

**Masarykova univerzita v Brně  
Přírodovědecká fakulta  
Ústav botaniky a zoologie**

**Variabilita velikosti genomu *Eleocharis uniglumis*  
subsp. *sternerii***

Diplomová práce

**Brno 2007**

**Jana Kneřová  
Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Petr Bureš, Ph.D.**

Souhlasím s uložením této diplomové práce v knihovně Ústavu botaniky a zoologie PřF MU v Brně, případně jiné knihovně Masarykovy univerzity v Brně, s jejím veřejným půjčováním a využitím pro vědecké, vzdělávací nebo jiné veřejně prospěšné účely, a to za předpokladu, že převzaté informace budou řádně citovány a nebudou využívány komerčně.

10.5.2007

Děkuji...

V první řadě děkuji školiteli docentu Burešovi za vybrané téma, pomoc při sběru vzorků a při jejich nekonečných analýzách a za rady všeho druhu. Luce Horové a Jakobovi Šmerdovi za příjemnou atmosféru v laboratoři a Luce zvláště za pomoc při měření na průtokovém cytometru. Jirkovi Konečnému za pomoc při sběru vzorků v Rakousku, především za auto a za fotky, které na lokalitách pořídil. Paní Lence Klapalové z botanické knihovny Městského muzea v Brně za ochotné vyhledání a zapůjčení literatury. Tatínkovi za odhalování skrytých nástrah počítačové techniky a opakovaný tisk diplomky a mamince za odhalování gramatických chyb. V neposlední řadě děkuji všem, kteří se na mé práci jakkoli podíleli, ať už radou, dobrým slovem, nebo i kritikou.

## Abstrakt

*Eleocharis uniglumis* náleží do čeledi *Cyperaceae*. Tato čeleď je specifická svou difúzní centromerou, díky níž dochází v jaderném genomu k fúzím a fragmentacím chromozomů, neboli k tzv. agmatoploidii.

*Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* ( $2n=46$ ) se svým areálem rozkládá v temperátní zóně Evropy, Asie a Severní Ameriky. Polyploid *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* se vyskytuje ve třech oblastech: (1) ostrovy Krk, Pag a přilehlé jaderské pobřeží Chorvatska; (2) Neziderské jezero v SV Rakousku, Z Maďarsko a JZ Slovensko; (3) ostrovy Öland a Gotland v Baltském moři.

Oproti ostatním pěti taxonům agregátu *Eleocharis palustris* agg. byla u *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* zjištěna značná variabilita v počtu chromosomů ( $2n=70-88$ ) i ve velikosti genomu. Variabilita velikosti genomu byla zkoumána průtokovou cytometrií s fluorescenčním barvivem DAPI. Byla zjišťována mezi jednotlivými arely (bylo zkoumáno 5–6 populací v každé oblasti) mezi populacemi a uvnitř populací (15 – 25 rostlin bylo sebráno na transektu napříč lokalitou).

Vnitropopulační variabilita byla zjištěna v rozsahu 11,9–42,1% v Chorvatsku (byly zde nalezeny tři polyhaploidní vzorky ( $2n=42$ ), 6,1–28,6% u Neziderského jezera a 28,3–51,5% na Ölandu (zde nalezeny pravděpodobně hybridní vzorky ( $2n=54$ ; 56)). V populacích v Chorvatsku byla nalezena jen *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*, zatímco v ostatních dvou oblastech byly zastoupeny oba poddruhy *Eleocharis uniglumis*. Velikost genomu v alopatrické populaci byla signifikantně větší než při sympatrickém výskytu obou poddruhů.

Lineární korelace mezi počtem chromosomů a velikostí genomu ukazuje na příčinu variability (v počtu chromosomů a velikosti genomu) spíše v aneuploidii než agmatoploidii.

## Genome size variation in *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*

Karyological irregularities as chromosomal fusion or fragmentation (agmatoploidy) caused by holocentric chromosomes are very frequent in the family *Cyperaceae*.

*Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* ( $2n=46$ ) is widely distributed in temperate zone of Europe, Asia and North America. Polyploid *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* is restricted to three areas: (1) islands of Krk, Pag and adjacent Adriatic coasts in Croatia; (2) Neusiedler See

surroundings in NE Austria, W Hungary and SW Slovakia; (3) Baltic islands of Öland and Gotland.

It has large variability of chromosome numbers ( $2n=70-88$ ) compared with other five closely related taxa of *Eleocharis palustris* agg. Genome size variability among the centers of distribution (5–6 population per area), between populations, and within the populations (15–25 plants per population transect) has been studied using DAPI flow cytometry.

Intra-population genome size varies from 11,9 to 42,1 % in Croatia (three polyploid samples with  $2n=42$  were excluded from the analysis), 6,1–28,6 % at Neusiedler See and 28,3–51,5% in Öland (probably hybrid samples included). In the Croatia all populations were uniform subsp. *streneri*, while, the most of populations was formed by both subspecies at Neusiedler See and in Öland. Genome size in pure populations was significantly larger than in mixed ones. Linear correlation between chromosome numbers and genome size indicates aneuploidy (not agmatoploidy) as a main cause of chromosomal number and genome size variability in subsp. *streneri*.

|        |                                                               |    |
|--------|---------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | <u>Úvod</u>                                                   | 1  |
| 2.     | <u>Modelový taxon – Eleocharis uniglumis subsp. sternerii</u> | 6  |
| 2.1.   | <u>Historie</u>                                               | 6  |
| 2.2.   | <u>Taxonomické zařazení</u>                                   | 7  |
| 2.3.   | <u>Morfologie</u>                                             | 9  |
| 2.4.   | <u>Rozšíření</u>                                              | 10 |
| 2.5.   | <u>Ekologie</u>                                               | 11 |
| 2.6.   | <u>Biologie</u>                                               | 13 |
| 2.6.1. | <u>Rozmnožování</u>                                           | 13 |
| 2.6.2. | <u>Opylení a šíření</u>                                       | 13 |
| 2.6.3. | <u>Fenologie</u>                                              | 13 |
| 3.     | <u>Metodika</u>                                               | 15 |
| 3.1.   | <u>Materiál</u>                                               | 15 |
| 3.2.   | <u>Lokality</u>                                               | 16 |
| 3.2.1. | <u>Ilyrská oblast</u>                                         | 16 |
| 3.2.2. | <u>Panonská oblast</u>                                        | 17 |
| 3.2.3. | <u>Baltská oblast</u>                                         | 18 |
| 3.3.   | <u>Průtoková cytometrie</u>                                   | 19 |
| 3.3.1. | <u>Historie vývoje</u>                                        | 20 |
| 3.3.2. | <u>Popis průtokového cytometru a princip jeho funkce</u>      | 20 |
| 3.3.3. | <u>Příprava a měření materiálu</u>                            | 22 |
| 3.3.4. | <u>Hypotonické izolační pufry</u>                             | 23 |
| 3.3.5. | <u>Fluorescenční barviva</u>                                  | 24 |
| 3.3.6. | <u>Standard</u>                                               | 26 |
| 3.3.7. | <u>Využití průtokové cytometrie v biologii rostlin</u>        | 26 |
| 3.4.   | <u>Roztlaková karyologická metoda pro počítání chromozomů</u> | 27 |
| 3.4.1. | <u>Postup (Dyer 1963):</u>                                    | 27 |
| 3.4.2. | <u>Počítání chromozomů</u>                                    | 28 |
| 3.5.   | <u>Kontrolní měření</u>                                       | 28 |

|        |                                                                  |    |
|--------|------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.1. | <u>Barvivo DAPI versus PI</u>                                    | 28 |
| 3.5.2. | <u>Opakovatelnost měření na cytometru PA-1</u>                   | 29 |
| 3.6.   | <u>Zpracování získaných dat</u>                                  | 29 |
| 4.     | <u>Výsledky</u>                                                  | 30 |
| 4.1.   | <u>Rozsah variability obsahu DNA</u>                             | 30 |
| 4.1.1. | <u>Neočekávané cytotypy</u>                                      | 30 |
| 4.1.2. | <u>Variabilita obsahu DNA mezi arely a mezi populacemi</u>       | 32 |
| 4.1.3. | <u>Variabilita obsahu DNA uvnitř populací</u>                    | 33 |
| 4.2.   | <u>Potvrzení přítomnosti variability obsahu DNA mezi jedinci</u> | 36 |
| 4.3.   | <u>Počet chromozomů versus velikost genomu</u>                   | 37 |
| 4.4.   | <u>Sympatrický výskyt poddruhů <i>Eleocharis uniglumis</i></u>   | 39 |
| 4.5.   | <u>Barvivo DAPI nebo PI?</u>                                     | 39 |
| 4.6.   | <u>Opakovatelnost měření</u>                                     | 40 |
| 5.     | <u>Diskuse</u>                                                   | 41 |
| 6.     | <u>Závěr</u>                                                     | 47 |
|        | <u>Literatura</u>                                                | 48 |

# 1. Úvod

Obsah jaderné DNA je v současné době znám pro téměř 3000 druhů cévnatých rostlin. Toto číslo představuje zhruba 1% z jejich celkového počtu (Ohri 1998). Rostlinou s nejmenší velikostí nereplikovaného haploidního genomu byla v loňském roce určena *Genlisea margaretae* s 0,065 pg (Greilhuber et al. 2006). Do té doby měla toto prvenství *Arabidopsis thaliana* s 0,16 pg (Bennett et Leitch 2003). Naopak rostlina s největším genomem v nereplikovaném haploidním stavu je *Fritillaria assyriaca* s 127,4 pg (Bennett et Leitch (2003). Studium obsahu DNA je rozhodující pro porozumění genomu organismů a je nezbytné pro popsání jeho případné variability. Zjištění významných rozdílů ve velikosti genomu uvnitř rodu napomáhá vymezit jednotlivé druhy (Ohri 1998).

Variabilita velikosti genomu dříve popisovaná jen na mezidruhové úrovni byla v osmdesátých letech minulého století zjištěna i uvnitř jednotlivých druhů. Mezi prvními byla nalezena u druhů *Microseris bigelovii* (Price et al. 1981a), *Microseris douglasii* (Price et al. 1981b) nebo *Poa annua* (Mowforth et Grime 1989). Později například u *Festuca pallens* (Šmarda et Bureš 2006), *Cirsium acaule* (Bureš et al. 2004) nebo *Cirsium vulgare* (Bureš et al. 2004). Z čeledi *Cyperaceae* u druhů rodu *Carex* (Hoshino et Waterway 1994; Ohkawa et al. 2000), *Luzula* (Kuta et al. 2004) atd.

Díky poměrně snadné a dostupné metodice zjišťování množství DNA, průtokové cytometrii a Feulgenově densitometrii, je tato problematika v současné době velice aktuální. Práce na toto téma přinášejí mnoho nových a zajímavých poznatků o rostlinné genomice a značně rozšiřují pohled na ni. Současně však mohou vnášet do dosavadního poznání zmatek způsobený častými těžko odhalitelnými artefakty a chybnými interpretacemi, kterých se někteří autoři při popisování vnitrodruhové variability v důsledku metodických nedostatků dopouštějí. Díky tomu vznikly pochybnosti, zda vůbec intraspecifická (=vnitrodruhová) variabilita existuje. Zda přesvědčivé výsledky předkládané v mnoha člancích nejsou založené jen na špatné optimalizaci metody.

Celou problematikou se začal zabývat profesor Greilhuber a spolu se svým kolektivem začal publikace o nálezech vnitrodruhové variability velikosti genomu u konkrétních druhů přezkoumávat. Případy, kdy se jeho závěry od původních lišily, popisuje v pracích z roku 1998 a 2005 (Greilhuber 1998; 2005). Namátkou z nich vyberme například studii o severoamerických kultivarech *Glycine max* (Graham et al. 1994). Autor pro měření obsahu DNA použil průtokovou cytometrii s fluorescenčním barvivem propidium jodide a uvádí, že severnější kultivary mají



signifikantně menší genom než jižnější kultivary. Greilhuber a Obermayer (1997) však zjistili uniformitu velikosti genomu a ukázali, že signifikanci korelace uváděnou Grahamem způsobila pouze jedna extrémně nízká hodnota. Po odstranění této hodnoty signifikance zmizela. Druhým případem, kterým se Greilhuber zabývá v článku z roku 2005, je *Arachis hypogea* (Singh et al. 1996). Singh použil pro měření Feulgenovu densitometrii a popsal variabilitu velikosti genomu dokonce i uvnitř variet v rámci jednoho poddruhu. Jím naměřené hodnoty jsou však dle Temsch a Greilhubera (2000), kteří přezkoumávali odlehlé hodnoty průtokovou cytometrií i Feulgenovou densitometrií, dvakrát vyšší, než by měly být.

Vznik popsáných artefaktů může mít mnoho příčin. Častá je (1) kontaminace materiálu, (2) špatná kalibrace nebo jiný problém s přístrojem, (3) chybná příprava materiálu pro měření, (4) degradace materiálu při jeho dlouhodobějším skladování nebo (5) obsah inhibitorů barviv v materiálu. Důležitý je také (6) vědecký přístup badatele a jeho interpretace výsledků.

Metodika zjišťování obsahu jaderné DNA se však stále zpřesňuje a prací popisujících proměnlivost tohoto obsahu přibývá. Existence vnitrodruhové variability velikosti genomu je dnes již všeobecně uznávaná a práce badatelů se soustřeďuje spíše na vysvětlení příčin jejího vzniku.

Dle Greilhubera (1998) se příčiny vzniku vnitrodruhové variability velikosti genomu dělí na takzvaně ortodoxní, mezi něž patří polyploidie, aneuploide, akcesorické B chromozomy a pohlavní chromozomy, a neortodoxní, objevené později v důsledku občasných nesrovnalostí při aplikaci ortodoxních příčin. Mezi neortodoxní příčiny se řadí variabilita velikosti heterochromatinových segmentů a delece a duplikace chromozomových segmentů. Nejčastěji dochází ke změnám velikosti genomu v důsledku polyploidie, aneuploidie a někdy také agmatoploidie.

Polyploidie je náhlá genetická změna, která může zásadně ovlivnit reprodukční systém druhu (Briggs & Walters 2001). Jejím prostřednictvím se znásobí genetický obsah a velikost genomu v jediné generaci. Většina nebo všechny kvetoucí rostliny jsou buď současné polyploidy nebo mají polyploidní původ (Wendel 2000). Dle způsobu vzniku můžeme polyploidii rozdělit na auto- a allopolyploidii. Při autopolyploidii dochází ke zdvojení chromozomové sady individua v rámci jednoho druhu buď po předchozím splynutí dvou neredukovaných gamet nebo narušením normálního průběhu mitosy působením extrémních podmínek. K allopolyploidii dochází v důsledku křížení dvou příbuzných druhů. Vzniklá hybridní rostlina může při meiose, kromě velkého množství neživotaschopných produktů, vytvořit i několik málo neredukovaných vaječných a pylových buněk. Dojde-li ke splynutí takových gamet, vznikne rostlina se

zdvojeným počtem chromozomů (Briggs et Walters 2001). Při polyploidii obvykle dochází k okamžité reprodukční izolaci a sympatrické speciaci (King 1993).

U aneuploidie nedochází ke zmnožení celé chromozomové sady jako při polyploidii, ale pouze ke zmnožení (hyperploidii) nebo úbytku (hypoploidii) jednotlivých chromozomů. Je založena na chybě při tvorbě gamet, kdy dojde k vyloučení chromozomu ze sady nebo naopak k zařazení více kopií stejného chromozomu do gamet, tedy genetický materiál není rozdělen rovnoměrným způsobem (Briggs et Walters 2001).

Od aneuploidie můžeme odlišovat takzvanou dysploidii. Její podstatou je Robertsonovská translokace, neboli fúze dvou chromozomů v místech příčně rozštěpených centromer, která je jedním z mechanismů vývoje metacentrických a submetacentrických chromozomů z původních telocentrických chromozomů (Ipser 2006). Jedním z typů dysploidie je agmatoploidie.

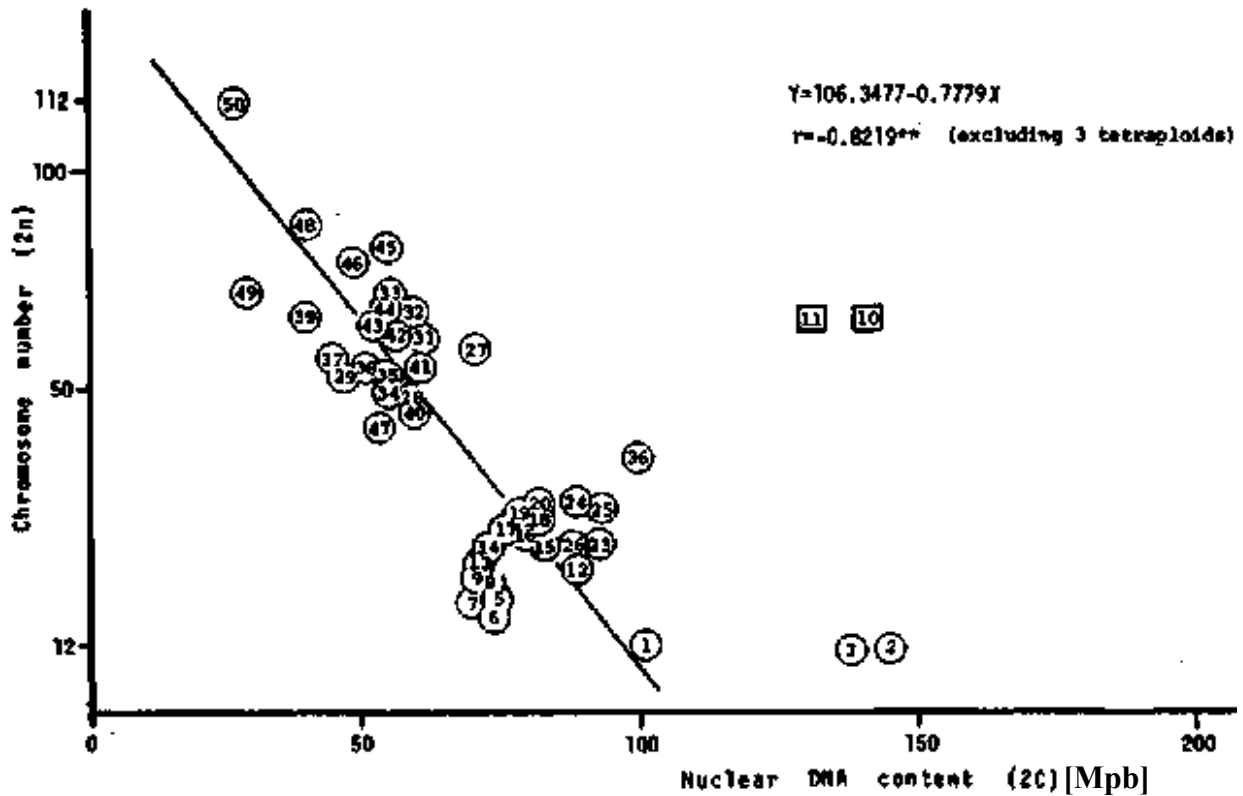
Agmatoploidie je jev vyskytující se pouze u některých skupin rostlin, zvláště v čeledích *Juncaceae* (*Luzula*, *Juncus*) a *Cyperaceae* (*Carex*, *Scirpus*) – Briggs et Walters (2001). Její princip je založen na přítomnosti polycentrických chromozomů, tedy chromozomů obsahujících difúzní centromeru. Díky této nelokalizované centromeře dochází v průběhu evoluce k rozpadu nebo naopak k fúzi chromozomů. Tento stav se dědí do dalších generací. Pojem agmatoploidie je někdy používán pouze pro fragmentaci chromozomů, fúze chromozomů je pak nazývána symploidie (Kuta et al. 2004).

Kromě výše popsaných jevů lze, podle Kutý et al. 2004, mezi příčiny intraspecifické variability DNA obsahu zařadit také aneusomacii, tedy nondisjunkce v průběhu mitózy. Kuta v tomto článku uvádí, že v rodu *Luzula* (*Cyperaceae*) je zmíněná variabilita způsobená agmatoploidii, symploidii i aneusomacii.

Dalším rodem, který lze srovnávat s mým studovaným taxonem, protože rovněž náleží do čeledi *Cyperaceae* a má chromozomy s difúzní centromerou je rod *Carex*. Studium genomu tohoto rodu, především proměnlivostí v počtu chromozomů, se mimo jiné zabývají Hoshino et al. (1981; 1992; 1993; 1994) a Ohkawa et al. (1998; 2000). Tito autoři se shodují, že původ variability v počtu chromozomů, uvnitř druhů rodu *Carex* může být zapříčiněn aneuploidii, ale většinou vzniká spíše prostřednictvím agmatoploidie. Oba kolektivy autorů také shodně popisují výskyt dvou typů populací v rodu *Carex*. V populacích prvního typu se vyskytují jedinci s různým počtem chromozomů, kteří se mezi sebou často kříží. Jedinci v populacích druhého typu mají počet chromozomů stálý a variabilita tohoto počtu se vyskytuje až na interpopulační úrovni.

Hoshino (1981) dále uvádí, že při rostoucím počtu chromozomů se zmenšuje jejich velikost. Při speciaci v rodu *Carex* tedy dochází ke vzniku taxonů, které mají velký počet malých

chromozomů, z taxonů s malým počtem velkých chromozomů prostřednictvím jejich fragmentace, která je doprovázena mírnou redukcí obsahu DNA (Castro et al. 1954) Tuto teorii podporují i Nishikawa et al. (1984). Při zanesení hodnot obsahu DNA a počtu chromozomů 47 vzorků rodu *Carex* do grafu získali signifikantně negativní závislost (obr. 1).



Obr. 1: Vztah mezi počtem chromozomů (osa y) a obsahem DNA (osa x) ve 47 vzorcích rodu *Carex*. Kolečka a čtverečky znázorňují diploidy respektive tetraploidy (Nishikawa et al. 1984).

Na základě výše uvedených současných znalostí o problematice intraspecifické variability velikosti genomu jsem se v této práci soustředila na její odhalení v rámci taxonu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*, který je z hlediska obsahu DNA velmi zajímavý a poměrně málo prozkoumaný.

První zmínky o tomto taxonu pocházejí z roku 1938 od Sternera, který zpracovával flóru ostrova Öland v Baltském moři. Blíže se taxonem zabýval autor Strandhede (1961), který se ale soustřeďuje jen na Skandinávské rozšíření poddruhu. Domnívá se, že se jedná o tamního endemita. V současnosti se této problematice věnuje Bureš (1998 a 1999). Článek z roku 1998 pojednává o evropském rozšíření taxonu a studie z roku 1999 zpracovávaná v rámci disertační

práce shrnuje znalosti o celém rodu *Eleocharis*. Tato publikace však řeší spíše komplexní rozbor rodu a v oblasti genomiky nezachází do podrobností.

Hlavním cílem diplomové práce je zjistit, zda existuje variabilita v obsahu DNA uvnitř taxonu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* a to na třech úrovních:

- mezi jednotlivými arely v rámci celého areálu
- mezi jednotlivými populacemi uvnitř arel
- mezi jedinci uvnitř populací

Pokud tato variabilita bude prokázána, jsou jako další cíle stanoveny následující body:

- objasnit příčiny vnitrodruhové variability v DNA obsahu na základě vztahu mezi velikostí genomu a počtu chromozomů
- studovat sympatrický výskyt s typovým poddruhem s ohledem na případnou hybridizaci

Poslední část práce by se měla zabývat ověřením získaných výsledků a odpovědět na otázky:

- Je barvivo DAPI stejně dobře použitelné pro zjišťování vnitrodruhové variability velikosti genomu jako barvivo PI?
- Jsou měření s DAPI barvivem opakovatelná i v dlouhodobém časovém horizontu?

## 2. Modelový taxon – *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*

### 2.1. Historie

Prvním autorem, který zde studovaný taxon rozlišil, byl Sterner. Ve 20. letech 20. století zpracovával Květenu ostrovů Öland a Gotland v Baltském moři. Při studiu druhu s tehdejší názvem *Scirpus uniglumis*, dnes *Eleocharis uniglumis*, zaznamenal jeho výskyt ve dvou různých formách (Sterner 1938). O netypickou formu *Eleocharis uniglumis* se o čtyřicet let později začal zajímat badatel Strandhede, který na základě morfologických, cytologických i ekologických odlišností došel k závěru, že se jedná o polyploid představující samostatný taxon, dle jeho mínění na ostrovech Öland a Gotland endemický. Pojmenoval ho podle jeho objevitele *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* (Strandhede 1961, 1965, 1966).

V devadesátých letech minulého století se problematikou začal zabývat Petr Bureš. Postupně našel další lokality taxonu ve střední a jihovýchodní Evropě, čímž vyvrátil domněnku o endemismu (Bureš 1998). Na základě nově zjištěného souvislého areálu se severní hranicí v Panonské oblasti Rakouska, Maďarska a Slovenska a enklávou na ostrovech Öland a Gotland vyslovil Bureš teorii o podobnosti *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* s dalšími jihovýchodoevropskými druhy s předsunutými izolovanými lokalitami na Ölandu a Gotlandu, mezi něž patří například *Plantago tenuiflora* WALDST et KIT (Bureš 1999). Pozdější rozsáhlejší studie zaměřená na potenciální výskyt *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* v jihovýchodní Evropě (Maďarsko, Rumunsko, Bulharsko) však tuto teorii nepotvrdila, neboť, až na jedinou lokalitu u města Tatabánya v Maďarsku, zde taxon oproti očekávání nebyl nalezen (Pikner & Bureš 2002).

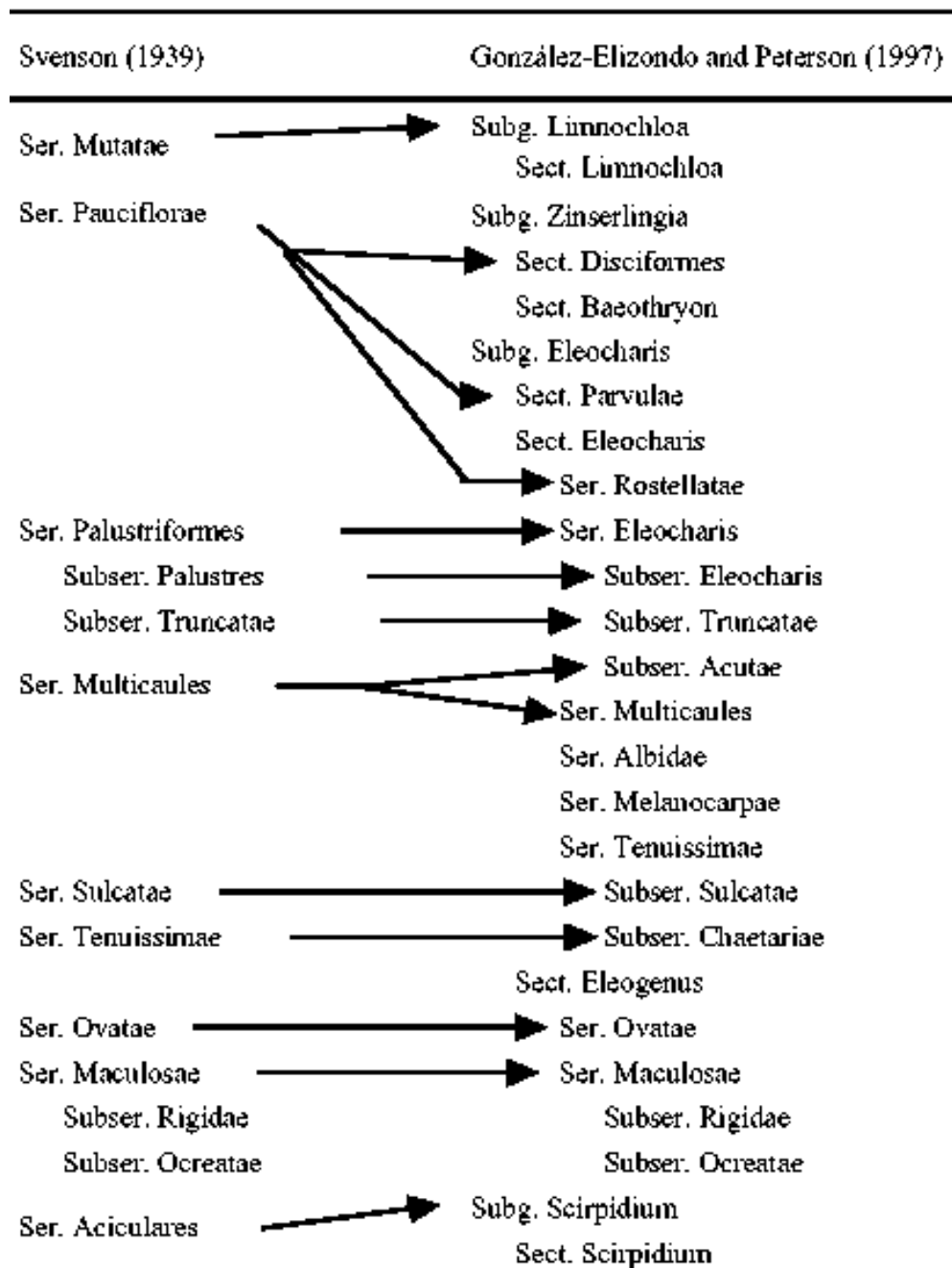
V poslední době byl prováděn výzkum za pomoci studia sekvencí jaderné DNA a chloroplastové DNA a analýzy AFLP s cílem objasnit místo a způsob vzniku *E. uniglumis* subsp. *sternerii*. Tento výzkum předpokládal dvě základní hypotézy (Bureš in verb., 2005):

- *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* vznikala popř. vzniká polytopně ve všech oblastech jejího výskytu autoployploidizací sympatrických populací *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*.

- *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* vznikla v minulosti jedenkrát v jedné z jejích tří oblastí současného výskytu a byla odsud rozšířena vodními ptáky, kteří tyto oblasti využívají při každoroční severojižní migraci.

Tato otázka však stále zůstává nerozřešena.

## 2.2. Taxonomické zařazení



Obr. 2: Taxonomická klasifikace rodu *Eleocharis* (Yano et al. 2004)

*Eleocharis* R. BR. patří do čeledi *Cyperaceae*, podčeledi *Cyperoideae*. Tato čeleď náleží do třídy *Monocotyledonae* (jednoděložné), podtřídy *Commelinidae* a řádu *Juncales* (Kubát 2006). Řadí se do první desítky nejbohatších čeledí krytosemenných rostlin.

Taxonomická klasifikace rodu *Eleocharis* se u jednotlivých autorů liší. Obrázek 2 porovnává dvě různá členění: Svensonovo z roku 1939 a nové z roku 1997, poněkud složitější, od autorů Gonzáles–Elizondo et Peterson (obr.2).

*Eleocharis* R. BR. subser. *Eleocharis* (= *Eleocharis palustris* agg.) obsahuje v rámci Evropy minimálně 6 taxonů specifické a subspecifické úrovně včetně studovaného taxonu (Wlaters 1980):

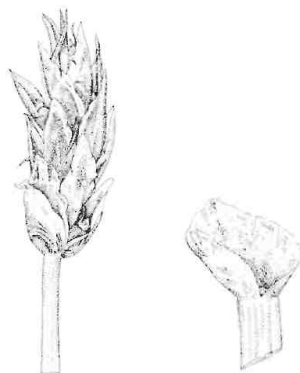
- *E. mamillata* H. Lindb.
  - subsp. *mamillata*
  - subsp. *austriaca* (Hayek) Strandhede
- *E. palustris* (L.) Roemer et Schultes
  - subsp. *palustris*
  - subsp. *vulgaris* S. M. Walters
- *E. uniglumis* (Link) Schultes
  - subsp. *uniglumis*
  - subsp. *sternerii* Strandhede

Pro taxonomické vymezení a determinaci v rámci agregátu mají největší význam znaky uvedené v tabulce (tab.1). Většina těchto znaků koreluje s počtem chromozomů.

Tab. 1: Determinační znaky poddruhů *Eleocharis* subser. *Eleocharis* (Bureš 1999).

|                            | délka průduchů<br>[µm] | délka nažek<br>[mm] | délka pylových<br>zrn [µm] | délka fertálních<br>plev ve stř. části<br>klásku [mm] | počet<br>chromozomů<br>2n= |
|----------------------------|------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------|
| <i>E.u. ssp. sternerii</i> | (54-)64-92(-103)       | 1,4-1,9(-2,1)       | (43-)47-62(-70)            | (4,0-)4,2-6,0(-6,5)                                   | (70-)74-88                 |
| <i>E.u. ssp. uniglumis</i> | (45-)50-69(-73)        | (1,3-)1,4-1,8(-1,9) | (36-)39-53(-58)            | (3,4-)3,6-4,7(-4,8)                                   | (44-)46-56                 |
| <i>E.p. ssp. vulgaris</i>  | (43-)52-69(-73)        | (1,2-)1,4-1,8(-2,0) | (35-)41-53(-59)            | (3,1-)3,6-5,0(-5,5)                                   | (36-)38-39(-41)            |
| <i>E.p. ssp. palustris</i> | (32-)36-48(-50)        | (1,0-)1,1-1,4(-1,5) | (30-)34-42(-46)            | (2,3-)2,7-4,3(-4,5)                                   | (12-)16(-18)               |
| <i>E.m. ssp. mamillata</i> | (33-)37-59(-83)        | (1,0-)1,1-1,4(-1,5) | 29-42                      | (2,5-)2,9-4,0(-4,3)                                   | (13-)16(-18)               |
| <i>E.m. ssp. austriaca</i> | (30-)35-54(-56)        | (1,0-)1,1-1,4(-1,5) | 29-43                      | (2,8-)2,9-4,0(-4,2)                                   | 16(-18)                    |

Dalším důležitým znakem je jediná hnědá sterilní pleva na bázi klásků (obr.3) obou poddruhů *E. uniglumis* (ostatní druhy mají dvě bazální plevy (obr.4) se zeleným středním žebrem), často s 0,2–1,5(–1,8) mm širokým blanitým lemem. Tato pleva objímá ze 2/3 až zcela bázi klásku. Klásky proto díky tomu často nasedají u *Eleocharis uniglumis* na stonek poněkud šikmo (Bureš 2002).



Obr. 3: Terminální klásek *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* a jeho jediná sterilní bazální pleva (vpravo) – Strandhede et Dahlgren (1968)



Obr. 4: Terminální klásek *Eleocharis palustris* se dvěma sterilními bazálními plevami (Strandhede et Dahlgren 1968)

### 2.3. Morfologie

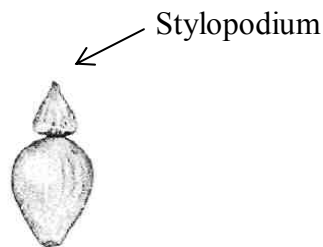
Rostliny řadící se do čeledi *Cyperaceae* jsou byliny trávovitého vzhledu, většinou s oddenkem. Stonek bývá oblý, čtyřhranný nebo trojhranný, plný. Listy jsou úzce čárkovité, střídavé, často trojřadé. Listová pochva bývá uzavřená s jazýčkem. Květy jsou krátkodobé, obou– i jednopohlavné, v mnoho– až jednokvětých kláscích, ve kterých jsou uspořádány spirálovitě nebo dvouřadě. Klásky se sdružují do klasovitých květenství (opět obou– i jednopohlavných). Květní obaly jsou často redukovány v šupiny nebo chlupy nebo úplně chybí. Tyčinky bývají převážně tři, ale mohou být i dvě nebo jedna. Pestík obsahuje dvě nebo tři blizny. Semeník je svrchní. Plodem bývá trojhranná nebo čočkovitá nažka (Kubát 2006).

Rod *Eleocharis* tvoří vytrvalé byliny snášející trvalé zaplavení. Bureš (1999) uvádí, že rostliny tohoto rodu vytváří zvláštní růstovou formu, typickou pro některé graminoidní helofyty. Tato forma se vyznačuje tím, že stonek, popř. listy, mají obvykle válcovitý vzpřímený charakter,

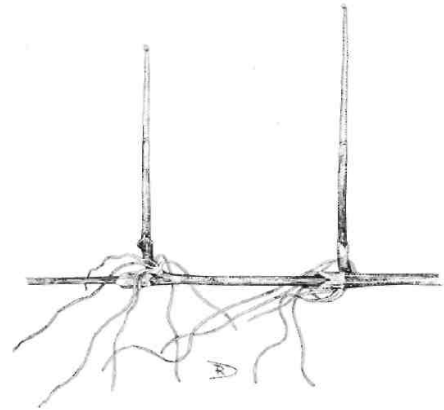


uvnitř s houbovitou dřevinou. Listové čepele jsou u některých z nich dokonce zcela redukované (důležitý znak *Eleocharis*). Její vznik lze vysvětlit jako konstrukční adaptaci na zaplavování a kolísání vodní hladiny, které pro takto poměrně pevně stavěnou rostlinu nemá za následek polehnutí. Květy jsou nesené jednotlivě v paždí spirálně uspořádaných pluch v jediném terminálním klásku. Jsou nenápadné se zřetelnou protogynií (Wlaters 1980). Základními diagnostickými znaky rodu jsou:

- jeden terminální klásek
- tubulární stonek objímající listy = bezčepelné pochvy
- stylopodium (obr.5) = zduřelá báze čnělky vytrvávající i v době zralosti plodu



Obr. 5: Stylopodium na plodu *Eleocharis palustris* (Strandhede et Dahlgren 1968)



Obr. 6: Způsob větvení oddenků taxonů *Eleocharis palustris* agg. (Strandhede et Dahlgren 1968)

Rostlina *Eleocharis uniglumis* se stejně jako ostatní taxony agregátu *Eleocharis palustris* skládá z podzemního systému oddenků (obr 6.) nesoucích vzpřímené neolistěné zelené stonky, z nichž některé vytváří terminální klásky. Primární stonky vyrůstají jednotlivě z nodů na mladém oddenku, ostatní stonky rostou v trsech z pupenů na bázi stonků primárních (Wlaters 1980).

Taxon *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* pravděpodobně vznikl autopolyploidizací typového poddruhu (Bureš 1998) a liší se od něho především cytologicky. Jejich morfologické determinální znaky se do značné míry překrývají.

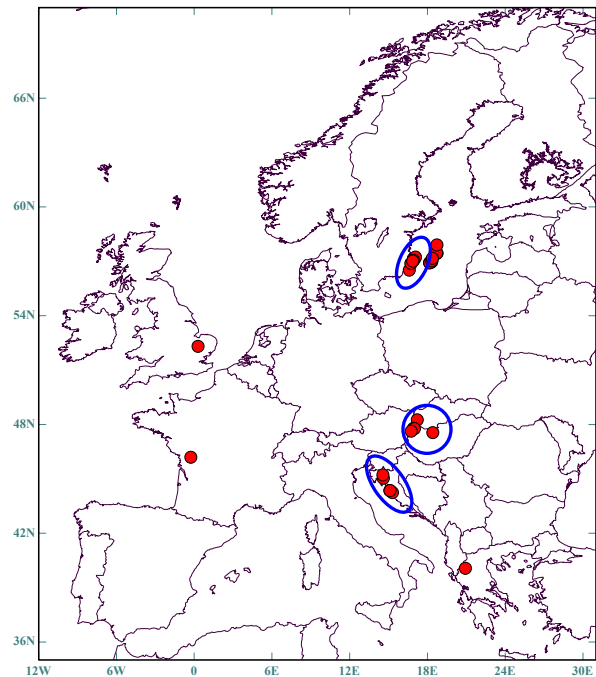
## 2.4. Rozšíření

Čeleď *Cyperaceae* je svým rozšířením kosmopolitní. Rod *Eleocharis* má centrum výskytu v subtropické a tropické oblasti Starého i Nového světa. Výjimkou je skupina *Eleocharis* subser. *Eleocharis*, kam patří i *Eleocharis uniglumis*. Ta je rozšířena v rámci Holarktis.

Areál *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* sestává ze tří arel. Těmi jsou ostrovy v Baltském moři, část Panonie a Ilyrské oblasti.

- Ostrovy v Baltském moři
  - Öland
  - Gotland
- Panonská oblast
  - okolí Neziiderského jezera v Rakousku
  - Svätý Jur na Slovensku
  - Tatabánya v Maďarsku
- Ilyrská oblast
  - ostrovy Krk a Pag
  - Chorvatské pobřeží Jaderského moře

 – oblasti sběru vzorků



Obr. 7: Mapa rozšíření *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*

Vzhledem k postglaciální historii je pravděpodobné, že výskyt *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*, resp. *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* na baltských ostrovech je mladšího data než v Ilyrské a Panonské oblasti. Dosud není jasné, zda tu proběhla autopolyploidizace *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* nezávisle, nebo zda sem byla *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* zavlečena tažným ptactvem, pro které tyto ostrovy (stejně jako další místa jejího výskytu – Neziiderské jezero a Ilyrské ostrovy) představují důležité orientační body a pravděpodobně i místa odpočinkových mezipřistání (Bureš 1998).

Byla také zjištěna dřívější existence dvou lokalit *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* v České Republice. Obě se nacházely v blízkosti Strachotína v Jihomoravském Úvalu a v současnosti jsou zaplaveny 3. Novomlýnskou nádrží. V naší flóře proto můžeme tento taxon považovat za vyhynulý (Bureš 1999).

## 2.5. Ekologie

Všechny taxony *Eleocharis* subser. *Eleocharis* jsou omezeny na vlhká stanoviště s malou kompeticí (Wlaters 1980). Jednotlivé druhy se však liší v nárocích na pH půdy. *Eleocharis*

*palustris* a *Eleocharis austriaca* preferují bazický substrát, *Eleocharis vulgaris* a *E. mamillata* spíše substrát kyselý. Oba poddruhy *Eleocharis uniglumis* rostou především na místech zásobovaných neutrální nebo zásaditou vodou (Wlaters 1980).

Znalosti o ekologii *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* jsou zatím poměrně kusé, prakticky každá lokalita je specifická. Nejčastější typ stanoviště je ukázán na fotografiích (obr. 8).

Na ostrovech Öland a Gotland je výskyt vázán na mělké, krátkodobě zaplavované terénní



Obr. 8: Stanoviště *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*. Zaplavená terénní deprese na jaře (vlevo); suchá terénní deprese v létě (vpravo)

deprese. U Neziderského jezera se soustřeďuje do blízkosti malých i rozsáhlejších jezírek se sezónně kolísající hladinou obklopujících jezero především na jeho východní straně. Na ostrovech Krk a Pag se taxon nachází ve vlhkomilné vegetaci zamokřených pastvin v mírných terénních depresích, na jaře více nebo méně zaplavených a během sezóny vysychajících. U města Tatabánya bývá doprovázen slatinnými druhy *Epipactis palustris* a *Carex distans* a u Svätého Juru druhy halofylními (*Achilea aspleniifolia*, *Cirsium brachycephalum* atd.) – Bureš (1998).

## 2.6. Biologie

### 2.6.1. Rozmnožování

*Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* se stejně jako ostatní druhy rodu *Eleocharis* rozmnožují vegetativně i generativně.

- **Vegetativní rozmnožování** se děje horizontálními oddenky těsně pod povrchem nebo na zaplaveném povrchu půdy. Jejich růst začíná brzy na jaře a pokračuje až do léta, pokud mají dost vlhkosti. Na podzim růst ustává a celý oddenek přezimuje. Během druhého roku oddenek spojující jednotlivé trsy odumírá a ty se tak stávají samostatně fungujícími jedinci (dle Walters 1980). Toto rozmnožování umožňuje snadnou kolonizaci nových stanovišť i rychlý nástup na stanoviště se sezónním poklesem hladiny (Bureš 1999).

- **Generativní rozmnožování:** Plodem je jednosemenná nažka. Klásky jsou obvykle málokvěté a obsahují poměrně malé množství plodů (Walters 1980). Dormance semen je podmíněna mrazem (Grime et al. 1988), ke klíčení dochází na povrchu půdy v téže sezóně na podzim, nebo v dalších letech na jaře. Schopnost klíčit si nažky udržují až po dobu deseti let (Bureš 1999). Klíčivost je často snižována trvalým zaplavením (Bureš 1999).

Dle Walters (1980) neexistuje důkaz, který by prokazoval přítomnost apomixie.

### 2.6.2. Opylení a šíření

Opylení je u všech druhů rodu *Eleocharis* anemogamní. Šíření probíhá epizoochorně díky zpětným háčkům na okvětních štětinkách, ale i barochorně, hydrochorně, případně endozoochorně konzumací vodním ptactvem (Ridley 1930).

Walters (1980) uvádí, že primární kolonizace nového stanoviště je sice podmíněna vyklíčením semene, následné rychlé šíření však probíhá většinou vegetativně oddenky. Přes poměrně značnou plochu mohou, celé populace vznikat vegetativně z jediného jedince.

### 2.6.3. Fenologie

*Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* je při trvalém zaplavení nejrychleji rostoucím druhem rodu. V příznivých podmínkách se nové nadzemní lodyhy vytvářejí po celou vegetační sezónu a k zastavení růstu oddenků a k odumírání dochází ve střední Evropě v říjnu nebo počátkem listopadu, v Evropě jižní vlivem sucha a tepla již v červenci nebo v srpnu. Rostliny kvetou

přibližně od května do července a v rámci porostu je zhruba 50% lodyh fertálních. Počátkem července dozrávají plody (Bureš 1999).

## 3. Metodika

### 3.1. Materiál

Sběr materiálu byl proveden ve všech třech areálech *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*. V každé oblasti bylo vybráno 5 až 6 populací vzdálených od sebe minimálně 5 km. Nakonec se vzdálenosti mezi určenými lokalitami v rámci jedné arealy pohybovaly mezi 5 a 120 km (viz mapy v příloze).

Sběr byl uskutečněn na jaře a v létě roku 2005. Při odebírání vzorků byla použita metoda transektů. Vzdálenost mezi jednotlivými sběry byla ovlivněna hustotou výskytu rostliny, neměla však být menší než 5 metrů, aby se zabránilo sebrání několika klonů stejného jedince. Počet odebraných vzorků se měl pohybovat okolo dvaceti na každé lokalitě. Pouze v několika málo případech se stalo, že populace stanovený počet jedinců neobsahovala. Celkový počet vzorků z jedné lokality se pohyboval mezi 15 a 22. Dohromady bylo sebráno 373 vzorků z 18 lokalit areálu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*. Analyzováno bylo o něco méně vzorků z důvodu problematické determinace poddruhů *Eleocharis uniglumis* v terénu. Vzorky, které se při měření průtokovou cytometrií ukázaly být typovým poddruhem byly vyřazeny. Rostliny byly odebírány i s kořenovým balem a ukládány do igelitových sáčků označených zkratkou lokality a pořadím sběru na dané lokalitě. Toto označení bylo po celou dobu zpracovávání dodržováno a pořadí bylo zachováno i při interpretaci výsledků, pro niž bylo velmi důležité.



Obr. 9: *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*  
v přechodné kultuře

Po přepravě do školní laboratoře byly oddenky rostlin zbaveny hlíny, zbytků a kořínků ostatních rostlinných druhů a všech jiných nečistot, aby později při měření na průtokovém cytometru nebo při počítání chromozomů nemohlo dojít ke kontaminaci analyzovaného materiálu. Čisté rostliny byly umístěny do sklenic s vodou (obr. 9), ve kterých se kultivovaly mladé kořínky potřebné pro počítání chromozomů. Sklenice byly při průběhu analýz uchovávány ve skleníku. Na podzim roku 2005, po ukončení měření, bylo pro zredukování velkého množství

položek vybráno z každé oblasti několik vzorků, jejichž velikost genomu určovala rozsah variability v dané oblasti. Byl vybrán vždy vzorek s největším a nejmenším genomem a několik vzorků mezi. Dále byly uchováni ti jedinci, jejichž velikost genomu se vymykala očekávaným hodnotám. Tyto vytyčené položky byly přesazeny do trvalé kultury a použity pro analýzy v roce 2006.

## 3.2. Lokality

Jednotlivé oblasti byli navštěvováni v různá období roku, podle toho, kdy se v dané oblasti očekával nejintenzivnější růst a kvetení rostlin.

### 3.2.1. Ilyrská oblast

V Ilyrské oblasti, tedy na Chorvatském pobřeží a na ostrovech Krk a Pag, byl sběr proveden na přelomu dubna a května. V této době je zde již natolik pokročilá vegetační sezóna, že rostliny kvetou, zároveň je však ještě dostatek vláhy pro jejich bujný růst.

Ilyrská oblast byla v sadě vzorků zastoupena šesti lokalitami. Na pěti z nich bylo sesbíráno po 22 vzorcích, na lokalitě Tribalj jen 12.

Tab. 2: Populace *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* v Ilyrské oblasti, které byly vybrány pro sběr vzorků; jejich umístění a počet odebraných jedinců (mapy a fotografie lokalit viz přílohy).

| Lokalita<br>(označení) | Počet<br>vzorků | Poloha | Zeměpisná<br>šířka<br>[S š.] | Zeměpisná<br>délka<br>[V d.] | Nadm.<br>výška<br>[m n.m.] |
|------------------------|-----------------|--------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
|------------------------|-----------------|--------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|

#### ILYRSKÁ OBLAST (mapa 1; 5; 8)

|                     |    |                                                                                                                                              |            |            |    |
|---------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|----|
| Krk-Ponikve<br>(E1) | 22 | <b>Chorvatsko: ostrov Krk; Malinska:</b> jižní břeh jezera Ponive; 6,5 km SV od města Malinska; transekt 350 m V->Z (mapa 2; foto 1)         | 45;04;14.4 | 14;34;21.1 | 20 |
| Krk-Jezero<br>(E2)  | 22 | <b>Chorvatsko: ostrov Krk; Omisalj:</b> severní břeh jezera Jezero; 4,5 km J od města Omisalj; transekt 300 m Z->V (mapa 3; foto 2)          | 45;10;27.8 | 14;33;47.5 | 2  |
| Tribalj<br>(E3)     | 12 | <b>Chorvatsko: oblast Crikvenica; Tribalj:</b> severovýchodní břeh jezera 1,5 km SZ od města Tribalj; transekt 600 m JV->SZ (mapa 4; foto 3) | 45;13;41.9 | 14;39;48.5 | 51 |

| Lokalita<br>(označení) | Počet<br>vzorků | Poloha                                                                                                                                                          | Zeměpisná<br>šířka<br>[S š.] | Zeměpisná<br>délka<br>[V d.] | Nadm.<br>výška<br>[m n.m.] |
|------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Pag-Gajac<br>(E4)      | 22              | <b>Chorvatsko: ostrov Pag; Gajac:</b> podmáčená louka jižně od jezera; 2,2 km J od obce Gajac; transekt 400 m J->S (mapa 6; foto 4)                             | 44;30;55.3                   | 14;55;24.3                   | 0                          |
| Pag-V.Blato<br>(E5)    | 22              | <b>Chorvatsko: ostrov Pag; Poveljana:</b> východní břeh jezera Veliko Blato; 4 km VJV od obce Poveljana; transekt 500 m S->J (mapa 7; foto 5)                   | 44;21;40.6                   | 15;08;52.1                   | 1                          |
| Miocici<br>(E6)        | 22              | <b>Chorvatsko: oblast Zadar, Ljubacki zaljev; Miocici:</b> podmáčená louka v zálivu Uvala Plemici 2 km JZ od obce Miocici; transekt 600 m V->Z (mapa 9; foto 6) | 44;16;59.7                   | 15;18;27.0                   | 1                          |

### 3.2.2. Panonská oblast

V Panonii, tedy v Rakousku, Maďarsku a na Slovensku, se sbíralo v polovině května. Panonské lokality, především v okolí Nezdierského jezera v Rakousku, byly pro optimální růst *Eleocharis* poměrně dosti suché. Sběr dostatečného množství vzorků zde byl největší problém. Z původních šesti lokalit ověřených z předchozích let se sbíralo pouze na pěti. Lokalita Warm See byla vynechána, protože na ní byly nalezeny pouze dva jedinci *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*. Z ostatních populací bylo nakonec shromážděno dostatečné množství vzorků (tab. 3).

Tab. 3: Populace *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* v Panonské oblasti, které byly vybrány pro sběr vzorků; jejich umístění a počet odebraných jedinců (mapy a fotografie lokalit viz přílohy).

| Lokalita<br>(označení) | Počet<br>vzorků | Poloha | Zeměpisná<br>šířka<br>[S š.] | Zeměpisná<br>délka<br>[V d.] | Nadm.<br>výška<br>[m n.m.] |
|------------------------|-----------------|--------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
|------------------------|-----------------|--------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|

#### PANONSKÁ OBLAST (mapa 10; 15)

|                     |    |                                                                                                                                                              |            |            |     |
|---------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-----|
| Gansellacke<br>(N1) | 18 | <b>Rakousko: Neusiedler See; St. Andrä:</b> severovýchodní břeh jezera Gansellackelake; 0,5 km SZ od obce St. Andrä; transekt 320 m JV->SZ (mapa 11; foto 7) | 47;47;23.4 | 16;55;58.2 | 118 |
|---------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-----|



| Lokalita<br>(označení)     | Počet<br>vzorků | Poloha                                                                                                                                                                                     | Zeměpisná<br>šířka<br>[S š.] | Zeměpisná<br>délka<br>[V d.] | Nadm.<br>výška<br>[m n.m.] |
|----------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Schoschto<br>Lacke (N2)    | 22              | <b>Rakousko: Neusiedler See; St. Andrä:</b> severní břeh jezera Schoschto Lacke; 3km JV od obce St. Andrä; transekt 350 m Z->V (mapa 12; foto 8; 9)                                        | 47;46;00.8                   | 16;57;44.5                   | 112                        |
| Scerdahelyer<br>Lacke (N3) | 15              | <b>Rakousko: Neusiedler See; Wallern, Apetlon:</b> jižní břeh jezera Scerdahelyer Lacke; blízko silnice mezi obcemi Apetlon a Wallern; 4km od obce Wallern; transekt 400m JZ->SV (mapa 13) | 47;44;45.9                   | 16;53;35.7                   | 118                        |
| Hegykö<br>(N5)             | 22              | <b>Maďarsko: Neusiedler See; Hegykö:</b> severozápadně od vysílače; 300m S od obce Hegykö; transekt 300m V->Z (mapa 14; foto 10)                                                           | 47;38;04.2                   | 16;44;32.3                   | 128                        |
| Svätý Jur<br>(S)           | 20              | <b>Slovensko: Svätý Jur; Čierna voda:</b> vlhké halinní louky na J okraji PR Svätójurský Šúr; S od obce Čierna voda v blízkosti města Svätý Jur; transekt 350m JZ->SV (mapa 16; foto 11)   | 48;13;35.9                   | 17;14;10.8                   | 130                        |

### 3.2.3. Baltská oblast

V nejsevernější oblasti, v Dánsku a na Ölandu, proběhl sběr vzorků až na přelomu července a srpna. V Dánsku bylo nasbíráno 20 kontrolních jedinců *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*. Na Ölandu bylo vybráno šest lokalit a ze všech bylo přivezeno 20 a více vzorků (tab. 4).

Tab. 4: Populace *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* v Baltské oblasti, které byly vybrány pro sběr vzorků; jejich umístění a počet odebraných jedinců (mapy a fotografie lokalit viz přílohy).

| Lokalita<br>(označení) | Počet<br>vzorků | Poloha | Zeměpisná<br>šířka<br>[S š.] | Zeměpisná<br>délka<br>[V d.] | Nadm.<br>výška<br>[m n.m.] |
|------------------------|-----------------|--------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
|------------------------|-----------------|--------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|

#### BALTSKÁ OBLAST (mapa 17; 21; 23; 26)

|               |    |                                                                                                                                                                                                                       |            |            |   |
|---------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|---|
| Lakolk<br>(D) | 20 | <b>Dánsko (ostrov Rømø): Lakolk:</b> mělká terénní deprese mezi jihozápadním okrajem obce a písečnými dunami mořského pobřeží na Z okraji ostrova; v blízkosti Bilfrit Område; transekt 300 m S->J (mapa 27; foto 18) | 55;08;19,7 | 08;29;13,6 | 2 |
|---------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|---|

| Lokalita<br>(označení) | Počet<br>vzorků | Poloha                                                                                                                                                                                 | Zeměpisná<br>šířka<br>[S š.] | Zeměpisná<br>délka<br>[V d.] | Nadm.<br>výška<br>[m n.m.] |
|------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Byxelkrok<br>(O1)      | 20              | <b>Švédsko: Öland; Byxelkrok:</b> pastvina cca 200m od pobřeží; východně od silnice č.136; mezi obcemi Byxelkrok a Nabbelund; transekt 350 m Z->V (mapa 18; foto 12)                   | 57;20;39,4                   | 17;01;40,5                   | 0                          |
| Folberga<br>(O2)       | 20              | <b>Švédsko: Öland; Folberga</b> (obec 17,7 km SSV od Borgholm): vlhká louka u polní cesty na východním okraji obce Folberga; transekt 350 m V->Z (mapa 22; foto 15)                    | 56;59;36,3                   | 16;50;51,3                   | 10                         |
| Gräsgård<br>(O3)       | 26              | <b>Švédsko: Öland; Gräsgård:</b> periodická říčka JJV od hradu Eketorp borg; transekt 300 m S->J (mapa 24; foto 16)                                                                    | 56;17;31                     | 16;29;02,7                   | 2                          |
| Bengstorp<br>(O4)      | 25              | <b>Švédsko: Öland; Bengstorp</b> (obec 3 km VJV od Mörbylånga): mělká deprese na pastvině JV od křižovatky na severním okraji obce Bengstorp; transekt 700 m SZ->JV (mapa 25; foto 17) | 56;30;20,9                   | 16;26;30,5                   | 0                          |
| Brokär<br>(O5)         | 21              | <b>Švédsko: Öland; Brokär:</b> mělká terénní deprese podél silnice jižně od obce Brokär, J od Byxelkrok; transekt 250 m S->J (mapa 19; foto 13)                                        | 57;18;53,5                   | 16;59;52,7                   | 0                          |
| Glabo<br>(O6)          | 22              | <b>Švédsko: Öland; Löttorp:</b> mělká terénní deprese podél silnice č.136 jižně od obce Glabo; transekt 200 m S->J (mapa 20; foto 14)                                                  | 57;12;29,0                   | 17;02;43,0                   | 9                          |

### 3.3. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda pro měření optických vlastností (fluorescence, světelný rozptyl) izolovaných částic, které jednotlivě protékají v úzkém přesně určeném proudu kapaliny skrz intenzivní paprsek ultrafialového nebo laserového záření. Jedná se o moderní perspektivní metodu, která je v současné době využívána v základním i aplikovaném výzkumu mnoha biologických oborů. Slouží například ke stanovení obsahu jaderné DNA, určení ploidie, analýze buněčného cyklu, studiu genové exprese, počítání a určení typu krevních buněk apod.

### 3.3.1. Historie vývoje

Teoretický princip cytometru, jakožto přístroje umožňujícího automatické počítání částic proudem unášené suspenze, formuloval poprvé Kanadčan Andrew Moldavan v roce 1939 (Bureš 2003). O deset let později byl vyvinut přístroj k počítání krevních buněk, založený na proudění částic v izotonickém solném proudu a měření bylo prováděno na základě zvyšujícího se elektrického odporu, ke kterému docházelo při průchodu částic otvorem úzké kapiláry. Některé ze znaků této technologie (např. rychlý proud izolovaných částic, elektronická detekce signálu apod.) jsou používány dodnes. Měla však i mnoho nedostatků. Tím hlavním bylo časté ucpávání kapiláry, která musela být velice tenká, aby nedocházelo k proudění částic po dvou a více, což bylo nežádoucí.

Významným rokem pro průtokovou cytometrii se stal rok 1953, kdy britský lékař Paul J. Crossland–Taylor publikoval v časopise Nature princip hydrodynamické fokusace (Crossland–Taylor 1953). Tento princip spočívá ve vstříknutí vzorku do centra rychleji se pohybujícího proudu, který přinutí částice seřadit se jedna za druhou a procházet jen středem otvoru trubice. Tímto technickým řešením se podařilo zkombinovat dvě hlavní podmínky pro správnou funkci cytometru:

- úzký přesně definovaný proud částic
- dostatečně široká kapilára, ve které nebude docházet k brždění a ucpávání.

První průtokový cytometr založený na hydrodynamické fokusaci byl vyroben v Los Alamos v roce 1969. V biologii rostlin byla průtoková cytometrie poprvé využita v roce 1973 F. O. Hellerem (Heller 1973).

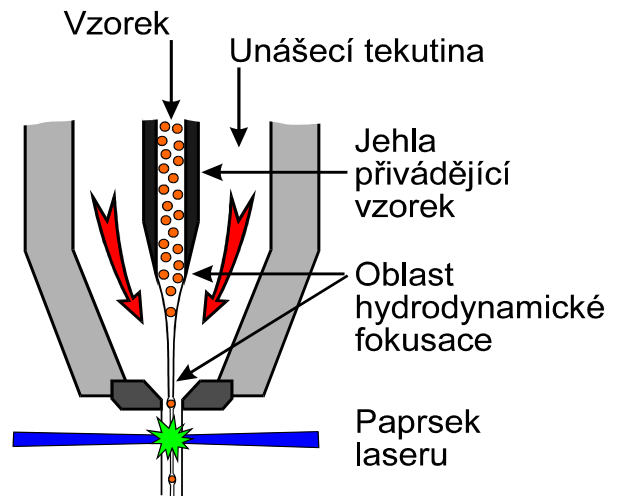
V současnosti se vývoj cytometrie ubírá dvěma směry. První z nich se snaží o stále zdokonalování, zpřesňování a zrychlování metody a druhý o výrobu jednoduchých cytometrů se základní výbavou, vhodných k rutinní práci v laboratoři. (Suda 2004)

### 3.3.2. Popis průtokového cytometru a princip jeho funkce

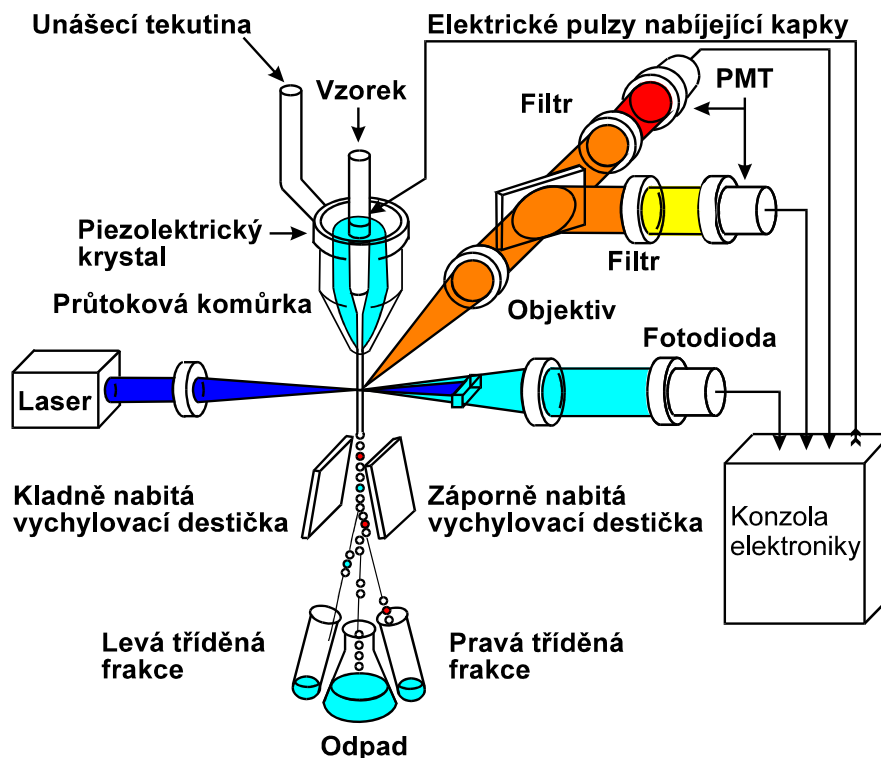
V současné době jsou u nás využívány cytometry vyráběné dvěma firmami. Firmou Becton Dickinson z USA a německou firmou PARTEC (www 3). V naší laboratoři jsou využívány průtokové cytometry firmy PARTEC, typy PA–1, jehož zdrojem světla je UV lampa – k excitaci elektronů dochází při obarvení vzorku fluorescenčním barvivem DAPI a Cy flow s laserem, kde se používá fluorescenční barvivo PI. Základní součásti cytometru jsou (obr.11): průtoková

komůrka (obr.10), zdroj světla, optická část, analog–digitální konvertory, fotodetektory a počítačový systém.

**Průtoková komůrka** je jádrem celého přístroje a dochází v ní k hydrodynamické fokusaci. Kovová jehla vnáší částice do prostoru s rychle proudící unášecí tekutinou. Tou bývá většinou destilovaná voda nebo slabý roztok solí. Vyšší tlak kapaliny než vzorku nutí částice držet se jen ve střední části proudu. Při výstupu tekutiny z komůrky jsou částice vzniklým zrychlením nuceny řadit se jedna za druhou a takto prochází, vysokou rychlostí (1–10 m/s), ohniskem zdroje excitačního záření. Velikost zrychlení závisí také na průměru ústí komůrky, které bývá přibližně 50–100  $\mu\text{m}$ . Průtoková komůrka na obrázku 10 je typ nazývaný „jet in air“. Částice jsou zde měřeny v úzkém vodním paprsku, který vychází z komůrky. Existují ještě další dva typy. „Enclosed–stream“, kde jsou částice měřeny při pohybu v úzkém kanálku a „jet on open surface“, kde měření probíhá ve vodním paprsku proudícím po povrchu krycího skla (Doležel 1991).



Obr. 10: Schéma průtokové komůrky (www1)



Obr. 11: Schéma průtokového cytometru (www1)

**Zdrojem světla** může být laser nebo vysokotlaká rtuťová výbojka. Pokud před měřením suspenzi částic obarvíme fluorescenčním barvivem, které se specificky váže na DNA studovaného objektu, dojde při ozáření k excitaci (přechodu na vyšší energetickou hladinu) elektronů. Při jejich návratu zpět do původní polohy se uvolní světelná energie tzv. fluorescence, která má díky části energie uvolněné ve formě tepla delší vlnovou délku než původní excitační záření.

**Optická část** se skládá z objektivu a optických filtrů. Výsledné záření je přes objektiv přiváděno na soubor optických filtrů, které fluorescenci a původní světlo oddělí.

**Fotodetektory** tvořené tubou a násobičem fotonů mění světelné pulzy na pulzy elektrického proudu a zesilují je. Zesílené pulzy jsou následně digitalizovány pomocí **analog –digitálních konvertorů** a dále zpracovávány a ukládány **počítačovým systémem**. Výsledky měření jsou zobrazeny v tabulce a ve formě jednoparametrických histogramů intenzity fluorescence (dle Doležel 1991).

### 3.3.3. Příprava a měření materiálu

Pro měření materiálu na průtokovém cytometru je třeba uvolnit jádra z buněk rostlinného pletiva. Metodu, která je pro tento účel nejčastěji používána, popsali Galbraith et al. v roce 1983. Její princip spočívá v mechanické homogenizaci čerstvého pletiva v hypotonickém izolačním pufu.

V Petriho misce obsahující 0,5 ml izolačního pufu, v našem případě OTTO I, pomocí žiletky nebo skalpelu nadrobno nasekáme asi centimetrovou část čerstvého pletiva listu vzorku a standardu. Standardem je rostlina o známé velikosti jaderného genomu. Přidáme ještě asi 0,5 ml roztoku OTTO I. Hypotonický izolační puf způsobí rozpad všech organel kromě jádra. Přes filtrační tkaninu homogenizovanou suspenzi filtrujeme do testovací zkumavky. Do té těsně před zahájením měření přidáme 1 ml pufu OTTO II. OTTO II obsahuje fluorescenční barvivo DAPI případně PI. Následně měříme na průtokovém cytometru.

Zkumavku nasadíme do držáku přístroje. Několikrát zmáčkeme tlačítko Clear, čímž se resetuje histogram na obrazovce. Nastavíme příslušný Gain (je různý pro různý typ materiálu, nastavuje se podle toho, kde očekáváme pík) a požadovanou rychlost průchodu částic. Jako první změříme samotný standard jako kontrolu, pak již hodnotíme směs vzorku a standardu. Po každé změřené sérii vzorků opět zařadíme kontrolu. Po každém měření použijeme funkci Clean, čímž zabráníme kontaminaci vzorku vzorkem předešlým. Vyhodnocování jednoho vzorku probíhá,

dokud není naměřen předem stanovený počet jader, nebo dokud přístroj sami nezastavíme tlačítkem stop.

Relativní velikost jaderného genomu se dá snadno stanovit porovnáním (poměrem) aritmetického průměru píků vzorku a standardu v histogramu. Výsledné hodnoty jsou udávány v tzv. arbitrárních jednotkách [a.u.], přičemž 1 a.u. udává aritmetický průměr standardu. Výsledky zaznamenáváme do tabulky v programu Excel.

Měření v roce 2005 probíhala pouze na průtokovém cytometru PA-1 s barvivem DAPI. Zjišťoval se relativní obsah DNA vzorků. Každý vzorek byl proměřen 3x v různé dny. Počet měřených jader byl nastaven na 5000. Použité standardy byly *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* a *Eleocharis palustris*.

V roce 2006 se měřilo na obou cytometrech (PA-1 i Cy flow). Příprava vzorků se lišila v tom, že bylo v roztoku zdvojnásobeno množství jak vzorku, tak izolačního pufru, a před měřením byl roztok rovnoměrně rozdělen do dvou zkumavek. Měření pak probíhalo na obou přístrojích souběžně. Stejně jako v roce 2005 se měření každého vzorku provedlo 3x. Jako standard byla použita kukuřice.

### 3.3.4. Hypotonické izolační pufrů

Existuje šest druhů nejčastěji používaných izolačních pufrů. Mezi ně patří i pufrů OTTO I a II. OTTO I se skládá ze 100mM kyseliny citronové a 0,5% detergentu Tween 20 (Otto 1990). Detergent slouží v roztoku k usnadnění uvolnění jader z cytoplazmy. Odstraňuje zbytky cytoplazmy z povrchu jader, rozptyluje chloroplasty a snižuje tendenci jader a cytoplazmových pozůstatků agregovat. Kyselina citronová fixuje izolovaná jádra (Doležel et Bartoš 2005). OTTO II je tvořen 0,4 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Doležel et Göhde 1995). Do tohoto pufru se přidává fluorescenční barvivo.

Měření vzorků s izolačním barvivem OTTO dává většinou nejlepší výsledky. Je to dáno pravděpodobně přítomností kyseliny citronové, která zlepšuje přístupnost chromatinu k barvivům (Doležel et Bartoš 2005).

### Příprava pufru OTTO I (www2):

Tab. 4: Složení a používané množství látek pro přípravu pufru OTTO I

| Látka / Celkový objem [ml] | 200  | 500   | 1000  |
|----------------------------|------|-------|-------|
| 0,1M kyselina citronová    | 4,2g | 10,5g | 21,0g |
| 0,5% Tween 20              | 1ml  | 2,5ml | 5ml   |

Po úpravě roztoku na celkový objem filtrujeme přes filtr (0,22  $\mu\text{m}$ ) a uchováváme při teplotě 4°C.

### Příprava pufru OTTO II (www2):

Tab. 5: Složení a používané množství látek pro přípravu pufru OTTO II

| Látka / Celkový objem [ml]                                | 200    | 500    | 1000    | 5000    |
|-----------------------------------------------------------|--------|--------|---------|---------|
| 0,4M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 28,65g | 71,62g | 143,25g | 716,25g |
| DAPI nebo PI                                              |        |        |         | 50ml    |

Rozpustíme fosforečnan při teplotě 50–70°C v deionizované vodě. Do chladného roztoku přidáme fluorescenční barvivo. Po úpravě na celkový objem filtrujeme přes filtr (0,22  $\mu\text{m}$ ). Uchováváme ve tmě v lednici (bez barviva může být roztok uchováván při pokojové teplotě).

### 3.3.5. Fluorescenční barviva

Fluorescenční barviva neboli fluorochromy jsou chemické sloučeniny schopné absorbovat světlo a emitovat záření různých vlnových délek. Aby mohl být fluorochrom použit při analýze jaderného obsahu, musí se specificky vázat na DNA. Taková fluorescenční barviva můžeme rozdělit do třech skupin (tab. 6) – Doležel 1991:

- barviva, která se kvantitativně vmezeřují mezi páry bází v dvoušroubovici DNA
- barviva schopná specificky se vázat na oblasti bohaté A–T páry bází
- barviva specificky se vázající na oblasti bohaté G–C páry bází

Pro zjištění velikosti genomu se používají nejčastěji barviva DAPI a Propidium iodide (PI). Propidium iodide je barvivo vázající se mezi páry bází a je v současné době upřednostňováno před Ethidium bromidem (EB). Zvláště proto, že je o něco zřetelnější a méně toxické.

Interkalační barviva se používají tam, kde chceme zjistit obsah jaderné DNA v absolutních jednotkách (pikogramy, počet párů bází). Protože v buňce se může vzácně vyskytovat i dvoušroubovicová RNA, kterou by flouorchrom také obarvil, je třeba při použití interkalačních barviv použít RNAzu (enzym štěpící RNA).

Oblíbené a často používané barvivo je DAPI (4,6–diamino–2–phenylindole). Specificky se váže na oblasti A–T párů bází. Tím pádem nehrozí zkreslení ze strany RNA. K excitaci dochází při ozáření ultrafialovým zářením a vyzařováno je modré světlo. Srovnávací studie mezi barvivy DAPI a Hoechst (další A–T specifické barvivo) ukázaly, že první z nich má vyšší intenzitu fluorescence a lepší zřetelnost. (Otto & Tsou 1985). Hůře než všechny ostatní flouorchromy však DAPI barví chromatin ve stadiu kondenzace (Shapiro 1995).

Pro měření velikosti genomu v rámci diplomové práce bylo využíváno barvivo DAPI pro zjištění relativního obsahu DNA a DAPI i PI pro srovnávací studie.

Tab. 6: Hlavní flouorchromy používané v průtokové cytometrii a jejich vazba k nukleové kyselině (Doležel 1991 a www1)

| Flouorchrom                  | Vazba na DNA         | Excitační záření [vlnová délka, nm] | Emitované záření [vlnová délka, nm] |
|------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Propidium iodide (PI)</b> | Vmezežení mezi páry  | <b>540 (modro-zelené)</b>           | <b>615 (červené)</b>                |
| Ethidium bromid(EB)          | bází (=interkalace)  | 530 (modro-zelené)                  | 605 (červené)                       |
| <b>DAPI</b>                  | Vazba na A–T oblasti | <b>365 (UV)</b>                     | <b>450 (modré)</b>                  |
| DIPI                         |                      | 365 (UV)                            | 450 (modré)                         |
| Hoechst 33258                |                      | 365 (UV)                            | 465 (modré)                         |
| Hoechst 33342                |                      | 360(UV)                             | 460 (modré)                         |
| Mithramycin                  | Vazba na G–C oblasti | 445 (fialovo-modré)                 | 570 (zelené)                        |
| Chromomycin                  |                      | 445 (fialovo-modré)                 | 575 (zelené)                        |
| Olivomycin                   |                      | 445 (fialovo-modré)                 | 560 (zelené)                        |

#### **Příprava roztoku DAPI–4,6–diamino–2–phenylindole (www2):**

Tab. 7: Složení a používané množství látek pro přípravu flouorchromu DAPI

| Látka /Celkový objem [ml] | 50      | 100     | 250     | 500     |
|---------------------------|---------|---------|---------|---------|
| DAPI 0,1 mg/ml            | 5mg     | 10mg    | 25mg    | 50mg    |
| deionizovaná voda         | doplnit | doplnit | doplnit | doplnit |

Rozpustíme v 50 ml vody, přefiltrujeme přes filtr (0,22 $\mu$ m) a uchovááme při teplotě -20°C.



### **Příprava roztoku Propidium iodide (PI) (www2):**

Tab. 8: Složení a používané množství látek pro přípravu fluorochromu PI

|                           |      |
|---------------------------|------|
| Látka /Celkový objem [ml] | 50   |
| propidium iodide 1 mg/ml  | 50mg |

Rozpustíme v 50ml vody, přefiltrujeme přes filtr (0,22 $\mu$ m) a uchováváme při teplotě -20°C.

### **3.3.6. Standard**

Ideálním standardem je rostlina (ale používají se i živočišné a lidské buňky) o známé konstantní velikosti genomu, geneticky stabilní, snadno a v dostatečném množství dosažitelná, která je pokud možno blíže příbuzná měřeným vzorkům, aby výsledné píky v histogramu nebyly příliš daleko od sebe.

V rámci diplomové práce byly použity tři standardy. V roce 2005 to byla *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* (2n=46), která se používala při měření vzorků *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*, a *Eleocharis palustris* (2n=16) pro jedince *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*, v roce 2006 *Zea mays* (2n=40).

### **3.3.7. Využití průtokové cytometrie v biologii rostlin**

Aplikace průtokové cytometrie v botanice se oproti zoologii a medicíně značně opozdila (Doležel 1991). Poprvé byla sice použita již v roce 1973, ale až do osmdesátých let minulého století se jí zabývalo jen velice málo laboratoří. Bylo to dáno především raným stádiem vývoje v oblasti izolace rostlinných buněk. K průlomů došlo až roku 1983, kdy David Galbraith a jeho spolupracovníci představili jednoduchou a rychlou metodu získávání intaktních jader pomocí žiletky a izolačního pufu s přidavkem detergentu a fluorochromu, která se používá dodnes (Suda 2004).

V současnosti je průtoková cytometrie využívána především pro analýzu rostlinného protoplastu (www 1), jader (obsah DNA, stupeň ploidie, velikost genomu, fáze buněčného cyklu) a chromozomů (třídění pro tvorbu genetických map) (www 4).

### 3.4. Roztlaková karyologická metoda pro počítání chromozomů

Karyologické metody slouží pro výzkum buněčného jádra, především k počítání chromozomů. Dělíme je na klasické, které využívají především řezy pletivy, a na rychlé. Rychlé metody se používají přibližně od 20. let minulého století a dělíme je na roztěrové, používané při studiu meiosis, a roztlkové, jenž slouží ke studiu mitosy. Roztlaková metoda je využívána častěji. Ke studiu meiosis se přistupuje zpravidla pouze při zjišťování hybridogenního původu taxonu (studium tvorby bivalentů resp. univalentů a multivalentů meiotických chromozomů) nebo při velkém množství chromozomů v jádře. Chromozomy se počítají vždy ve stadiu metafáze, kdy jsou dobře viditelné a seřazené v ekvatoriální rovině buňky. Materiál pro měření získáváme z meristémů, které jsou soustředěny především ve vzrostných vrcholech, kořenových špičkách a poupatech.

#### 3.4.1. Postup (Dyer 1963):

Přípravu roztlkové karyologické metody můžeme rozdělit do několika fází: předpůsobení, fixace, macerace, vypírání, barvení, roztlak, vlastní pozorování. Předpůsobení způsobuje rozrušení dělicího vřeténka a tedy prostorové rozložení chromozomů. Zvýší se počet metafází a chromozomy se zkrátí, což usnadňuje jejich počítání. Fixace usmrcuje vzorek, ale zachovává neporušenou strukturu chromozomů. Macerací rozrušíme střední lamelu, která spojuje buňky. Izolované buňky se potom roztlakem rozprostřou do jedné roviny.

- 1) **Předpůsobení** probíhá 2–4 hodiny v nasyceném roztoku paradichlorbenzenu, kam byly ponořeny asi 1 cm dlouhé kořenové špičky.
- 2) **Fixace:** Provádíme ji ve směsi 96% alkoholu a ledové kyseliny octové v poměru 3 : 1 po dobu minimálně 2 hodin, nejlépe do druhého dne.
- 3) **Macerace:** Ve směsi 96% alkoholu a koncentrované kyseliny chlorovodíkové v poměru 1 : 1 macerujeme 1–3 minuty v přikryté nádobě.
- 4) **Vypírání** v destilované vodě trvá stejně dlouho jako předchozí macerace.
- 5) **Příprava barvy:** Vzhledem k dlouhému trvání rozpuštění orceinu se provádí týden dopředu. Smícháme 5 ml kyseliny propionové, 5 ml kyseliny mléčné, 0,2 g orceinu. Po týdnu naředíme 6–8 ml destilované vody a 2x zfiltrujeme.
- 6) **Barvení:** Nejprve umístíme vzorek do kapky vody na podložní sklo a odřízneme co nejmenší kousek kořenové špičky. Prebytečnou vodu odsajeme. Přikápneme barvivo acetoorcein a

přiložíme krycí sklíčko. Objekt opatrně rozmáčkneme špičkou preparační jehly. Žiletkou lehce nadzvedneme rožek krycího sklíčka, aby se barva přelila přes objekt.

7) **Pozorování:** Pozorujeme pod mikroskopem při zvětšení objektivu 100x (s použitím imerzního oleje) a okuláru 15x. Počítáme, případně zakresluje chromozomy.

### 3.4.2. Počítání chromozomů

Po změření velikosti genomu všech vzorků průtokovou cytometrií byly vybírány vzorky pro počítání chromozomů. Z každé oblasti to byly jedinci s extrémními, průměrnými nebo neobvyklými hodnotami obsahu DNA, abychom postihli celou variabilitu velikosti genomu, která byla v dané oblasti zjištěna. V konečné fázi jsme takto vyčlenili 31 vzorků. U nich byly odebrány mladé kořinky, jejichž kořenové špičky byly pro počítání použity. Počet chromozomů byl zjišťován roztlakovou karyologickou metodou s použitím barviva acetoorcein, jejíž postup je popsán v předchozí podkapitole (3.4.1).

Při počítání byly nejzřetelnější metafáze nejprve vyfotografovány, fotografie byla vytištěna jako podklad a chromozomy byly do ní postupně dokreslovány (obtahovány) při proostřování na jednotlivé vrstvy metafáze. Po zakreslení byly chromozomy spočítány. Zpravidla bylo počítáno kolem 10 metafází. Vzorek byl považován za spočítaný, pokud bylo 5x dosaženo stejného počtu.

## 3.5. Kontrolní měření

V roce 2006 probíhaly kontrolní analýzy třinácti vzorků uchovaných v trvalé kultuře. Velikost genomu byla opět měřena na průtokovém cytometru PA-1 jako v předchozím roce a navíc ještě na Cy flow a to postupem popsáním v podkapitole (3.3.3). Měření jednoho vzorku probíhalo na obou cytometrech současně a bylo 3x v různé dny opakováno.

### 3.5.1. Barvivo DAPI versus PI

Současným měřením vzorků na dvou cytometrech používajících rozdílná fluorescenční barviva bylo zjišťováno, jak dobře jsou výsledky z obou přístrojů korelovatelné. Zda lze fluorescenční barvivo DAPI využít pro analýzu variability velikosti genomu stejně dobře jako barvivo PI.

### 3.5.2. Opakovatelnost měření na cytometru PA–1

Aby se prokázalo, že měření na průtokovém cytometru lze snadno zopakovat i v delším časovém rozmezí, byly z hodnot velikosti genomu naměřených v roce 2005 vybrány výsledky třinácti vzorků, které zůstaly v trvalé kultuře a jejichž měření bylo provedeno i v roce 2006. Výsledné hodnoty měření z obou let byly porovnány.

## 3.6. Zpracování získaných dat

Velikost genomu jednotlivých vzorků naměřená na průtokovém cytometru byla graficky znázorněna. Byl vytvořen jeden sloupcový graf, který porovnává variabilitu velikosti genomu mezi arelami a jednotlivými populacemi v rámci arel a druhý, který ukazuje variabilitu jedinců v rámci populací. Pro srovnání byly do tohoto grafu vneseny také hodnoty velikosti genomu z jedné lokality *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*.

Pro každou populaci byl vypočítán rozsah velikosti genomu jedinců z této populace v procentech a to jako rozdíl maximální a minimální naměřené hodnoty vydělený jedním procentem z minimální hodnoty.

Pomocí grafu lineární regrese byl vyjádřen vztah mezi velikostí genomu a počtem chromozomů.

Nakonec byly porovnány výsledky měření na průtokovém cytometru pro ověření jejich správnosti. Do bodového grafu byly zaneseny hodnoty vzorků změřené v roce 2005 proti hodnotám stejných vzorků změřených o rok později. V dalším grafu byly porovnány hodnoty naměřené v roce 2006 na PA–1 a na Cy flow pro zjištění srovnatelnosti výsledů z obou přístrojů. Oběma grafy byla proložena lineární regresní přímka.

## 4. Výsledky

V roce 2005 probíhala měření relativního obsahu jaderné DNA pomocí průtokového cytometru Partec PA-1 a AT selektivního fluorescenčního barviva DAPI. V celkovém souboru vzorků byly v průběhu měření zaznamenány čtyři typy jedinců. (1) Jedinci *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*, u kterých byla zjišťována velikost genomu. (2) Náhodně sebraní jedinci *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*, u kterých byla poznamenána pouze jejich přítomnost. (3) Jedinci *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* z lokality Lakolk na dánském ostrově Römö, u kterých byla zjišťována velikost genomu a byly použity pro porovnání rozdílů v DNA obsahu mezi oběma poddruhy. (4) Jedinci jiných druhů rodu *Eleocharis* sebraní omylem a z dalších analýz vyřazení. (5) Jedinci s netypickým genomem, kteří se stali středem pozornosti části dalšího výzkumu.

### 4.1. Rozsah variability obsahu DNA

#### 4.1.1. Neočekávané cytotypy

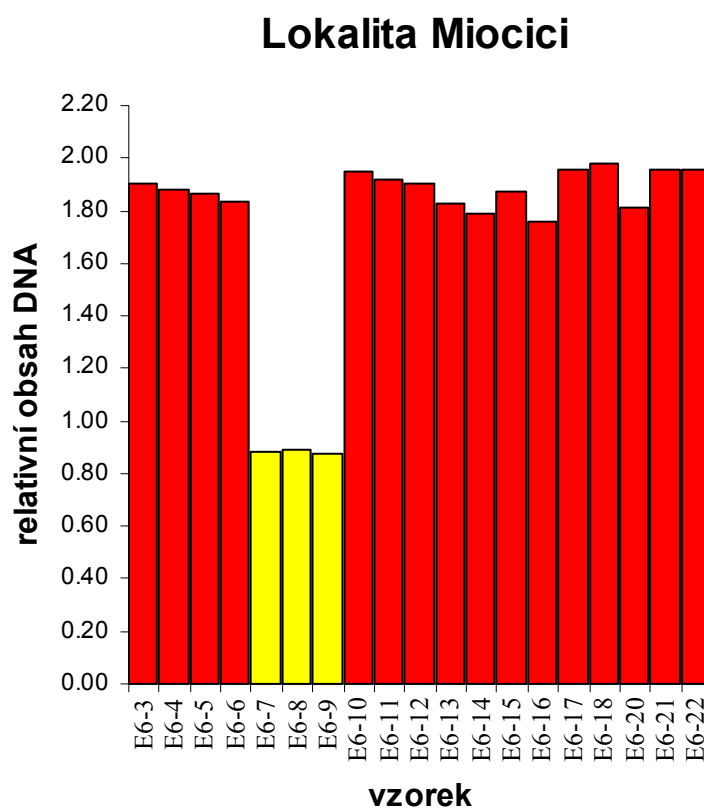
Při měření na průtokovém cytometru byly odhaleny dva typy jedinců, jejichž velikost genomu se od ostatních nápadně lišila.

(A) V jedné z Chorvatských populací (Miocici) byli zjištěni tři jedinci, jejichž relativní obsah DNA byl oproti hodnotám ostatních vzorků přibližně poloviční. Při měření se standardem *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* to bylo 0,87; 0,88 a 0,89 a.u. (genom těchto vzorků je tedy menší i než genom *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*). Hodnoty velikosti genomu ostatních jedinců z dané lokality (měřené se standardem *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*) se pohybovaly přibližně mezi 1,75–1,95 a.u.

Cytometricky získané výsledky relativního obsahu DNA s použitím standardu *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* z lokality Miocici jsou zaznamenány v tabulce (tab. 9) a znázorněny v grafu (obr. 12). V tabulce i v grafu jsou jedinci s neobvyklým cytotypem označeni žlutou barvou.

Tab. 9: Relativní obsah DNA jedinců z lokality Miocici

| Vzorek | Relat. obsah DNA[a.u.] |
|--------|------------------------|
| E6-3   | 1.90                   |
| E6-4   | 1.88                   |
| E6-5   | 1.87                   |
| E6-6   | 1.84                   |
| E6-7   | 0.88                   |
| E6-8   | 0.89                   |
| E6-9   | 0.87                   |
| E6-10  | 1.95                   |
| E6-11  | 1.92                   |
| E6-12  | 1.91                   |
| E6-13  | 1.83                   |
| E6-14  | 1.79                   |
| E6-15  | 1.87                   |
| E6-16  | 1.76                   |
| E6-17  | 1.95                   |
| E6-18  | 1.98                   |
| E6-20  | 1.81                   |
| E6-21  | 1.95                   |
| E6-22  | 1.95                   |

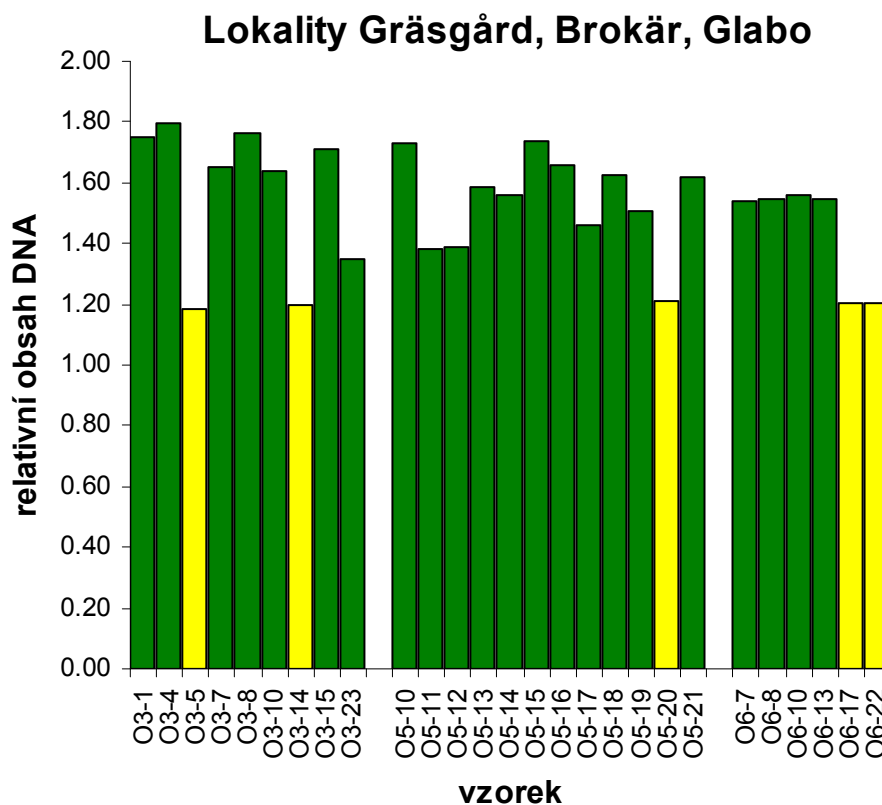


Obr. 12: Relativní obsah DNA jedinců z lokality Miocici

(B) Na třech lokalitách ze šesti na Ölandu (Gräsgård, Brokär a Glabo) bylo nalezeno 5 jedinců s velikostí genomu spadající mezi oba poddruhy *Eleocharis uniglumis*. Jejich relativní obsah DNA při měření se standardem *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* se pohyboval okolo 1,2 a.u., u ostatních byl v rozmezí 1,4–1,8 a.u. Získané hodnoty velikosti genomu z daných lokalit jsou stejně jako v předchozím případě zaneseny do tabulky, z níž byl vytvořen graf (tab. 10, obr. 13). Z lokality Brokär, která obsahovala největší počet analyzovaných vzorků, je zde pro zestručnění zahrnuta jen část z nich. Zajímaví jedinci jsou v tabulce i v grafu opět zvýrazněni žlutou barvou.

Tab. 10: Relativní obsah DNA jedinců  
z lokalit Gräsgård, Brokär a Glabo

| Vzorek | Relat. obsah<br>DNA [a.u.] |
|--------|----------------------------|
| O3-1   | 1.75                       |
| O3-4   | 1.80                       |
| O3-5   | 1.19                       |
| O3-7   | 1.65                       |
| O3-8   | 1.76                       |
| O3-10  | 1.64                       |
| O3-14  | 1.20                       |
| O3-15  | 1.71                       |
| O3-23  | 1.35                       |
| O5-10  | 1.73                       |
| O5-11  | 1.38                       |
| O5-12  | 1.39                       |
| O5-13  | 1.59                       |
| O5-14  | 1.56                       |
| O5-15  | 1.74                       |
| O5-16  | 1.66                       |
| O5-17  | 1.46                       |
| O5-18  | 1.63                       |
| O5-19  | 1.51                       |
| O5-20  | 1.21                       |
| O5-21  | 1.62                       |
| O6-7   | 1.54                       |
| O6-8   | 1.54                       |
| O6-10  | 1.56                       |
| O6-13  | 1.54                       |
| O6-17  | 1.20                       |
| O6-22  | 1.21                       |



Obr.13: Relativní obsah DNA jedinců z lokalit  
Gräsgård, Brokär a Glabo (zleva)

#### 4.1.2. Variabilita obsahu DNA mezi arely a mezi populacemi

Po dokončení měření na průtokovém cytometru byla vypočítána průměrná velikost genomu pro každou populaci, a to aritmetickým průměrem hodnot velikosti genomu všech jedinců z populace. Tyto průměrné hodnoty byly zaneseny do grafu a vzájemně porovnávány.

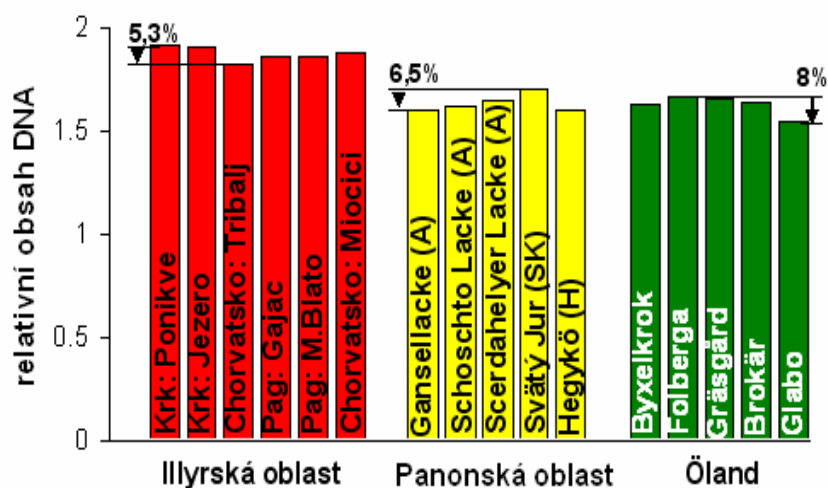
Variabilita v rámci jedné arely byla spočítána jako rozdíl nejvyšší a nejnižší velikosti genomu populace dělený 1% z nejnižší velikosti.

Prokázalo se, že velikost genomu u vzorků sebraných v Ilyrské oblasti je vyšší než v Panonii a na Ölandu (tab. 11, obr.14). Průměrný relativní obsah DNA celé Ilyrské oblasti je 1,9 a.u., zatímco v ostatních dvou areálech pouze 1,6 a.u.

Rozsah velikosti genomu mezi jednotlivými lokalitami se příliš nelišil. Největší rozptyl hodnot byl zaznamenán na Ölandských lokalitách (8%). V Panonii to bylo 6,5% a v Ilyrské oblasti 5,3% (obr.14).

Tab. 11: Průměrný relativní obsah DNA na lokalitách ve všech zkoumaných oblastech

| Lokalita | Relat. Obsah DNA [a.u.] |
|----------|-------------------------|
| E1       | 1.92                    |
| E2       | 1.90                    |
| E3       | 1.82                    |
| E4       | 1.86                    |
| E5       | 1.86                    |
| E6       | 1.88                    |
| PRŮMĚR   | 1.9                     |
| N1       | 1.60                    |
| N2       | 1.62                    |
| N3       | 1.65                    |
| S        | 1.71                    |
| N5       | 1.60                    |
| PRŮMĚR   | 1.6                     |
| O1       | 1.62                    |
| O2       | 1.67                    |
| O3       | 1.66                    |
| O5       | 1.64                    |
| O6       | 1.55                    |
| PRŮMĚR   | 1.6                     |



Obr. 14: Průměrný relativní obsah DNA na lokalitách a rozsah variability ve všech zkoumaných oblastech

#### 4.1.3. Variabilita obsahu DNA uvnitř populací

Hodnoty velikosti genomu všech jedinců naměřené na průtokovém cytometru byly zaneseny do grafu (obr. 15). Pořadí sběrů podél transektu bylo zachováno. Pro srovnání byly do grafu přidány hodnoty velikosti genomu *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* z ostrova Römö



v Dánsku. Rovněž jsou zde znázorněni jedinci s neobvyklými hodnotami velikosti genomu popsání v podkapitole 4.1.1.

Variabilita velikosti genomu v procentech na každé lokalitě byla vypočítána opět jako rozdíl nejvyšší a nejnižší hodnoty dělený 1% nejnižší hodnoty, přičemž do výpočtu nebyly zahrnuty odlehlé hodnoty jedinců se specifickou velikostí genomu (tab.12; 13; 14).

V Ilyrské oblasti se variabilita na lokalitách pohybovala mezi 11,9% a 42,1%, v Panonské oblasti mezi 6,1% a 28,6% a na Ölandu mezi 3,9% a 33,1%. Ukázalo se, že v porovnání se stabilním obsahem DNA *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* je mezi jedinci uvnitř populací *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* značná variabilita. Největší rozptyl hodnot ve studovaných populacích byl zjištěn na lokalitě Tribalj v Chorvatsku. Bylo to více než 42%. Naopak nejmenší rozptyl, pouze 3,9%, byl zjištěn u lokality Glabo na Ölandu. To je však dáno tím, že kromě neobvyklých jedinců se v sebraných vzorcích vyskytoval jen jeden cytotyp. Druhou lokalitou s nejmenším rozptylem hodnot (6,1%) bylo Scerdahelyer Lacke v Rakousku.

Tab. 12: Rozsah variability velikosti genomu v Ilyrské oblasti

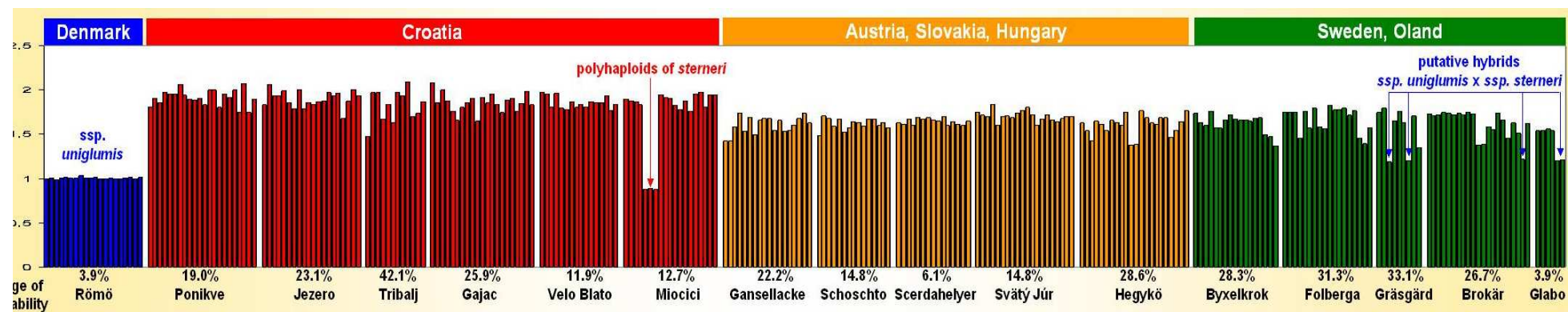
| <b>Ilyrská</b>     |         |        |         |       |         |         |
|--------------------|---------|--------|---------|-------|---------|---------|
| <b>oblast</b>      | Ponikve | Jezero | Tribalj | Gajac | M.Blato | Miocici |
| Rozsah variability | 19,0%   | 23,1%  | 42,1%   | 25,9% | 11,9%   | 12,7%   |

Tab. 13: Rozsah variability velikosti genomu v Panonské oblasti

| <b>Panonská</b>    |             | Schoschtö | Scerdahelyer | Svätý  |       |
|--------------------|-------------|-----------|--------------|--------|-------|
| <b>oblast</b>      | Gansellacke | Lacke     | Lacke        | Hegykö | Jur   |
| Rozsah variability | 22,2%       | 14,8%     | 6,1%         | 28,6%  | 14,8% |

Tab. 14: Rozsah variability velikosti genomu na Ölandu

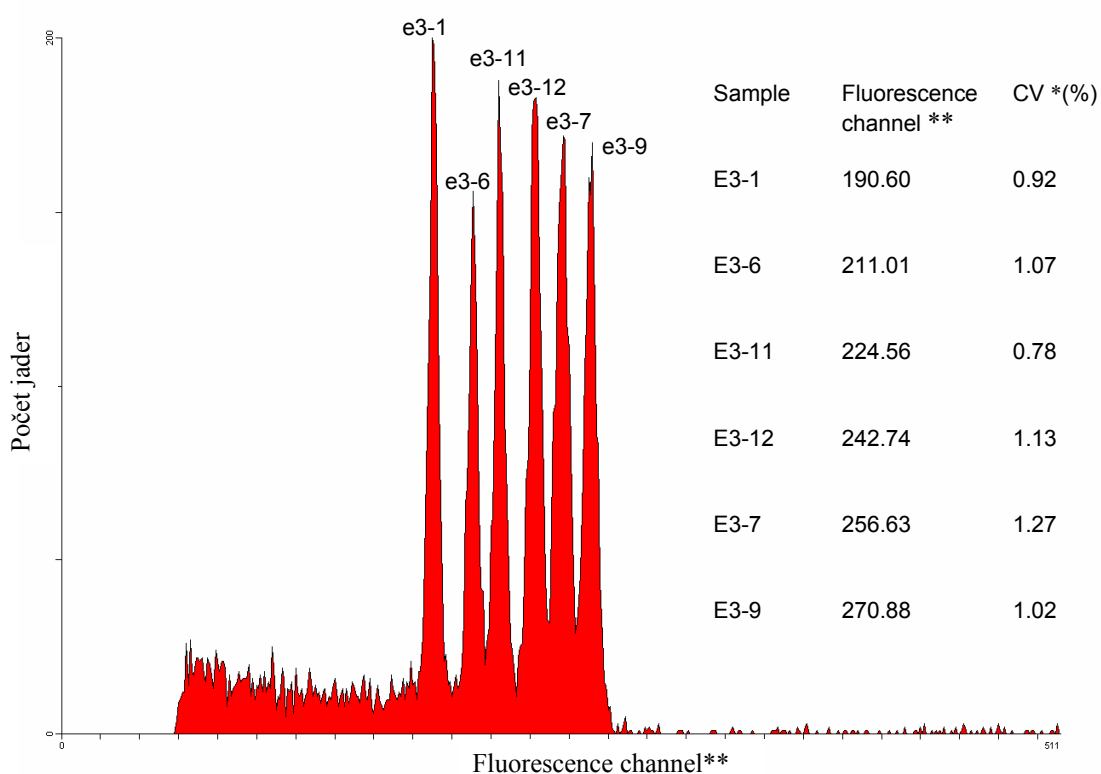
| <b>Öland</b>       |           |          |          |        |       |
|--------------------|-----------|----------|----------|--------|-------|
|                    | Byxelkrok | Folberga | Gräsgård | Brokär | Glabo |
| Rozsah variability | 28,3%     | 31,3%    | 33,1%    | 26,7%  | 3,9%  |



Obr. 15: Relativní obsah DNA všech analyzovaných vzorků; barevně jsou odlišeny jednotlivé oblasti; šipky označují specifické cytotypy

## 4.2. Potvrzení přítomnosti variability obsahu DNA mezi jedinci

Aby se prokázalo, že průtokovou cytometrií zjištěná vnitropopulační variabilita velikosti genomu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* není jen artefakt vzniklý chybou v metodice, přípravě materiálu a podobně, bylo zopakováno měření šesti vzorků z jedné lokality. Tentokrát se však neměřilo se standardem, ale všechny rostliny byly smíchány do jednoho vzorku a měřeny pohromadě. Výsledkem byl histogram se šesti dobře oddělenými píky (obr.16), který jasně ukazuje variabilitu velikosti genomu podél transektu v populacích a dokazuje, že nejsou variabilní pouze jednotlivá měření. Koeficient variance (CV) se pohyboval v rozmezí 0,92–1,78%.



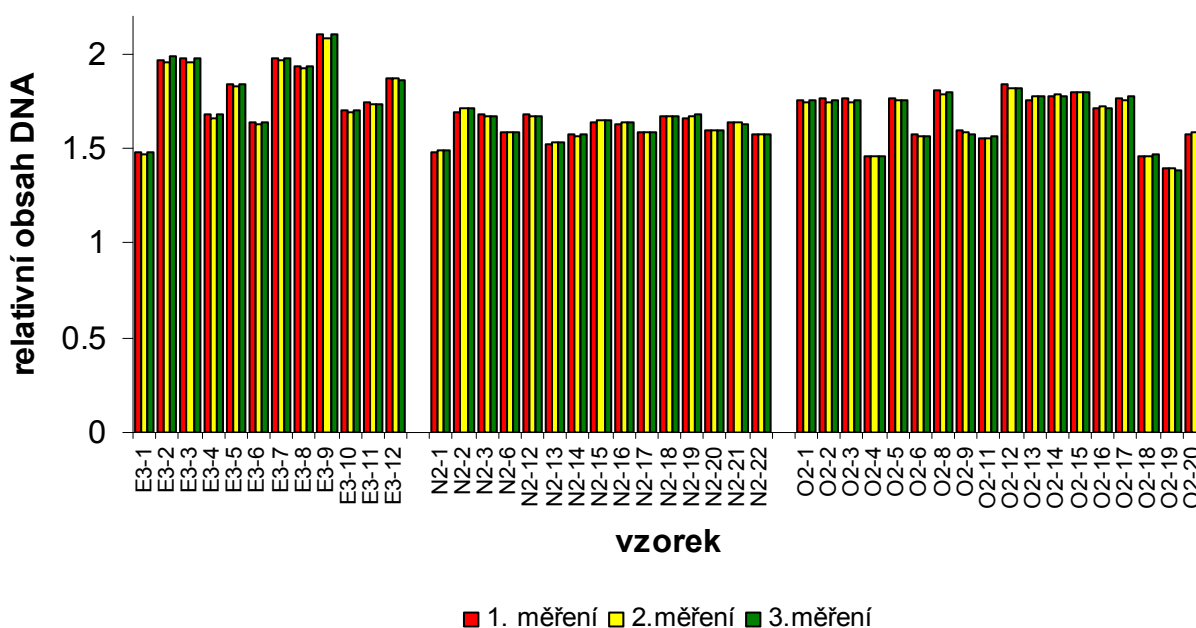
Obr. 16: Histogram šesti vzorků z lokality Tribalj v Chorvatsku měřených dohromady

\* CV (Koeficient variance): odráží přesnost měření. Čím je koeficient variance nižší, tím je měření přesnější

\*\* Fluorescence channel: jednotka intenzity fluorescence

Druhým důkazem potvrzujícím vnitrodruhovou variabilitu v rámci *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* je graf, ve kterém jsou zachyceny nejen rozdíly ve velikosti genomu mezi jednotlivými vzorky, ale také mezi třemi opakováními měření stejného vzorku (obr. 17). Je zde jasně vidět, že rozdíly mezi jedinci jsou mnohem větší, než kolísání hodnot při

opakovaném měření stejného jedince. Tento graf byl vytvořen pro celou sadu vzorků, pro zestručnění je zde vyňata pouze jeho část, ostatní části vypadají podobně.



Obr. 17: Relativní obsah DNA 3x měřených vzorků

### 4.3. Počet chromozomů versus velikost genomu

Možné příčiny vnitrodruhové variability velikosti genomu a počtu chromozomů u rostlin byly obecně popsány v kapitole 1. V případě *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*, z důvodu její náležitosti k čeledi *Cyperaceae*, je třeba rozhodnout, zda je tato variabilita způsobena klasickou aneuploidií, tedy meiotickými nondisjunkcemi (nepravidelným rozdělením chromozomů do gamet v průběhu meiozy), a nebo agmatoploidií, při níž vlivem difúzní centromery dochází v průběhu evoluce k fúzi a fragmentaci chromozomů. Agmatoploidie je v čeledi *Cyperaceae* velmi častá a i u druhů rodu *Eleocharis* byla prokázána (Håkanson 1958)

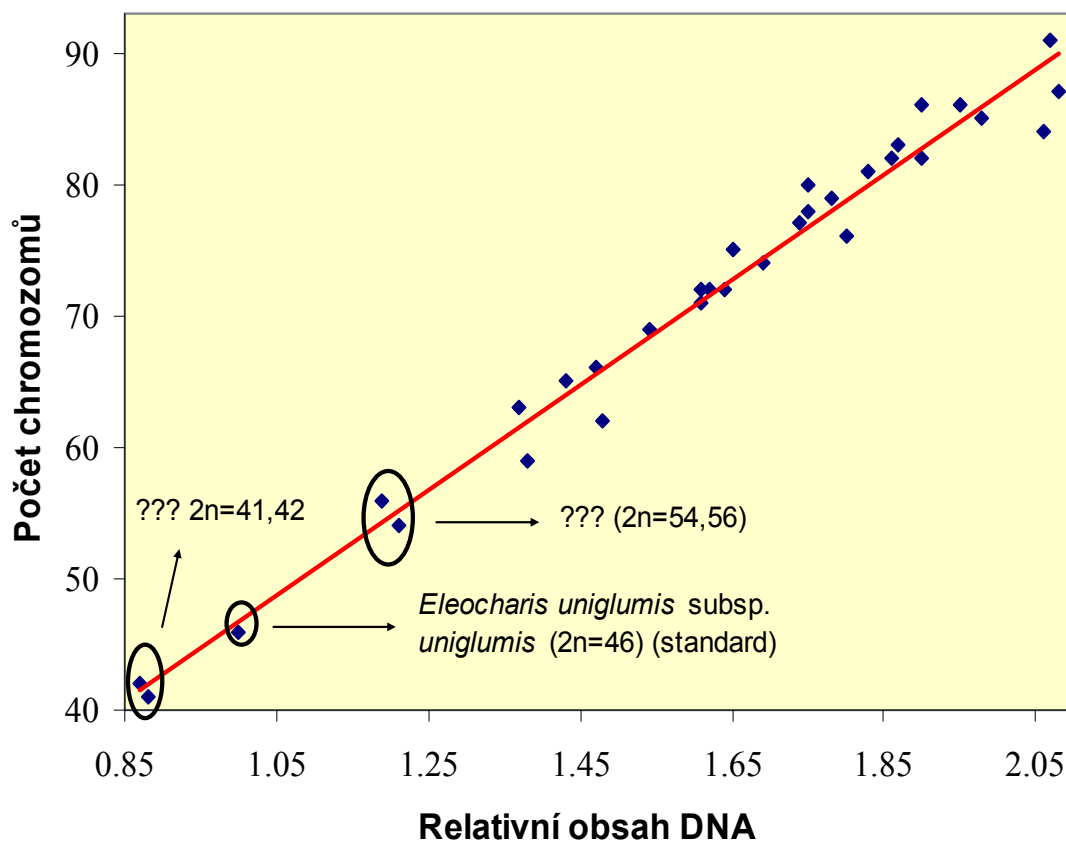
Pokud by příčinou vnitrodruhové variability u *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* byla klasická aneuploidie, docházelo by v důsledku meiotických nondisjunkcí ke změnám v celkovém počtu chromozomů jedinců a úměrně s tím i ke změně velikosti genomu. V případě

agmatoploidie by rozpad a splývání chromozomů způsobil sice změnu jejich celkového počtu, ale velikost genomu by zůstala stejná.

Proto byl pro rozhodnutí o vlivu popsaných procesů způsobujících vnitrodruhovou variabilitu velikosti genomu zjišťován počet chromozomů z buněk meristému v kořenových špičkách vybraných jedinců roztakovou karyologickou metodou, jejíž princip a postup je popsán v podkapitole 3.4. Výsledky byly následně porovnávány s relativním obsahem DNA stejných jedinců změřeným na průtokovém cytometru. Závislost byla graficky znázorněna (obr. 18)

Chromozomy byly také spočítány u několika již zmíněných jedinců s neobvyklou velikostí genomu. Dva ze specifických jedinců na Ölandu měli diploidní počet chromozomů 54 a 56 a dva zvláštní jedinci z Chorvatska měli 41 a 42 chromozomů. Pro srovnání byla zjištěna četnost chromozomů i u *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* jako standardu ( $2n=46$ ). Výsledné hodnoty byly do grafu rovněž zaneseny.

XY bodový graf ukázal mezi počtem chromozomů a relativním obsahem DNA lineární závislost.



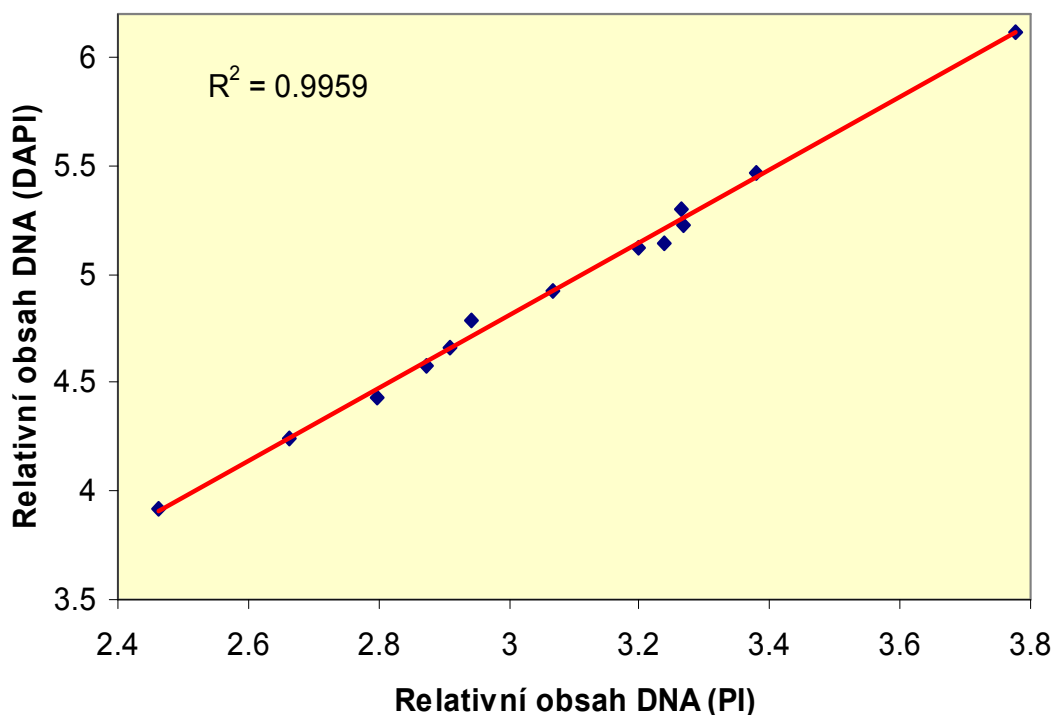
Obr. 18: Pozitivní korelace velikosti genomu a počtu chromozomů

#### 4.4. Sympatrický výskyt poddruhů *Eleocharis uniglumis*

Vzhledem k tomu, že v terénu prakticky nelze rozeznat jeden poddruh *Eleocharis uniglumis* od druhého, bylo ve vzorcích očekáváno kromě *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* zastoupení i typového poddruhu. Tento předpoklad se však naplnil jen na Ólandu a v Panonii. Zde skutečně byl ve vzorcích z většiny populací zastoupen větší či menší měrou i poddruh *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*. Jiná situace však byla v Ilyrské oblasti, kde mezi sebranými vzorky nebyl typový poddruh ani jeden.

#### 4.5. Barvivo DAPI nebo PI?

Protože propidium iodide (PI) je interkalačním barvivem (váže se na DNA mezi páry bází), lze s jeho pomocí zjistit absolutní velikost genomu. Je tedy jasné, že toto barvivo je vhodné pro zjišťování variability celkové velikosti genomu. Barvivo DAPI se však přednostně váže na AT báze v DNA, a tudíž jsme s jeho pomocí schopni zachytit pouze obsah AT bohatých oblastí DNA.



Obr. 19: Korelace relativního obsahu DNA měřeného s barvivem DAPI a PI

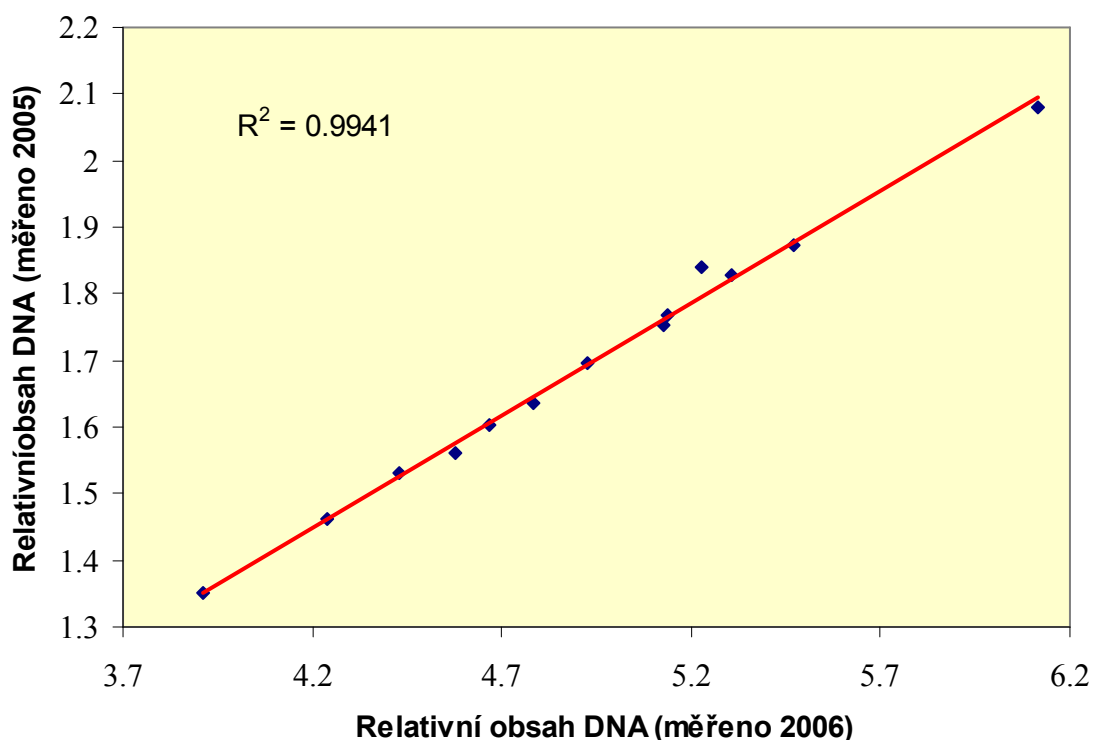
Porovnáním hodnot velikosti genomu třinácti vzorků, které byly v roce 2006 měřeny zároveň na průtokovém cytometru PA-1 (s barvivem DAPI) a Cy flow (s barvivem PI) postupem

popsaným v podkapitole 3.3.3, zjistíme, zda velikost genomu zachycená pomocí DAPI barviva koreluje s velikostí genomu zachycenou s barvivem PI.

Dosazením hodnot do grafu, kde na osu X jsou promítány výsledky měření na Cy flow a na osu Y výsledky z PA-1, jsme získali pozitivní korelaci (obr. 19) s vysokou hodnotou spolehlivosti.

## 4.6. Opakovatelnost měření

Vzhledem k častým metodickým chybám, kterých se dopouštějí někteří autoři při měření na průtokovém cytometru (viz úvod), byly provedeny tři kontrolní testy. První dva, dokazující přítomnost vnitrodruhové variability mezi jedinci *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*, jsou popsány v podkapitole 4.2 (obr. 16; 17). Třetím testem bylo zopakování měření průtokovou cytometrií třinácti vzorků zachovaných v trvalé kultuře. První měření proběhlo v roce 2005, druhé o rok později. Postup měření byl zachován v obou případech stejný, došlo však ke změně standardu. První rok byla použita *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*, v druhém roce *Zea mays*. Získané hodnoty spolu po dosazení do grafu silně pozitivně korelují (obr. 20).



Obr. 20: Relativní obsah DNA třinácti vzorků měřených v roce 2005 a znovu v roce 2006

## 5. Diskuse

Výzkum velikosti genomu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* zaměřený na odhalení přítomnosti vnitrodruhové variability začal na jaře roku 2005 sběrem vzorků ve třech známých areálech areálu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*. Těmito arealami, které shrnul Bureš v článku z roku 1998 pojednávajícím o rozšíření *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* ve střední a jihovýchodní Evropě, jsou Panonská oblast, především okolí Neziderského jezera, Ilyrská oblast, a to ostrovy Krk, Pag a jaderské pobřeží Chorvatska, a již dříve autorem Strandhede (1961) popsané izolované lokality na ostrovech Öland a Gotland v Baltském moři.

V létě v roce 2005, když byly vzorky ze všech vytyčených lokalit shromážděny a umístěny do prozatímní kultury ve sklenicích s vodou, začaly analýzy na průtokovém cytometru. V roce 2005 byl používán cytometr Partec PA-1 a fluorescenční AT selektivní barvivo DAPI. Zjišťovaný relativní obsah DNA vzorků v poměru ku standardu, jímž byla *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*, případně *Eleocharis palustris* (při měření vzorků *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*) měl odhalit rozsah variability velikosti genomu mezi vzorky.

Při vyhodnocování naměřených dat bylo na první pohled patrné, že mezi vzorky bylo několik jedinců, kteří se svou velikostí genomu naprosto vymykali předpokládaným hodnotám i naměřeným výsledkům ostatních vzorků.

(1) Na ostrově Öland byli nalezeni jedinci, jejichž velikost genomu spadala mezi oba poddruhy *Eleocharis uniglumis*.

Obvykle se měřený relativní obsah DNA *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* se standardem *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* pohyboval přibližně mezi 1,5–2 a.u. U pěti vzorků ze tří různých lokalit na Ölandu však tato hodnota kolísala jen okolo 1,2 a.u. Rozdíl od ostatních vzorků se ještě lépe projevil při počítání chromozomů roztlakovou karyologickou metodou. Diploidní počet chromozomů dvou z těchto vzorků, u kterých byla četnost zjišťována, byl 54 a 56, u ostatních analyzovaných jedinců byl v rozsahu 60–90 (literatura (Bureš 1999) uvádí rozmezí počtu chromozomů *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*  $2n=(70-74-88)$ ). Typový poddruh má v diploidním stavu 46 chromozomů. Pět specifických vzorků z Ölandu je tedy velikostí genomu i počtem chromozomů větší než *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*, ale menší než *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*. Graf uvedený ve výsledcích v podkapitole 4.3, který znázorňuje vztah počtu chromozomů s velikostí genomu dokonce ukazuje, že hodnoty těchto zvláštních jedinců leží přibližně v polovině mezi hodnotou *Eleocharis uniglumis* subsp.



*uniglumis* a nejnižšími hodnotami *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* (obr. 18). Z tohoto poznatku můžeme usuzovat, že na lokalitách na Ölandu dochází k hybridizaci mezi oběma poddruhy *Eleocharis uniglumis*. V populacích z Panonské oblasti, kde se typový poddruh rovněž vyskytoval, žádní podobní jedinci nebyli nalezeni.

(2) V jedné z Chorvatských populací byli nalezeni jedinci s polovičním genomem než je běžné u *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*.

Na lokalitě MIOCICI v Chorvatsku byli nalezeni tři jedinci, jejichž genom byl menší než genom běžných rostlin *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* a dokonce menší než genom *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*. Při měření na průtokovém cytometru se standardem *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* se relativní obsah DNA těchto vzorků pohyboval okolo 0,88 a.u., zatímco u ostatních jedinců z lokality byl mezi 1,75–1,95 a.u. Tento fakt byl potvrzen i počtem chromozomů. Specifičtí jedinci měli diploidní počet chromozomů 41 a 42. To je přibližně polovina počtu chromozomů *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* uváděného v literatuře ( $2n=74-88$ ). Poloha těchto jedinců vůči ostatním vzorkům je znázorněna v grafu v podkapitole 4.3 (obr. 18).

Příčinou vzniku jedinců s polovičním počtem chromozomů než je obvyklé u *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* může být takzvaná polyhaploidie. Jedná se o reversní proces, kdy u polyploidního jedince dojde k haploidizaci. Polyhaploidie bývá důsledkem partenogenetického rozmnožování redukováných vaječných buněk, které vede ke vzniku rostlin s nižší ploidní úrovní než mají rostliny původní (Bicknell et Koltunow 2004). Polyhaploidní jedinci bývají oproti polyploidům mnohem méně životaschopní. Často se u nich vyskytuje nízká viabilita pylu a fertilita semen, mají redukováný růst, sníženou reprodukci a schopnost přežívání. Častá je ne schopnost párování chromozomů (Ramsey et Schemske 2002). Dle mého názoru se tyto vlastnosti projeví i u námi získaných rostlin, které se špatně vyrovnávaly se stresem způsobeným převozem a přesazováním a v prozatímní kultuře se jim nedařilo. Pro trvalou kulturu se nepodařilo uchovat ani jeden jejich vzorek.

Dále byla při hodnocení výsledků věnována pozornost variabilitě velikosti genomu mezi jednotlivými arely *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* a mezi populacemi v rámci arel. Byly vypočítány průměrné hodnoty velikosti genomu každé lokality a z těchto průměrů byla stanovena procentuální variabilita dané arely. Dále byly tyto hodnoty porovnány graficky (obr.14). Variabilita velikosti genomu z Ilyrské oblasti byla nejmenší, bylo to 5,3%. V Panonii byl rozsah hodnot 6,5% a na Ölandských lokalitách 8%. Rozptyl hodnot relativního obsahu DNA mezi populacemi v rámci jedné studované oblasti se tedy v oblastech příliš neliší.

Zajímavějším poznatkem vyplívajícím z grafu znázorněném v podkapitole 4.1.2 bylo, že hodnoty relativního obsahu DNA v Ilyrské oblasti byly vyšší (průměrná hodnota celé oblasti se standardem *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* byla 1,9 a.u.) než v Panonii a na Ölandu, kde se pohybovaly přibližně v podobném rozmezí (průměrná hodnota byla v obou případech 1,6 a.u.) (obr.14). Tato skutečnost dobře koreluje s výskytem typového poddruhu. Sympatrický výskyt obou poddruhů byl totiž prokázán jen na lokalitách v Panonské oblasti na ostrově Öland. Při sběru materiálu nebyl vzhledem k malým morfologickým rozdílům brán zřetel na rozlišování poddruhů *Eleocharis uniglumis*. K jejich determinaci na poddruhovou úroveň došlo až s použitím cytometrie. Přes stejnou metodiku sběru ve všech třech oblastech, byl v populacích na Ölandu a v Panonii ve větší či menší míře mezi vzorky zastoupen typový poddruh, zatímco na lokalitách v Ilyrské oblasti se jedinec *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* nenašel ani jeden. Z toho vyplývá, že v oblastech se sympatrickým výskytem *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* mají rostliny *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* menší genom než v populacích alopatrických, což může být důsledkem hybridizace, ke které mezi poddruhy dochází.

Nejnižší úroveň, na které byla vnitrodruhová variabilita velikosti genomu studována byla variabilita vnitropopulační. Zde byl vytvořen graf, kde byly srovnávány všechny naměřené hodnoty, včetně hodnot *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* získaných z ostrova Römö v Dánsku. Ty byly použity pro zvýraznění rozdílu mezi variabilitou velikosti genomu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* a stabilitou *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* (obr. 15). Pro každou lokalitu byl vypočítán procentuální rozsah variability. Nejvyšší variabilita, více než 42%, byla zjištěna v Chorvatské populaci Tribalj. Nejnižší, 6,1%, byla u Neziderského jezera na lokalitě Scerdahelyer Lacke. Ještě nižší rozsah variability byl na Ölandu v populaci Glabo. Bylo to jen 3,9%. Mezi vzorky však bylo velké množství jedinců *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*. Ve zbylých vzorcích *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* byly zastoupeny pouze dva cytotypy. Variabilita uvnitř Dánské populace *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis* byla také necelá čtyři procenta. Ve zmíněném grafu v podkapitole 4.1.3 je dobře vidět kolísání velikosti genomu mezi vzorky v jednotlivých populacích. Je zde zachováno pořadí, v jakém byly vzorky sbírány, aby byl zachycen případný gradient velikosti genomu podél transektu. Žádný takový gradient však nebyl pozorován, rozmístění jednotlivých cytotypů se zdá být zcela náhodné. Zároveň je však z tohoto uspořádání patrné, že ačkoli minimální vzdálenosti při sběru vzorků byly „pouze“ pět metrů, tato vzdálenost byla dostačující pro to, abychom se vyhnuli sběru klonálních jedinců. Tento fakt v případě *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* nepodporuje teorii Walterse (1980) o vegetativním původu populací z jediného generativně vzniklého jedince.

Dalším krokem při studiu genetického obsahu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* bylo počítání chromozomů přibližně třiceti vzorků roztakovou karyologickou metodou. Získaný diploidní počet chromozomů se pohyboval v rozmezí 60–90 (do tohoto rozsahu nejsou započítány specifické vzorky popsané výše). Tato zjištěná variabilita je ještě větší než je popisováno v literatuře. Bureš (1999) uvádí pro *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* hodnoty  $2n=(70-74-88)$ .

Příčina vnitrodruhové variability velikosti genomu a počtu chromozomů *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* byla zjišťována porovnáním počtu chromozomů a velikosti genomu. Předběžně byly stanoveny dvě možné příčiny této variability.

(1) Aneuploidie, při níž v průběhu meiozy dochází k nepravidelnému rozdělení chromozomů do gamet, nebo-li k tzv. meiotickým nondisjunkcím. Tím pádem se v nově vzniklých jedincích změni celkový počet chromozomů a zároveň se změni jejich velikost genomu.

(2) Agmatoploidie. V čeledi *Cyperaceae* je to velmi častý jev potvrzený i u rodu *Eleocharis*. Její princip byl popsán v úvodu. V důsledku agmatoploidie dochází k fragmenatci nebo splývání jednotlivých chromozomů. To znamená, že ačkoli při počítání chromozomů zjistíme změny v jejich celkovém počtu, žádná část genomu se nikam neztrácí ani nikde nepřibývá a jeho celková velikost se nemění.

Kuta (2004) uvádí ještě jako příčinu vnitrodruhové variability DNA obsahu aneusomacii. Její přítomnost však našim výzkumem nebylo možno potvrdit ani vyvrátit.

Graf závislosti chromozomového počtu a relativního obsahu DNA (obr. 18) ukázal lineární korelaci. Z tohoto důvodu můžeme agmatoploidii, jako příčinu vnitrodruhové variability *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* vyloučit a potvrdit, že její původ je zapříčiněn klasickou aneuploidii.

Abychom zabránili případným pochybnostem o spolehlivosti měření pomocí průtokového cytometru, neboť optimalizace této metody je poměrně obtížná, a potvrdili nalezenou variabilitu mezi vzorky, bylo provedeno několik testů.

(1) V roce 2005 bylo vybráno šest různých jedinců z jedné lokality, kteří byli společně měření na průtokovém cytometru. Výsledkem byl histogram, ukazující šest dobře oddělených, nepřekrývajících se píků, jejichž poloha jasně ukazuje, že relativní obsah DNA každého vzorku je jiný. Tento graf je znázorněn v podkapitole 4.2 (obr. 16) a jeho součástí jsou kromě hodnot Fluorescence channel, které určují polohu píku na ose x i hodnoty koeficientu variance (CV), které udávají přesnost měření. Pokud je hodnota CV menší než tři, můžeme měření považovat za přesné. V tomto případě se koeficient variance pohyboval kolem 1, což je velmi dobrý výsledek, potvrzující velice přesné měření.

(2) Druhým testem provedeným s použitím výsledků měření průtokovou cytometrií v roce 2005 bylo grafické porovnání výsledků měření mezi jednotlivými vzorky a mezi třemi opakováními měření jednoho a téhož vzorku. Graf je rovněž v podkapitole 4.2 (obr. 17) a dokazuje, že rozdíly mezi třemi měřeními jednoho vzorku jsou mnohem menší, téměř zanedbatelné, než rozdíly mezi vzorky. Můžeme tedy říci, že výsledky měření na cytometru nekolísaly z důvodu chyby v metodice, ale z důvodu rozdílného obsahu DNA mezi jedinci.

(3) V průběhu roku 2006 byla znovu měřena část vzorků průtokovou cytometrií, tentokrát však na dvou různých přístrojích s použitím různých fluorochromů. Jednou s AT specifickým barvivem DAPI, jako v roce 2005, a podruhé s interkalačním barvivem propidium jodide (PI). Propidium jodide je, díky tomu, že se váže mezi páry bází DNA, využíváno pro zjištění absolutního množství DNA v jádře a lze s jeho pomocí také stanovit variabilitu celkové velikosti genomu. S barvivem DAPI, které se přednostně váže na AT páry bází zjistíme pouze velikost genomu oblastí bohatých na AT páry bází. Proto je nutné zjistit, zda variabilita, která se ukázala při měření s DAPI je korelovatelná s variabilitou velikosti celého genomu. Za tímto účelem byly porovnávány výsledky měření z obou přístrojů, kdy jedna rostlina byla měřena na obou přístrojích současně. Graf s výslednými hodnotami uvedený v podkapitole 4.5 (obr. 19) ukazuje, že vztah mezi vzorky měřenými s barvivem PI a s barvivem DAPI je lineární. Znamená to tedy, že barvivo DAPI stejně jako PI odráží celkovou variabilitu velikosti jaderného genomu a lze ho tedy pro analýzy tohoto typu využít stejně dobře jako PI.

(4) Cílem posledního kontrolního testu bylo dokázat, že měření na průtokovém cytometru jsou opakovatelná, a to i v dlouhém časovém rozmezí. Z analýz z roku 2005 byly vyňaty výsledky relativního obsahu DNA vzorků, které byly zachovány v trvalé kultuře pro další zpracování a byly porovnány s hodnotami, které byly u těchto vzorků získány měřením na průtokovém cytometru o rok později. Měření bylo prováděno stejným postupem, lišilo se pouze ve zvoleném standardu. V roce 2005 byla použita *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*, v roce 2006 *Zea mays*. Získané hodnoty byly korelovány v grafu v podkapitole 4.6 (obr. 20). Výsledek přesvědčivě, s vysokým stupněm spolehlivosti, prokázal lineární vztah mezi hodnotami a tedy potvrdil opakovatelnost měření.

Původ taxonu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*, dle literatury (Bureš 1999), spočívá v autopolyploidizaci typového poddruhu s následným vznikem aneuploidních jedinců. Na příkladu jiných rostlinných druhů je však ukázáno, že podobní aneuploidie jako jsou u *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* mohou vznikat i v důsledku hybridizace dvou druhů. Např. v rodu *Reynoutria*, kde došlo ke křížení dvou u nás invadovaných druhů. *Reynoutria japonica*, která k nám byla zavlečena jako první, a pouze její samičí rostliny, se původně šířila jen vegetativně.

Po zavlečení jiného druhu, *Reynoutria sachaliensis*, došlo k mezidruhovému křížení za vzniku hybridu *Reynoutria ×bohemica*. Díky neúplné kompatibilitě genomu nebyl nově vzniklý kříženec schopen reprodukce, a proto polyploidizoval. Následně došlo k tvorbě mnoha aneuploidních cytotypů a dobré adaptaci na místní podmínky (Mandák et al. 2003; 2005).

Je tedy možné, že stejným způsobem vznikla i *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*? Že její původ ve skutečnosti není autopolyploidní, ale alopolyloidní? Pokud ano, tak které druhy jsou rodičovské? To jsou otázky, na které zatím nedokážeme odpovědět.

## 6. Závěr

Hlavními cíli diplomové práce bylo (1) zjistit existenci vnitrodruhové variability velikosti genomu a počtu chromozomů uvnitř taxonu *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*, (2) zjistit její příčiny a (3) prověřit vztah mezi výskytem *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* a *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*.

Existence vnitrodruhové variability v obsahu DNA byla prokázána, a to na všech studovaných úrovních – mezi arely, mezi populacemi i mezi jedinci v populaci. Jako příčina této variability byla vzhledem k lineární korelaci mezi počtem chromozomů a velikostí genomu stanovena aneuploidie (ne agmatoploidie).

Při analýze obsahu DNA byl prokázán sympatrický výskyt obou poddruhů *Eleocharis uniglumis* ve zkoumaných populacích na Ölandu a v Panonii, zatímco populace v Chorvatsku a na ostrovech Krk a Pag byly alopatrické. V alopatrických populacích byl zjištěn signifikantně větší genom než v populacích sympatrických.

Na Ölandu byli objeveni jedinci, jejichž velikost genomu spadala mezi obvyklé hodnoty *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii* a *Eleocharis uniglumis* subsp. *uniglumis*, což nasvědčuje tomu, že zde pravděpodobně dochází k hybridizaci mezi oběma poddruhy. Dále byly v populacích v Chorvatsku nalezeny jedinci s genomem přibližně polovičním, než je obvyklé pro *Eleocharis uniglumis* subsp. *sternerii*, což ukazuje na haploidizaci polyploidů.

Posledním, ne však nejméně důležitým, cílem práce bylo potvrdit získané výsledky. (1) Lineární korelací mezi hodnotami velikosti genomu získanými na cytometru s DAPI a na cytometru s propidium iodidem bylo prokázáno, že barvivo DAPI je pro studium variability v DNA obsahu stejně vhodné jako barvivo PI. (2) Lineární vztah mezi hodnotami velikosti genomu naměřenými v roce 2005 a mezi hodnotami týchž jedinců zjištěnými o rok později prokázal opakovatelnost měření průtokovou cytometrií i v delším časovém rozmezí.

## Literatura

- BENNETT M. D., LEITCH I. J. 2003:** Plant DNA C-values database (release 2.0, Jan 2003).  
<http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>
- BICKNELL R. A., KOLTUNOW A. M. 2004:** Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell* 16: 228–245.
- BRIGGS D., WALTERS S. M. 2001:** *Proměnlivost a evoluce rostlin*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- BUREŠ P. 1998:** A high polyploid *Eleocharis uniglumis* s.l. (Cyperaceae) from Central and Southeastern Europe. *Folia Geobotanica* 33: 429–439.
- BUREŠ P. 1999:** *Eleocharis R. Br. Subser. Eleocharis: Biosystematická studie středoevropských taxonů se zvláštním zřetelem k území České Republiky*. Ms. [Disert. Pr., dep. Masarykova Univerzita, Brno].
- BUREŠ P. 2002:** rod *Eleocharis* In: Kubát K. (ed.), *Klíč ke květeně České Republiky*, Academia, Praha.
- BUREŠ P. 2003:** *Taxonomie a chorologie vybraných taxonů evropské květeny*. Ms. [Habil. Pr., dep. Masarykova Univerzita, Brno].
- BUREŠ P., WANG Y., HOROVÁ L., SUDA J. 2004:** Genome size variation in central european species of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids. *Annals of botany* 94/3: 353–363.
- CASTRO D., NORONHA-WAGNER M., CAMERA A. 1954:** Two X-ray induced translocation in *Luzula purpurea*. *Genetica Iberica* 6: 3–18.
- CROSSLAND-TAYLOR P.J. 1953:** A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluid through a Tube. *Nature* 171: 37–38.
- DOLEŽEL J. 1991:** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemistry 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., GÖHDE W. 1995:** Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19: 103–106.
- DYER A. F. 1963:** The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods for chromosome preparations. *Stain technology, Geneva & New York* 38: 85–90.

- 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.
- GONZÁLEZ–ELIZONDO M. S., PETERSON P. M. 1997:** A classification of and key to the supraspecific taxa in *Eleocharis*. *Taxon* 46: 433–449. [cit. sec. Yano et al. 2004 ]
- GRAHAM MJ., NICKELL CD., RYBURN AL. 1994:** Relationship between genome size and maturity group in soybean. *Theoretical and Applied genetics* 88: 429–432.
- GREILHUBER J. 1998:** Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 27–35.
- GREILHUBER J. 2005:** Intraspecific variation in genome size in Angiosperms: Identifying its existence.. *Annals of Botany* 95: 91–98.
- GREILHUBER J., BORSCH T., MÜLLER K., WORBERG A., POREMBSKI S., BARTHLOTT W. 2006:** Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae, with Chromosomes of Bacterial Size. *Plant biology* 8: 770–777.
- GREILHUBER J., OBERMAYER R. 1997:** Genome size and maturity group in *Glycine max* (soybean). *Heredity* 78:547.–551.
- GRIME J. P., HODGSON J. G., HUNT R. 1988:** *Comparative plant ecology*. Unwin Hyman, London, Boston, Sydney et Wellington.
- HÅKANSSON A. 1958:** Holocentric chromosomes in *Eleocharis*. *Hereditas* 44: 531–540.
- HELLER F. O. 1973:** DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometric . *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86: 437–441.[cit. sec. Suda 2004 ]
- HOSHINO T. 1981:** Karyomorphological and cytological studies on aneuploidy in *Carex*. *Journal of Science, Hiroshima University, series B Div 2* 17: 155–238.
- HOSHINO T. 1992:** Cytogeographical study of four aneuploids of *Carex oxyandra* Kudo in Japan. *Botanical Magazine, Tokyo* 105: 639–648.
- HOSHINO T., AOSAKI K., ONIMATSU A. 1993:** Cytological studies of *Carex stenostachys* (Cyperaceae) with special references to meiotic configuration of intraspecific aneuploids. *La Kromosomo* II: 71–72.
- HOSHINOT., WATERWAY MJ. 1994:** Cytogeography and meiotic chromosome configuration of six aneuploids of *Carex conica* Boot (Cyperaceae) in Japan. *Journal of Plant Research* 107: 131–138.
- IPSER J. 2006:** *Genetika*. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Ústí nad Labem.



- KING M. 1993:** Species evolution, the role of chromosome change. *Cambridge: Cambridge University Press.*
- KUBÁT K. 2006:** *Fylogeneze a systém vyšších rostlin.* Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Ústí nad Labem.
- KUTA E., BOHANEK B., DUBAS E., VIŽINTIN L., PRZYWARA L. 2004:** Chromosome and nuclear DNA study on *Luzula* – a genus with holokinetic chromosomes. *Genome* 47: 246–256.
- MANDÁK B., BÍMOVÁ K., PYŠEK P., ŠTĚPÁNEK J., PLAČKOVÁ I. 2005:** Isoenzyme diversity in *Reynoutria* (Polygonaceae) taxa: escape from sterility by hybridization. *Plant systematics and evolution* 253: 219–230.
- MANDÁK B., PYŠEK P., LYSÁK M., SUDA J., KRAHULCOVÁ A., BÍMOVÁ K. 2003:** Variation in DNA–ploidy levels of *Reynoutria* taxa in the Czech republic. *Annals of botany* 92: 265–272.
- MOWFORTH M. A., GRIME J. P. 1989:** Intra-population variation in nuclear DNA content, cell size and growth rate in *Poa annua* L. *Functional ecology* 3: 289–295.
- NISHIKAWA K., FURUTA Y., ISHITOBI K. 1984:** Chromosomal evolution in genus *Carex* as viewed from nuclear DNA content, with special reference to its aneuploidy. *Japanese Journal of Genetics* 59: 465–472.
- OHKAWA T., YOKOTA M., HOSHINO T. 2000:** Aneuploidal population differentiation in *Carex sociata* Boot (Cyperaceae) of the Ryukyu Islands, Japan. *Botanical Journal of the Linnean Society* 132: 337–358.
- OHRI D. 1998:** Genome size variation and plant systematics. *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 75–83.
- OTTO F. 1990:** DAPI staining of fixed cells for high–resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Doležel J., Bartoš J. 2005: Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99–110.
- OTTO F., TSOU K.C. 1985:** A comparative study of DAPI, DIPI and Hoechst 33258 and 33342 as chromosomal DNA stains. *Stain Technology* 60: 7–11.
- PRICE HJ., CHAMBERS KL., BACHMANN K. 1981a:** Genome size variation in diploid *Microseris bigelovii* (Asteraceae). *Botanical Gazette* 142: 156–159.
- PRICE HJ., CHAMBERS KL., BACHMANN K. 1981b:** Geographic and ecological distribution of genomic DNA content in *Microseris douglasii* (Asteraceae). *Botanical Gazette* 142: 415–429.
- RIDLEY H. N. 1930:** *The Dispersal of Plants Through the World.* L. Reeve & Co., Ashford.

- SHAPIRO H.M. 1995:** *Practical flow cytometry*. 3<sup>rd</sup> ed–Wiley–Liss/ John Wiley and sons,Inc., New York
- SINGH K. P., RAINA S. N., SINGH A. K. 1996:** Variation in chromosomal DNA associated with the evolution of *Arachis* species. *Genome* 39: 890–897.
- STERNER R. 1938:** Flora der Insel Öland. *Acta phytogeographica suecica* 9: 1–169.
- STRANDHEDE S. O. 1961:** *Eleocharis palustres* in Scandinavia and Finland. Taxonomical units within the area. *Botaniska. Notiser* 114: 417–439.
- STRANDHEDE S. O. 1965:** Chromosome studies in *Eleocharis* subser. *Palustres*. III. Observatio on Western European taxa. *Opera Bot.* 9/2: 1–86.
- STRANDHEDE S. O. 1966:** Morfologic variation and taxonomy in European *Eleocharis* subser. *Palustres*. *Opera Bot.* 10/2: 1–187.
- STRANDHEDE S. O., DAHLGREN R. 1968:** Drawings of Scandinavian plants; *Eleocharis* R. Br. *Botanical notiser* 121.
- SUDA J. 2004:** *An employment of flow cytometry into plant biosystematics*. PhD. Disert., Univerzita Karlova, Praha.
- SVENSON H. K. 1939:** Monographic studies in the Genus *Eleocharis*. *Rhodora* 41: 3–19; 95–104. [cit. sec. Yano et al. 2004 ].
- ŠMARDA P., BUREŠ P. 2006:** Intraspecific DNA content variability in *Festuca pallens* on different geographical scales and ploidy levels. *Annals of botany* 98: 665–678.
- TEMSCH E. M., GREILHUBER J. 2000:** Genome size variation in *Arachis hypogea* and *A. monticola* re-evaluted. *Genome* 43: 449–451.
- WALTERS S. M. 1980:** *Eleocharis* R.Br. In: TUNIN T.G. et al. (eds.): *Flora europea* 5. Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne et Sydney.
- WENDEL J. F. 2000:** Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225 –249.
- YANO O., KATSUYAMA T., TSUBOTA H. 2004:** Molecular phylogeny of Japanese *Eleocharis* (*Cyperaceae*) based on ITS sequence data, and chromosomal evolution. *Journal of Plant Research* 117: 409–419.
- www 1:** [http://www.ueb.cas.cz/Olomouc1/LabDol/Research/labdol\\_research.htm](http://www.ueb.cas.cz/Olomouc1/LabDol/Research/labdol_research.htm)
- www 2:**  
[http://www.ueb.cas.cz/Olomouc1/LabDol/Research/Flow\\_cytometry/Protocols/Reagents\\_and\\_solutions.htm](http://www.ueb.cas.cz/Olomouc1/LabDol/Research/Flow_cytometry/Protocols/Reagents_and_solutions.htm)
- www 3:** <http://www.partec.de/partec/flowcytometry.html>
- www 4:** <http://www.nal.usda.gov/pgdic/Probe/v5n1/dev.html>

