

**BP**

3/2008

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra botaniky**



Bakalářská práce

Problematika okruhu *Anthoxanthum odoratum* v Evropě

Zuzana Khodlová

2008

Školitel: Mgr., Ing. Pavel Trávníček

## Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce shrnuje současné poznatky o nejrozšířenějším evropském zástupci rodu *Anthoxanthum* L.– tomka (čeleď *Poaceae*), jehož taxonomické pojetí je poměrně složité a nejednotné. Je jím polyploidní komplex *Anthoxanthum odoratum* s. l. (tomka vonná), skládající se ze dvou druhů - *A. odoratum* L. a *A. alpinum* Á. & D. LOVE. První z nich je druh většinou tetraploidní, široce rozšířen po celé Evropě s přesahy do Severní i Jižní Ameriky, Východní Aise, severní Afriky a Austrálie. Druh *A. alpinum* je vázán zejména na území severní Evropy a horské systémy střední a jižní Evropy. U tohoto druhu jsou známy jak diploidní, tak tetraploidní rostliny. Otázka původu tetraploidů je uspokojivě dokázána, neboť jak studium karyologie, tak i enzymatických systémů potvrzuje autopolyploidní původ rostlin.

Literární rešerše v první části mé práce pojednává o vývoji taxonomického hodnocení diploidního cytotypu *A. alpinum*. Dále jsou zde popsány čtyři různé karyotypy rodu *Anthoxanthum odoratum* s. l., jejich rozšíření, možnosti původu rostlin a jejich migrace po Evropě.

Z okruhu populační biologie popisují rozdíly mezi *A. odoratum* a *A. alpinum* a možnosti výměny genů mezi populacemi *A. odoratum* L. s. lat.

V práci jsou uvedeny předpokládané teorie vzniku tetraploidů druhu *Anthoxanthum odoratum* L., u něhož do současnosti nebylo objasněno, zda vznikly autopolyploidním či allopolyploidním způsobem.

V experimentální části se zabývám právě problematikou vzniku tetraploidního *Anthoxanthum odoratum* L. Prozatímni výsledky, jež byly dosaženy analýzou obsahu jaderné DNA pomocí průtokové cytometrie, se shodují s hypotézou jeho vzniku hybridizací mezi *A. alpinum* a jiným diploidním taxonem z jižní Evropy, tedy allopolyploidizací.

**Klíčová slova:** *Anthoxanthum odoratum* L., *A. alpinum* Á. & D. LOVE, polyploidní komplex, autopolyploidizace, allopolyploidizace, průtoková cytometrie

## Abstract

### Study of *Anthoxanthum odoratum* complex in Europe

Proposed Bc. Thesis summarizes the current knowledge of the most common European species of the genus *Anthoxanthum* L. (family *Poaceae*) - a taxonomically rather complicated and disunified polyploid complex *Anthoxanthum odoratum* s. l. consisting of *A. odoratum* L. and *A. alpinum* Á. & D. LOVE. The usually tetraploid *A. odoratum* L. is wide-spread across Europe and found in North and South America, East Asia, Northern Africa and Australia as well, whereas *A. alpinum* (both diploid and tetraploid) is typical for Northern Europe and montane areas of Middle and Southern Europe. The autopolyploid origin of tetraploid plants of *A. alpinum* is known and well documented by studies on cytology and enzymatic systems.

First part of the work (literature search) summarizes the history of taxonomical classification of diploid cytotype of *A. alpinum* and describes four different karyotypes of *Anthoxanthum odoratum* s. l., their distribution, origin and migration in Europe. Moreover, differences between *A. odoratum* and *A. alpinum* and possible genetic interchange among *A. odoratum* L. s. l. populations are discussed from the point of view of population biology. Theories of autopolyploid or allopolyploid origin of tetraploid *Anthoxanthum odoratum* L. species are summarized as well. The Experimental part deals with the question of tetraploid *Anthoxanthum odoratum* L. origin. The preliminary results obtained from the nuclear DNA content analysis by flow cytometry seem to confirm the accepted theory of allopolyploid origin of *A. odoratum* via hybridisation between two diploid ancestors – *A. alpinum* and another diploid taxon from Southern Europe.

**Keywords:** *Anthoxanthum odoratum* L., *A. alpinum* Á. & D. LOVE, polyploid complex, autopolyploidization, allopolyploidization, flow cytometry

## Poděkování

Děkuji především svému školiteli Mgr., Ing. Pavlu Trávníčkovi za vedení celé práce, jeho trpělivost a ochotu odpovídat na veškeré dotazy.

Dále děkuji N. Galland, G. Besnardovi a F. Felberovi ze Švýcarska za poskytnutí mnoha materiálů týkajících se rodu *Anthoxanthum*.

Mé poděkování patří též všem kolegům a kamarádům nejen z katedry botaniky, ať už za sběr rostlinného materiálu, tak za nejrůznější rady a pomoc při psaní bakalářské práce.

Za všeobecnou pomoc a podporu děkuji své rodině.

Experimentální část práce byla financována z prostředků grantu GA UK 145/2006.

# Obsah

1. Předmluva.....	2
2. Teoretická část.....	3
2.1 Úvod.....	3
2.2 Popis rostlin z území ČR.....	4
2.3 Karyologické poznatky.....	5
2.3.1 Karyotypy diploidního cytotypu .....	6
2.3.2 Karyotypy tetraploidního cytotypu .....	7
2.4 Vývoj taxonomického hodnocení diploidního cytotypu.....	8
2.5 Průběh meiózy .....	9
2.6 Teorie vzniku tetraploidů .....	10
2.6.1 Autopolyploidizace.....	10
2.6.2 Allopolyploidizace.....	10
2.6.3 Hybridizační experimenty.....	11
2.7 Rozšíření jednotlivých karyotypů.....	12
2.8 Původ druhů.....	13
2.9 Populační biologie.....	15
2.9.1 Rozdíly mezi <i>A. odoratum</i> a <i>A. alpinum</i> .....	15
2.9.2 Výměna genů mezi populacemi <i>A. odoratum</i> L. s. Lat.....	16
2.10 Shrnutí.....	17
3. Experimentální část .....	18
3.1 Úvod.....	18
3.2 Metodika.....	18
3.2.1 Terénní práce.....	18
3.2.2 Odběr materiálu .....	19
3.2.3 Stanovení velikosti genomu .....	19
3.2.4 Karyologické analýzy .....	19
3.2.5 Molekulární analýzy.....	20
3.3 Výsledky a diskuze.....	20
3.3.1 Práce v terénu a odběr materiálu.....	20
3.3.2 Stanovení velikosti genomu a ploidní úrovně.....	22
4. Závěr.....	23
5. Použitá literatura.....	24

## 1. Předmluva

V bakalářské práci jsem se zabývala, jak z názvu vyplývá, problematikou okruhu *Anthoxanthum odoratum*. Jejím cílem bylo především seznámit se s dostupnou literaturou, následně pak údaje utřídit a porovnat. Již od 40. let 20. století, kdy bylo zjištěno, že se *Anthoxanthum odoratum* L. s. l. rozpadá na diploidní *Anthoxanthum alpinum* Á. & D. Löve a tetraploidní *Anthoxanthum odoratum* L. s. str., byly oba typy velmi rozmanitě hodnoceny, od druhu po typy bez větší taxonomické hodnoty. Vzhledem k pozdějšímu objevení dalších dvou cytotypů se situace týkající se tohoto polyploidního komplexu stala složitější, a do dnešní doby není vyřešená. Údaje od různých autorů se značně liší.

Doufám, že v mé diplomové práci, kterou bych chtěla na tuto navázat, se podaří přispět alespoň dílem k vyřešení otázky týkající se tohoto komplexu druhů.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Úvod

*Anthoxanthum* L. s. str. (*Poaceae*: Pooideae: Aveneae) je taxonomicky poměrně složitý a nejednotný rod čítající 15 (Dahlgren et al. 1985; Nicora & Rúgolo de Agrassar 1987; Watson & Dallwitz 1992), 18 (Clayton & Renvoize 1986), či 20 (Conert 1988; Watson & Dallwitz 2005) jednoletých či vytrvalých druhů. Rod je rozšířen v mírné a arkticko-alpínské oblasti Evropy, Asie a Afriky (např. Clayton & Renvoize 1986; Watson & Dallwitz 1992), byl rovněž zavlečen do Ameriky a Austrálie (např. Tovar 1993).

Na území Evropy je popsáno 8 druhů tomek, z toho pět vytrvalých druhů patřících do komplexu *Anthoxanthum odoratum* a tři druhy jednoleté (*A. gracile* Biv., *A. aristatum* Bois. a *A. ovatum* Lag.). Toto rozlišení však není stoprocentní, neboť *A. odoratum* se může chovat jako druh jednoletý, a byly nalezeny dvouleté rostliny druhů *A. aristatum* a *A. ovatum* (Borril 1962; Hedberg 1964). Ani morfologické odlišení rostlin není ve většině případů jednoznačné (např. Tutin 1980; López-González 1994; Pimentel & Sahuquillo 2003a).

Zatímco jednoleté taxony jsou diploidní ( $2n = 10$ ) a jsou rozšířené v mediteránní oblasti (Tutin 1980, Pignatti 1982), druhy vytrvalé jsou diploidní i polyploidi s lokálním i širším výskytem (Conert 1988).

Co se vytrvalých druhů týče, nejrozšířenějším zástupcem rodu v Evropě je polyploidní komplex *Anthoxanthum odoratum* s. l. Jde o komplex dvou tradičně rozlišovaných druhů, z nichž druh *A. odoratum* L. - tomka vonná ( $2n = 20$ ) - je široce rozšířen po téměř celé Evropě (Hedberg 1967) s přesahy do Severní i Jižní Ameriky, Japonska, severní Afriky a Austrálie.

Druh *A. alpinum* Á.LÖVE & D. LÖVE (většinou  $2n = 10$ ) je vázán zejména na území horských systémů střední a jižní Evropy (Conert 1985), dále se vyskytuje více či méně souvisle od Skandinávie přes Sibiř až po Japonsko (Hedberg 1986, 1990).

Prvotně byly oba druhy vymezeny počtem chromozómů (ploidií) s tím, že diploidní stupeň představuje *A. alpinum* ( $2n = 10$ ) a tetraploidní stupeň *A. odoratum* ( $2n = 20$ ) (Löve & Löve 1948). Později byla zjištěna i dobrá morfologická diference obou druhů, neboť *A. alpinum* se vyznačuje přítomností háčkovitých chlupů na pluchách fertálních květů, zatímco u druhu *A. odoratum* tyto chlupy chybí (Mayová 1982; Bogenrieder & von Stietencron 1985). Nicméně právě upřednostnění morfologických znaků nad znaky karyologickými vedlo později k závěrům, že oba druhy představují komplexy diploidních i tetraploidních rostlin, neboť byly ve Švýcarském předalpi nalezeny tetraploidní rostliny s háčkovitými chlupy (přiřazeny k druhu *A. alpinum*, Felber 1986)

a naopak v jižní Evropě diploidní rostliny bez háčkovitých chlupů (přiřazeny k *A. odoratum*, Hedberg 1986, Felber 1987). U druhu *A. alpinum* je otázka původu tetraploidů uspokojivě dokázána, neboť jak studium karyologie (Teppner 1970, Hedberg 1970 a 1986), tak i enzymatických systémů (Zeroual-Humbert-Droz & Felber 1999) potvrzuje autopolyloidní původ tetraploidních rostlin. Na druhé straně se předpokládá, že tetraploidní rostliny duhu *A. odoratum* vznikly hybridizací mezi *A. alpinum* a jiným diploidním taxonem z jižní Evropy (Hedberg 1986), a jsou tedy allopolyploidního původu. Diskutabilní je možnost autopolyloidního původu těchto rostlin z hypotetického jihoevropského ancestrálního taxonu (Felber 1986), neboť tento předpoklad nebyl dosud experimentálně ověřen, a naopak je některými studii vyvrácen (Hedberg 1986).

### **Další vytrvalé druhy Evropy:**

*A. amarum* BROT. – vysoce polyploidní taxon ( $2n = 86, 88, 90$ ), endemit v SZ části Pyrenejského poloostrova (Fernández & Queirós 1969, Teppner 2002), často uváděn jako subspecie či varieta *A. odoratum* (Fernández & Queirós 1969), jemuž je po morfologické (Pimentel et al. 2007a) i genetické (Pimentel et al. 2007b) stránce blízce příbuzný.

*A. maderense* TEPPNER – nedávno popsáný diploidní taxon ( $2n = 10$ ) vyskytující se na Madeiře (Teppner 1998), morfoloogicky podobný *A. odoratum*, v současné době s ne příliš známými taxonomickými vztahy k ostatním druhům.

*A. pauciflorum* ADAMOVIČ – endemit jižní části Balkánu, zatím neprobádaný.

## **2.2 Popis rostlin z území ČR:**

Na našem území se problematikou odlišení *A. odoratum* a *A. alpinum* po morfologické stránce podrobně zabývala ve své diplomové práci M. Mayová (1982).

Následující přehled znaků je převzat z Dostálovy Nové květeny ČSSR (Dostál, 1989) a doplněn poznatky Mayové. Stejně znaky lze dnes nalézt v Klíči ke květeně České republiky (Kubát 2002).

### **Společné znaky:**

- rostliny: vytrvalé, hustě trsnaté, s četnými nekvetoucími růžicemi listů
- stébla: četná, nevětvená, přímá, 10-50 (100) cm vysoká, hladká, řidce listnatá
- listy: pochvy hladké, jazýček uťatý, ouška vyvinuta, čepele 2-8 mm široké
- květenství: stažená lata podlouhle válcovitá, hustá, klásky z boku smáčklé, se dvěma sterilními a 1 vrcholovým oboupohlavným květem (A2, blizny nitkovité), plevy blanité, průsvitné, pluchy sterilních květů blanité, osinaté, lodikuly chybějí
- obilka: okoralá



### ***Anthoxanthum odoratum***

- listy: čepele alespoň na líci řídce chlupaté, 4-8 mm široké, i za sucha ploché
- květenství: lata až 9 cm dlouhá, plevy drsné, nelesklé, řídce chlupaté, někdy se zoubky na kýlu, pluchy sterilních květů chlupaté, chlupy dosahují nebo přesahují vrchol pluchy, pluchy a plušky fertilních květů hladké, lesklé, zřídka chlupaté

### ***Anthoxanthum alpinum***

- rostliny: celkově menší vzrůst oproti *A. odoratum*
- listy: čepele lysé, jen na bázi na ouškách brvitě, 2-4 mm široké, za sucha svinuté
- květenství: lata 2-3 cm dlouhá, plevy bez chlupů a zoubků na kýlu, pluchy sterilních květů chlupaté, chlupy nedosahují k vrcholu, pluchy a plušky fertilních květů drsné, nelesklé, někdy chlupaté

(povrch pluchy a plušky fertilního květu lze snadno sledovat pod binokulární lupou na obilkách - chrání ji v době zralosti; drsnost je podmíněna přítomností drobných háčkovitých chlupů, hladkost a lesklost jejich nepřítomností)

## **2.3 Karyologické poznatky**

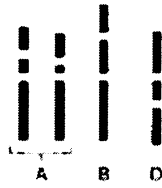
Základní chromozomové číslo v rodě *Anthoxanthum* je 5. Vzhledem k tomuto číslu bylo *A. odoratum* popsané Linéem známo pouze jako tetraploidní rostlina, tj. s 20 chromozomy (Katerman, 1931). V roce 1942 Östergen zjistil, že v rámci tohoto druhu existují rovněž jedinci diploidní (Östergen 1942). V roce 1948 popsali A. a D. Löve diploidní rostliny jako druh *Anthoxanthum alpinum*, jméno *Anthoxanthum odoratum* L. bylo ponecháno rostlinám tetraploidním. Další výzkumy později ukázaly, že je situace o něco složitější.

V dalším textu je termínem „cytotyp“ označován počet chromozomálních sad dané rostliny, termínem „karyotyp“ se rozumí sady chromozomů s určitými morfologickými znaky.

V současné době jsou v rámci každého cytotypu (diploidního i tetraploidního) známy dva různé karyotypy. Chromozomy jednoho karyotypu morfologicky neodpovídají chromozomům karyotypu druhého.

Hlavním rozlišovacím znakem mezi karyotypy je u obou cytotypů stavba satelitních chromozomů (tj. chromozomů skládajících se ze tří částí) (Hedberg 1986).

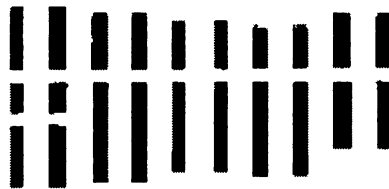
Typy satelitních chromozomů vyskytujících se v rámci *A. odoratum* L. s. lat. ukazuje obrázek, převzatý od I. Hedberg (1986):



### 2.3.1 Karyotypy diploidního cytotypu (dle Hedberg 1986, 1990)

Boreální karyotyp (*Anthoxanthum alpinum* Á. & D. LÖVE): satelitní chromozomy typu **D**

Celý karyotyp obsahuje 1 pár satelitních chromozomů, 3 páry submetacentrických chromozomů, 1 pár malých metacentrických chromozomů.



Mediterránní karyotyp: satelitní chromozomy typu **A, B**

Celý karyotyp obsahuje 2 páry satelitních chromozomů (A, B v různých kombinacích), 2 páry submetacentrických chromozomů, 1 pár velkých metacentrických chromozomů.

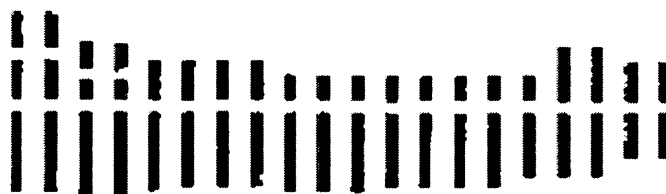


### 2.3.2 Karyotypy tetraploidního cytotypu (dle Hedberg 1986, 1990)

#### Karyotyp I (*Anthoxanthum odoratum* L.): satelitní chromozomy A, B, D

V sadě chromozomů tohoto karyotypu je možno rozlišit dvě skupiny chromozomů, z nichž jedna odpovídá chromozomům diploidního boreálního karyotypu, druhá chromozomům mediteránního karyotypu.

V rámci karyotypu existuje určitá variabilita v počtu satelitních chromozomů, příčinou tohoto jevu je ztráta jedné z části satelitního chromosomu, čímž je chromozom přeměn na chromozom jiného typu. Celý karyotyp obsahuje 4-6 satelitních chromozomů, 12-10 submetacentrických chromozomů, 4 metacentrické chromozomy různých velikostí (neobsahuje 4 stejné sady chromozomů).

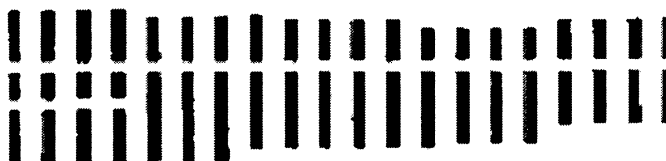


#### Karyotyp II (tetraploidní *Anthoxanthum alpinum*): satelitní chromozomy pouze typu D

Karyotyp obsahuje 4 stejné sady chromozomů, jež odpovídají chromozomům diploidního boreálního karyotypu.

Celý karyotyp obsahuje: 4 satelitní D chromozomy, 4 malé metacentrické chromozomy (nikdy ne velké), 12 submetacentrických chromozomů.

Objevem dvou různých karyotypů v rámci tetraploidního cytotypu byly vysvětleny rozpory v dřívějších porovnáních. Například Parthasarathy (1939) popisoval chromozomy tetraploida jako 4 podobné sady chromozomů, zatímco Jones (1964) uváděl, že 4 sady chromozomů nemají podobnou morfologii.



## 2.4 Vývoj taxonomického hodnocení diploidního cytotypu

Od doby, kdy bylo popsáno *A. alpinum* Á. LÖVE & D. LÖVE jako druh (1948) a postupně zkoumány rozlišovací znaky mezi ním a *A. odoratum*, setkáváme se u různých autorů s velmi rozmanitým hodnocením obou typů.

Jako druh hodnotí *A. alpinum* Á. & D. LÖVE Tutin (1950), Hadač et Hašková (1956), Skalinska, Banach-Pogan, Wciśło et al. (1957), Rozmus (1958 a 1960), Borrill (1962), K. Jones (1962), Madalski a Servatka (1963), Tateoka (1966), Teppner (1969 a 1970), Kiem (1974), Felber (1986, 1987, 1988a, 1988b), do současnosti až na níže uvedené výjimky všichni.

Za subspecii považovali diploidní cytotyp: Á. Löve (1945), Böcher (1961), B.M.G. Jones a Melderis (1964).

Hedberg se ve svých pracích kloní k názvu „diploidní odoratum“.

Ve všech výše uvedených případech, kdy je *A. alpinum* hodnoceno jako poddruh, mluví autoři o druhu *A. odoratum* se dvěma poddruhy: subsp. *odoratum* a subsp. *alpinum*. Ponechávají stranou otázku *A. nipponicum* HONDA. Teprve Tateoka (1966) se zmiňuje o možné identitě *A. alpinum* a *A. nipponicum*. Avšak Tzelev se domnívá, že nejde o totožné taxony. Uvádí je oba jako samostatné poddruhy druhu *A. odoratum*, tedy subsp. *alpinum* (Á. & D. LÖVE) JONES ET MELDERIS a subsp. *nipponicum* (HONDA) TZELEV kromě typové supsp. *odoratum* (Tzelev 1967 a 1976). Jiným způsobem řeší problematiku Schubert et al. (in Rothmaler 1976), kteří uvádějí horské diploidní rostliny ze střední Evropy pod jménem *A. nipponicum* HONDA a *A. alpinum* Á. & D. LÖVE uvádějí v závorce jako synonymum. Zřejmě se domnívají, že se jedná o zcela nebo téměř totožné taxony.

K určitému kompromisnímu řešení přistoupil Smejkal (1980). Uvádí diploidní rostliny z Moravy jako “*A. nipponicum* HONDA subsp. *alpinum* (Á. & D. LÖVE) SMEJKAL ined.”, tedy v rámci diploidního *A. nipponicum* HONDA rozlišuje dvě subspecie. Tetraploidní *A. odoratum* považuje za samostatný druh.

V ostrém protikladu se všemi předchozími autory, snad až s částečnou výjimkou Hedbergové, je nové Tutinovo stanovisko k problematice (Tutin 1980). Domnívá se, že v rámci Evropy není možné uvnitř druhu *A. odoratum* L. rozlišovat vůbec ani subspecie. K tomuto stanovisku se vrátili i autoři nejnovějšího článku (Pimentel & Sahuquillo 2008), kteří navrhují na základě provedených molekulárních a morfometrických analýz spojení *A. odoratum* a *A. alpinum* do jednoho druhu.

V příloze v tabulce č. 3 je shrnuto pojmenování čtyřech známých cytotypů *A. odoratum* a *A. alpinum* od různých autorů (převzato z Hedberg 1990).

## 2.5 Průběh meiózy

V popisu průběhu meiózy se v zásadě všichni autoři shodují jak u diploidních, tak u tetraploidních rostlin.

Diploidní rostliny studovali K. Jones (1962, 1964) a I. Hedberg (1970a). Podle jejich pozorování se při meiotickém dělení buněk vytvářejí bivalenty; Hedberg zaznamenala v několika případech i tvorbu univalentů. Rozchod chromozomů do dceřinných buněk je většinou pravidelný, jen výjimečně vznikají inverzní můstky.

Obě tyto studie byly uskutečněny ještě před definitivním rozpoznáním dvou různých diploidních karyotypů (Hedberg 1986), nicméně Jones tato pozorování prováděl na materiálu z Britských ostrovů, je tedy důvod předpokládat, že se jednalo o boreální karyotyp. I. Hedberg ve své studii uvedla typ satelitních chromozomů, který se ve zkoumaném materiálu vyskytoval. Ve všech případech se jednalo o typ D, tzn. šlo rovněž o boreální karyotyp.

Meiozí tetraploidních jedinců se kromě Jonese (Jones 1964) a Hedberg (1970a) zabývali např. Katterman (1931), Parthasarathy (1939), Östergen (1942). Výsledky jejich pozorování je možno shrnout takto: místo bivalentů se vytvářejí tetravalenty, v některých případech i multivalenty vyššího řádu. U některých jedinců probíhá rozchod chromozomů bez poruch, u jiných je možno pozorovat inverzní můstky a jiné nepravidelnosti.

Vytváření multivalentů vysvětlují strukturálními změnami (přestavby chromozomů), které vedou ke vzniku homologických míst i u nehomologních chromozomů a následnému nesprávnému párování.

I. Hedberg v době svého výzkumu už věděla o existenci dvou tetraploidních karyotypů, mohla se proto zaměřit i na zjištění rozdílů v průběhu meiózy mezi těmito karyotypy.

Došla k závěru, že meiotické dělení probíhá u obou typů v podstatě stejně s jediným rozdílem: u karyotypu II (4 stejné sady chromozomů) se multivalenty vyššího řádu vyskytují v menší míře než u karyotypu I.

K. Jones (1964) se tvorbou tetravalentů a vyšších multivalentů zabýval detailněji. (Podle morfologie chromozomů dospěl k názoru, že tetraploid vznikl spojením dvou různých diploidů). U tetravalentů existují 3 spojení chromozomů, avšak pouze u jediného dochází k rozchodu chromozomů tak, aby každá dceřinná buňka získala kompletní sadu chromozomů od každého diploidního rodiče. Podle zákonů pravděpodobnosti by k takovému spojení chromozomů mělo docházet pouze ve třetině případů. Jones však zjistil, že se vyskytuje v 90% případů. Tento jev lze podle něj vysvětlit selekcí ve prospěch uvedeného spojení chromozomů (nedochází ke snižování fertility v důsledku vyváženého genomu). U multivalentů je situace obdobná.

## 2.6 Teorie vzniku tetraploidů (*A. odoratum* L. s. lat.)

Náborů na vznik tetraploidů bylo publikováno více, ale v podstatě se dají shrnout do dvou skupin: autopolyploidizace, anebo allopolyploidizace. Zastánci první hypotézy tvrdí, že došlo ke zdvojení sady chromozomů jednoho diploida, naproti tomu druhá skupina se domnívá, že došlo ke zkřížení dvou různých diploidů.

### 1.6.1 Autopolyploidizace

O autopolyploidizaci se začalo uvažovat mnohem dříve než o druhém způsobu: Katterman (1931), Parthasarathy (1939) a Östergen (1942) tento názor vyslovili na základě pozorování průběhu meiózy – tvorba tetraivalentů je typickým jevem u autotetraploidů, protože v jejich genomu se vyskytují vždy čtveřice homologních chromozomů.

Hedberg (1967) tuto hypotézu podpořila na základě výskytu triploidních jedinců v čistě diploidních populacích, a možností vzniku tetraploida splynutím neredukované triploidní gamety s normální haploidní gametou. Tato událost proběhla během jejího experimentu. V roce 1970, s objevem dvou tetraploidních karyotypů, publikovala I. Hedberg hypotézu, že karyotyp II (4 stejné sady chromozomů) vznikl přímo autotetraploidizací do té doby jediného známého (boreálního) diploida (Hedberg 1970a). Karyotyp I je pak možno od karyotypu II odvodit přestavbami chromozomů. V témže roce uveřejnila pozměněnou variantu hypotézy – karyotyp I vznikl hybridizací odlišných ekotypů téhož diploida (Hedberg 1970b). Po zveřejnění objevu dvou diploidních karyotypů publikoval F. Felber v roce 1986 další možnost vzniku obou tetraploidů: z diploidního boreálního alpina vznikl zdvojením chromozomů tetraploidní karyotyp II, z mediteránního diploida vznikl tetraploid karyotypu I. Přitom oba diploidní karyotypy vznikly z jednoho společného předka a postupnou speciací se diferenciovaly.

### 2.6.2 Allopolyploidizace

Jako první přišel s myšlenkou hybridního původu tetraploida Borrill v roce 1963. V té době byl znám pouze jeden diploid (boreální), a o různých karyotypech tetraploida se nevědělo. Borrill se domníval, že došlo ke zkřížení diploida s rostlinou patřící do komplexu *A. ovatum* – *aristatum* (Borrill 1963). Dospěl k tomu na základě morfologických výzkumů: znaky společné s diploidem – rostliny vytrvalé, nevětvící se fertily stébla; znak společný s komplexem *ovatum* – *aristatum*: odění rostlin.

Pro ověření jeho závěrů provedl Jones morfologickou studii chromozomů a dospěl ke stejnému názoru (Jones 1964). Ve svém materiálu nenašel jedince, který by měl 4 stejné sady chromozomů, na základě čehož vyloučil možnost autotetraploidizace. Navíc uveřejnil několik možností, jak mohl

tetraploid vzniknout ( ve všech případech nutno předpokládat zdvojení sady chromozomů následně po zkřížení, anebo splynutí dvou neredukovaných gamet):

(boreální) diploid x *A. ovatum*

(boreální) diploid x krétský diploid

*A. ovatum* x krétský diploid.

(Jones při svých karyologických výzkumech zaznamenal existenci diploida odlišného karyotypu a jako první připustil, že by tento diploid mohl hrát nějakou roli při vzniku tetraploida; nějakou dobu však ještě trvalo, než byla existence dalšího diploida vzata na vědomí; později se ukázalo, že Jonesův krétský diploid je zřejmě totožný s mediteránním diploidem (Hedberg 1986)).

Další názor na vznik tetraploida hybridizací uveřejnil v roce 1970 Teppner. Podle něj došlo ke zkřížení diploida podobného tetraploidu s hypotetickým diploidem podobným doposud známému diploidu (tj. boreálnímu). (Rovněž Teppner věděl o existenci jiného diploida ze svých studií jihoevropského materiálu.)

S další hypotézou přišla I. Hedberg v roce 1986, když už byla existence dvou karyotypů u diploida i tetraploida plně prokázána. Na základě studia morfologie chromozomů obou diploidů i tetraploidů došla k názoru, že karyotyp I mohl vzniknout zkřížením boreálního a mediteránního diploida (tuto možnost navrhl už v roce 1964 Jones). Zároveň ale Hedberg nevyločila možnost vzniku karyotypu I autotetraploidizací. (Na původ karyotypu II nezměnila od r. 1970 názor, viz výše oddíl Autopolyploidizace.)

### **2.6.3 Hybridizační experimenty**

Pro doložení hypotéz o hybridním původu tetraploida bylo uskutečněno několik experimentů, při nichž byl sledován vzhled a chování kříženců a jejich umělých (kolchicinových) tetraploidů.

#### **Křížení *A. ovatum* x (boreální) diploid**

Tyto pokusy uskutečnili M. Borrill a K. Jones. Borrill sledoval, do jaké míry jsou dané rostliny schopny vytvořit křížence. Ukázalo se, že je to poměrně obtížné (Borrill 1962, 1963). Allotetraploid získaný pomocí kolchicinu byl vzhledem podobný přirozenému tetraploidu (přítomnost odění, nevětvící se fertlní stébla, vytrvalý). Na rozdíl od něj měl však velice nízkou klíčivost semen (poloviční oproti přirozenému tetraploidu) - pro tento jev našel vysvětlení Jones – selekce ve prospěch kvalitativně pravidelného rozchodu tetraivalentů (Jones 1964). Jones sledoval u kříženců meiózy (Jones 1962, 1964). U diploidních rostlin zaznamenal výskyt multivalentů, umělý tetraploid (opět získaný pomocí kolchicinu) vytvářel tetraivalenty i multivalenty vyššího řádu. Meiotické dělení umělého tetraploida tedy probíhalo velice podobně jako u tetraploida přirozeného.

### **Křížení *A. aristatum* x (boreální) diploid**

Experimenty uskutečnili rovněž M. Borrill a K. Jones (Borrill 1963, Jones 1964). Oba došli k podobným závěrům jako v případě předchozího křížence (vzhled a průběh meiózy umělého tetraploida se neliší od přirozeného tetraploida).

## **2.7 Rozšíření jednotlivých karyotypů**

### **Boreální diploid - (*Athoxanthum alpinum* Á. & D. LÖVE)**

Tento cytotyp se vyskytuje v oblasti hlavních horských eurasijských masívů od Japonska po Alpy. Také je přítomný ve Skandinávii, na Islandu a v Grónsku. Jedná se tedy o arkticko-alpínský areál.

V roce 1993 byl poprvé zaznamenán na Korsice (Felber 1993), chybí na Sicílii, Krétě a v severní Africe, přestože se vyskytuje ve stejné zeměpisné šířce či o něco severněji v Apeninách, na Balkáně a v Turecku.

Seznam studií s rozšířením z jednotlivých států (Felber 1987) naleznete v příloze v tabulce č. 2.

### **Mediterránní diploid**

Tento karyotyp zřejmě poprvé pozoroval Jones, v literatuře se o něm zmiňuje jako o „nepojmenovaném druhu z Kréty“ (Jones 1964). Dále je tento karyotyp uváděn z Itálie (Böcher 1961, Sicílie; Teppner 1970), z území bývalé Jugoslávie (Teppner 1970), z Řecka (Jones 1964, Kréta; Hedberg, 1986), Bulharska (Pundeva 1974; Pyndeva 1975), jihu Francie (Felber 1988a) a z Korsiky (de Litardière 1949, Contandriopoulos 1962; Grossetête 1982; Felber 1993).

### **Tetraploid karyotypu I - (*Anthoxanthum odoratum* L.)**

Areál výskytu tohoto karyotypu se prakticky shoduje s výskytem druhu *A. odoratum* L. (Hedberg 1970a, 1986, 1990). Ten je široce rozšířen po celé Evropě, chybí pouze ve vyšších horských polohách (Hedberg 1967, 1969, Rozmus 1958).

Seznam studií s rozšířením z jednotlivých států (Felber 1987) naleznete v příloze v tabulce č. 3.

### **Tetraploid karyotypu II (tetraploidní *Anthoxanthum alpinum*)**

Podle dosavadních výzkumů není areál výskytu karyotypu II příliš rozsáhlý. Je uváděn z Polska (Rozmus 1958), z Francie (Teppner 1970, Felber 1988a) a ze Švýcarska (Hedberg 1970a).



## 2.8 Původ druhů (1. část podle Felber 1987)

Vznik čeledi *Poaceae* je datován do paleocénu, více šířit se ale začala pravděpodobně až ke konci oligocénu a v miocénu (Stanley 1986). Rod *Anthoxanthum* se tedy zřejmě diferencoval během první poloviny třetihor.

Podle Felberovy nepublikované dizertační práce *A. alpinum* vzniklo na východě kvůli příbuznosti západoevropských a východoasijských populací, stejně jako západnímu rozšíření tetraploida. *A. alpinum* se mohlo diferenciovat např. ve starých horách střední či východní Asie, kde se zrodila část orofilních druhů Alp (Landolt 1986).

Původ diploidního *A. odoratum* zůstává podle něj na rozřešení složitějším. Oproti tetraploidnímu cytotypu je rozšířeno více na západě a na jihu, což hovoří též pro původní středo- či východoasijský původ. Pokud je tato hypotéza správná, musely se tyto dva taxony odlišit postupnou speciací ze společného předka.

Co se evropského rozšíření týče, Felber píše, že migrace *A. alpinum* z Asie do Evropy musela kvůli klimatu a pohybům litosférických desek proběhnout na konci třetihor. Felber nezaznamenal *A. alpinum* v Pyrenejích a Sieře Nevadě, jen na Balkáně, v Alpách a části Centrálního masivu ve Francii, což ho přivedlo k myšlence o nedávné imigraci tohoto taxonu. Navíc proti migraci na dlouhou vzdálenost hovoří absence tohoto cytotypu na Sicílii, Krétě a v severní Africe. Felber tedy předpokládá, že se taxon dostal do Evropy později než v messieniu, kdy definitivně zmizely pozemní mosty mezi středomořskými ostrovy a evropským a africkým kontinentem, a stejně tak později než v pliocénu, kdy došlo k připojení El Rífu k Africe (Stanley & Wezel 1985).

*A. alpinum* mohlo podle něj přijít do Evropy dvěma cestami:

- severskou od oblasti řeky Angary přes Sibiř, kde je tato tomka stále přítomná; do Alp a následně do dalších hor Evropy se dostala díky migraci k jihu s ostatní arktickou květenou během čtvrtohorního zalednění
- jižní cestou ze Střední Asie postupně přes Kavkaz, Turecko, Balkán, a pak do Karpat a Alp během zalednění

Felber se nepřiklání ani k jedné možnosti, pro severskou cestu mluví velikost severského areálu (západní Sibiř, Skandinávie, Island, Grónsko), pro jižní pak přítomnost tomky na Kavkaze a v horách Malé Asie, stejně jako západní výskyt polyploidů.

Co se polyploidizace týče, myslí si, že určitě proběhla až po té, co se rostliny dostaly do Alp, tudíž je na cestě z Východu nezávislá.

Co se výskytu *A. alpinum* v Japonsku týče, myslí si, že se tam dostalo migrací ze střední či východní Asie směrem na východ.

O diploidním cytotypu *A. odoratum* a jeho cestě do Evropy se Felber domnívá, že vzhledem k tomu, že se *A. odoratum* vyskytuje v Pyrenejích, severní Africe a na středozemních ostrovech, kde *A. alpinum* chybí, proběhla jeho imigrace dříve než u *A. alpinum*.

Do Evropy se musela tato diploidní tomka (*A. odoratum*) rozšířit přes Středozeří, kromě toho sem musela domigrovat v epoše, kdy bylo v Evropě podnebí poměrně blízké dnešku, aby se zde mohla uchytit.

O příchodu rodu *Anthoxanthum* na Island a do Grónska se mu nejpravděpodobnější cestou jeví šíření diaspor na dlouhou vzdálenost, nebo zavlečení diaspor člověkem v nedávné době, neboť kontinentální most mezi Evropou a Severní Amerikou existoval do eocénu, kdy je datováno odtržení Grónska a Evropy (Cox et Moore 1985), což je dříve, než udávaný vznik čeledi *Poaceae* (Stanley 1986).

Fylogeografií *A. alpinum* a *A. odoratum* se též zabývali ve své studii z roku 2007(b) M. Pimentel, E. Sahuquillo a P. Catalán. Pomocí metody AFLP srovnávali rostliny z Madeiry, Pyrenejského poloostrova, Alp, Sudet, Skandinávie a Malty.

Jejich výsledky jsou v příloze na obrázku č. 3.

Jako zvláštní se jeví naprostá odlišnost *A. gracile*, spojená zřejmě s jeho dlouhou izolací od dob miocénu, kdy byly některé rostlinné rody nuceny rychle se přesunout do Středozeří kvůli suchému podnebí (Bocquet et al. 1978; Kellogg 2001). Jako druhý krok diverzifikace se jeví oddělení vytrvalých druhů, kde *A. maderense* tvoří samostatnou větev (což může zobrazovat jeho izolaci a dřívější vznik), od jednoletých druhů. Poslední diference mezi vytrvalými taxony proběhla podle autorů zřejmě v době klimatických změn pliocénu a pleistocénu. Díky svým výsledkům se domnívají, že je *A. alpinum* původnější taxon, než tetraploidní *A. odoratum* a 17-18ploidní *A. amarum*.

Vzhledem k tomu, že objevili relativně úzký vztah mezi populacemi *A. alpinum* z Alp a Sudet, usuzují na rekolonizaci těchto míst (v dobách meziledových) severním směrem. Díky objevení větší diverzity populací v západních Alpách usuzují na to, že rostliny přecházely v dobách ledových v subalpínském refugiu právě v těchto místech. Na druhou stranu populace ze Skandinávie nevykazují signifikantní příbuznost s alpskými a sudetskými populacemi, což ukazuje na teoretický výskyt zóny, kde by se jižní a potenciální východní populace setkaly. Vzhledem k výskytu *A. alpinum* v Japonsku se autoři zmiňují o předpokládaném refugiu v západní Asii, ze kterého se mohly rostliny dostat i do severní Skandinávie.

Co se tetraploidního cytotypu *A. odoratum* týče, populace z Pyrenejského poloostrova nejeví přílišné známky příbuznosti se sudetskými a alpskými populacemi, kdežto se skandinávskými ano,

což ukazuje na kolonizaci od Atlantiku směrem na východ. Autoři předpokládají, že mohl Pyrenejský poloostrov sloužit pro *A. odoratum* jako refugium.

Vzhledem k větší odlišnosti populací u *A. alpinum* než u *A. odoratum* se autoři domnívají, že se *A. alpinum* dostalo na svá místa výskytu dříve a že severský postup ze západních Alp do Sudet trval přes dvě různá ledová období. V tom prvním *A. alpinum* obsadilo nížiny, a když se oteplilo, vyšplhalo se do hor. V druhé fázi mohlo *A. odoratum* kolonizovat území, která *A. alpinum* opustilo.

Tomuto předpokladu nasvědčují původní ostré hranice mezi těmito taxony v daném areálu výskytu (Bogenrieder et al. 1993; Flegrová & Krahulec 1999), které se postupem času díky lidské činnosti ztrácejí (Hedberg 1967).

## 2.9 Populační biologie

### 2.9.1 Rozdíly mezi *A. odoratum* a *A. alpinum*

Rozdíly v délce života trsů *A. odoratum* a *A. alpinum* a v kvetení studoval v experimentální zahradě Böcher (1961).

Délka života trsů diploida byla výrazně kratší – trsy odumřely po dvou letech, zatímco většina trsů tetraploida žila nejméně 3 roky.

Rozdíly byly i v kvetení – diploidní trsy kvetly ve velkém množství druhý rok (v prvním málo), tetraploidní kvetly málo v obou letech. Böcher zjistil rozdíly i v podzimním kvetení. U diploidů se druhé kvetení nevyskytovalo, zatímco u tetraploidů ano, ale pouze u nížinných. U montánních tetraploidů se podzimní kvetení rovněž nevyskytovalo.

Hedberg a Felber sledovali časové rozdíly v kvetení (boreálního) diploida a tetraploida. Hedberg (1967) zjistila, že diploidní rostliny kvetou dříve než tetraploidní (po ročním pěstování ve stejných podmínkách). Felber (1988b) při svém výzkumu už ovšem věděl o existenci dvou diploidů a dvou tetraploidů, proto porovnával všechny 4 typy. Zjistil, že boreální diploid a tetraploid karyotypu II (v jeho pojetí diploidní a tetraploidní *alpinum*) kvetou dříve než druhé dva typy (diploidní a tetraploidní *odoratum*).

Bogenrieder et al. (1993) se zabýval rozdíly mezi *A. odoratum* a *A. alpinum* na fyziologické úrovni. Pěstovali rostliny obou druhů při různých teplotách (5°C, 15°C, 25°C) a sledovali jejich fotosyntetickou aktivitu. Ve všech teplotních režimech byla fotosyntetická aktivita vyšší u *A. odoratum*.

## 2.9.2 Výměna genů mezi populacemi *A. odoratum* L. s. Lat.

Hedberg (1967) zjistila, že v přírodních populacích dochází spontánně ke vzniku tetraploidních semen, a to v populacích čistě diploidních i ve smíšených. Toto zjištění učinila ve Švédsku, kde zkoumala rozložení *A. alpinum* a *A. odoratum*, v té době pouze dvou známých cytotypů (diploidního *A. alpinum* a tetraploidního *A. odoratum*).

Ke vzniku triploidů dochází podle Hedberg dvěma různými způsoby. 1. spojením neredukované gamety diploida ( $n = 10$ ) s normální redukovanou gametou ( $n = 5$ ); 2. spojením redukovaných gamet diploida ( $n = 5$ ) a tetraploida ( $n = 10$ ). Je zřejmé, že v čistě diploidních populacích je možný pouze první způsob, ve smíšených probíhají oba.

Hedberg provedla rovněž řadu experimentů se získáním umělého triploida (Hedberg 1967, 1970a). Křížení, ve kterých byl jako samičí jedinec použit diploid, nebyla příliš úspěšná, nicméně několik triploidů se podařilo získat. V opačném směru triploidní semena vůbec nevznikla s jedinou výjimkou - jako samičí jedinec byla použita rostlina karyotypu II (se 4 stejnými sadami identickými s chromozomy diploida). V tomto případě vznikla triploidní semena ve velkém počtu. (Že šlo o karyotyp II bylo ovšem zjištěno až dodatečně, v době provádění se o existenci dvou karyotypů nevědělo.)

Felber et Girard (1986) zjistili v kontaktní zóně (boreálního) diploida a tetraploida karyotypu I (diploidní *alpinum* a tetraploidní *odoratum*) výskyt triploidů s chromozomy zřetelně pocházejícími od obou typů. Navíc byly nalezeny jedna diploidní a dvě tetraploidní rostliny, které měly karyotyp složený z chromozomů obou cytotypů, a také dva aneuploidi. Tento náález je podle autorů dokladem probíhající genové introgrese. Morfologické znaky (drnrost nebo hladkost semen) rovněž potvrdily existenci toku genů. Ten podle autorů probíhá v obou směrech (od diploida k tetraploidu i naopak).

## 2.10 Shrnutí

Z literárního přehledu vyplývá, že je otázka okruhu *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. poměrně složitá. Rod se dělí na dva druhy, a to na *A. odoratum* L. a *A. alpinum* Á. & D. Löve, oba mohou být jak diploidní ( $2n = 10$ ), tak tetraploidní ( $2n = 20$ ). V rámci každého cytotypu jsou známy dva karyotypy, kde se jako hlavní rozlišovací znak bere stavba satelitních chromozomů.

Ačkoli si údaje o jejich morfologických znacích a vzájemné rozlišitelnosti v literatuře do značné míry odporují, po morfologické stránce se rozlišením tetraploidního *A. odoratum* a diploidního *A. alpinum* v České republice zabývala M. Mayová (1982), která jako hlavní rozlišovací znak uvedla hladké (pro *A. odoratum*) či drsné (*A. alpinum*) pluchy a plušky fertilních květů.

Co se celkového rozšíření týče, diploidní *Anthoxanthum alpinum* Á. & D. Löve se vyskytuje v arkticko-alpinském areálu, v oblasti hlavních horských eurasijských masivů od Japonska po Alpy. Mediteránní diploid je znám z Itálie, z území bývalé Jugoslávie, Řecka, Bulharska, jihu Francie a z Korsiky. Tetraploidní *Anthoxanthum odoratum* L. se vyskytuje po celé Evropě, chybí pouze ve vyšších horských polohách. Areál výskytu tetraploidního *Anthoxanthum alpinum* není podle dosavadních výzkumů příliš rozsáhlý, je uváděn z Polska, Francie a ze Švýcarska.

V místech kontaktních zón tetraploidů *A. odoratum* a diploidů *A. alpinum* byly objeveny triploidní rostliny, což vypovídá o výměně genů mezi populacemi.

Felber (1987) se domnívá, že místem původu diploidních topek je střední či východní Asie. Doby ledové přečkávaly podle něj i Pimentela (2007b) v refugiích, odkud se pak šířily dále po Evropě. V refugiích podle nich také poprvé došlo k polyploidizacím.

U druhu *A. alpinum* je otázka původu tetraploidních rostlin karyologickými (např. Hedberg 1986) studiemi dokázána, autopolyploidizaci potvrzují i Zeroual-Humbert-Droz a Felber (1999) studií enzymatických systémů. U tetraploida druhu *A. odoratum* se většina autorů přiklání k allopolyploidnímu původu, nebyl však ale zatím dokázán, a bude jedním z předmětů mého dalšího výzkumu.

## 3. Experimentální část

### 3.1 Úvod

Polyplodizace, tedy proces zvyšující počet kompletních chromozómových sádek v jádře buňky, je nedílnou součástí evoluce rostlin (Soltis et al. 2003). V současné době se odhaduje, že asi 70% krytosemenných rostlin (Masterson 1994) a až 95% kaprad'orostů (Grant 1981) je polyploidního původu. Není proto divu, že řešení otázek souvisejících s polyploidními taxony a procesy, které vedly k jejich vzniku, je věnována velká pozornost soudobých botaniků a biosystematiků. Právě studium mechanismů vzniku a udržení nově formovaných polyploidů v přirozených populacích je klíčové k pochopení polyploidní speciace (Ramsey & Schemske 1998). Přestože jde o klíčový faktor evoluce rostlin, je dosud poměrně málo probádán (Thompson & Lumaret 1992) a získávání nových poznatků v konkrétních studiích je velmi žádoucí.

Pro účely zkoumání polyploidní speciace se komplex taxonů z okruhu *Anthoxanthum odoratum* jeví jako velmi zajímavý. Tato skupina v sobě zahrnuje ancestrální diploidní typy a odvozené typy polyploidní (zejména tetraploidní), které vznikly pravděpodobně odlišnými polyploidizačními událostmi (Hedberg 1986), a tvoří tak ideální objekt zkoumání makro- i mikroevolučních změn spojených s polyploidizací.

V této části práce jsem se pokusila popsat metody, které budu potřebovat ve své diplomové práci, kterou bych chtěla navázat na práci bakalářskou. Jednou z hlavních otázek je zajisté zjištění rodičovských taxonů tetraploidních rostlin *Anthoxanthum odoratum* s. s. a jejich rozšíření.

Terénní práci, odběr materiálu a stanovení velikosti genomu jsem využila i v mé bakalářské práci, prozatímní výsledky řešení projektu jsou v příslušné kapitole.

### 3.2 Metodika

#### 3.2.1 Terénní práce

S využitím dosud známých poznatků o rozšíření jednotlivých ploidních úrovní (literatura, databáze FLDOK, herbářové doklady s cytometrickými výsledky, údaje floristů) bude snaha získat rostlinný materiál z co nejširšího území Evropy tak, aby byly rovnoměrně podchyceny všechny taxony, které se podílely na vzniku polyploidních druhů v rámci rodu *Anthoxanthum*. Jedná se zejména o diploidní taxony (*A. alpinum* a jihoevropský mediteránní cytotyp), tetraploidní druhy (*A. odoratum*, *A. alpinum*) a polyploidní druh *A. amarum*. Všechny získané populace těchto druhů budou zaměřeny pomocí GPS.

### 3.2.2 Odběr materiálu

Ačkoliv se uvádí, že rod *Anthoxanthum* je jednoletou travinou (Conert 1988), jedná se ve skutečnosti o rostlinu hapaxantní, neboť pokud v dané vegetační sezóně rostlina nevykvetne a neodplodí, trs přežívá zimní období (Flegrová & Krahulec 1999). Navíc je tato vlastnost vázána na konkrétní odnož, a jelikož rostliny každoročně produkují větší množství krátkých sterilních výběžků, které kvetou až další rok, jsou rostliny považovány za vytrvalé. Je tedy možné a smysluplné na lokalitách odebírat dospělé rostliny a pěstovat je v experimentálních podmínkách. U každého pěstovaného exempláře bude stanovena ploidní hladina, a následně bude odebrána herbářová položka pro morfologické zpracování (zejména u mediteránních diploidů). Ve vytipovaných přirozených populacích bude odebráno i velké množství obilek pro odhalení, zda dochází ke spontánní hybridizaci.

### 3.2.3 Stanovení velikosti genomu

Pro měření velikosti genomu všech typů rostlin *Anthoxanthum odoratum* s. l. je používána průtokové cytometrie (cytometr CyFlow, světelný zdroj - laser s excitační vlnovou délkou 532 nm, *Pisum sativum* cv. 'Ctirad' s velikostí genomu 9,09 pg jako interní standard a propidium iodid jako fluorescenční barvivo). Izolace jader je prováděna pomocí dvoustupňové metodiky dle Otto (1990), jež byla pro účely stanovení velikosti genomu tohoto okruhu již úspěšně aplikována (Filipová & Krahulec 2006). Pro stanovení ploidie obilek a klíčících semenáčků bude použita v případě obilek modifikovaná metoda dle Matzk et al. (2000) a v případě semenáčků dvoustupňová metodika dle Otto (1990) s použitím DAPI jako fluorescenčního barviva.

### 3.2.4 Karyologické analýzy

Vybraní jedinci zejména diploidního cytotypu *A. alpinum* a mediteránního diploida budou podrobeny karyologickým analýzám. Analýzy karyotypů se ukázaly jako velmi vhodné při řešení otázek jak vzniku a původu tetraploidních rostlin, tak i odlišení diploidních rostlin (Hedberg 1986). K počítání chromozómů budou použity rychlé karyologické techniky (předpůsobení kolchicinem, fixace v kyselině octové a ethanolu v poměru 1:3, macerace v 1N HCl při 60 °C, barvení pomocí lakto-propio-orceinu) s využitím meristematických pletiv kořenových špiček. Tato metoda byla na tomto materiálu opakovaně úspěšně použita (např. Krahulcová 1990), neboť rod *Anthoxanthum* je charakteristický velkými chromozómy, kterých je malý počet a jejichž počítání je velmi snadné.

### 3.2.5 Molekulární analýzy

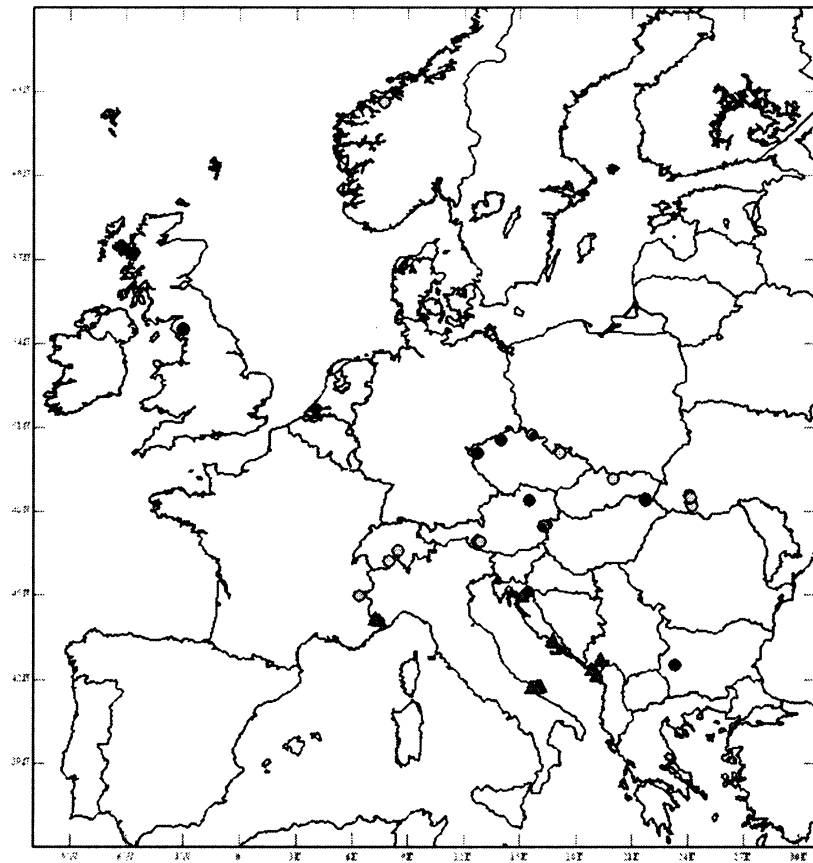
Pro stanovení haplotypů bude použito sekvenování nejméně dvou úseků cpDNA. Jako použitelný se jeví díky relativně velké variabilitě úsek trnL-trnF (Taberlet et al. 1991). Další úsek(y) budeme muset vybrat testováním na skupině rostlin (nejméně 3 jedinci na populaci zahrnující vybrané druhy). Vyzkoušíme deset z 21 v současnosti popsanych nekódujících cpDNA úseků podle Shaw et al. (2005, 2007), v jehož pracích lze najít i přesné postupy celé procedury.

## 3.3 Výsledky a diskuze

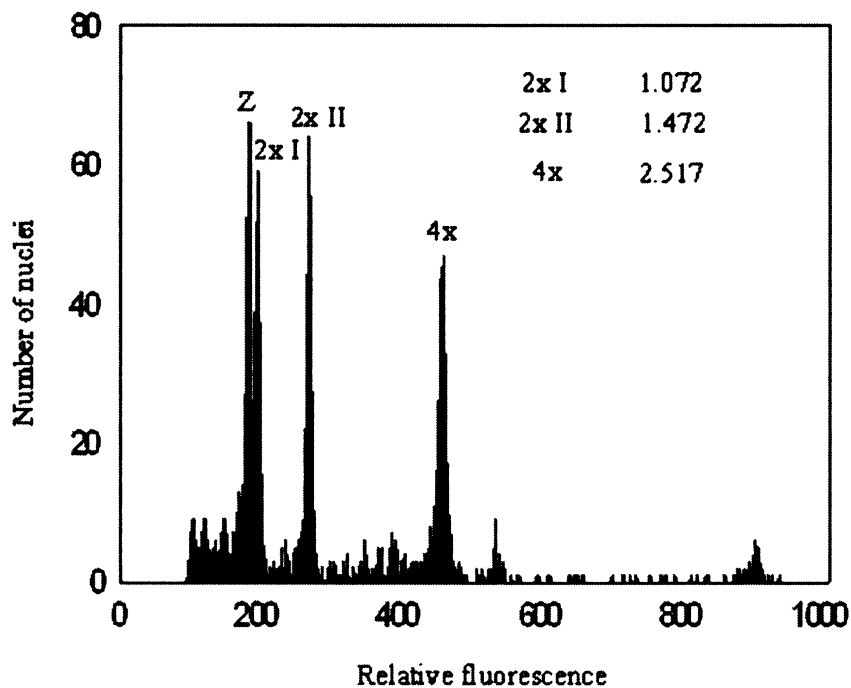
### 3.3.1 Práce v terénu a odběr materiálu

V roce 2006 byl sběr materiálu v rámci České republiky soustředěn zejména do oblasti Krkonoš, odkud je znám výskyt diploidního druhu *Anthoxanthum alpinum* a vlastního tetraploidního taxonu *Anthoxanthum odoratum*. Téměř 90 rostlin z této oblasti bylo přesazeno do experimentální zahrady BÚ AVČR v Průhoncích. Navíc byla získána unikátní kolekce rostlin z různých částí areálu – *Anthoxanthum alpinum* z Norska (18 rostlin) a rakouských Alp (37 rostlin); diploidní mediteránní typ z Itálie (9 rostlin) a Černé hory (8 rostlin). Tyto rostliny jsou taktéž pěstovány v experimentální zahradě. Podniknutá zahraniční cesta na Slovensko doplňuje tuto kolekci o rostliny z Vysokých a Nízkých Tater (celkem ca 10 rostlin). U dalších cca 600 rostlin z 20 krkonošských populací byla odebrána část pletiva pro cytometrické analýzy. V roce 2007 byla převážná část terénní činnosti vázána na území jižní Evropy, kde bylo snahou nalézt diploidní rostliny komplexu. Celkem bylo pro pěstování v experimentální zahradě a následné analýzy získáno cca 50 rostlin z Černé Hory (20 rostlin z 5 lokalit), Chorvatska (10 rostlin ze 3 lokalit), Francie (15 rostlin ze 4 lokalit) a Itálie (rostlin ze 2 lokalit). Všechny výše zmíněné nálezy za rok 2007 odpovídají diploidnímu taxonu vázanému právě na jihoevropskou oblast. Dále byly získány rostliny druhého diploidního druhu *Anthoxanthum alpinum* z Francie, Švýcarska, Ukrajiny a z hadcových oblastí Rakouska (Burgenland). Souhrnná mapka zobrazující lokality dosud získaných (a pěstovaných) rostlin z obou let je na obrázku č. 1.





Obr. 1. - Lokality s dosud získanými rostlinami - ● tetraploidní cytotyp, ○ diploidní cytotyp druhu *A. alpinum*, ▲ jihoevropský diploidní cytotyp



Obr. 2. - Výstup z průtokového cytometru při simultánní analýze všech 3 taxonů (2x I - diploidní *Anthoxanthum alpinum*, 2x II - diploidní jihoevropský taxon, 4x - tetraploidní *A. odoratum* s. str.) a standardu (*Zea mays* CE-777 = Z). Tabulka shrnuje poměry v relativní fluorescenci mezi taxony a standardem.

### 3.3.2 Stanovení velikosti genomu a ploidní úrovně

Analýza ploidních úrovní a velikosti genomu přinesla několik poznatků. Jako zcela zásadní se jeví zjištění odlišnosti v obsahu DNA dvou diploidních taxonů. Jedním z nich je známý druh *Anthoxanthum alpinum*, který ve středoevropském prostoru tvoří výškový vikariant široce rozšířeného taxonu *A. odoratum* s. str. U tohoto taxonu byl stanoven obsah jaderné DNA na  $5,58 \pm 0,04$  pg. Druhý diploidní taxon tvoří jedinci nalezení v jižní Evropě. Obsah jejich jaderné DNA činí  $7,77 \pm 0,10$  pg. Nomenklatura tohoto taxonu je velmi nejasná – v minulosti byl nejčastěji ztotožňován s druhem *A. odoratum* s. str. jakožto jeho diploidní rasa. Nicméně analýzou obsahu jaderné DNA bylo zjištěno, že tetraploidní rostliny druhu *A. odoratum* s. str. se významně liší od předpokládaného obsahu 15,5 pg (tedy  $2 \times 7,77$  pg za předpokladu autotetraploidního původu). Byl u nich zjištěn výrazně nižší obsah jaderné DNA, a to cca 13,4 pg. Tato hodnota odpovídá teoretickému součtu hodnot pro oba diploidní taxony. Toto zjištění stálo u hypotézy allotetraploidního původu široce rozšířeného druhu *A. odoratum* s. str. (viz též Obr. 2).

Allopolyploidní původ tetraploidního druhu pravděpodobně spadá do období, kdy mohly oba diploidní taxony růst v sympatrii – tj. když horský diploidní druh *A. alpinum* sestoupil do nižších poloh. Tato skutečnost nastala pravděpodobně v období glaciálů. Teorii o sestupu horských diploidů do nižších poloh potvrzují i reliktní lokality rakouských hadců (Melzer 1986), kde diploidní *A. alpinum* jako „glaciální relik“ setrvalo dodnes.

Jako další významný výsledek považuji objevení triploidního jedince na lokalitě Malé Tippetovy Boudy v Krkonoších, odkud je znám a potvrzen společný výskyt jak diploidního druhu *Anthoxanthum alpinum*, tak tetraploidního taxonu *A. odoratum*. Obsah jaderné DNA tohoto triploidního jedince zcela odpovídá intermediálnímu postavení mezi diploidním a tetraploidním druhem. Z tohoto faktu jednoznačně vyplývá hybridní původ této rostliny. Navíc tento jedinec byl již plodný a v porostu dobře etablován, z čehož lze usuzovat, že k hybridizacím dochází poměrně často, což by měla prokázat analýza obilek.

Na úrovni tetraploidních rostlin druhu *Anthoxanthum odoratum* byla objevená i poměrně častá aneuploidie, a to jak  $2n = 21$ , tak  $2n = 19$  (nicméně tyto počty chromozómů jsou jen orientační, neboť jsou odvozeny na základě obsahu jaderné DNA a nikoliv exaktního počítání v roztlakových preparátech).

## 4. Závěr

V první části mé bakalářské práce jsem se snažila shrnout dosud známé poznatky o polyploidním komplexu *Anthoxanthum odoratum*. Jejich znalost by mi měla pomoci při řešení diplomové práce, ve které se budu tímto rodem dále zabývat.

Prozatímni výsledky ukazují na mnoha autory navrhnovanou možnost allopolyploidního původu tetraploidního *A. odoratum* L.. V diplomové práci bych tuto hypotézu ráda potvrdila a vyvrátila tak návrh z posledního článku Pimentela et. al (2008) na sjednocení druhů *A. odoratum* a *A. alpinum*, který položili na základě výsledků molekulárních (RAPD) a morfologických analýz populací pouze z Pyrenejského poloostrova a Skandinávie.

Postupným průzkumem evropského terénu a následnou analýzou sebraných vzorků tomek se ukazuje rozmístění jejich dvou odlišných haplotypů, což otevírá cestu v řešení dalších okruhů otázek, jako objasnění historie polyploidů u vytrvalých druhů rodu *Anthoxantum*; způsob a počet polyploidizačních událostí. Mohlo by se podařit vyjasnit vztahy mezi všemi zástupci tohoto rodu v Evropě, zvláště pak otázku příbuznosti jednoletých a vytrvalých druhů, zda se jednoleté druhy na polyploidizačních událostech podílely.

K řešení těchto otázek, kterými se budu ve své diplomové práci zabývat, využiji v současné době hojně využívané metody rostlinné biologie, jako jsou molekulární techniky a průtoková cytometrie.

## 5. Použitá literatura:

- Bocquet G., Widler B., Kiesler H. (1978):** The Messiah Model – a new outlook for the floristics and systematics of the Mediterranean areas. - *Candollea* 33: 269-287.
- Böcher T.W. (1961):** Experimental and cytological studies on Plant species VI. *Dactylis glomerata* and *Anthoxanthum odoratum*. - *Botanisk Tidsskrift* 56: 314-335.
- Bogenrieder A. & von Stietencron A. (1985):** Morphologische und cytologische Untersuchungen an *Anthoxanthum alpinum* A. & D. LöWE und *Anthoxanthum odoratum* L. vom Feldberg im Schwarzwald. – *Carolinea* 42: 51-56.
- Bogenrieder A., Buhler M. et Harringer P. (1993):** *Anthoxanthum odoratum* L. und *Anthoxanthum alpinum* (A. & D. Löve) am Felberg (Schwarzwald). Ein Beispiel für Hohenvikarianz. - *Carolinea* 51: 41-50.
- Bolkhovskikh Z., Grif V., Matvejeva T. et Zakharyeva O. (1969):** Chromosome numbers of flowering plants., Ed: Fedorov A., Leningrad. In **Felber 1987**.
- Borrill M. (1962):** Te experimental taxonomy of *Anthoxanthum* species. - *Proceedings of the Linnean Society of London* 173: 106-109.
- Borrill M. (1963):** Experimental studies of evolution in *Anthoxanthum* (*Gramineae*). – *Genetica* 34: 183-210.
- Bosemark N. O. (1957):** Further studies on accessory chromosomes in grasses. *Hereditas* 43 (2): 236-297.
- Bowden W. M. (1960):** Chromosome numbers and taxonomic notes on northern grasses. III. Twenty-five genera. - *Canadian Journal of Botany* 38: 541-557.
- Clayton W. D. & S. Renvoize (1986):** *Genera Graminum: Grasses of the world.* – *Kew Bulletin, Additional series* 13:1-389.
- Conert H. J. (1988):** *Gramineae.* – In: Hegi G., *Illustrierte Flora von Mitteleuropa I/3*, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- Contandriopoulos J. (1962):** Recherches sur la flore endémique de la Corse et sur ses origines.- Thèse, Montpellier, 354 p.; in **Felber 1987**.
- Cox C. B. et Moore P. D. (1985):** *Biogeography: An ecological and evolutionary approach.*, 4ème édition, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dersch G. (1974):** Über einige Chromosomenzählungen an mitteleuropäischen Blütenpflanzen. II. - *Philippia* 2 (2): 75-82. In **Felber 1987**.
- Dahlgren R. M., Clifford H. T., Yeo P. F. (1985):** *The families of the Monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy.* Berlin: Springer Verlag.
- Dostál J. (1989):** *Nová květena ČSSR díl 2.* - Praha.
- Engelskjøn T. (1979):** Chromosome numbers in vascular plants from Norway, including Svalbard. - *Opera Botanica* 52: 1-38.
- Favarger C. (1962):** Contribution de la biosystématique à l'étude des flores alpine et jurassienne. - *Revue de Cytologie et de Biologie Végétales* 25: 3-4: 397-410.
- Favarger C., Galland N., Küpfer Ph. (1979):** Recherches cytotaxonomiques sur la flore orophile du Maroc. *Naturalia Monspeliaca - Ser. Bot.* 29: 1-64
- Felber F. (1986):** Distribution des cytodèmes d'*Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. en Suisse. Les relations Alpes – Jura. – *Botanica Helvetica* 96: 145-158.
- Felber F. (1987):** Contribution à l'étude phytogéographique, biosystématique et expérimentale du complexe polypléid *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat.- Thèse à l'UNINE, Neuchâtel.
- Felber F. (1988a):** Distribution des cytodèmes d'*Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. en France et dans les régions limitrophes. – *Bulletin de la Société Botanique de France* 135: 281-293.
- Felber F. (1988b):** Phénologie de la floraison de populations diploïdes et tétraploïdes d'*Anthoxanthum alpinum* et d'*Anthoxanthum odoratum*. - *Canadian Journal of Botany* 66: 2258-2264.

- Felber F. (1993):** Présence de trois taxons pérennes d'*Anthoxanthum* L. en Corse. - In **Jeanmonod D.** et **Burdet H.M.** [red.], Notes et contributions à la flore de Corse, IX. - *Candonellea* 48: 582-591.
- Felber F. et Girard M. (1986):** Etude écologique et génétique d'une zone de contact entre deux cytodemes d'*Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. à Chasseral (Berne, Suisse). Résultat préliminaires. - Actes de Colloque National CNRS „Biologie des Populations“, Lyon: 4-6 septembre 1986: 331-330.
- Felber F. et Jacot Ph. (1987):** Potentialités androgénétiques des quatre cytodèmes d'*Anthoxanthum odoratum* L. s. lat., *Botanica Helvetica* 97.
- Fernández A. & Queirós M. (1969):** Contribution à la connaissance cytotaxonomique de spermatophyta du Portugal. I. Gramineae. *Boletim da Sociedade Broteriana* 2.a sér 43: 20-140, in **Pimentel 2007a**.
- Feráková V. (1972):** Bemerkungen zur Flora der Umgebung der Stadt Hlohovec in der Slowakei III. Ergänzungen. *Acta F. R. N., Univ. Comen.* - *Botanica* 20: 149-158.
- Fernandez A. et Queiros M. (1969):** Contribution à la connaissance cytotaxonomique des Spermatophyta du Portugal, I. Graminae. - *Boletim da Sociada de Broteriana* 43: 3-140. In **Felber 1987**.
- Flegrová M. & Krahulec F. (1999):** *Anthoxanthum odoratum* and *A. alpinum*: Life history parameters at two different altitudes. - *Folia Geobotanica* 34: 19-31.
- Filipová L. & Krahulec F. (2006):** The transition zone of *Anthoxanthum alpinum* and *A. odoratum* in the Krkonoše Mts. - *Preslia* 78: 317-330.
- Galland N. (1984):** Recherches sur l'origine de la flore orophile du Maroc: étude caryologique et cytogéographique. Thèse, Université de Neuchâtel. 462 p.
- Garbari F., Miceli P. et Monti G. (1980):** Numeri cromosomici per la Flora Italiana: 676-682. *Informatore Botanico Italiano* 12: 107-111. In **Felber 1987**.
- Goldblatt P. (1985):** Index to plant chromosome numbers 1982-1983. Missouri Botanical Garden. In **Felber 1987**.
- Gould F. W. et Soderstrom T. R. (1974):** Chromosome numbers of some Ceylon grasses. - *Canadian Journal of Botany* 52: 1075-1090.
- Grant V. (1981):** Plant speciation. Columbia University Press, New York, USA.
- Grossetête M. P. (1982):** Contribution à l'étude biosystématique du genre *Anthoxanthum* L. en France, Th. 3e cycle: ecol., Paris II, 124 p. et annexes, in **Felber 1987**.
- Guinochet M. (1942-1943):** Recherches de taxonomie expérimentale sur la Flore des Alpes et la Région méditerranéenne occidentale. I. - Notes caryologiques sur quelques Graminées. *Rev. Cytol. et Cytophysiol.* 6: 209-220. In **Felber 1987**.
- Hadač E. et Hašková V. (1956):** taxonomické poznámky o tatranských roslinách ve vztahu k jejich cytologii. - *Biológia, Martin*, 11: 717-723.
- Hedberg I. (1964):** Pubescence – a spurious taxonomic character in *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. *Svensk Botanisk Tidskrift* 58: 273-241.
- Hedberg I. (1967):** Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. II. Investigations of some Swedish and of a few Swiss population samples. - *Symbolae Botanicae Upsaliensis* 28/58: 5-88.
- Hedberg I. (1969):** Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. III. Investigations of Swiss and Austrian population samples. - *Svensk Botanisk Tidskrift* 63: 233-250.
- Hedberg I. (1970a):** Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. IV. Karyotypes, meiosis and the origin of tetraploid *A. odoratum*. - *Hereditas* 48: 471-502.
- Hedberg I. (1970b):** Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. - *Acta Universitatis Upsaliensis* 147: 3-8.

- Hedberg I. (1986):** The genesis of tetraploid *Anthoxanthum odoratum*. – Symbolae Botanicae Upsaliensis 27(2): 147-154.
- Hedberg I. (1990):** Morphological, cytotaxonomic and evolutionary studies in *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. – a critical review. - Sommerfeltia 11:97-107.
- Hedberg O. (1967):** Chromosome numbers of vascular plants from arctic and sub-arctic North America. - Ark. Botany 6: 309-326.
- Hindáková M. et Záborský J. (1977):** In IOPB chromosome number reports LVI. Taxon 26: 257-274.
- Holub (1960):** Nové nebo méně známé rostliny květeny ČSSR. - Preslia (Praha) 32: 423-426.
- Jones B. M. G. et Melderis A. (1964):** *Anthoxanthum odoratum* L. and *A. alpinum* Å. and D. Löve, - Proceedings of the Botanical Society of the British Isles, London, 5: 375-377.
- Jones K. (1962):** The cytology of *Anthoxanthum*. - Proceedings of the Linnean Society of London 173: 109-110.
- Jones K. (1964):** Chromosomes and the nature and origin of *Anthoxanthum odoratum* L. - Chromosoma 15: 248-274.
- Jørgensen C. A., Sørensen Th. et Westergaard M. (1958):** The flowering plants of Greenland – a taxonomical and cytological survey. - Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk. 9: 1-172. In **Felber 1987**.
- Krahulcová A. (1990):** Selected Chromosome Counts of the Czechoslovak Flora II. – Folia Geobot. Phytotax. 25: 381-388.
- Kattermann G. (1931):** Über die Bildung polyvalenter Chromosomenverbände bei einigen Gramineen. - Planta 12: 732-774. In **Hedberg 1970a**.
- Kellog E. A. (2001):** Evolutionary history of the grasses. Plant. Physiol. 125: 1198-1205.
- Kiem J. (1974):** Gräser bei Bozen. - Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft, München, 45: 137-150. In **Mayová 1982**.
- Kirchner J., Štěpánek J., Štěpánková J. (1982):** In IOPB chromosome number reports LXXVI. - Taxon 31: 574-575
- Kockx-van Room et Wieffering J. H. (1982):** In IOPB chromosome number reports XL. - Taxon 22: 285-291.
- Kubát K. (2002):** Klíč ke květeně České republiky, Praha.
- Küpfer Ph. (1969):** Recherches cytotaxonomiques sur la flore des montagnes de la péninsule ibérique. - Bulletin de la Société de Neuchâteloises des Sciences Naturelles 92: 31-48.
- Küpfer Ph. (1974):** Recherches sur le lien parenté entre la flore orophile des Alpes et celle des Pyrénées. Thèse Neuchâtel. - Boissiera 23: 1-322.
- Landolt E. (1986):** Notre flore alpine, adaptation française de D. Aeschmann, Club alpin suisse, in **Felber 1987**.
- Litadière de R. (1949):** Observations caryologiques et caryosystématiques sur diverses graminées, principalement de la flore méditerranéenne, Mémoires de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord 2: 199-208.
- López-González G. (1994):** Notas sobre el género *Anthoxanthum* L. (Gramineae). Anales del Jardín Botánico de Madrid 51: 309-312. In **Pimentel 2007a**.
- Lotto R. (1982):** Neue floristische Beobachtungen von Fahr- und Blütenpflanzen in den mittleren Bayerischen Alpen. Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft 53: 61-86. In **Felber 1987**.
- Löve A. & Löve D. (1948):** Chromosome numbers of northern plant species. – Reports of the Department of Agriculture, University Institute of Applied Sciences (Iceland), Series B. 3: 105.
- Löve A. & Löve D. (1956):** Cytotaxonomical conspectus of the Icelandic flora. - Acta Horti Gotoburgensis 20: 65-291.
- Löve A. & Löve D. (1968):** The diploid perennial *Anthoxanthum*. Scientia islandica, anniv. vol. 1968: 26-30.

- Madalski J. et Serwatka J. (1963):** *Poa supina* Schrad. i *Anthoxanthum aplanum* L. et L. w Krkonoszach. - Opelskie Towarz. Przyj. Nauk., Zesz. Przyrod., Opole, 3:53-64. In **Mayová, 1982.**
- Magic D. et Májovský J. (1974):** Vegetationsgrundriss der Kohút – Stolica – Berggruppe (Slowakisches Erzgebirge). - Acta F. R. N., Universita Comeniana - Botanica 22: 27-91.
- Májovský et al. (1974):** Index of chromosome numbers of slovakian flora (part 3). - Acta F. R. N., Universita Comeniana - Botanica 22: 1-20.
- Masterson J. (1994):** Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. – Science 264: 421-423.
- Matzk F., Meister A. & Schubert I. (2000):** An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. – The Plant Journal 21: 97-108.
- Mayová M. (1982):** Příspěvek k řešení problematiky *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. se zvláštním zřetelem k *Anthoxanthum alpinum* A. & D. Löve. - Diplomová práce na katedře botaniky vyšších rostlin, PřF UK, Praha
- Mehra P. N. et Sharma M. L. (1975):** Cytological studies in some central and eastern Himalayan grasses. III. The Agrostideae, Aveneae, Brachypoideae, Bromeae, *Festucaceae*, Phalarideae and Triticeae. - Cytologia 40: 441-452. In **Felber 1987.**
- Melzer H. (1986):** Notizen zur Flora des Burgenlandes, von Nieder- und Oberösterreich. – Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft, Österreich 124: 81-92.
- Miège J. (1939):** Contribution à l'étude des Phalaridées.- Bulletin de la Société d'Histoire naturelle de l'Afrique du Nord. 30: 223- 245. In **Felber 1987.**
- Moore R. J. (1973):** Index to plant chromosome numbers 1967-1971. - Regnum Vegetabile 90: 1- 539. In **Felber 1987.**
- Nicora E. G. & Rúgolo de Agrassar Z. E. (1987):** Los géneros de gramíneas de América Austral. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur. In **Pimentel 2007a.**
- Nieto Felinger G. (1985):** Estudio critico de la flora orófila del suroeste de León: Montes Aquilianos, Sierra del Teleno y Sierra de la Cabrera. - Ruizia 2: 1-239. In **Felber 1987.**
- Östergren G. (1942):** Chromosome numbers in *Anthoxanthum*. - Hereditas 33: 242-243. In **Hedberg 1990.**
- Otto F. (1990):** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. – In: Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. [eds.], Methods in Cell Biology, p. 105-110, Academic Press, New York.
- Parthasarathy N. (1939):** Cytogenetical studies in Oryzeae and Phalarideae. - Annals of Botany New Series 111: 43-76. In **Hedberg 1990.**
- Pauca-Comanescu M. et Tonciu (1978):** La différenciation des populations de *Anthoxanthum odoratum* L. dans les monts Bucegi. - Travaux du Museum National d'Histoire Naturelle Grigore Antipa , 19: 217-230.
- Pashuk KH. T. (1970):** Cytological investigation on *Anthoxanthum* genus in the Carpathians. Ukrains'kii Biokhimichnii Zhurnal 27: 439. In **Felber 1987.**
- Pimentel M. & Sahuquillo E. (2003a):** An approach to the study of morphological relationships among the sweet vernal grass (*Anthoxanthum* L. *Poaceae*, Pooideae) in the Iberian Peninsula. Bocconeia 16: 731-737.
- Pimentel M., Estévez G. & Sahuquillo E. (2007a):** European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum*, *Poaceae*; Pooideae; Aveneae): a morphometric taxonomical approach. - Systematic Botany 32 (1): 43-59.
- Pimentel M., Sahuquillo E. & Catalán P. (2007b):** Genetic diversity and spatial correlation patterns unravel the biogeographic history of the European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum* L., *Poaceae*). – Molecular Phylogenetics and Evolution 44: 667-684.

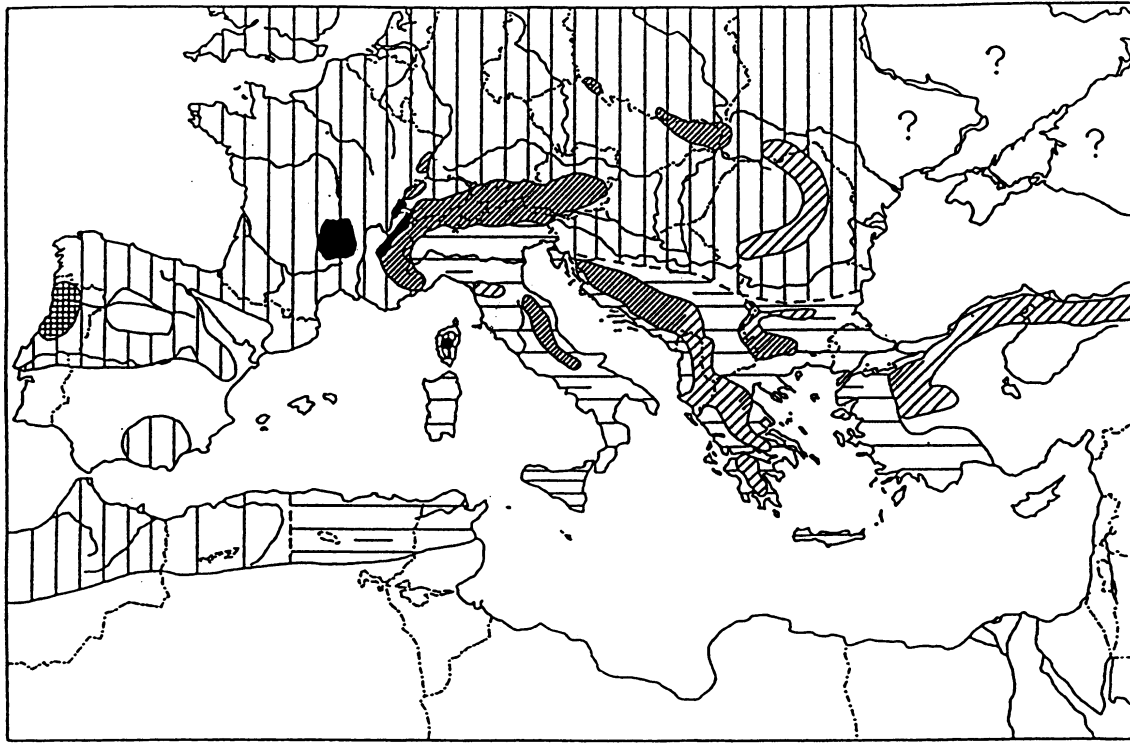
- Pimentel M. & Sahuquillo E. (2008):** Relationships between the close congeners *Anthoxanthum odoratum* and *A. alpinum* (Poaceae, Pooideae) assessed by morphological and molecular methods. - Botanical Journal of Linnean Society 156: 237-252.
- Pignatti S. (1982):** *Anthoxanthum*. Pp. 582-583 in Flora d'Italia vol. 3, ed. S. Pignatti. Bologna: Edagricole.
- Polatschek A. (1966):** Flora d'Italia, vol. 3: 582-583. Edagricole, Bologne.
- Pundeva R. S. (1974):** Karyological study on the two varieties of *Anthoxanthum odoratum* L. - var. *odoratum* and var. *montanum* Aschers. et Graebn. C. R. Acad. Bulg. Sci. 27 (3): 395-398.
- Queiros M. (1973):** Contribuição para o conhecimento citotaxonomico das *Spermathophyta* de Portugal. I. *Gramineae*, - Supl. I. Boletim da Sociedade Broteriana 47 (Ser. 2): 77-103.
- Queiros M. (1974):** Contribuição para o conhecimento citotaxonomico das *Spermathophyta* de Portugal. I. *Gramineae*, - Supl. 2. Boletim da Sociedade Broteriana 48: 81-98.
- Pyndeva R. (1975):** Etude morphologique et caryologique du genre *Anthoxanthum* en Bulgarie (en Bulgare), Rasteniievad. Nauki 12 (9): 123-130.
- Ramsey J. & Schemske D. W. (1998):** Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. - Annual Reviews of Ecology and Systematics 29: 467-501.
- Richards A. J. (1972):** In IOPB chromosome number reports XXXV. - Taxon 21: 161-166.
- Ritter J. (1974):** In IOPB chromosome number reports XLIV. - Taxon 23: 373-380.
- Rothmaler W. (1976):** Exkursionsflora für die Gabiete der DDR und der BRD. Kritischer Band. - Berlin.
- Rozmus (1958):** Badania cytologiczne nad *Anthoxanthum alpinum* L. et L. gatunkiem nowym dla flory polskiej. - Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica 1: 170-184.
- Rozmus M. (1960):** Odrebnosc gatunkowa *Anthoxanthum alpinum* L. et L. w swietle badan anatomicznych. - Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica 3: 83-90.
- Rozmus M. (1963):** Cytogenetical studies in biotypes of *Anthoxanthum alpinum* with accessory chromosomes. - Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica 6: 115-141.
- Scholte G. (1977):** in Löve A. IOPB chromosome number reports LVI. - Taxon 26: 2-3: 257-274.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E. & Small R.L. (2005):** The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. - American Journal of Botany 92(1): 142-166.
- Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E. & Small R. L. (2007):** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: The tortoise and the hare III, - American Journal of Botany 94(3): 275-288..
- Skalinska M., Banach – Pogan E., Wcislo H. et al. (1957):** Further studies in chromosome numbers of Polish Angiosperms. - Acta Soc.Bot. Polon., Warszawa, 26: 217-245.
- Smejkal M. (1980):** Komentovaný katalog moravské flory. - Brno.
- Soltis D. E. & Soltis P. S. [eds.] (1990):** Isozymes in Plant Biology, Dioscorides press, Portland, Oregon.
- Soltis D. E., Soltis P. S. & Tate J. A. (2003):** Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. - New Phytol. 161: 173-191.
- Stanley M. S. (1986):** Earth and life through time, Freeman W. H. and Co, New York, 690 p.
- Stanley D. J. & Wezel F. C. (1985):** Geological evolution of the Mediterranean basin. - Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg and Tokyo. 559-571.
- Strid A. et Franzen R. (1981):** In IOPB chromosome number reports LXIII. - Taxon 30: 829-842.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J. (1991):** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. - Plant Molecular Biology 17: 1105-1109.
- Tateoka T. (1964):** Karyotaxonomy in Poaceae. II. Somatic chromosomes of some species. - Cytologia, Tokyo, 19: 317-328. In Felber 1987.














- Tateoka T. (1966):** Notes on *Anthoxanthum nipponicum* Honda, - Journal of Japanese Botany, Tokyo, 41: 85-88.
- Teppner H. (1969):** *Anthoxanthum alpinum* und seine Verbreitung in der Steiermark, - Phytion (Austria), Horn, 13: 305-312.
- Teppner H. (1970):** Karyotypen europäischer, perennierender Sippen der Gramineen-Gattung *Anthoxanthum*. – Österreichische Botanische Zeitschrift 118: 280-292.
- Teppner H. (1998):** *Anthoxanthum maderense* spec. nova und *A. odoratum* (Poaceae-Aveneae) von Madeira und deren chromosomen morphologie. Phytion 38: 307-321.
- Teppner H. (2002):** Poaceae in the greenhouse of the Botanic Garden of the Institute of Botany in Graz (Austria, Europe). - Fritschiana 31: 1-42.
- Thompson J. D. & Lumaret R. (1992):** The evolutionary dynamics of polyploid plants: origin, establishment and persistence. – Trends in Ecology & Evolution 7: 302-307.
- Tovar O. (1993):** Las gramíneas (Poaceae) del Perú. Ruizia 13: 1- 480.
- Tutin T. G. (1950):** A note on species pairs in the Gramineae. - Watsonia, London, 1: 224-227.
- Tutin T. G. (1980):** *Anthoxanthum* L. Pp. 229-230 in Flora Europaea vol. 5, eds. T. G. Tutin, V.H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, and D. A. Webb. Cambridge: Cambridge University Press.
- Tzelev N. N. (1967):** *Anthoxanthum odoratum* L. et *Anthoxanthum odoratum* subsp. *alpinum*. - Spisok Rast. Gerb. Fl. SSSR, Leningrad, 17: 31-32. In Mayová 1982.
- Tzelev N. N. (1976):** *Anthoxanthum* L. - In: Tzelev N. N., Zlaki SSSR, p. 353-355, Leningrad.
- Valdès B. (1973):** Numeros cromosomicos de algunas plantas espanolas. I. Lagascalia 3: 211-217.
- Watson L. & Dallwitz M. J. (1992):** The grass genera of the world. Wallingford: CAB.
- Watson L. & Dallwitz M. J. (2005):** The grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. – Verze: 6.10. 2005. <http://delta-intkey.com>.
- Zeroual-Humbert-Droz C. & Felber F. (1999):** Evidence from isozymes analysis of autopolyploidy in *Anthoxanthum alpinum* Á. & D. LÖWE. – Botanica Helvetica 109: 217-227.

# Přílohy

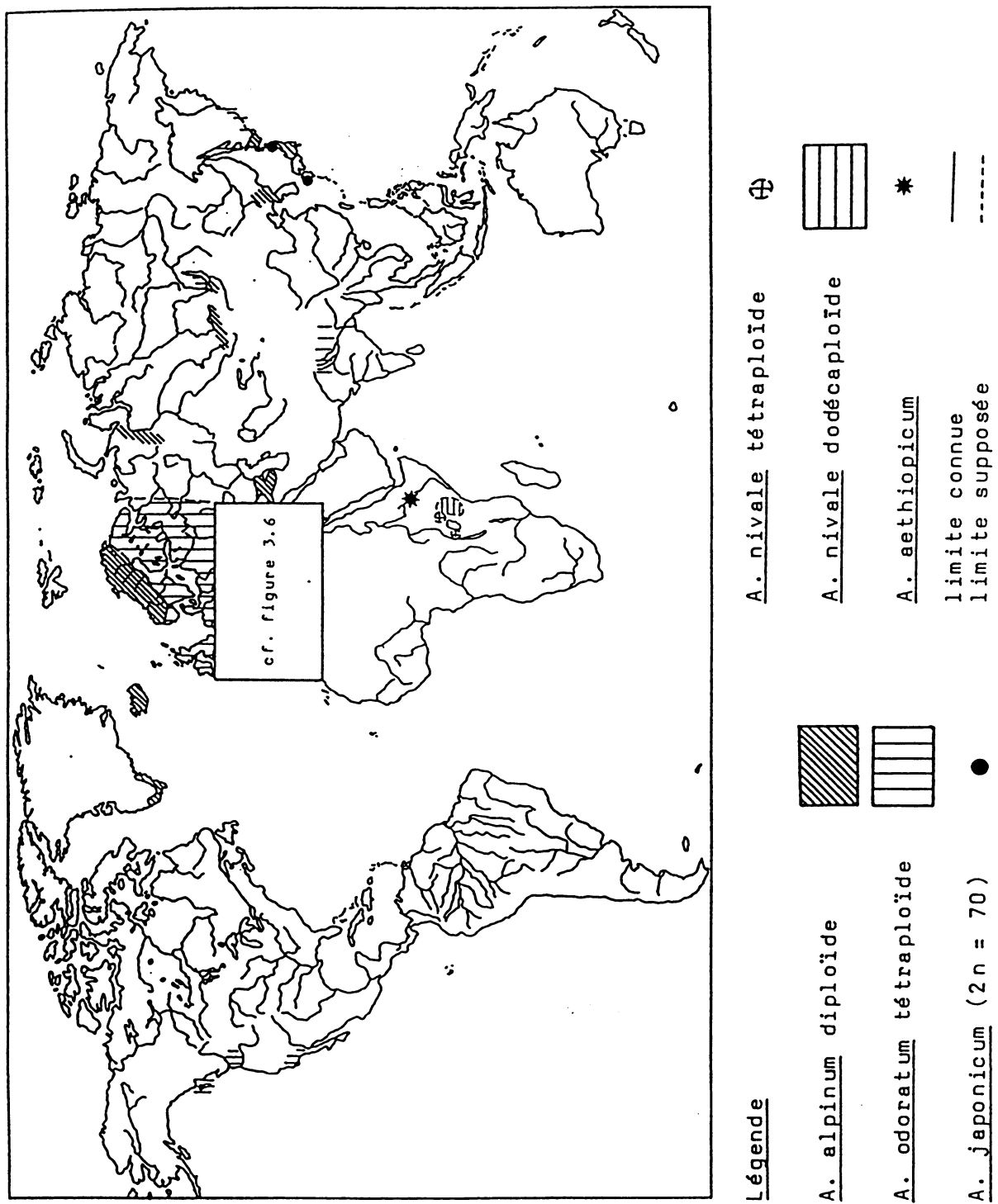
**Obr. č. 1:** Rozšíření vytrvalých druhů *Anthoxanthum* v Evropě (z Felber 1987; pův. obr. 3.6.)  
 (limite connue – známá hranice; limite supposée – předpokládaná hranice areálu výskytu)



Légende :

	Aire connue	Aire supposée
<u>A. alpinum</u> diploïde		
<u>A. alpinum</u> tétraploïde		
<u>A. odoratum</u> diploïde		
<u>A. odoratum</u> tétraploïde		
<u>A. amarum</u> (2n = 80 et 90)		
<u>A. odoratum</u> octoploïde de Corse		
limite connue		
limite supposée		

**Obr. č. 2:** Světové rozšíření vytrvalých druhů rodu *Anthoxanthum* (z Felber 1987)  
 (limite connue – známá hranice; limite supposée – předpokládaná hranice areálu výskytu)



**Obr. č. 3:** NJ strom sestavený na základě genetických vzdáleností odvozených z analýzy AFLP (převzato z Pimentel 2007a)

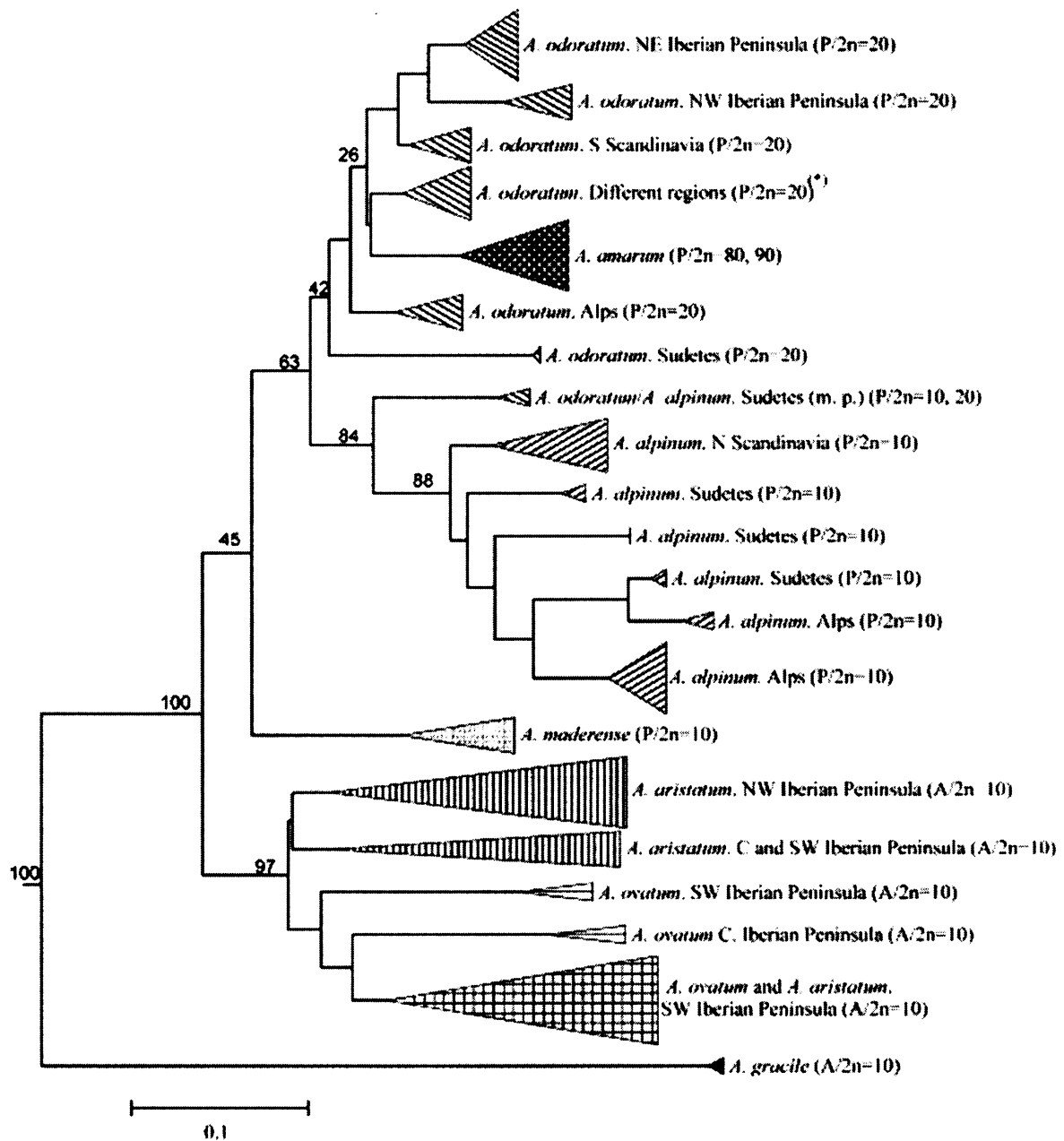


Fig. 2. NJ phenogram based on pairwise Nei & Li distances between individuals of *Anthoxanthum* s. str. *Phalaris coerulescens* was used to root the tree and then pruned from it. IP, Iberian Peninsula; m.p., mixed population. (\*) Admixed group of individuals from the Alps, the Sudetes Mts. and S. Scandinavia. P, perennials; A, annuals.

**Tab. č. 1:** Přehled názvů používaných pro *A. odoratum* a *A. alpinum* různými autory (převzato z Hedberg 1990):

Autor	tetraploid karyotyp I	tetraploid karyotyp II	boreální diploid	mediteránní diploid
Östergen (1942)	odoratum		odoratum	
Löve & Löve (1948)	odoratum		alpinum	
Tutin (1950)	odoratum		alpinum = nipponicum?	
Hadač & Hašková (1956)	odoratum var. alpinum			
Rozmus (1958, 1960)	odoratum		alpinum*	
Bøcher (1961)	odoratum		odoratum ssp. alpinum	
B.M.G. Jones (1963)	alpinum **			
B.M.G. Jones & Melderis (1964)	odoratum		odoratum ssp. alpinum	
K. Jones (1964)	odoratum		alpinum	unnamed species
Tateoka (1966)	odoratum		?nipponicum	
Hedberg (1967, 1969)	tetraploid odoratum		diploid odoratum	
Löve & Löve (1968)	odoratum		nipponicum	
Hedberg (1970)	tetraploid odoratum (K <sub>I</sub> )	tetraploid odoratum (K <sub>II</sub> )	diploid odoratum	
Teppner (1970)	tetraploid odoratum	tetraploid alpinum	diploid alpinum	diploid odoratum
Hedberg (1986)	tetraploid odoratum (K <sub>I</sub> )	tetraploid odoratum (K <sub>II</sub> )	diploid odoratum	diploid odoratum
Felber (1986, 1988)	tetraploid odoratum	tetraploid alpinum	diploid alpinum	diploid odoratum
Tateoka (1987)	odoratum ssp. odoratum		odoratum ssp. alpinum	

\* Rozmus svůj materiál označil jako *A. alpinum* Löve & Löve, ale satelitní chromozomy jím popsané byly chromozomy tetraploida karyotypu I. Podle Rozmuse se tyto chromozomy vyskytují i u diploidů.

\*\* B.M.G. Jones pojmenování postavil na absenci odění rostlin v jeho materiálu.

**Tab. č. 2:** Seznam literatury s výskytem *A. alpinum* (převzato z Felber 1987):

Stát	Citace, upřesnění místa (pokud je uvedeno)
Bulharsko	Kozuharov a Petrova 1973; Pundeva 1974; Pyndeva 1975
Československo/ Česká republika	Holub 1960, Krkonoše a Hrubý Jeseník; Borril 1963 = Jones 1964; Magic & Májovský 1974; Májovský et al. 1974
Čína	Tateoka 1966, Manchourie
Francie	Löve A. & D. 1968, Pyreneje; Teppner 1970, Alpy; Dersch 1974, Vogézy; Ritter 1974, Alpy; Grossetête 1982, Alpy
Grónsko	Böcher et Larsen 1950 v I. Hedberg 1967; Jörgensen et al. 1958
Island	A. & D. Löve 1956; Böcher 1961
Itálie	Teppner 1970; Garbari et al. 1980
Japonsko	Tateoka 1966
býv. Jugoslávie	Teppnes 1970
Německo	Dersch 1974, Bavorské Alpy; Lotto 1982, Bavorské Alpy; Bogenrieder et Stietencron 1985, Černý les
Polsko	Skalinska et al. 1957 v Rozmus 1958; Rozmus 1958 a 1963; Holub 1960
Rakousko	Böcher 1961; Polatschek 1966; Hedberg 1969 a 1970a, Teppner 1969 a 1970
Rumunsko	Polya 1950 v I. Hedberg 1967
Severní Korea	Tateoka 1966
býv. SSSR	Böcher et Larsen 1950 v I. Hedberg 1967, Rusko; Sokolovskaya et Strelkova 1960 v I. Hedberg 1967, Rusko; Tzelev et al. 1964 v Tateoka 1966, Sibiř; Hedberg 1970a, Karpaty a jižní Sibiř; Pashuk 1970, Karpaty; Poghosian et al. 1971 v Moore 1973, Arménie; Belaeva et Siplivinsky 1975 v Goldblatt 1985, Bajkal; Krogulevich 1976 v Goldblatt 1985; Magulaev 1976 v Goldblatt 1985, Gvinianidze & Avaznelli 1980 in Goldblatt 1985; Probatova a Sokolovskaya 1980 v Goldblatt 1985, Altaj
Švédsko	Lövkvist ve Wiemark 1963 v I. Hedberg 1967; Östergen 1942; I. Hedberg 1967 a 1970a
Švýcarsko	Östergen 1942; Böcher 1961; Favarger 1962; Borril 1963 = Jones 1964; Hedberg 1969 a 1970a; Scholte 1977; Felber 1986, Jura
Řecko	Strid et Franzen 1981, Olymp

Tab. č. 3: Seznam literatury s výskytu <sup>LM</sup>*A. odoratum* (převzato z Felber 1987):

Stát	Citace, upřesnění místa (pokud je uvedeno)
Costa Rica	Pohl et Davidse 1971 in Moore 1973
Československo/ Česká republika	Hadač et Hašková 1956; Magic et Májovský 1974; Májovský et al. 1970; Feráková 1972; Hindáková et Zaborski 1977; Kirschner et al. 1982
Dánsko	Böcher 1961, Dánsko i Faerské ostrovy; Böcher et Larsen 1950 in I. Hedberg 1967, Faerské ostrovy
Finsko	Sorsa 1962 in Bolkhovskikh et al. 1969
Francie	Guinochet 1942-43 (studie Rozšíření tetraploidního <i>A. alpinum</i> ve Francii); Böcher 1961; Teppner 1970; Kúpfer 1974, Pyreneje; Grossetête 1982
Indie	Mehra et Sharma 1975, Himaláje; Mehra 1982 in Goldblatt 1985
Irsko	Jones 1964
Island	Östergen 1942; Å. & D. Löve 1956
Japonsko	Tateoka 1953 in Bolkhovskikh et al. 1969 a Tateoka 1954
Kanada	Bowden 1960; Taylor et Mulligan 1968 in Moore 1973
Maďarsko	Polya 1950 in Bolkhovskikh et al. 1969
Maroko	Miège 1939; Valdès 1973; Galland in Favarger et al. 1979; Galland 1984
Německo	Böcher 1961; Bogenrieder & Stietencron 1985, Černý les
Nizozemi	Gadella et Kliphuis 1963 in Bolkhovskikh et al. 1969; Kockx Roon et Wieffering 1982
Norsko	Östergen 1942; Laane 1965 in Engelskjøn 1979; Aaberge 1966 in Engelskjøn 1979; I. Hedberg 1967 a 1970a; Engelskjøn 1979
Polsko	Rozmus 1958
Portugalsko	Fernandes et Quieros 1969; Quieros 1973 a 1974
Rakousko	Polatschek 1966; Hedberg 1969 a 1970
Rumunsko	Teppner 1970; Pauca-Comanescu et Tonciu 1978
Řecko	Jones 1964, Kréta
„Skandinávie“	Östergen 1942; Böcher et Larsen 1950 in I. Hedberg 1967; Bosemark 1957; Böcher 1961; Lövkvist in Weimark 1963 in I. Hedberg 1967; Laane 1965 in I. Hedberg 1967
Slovinsko	Teppner 1970
Spojené státy americké	Heiser et Whitaker 1948 in Bolkhovskikh et al. 1969
Srí Lanka	Gould et Soderstrom 1974
býv. SSSR	Pashuk 1970, Karpaty; Petrova in Prokudin et al. 1977 in Goldblatt 1985, Ukrajina; Krogulevich 1971 in Goldblatt 1985; Belaeva et Siplivinsky 1975 in Goldblatt 1985, Bajkal; Sokolovskaya et Probatova 1976a in Goldblatt 1985, Sachalin a Kurily; Dmitrieva et al. 1977 in Goldblatt 1985, Bělorusko
Španělsko	Böcher 1961; Kúpfer 1969, Sierra Nevada; Kúpfer 1974, Pyreneje a Sierra Nevada; Valdès 1973; Nieto Feliner 1985
Švédsko	Bosemark 1957; I. Hedberg 1967 a 1970a
Švýcarsko	Böcher 1961; Favarger 1962; Hedberg 1969 a 1970a
Velká Británie	O. Hedberg 1958 in I. Hedberg 1967, Skotsko; Borril 1963 a Jones 1964, Anglie; Richard 1972, Skotsko