141 (2): 177–181.
- Belanger F. C., Meagher T. R., Day P. R., Plumley K., Meyer W. A. (2003):** Interspecific hybridization between *Agrostis stolonifera* and related *Agrostis* species under field conditions. Crop Science, 43 (1): 240–246.
- Bennett M. D. (1972):** Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. Proceedings of the Royal Society London, Series B, Biological Sciences, 181: 109–135.
- Bennett M. D., Leitch I. J. (1995):** Nuclear DNA amounts in angiosperms. Annals of Botany, 76: 113–176.
- Bennett M. D., Leitch I. J. (2005a):** Angiosperm DNA C-values Database (release 6.0, October 2005). <http://www.kew.org/cval/homepage.html>
- Bennett M. D., Leitch I. J. (2005b):** Genome size evolution in plants. In: Gregory T. R. (ed.): The evolution of the genome. Elsevier Academic Press, Amsterdam New York, pp. 89–162.
- Bennett M. D., Leitch I. J. (2005c):** Plant genome size research: a field in focus. Annals of Botany, 95: 1–6.
- Bennett M. D., Smith J. B. (1976):** Nuclear DNA amounts in angiosperms. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, 274: 227–274.
- Bennett M. D., Bhandol P., Leitch I. J. (2000):** Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. Annales of Botany, 86: 859–909.
- Bennett M. D., Smith J. B., Lewis Smith R. I. (1982):** DNA amounts of angiosperms from the Antarctic and South Georgia. Environmental and Experimental Botany, 22: 307–318.
- Bhagwat S. G., Bhatia C. R. (1993):** Selection for flag leaf stomatal frequency in bread wheat. Plant Breeding, 110: 129–136.
- Björkman S. O. (1951):** Chromosome studies in *Agrostis*. Hereditas, 37: 465–468.



- Björkman S. O. (1954):** Chromosome studies in *Agrostis* II. *Hereditas*, 40 (2): 254–258.
- Björkman S. O. (1960):** Studies in *Agrostis* and related genera. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, 17 (1): 1–112.
- Bonos S. A., Plumley K. A., Meyer W. A. (2002):** Ploidy determination in *Agrostis* using flow cytometry and morphological traits. *Crop Science*, 42 (1): 192–196.
- Borrino E. M., Powell W. (1988):** Stomatal guard cell length as an indicator of ploidy in microspore derived plants of barley. *Genome*, 30: 158–160.
- Bowers J. E., Chapman B. A., Rong J. K., Paterson A. H. (2003):** Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature*, 422: 433–438.
- Conert H. J. (1989):** *Agrostis*. In: Hegi G.: *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Lieferung 5, Juli '89, Band I, Teil 3. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. 333–357 pp.
- Davies E. (1953):** The breeding affinities of some British species of *Agrostis*. *British Agricultural Bulletin*, 5: 313–316.
- de Oliveira V. M., Forni-Martins E. R., Magalhaes P. M., Alves M. N. (2004):** Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Eupatorieae*, *Asteraceae*). *Genetics and Molecular Biology*, 27 (2): 215–222.
- Doležel J. (1991):** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical analysis*, 2: 143–154.
- Doležel J., Bartoš J. (2005):** Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99–110.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [eds.] (2007):** *Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 455 pp.
- Dostál J. (1989):** *Agrostis*. In: *Nová květena ČSSR II*. Academia, Praha. pp. 1399–1401.
- Fei S., Nelson E. (2004):** Greenhouse evaluation of fitness-related reproductive traits in Roundup-tolerant transgenic creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). In *Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant*, 40: 266–273.
- Frey L. (1997):** Karyology of the genus *Agrostis*. *Fragmenta Floristica et Geobotanica*, 42 (2): 361–400.
- Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P., Firoozabady E. (1983):** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049–1051.
- Greilhuber J., Obermayer R. (1997):** Genome size and maturity group in *Glycine max* (soybean). *Heredity*, 78: 547–551.

- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M. A., Bennett M. D. (2005):** The origin, evolution, and proposed stabilisation of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*, 95: 255–260.
- Heller F. O. (1973):** DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometric. *Berichte Deutsche Botanische Gessellschaft*, 86: 437–441.
- Joachimiak A., Grabowska–Joachimiak A. (2000):** Stomatal cell length and ploidy level in four taxa belonging to the *Phleum* sect. *Phleum*. *Acta Biologica Cracviensia, Series Botanica*, 42 (1):103–107.
- Jones K. (1956):** Species differentiation in *Agrostis*. III. *Agrostis gigantea* Roth. and its hybrids with *A. tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. *Journal of Genetics*, 54 (3): 394–399.
- Jones K. (1953):** The cytology of some British species of *Agrostis* and their hybrids. *British Agricultural Bulletin*, 5 (23): 316.
- Juhl K. (1952):** An-euploidie und Systematik bei *Agrostis stolonifera* L. und *Festuca rubra* L. aus Schlesweg-Holstein. *Berichte Deutsche Botanische Gessellschaft*, 65: 331–338.
- Kik C., Linders T. E., 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., 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., Van Delden W., Joenje W., Bijlsma R. (1990a):** Colonization and differentiation in the clonal perennial *Agrostis stolonifera*. *Journal of Ecology*, 78: 949–961.
- Kik C., Van Andel J., Joenje W. (1990b):** Life-history variation in ecologically contrasting populations of *Agrostis stolonifera*. *Journal of Ecology*, 78: 962–973.
- Kirschner J., Kirschnerová L., Kottová K., Plačková I., Štěpánek J., Tichý M. (2000):** Analýza isoenzymů v populační biologii rostlin. Příručka praktických cvičení pro posluchače katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK. Průhonice. 23 pp.
- Kirschner J., Štěpánek J., Štěpánková J. (1982):** In: Löve A. [ed.]: IOPB chromosome number reports LXXVI. *Taxon*, 31(3): 574–575.
- Krahulcová A. 1998.** Karyologie cévnatých rostlin při aplikaci metod klasického barvení chromozómů. Příručka praktických cvičení pro posluchače katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK. Průhonice. 25 pp.  
<http://botany.natur.cuni.cz/pdf/karyologie.pdf>
- Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J., Štěpánek J. [eds.]. 2002.** Klíč ke květeně ČR. Academia, Praha.

- Kubešová M. (2004):** Karyologická studie *Agrostis stolonifera* v České republice (Bakalářská diplomová práce.). Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. 29 pp.
- Leitch I. J., Bennett M. D. (2004):** Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 651–663.
- Lepš J. (1996):** Biostatistika. Skriptum, Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice. 166 pp.
- Levin D. A. (2002):** The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press, Oxford. 240 pp.
- Limin A. E., Fowler D. B. (1989):** The influence of cell size and chromosome dosage on cold-hardiness expression in the *Triticeae*. *Genome*, 32: 667–671.
- Lysák M. A., Doležel J. (1998):** Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria (Poaceae)*. *Caryologia*, 51: 123–132.
- Lysák M. A., Doleželová M., Horry J. P., Swennen R., Doležel J. (1999):** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 1344–1350.
- Marhold K., Suda J. (2002):** Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). Skriptum, Karolinum, Praha. 159 pp.
- Markert C. L., Moller F. (1959):** Multiple forms of enzymes: Tissues, cytogenic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 45: 753–763.
- Měsíček J., Jarolímová V. (1992):** List of chromosome numbers of the Czech vascular plants. Academia, Praha.
- Miskin K. E., Rasmusson D. C. (1970):** Frequency and distribution of stomata in barley. *Crop Science*, 10: 575–578.
- Mowforth M. A. G. (1986):** Variation in nuclear DNA amounts in flowering plants: an ecological analysis. Ph. D. University of Sheffield.
- Obermayer R., Greilhuber J. (2006):** Cryptopolyploidy revisited: the case of *Vinca* (Apocynaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 256: 201–208.
- Oja T. (2005):** Isozyme evidence on the genetic diversity, mating system and evolution of *Bromus intermedius (Poaceae)*. *Plant Systematics and Evolution*, 254: 199–208.
- Oja T., Jaaska V., Vislap V. (2003):** Breeding system, evolution and taxonomy of *Bromus arvensis*, *B. japonicus* and *B. squarrosus (Poaceae)*. *Plant Systematics and Evolution*, 242: 101–117.
- Otto F. (1990):** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman H.A. & Darzynkiewicz Z. (eds.): *Methods in Cell Biology*, 33: 105–110. Academic Press, New York.



- Otto S. P., Whitton J. (2000):** Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, 34: 401–437.
- Rajenda B. R., Mujeeb K. A., Bates L.S. (1978):** Relationships between 2x *Hordeum* sp., 2x *Secale* sp. and 2x, 4x, 6x *Triticum* sp. for stomatal frequency, size and distribution. *Environmental and Experimental Botany*, 18: 33–37.
- Ramsey J. (2007):** Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity*, 98 (3): 143–150.
- Refoufi A., Esnault M. A., Levasseur J. E. (2005):** Characterization of a novel 9-ploid hybrid ( $2n = 63$ ) with four genomes in an *Elytrigia* complex (*Poaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147: 501–508.
- Rosenbaumová R., Plačková I., Suda J. (2004):** Variation in *Lamium* subg. *Galeobdolon* (Lamiaceae) – insights from ploidy levels, morphology and isozymes. *Plant Systematics and Evolution*, 244: 219–244.
- Rothanzl J. (2002):** Struktura genet *Agrostis capillaris* v heterogenním prostředí vytvořeném mraveništi druhu *Lasius flavus*. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra botaniky, Oddělení geobotaniky. 82 pp.
- Roux N., Toloza A., Radecki Z., Zapata-Arias F. J., Doležel J. (2003):** Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Reports*, 21(5): 483–490.
- Singh S., Sethi G. S. (1995):** Stomatal size, frequency and distribution in *Triticum aestivum*, *Secale cereale* and their amphiploids. *Cereal Research Communications*, 23: 103–108.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Tate J. A. (2003):** Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist*, 161: 173–191.
- Soltis D. E., Soltis P.S. (1989):** *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland, Oregon. 268 pp.
- Stebbins G. L. (1971):** The morphological, physiological and cytogenetic significance of polyploidy. In: Stebbins G. L. (ed.): *Chromosomal evolution in higher plants*. Arnold, London. 124–154 pp.
- Stuckey I. H., 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. 50 pp.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Krahulec F. (2006):** Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon*, 55 (2): 447–450.
- Swift H. (1950):** The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 36: 643–654.

- Wang H., Clarke J. M. (1993):** Genotypic, intraplant and enviromental variation in stomatal frequency and size in wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 73: 671–678.
- Yanaka F. Y., Dall’Agnol M., Schifino-Wittmann M. T. Dias P. M. B., Gomes K. L. (2005):** Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (*Poaceae*) com Base em Isoenzimas e Marcadores RAPD1. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(6): 1897–1904.
- Widén K.–G. (1971):** The genus *Agrostis* L. in eastern Fennoscandia. Taxonomy and distribution. *Flora Fennica*, 5: 298 pp. Helsingfors, Helsinki.

## Příloha 1: Seznam lokalit

číslo	druh	lokalita	nadm. výška	long	lat	datum sběru	ploidie
1	<i>A. canina</i>	Březník: SV okraj rašeliniště Novohuťské močály, ca 2,7 km SZ od hájovny v zaniklé obci	1200	48°59'03,07"	13°27'01,49"	15.7.2003	<b>2x</b>
2	<i>A. canina</i>	Dolní Sokolovec: PP Písník u Sokolovce 0,7 km JJZ obce, rašelinný mokřad	480	49°43'18"	15°42'39"	24.7.2003	<b>2x</b>
3	<i>A. canina</i>	Kaliště u Č. Budějovic: vlhká louka ca 1 km VJV od obce	500	48°57'44''	14°35'16''	říjen 2001	<b>2x</b>
4	<i>A. canina</i>	Knížecí Pláně: okraj příkopu a prameniště ca 1,5 km JJV od zatáčky v zaniklé obce	980	48°56'57.19"	13°37'58.95"	17.7.2003	<b>2x</b>
5	<i>A. canina</i>	Strachoňovice: rašelinná louka v lesích ca 1,9 km J od obce	540	49°07'05''	15°29'33''	12.8.2002	<b>2x</b>
6	<i>A. canina</i>	Závod: louky ve východní části rezervace Abrod ca 600 m J železniční zastávky Závod (Slovensko)	160	48°31'30"	17°00'20"	22.8.2002	<b>&lt; 2x</b>
7	<i>A. capillaris</i>	České Budějovice: bývalé vojenské cvičiště na severním okraji	385	49°00'01"	14°26'48"	říjen 2001	<b>4x</b>
8	<i>A. capillaris</i>	Ejovice: lesní okraj nedaleko dálnice ca 1,3 km J od obce	425	49°44'04"	13°31'00"	září 2001	<b>4x</b>
9	<i>A. capillaris</i>	Chlum u Třeboně: nábreží na pravém břehu Lužnice ca 1 km JV od železniční zastávky	440	48°56'45.12"	14°52'51.3 "	26.8.2004	<b>4x</b>
10	<i>A. capillaris</i>	Chlum u Třeboně: náplavy na pravém břehu Lužnice ca 1 km JV od železniční zastávky	440	48°56'45.12"	14°52'51.3 "	26.8.2004	<b>4x</b>
11	<i>A. capillaris</i>	Kaliště: vlhká louka u silnice ca 1 km VJV od obce	500	48°57'43"	14°35'17"	říjen 2001	<b>4x</b>
12	<i>A. capillaris</i>	Krasetín: areál kravína na SV okraji obce	565	48°52'59"	14°19'05"	22.8.2003	<b>4x</b>
13	<i>A. capillaris</i>	Křivoklátsko, Branov: okraj lesní cesty JJZ od obce, ca 6,2 km JZ od železniční zastávky Křivoklát	480	49°59'29,38"	13°49'16,74"	15.6.2004	<b>4x</b>
14	<i>A. capillaris</i>	Lnáře: SZ část dna protrženého rybníka Podhájský v obci	460	49°27'20"	13°47'12"	21.6.2003	<b>4x</b>
15	<i>A. capillaris</i>	Prochody: hráz rybníka Svatba ZSZ osady	290	50°02'10,65"	16°08'25,45"	6.7.2004	<b>7x</b>
16	<i>A. gigantea</i>	Ejovice: lesní okraj nedaleko dálnice ca 1,3 km J od obce	425	49°44'04"	13°31'00"	září 2001	<b>6x</b>
17	<i>A. gigantea</i>	Hluboká u Borovan: okraj polní cesty ca 1,1 km JJV žel. zastávky v obci	455	48°53'8.3"	14°40'50.9"	19.10.2003	<b>6x</b>
18	<i>A. gigantea</i>	Vlkov: okraj pole poblíž Vlkovského přesypu, ca 950 m SZ kaple v obci	410	49°09'26,05"	14°42'44,89"	23.11.2003	<b>6x</b>
19	<i>A. rupestris</i>	Pec pod Sněžkou: Z okraj Studniční hory, 1 km JJV Lucni boudy, 4,5 km SZ obce, porosty na bezlesí	1530	50°43'36.96"	15°42'4.37"	24.8.2005	<b>4x</b>
20	<i>A. stolonifera</i>	Bernartice: podmáčené místo u okraje cesty u plotu vedle vstupu do obalovny drti, 1 km SSZ kostela v obci	425	49°40'52.52"	15°7'24.69"	16.7.2005	<b>6x</b>
21	<i>A. stolonifera</i>	Bílek: 0,5 km JJV od kostela, za ohybem červené turistické značky na východ, na cestě	535	49°42'02"	15°44'07"	24.7.2003	<b>6x</b>

22	<i>A. stolonifera</i>	Bohouškovice: okraj cesty u posledního stavení na S okraji cesty	535	48°55'28"	14°18'48"	21.8.2003	6x
23	<i>A. stolonifera</i>	Borek pod Troskami: okraj lesní cesty ca 900 m ZJZ od železniční zastávky	270	50°31'51"	15°13'13"	8.11.2003	6x
24	<i>A. stolonifera</i>	Borek pod Troskami: okraj lesní cesty ca 900 m ZJZ od železniční zastávky	270	50°31'51"	15°13'13"	8.11.2003	6x
25	<i>A. stolonifera</i>	Branná: okraj lesní cesty ca 2 km JZ kostela v obci	456	48°57'10.16"	14°45'41.02"	7.8.2003	6x
26	<i>A. stolonifera</i>	Branná: okraj lesní cesty ca 2 km JZ kostela v obci	456	48°57'10.16"	14°45'41.02"	7.8.2003	6x
27	<i>A. stolonifera</i>	Bulhary: cesta v louce k NPR Křivé jezero ca 2 km SZ obce	170	48°50'39.66"	16°43'39.56"	29.5.2003	6x
28	<i>A. stolonifera</i>	Bykárka: lesní cesta v údolí Bieleho potoka ca 1,5 km JV vrcholu Bykárka (1058 m) (Slovensko)	670	48°54'20"	20°24'45"	21.8.2003	5x
29	<i>A. stolonifera</i>	Bykárka: lesní cesta v údolí Bieleho potoka ca 1,5 km JV vrcholu Bykárka (1058 m) (Slovensko)	670	48°54'20"	20°24'45"	21.8.2003	5x
30	<i>A. stolonifera</i>	Černovice: hráz Chrásteckého rybníka na Černovickém potoce, 3,3 km VSV centra obce	635	49°22'52.86"	15°0'14.33"	srpen 2004	5x
31	<i>A. stolonifera</i>	Červenohorské Sedlo: břeh cesty značené červenou tur. značkou 1,5 km SZ sedla, 100 m JV rozcestí tur. značek Bílý sloup	1210	50°8'10.17"	17°8'41.15"	6.8.2005	6x
32	<i>A. stolonifera</i>	Červenohorské Sedlo: okraj silnice v centru horských chat	1000	50°7'33.27"	17°9'11.78"	6.8.2005	6x
33	<i>A. stolonifera</i>	Dobré pole: jihovýchodní okraj slaniska na JZ okraji obce, vlhká	180	48°49'22"	16°31'52"	21.8.2002	4x
34	<i>A. stolonifera</i>	Dobré Pole: PR Slanisko Dobré Pole na JZ okraji obce, porost mezi rýničkem a cestou oddělující fotbalové hřiště	180	48°49'20"	16°31'54"	23.8.2002	4x
35	<i>A. stolonifera</i>	Dolní Němčice: Zemědělský areál na severním okraji obce	530	49°05'58"	15°23'45"	10.8.2002	4x
36	<i>A. stolonifera</i>	Dřevce: okraj louky ca 700 m J od kaple v obci	560	50°29'33.11"	13°52'30.09"	24.4.2004	6x
37	<i>A. stolonifera</i>	Dřevce: okraj louky ca 700 m J od kaple v obci	561	50°29'33.11"	13°52'30.09"	25.4.2004	5x
38	<i>A. stolonifera</i>	Dřevce: okraj louky ca 700 m J od kaple v obci	562	50°29'33.11"	13°52'30.09"	26.4.2004	5x
39	<i>A. stolonifera</i>	Františkov: travnatá plocha u cesty ca 600 m Z od osady	990	49°00'17''	13°36'48''	2.7.2004	6x
40	<i>A. stolonifera</i>	Františkov: travnatá plocha u cesty ca 600 m Z od osady	990	49°00'17''	13°36'48''	2.7.2004	4x
41	<i>A. stolonifera</i>	Františkov: travnatá plocha u cesty ca 600 m Z od osady	990	49°00'17''	13°36'48''	2.7.2004	4x
42	<i>A. stolonifera</i>	Františkov: travnatá plocha u cesty ca 600 m Z od osady	990	49°00'17''	13°36'48''	2.7.2004	5x
43	<i>A. stolonifera</i>	Fratres: vlhká cesta na okraji hadcového tělesa ca 1,6 km JJV od obce (Rakousko)	490	48°57'58.74"	15°21'22.53"	13.6.2004	5x
44	<i>A. stolonifera</i>	Fratres: vlhká louka na levím břehu potoka ca 1,4 km JV od obce (Rakousko)	480	48°58'08.03"	15°21'22.84"	13.6.2004	5x
45	<i>A. stolonifera</i>	Hájek: PR SOOS, porost u Císařského pramene 0,5 km SV obce	430	50°08'57"	12°25'01"	19.5.2003	4x
46	<i>A. stolonifera</i>	Havraníky: břeh rybníka na SZ okraji obce	320	48°48'51.85"	16°00'16.01"	4.6.2004	4x
47	<i>A. stolonifera</i>	Havraníky: břeh rybníka na SZ okraji obce	320	48°48'51.85"	16°00'16.01"	4.6.2004	4x

48	<i>A. stolonifera</i>	Hejná: cesta při okraji lesa na Z úpatí vrchu Pučanka ca 1,25 km JJZ obce	517	49°16'52.31"	13°39'55.98"	18.7.2003	4x
49	<i>A. stolonifera</i>	Hluboká u Borovan: okraj polní cesty ca 1,1 km JJV žel. zastávky v obci	450	48°53'10,14"	14°40'45,62"	19.10.2003	6x
50	<i>A. stolonifera</i>	Hnanice: okraj cesty na pravém břehu Dyje ca 1,6 km SSZ od kostela v obci	270	48°48'37.69"	15°58'42.42"	4.6.2004	5x
51	<i>A. stolonifera</i>	Horní Maršov: ohyb žlutě značené turistické stezky 1,8 km SV obce	810	50°40'17.51"	15°50'20.22"	26.8.2005	5x
52	<i>A. stolonifera</i>	Horní Maršov: okraj cesty modře a žlutě značené turistické cesty v S části obce severně mostu přes Úpu	590	50°39'42.27"	15°49'14.34"	26.8.2005	6x
53	<i>A. stolonifera</i>	Horní Maršov: trávník před Rýchorskou boudou	1000	50°39'37.62"	15°50'59.77"	26.8.2005	4x
54	<i>A. stolonifera</i>	Horusice: kaluž v luční cestě východně od rašeliniště Ruda ca 3 km JV železniční zastávky Horusice	420	49°08'51,68"	14°41'37,32"	23.11.2003	4x
55	<i>A. stolonifera</i>	Hradce: břeh rybníku 400 m JZ od obce	485	48°55'55"	14°21'24"	17.8.2003	5x
56	<i>A. stolonifera</i>	Hradce: rybník 400 m JZ od obce	485	48°55'55"	14°21'24"	17.8.2003	6x
57	<i>A. stolonifera</i>	Hříšice: lesní cesta ca 1,8 km S kostela v obci	540	49°07'	15°29'	10.8.2002	5x
58	<i>A. stolonifera</i>	Chmelná: v obci	540	48°56'06"	14°16'44"	21.8.2003	5x
59	<i>A. stolonifera</i>	Chmelná: v obci	540	48°56'06"	14°16'44"	21.8.2003	5x
60	<i>A. stolonifera</i>	Jeseníky, Červenohorské sedlo: okraj cesty červené turistické značky ca 0,5 km JV od Č. sedla	1070	50°7'19.24"	17°9'28.23"	11.8.2003	6x
61	<i>A. stolonifera</i>	Jeseníky, Červenohorské sedlo: trávník na pravé straně silnice vedle rozcestníku u dřevěné boudy	1000	50°07'32"	17°09'17"	11.8.2003	6x
62	<i>A. stolonifera</i>	Jestřebí: podmáčená cesta v louce ca 700 m JV od železniční stanice	250	50°36'32''	14°36'22''	2005	4x
63	<i>A. stolonifera</i>	Kaliště: vlhká louka ca 1 km VJV obce	500	48°57'42,3"	14°35'15,8"	říjen 2001	5x
64	<i>A. stolonifera</i>	Kašperské Hory: V okraj pastviny 1,1 km JV obce, 200 m VJV Liščímu vrchu	770	49°8'9.45"	13°34'7.42"	27.7.2005	5x
65	<i>A. stolonifera</i>	Krkonoše, Luční bouda: okraj cesty 0,5 km SV Luční boudy (jen jeden trs)	1425	50°44'10"	15°42'12"	27.7.2003	6x
66	<i>A. stolonifera</i>	Krkonoše, Luční bouda: vyschlá mokřina u dřevěné lávky na Úpském rašeliništi, 1km SV Luční boudy	1440	50°44'15"	15°42'38"	27.7.2003	6x
67	<i>A. stolonifera</i>	Křivoklátsko, Branov: křižovatka lesních cest JJZ od obce, ca 5,6 km JZ od železniční zastávky Křivoklát	500	49°59'40,12"	13°49'46,52"	15.6.2004	4x
68	<i>A. stolonifera</i>	Křivoklátsko, Branov: křižovatka lesních cest JJZ od obce, ca 5,6 km JZ od železniční zastávky Křivoklát	500	49°59'40,12"	13°49'46,52"	15.6.2004	6x

69	<i>A. stolonifera</i>	Křivoklátsko, Branov: křižovatka lesních cest JJZ od obce, ca 5,6 km JZ od železniční zastávky Křivoklát	500	49°59'40,12"	13°49'46,52"	15.6.2004	4x
70	<i>A. stolonifera</i>	Křivoklátsko, Branov: křižovatka lesních cest JJZ od obce, ca 5,6 km JZ od železniční zastávky Křivoklát	500	49°59'40,12"	13°49'46,52"	15.6.2004	5x
71	<i>A. stolonifera</i>	Kvilda: okolí můstku přes potok na severním okraji obce	1040	49°01'20''	13°34'49''	2.7.2004	5x
72	<i>A. stolonifera</i>	Lipí: vodní nádrž 600 m JV obce Lipí	460	48°56'39.56"	14°21'22.54"	17.8.2003	4x
73	<i>A. stolonifera</i>	Lnáře: SZ část dna protrženého rybníka Podhájský v obci	460	49°27'20"	13°47'12"	21.6.2003	5x
74	<i>A. stolonifera</i>	Lnáře: SZ část dna protrženého rybníka Podhájský v obci	460	49°27'20"	13°47'12"	21.6.2003	5x
75	<i>A. stolonifera</i>	Lnáře: SZ část dna protrženého rybníka Podhájský v obci	460	49°27'20"	13°47'12"	21.6.2003	4x
76	<i>A. stolonifera</i>	Lnáře: SZ část dna protrženého rybníka Podhájský v obci	460	49°27'20"	13°47'12"	21.6.2003	4x
77	<i>A. stolonifera</i>	Lnáře: SZ část dna protrženého rybníka Podhájský v obci	460	49°27'20"	13°47'12"	21.6.2003	4x
78	<i>A. stolonifera</i>	Lnáře: SZ část dna protrženého rybníka Podhájský v obci	460	49°27'20"	13°47'12"	21.6.2003	4x
79	<i>A. stolonifera</i>	Lnáře: SZ část dna protrženého rybníka Podhájský v obci	460	49°27'20"	13°47'12"	21.6.2003	4x
80	<i>A. stolonifera</i>	Lomy: okraj cesty ca 250 m JV železniční zastávky Kunžak	608	49°06'36.41"	15°09'50.42"	8.8.2003	5x
81	<i>A. stolonifera</i>	Lysá nad Labem: vlhká louka na JZ okraji PR Hrabanovská černava 2,25 km SSZ od železniční stanice	180	50°12'52''	14°49'38''	13.9.2003	6x
82	<i>A. stolonifera</i>	Lysá nad Labem: vlhká louka na JZ okraji PR Hrabanovská černava 2,25 km SSZ od železniční stanice	180	50°12'52''	14°49'38''	13.9.2003	4x
83	<i>A. stolonifera</i>	Lysá nad Labem: vlhká louka na JZ okraji PR Hrabanovská černava 2,25 km SSZ od železniční stanice	180	50°12'52''	14°49'38''	14.9.2003	4x
84	<i>A. stolonifera</i>	Lysá nad Labem: vlhká louka na JZ okraji PR Hrabanovská černava 2,25 km SSZ od železniční stanice	180	50°12'52''	14°49'38''	15.9.2003	4x
85	<i>A. stolonifera</i>	Lysá nad Labem: vlhká louka na JZ okraji PR Hrabanovská černava 2,25 km SSZ od železniční stanice	180	50°12'52''	14°49'38''	16.9.2003	4x
86	<i>A. stolonifera</i>	Lysá nad Labem: vlhká louka na JZ okraji PR Hrabanovská černava 2,25 km SSZ od železniční stanice	180	50°12'52''	14°49'38''	17.9.2003	4x
87	<i>A. stolonifera</i>	Lysá nad Labem: vlhká louka na S okraji PR Hrabanovská černava 2,7 km SSZ od železniční stanice	180	50°13'10"	14°50'01"	13.9.2003	4x
88	<i>A. stolonifera</i>	Lysá nad Labem: okraj silnice vedoucí k psinci 1,5 km SZ železniční stanice	215	50°12'28"	14°49'55"	13.9.2003	6x
89	<i>A. stolonifera</i>	Mašovice: okraj žlutě značené turistické cesty 1,5 km J od obce, 0,5 km JZ od kóty 398,6	380	48°50'38"	15°58'24"	25.10.2003	4x
90	<i>A. stolonifera</i>	Mělnická Vrutice: cesta v PR Polabská černava 250 m ZJZ od železniční zastávky	185	50°20'32"	14°32'38"	13.9.2003	6x

91	<i>A. stolonifera</i>	Mělnická Vrutice: vlhká louka v Z části PR Polabská černava 0,5 km JZ od železniční zastávky	180	50°20'28"	14°32'28"	13.9.2003	6x
92	<i>A. stolonifera</i>	Mělnická Vrutice: okraj silnice v obci, 300 m SV od železniční zastávky	190	50°20'43"	14°32'58"	13.9.2003	6x
93	<i>A. stolonifera</i>	Mělnická Vrutice: vlhká louka ca 400 m JZ od železniční zastávky	190	50°20'27''	14°32'33''	18.9.2003	6x
94	<i>A. stolonifera</i>	Modrava: vlhká louka a prameniště ca 800 m V od obce	1060	49°01'21.34"	13°30'32.36"	11.5.2004	4x
95	<i>A. stolonifera</i>	Niederfladnitz: okraj lesní cesty ca 2,1 km V od kostela v obci (Rakousko)	500	48°47'55.00"	15°55'36.8 "	1.6.2004	4x
96	<i>A. stolonifera</i>	Niederfladnitz: okraj lesní cesty ca 2,1 km V od kostela v obci (Rakousko)	501	48°47'55.00"	15°55'36.8 "	2.6.2004	5x
97	<i>A. stolonifera</i>	Nová Pec: JV cíp pastviny u okraje lesa po pravé straně silnice směr Nová Pec, 2,3 km J ŽST v obci	760	48°46'9.9"N	13°57'25.94"	26.7.2005	6x
98	<i>A. stolonifera</i>	Nový Vojvířov: lesní cesta ca 750 m Z hotelu Peršlák	500	49°01'13.96"	15°00'53.61"	9.8.2003	5x
99	<i>A. stolonifera</i>	Pardubice, Spožil: okraj lesní cesty ca 1,5 km V kaple v obci	230	50°02'32.41"	15°50'31.66"	25.7.2003	5x
100	<i>A. stolonifera</i>	Pardubice, Veská: pískovna při okraji lesa ca 600 m SSZ obce	230	50°02'42.49"	15°51'13.82"	25.7.2003	6x
101	<i>A. stolonifera</i>	Pec pod Sněžkou: břeh vodní nádrže na Úpě v severní části obce	780	50°41'55.15"	15°44'11.9"	27.8.2005	5x
102	<i>A. stolonifera</i>	Podmokly: okraj zeleně značené polní cesty 0,5 km SSZ od obce	380	49°56'49"	13°42'03"	25.9.2003	4x
103	<i>A. stolonifera</i>	Prameny u Mariánských Lázní: mýtina u asfaltky Prameny-Sítiny, na vrcholu hřebínku Vlčí hřbet – V Boru, 300m JZ kóty 860,1 (V Boru)	825	50°2'18.13"	12°44'42.04"	2.9.2005	4x
104	<i>A. stolonifera</i>	Prameny u Mariánských Lázní: okraj lesní cesty-červené tur. značky, 100 m V rozcestí Pod Popravčí loukou, 2 km JZ kóty 882,9 m (Vlčí hřbet), 4km JJZ obce	850	50°1'24.46"	12°41'56.3"	3.9.2005	5x
105	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	5x
106	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	5x
107	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	5x
108	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	5x
109	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	4x
110	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	5x
111	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	5x
112	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	5x
113	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	4x
114	<i>A. stolonifera</i>	Přelouč, Vlčí Habřina: okraj lesní písčité cesty ca 1,2 km JZ obce	233	50°04'41.51"	15°34'51.78"	24.7.2003	5x
115	<i>A. stolonifera</i>	Raabs an der Thaya: louka u silnice ca 1,25 km V od obce (Rakousko)	460	48°50'49.71"	15°30'38.54"	12.6.2004	6x

116	<i>A. stolonifera</i>	Raabs an der Thaya: louka u silnice ca 1,25 km V od obce (Rakousko)	460	48°50'49.71"	15°30'38.54"	12.6.2004	6x
117	<i>A. stolonifera</i>	Ramzová: 1,5 km JV ŽST, červeně a modře značená tur. cesta, 450 m Z od přestupu lanovek Čerňava, písčitá cesta	1010	50°10'52.55"	17°4'27.3"	6.8.2005	5x
118	<i>A. stolonifera</i>	Ramzová: okraj cesty 1,8 km JV ŽST, rozcestí lesní cesty a červeně značené tur. značky	1060	50°10'51.6"	17°4'55.1"	6.8.2005	6x
119	<i>A. stolonifera</i>	Ramzová: 3,2 km V ŽST, 20 m Z od zvoničky u tur. chaty Šerák,	1320	50°11'11.59"	17°6'31.41"	6.8.2005	6x
120	<i>A. stolonifera</i>	Ramzová: okraj červeně značená tur. cesty vedoucí po J straně pastviny, 250 m SZ ŽST	765	50°11'37.32"	17°3'42.43"	6.8.2005	5x
121	<i>A. stolonifera</i>	Ratibořské Hory: okraj rybníka ca 1,4 km Z od kostela v obci	460	49°27'37.54"	14°44'54.34"	9.5.2004	5x
122	<i>A. stolonifera</i>	Ratibořské Hory: okraj rybníka ca 1,4 km Z od kostela v obci	460	49°27'37.54"	14°44'54.34"	9.5.2004	6x
123	<i>A. stolonifera</i>	Ratíškovice: břeh rybníčku Hliníček na JZ okraji obce	210	48°55'01,73"	17°09'30,81"	30.5.2002	4x
124	<i>A. stolonifera</i>	Rojšín: ruderál u JZ cípu návsi	550	48°54'54"	14°15'02"	22.8.2003	5x
125	<i>A. stolonifera</i>	Rojšín: ruderál u JZ cípu návsi	550	48°54'54"	14°15'02"	22.8.2003	6x
126	<i>A. stolonifera</i>	Řevničov: lesní cesta ca 350 m J od železniční stanice	435	50°08'44.93"	13°49'43.70"	16.6.2004	4x
127	<i>A. stolonifera</i>	Řevničov: lesní cesta ca 350 m J od železniční stanice	435	50°08'44.93"	13°49'43.70"	16.6.2004	4x
128	<i>A. stolonifera</i>	Sedlec: NPR Slanisko u Nesytu, louka pod železniční zastávkou	175	48°46'33"	16°41'50"	23.8.2002	4x
129	<i>A. stolonifera</i>	Sedlec: NPR Slanisko u Nesytu, louka pod železniční zastávkou	175	48°46'33"	16°41'50"	23.8.2002	4x
130	<i>A. stolonifera</i>	Sedlec: příkop v louce ca 250 m SZ železniční zastávky Sedlec	175	48°46'35"	16°41'56"	23.8.2002	4x
131	<i>A. stolonifera</i>	Sedlice: levý okraj cesty vedoucí od obce k dálnici, 500 m SV obce	410	49°41'18.4"	15°5'50.07"	17.7.2005	5x
132	<i>A. stolonifera</i>	Solnice: příkop u cesty ca 1,4 km SZ železniční stanice v obci	350	50°12'41,69"	16°14'22,06"	9.7.2004	4x
133	<i>A. stolonifera</i>	Solnice: příkop u cesty ca 1,4 km SZ železniční stanice v obci	350	50°12'41,69"	16°14'22,06"	9.7.2004	6x
134	<i>A. stolonifera</i>	Stožec: smrkový les ca 2,4 km SSV železniční zastávky	980	48°52'44"	13°50'00"	2.11.2003	4x
135	<i>A. stolonifera</i>	Světlík: okraj zeleně značené turistické cesty 1,3 km JZ od obce	780	48°43'30"	14°11'44"	27.8.2002	6x
136	<i>A. stolonifera</i>	Světlík: porost v rybníku Světlík 0,5 km SSV od obce	748	48°44'08"	14°12'46"	27.8.2002	6x
137	<i>A. stolonifera</i>	Šediviny: okraj lesní cesty ca 1000 m JJV od kaple u kóty 716,6 m	670	50°17'51,20"	16°19'16,53"	8.7.2004	6x
138	<i>A. stolonifera</i>	Špindlerův Mlýn: okraj červeně značené turistické cesty v lese, 250 m SZ Petrovy boudy, 5,3 km S obce	1300	50°46'28.2"	15°36'34.85"	25.8.2005	4x
139	<i>A. stolonifera</i>	Špindlerův Mlýn: trávník u JZ rohu chaty u S cípu parkoviště patřícího ke Špindlerově boudě, 4,4 km SSV obce	1198	50°45'46.58"	15°38'0.43"	25.8.2005	4x
140	<i>A. stolonifera</i>	Šumava, Bučina: prameniště při cestě u zaniklé osady Chaloupky ca 1,6 km JV hraničního přechodu	1052	48°57'23.55"	13°35'53.40"	17.7.2003	5x
141	<i>A. stolonifera</i>	Tchořovice: SZ část dna protrženého rybníka Dolejší JV obce	450	49°26'08"	13°48'59"	21.6.2003	5x
142	<i>A. stolonifera</i>	Tchořovice: SZ část dna protrženého rybníka Dolejší JV obce	450	49°26'08"	13°48'59"	21.6.2003	5x



143	<i>A. stolonifera</i>	Tchořovice: SZ část dna protrženého rybníka Dolejší JV obce	450	49°26'08"	13°48'59"	21.6.2003	6x
144	<i>A. stolonifera</i>	Unterthürnau: okaj cesty v obci ca 200 m JV od kaple v obci (Rakousko)	360	48°52'49.90"	15°37'23.9 "	12.6.2004	5x
145	<i>A. stolonifera</i>	Unterthürnau: okaj lesní cesty ca 200 m JZ od kaple v obci (Rakousko)	360	48°52'46.58"	15°37'07.29"	12.6.2004	5x
146	<i>A. stolonifera</i>	Ústrašín: prameniště v louce ca 1,7 km JZ kostela v obci	570	49°22'25,09"	15°08'48.17"	5.10.2003	5x
147	<i>A. stolonifera</i>	Velký Borek: okraj silnice v obci	175	50°20'39"	14°31'03"	13.9.2003	6x
148	<i>A. stolonifera</i>	Velký Borek: okraj silnice v obci	175	50°20'39"	14°31'03"	13.9.2003	6x
149	<i>A. stolonifera</i>	Vernár: luční cesta ca 50 m JV železniční zastávky Vernár (Slovensko)	940	48°52'55"	20°14'15"	22.8.2002	4x
150	<i>A. stolonifera</i>	Vičí Habřina: 1,7 km JZ obce, trávník 20 m Z křižovatky lesní cesty (u průseku) se žlutou tur. značkou, 200 m Z rybníku Černý Nadýmač	220	50°4'28.06"	15°34'37.41"	7.8.2005	6x
151	<i>A. stolonifera</i>	Vičí Habřina: okraj cesty 2,1 km JZ obce, 250 m Z od rozcestí se žlutou tur. značkou	220	50°4'9.68"	15°34'28.33"	7.8.2005	5x
152	<i>A. stolonifera</i>	Vičí Habřina: okraj písčité lesní cesty na křižovatce cest 1,2 km JZ obce	225	50°4'42.58"	15°34'56.53"	7.8.2005	5x
153	<i>A. stolonifera</i>	Vlkov: cesta kolem pískovny na levém břehu Lužnice ca 1,1 km kaple v obci	410	49°09'21,80"	14°42'33,20"	23.11.2003	6x
154	<i>A. stolonifera</i>	Vlkov: okraj pole poblíž Vlkovského přesypu, ca 950 m SZ kaple v obci	410	49°09'26,05"	14°42'44,89"	23.11.2003	6x
155	<i>A. stolonifera</i>	Výšice: okraje lesní cesty ca 500 m S od osady Chrást	505	49°27'51.87"	13°59'56.39"	30.7.2003	4x
156	<i>A. stolonifera</i>	Výšice: okraje lesní cesty ca 500 m S od osady Chrást	505	49°27'51.87"	13°59'56.39"	30.7.2003	5x
157	<i>A. stolonifera</i>	Výšice: okraje lesní cesty ca 500 m S od osady Chrást	505	49°27'51.87"	13°59'56.39"	30.7.2003	6x
158	<i>A. stolonifera</i>	Výšice: okraje lesní cesty ca 500 m S od osady Chrást	505	49°27'51.87"	13°59'56.39"	30.7.2003	4x
159	<i>A. stolonifera</i>	Výšice: okraje lesní cesty ca 500 m S od osady Chrást	505	49°27'51.87"	13°59'56.39"	30.7.2003	5x
160	<i>A. stolonifera</i>	Výšice: okraje lesní cesty ca 500 m S od osady Chrást	505	49°27'51.87"	13°59'56.39"	30.7.2003	6x
161	<i>A. stolonifera</i>	Výšice: okraje lesní cesty ca 500 m S od osady Chrást	505	49°27'51.87"	13°59'56.39"	30.7.2003	6x
162	<i>A. stolonifera</i>	Výšice: okraje lesní cesty ca 500 m S od osady Chrást	505	49°27'51.87"	13°59'56.39"	30.7.2003	4x
163	<i>A. stolonifera</i>	Zábřeh: bývalý lom na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie, 900 m Z ŽST	290	49°52'26"	16°52'28"	10.8.2003	4x
164	<i>A. stolonifera</i>	Zábřeh: bývalý lom na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie, 900 m Z ŽST	290	49°52'26"	16°52'28"	5.8.2005	4x
165	<i>A. stolonifera</i>	Zábřeh: bývalý lom na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie, 900 m Z ŽST	290	49°52'26"	16°52'28"	5.8.2005	4x

166	<i>A. stolonifera</i>	Zábřeh: bývalý lom na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie, 900 m Z ŽST	290	49°52'26"	16°52'28"	5.8.2005	4x
167	<i>A. stolonifera</i>	Zábřeh: bývalý lom na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie, 900 m Z ŽST	290	49°52'26"	16°52'28"	5.8.2005	6x
168	<i>A. stolonifera</i>	Zábřeh: bývalý lom na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie, 900 m Z ŽST	290	49°52'26"	16°52'28"	5.8.2005	5x
169	<i>A. stolonifera</i>	Zábřeh: bývalý lom na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie, 900 m Z ŽST	290	49°52'26"	16°52'28"	5.8.2005	6x
170	<i>A. stolonifera</i>	Zábřeh: bývalý lom na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie, 900 m Z ŽST	290	49°52'26"	16°52'28"	5.8.2005	6x
171	<i>A. stolonifera</i>	Zábřeh: bývalý lom na J okraji obce na pravém břehu Moravské Sázavy, u zahrádkářské kolonie, 900 m Z ŽST	290	49°52'26"	16°52'28"	10.8.2003	4x
172	<i>A. stolonifera</i>	Závod: louky ve východní části rezervace Abrod ca 600 m J železniční zastávky Závod (Slovensko)	160	48°31'30"	17°00'20"	22.8.2002	4x
173	<i>A. stolonifera</i>	Zdíkov: břeh potoka v parku pod zámkem, Z hlavní silnice	730	49°4'56.8"	13°41'53.5"	26.7.2005	5x
174	<i>A. stolonifera</i>	Zliv: okolí cesty podél lesní železničky ca 1,75 km SSV od kostela ve městě	400	49°04'44''	14°22'42''	9.2005	5x
175	<i>A. vinealis</i>	Maletice: travnatý okraj pole ca 1,4 km SZ středu obce, ca 280 m ZJZ samoty U Vlasatých	405	49°14'42.95	14°10'24.16	7.10.2007	6x
176	<i>A. vinealis</i>	Zliv: loučka ca 1,7 km SZ středu obce, na J břehu rybníku Velký Knapr (Nohavička)	370	49°4'34.78"	14°20'55.97	11.4.2007	6x
177	<i>A. vinealis</i>	Voltýřov: lada u polní cesty ca 1,2 km ZJZ od obce	400	49°32'24''	14°11'18''	26.6.2005	6x

## Příloha 2: Kultivační experimenty



Čtveřice klonů (před zastříhnutím do odpovídající velikosti) použitá při experimentu



Uspořádání pokusu s vlivem substrátu

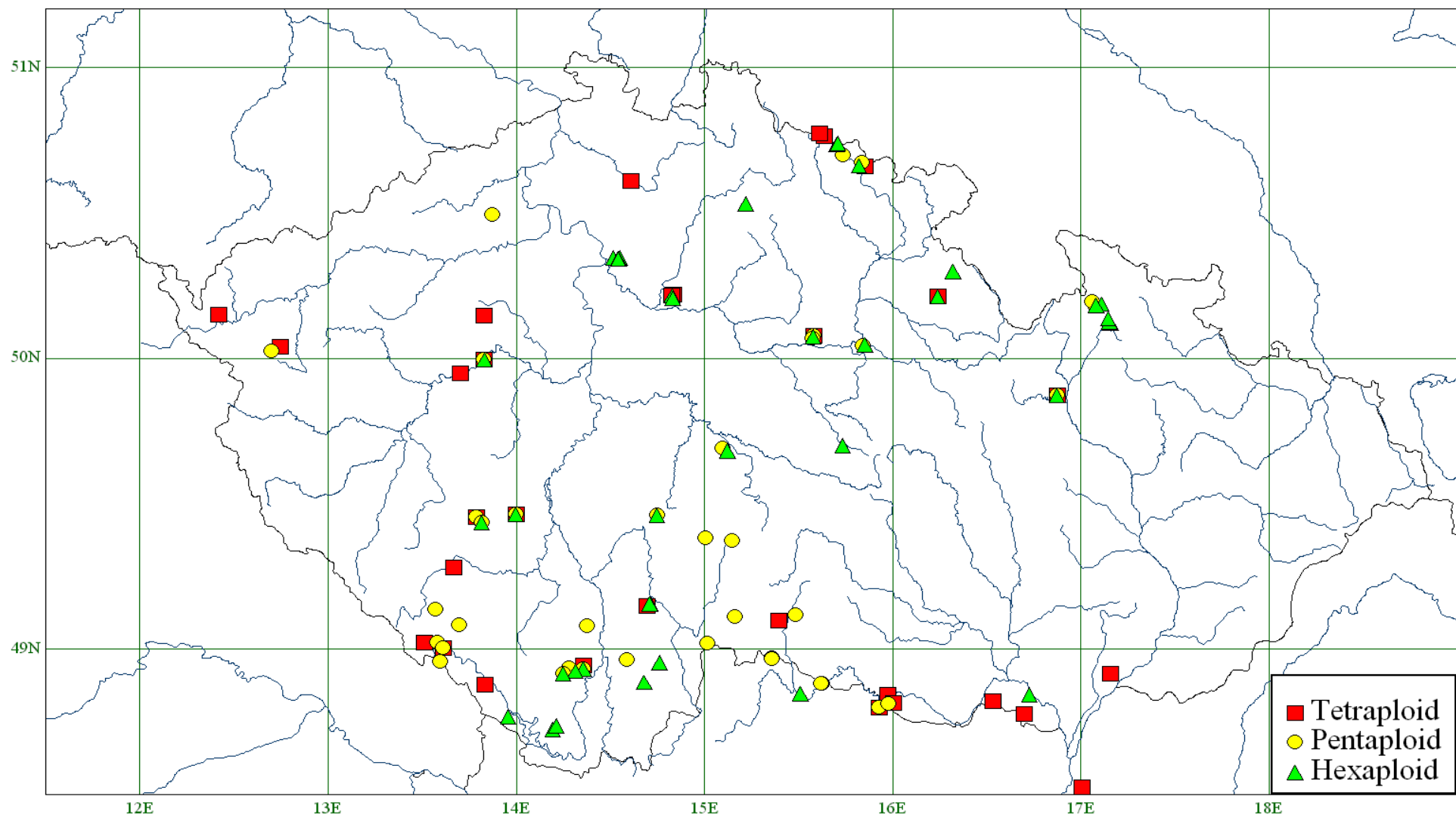


Vegetativní prýty při ukončení pokusu s vlivem vlhkostních poměrů a sešlapu



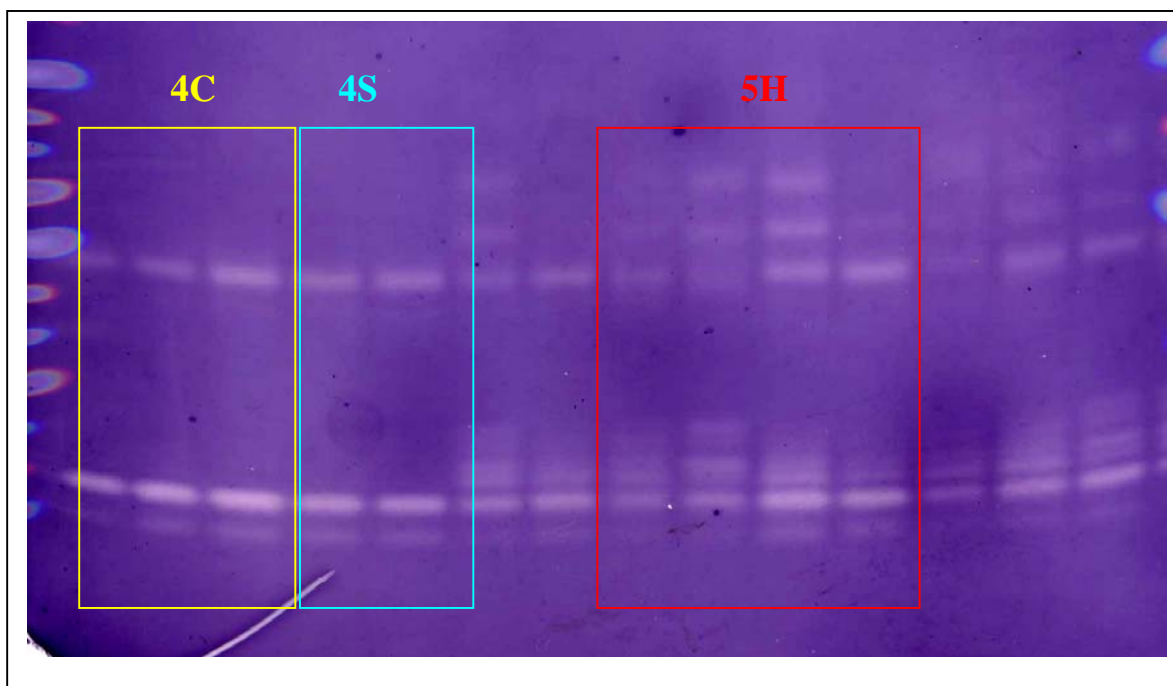
Uspořádání pokusu s vlivem vlhkostních poměrů a sešlapu

### Příloha 3: Mapka rozšíření zjištěných cytotypů *Agrostis stolonifera* v ČR

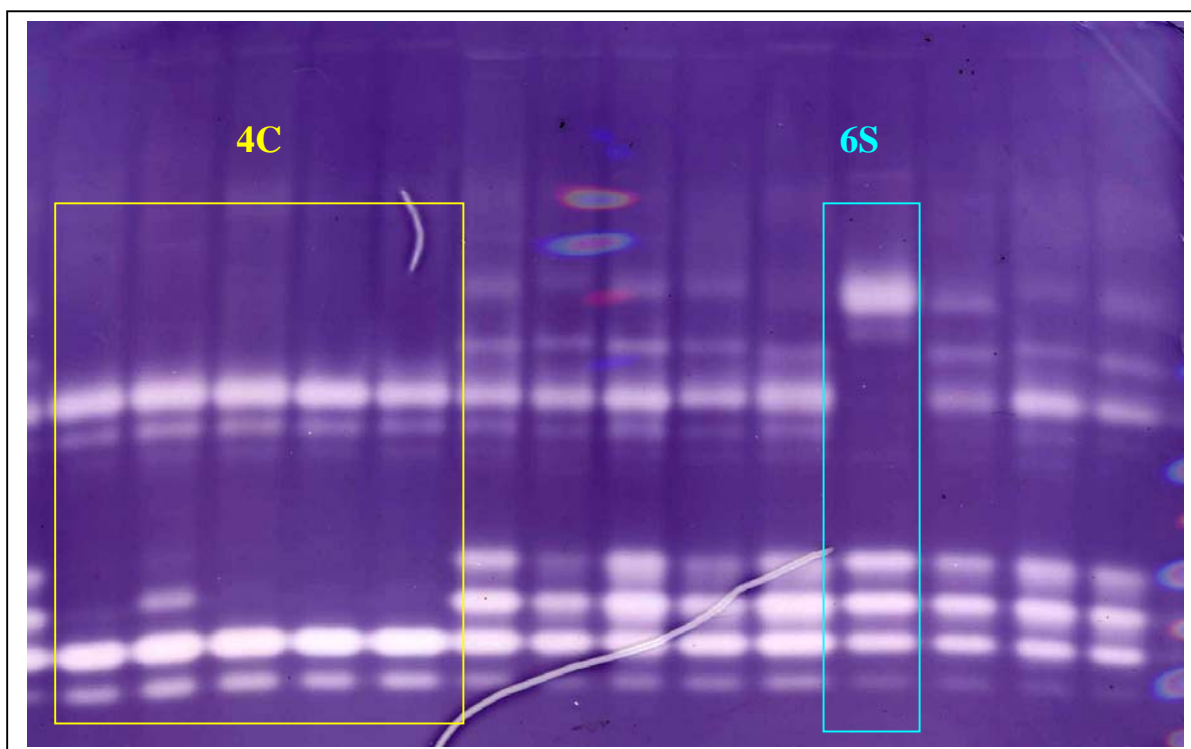




## Příloha 4: Zymogramy enzymového systému SOD



Zymogram 1: 4C = *Agrostis capillaris*, 4S = *A. stolonifera* ze smíšené populace, 5H = potenciální pentaploidní hybridi; vzorky mezi 4S a 5H přísluší 4x *A. stolonifera*; vzorky napravo od 5H jsou 6x *A. stolonifera*



Zymogram 2: 4C = *Agrostis capillaris*, 6S = *A. stolonifera*; vzorky mezi 4C a 6S jsou 4x, 5x, 5x, 6x, 6x *A. stolonifera*, všechny vzorky za 6S přísluší 6x *A. stolonifera*