

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky



Velikost genomu vybraných zástupců cévnatých rostlin Tropicke Afriky

Diplomová práce

Romana Indrová

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Učitelství biologie a chemie pro střední školy
Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **RNDr. Ľuboš Majeský, Ph.D.**
Konzultant práce: **Mgr. Martin Dančák, Ph.D.**

Olomouc 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem zadanou diplomovou práci vypracovala samostatně podle metodických pokynů vedoucího práce s použitím citované literatury a konzultací.

V Olomouci dne

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Lubošovi Majeskému, Ph.D. za zadání velmi zajímavého tématu, odborné vedení a laskavý a trpělivý přístup při vypracování této diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Romana Indrová

Název práce: Velikost genomu vybraných zástupců cévnatých rostlin Tropicke Afriky

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci,
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holic

Vedoucí práce: RNDr. Ľuboš Majeský, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt:

Cílem předkládané diplomové práce bylo změřeni velikosti genomu vybraných zástupců cévnatých rostlin pocházejících z oblasti Tropicke Afriky pomocí průtokové cytometrie. Analyzované rostliny byly vypěstovány ze semen sbíraných na výškovém gradientu na horském masivu Mount Cameroon v Kamerune. Celkově byla velikost genomu změřena pro 43 rostlinných druhů z 27 čeledí. Největší genom, $2C = 94,22$ pg, měl *Nephtytis poissonii* z čeledě Araceae. Nejmenší velikost genomu, $2C = 0,83$ pg, byla naměřena pro blíže neurčený druh *Sarcophrynium* sp. z čeledě Maranthaceae. Největší genom byl tedy 113,5 krát větší, než nejmenší genom. Při porovnání průměrných hodnot velikosti genomu mezi zastoupenými biomy na výškovém gradientu Mt. Cameroon, byl pozorován trend klesání průměrné hodnoty velikosti genomu s rostoucí nadmořskou výškou. Tenhle trend byl pozorován jenom pro lesní biomy po horní hranici lesa. Průměrná hodnota velikosti genomu pro horskou savanu, tedy biom nad horní hranici lesa, je větší než pro horský deštný les. Lze se tedy domnívat, že vztah mezi průměrnou velikostí genomu a nadmořskou výškou není lineární. Získané výsledky poskytují cenný informace o velikosti genomu rostlinných druhů z Tropicke Afriky a téměř v polovině případů se jedná dokonce o první informace o velikosti genomu pro daný rod.

Klíčová slova: průtoková cytometrie, velikost genomu, Tropická Afrika, Mount Cameroon

Počet stran: 53

Počet příloh: 0

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Romana Indrová

Title: Genome size of selected species of vascular plants from Tropical Africa

Type of thesis: Master thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc,
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holic

Supervisor: RNDr. Ľuboš Majeský, Ph.D.

The year of defence: 2015

Abstract:

The aim of the present Master thesis was to determine genome size of selected species of vascular plants from Tropical Africa by means of Flow Cytometry. Analysed plants were grown from seeds collected on altitudinal gradient on Mont Cameroon. Genome size was determined for 43 species from 27 families. The biggest genome, $2C = 94,22$, pg was encountered for *Nephtytis poissonii* from family Araceae. The lowest genome size, $2C = 0.83$ pg, was observed for an undetermined species *Sarcophrynium* sp. from family Maranthaceae. Thus the biggest genome was 113.5 times bigger than the lowest one. Comparing average values of genome sizes of plants from represented biomes on altitudinal gradient showed a pattern of decreasing genome size with increasing altitude. However, this trend was observed only for forest biomes. Average value of genome size for mountain savannah (above the upper tree line) was higher than for mountain forest. Thus, the pattern of average genome size and altitude is not linear. The results provide valued information on genome size of plants from Tropical Africa and almost half of them represent the first records on genome size for particular genera.

Keywords: flow cytometry, genome size, Tropical Africa, Mount Cameroon

Number of pages: 53

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah:

1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1. Velikost genomu rostlin	9
2.1.1. Vztah mezi velikostí genomu, ploidií, životní formou a ekologickými faktory prostředí	11
2.2. Způsoby určování velikosti genomu	13
2.3. Význam poznání velikosti genomu u rostlin	15
2.4. Dostupné databáze	15
2.5. Tropická Afrika	16
2.5.1. Mount Cameroon	22
3. Cíle	28
4. Materiál a metody	29
4.1. Použité chemikálie	29
4.2. Použité roztoky	30
4.3. Laboratorní přístroje	31
4.4. Rostlinný materiál	32
4.5. Příprava vzorku, měření a vyhodnocování	33
5. Výsledky	35
6. Diskuse	41
7. Závěr	44
8. Seznam použitých zkratk	45
9. Seznam literatury	46

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Mapa tropických oblastí na základě Köppenovy klasifikace podnebí.....	16
Obrázek 2: Roční úhrn srážek na Africkém kontinentu	18
Obrázek 3: Mapa znázorňující typy vegetačního pokryvu v Africe.....	21
Obrázek 4: Historická místa výbuchu ve 20 století (*) a směry toku lávy vulkánu Mount Cameroon	23
Obrázek 5: Erupce a tok lávy v roce 1982.....	23
Obrázek 6: Letecký záběr Mount Cameroon.....	24
Obrázek 7: Biotopy Mount Cameroon.....	27
Obrázek 8: Ukázky výsledných histogramů z průtokového cytometru.....	40

Seznam tabulek:

Tabulka 1: <i>Charakteristiky velikosti genomů pro jednotlivé květní říše.</i>	10
Tabulka 2: <i>Terminologie navrženého značení.</i>	11
Tabulka 3: <i>Seznam studovaných druhů.</i>	32
Tabulka 4: <i>Průměrná relativní velikost genomu u měřených druhů</i>	37

1. Úvod

Všechny živé organismy na Zemi mají genetickou informaci uloženou v nukleové kyselině (DNA). Jaderná DNA je uspořádána do chromozomů a genom představuje veškerý genetický materiál v chromozomech určitého organismu. Velikost genomu je jednou z důležitých charakteristik druhu. Souvisí jak s ekologickými faktory prostředí, tak i se způsobem života. Abychom mohli pozorovat jednotlivé souvislosti, musíme být schopni určit velikost genomu. Ten se určuje nejčastěji pomocí průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie umožňuje rychlou a přesnou metodu zjištění velikosti genomu a má obrovskou výhodu v rychlosti a množství spravovaných vzorků a nedestruktivnosti metody.

Rostliny, jež byly studovány v rámci mé diplomové práce, mají svůj původ v tropických oblastech Kamerunu, konkrétně pocházejí z horského masivu Mount Cameroon. Jedná se o velmi zajímavou horu vulkanického původu. Je to jedna z nejaktivnějších sopek v Africe. Vlivem vydatných dešťů a vlhkosti má Mount Cameroon vysokou biodiverzitu, která je jednou z nejvyšších v Africe.

Tato práce se především zabývá velikostí genomu, jeho vztahem s životní formou a ekologickými faktory prostředí. Praktická část se zaměřuje na stanovení velikosti genomu u rostlin posbíraných na Mount Cameroon. U většiny z měřených druhů se jedná o vůbec první určení velikosti genomu pro dané druhy.

2. Literární přehled

2.1. Velikost genomu rostlin

Veškeré živé organismy na Zemi se vyznačují tím, že jejich genetická informace je obsažena v sekvenci nukleových kyselin. V případě eukaryotních organismů, mezi něž patří všechny rostliny a živočichové, je touto kyselinou kyselina deoxyribonukleová (DNA). Jednotlivé molekuly DNA jsou uspořádány do útvarů zvaných chromozomy. Genom představuje veškerý genetický materiál v chromozomech určitého organismu, přičemž pojem zahrnuje jak kódující části DNA (geny), tak také nekódující části DNA. Jeho velikost se obecně vyjadřuje jako celkový počet páru bází (bp) (Genetic Alliance UK). Jinou možností jak vyjádřit velikost genomu je pomocí hmotnostních jednotek, obvykle v pikogramech (pg) (Greilhuber a kol. 2007). Velikost genomu vyjádřenou počtem bází je možné převést na velikost vyjádřenou v pikogramech vydělením faktorem $0,978 \times 10^9$ (rovnice 1) a naopak velikost genomu vyjádřenou v pikogramech je možné převést na počet bází vynásobením stejným faktorem (rovnice 2). Číslo $0,978 \times 10^9$ představuje počet bází v jednom pikogramu DNA při hmotnosti jednoho nukleotidového páru bází $1,023 \times 10^{-9}$ pg (Doležel a kol. 2003).

$$1. \text{ velikost genomu (bp)} = (0,978 \times 10^9) \times \text{obsah DNA (pg)}$$

$$2. \text{ obsah DNA (pg)} = \frac{\text{velikost genomu (bp)}}{0,978 \times 10^9}$$

Množství jaderné DNA a velikost genomu se často označuje jako *C-hodnota*. Zavedení pojmu *C-hodnota* se dává do souvislosti s prací Swifta (Swift 1950), i když ten nikde ve své práci tento pojem přímo nepoužívá. Později bylo specifikováno, že označení „C“ souvisí s pojmem „constant“ tedy „konstantní“ a vztahuje se na konstantní neboli charakteristické množství DNA pro určitý genotyp. *C-hodnota* se užívá k vyjádření množství jaderné DNA nejčastěji v haploidní gametě (Bennett & Leitch 2005a). *C-hodnoty* jaderné DNA se mezi různými rostlinnými skupinami liší až o tři řády a většinou platí, že tyto hodnoty jsou charakteristické pro taxony. Zatímco v roce 2000 byly známy hodnoty v rozsahu od 0,1 do 125 pg (Bennett a kol. 2000), již v roce 2005 bylo diskutováno, že teoretické minimum velikosti genomu může být 0,05 pg v diploidním organismu (Bennett & Leitch 2005b). Takovýto odhad byl následně potvrzen jako zcela správný, neboť došlo k nalezení krytosemenných rostlin z čeledi bublinatkovitých (*Lentibulariaceae*), jejichž

velikost genomu se pohybuje jen kolem 0,065 pg, což odpovídá velikosti 63,6 Mbp (*Genlisea aurea*; Greilhuber a kol. 2006). Také v oblasti maximální hodnoty došlo ke změně. Nejvyšší známá hodnota se změnila na 152,23 pg. Takhle obří genom má druh *Paris japonica* z čeledi kýchavicovitých (*Melanthiaceae*; Pellicer a kol. 2010). Tato hodnota se zároveň stala i nejvyšší známou hodnotou pro eukaryotní organismus. Tyto změny tak vedly k změně rozsahu *C-hodnot* u krytosemenných rostlin až na 2400násobek, přičemž rozsah genomu eukaryotních organismů se změnil na 66000násobek (Pellicer a kol. 2010).

Tabulka 1: Charakteristiky velikosti genomů pro jednotlivé květní říše. Zdroj Suda a kol. (2015).

	Rozsah (pg)	Střední hodnota (pg)	Medián (pg)	Počet chromozomů (2n)	Polyploidie
Krytosemenné	0,06-152,23 (cca. 2400x)	5,9	2,5	4 – 640	Velmi běžná
Nahosemenné	2,25-36,00 (16x)	18,1	17,2	14 – 66	Vzácná
Kaprad'orosty	0,77-72,68 (94x)	12,8	9,2	18 – 1440	Běžná
Mechorosty	0,09-11,97 (136x)	2,4	2,0	14 – 520	Průměrná

V rostlinách stejně jako v dalších eukaryotních organismech je jaderná DNA uspořádána do chromozomů. Počty chromozomů se mezi jednotlivými druhy výrazně liší (Tabulka 1). Počet sad chromozomů, neboli ploidy, se také výrazně liší mezi jednotlivými druhy a skupinami. U nahosemenných je polyploidie relativně vzácná, zatímco u krytosemenných je velmi častá (Bennett 1987). Počet chromozomů, stupeň ploidy a *C-hodnota* jsou pro mnohé organismy prakticky konstantní. V důsledku toho mají důležitou taxonomickou hodnotu (Bennett 1987). Při vyjadřování velikosti genomu je důležité rozlišovat mezi *C-hodnotou* a *Cx-hodnotou*. Pokud hovoříme o celém chromozomovém množství s počtem chromozomů n a to bez ohledu na stupeň generativní ploidy, byl Greilhuberem a spolupracovníky zaveden pojem „*holoploidní genom*“ (Greilhuber a kol. 2005). K naznačení jeho velikosti pak používají termín *C-hodnota*. Pro (průměrný) obsah DNA monoploidního genomu v případě polyploidních ale i nepolyploidních taxonů pak přichází s pojmem *Cx-hodnota*. Obecně pak platí, že u

nepolyploidního organismu jsou *C-hodnota* a *Cx-hodnota* shodné (Greilhuber a kol. 2005). Zavedení pojmu „*holoploidní genom*“ však stále nevyřešilo všechny komplikace. Tyto komplikace jsou spojeny např. se závislostí na pohlaví, či životním cyklem. Zpřesnění použití termínů „*holoploidní*“ (C) a „*monoploidní*“ (Cx) genomové velikosti bylo navrženo v roce 2009. Byly zavedeny horní a dolní indexy, které se připojují k označení C respektive Cx. Ty u rostlin naznačují generaci nebo úsek životního cyklu a kvantitativní vztahy mezi těmito úseky. U živočichů mohou naznačovat pohlaví nebo typ živočicha. (Greilhuber & Doležel 2009).

Tabulka 2: Terminologie navrženého značení velikosti genomu. Zdroj Greilhuber a kol. (2005).

	Monoploidní	Holoploidní
Označení počtu chromozomů	x	N
Termín pro označení obsahu genomové DNA	Velikost genomu	Velikost genomu
Krátké pojmy	Cx-hodnota	C-hodnota
Kvantifikace krátkých pojmů	1Cx, 2Cx, ...	1C, 2C, ...

V několika studiích byl nalezen a následně potvrzen pozitivní vztah mezi obsahem DNA buňky a velikostí (objemem) buňky. Obecně platí, že rozsah velikosti buňky a velikosti genomu je menší u živočichů oproti rozsahu u rostlin. Nejmenší je v případě ptáků a savců. Ve snaze vysvětlit tento vztah bylo vytvořeno několik teorií (Cavalier-Smith, 1982). Jednou z hypotéz, jež se jeví pravděpodobnou, je, že DNA má kromě genetické funkce i funkci stavební, kdy DNA slouží jako kostra. Tomu nasvědčuje i skutečnost, že množství genetické DNA je úměrné složitosti organismu, kdežto množství „sekundární“ DNA (stavební DNA bez specifických sekvencí) roste s objemem buňky (Cavalier-Smith & Beaton, 1999).

2.1.1. Vztah mezi velikostí genomu, ploidií, životní formou a ekologickými faktory prostředí

Velikost genomu závisí na celé řadě faktorů. Jedním z těchto faktorů, a to faktorem značně významným, je ploidie. Obecně se předpokládá, že polyploidní organismy mají při konstantnosti ostatních faktorů větší *C-hodnoty* než jejich diploidní předci. Při testování tohoto předpokladu byly nalezeny tři rysy (Leitch & Bennett 2004):

- většina polyploidních druhů vykazuje přídavek v množství DNA vůči odpovídajícím diploidním druhům,
- mnohé polyploidní druhy vykazují redukci v množství DNA relativně k odpovídajícím diploidním druhům,
- některé polyploidní druhy vykazují zvýšení v množství DNA relativně k příslušným diploidním druhům.

Pozdější studie nicméně přinesly rozdílné výsledky. Bylo zjištěno, že množství DNA není přímo úměrné ploidii, a že střední hodnota velikosti základního genomu se snižuje s tím, jak roste ploidie. Zmenšování genomu se zvyšováním ploidie je široce rozšířený biologický fenomén. Existují cytologické studie, které poskytují důkazy o ztrátě chromozomových segmentů při polyploidizaci (Leitch & Bennett 2004).

Prostředí, ve kterém organismus žije, má výrazný vliv na mnoho jeho základních charakteristik, jako jsou např. životní forma, životní strategie, generační doba, opylování, či hospodaření s vodou. U organismů, které se nemohou aktivně pohybovat, jako jsou rostliny, je vliv prostředí, ve kterém žijí, velice výrazný v porovnání s živočichy. Rostliny se tomuto vlivu přizpůsobují pomocí mnoha adaptací. Pro některé faktory prostředí byla zjištěna přímá korelace s velikostí genomu. Byl pozorován např. vztah mezi množstvím DNA a minimální dobou mezi klíčením a tvorbou prvních zralých semen (Bennett 1972). Druhy s genomem mezi 3 – 25 pg mohou být jednoleté, nebo příležitostně víceleté. Druhy s menším genomem než 3 pg mohou navíc mít generační čas pouze několik týdnů. Druhy s genomem přesahujícím 25 pg jsou pak vždy víceleté. Byla taky nalezena korelace s množstvím slunečního svitu (Price a kol. 1998). Bylo vypořádáno, že rostliny rostoucí ve stínu mají větší genom než rostliny, jež rostly na slunečném stanovišti. Rostliny žijící v polostínu pak vykazovaly ještě menší genom. Dalším faktorem životního prostředí, pro nějž byl studován vztah k velikosti genomu, je vztah k vodě (Wakamiya a kol. 1996). Byla studována velikost genomu ve vztahu k rozměrům vodivých buněk a vodnímu potenciálu v bodě ztráty turgoru v případě šesti druhů borovic. Velikost genomu nekorespondovala s vodivostí xylému, ale velikost genomu korelovala s vodním potenciálem v bodě ztráty turgoru. Větší genom souvisel s nižším potenciálem.

Velikost genomu souvisí nejen s ekologickými faktory prostředí, ale i se způsobem života daného druhu. V případě česneku byla například pozorována pozitivní korelace mezi obsahem jaderné DNA a velikostí semen (Ohri a kol. 1998). Invazivní druhy také vykazují negativní vztah k holoploidní velikosti genomu, ale jsou pozitivně korelované s počtem chromozomů, respektive se stupněm ploidie (Pandit a kol. 2014). Existují

významné trendy mezi počtem chromozomů a morfologií rostliny, její formou, životním prostředím nebo rozšířením. Bylo prokázáno, že dřeviny mají vyšší základní počet chromozomů než byliny. Tato skutečnost může souviset s faktem, že u dřevin byly pozorovány menší chromozomy než u bylin. Zároveň se u dřevin setkáváme méně často s polyploidii (Stebbins 1938). V rámci srovnání několika stovek tropických bylin s bylinami chladnějšího prostředí bylo zjištěno, že chromozomy tropických rostlin jsou menší. Tyto závěry však nejsou univerzální. Rozdíly ve velikosti chromozomů nesouvisí s rozdíly v počtu chromozomů (Levin & Funderburg 1979). Hladina ploidie u krytosemenných rostlin vykazuje závislost na zeměpisné šířce. Byla pozorována i závislost na nadmořské výšce. V několika studiích byl pozorován pozitivní vztah mezi nadmořskou výškou, ve které rostli studované rostliny a velikostí jejich genomu. Jiné studie naopak zjistily negativní vztah, např. studie andského rodu *Lasiocephalus*, kde byl prokázán růst velikosti genomu s klesající nadmořskou výškou (Dušková a kol. 2010). V některých studiích byly výsledky neprůkazné. To vedlo k názoru, že vztah mezi velikostí genomu a nadmořskou výškou není lineární, ale může mít tvar zvonu (Knight a kol. 2005).

2.2. Způsoby určování velikosti genomu

Abychom mohli studovat a sledovat jakoukoliv závislost, jakýkoliv vztah mezi velikostí genomu a příslušnou sledovanou proměnnou, musíme být nejprve schopni určit velikost genomu. První odhady velikosti genomu byly pořízeny použitím chemické extrakce pro izolaci DNA ze známého množství buněk. Tato metoda však byla komplikovaná a pomalá. Významnou metodou pro studium velikosti genomu se v 60. letech stala fotomikrodenzitometrie. Místo extrakce DNA z buněk dochází k obarvení jader a k měření množství absorbovaného světla. Nejběžnější užívanou metodou barvení je pomocí Feulgenovy reakce. Od 80. let se začala více užívat průtoková cytometrie (Leitch & Bennett 2007). Obecně jakákoliv tkáň obsahující vitální jádra může být vhodná pro měření jaderného obsahu pomocí průtokové cytometrie. Ta nejčastěji jako optický parametr využívá fluorescenci. Pro její úspěšnou aplikaci je třeba studovaná jádra obarvit vhodným barvivem, obsahujícím vhodný chromofor. Přítomnost nebo naopak absence endogenních inhibitorů fluorescence má proto primární vliv na kvalitu výsledků získaných z průtokové cytometrie (Greilhuber a kol. 2007).

Pro měření velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie je zapotřebí získání suspenze neporušených jader. Toho se docílí pomocí vhodně zvoleného pufru, ve kterém se rozseká rostlinné pletivo pomocí žiletky. Bylo popsáno mnoho různých pufrů užívaných k izolaci buněčných jader. Všechny izolační pufrы musí splňovat několik základních podmínek, aby mohli být použity. Kromě schopnosti uvolnit jádro z cytoplasmy, musí také být schopny udržet jadernou integritu po celou dobu experimentu a ochránit DNA před degradací endonukleázami. Obvykle obsahují organické pufrы k udržení vhodného pH. To se obvykle pohybuje mezi 7-8, neboť toto pH je kompatibilní s běžnými DNA fluorochromy. Další běžné složky jsou neiontové detergenty k uvolnění jádra, chromatinový stabilizátor, chelatační činidla k vazbě kovů sloužících jako kofaktory nukleáz a anorganické soli (Greilhuber a kol. 2007). Jak je uvedeno výše, je třeba analyzované jádra nejprve obarvit vhodným fluorescenčním barvivem. To musí být schopno absorbovat a emitovat záření o vlnových délkách, jenž se vzájemně dostatečně liší, aby tyto délky mohly být separovány. Fluorochromy, jenž se využívají v rostlinné průtokové cytometrii, se klasifikují do tří kategorií: a) barviva nukleových kyselin (např. propidium jodid), b) barviva proteinů (např. fluorescein) a c) funkční sondy pro monitorování buněčné aktivity *in situ*, např. cyanin (Doležel a kol. 2007). Aby mohly být data z průtokové cytometrie interpretována, je třeba mít referenční vzorky se známou velikostí genomu, se kterými je neznámý vzorek srovnáván. Vzorky použité jako standardy by měli splňovat několik kritérií (Greilhuber a kol. 2007):

1. Měli by být biologicky podobné.
2. Standardní vzorky by měli mít odlišnou genomovou velikost od neznámého vzorku, ale neměli by se příliš lišit.
3. Neměly by obsahovat fluorescenční inhibitory.

Průtoková cytometrie poskytuje několik výhod při měření velikosti genomu oproti jiným metodám. První výhodou je rychlá příprava vzorků. Další výhodou je nedestruktivnost, která umožňuje i opakované analyzování vzácných vzorků. Značnou výhodou jsou také nízké operační náklady. Použití suché tkáně poskytuje podobné výsledky jako použití tkáně čerstvé. To umožňuje použít rychle vysušené tkáně v případech, kdy není možné získat ty čerstvé (Bai a kol. 2012).

2.3. Význam poznání velikosti genomu u rostlin

Velikost genomu je důležitá charakteristika biodiverzity a má velké praktické využití v biologii (Bennett & Leitch 2005c). Velikost genomu je důležitým faktorem při výběru organismu určenému pro kompletní sekvenaci genomu (Leitch & Bennett 2007). Po prokázání vztahu mezi velikostí genomu a minimálním generačním časem (Bennett 1972), bylo zjištěno, že menší genom je potřebný proto, aby se daný organismus stal plevelem (Bennett a kol. 1998). Na základě velikosti genomu tedy můžeme např. posuzovat to, zda má organismus potenciál stát se plevelem. Podobně můžeme odhadovat invazivnost daného organismu. Narůstající počet odhadů velikosti genomu (*C-hodnoty*) slouží také ke komparativním analýzám sledujícím např. vztah mezi velikostí genomu a B-chromozomy (Levin a kol. 2005), trváním buněčného cyklu (Francis a kol. 2008), velikostí semen (Beaulieu a kol. 2007) či růstovou formou (Ohri 2005). Trvání buněčného cyklu stanovuje minimální generační dobu, a proto může omezovat výskyt velkých genomů v prostředí s krátkou vegetační dobou, zvýhodněné jsou pak v něm genomy s malou velikostí. Pro zdárné dokončení svého vývoje je pro jednoleté rostliny charakteristická nižší velikost genomu, na rozdíl od rostlin víceletých (Bennett 1972).

2.4. Dostupné databáze

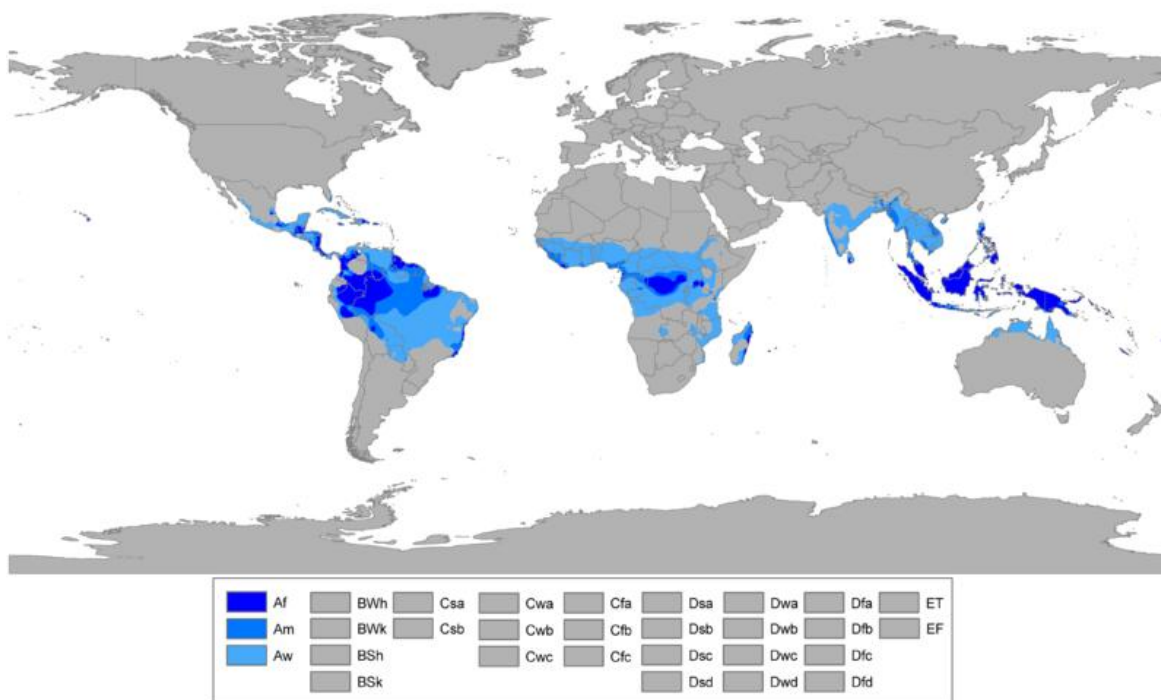
Neustále narůstající množství údajů o velikosti genomu se postupem času stávalo stále více nepřehledným. Také rozporuplnost některých výsledků, která může pramenit např. z různých použitých metod a izolačních postupů, případně rozdílného přístrojového vybavení jednotlivých laboratoří, představovala překážku v nalezení obecných zákonitostí mezi velikostí genomu a některými charakteristikami. Z těchto důvodů vyvstala potřeba získaná data a postupy, jimiž byla tato data analyzována, nějakým vhodným způsobem seskupit a utřídit. Za tímto účelem vzniklo několik databází. Jedním z příkladů takovéto databáze byla databáze FLOWer. Ta byla průběžně aktualizována autory a byla volně dostupná na internetu (<http://flower.web.ua.pt>). Bohužel v dnešní době se daná adresa nedá zobrazit a blog, jenž s danou databází souvisel, přestal být aktualizován v roce 2008.

Nejnámější a nejvýznamnější databáze, shromažďující údaje o velikosti genomu rostlin, je *Kew Plant DNA C-value database* (<http://data.kew.org/cvalues/>). V současné době je v dané databázi k dispozici více než 8500 rostlinných druhů. Naprostou většinu,

více než 7500 druhů, představují rostliny krytosemenné. Nahosemenné rostliny reprezentují 355 druhů. Nejméně záznamu v databázi je pro kaprad'orostry (128 druhů).

2.5. Tropická Afrika

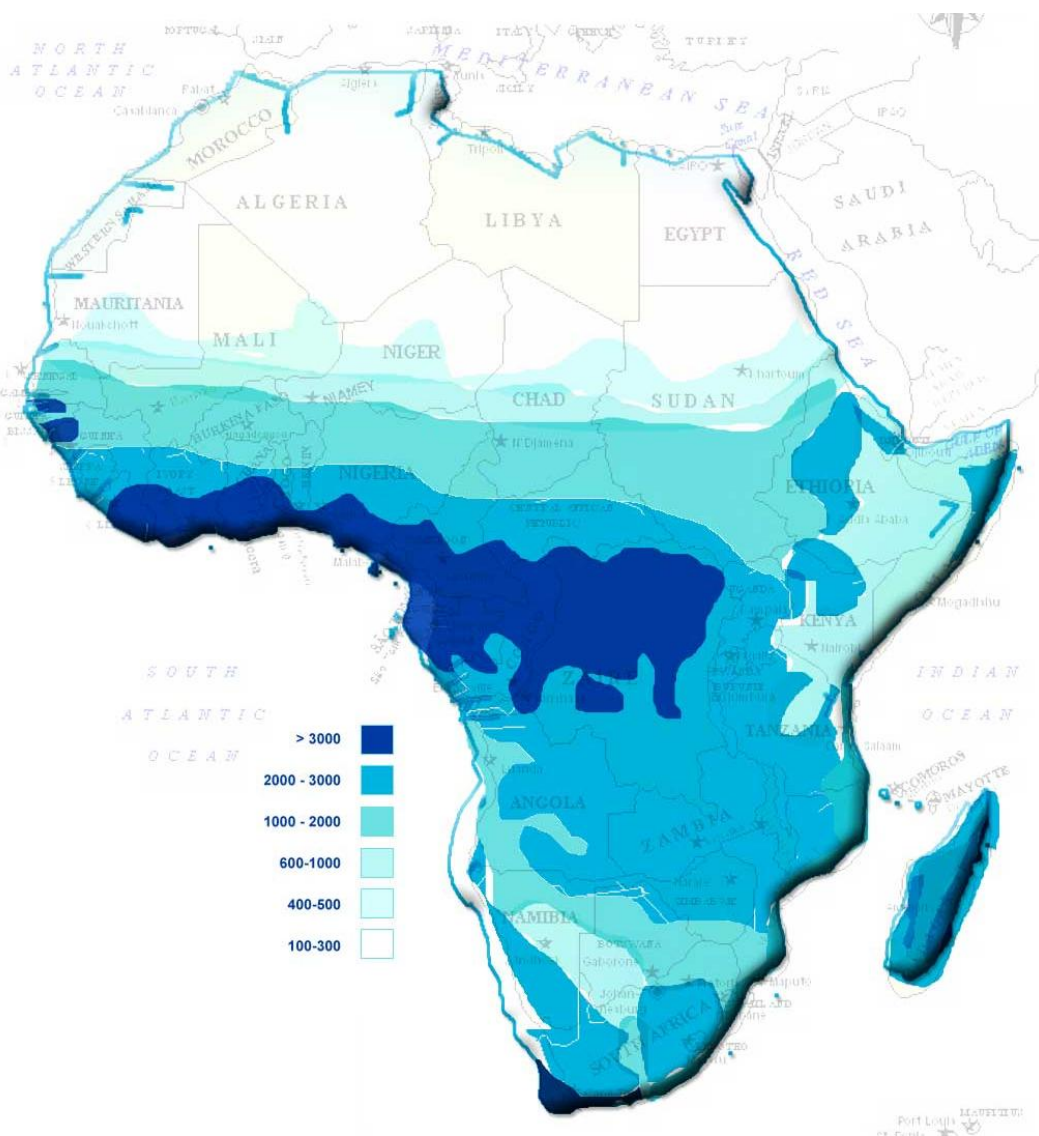
Afrika je druhý největší kontinent po Asii. Pokud bereme Severní a Jižní Ameriku jako jeden kontinent, tak se Afrika stává třetím největším kontinentem. Její rozloha je více jak 30 milionů km², což představuje cca 20,3 % zemské souše. Přes kontinent prochází nultý poledník (tzv. Greenwichský poledník), nultá rovnoběžka (rovník), i oba obratníky (obratník raka a kozoroha). Oblast mezi obratníky pak představuje tropickou část.



Obrázek 1: Mapa tropických oblastí na základě Köppenovy klasifikace podnebí. Zdroj Wikipedie.

Africký kontinent je možné dělit na dvě části. Na část arabskou, která se nachází na severu kontinentu a představuje zhruba třetinu kontinentu, a část subsaharskou, která se nachází jižně od Sahary. Subsaharská Afrika je taky někdy označována jako černá Afrika, a to díky převaze černého obyvatelstva. Pro subsaharskou Afriku bez své jižní části se taky v minulosti používal termín tropická Afrika (Šerý 2014).

Povrch Afriky je vystaven poměrně silné insolaci, díky čemuž je Afrika nejteplejším kontinentem. Pro tropický pás jsou charakteristické vzestupné vzdušné proudy. Díky tomu zde převládá nízký tlak, jenž způsobuje proudění vzduchu ze subtropických oblastí v podobě pasátů. Ty následně v této oblasti vyvolávají prakticky každodenní srážky. Oblast kolem obratníků se naopak vyznačuje sestupným prouděním vzduchu, vysokým tlakem vzduchu, a tím trvalým nedostatkem srážek. Severní a jižní pobřeží Afriky se pak vyznačuje subtropickým podnebím. Rozložení množství srážek v jednotlivých oblastech zachycuje Obrázek 2. Důležitým faktorem je také kontinentalita. Obecně platí, že čím je oblast dále od oceánu, tím menší vliv oceán má na podnebí. Mnohem více se tento fenomén uplatňuje v severní části. V pobřežních oblastech mohou na místní podnebí působit i oceánské proudy. Ty ovlivňují nejen teplotu, ale i množství srážek (Šerý 2014).



Obrázek 2: Roční úhrn srážek na Africkém kontinentu. Zdroj World map.

Tropická dešťová oblast s tropickým pralesním podnebím se vyznačuje trvalým vlhkem a vysokou průměrnou roční teplotou (24 – 30 °C). Průměrná měsíční teplota neklesá pod 18 °C. Setkáme se s ní např. v severní oblasti Konga a Gabonu, ve východní oblasti Demokratické republiky Kongo, či v pobřežních pásech Kamerunu a Nigérie. Na tuto oblast navazuje tropická dešťová oblast se savanovým podnebím. Ta se vyznačuje nižší průměrnou roční teplotou (22 – 25 °C) a také nižšími srážkami. Ty jsou koncentrovány do dvou období během roku. První sahá od konce dubna do července. Druhé, kratší období je na přelomu září a října. Do této oblasti patří většina zemí na západním pobřeží (Šerý 2014).

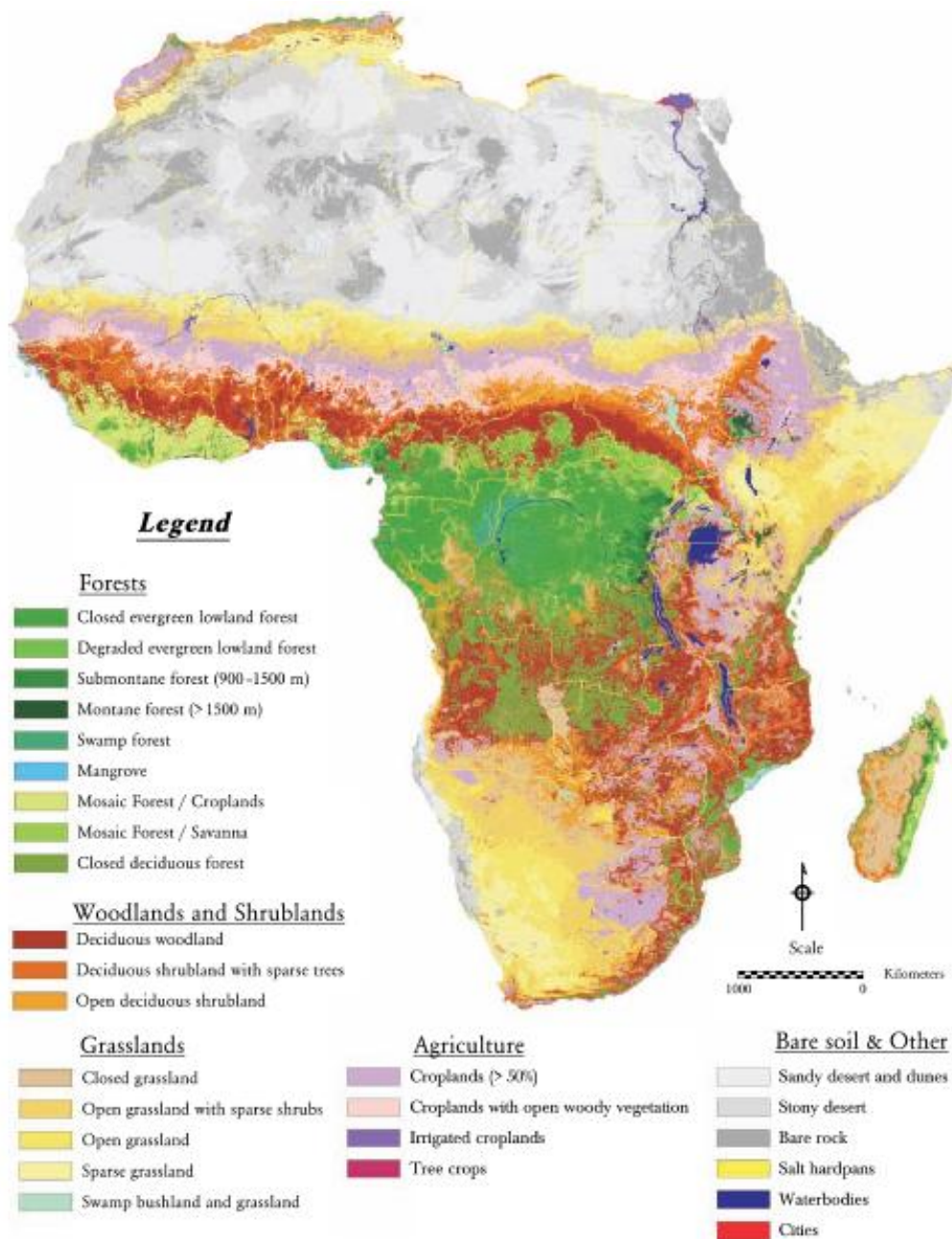
Historie afrického deštného pralesa musela začít někdy v období křídy. Tato datace souvisí se skutečností, že je složen téměř zcela z krytosemenných rostlin. První etapa vývoje krytosemenných rostlin probíhala v severní části super-kontinentu Gondwana. V začátku tohoto období byla dnešní část afrického deštného lesa v centru tohoto super-kontinentu. V důsledku pohybu litosférických desek se rovník ke konci období křídy nacházel na jihu dnešní Sahary a jižních hranic Egypta (Maley 1996). V pozdním eocénu (cca před 45 mil. let) složení flóry jižního Kamerunu začalo připomínat současný stav (Maley 1996). V období pozdní křídy a paleocénu dominovaly velké části severní Afriky nížinné deštné lesy. Savany a lesy byly omezeny na oblast mezi subtropickými deštnými lesy a nížinnými deštnými lesy. Hornaté deštné lesy se vyskytovaly ve východní části kontinentu. Během oligocénu/miocénu se však situace dramaticky změnila. Došlo k posunu rovníku směrem na jih, který byl doprovázen posunem nížinných deštných lesů stejným směrem. Současná distribuce vegetace pak odráží klimatické změny za posledních 7 milionů let. Nížinné deštné lesy se vyskytují od západního pobřeží do rovníkové oblasti, přičemž nesahají k východnímu pobřeží. Savanové lesy se vyskytují na jihu a severu (Wieczorek a kol. 2000).

Na africkém kontinentu jsou dva významné tropické deštné lesy: konžský deštný les a madagaskarský deštný les. Konžský deštný les je druhým největším tropickým deštným lesem na světě. Reprezentuje dokonce 70% afrických lesů (Saiter a kol. 2009). Odhadovaný počet kvetoucích rostlinných druhů v tropické Africe je přes 26 000, což představuje zhruba polovinu druhů nacházejících se v jihovýchodní Asii a méně než třetinu druhů nacházejících se v Jižní Americe (Plana 2004). Nejvíce druhů se nachází v západním Kamerunu, ve východní části Demokratické republiky Kongo a oblasti Rovníkové Guinei (Plana 2004; Saiter a kol. 2009; Linder 2001).

Afrika je velmi bohatá na rostlinný pokryv, přičemž přibližně jednu čtvrtinu tvoří endemity. Důležitými faktory, na nichž je závislá podoba vegetace, jsou geologické podloží, srážky a v neposlední řadě lidská činnost. Flóra Afriky má vztah ke třem floristickým oblastem (Šerý 2014). Jsou jimi:

1. Holartická floristická oblast – zahrnuje flóru na severu Afriky. Typické jsou vegetační formace mediteránního typu s korkovými duby a cedry.
2. Paleotropická floristická oblast – pokrývá většinu Afriky a je členěna do osmi podoblastí

- a. Podoblast africko-asijských pouští – vyznačuje se minimem srážek, které mají za následek nízký výskyt vegetace, a to jak kvantitativně, tak kvalitativně. Typickými rostlinnými představiteli jsou různé druhy akácií a sukulentních rostlin převážně z čeledi pryšcovitých.
 - b. Senegalsko-súdánská podoblast – jedná se o přechodovou zónu mezi tropickými deštnými lesy a pouštěmi, která ovšem není příliš druhově bohatá na rostlinstvo. Množství rostlin koresponduje s množstvím srážek, přičemž nejvyšší je na styku s deštným pralesem.
 - c. Podoblast východoafrických vysočin – najdeme zde suché klimatické oblasti se stepním až polopouštním podnebím, stejně jako dešťové klimatické oblasti se savanovým podnebím.
 - d. Západoafrická podoblast – vegetačně nejbohatší podoblast, do které zasahují tropické deštné oblasti s tropickým pralesním i savanovým podnebím. Jádro oblasti představují stálezelené tropické deštné lesy.
 - e. Jihovýchodoafrická podoblast – floristicky bohaté území. Najdeme zde savanové lesy, horská stepní společenstva a horské tropické lesy.
 - f. Jihoafrická podoblast – Při Atlantickém oceánu se nachází polopouštní a pouštní vegetace. Setkáme se zde i s místy bez vegetace. V západní části vnitrozemí se nacházejí suché savany, ve východní části jsou pak vlhké savany a monzunové lesy.
 - g. Podoblast ostrovů Ascension a Svatá Helena – vegetace je druhotně chudá a její složení je do značné míry ovlivněno člověkem
 - h. Madagaskarská podoblast – ploché pobřeží lemované močály, východní pobřeží je pak pokryto horským stálezeleným deštným pralesem. Vnitrozemí je tvořeno převážně savanou.
3. Kapská floristická oblast – nejmenší oblast na jihozápadě Jižní Afriky. Druhově velmi bohatá. Většina z rostlinných druhů, které se zde vyskytují, jsou endemická.



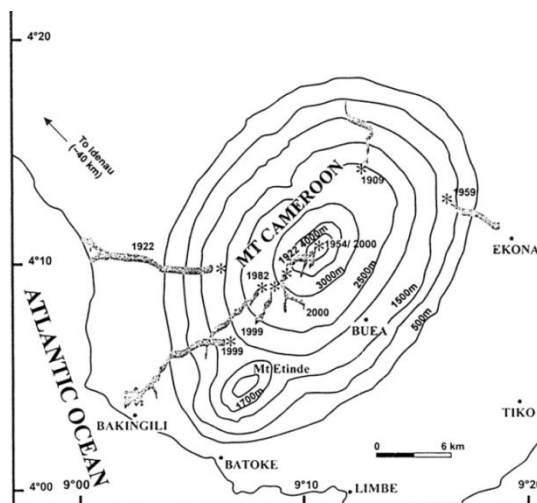
Obrázek 3: Mapa znázorňující typy vegetačního pokryvu v Africe. Zdroj Mayaux a kol. (2004).

Ačkoliv více jak polovina druhů žijících na Zemi se vyskytuje v tropických lesích, jejich rozložení mezi suchými a deštnými lesy je rozdílné. Deštné lesy jsou obecně druhově bohatší, což zřejmě souvisí s dostatkem zdrojů vody. Africké deštné lesy jsou méně druhově bohaté než deštné lesy v Jižní Americe a Indo-Malajské oblasti (Saiter a kol. 2009). Rozdělením subsaharské (tropické) Afriky na základě souřadnic zeměpisné šířky a délky bylo zjištěno, že druhová diverzita rostlin klesá směrem od rovníku k pólům. Tento nárůst navíc závisí na tom, zda se pohybujeme od rovníku severním nebo jižním směrem.

Severním směrem klesá diverzita velmi rychle. Naopak směrem k jihu je pokles diverzity podstatně pomalejší (Linder 2001). Na základě regrese bylo zjištěno, že zeměpisná šířka vysvětluje 13% diverzity oblastí. Dobrým předpokladem pro diverzitu jsou deštné lesy. Přítomnost deštných lesů vysvětluje až 43% rozdílnosti v diverzitě oblastí (Linder 2001). Z pohledu endemismu můžeme najít pozitivní korelaci mezi diverzitou a váženým endemismem. Endemické druhy se navíc napříč subsaharskou Afrikou nevyskytují náhodně, ale jsou koncentrovány do několika lokalit. Největší endemismus byl nalezen v oblasti jižní Afriky. Významné jsou také oblasti na východním pobřeží Afriky v Tanzanii. Také oblast Kamerunu a Gabonu je bohatá na endemické druhy (Linder 2001).

2.5.1. Mount Cameroon

Mount Cameroon neboli Kamerunská hora, či Mt. Fako se nachází na západním atlantickém pobřeží Kamerunu v blízkosti Guinejského zálivu a sahá do výšky 4095 m n. m. Jedná se o nejvyšší horu západní a centrální subsaharské oblasti (Encyclopædia Britannica 2015). Mount Cameroon je vulkanického původu a souvisí se zlomem lokálně nazývaným „Adamawa“, běžícím prakticky ve směru severovýchod-jihozápad. Mount Cameroon tvoří část ze zhruba 1600 km dlouhého řetězce vulkánů, známých také jako Kamerunská vulkanická linie (Suh a kol. 2003). Mt. Cameroon je jediný aktivní vulkán v této části Afriky, ale nachází se zde několik dalších spících sopek (Suh a kol. 2003). Jedná se o jeden z nejaktivnějších vulkánů Afriky. Ve 20. století bylo zaznamenáno celkem sedm erupcí o indexu vulkanické explozivity 2 (Smithsonian Institution). Místa výbuchu, včetně směru toku lávy jsou zobrazeny na Obrázek 4. Poslední zaznamenaná aktivita je z roku 2012 (Smithsonian Institution). Přes 100 kuželů a kráterů se vyskytuje na úbočí a vrcholu a to převážně paralelně s podélnou osou (Suh a kol. 2003).



Obrázek 4: Historická místa výbuchu ve 20 století (*) a směry toku lávy vulkánu Mount Cameroon . Zdroj Suh a kol. (2003).



Obrázek 5: Erupce a tok lávy v roce 1982. Zdroj Smithsonian Institution.

Hory západního Kamerunu obsahují velké zalesněné oblasti, které jsou však v současnosti velmi ovlivněny lidskou činností. V rámci výzkumu pomocí satelitních snímků pořízených mezi lety 1978 a 2001 bylo zjištěno, že celkově ubylo ve sledované oblasti přes 60 % plochy lesních porostů, což představuje úbytek každým rokem přibližně 579 ha lesa. Rychlost odlesňování se navíc každým rokem zvyšovala (Momo Solefack 2009). Toto souvisí se skutečností, že půda hlavního masivu Mt. Cameroon s výjimkou vrcholu a nedávných lávových toků je, díky svému vulkanickému původu, velmi vhodná z pohledu zemědělství a její úrodnost je označována jako prvotřídní (Cable & Cheek 1998). Půda si udržuje vlhkost vlivem vydatných srážek a vlhkosti, a také díky své vysoké schopnosti zadržovat vodu. V půdě byl také prokázán vysoký obsah organického uhlíku a

celkového dusíku, přičemž obsah těchto prvků narůstal s rostoucí nadmořskou výškou. Tento trend však nebyl lineární a byly pozorovány jisté odchylky (Proctor a kol. 2007). K ochraně vzácného prostředí byla zhruba jedna třetina Mt. Cameroon prohlášena národním parkem. Významný vliv na ekosystém mají kromě lidské činnosti také ekologické faktory. S rostoucí nadmořskou výškou bylo pozorováno snížení diverzity stromů. Hranice lesa a mezery v souvislém lesním pokryvu jsou pak vysvětlovány poškozeními lávou či popelem při erupcích (Proctor a kol. 2007) a přítomností slona pralesního (*Loxodonta cyclotis*; Majeský osobní sdělení). Populace slonů žije hlavně v pásně podhorského až horského deštného lesa (1100 – 1900 m n. m.). Les v této oblasti má fragmentární charakter s množstvím „sloních pasek“. Sloni vyvracejí všechny menší stromy, čímž vznikají tzv. lesní světliny (gapy), které velice rychle zarůstají bylinnou vegetací, která jim slouží jako potrava (Majeský osobní sdělení; Cable & Cheek 1998).



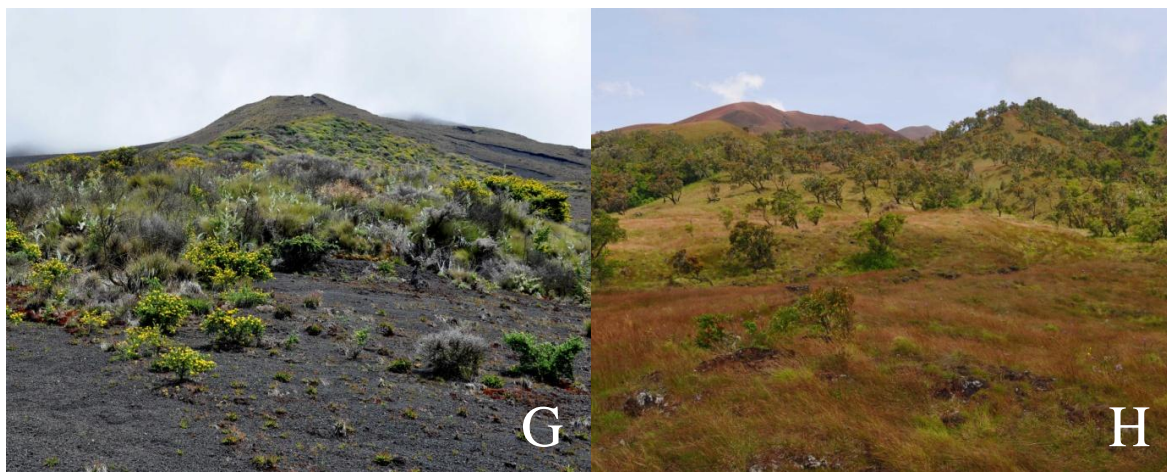
Obrázek 6: Letecký záběr Mount Cameroon. Zdroj <https://blizzardtobreeze.wordpress.com/page/3/>.

Na svazích Mount Cameroon jsou velice dobře zachovány všechny hlavní výškové vegetační stupně, vytvářející se v tropických oblastech (Cable & Cheek 1998). První, nejhůře zachovalý, je stupeň nížinného deštného lesa (0 – 800 m n. m.). Tento typ lesa byl a nadále zůstává nejvíce zasažený lidskou činností (např. zakládáním farem na pěstování palmy olejné (*Elaeis guineensis*), banánů (*Musa sp.*), nebo čaje (*Thea sinensis*), či komerční těžbou dřeva), která podmiňuje jeho charakter a představuje nejvíce ohrožený a zranitelný biom. Typický primární nížinný deštný les se zachoval jenom na několika

nesouvislých plochách na úpatí Mt. Cameroon (oblasti Bambuko, Mokoko, Onge, Bimbia-Bonadikombo). Navzdory dnešní značně zmenšené ploše, nížinný deštný les Mt. Cameroon je druhově nejbohatší s největším počtem endemických druhů. Rostou zde typičtí „stromový pralesní obři“, nacházejí se zde močály a na pobřeží mangrovy. Podhorský deštný les (800 – 1500 m n. m.) byl méně zasáhnut lidskou činností a představuje docela zachovalý typ lesa, v některých částech se dá považovat za primární. Horský deštný les (1500 – 2200 m n. m.) představuje primární typ lesa s dobře zachovalou vegetací, typickou pro africké tropy. Nad hranicí 2200 – 2400 m n. m. přechází les náhle v horské savany, kterým dominuje tráva *Loudetia simplex*, dávající savanám typické červené zbarvení. Horské savany sahají až do nadmořské výšky cca 3200 m n. m., kde postupně přecházejí do subalpínských travnatých formací s řídkým vegetačním pokryvem. Směrem k vyšším nadmořským výškám vegetační pokryv postupně slábne a od nadmořské výšky cca 3800 až po samotný vrchol (4095 m n. m.) vytváří alpínský vegetační stupeň, jenž je tvořen jenom pár, do deseti, druhy vyšších rostlin (Majeský osobní sdělení).

Horní hranice lesa je na Mt. Cameroon výrazně snížena a leží ve výšce 1800 – 2200 m n. m. Hranice není rovnoměrná na celém horském masivu a na jižních svazích dosahuje k výšce 2200 – 2400 m n. m., zatímco na východních svazích klesá až k 1900 – 1400 m n. m. Teoreticky by se horní hranice lesa měla nacházet mezi 3000 – 3200 m n. m., tak jako je tomu u jiných afrických hor, nebo jen u 250 km vzdáleného Mt. Oku. Důvodem pro toto výrazné snížení horní hranice lesa je podloží a požáry. Mladý vulkanický substrát je vysoce propustný a není schopný udržet dostatek vody nezbytný pro růst stromů. Pravidelné požáry vznikající samovolně, a to hlavně koncem období sucha (duben), také výrazně přispívají k udržení snížené horní hranice lesa. Mnohé rostliny horských savan jsou adaptovány na požáry (*Succisa trichotocephala*, *Cyanotis barbata*, *Crassula vaginata*) nebo tolerují pravidelné požáry – jsou tzv. pyrofyty (např. *Hypoxis camerooniana*). Stromy nad horní hranicí lesa jsou velice vzácné a rostou zde jenom solitérní jedinci požár tolerujících druhů (např. *Myrica arborea*, *Erica mannii*, *Agauria salicifolia*; Majeský osobní sdělení).





Obrázek 7: Biotopy Mount Cameroonu A) sloní pastvina – 1100 m n.m., B) Bimbia – nížinný deštný les, C) nelegální těžba dřeva v nížinném deštném lese, D) horský les – 1800 m n.m., E) horská savana – 2800 m n.m., F) alpský stupeň – 3800 m n.m., G) subalpínská vegetace – 3400 m n.m., H) horní hranice lesa. Foto: V. Majeský.

V oblasti Mt. Cameroonu je rok rozdělen do dvou období: období dešťů (květen – říjen) a období sucha (listopad – duben). Z pohledu klimatu se oblast Mt. Cameroonu vyznačuje dostatkem srážek v průběhu celého roku. Většina dešťových srážek spadne v období mezi dubnem až listopadem (Cable & Cheek 1998). Množství srážek se výrazně liší mezi jihozápadní a severovýchodní stranou, která se nachází v dešťovém stínu. Roční srážky dosahují až 10 m za rok v Debuntschi (Richards 1963). Na severovýchodní straně se srážky pohybují kolem 2 m za rok. Srážky klesají také s rostoucí nadmořskou výškou, přičemž dosahují hodnoty kolem 4 m ve výšce 1000 m, 3 m v nadmořské výšce 2000 m a méně jak 2 m na vrcholu (Proctor a kol. 2007). I přes časně přehánky a nadmořskou výšku vrcholu Mt. Cameroonu je sníh na vrcholu vzácný (Cable & Cheek 1998).

3. Cíle

Primárním cílem předkládané diplomové práce bylo změření velikosti genomu 43 druhů cévnatých rostlin pocházející z Tropické Afriky, konkrétně z oblasti hory Mount Cameroon, a to za použití průtokové cytometrie.

Jednotlivé dílčí cíle byly následující:

1. Výsev semen a vypěstování experimentálních rostlin pro analýzu velikosti genomu.
2. Volba vhodných standardů o známé velikosti genomu pro jednotlivé rostlinné druhy
3. Změření velikosti genomu a jeho následné vyhodnocení pro 43 rostlinných druhů vypěstovaných ve skleníku PřF Univerzity Palackého.

4. Materiál a metody

4.1. Použité chemikálie

- β -Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- Etylendiaminotetraacetát disodný (Na_2EDTA) (VWR)
- Chlorid draselný (KCl) (Lachner)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lachner)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) (Lachner)
- Propidium jodid (PI) (Sigma-Aldrich)
- Polyvinylpyrolidin (PVP) (Sigma-Aldrich)
- Spermin (Sigma-Aldrich)
- Trishydroxymetylaminometán (TRIS) (Sigma-Aldrich)
- Triton X 100 (Sigma-Aldrich)

4.2. Použité roztoky

LB01 pufr (200 ml), pH = 7.8

- 363.4 mg TRIS (15mM)
- 148.9 mg Na₂EDTA (2mM)
- 34.8 mg Spermin (0.5mM)
- 1.193 g KCl (80mM)
- 233.8 mg NaCl (20mM)
- 200 µl TRITON X-100 (0.1%)
- 4g PVP
- Rozmíchat a doplnit destilovanou vodou na objem 200 ml
- pH upravovat s 1N HCl
- přefiltrovat přes nylonový filtr s otvory 0.22 µm
- po přefiltrování přidat 220 µl β-Merkaptoetanolu (15 mM)

Roztok propidium jodidu (PI, 50µg/ml), 20 ml

- 1 mg PI se rozpustí ve 20 ml destilované vody a rozpipetuje se po 1 ml do samostatných mikrozkušavek
- Roztok se uchovává v mrazáku při teplotě – 20 °C

4.3. Laboratorní přístroje

- Průtokový cytometr BD Accuri™ C6 (BD Biosciences)
- Bio Vortex V1 (Biosan)

4.4. Rostlinný materiál

Vlastní sběr rostlinného materiálu (semen) pro mou práci probíhal v letech 2012 a 2013 na Mt. Cameroon. Semena rostlin sbíral můj školitel Dr. Ľuboš Majeský, během botanicko-ornitologického výzkumu horského masivu. Semena od každého jedince byla odebírána do samostatného uzavíratelného sáčku. Ke všem studovaným jedincům byly vždy přiděleny unikátní zkratky.

Semena byla později vyseta do plastických krabiček s perlitem a po vyklíčení byla přesazena do květináčů do pěstebního substrátu pro pokojové rostliny a pěstována ve sklenících Katedry botaniky. Každý květináč byl označen štítkem s unikátním kódem označujícím danou rostlinu. Na měření velikosti genomu se vzorky odebírali v čase, když rostliny měli už několik řádných listů. Seznam měřených rostlin s lokalitou původu je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 3: Seznam studovaných druhů. Pro všechny měřené rostliny je v tabulce popsán biotop a nadmořská výška, ve které daný druh roste. Naznačena je i životní forma pro každý druh.

Zkratka	Druh	Biotop	Nadmořská výška	Životní forma
SCA CIN	<i>Scadoxus cinnabarinus</i>	Nížinný deštný les	350 m	bylina/geofyt
ANC DIF	<i>Anchomanes difformis</i>	Podhorský deštný les	1500 m	bylina/geofyt
CER MIR	<i>Cercestis mirabilis</i>	Nížinný deštný les	350 m	hemiepifyt
ANU BAR	<i>Anubias barteri</i>	Nížinný deštný les	700 m	reofyt
NEP POI	<i>Nephtytis poissonii</i>	Nížinný deštný les	700 m	bylina/geofyt
DRA PHR	<i>Dracaena phrynioides</i>	Nížinný deštný les	700 m	bylina
CHL 2	<i>Chlorophytum</i> sp.2	Nížinný deštný les	700 m	bylina/geofyt
CHL 1	<i>Chlorophytum</i> cf. <i>petrophilum</i>	Nížinný deštný les	350 m	bylina/geofyt
ANA	<i>Aneilema</i> sp.	Horský deštný les	1800 m	bylina
POL CON	<i>Pollia condensata</i>	Podhorský deštný les	1100 m	bylina
COS ENG	<i>Costus englerianus</i>	Nížinný deštný les	700 m	bylina
HYP CAM	<i>Hypoxis cammerooniana</i>	Horská savana	2200 m	bylina/geofyt
HES PET	<i>Hesperantha petitiana</i>	Horská savana	3200 m	bylina/geofyt
SAR	<i>Sarcophrynium</i> sp.	Nížinný deštný les	700 m	bylina
LOU SIM	<i>Loudetia simplex</i>	Horská savana	2600 m	bylina
CYA COR	<i>Cyanastrum cordifolium</i>	Podhorský deštný les	1100 m	bylina/geofyt
AFR	<i>Aframomum</i> sp.1	Podhorský deštný les	1500 m	bylina/geofyt
AFR	<i>Aframomum</i> sp.2	Horský deštný les	1800 m	bylina/geofyt
PEP	<i>Peperomia</i> sp.	Horský deštný les - Horská savana	2200 m	epifyt
THA RHY	<i>Thalictrum rhynchocarpum</i>	Horský deštný les	1800 m	bylina
TAB IBO	<i>Tabernanthe iboga</i>	BZ Limbe	0 m	keř
SCH	<i>Schefflera</i> sp.	Horský deštný les	1900 m	strom
2012-38_1	cf. <i>Vernonia</i> sp.	Lávový proud	2600 m	bylina
BID MAN	<i>Bidens mannii</i>	Horská savana	2400 m	bylina

Zkratka	Druh	Biotop	Nadmořská výška	Životní forma
2013-54	<i>Crassocephalum</i> sp.	Lávový proud	2600 m	bylina
CRE HYP	<i>Crepis hypochoeridea</i>	Horská savana	3200 m	bylina
LAC INE	<i>Lactuca inermis</i>	Horská savana	3500 m	dřevnatíci bylina
SON ANG	<i>Sonchus angustissimus</i>	Horská savana	2200 m	dřevnatíci bylina
HEL MAN	<i>Helichrysum mannii</i>	Lávový proud	2600 m	dřevnatíci bylina
HEL CAM	<i>Helichrysum cameroonense</i>	Lávový proud	2600 m	dřevnatíci bylina
IMP ETI	<i>Impatiens etindensis</i>	Podhorský deštný les	1100 m	epifyt
BEG OXY	<i>Begonia oxyanthera</i>	Podhorský deštný les	1500 m	bylina
CRA VAG	<i>Crassula vaginata</i>	Lávový proud	2200 m	bylina/geofyt
AGA SAL	<i>Agauria salicifolia</i>	Horská savana	2400 m	keř/strom
KRO	<i>Crotalaria</i> sp.	Horská savana	2400 m	nízký keř
COL ACU	<i>Cola acuminata</i>	Nížinný deštný les	700 m	strom
PIT MAN	<i>Pittosporum mannii</i>	Horský deštný les	1800 m	strom
PLA PAL	<i>Plantago palmata</i>	Horský deštný les - Horská savana	2200 m	bylina
RUM ABY	<i>Rumex abyssinicus</i>	Horská savana	2600 m	bylina
COF	<i>Coffea</i> cf. <i>brevipes</i>	Nížinný deštný les	350 m	keř
SCHU MAG	<i>Schumanniophyton magnificum</i>	Podhorský deštný les	1100 m	strom
SOL TOR	<i>Solanum</i> cf. <i>torvum</i>	Horský deštný les	2200 m	keř
SOL PSE	<i>Solanum pseudospinosum</i>	Horská savana	2700 m	keř/bylina

4.5. Příprava vzorku, měření a vyhodnocování

Rostlinný materiál, pro zjištění velikosti genomu, byl odebrán ze zdravých zelených částí listů. Ze středních částí listu, tak aby neobsahoval střední žilku, byl odebrán kus rostlinného pletiva o velikosti 0,5 x 0,5 cm a přesunut na Petriho misku. Ke vzorku byl přidán ještě vzorek standardu přibližně stejné velikosti. Poté bylo k rostlinnému materiálu přidáno 550 μ l pufru LB01 s PVP a vzorek i standard byly rozsekány žiletkou na malé kousky. Suspenze byla přefiltrována přes 42- μ m nylonový filtr do ependorfy. Ke vzorku se ještě napipetovalo 20 μ l fluorescenčního barviva PI, vzorek se promíchal a ponechal se odstát minimálně 15 minut ve tmě.

Jako standardy byly použity čerstvé listy *Pisum sativum* cv. *Ctirad* (2C = 8,76 pg DNA; Doležel a kol. 1998), *Zea mays* CE-777 (2C = 5,43 pg DNA; Lysák 1998), *Glycine max* cv. *Polanka* (2C = 2,50 pg DNA; Doležel 1994), *Triticum aestivum* cv. *Saxana* (2C = 34, 24 pg DNA; Duchoslav a kol. 2013) a *Vicia faba* cv. *Inovec* (2C = 26,90 pg DNA; Doležel 1992). Vhodní rostlinný standard, pro každý měřený druh, byl vybrán po

zkušební měření, kdy vzorek byl vždy měřen se třemi různými standardy. O tom jaký standard byl nakonec vybrán, bylo rozhodnuto tak, aby se píky pro G1 fázi měřené rostliny a standardu na histogramu nepřekrývali a byli zřetelně rozeznatelné a standard byl zvolen tak, aby rozdíl ve velikosti genomu měřeného vzorku a standardu nebyl víc 20%.

Před samotným měřením byl vzorek protřepán a analyzován pomocí průtokového cytometru BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) v laboratoři Průtokové cytometrie Katedry botaniky UP. Měřila se fluorescence minimálně 5000 částic. Pozice píku, odpovídajících G1 fázi vzorku a standardu, byla zaznamenána společně s hodnotou CV do tabulky. Každý vzorek byl měřen postupně ve třech následujících dnech zhruba ve stejnou dobu. Velikost genomu byla vypočtena pomocí vzorce 3 pro každé měření samostatně. Finální velikost genomu byla stanovena jako aritmetický průměr velikosti genomu nejméně třech nezávislých měření.

$$3: 2C (\text{měřena vzorka}) = 2C \text{ hodnota standardu} \times \frac{\text{pozice G1 píku vzorky}}{\text{pozice G1 píku standardu}}$$

5. Výsledky

Celkově byla změřena velikost genomu u 43 druhů z 27 čeledí (Tabulka 4). Jednotlivé druhy byly sbírány v různých biotopech s různou nadmořskou výškou. Průměrné CV všech vzorků bylo 4,65 a průměrný CV všech standardů bylo 3,55.

Nejčastější zastoupení druhů bylo z čeledi *Asteraceae*, kde bylo měřeno 8 druhů. Průměrná velikost genomu u měřených druhů z čeledi *Asteraceae* je $2C = 3,94$ pg. Méně početná skupina byla složená ze 4 druhů čeledi *Araceae*, kde průměrná hodnota genomu činila $2C = 49,04$ pg. U této čeledi byl naměřen největší rozdíl ve velikosti genomu mezi jednotlivými druhy, *Nephtytis poissonii* měl velikost genomu $2C = 94,22$ pg a u *Anubias barteri* bylo naměřeno jen $2C = 4,76$ pg. To je více jak 19,79krát menší hodnota než u *Nephtytis poissonii*. U ostatních čeledí se měřili maximálně 3 zástupci. Nejvýše položený druh byl *Lactuca inermis* s nadmořskou výškou 3500 m ($2C = 1,65$ pg) a nejnižše položený druh *Tabernanthe iboga* s nadmořskou výškou 0 m ($2C = 1,42$ pg). Biotop s nejpočetnějším zastoupením byla horská savana (11 druhů a 2 druhy na přechodu horská savana – horský deštný les) a nížinný deštný les (11 druhů). Průměrná velikost genomu 11-ti změřených druhů z horské savany je $2C = 5,89$ pg, nejmenší hodnota byla naměřena u *Agauria salicifolia* ($2C = 0,86$ pg) a největší u *Hypoxis camerooniana* ($2C = 20,07$ pg). U rostlin z nížinného deštného lesa je průměrná hodnota velikosti genomu $2C = 25,72$ pg. Největší hodnotu genomu měl druh *Nephtytis poissonii* ($2C = 94,22$ pg) a nejnižší hodnotu mělo *Sarcophrynium* sp. ($2C = 0,83$ pg). *Nephtytis poissonii* měl vůbec nejvyšší genom a současně *Sarcophrynium* sp. měl nejnižší genom ze všech měřených druhů. Rozsah variability velikosti genomu počítaný jako podíl maximální a minimální hodnoty je 113,5. Rostliny z podhorského deštného lesa měli průměrnou hodnotou velikosti genomu $2C = 15,01$ pg. Největší genom rostlin, z podhorského deštného lesa, byl naměřen pro *Anchomanes difformis* ($2C = 86,26$ pg) a nejměmší pro *Begonia oxyanthera* ($2C = 1,36$ pg). Druhy vyskytující se v biotopu lávového proudu měly průměrnou hodnotu genomu podobnou horské savaně ($2C = 5,70$ pg). Ale pouze jeden jediný druh z této skupiny biotopu měl vyšší hodnotu genomu (*Crassula vaginata*, $2C = 11,02$ pg). Biotop s nejnižší průměrnou hodnotou genomu byl horský deštný les ($2C = 2,38$ pg). *Aneilema* sp. má ze všech druhů z biotopu horského deštného lesa největší genom ($2C = 5,29$ pg), tato hodnota však nepřesahuje žádnou jinou průměrnou hodnotu ostatních biotopů.

Podle životní formy (udává Tabulka 3) byly proměřeny stromy, keře, dřevnatíci byliny, byliny, byliny-geofyty, epifyty, hemiepifyty a reofyty. Jen málo z měřených druhů byly stromy, keře nebo dřevnatíci byliny (po 4 zástupcích), epifyty (2 zástupci), hemiepifyt a reofyt měl jen po 1 zástupci. Nejpočetnější byla skupina bylin (14 zástupců) a byliny-geofyty (11 zástupců). Průměrné hodnoty genomu pro jednotlivé skupiny jsou následující: keře $2C = 2,03$ pg, dřevnatíci byliny $2C = 3,08$ pg, stromy $2C = 3,32$ pg, epifyty $2C = 5,56$ pg, byliny $2C = 4,00$ pg a byliny-geofyty $2C = 35,09$ pg.

Jednotlivé měřené druhy patřili jak mezi jednoděložné (18 druhů), tak i mezi dvouděložné (25 druhů) rostliny. Jednoděložné rostliny (v Tabulce 4: od *Scadoxus cinnabarinus* až *Aframomum* sp. 2) měly průměrnou hodnotu velikosti genomu $2C = 22,83$ pg. U dvouděložných rostlin (v Tabulce 4: od *Peperomia* sp. až *Solanum pseudospinosum*) byla průměrná hodnota velikosti genomu ($2C = 3,89$ pg), to je 5,87krát menší než u jednoděložných rostlin. Nejvyšší genom u dvouděložných rostlin měla *Crassula vaginata* ($2C = 11,02$ pg) a nejnižší *Agauria salicifolia* ($2C = 0,86$ pg). Celkový přehled naměřených hodnot uvádí Tabulka 4.

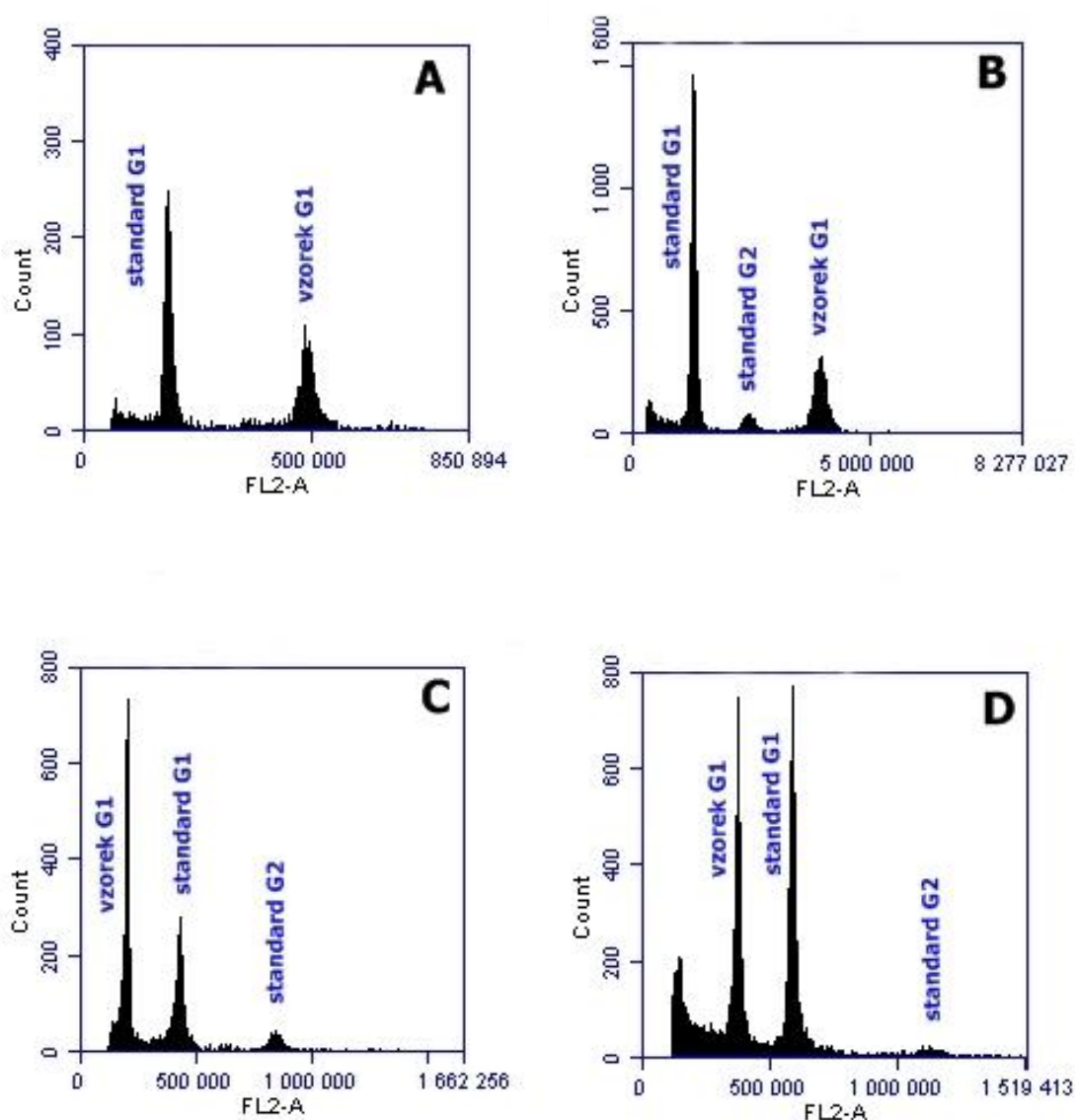
Tabulka 4: Průměrná relativní velikost genomu u měřených druhů. ND - Nížinný deštný les, PD - Podhorský deštný les, HD - Horský deštný les, HS - Horská savana, LP - Lávový proud, BZ Limbe – Botanická zahrada v Limbe, PS - *Pisum sativum* cv. *Ctirad*, , GM - *Glycine max* cv. *Polanka*, TA - *Triticum aestivum* cv. *Saxana* a VF - *Vicia faba* cv. *Inovec*.

Zkratka	Druh	Čeleď	Počet měřených jedinců	Biotop	Nadmořská výška	2C DNA (pg)	1C DNA (pg)	1C DNA (Mbp)	standard	CV standardu	CV vzorku
SCA CIN	<i>Scadoxus cinnabarinus</i>	<i>Amaryllidaceae</i>	2	ND	350 m	82,48	41,24	40331,99	VF	5,08	3,04
ANC DIF	<i>Anchomanes difformis</i>	<i>Araceae</i>	1	PD	1500 m	86,26	43,13	42182,12	TA	5,15	4,77
CER MIR	<i>Cercestis mirabilis</i> *	<i>Araceae</i>	1	ND	350 m	10,90	5,45	5330,71	TA	3,63	4,56
ANU BAR	<i>Anubias barteri</i>	<i>Araceae</i>	2	ND	700 m	4,76	2,38	2315,39	GM	3,14	9,40
NEP POI	<i>Nepthytis poissonii</i> *	<i>Araceae</i>	1	ND	700 m	94,22	47,11	46075,23	TA	5,25	7,15
DRA PHR	<i>Dracaena phrynioides</i>	<i>Asparagaceae</i>	1	ND	700 m	3,89	1,94	1900,32	ZM	2,96	3,58
CHL 2	<i>Chlorophytum</i> sp.2	<i>Asparagaceae</i>	1	ND	700 m	45,97	22,99	22481,06	TA	4,21	4,66
CHL 1	<i>Chlorophytum</i> cf. <i>petrophilum</i>	<i>Asparagaceae</i>	1	ND	350 m	26,43	13,22	12924,30	ZM	4,68	3,56
ANA	<i>Aneilema</i> sp.	<i>Commelinaceae</i>	1	HD	1800 m	5,29	2,65	2587,50	GM	3,33	1,97
POL CON	<i>Pollia condensata</i>	<i>Commelinaceae</i>	1	PD	1100 m	2,81	1,40	1374,48	ZM	1,91	2,85
COS ENG	<i>Costus englerianus</i>	<i>Costaceae</i>	1	ND	700 m	6,35	3,18	3106,65	GM	3,16	4,19
HYP CAM	<i>Hypoxis camerooniana</i>	<i>Hypoxidaceae</i>	1	HS	2200 m	20,07	10,04	9815,63	ZM	3,13	2,65
HES PET	<i>Hesperantha petitiana</i>	<i>Iridaceae</i>	2	HS	3200 m	10,57	5,29	5169,22	ZM	2,19	2,07
SAR	<i>Sarcophrynium</i> sp.	<i>Maranthaceae</i>	1	ND	700 m	0,83	0,41	405,03	GM	6,08	8,13
LOU SIM	<i>Loudetia simplex</i>	<i>Poaceae</i>	2	HS	2600 m	1,07	0,53	534,34	GM	3,28	5,30
CYA COR	<i>Cyanastrum cordifolium</i>	<i>Tecophylaeaceae</i>	2	PD	1100 m	4,87	2,44	2382,89	GM	4,73	4,09
AFR 1	<i>Aframomum</i> sp.1	<i>Zingiberaceae</i>	1	PD	1500 m	2,05	1,02	1004,57	ZM	3,50	4,03

Zkratka	Druh	Čeleď	Počet měřených jedinců	Biotop	Nadmořská výška	2C DNA (pg)	1C DNA (pg)	1C DNA (Mbp)	standard	CV standardu	CV vzorku
AFR 2	<i>Aframomum</i> sp.2	<i>Zingiberaceae</i>	1	HD	1800 m	2,10	1,05	1030,25	ZM	2,02	3,27
PEP	<i>Peperomia</i> sp.	<i>Piperaceae</i>	1	HD-HS	2200 m	8,16	4,08	3988,45	GM	4,50	3,20
THA RHY	<i>Thalictrum rhynchocarpum</i>	<i>Ranunculaceae</i>	1	HD	1800 m	1,41	0,71	689,54	ZM	3,15	4,72
TAB IBO	<i>Tabernanthe iboga</i>	<i>Apocynaceae</i>	1	BZ Limbe	0 m	1,42	0,71	696,60	GM	3,45	5,15
SCH	<i>Schefflera</i> sp.	<i>Araliaceae</i>	1	HD	1900 m	1,84	0,92	898,56	ZM	2,61	4,08
2012-38_1	cf. <i>Vernonia</i> sp.	<i>Asteraceae</i>	2	LP	2600 m	4,41	2,20	2155,37	ZM	2,92	2,96
BID MAN	<i>Bidens mannii</i>	<i>Asteraceae</i>	1	HS	2400 m	5,47	2,74	2676,61	PS	1,8	2,70
2013-54	<i>Crassocephalum</i> sp.	<i>Asteraceae</i>	1	LP	2600 m	5,21	2,60	2545,48	ZM	2,26	2,38
CRE HYP	<i>Crepis hypochoeridea</i>	<i>Asteraceae</i>	2	HS	3200 m	4,11	2,05	2009,20	ZM	2,81	3,76
LAC INE	<i>Lactuca inermis</i>	<i>Asteraceae</i>	1	HS	3500 m	1,65	0,83	808,83	ZM	2,20	5,52
SON ANG	<i>Sonchus angustissimus</i>	<i>Asteraceae</i>	2	HS	2200 m	2,80	1,40	1372,00	ZM	3,51	6,35
HEL MAN	<i>Helichrysum mannii</i>	<i>Asteraceae</i>	2	LP	2600 m	3,92	1,96	1916,61	PS	3,80	4,79
HEL CAM	<i>Helichrysum cameroonense</i>	<i>Asteraceae</i>	2	LP	2600 m	3,94	1,97	1931,44	PS	3,90	4,80
IMP ETI	<i>Impatiens etindensis</i>	<i>Balsaminaceae</i>	1	PD	1100 m	2,95	1,48	1444,96	PS	3,42	7,25
BEG OXY	<i>Begonia oxyanthera</i>	<i>Begoniaceae</i>	1	PD	1500 m	1,36	0,68	664,75	ZM	2,43	9,83
CRA VAG	<i>Crassula vaginata</i>	<i>Crassulaceae</i>	2	LP	2200 m	11,02	5,51	5392,02	GM	4,25	3,07
AGA SAL	<i>Agauria salicifolia</i>	<i>Ericaceae</i>	1	HS	2400 m	0,86	0,43	425,27	GM	2,66	5,42
KRO	<i>Crotalaria</i> sp.	<i>Fabaceae</i>	1	HS	2400 m	2,60	1,30	1273,72	ZM	7,74	11,29

Zkratka	Druh	Čeď	Počet měřených jedinců	Biotop	Nadmořská výška	2C DNA (pg)	1C DNA (pg)	1C DNA (Mbp)	standard	CV standardu	CV vzorku
COL ACU	<i>Cola acuminata</i>	<i>Malvaceae</i>	1	ND	700 m	5,52	2,76	2700,77	PS	3,96	5,71
PIT MAN	<i>Pittosporum mannii</i>	<i>Pittosporaceae</i>	2	HD	1800 m	1,17	0,59	574,10	ZM	3,69	9,04
PLA PAL	<i>Plantago palmata</i>	<i>Plantaginaceae</i>	2	HD-HS	2200 m	3,08	1,54	1507,37	ZM	2,14	3,66
RUM ABY	<i>Rumex abyssinicus</i>	<i>Polygonaceae</i>	2	HS	2600 m	10,66	5,33	5211,19	ZM	5,15	2,93
COF	<i>Coffea cf. brevipes</i>	<i>Rubiaceae</i>	1	ND	350 m	1,62	0,81	795,19	GM	2,85	4,50
SCHU MAG	<i>Schumanniophyton magnificum</i>	<i>Rubiaceae</i>	1	PD	1100 m	4,74	2,37	2320,23	GM	3,34	1,95
SOL TOR	<i>Solanum cf. torvum</i>	<i>Solanaceae</i>	2	HD	2200 m	2,46	1,23	1204,43	ZM	3,14	3,63
SOL PSE	<i>Solanum pseudospinosum</i>	<i>Solanaceae</i>	1	HS	2700 m	4,86	2,43	2378,85	GM	3,32	2,68

Symbolem (*) jsou označovány druhy pouze se dvěma měření



Obrázek 8: Ukázky výsledných histogramů z průtokového cytometru: Analýza mladého listového pletiva A) *Peperomia* sp. a standardu *Glycine max* cv. Polanka B) *Scadoxus cinnabarinus* a standardu *Vicia faba* cv. Inovec, C) *Solanum cf. torvum* a standardu *Zea mays* CE-777, D) *Bidens mannii* a standardu *Pisum sativum* cv. Ctirad. Velký pik odpovídá jádrům se základním množstvím jaderné DNA (G1 fáze cyklu), ve dvounásobné vzdálenosti se nachází jádra s duplikovaným množstvím genetického materiálu (G2 fáze) a signály v levé části označují nespecifickou fluorescenci („šum“). Na svislé ose jsou zobrazeny počty analyzovaných částic a na vodorovné ose relativní intenzita fluorescence.

6. Diskuse

V rámci mé diplomové práce byla změřená velikost genomu u 43 druhů cévnatých rostlin pocházejících z oblasti Tropicke Afriky. Naprostá většina těchto druhů byla měřena poprvé a v dostupných databázích nenalezneme žádné informace o velikosti jejich genomu. Téměř u poloviny druhů nejsou k dispozici dokonce žádná data z příbuzných druhů ze stejného rodu.

V *Kew Plant DNA C-value database* se nachází záznamy pro tři druhy, které jsem měřila i já. Konkrétně se jedná o druhy *Anubias barteri*, *Coffea cf. brevipes* a *Solanum cf. torvum*. Zonneveld se spolupracovníky (2005) měřili velikost genomu pro *Anubias barteri* var. *nana* ($2C = 4,1$ pg) a *Anubias barteri* ($2C = 6,1$ pg), jako standard pro měření použili *Agave americana* ($2C = 15,9$ pg). Hodnota stanovená v rámci mé diplomové práce $2C = 4,76$ pg je blízká hodnotě naměřené Zonneveldem a spolupracovníky (2005) pro druh *Anubias barteri* var. *nana*. V dané databázi existuje také záznam pro *Coffea brevipes*, která také pocházela z Mount Cameroon. Bylo měřeno šest rostlin tohoto druhu, které se lišily genotypem, průměrná hodnota velikosti genomu byla $2C = 1,52$ pg (Cros a kol. 1994). Tyto hodnoty jsou velice blízké mnou naměřené hodnotě $2C = 1,62$ pg. Třetím druhem, který se nacházel v databázi, bylo *Solanum torvum* s velikostí genomu $2C = 2,80$ pg (Bennett & Smith 1991). Moje naměřená hodnota $2C = 2,46$ pg je o 0,34 pg nižší. Rozdíly mezi naměřenými hodnotami v databázi a mými hodnotami mohou být přičítány rozdílům mezi laboratoři nebo rozdílnými standardy (Doležel a kol. 1998).

Pro některé měřené rostliny není známá velikost genomu pro ten daný druh, ale je známa velikost genomu alespoň pro jiné druhy daného rodu. Rozsah velikosti genomu pro tyto rody v některých případech pokrývá mnou naměřenou hodnotu. Takovým druhem je třeba *Bidens manii*, s hodnotou genomu $2C = 5,47$ pg naměřenou v rámci mé práce, která je v rozmezí mezi druhy *Bidens frondosa* ($2C = 5,20$ pg) a *Bidens connata* ($2C = 6,44$ pg; Kubešová a kol. 2010). Dalším příkladem je *Sonchus angustissimus*, kde jsem naměřila velikost genomu $2C = 2,80$ pg. Nejmenší genom z doposud proměřených druhů rodu *Sonchus* má *Sonchus radicans* ($2C = 2,62$ pg; Suda a kol. 2003) a největší *Sonchus asper* ($2C = 5,70$ pg; *Kew Plant DNA C-value database* <http://data.kew.org/cvalues/>). Jiné výsledky získané v rámci mé diplomové práce vedly k rozšíření dosud známého rozsahu *C-hodnot* u jednotlivých rodů. V případě tří rodů posunují mnou získané výsledky spodní hranici dosud zjištěného rozsahu. Největší změna nastala u rodu *Thalictrum*, kde naměřená

hodnota pro *Thalictrum rhynchocarpum* (1,41 pg) je o třetinu nižší než doposud uváděné hodnoty pro *Thalictrum fendleri* (2,20 pg; Bharathan a kol. 1994) a *Thalictrum aquilegifolium* (2,60 pg; Ingle a kol. 1975). Dalším rodem, u něž byla pozorována nižší hodnota genomu, než bylo dosud známo, je rod *Lactuca*. Dosud nejnižší hodnota je pro druh *Lactuca capensis* (2C = 2,02 pg; Doležalová a kol. 2002). *Lactuca inermis* má však menší velikost genomu a to jenom 2C = 1,65 pg. Třetím druhem, u kterého jsem pozorovala nižší hodnotu, než která je dostupná v databázi pro daný rod, je *Scadoxus cinnabarinus* (2C = 82,48 pg). V tomto případě jsou v databázi dostupné informace pouze pro jeden druh *Scadoxus multiflorus* (2C = 88,40 pg; Zonneveld a kol. 2005) a není teda nijak překvapivé, že změřená hodnota se liší. Rozdíl však není nikterak markantní, představuje pouze 7 %. Dá se předpokládat, že v případě analýzy dalších zástupců daného rodu bude pozorováno další rozšíření hodnot velikosti genomu. Podobně jako u rodu *Scadoxus* také u rodu *Cola* je v databázi pouze jedna hodnota, a to hodnota 2C = 4,86 pg pro druh *Cola nitida* (Argout a kol. 2011). Hodnota pro druh *Cola acuminata* byla vyšší (2C = 5,52 pg). Dalším druhem, který přesahoval dosud známé rozmezí velikosti genomu v rámci svého rodu, je *Peperomia* sp. Byla u ní zjištěna velikost 2C = 8,16 pg, čímž posunula horní hranici o 0,26 pg. V rámci čeledi *Asparagaceae* byly analyzovány 3 druhy reprezentující dva rody. V případě rodu *Dracaena* byla v rámci diplomové práce zjištěna hodnota 2C = 3,89 pg. Tato hodnota je o více než 50 % vyšší než dosud nejvyšší publikovaná hodnota, která byla naměřena u *Dracaena deremensis* (2C = 2,52 pg; Veselý a kol. 2012). Dalším rodem, jenž byl v rámci čeledi *Asparagaceae* studován, je rod *Chlorophytum*. Konkrétně byli studováni dva zástupci tohoto rodu. Jeden zástupce, *Chlorophytum* sp. 2, svou velikostí genomu také výrazně přesahoval nejvyšší dosud pozorovanou hodnotu. Horní hranice 2C hodnoty pro daný rod se tak posunula z hodnoty 29,60 pg (*Chlorophytum hoffmannii*; Zonneveld a kol. 2005) na hodnotu 45,97 pg. Poslední zástupce, u kterého byla pozorována vyšší hodnota v rámci rodu, než bylo doposud publikováno, je *Hesperantha petitiana*. V dostupné databázi jsou informace pouze pro jeden druh *Hesperantha bachmannii* (2C = 0,86 pg; Goldblatt a kol. 1984). Námi analyzovaný druh *Hesperantha petitiana* svou 2C hodnotou 10,57 pg, má více než 10x větší genom. Ani takto výrazný rozdíl v rámci jednoho rodu však není nikterak překvapivý a nemusí značit chybu při měření, neboť například u rodu *Rumex* byl pozorován ještě větší rozsah. Kubešová se spolupracovníky (2010) naměřily velikost genomu u *Rumex alpinus* 2C = 0,96 pg a Suda se spolupracovníky (2003) u rodu *Rumex lunaria* 2C = 12,48 pg .

U dvaceti druhů, které byly změřeny, se jedná o výsledky unikátní do té míry, že poskytují první informace o velikosti genomu v rámci daného druhu. Je však možné, že pro některé druhy existují informace o velikosti genomu, ale nenacházejí se v databázi *Kew Plant DNA C-value database* (<http://data.kew.org/cvalues/>). Zjistit skuteční stav by si vyžadovalo podrobné hledání v publikacích. Mezi těmito dvaceti zástupci nalezneme druhy, které v rámci diplomové práce dosahovaly nejvyšší i nejnižší 2C hodnoty. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u druhu *Nephtytis poissonii* (2C = 94,22 pg). Nejnižší hodnota byla nalezena v případě druhu *Sarcophrynium* sp. (2C = 0,83 pg). Ani jedna z těchto hodnot se však neblíží extrémům, které byly pro krytosemenné rostliny pozorovány.

Když dáme do souvislosti velikost genomu a biotop, ze kterého měřené druhy pocházely, můžeme pozorovat náznak některých trendů. V rámci deštného lesa byl pozorován pokles velikosti genomu s rostoucí nadmořskou výškou. Rostliny z nížinného deštného lesa vykazovaly průměrnou 2C hodnotu 25,72 pg. Průměrná hodnota pro podhorský deštný les byla 2C = 15,01pg. 2C hodnota pro rostliny pocházející z horského deštného lesa byla pouhých 2,38 pg. Podobný negativní vztah mezi velikostí genomu a nadmořskou výškou byl pozorován také v případě studie andského rodu *Lasiocephalus* (Dušková a kol. 2010). Rostliny z horské savany, která představovala nejvýše položený studovaný biotop, má průměrnou 2C hodnotu 5,89 pg. Tato hodnota je vyšší než jakou jsme pozorovali v případě níže položeného horského deštného lesa. Tyto výsledky tak naznačují, že vztah mezi velikostí genomu a nadmořskou výškou není lineární, ale má zřejmě zvonovitý tvar jak předpokládá Knight (Knight a kol. 2005). Je třeba však poznamenat, že námi zjištěné průměrné hodnoty pro jednotlivé biotopy vznikly analýzou nestejného počtu zástupců z jednotlivých biotopů a také různých čeledí. Je tedy možné, že při větším množství zástupců z jednotlivých biotopů a čeledí by sledovaná závislost mezi velikostí genomu a nadmořskou výškou mohla doznat podstatných změn.

7. Závěr

Předkládaná diplomová práce přispívá k rozšíření poznatků o velikosti genomu krytosemenných rostlin. Cílem práce bylo vypěstovat rostlinné druhy původem z Tropické Afriky, konkrétně z oblasti Mount Cameroon. Dalším cílem bylo zjištění velikosti genomu u takto připravených rostlin. Oba tyto cíle se podařilo splnit. V rámci práce bylo vypěstováno a následně analyzováno 43 rostlinných druhů, přičemž pouze pro tři druhy byla v databázi dostupná velikost genomu. Téměř polovina studovaných zástupců představuje dokonce první výsledky pro dané rody.

V rámci získaných výsledků byl pozorován vztah mezi velikostí genomu a nadmořskou výškou. Tento vztah byl negativní v případě tropického deštného lesa. Nárůst velikosti genomu pozorovaný při přechodu z horského deštného lesa do horské savany však značí, že vztah mezi velikostí genomu a nadmořskou výškou není lineární.

Ačkoliv naprostá většina výsledků je unikátních a zcela jistě přispěje k lepšímu porozumění významu velikosti genomu, bylo by bezesporu vhodné zanalyzovat ještě další zástupce jednotlivých čeledí a biotopů Mount Cameroon. Tyto výsledky by dále prohloubily naše znalosti o významu velikosti genomu u rostlin a prostředím ve kterém rostou.

8. Seznam použitých zkratek

bp	počet párů bází
pg	pikogram
DNA	deoxyribonukleová kyselina
CV	variační koeficient
PI	propidium jodid
PVP	polyvinylpyrolidín
G1	jádro se základním množstvím jaderné DNA
G2	jádro s duplikovaným množstvím jaderné DNA

9. Seznam literatury

Argout, X., Salse, J., Aury, J. M., Guiltinan, M. J., Droc, G., Gouzy, J. & Brunel, D. (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, 43(2): 101–108.

Bai, C., Alverson, W. S., Follansbee, A. & Waller, D. M. (2012). New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. *Annals of Botany*, 110(8): 1623–1629.

Beaulieu, J. M., Moles, A. T., Leitch, I. J., Bennett, M. D., Dickie, J. B. & Knight, C. A. (2007). Correlated evolution of genome size and seed mass. *New Phytologist*, 173(2): 422–437.

Bennett, M. D. & Leitch, I. J. (2005a). Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany*, 95(1): 45–90.

Bennett, M. D. & Leitch, I. J. (2005b) Genome size evolution in plants. [autor knihy] T. R. Gregory. *The evolution of the genome*. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005, stránky 89–162.

Bennett, M. D. & Leitch, I. J. (2005c). Plant genome size research: a field in focus. *Annals of Botany*, 95(1): 1–6.

Bennett, M. D., & Smith, J. B. (1991). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 334(1271), 309–345.

Bennett, M. D. (1987). Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist*, 106(s1): 177–200.

- Bennett, M. D.** (1972). Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 181(1063): 109-135.
- Bennett, M. D., Bhandol, P. & Leitch, I. J.** (2000): Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses—807 new estimates. *Annals of Botany*, 86(4): 859–909.
- Bennett, M. D., Leitch, I. J. & Hanson, L.** (1998): DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Annals of Botany*, 82(Suppl. 1): 121–134.
- Bharathan, G., Lambert, G. & Galbraith, D. W.** (1994). Nuclear DNA content of monocotyledons and related taxa. *American Journal of Botany*, 381-386.
- Cable, S. & Cheek, M.** (1998): *The plant of Mount Cameroon*. Kent: Royal Botanic Gardens, Kew, 1998. ISBN 1 900347571.
- Cavalier-Smith, T. & Beaton, M. J.** (1999). The skeletal function of non-genic nuclear DNA: new evidence from ancient cell chimaeras. *Genetica*, 106(1-2): 3–13.
- Cavalier-Smith, T.** (1982). Skeletal DNA and the evolution of genome size. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 11(1): 273–302.
- Cros, J., Gavalda, M. C., Chabrillange, N., Récall, C., Duperray, C. & Hamon, S.** (1994). Variations in the total nuclear DNA content in African *Coffea* species (Rubiaceae). *Café Cacao Thé*, 38: 3–3.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L. & Obermayer, R.** (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82(suppl 1): 17–26.

Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H. & Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*, 51: 127–8.

Doležel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. (2007). *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. John Wiley & Sons.

Doležel, J.; Doleželová, M. & Novák, F. J. (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, 36(3): 351–357.

Doležel, J., Sgorbati, S. & Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(4): 625–631.

Doležalová, I., Lebeda, A., Janeček, J., Číhalíková, J., Křístková, E. & Vránová, O. (2002). Variation in chromosome numbers and nuclear DNA contents in genetic resources of *Lactuca* L. species (Asteraceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49(4): 385–397.

Duchoslav, M., Šafářová, L. & Jandová, M. (2013). Role of adaptive and non-adaptive mechanisms forming complex patterns of genome size variation in six cytotypes of polyploid *Allium oleraceum* (Amaryllidaceae) on a continental scale. *Annals of Botany*, 111(3): 419–431.

Dušková, E., Kolář, F., Sklenář, P., Rauchová, J., Kubešová, M., Fér, T. & Marhold, K. (2010). Genome size correlates with growth form, habitat and phylogeny in the Andean genus *Lasiocephalus* (Asteraceae). *Preslia*, 82(1): 127–148.

Francis, D., Davies, M. S. & Barlow, P. W. (2008). A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level. *Annals of Botany*, 101(6): 747–757.

Goldblatt, P., Walbot, V. & Zimmer, E. A. (1984). Estimation of genome size (C-value) in Iridaceae by cytophotometry. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71(1):176–180.

Greilhuber, J. & Doležel, J. (2009). 2C or not 2C: a closer look at cell nuclei and their DNA content. *Chromosoma*, 118(3): 391–400.

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(6): 770–777.

Greilhuber, J., Doležel, J., Lysak, M. A. & Bennett, M. D. (2005). The origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘genome size’ and ‘C-value’ to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*, 95(1): 255–260.

Greilhuber, J., Tensch, E. M. & Loureiro, J. (2007). Nuclear DNA content measurement. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes* (eds J. Doležel, J. Greilhuber and J. Suda), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527610921.ch7, pp. 67-101.

Ingle, J., Timmis, J. N. & Sinclair, J. (1975). The relationship between satellite deoxyribonucleic acid, ribosomal ribonucleic acid gene redundancy, and genome size in plants. *Plant physiology*, 55(3), 496-501.

Knight, C. A., Molinari, N. A. & Petrov, D. A. (2005). The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Annals of Botany*, 95(1): 177–190.

Kubešová, M., Moravcova, L., Suda, J., Jarošík, V. & Pyšek, P. (2010). Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora. *Preslia*, 82(1): 81–96.

Leitch, I. J. & Bennett, M. D. (2004). Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4): 651–663.

Leitch, I. J. & Bennett, M. D. (2007). Genome size and its uses: the impact of flow cytometry. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes* (eds J. Doležel, J. Greilhuber and J. Suda), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527610921.ch7, pp. 153–176.

Levin, D. A. & Funderburg, S. W. (1979). Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. *American Naturalist*, 114(6):784–795.

Levin, D. A., Palestis, B. G., Jones, R. N. & Trivers, R. (2005). Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution*, 59(5): 962–969.

Linder, H. P. (2001). Plant diversity and endemism in sub-Saharan tropical Africa. *Journal of Biogeography*, 28(2): 169–182.

Lysák, M. A. & Doležel, J. (1998). Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia*, 51(2): 123–132.

Maley, J. (1996). The African rain forest—main characteristics of changes in vegetation and climate from the Upper Cretaceous to the Quaternary. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences*, 104: 31–73.

Mayaux, P., Bartholomé, E., Fritz, S. & Belward, A. (2004). A new land-cover map of Africa for the year 2000. *Journal of Biogeography*, 31(6): 861–877.

Momo Solefack, M. C. (2009). *Influence des activités anthropiques sur la végétation du Mont Oku (Cameroun)*. Doctoral dissertation, Amiens.

Ohri, D. (2005). Climate and growth form: the consequences for genome size in plants. *Plant Biology*, 7(5): 449–458.

Ohri, D., Fritsch, R. M. & Hanelt, P. (1998). Evolution of genome size in *Allium* (Alliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 210(1-2): 57–86.

Pandit, M. K., White, S. M. & Pocock, M. J. (2014). The contrasting effects of genome size, chromosome number and ploidy level on plant invasiveness: a global analysis. *New Phytologist*, 203(2): 697–703.

Pellicer, J., Fay, M. F. & Leitch, I. J. (2010). The largest eukaryotic genome of them all? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164(1): 10–15.

Plana, V. (2004). Mechanisms and tempo of evolution in the African Guineo–Congolian rainforest. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1450): 1585–1594.

Price, H. J., Morgan, P. W. & Johnston, J. S. (1998). Environmentally correlated variation in 2C nuclear DNA content measurements in *Helianthus annuus* L. *Annals of Botany*, 82(Suppl. 1): 95–98.

Proctor, J., Edwards, I. D., Payton, R. W. & Nagy, L. (2007). Zonation of forest vegetation and soils of Mount Cameroon, West Africa. *Plant Ecology*, 192(2): 251–269.

Richards, P. W. (1963). Ecological notes on West African vegetation III. The upland forests of Cameroons Mountain. *The Journal of Ecology* 51(3): 529–554.

Saiter, F. Z., Wendt, T., Villela, D. M. & Nascimento, M. T. (2009). Rain Forests: Floristics. *INTERNATIONAL COMMISSION ON TROPICAL BIOLOGY AND NATURAL*

RESOURCES. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Oxford: UNESCO, Eolss Publishers, 203–228.

Stebbins Jr, G. L. (1938). Cytological characteristics associated with the different growth habits in the dicotyledons. *American Journal of Botany* 25(3): 189–198.

Suda, J., Meyerson, L. A., Leitch, I. J. & Pyšek, P. (2015). The hidden side of plant invasions: the role of genome size. *New Phytologist*, 205(3): 994–1007.

Suda, J., Kyncl, T. & Freiová, R. (2003). Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. *Annals of Botany*, 92(1): 153–164.

Suh, C. E., Ayonghe, S. N., Sparks, R. S. J., Annen, C., Fitton, J. G., Nana, R. & Luckman, A. (2003). The 1999 and 2000 eruptions of Mount Cameroon: eruption behaviour and petrochemistry of lava. *Bulletin of Volcanology*, 65(4): 267–281.

Swift, H. (1950). The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36(11): 643.

Šerý, M. (2014) Regionální geografie Afriky. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 978-80-244-3896 –2.

Veselý, P., Bureš, P., Šmarda, P. & Pavlíček, T. (2012). Genome size and DNA base composition of geophytes: the mirror of phenology and ecology?. *Annals of Botany*, 109(1): 65–75.

Wakamiya, I., Price, H. J., Messina, M. G. & Newton, R. J. (1996). Pine genome size diversity and water relations. *Physiologia Plantarum*, 96(1): 13–20.

Wieczorek, A. M., Drewes, R. C. & Channing, A. (2000). Biogeography and evolutionary history of *Hyperolius* species: application of molecular phylogeny. *Journal of Biogeography*, 27(5): 1231–1243.

Zonneveld, B. J. M., Leitch, I. J. & Bennett, M. D. (2005). First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Annals of Botany*, 96(2): 229–244.

Internetové zdroje:

Genetic Alliance UK, dostupné online – <http://www.geneticalliance.org.uk/glossary.htm#>, citováno 20. 3. 2015.

World map, dostupné online – <http://www.mapsnworld.com/africa/annual-rainfall-monsoon-map.html>, citováno 20. 3. 2015.

Wikipedie Otevřená Encyklopedie, dostupné online - <https://en.wikipedia.org/wiki/Tropics>, citováno 20. 3. 2015.

Encyclopædia Britannica, dostupné online – <http://www.britannica.com/place/Mount-Cameroon>, citováno 20. 3. 2015.

Smithsonian Institution, dostupné online – <http://volcano.si.edu/volcano.cfm?vn=224010>, citováno 20. 3. 2015.

Kew Plant DNA C-value database, dostupné online - <http://data.kew.org/cvalues/>,

citováno 15. 4. 2015

Blizzard to Breeze, dostupné online - <https://blizzardtobreeze.wordpress.com/page/3/>, citováno 15. 4. 2015