

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Andreja ČURMAN

**KARIOLOGIJA IN VELIKOST JEDRNEGA
GENOMA SKUPINE POLJSKE BEKICE (*Luzula
campestris* agg.) V ALPAH IN NA BALKANU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Andreja Čurman

**KARIOLOGIJA IN VELIKOST JEDRNEGA GENOMA SKUPINE
POLJSKE BEKICE (*Luzula campestris* agg.) V ALPAH IN NA
BALKANU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**KARIOLOGY AND NUCLEAR GENOME SIZE OF *Luzula campestris*
GROUP IN THE ALPS AND BALKAN**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jasno Dolenc Koce, za somentorico pa doc. dr. Tinko Bačič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Simona STRGULC KRAJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Članica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Članica: doc. dr. Tinka BAČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Član: prof. dr. Nejc JOGAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Datum zagovora: 13.5.2013

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani obliki.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andreja Čurman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 581:57(043.3)=163.6
KG	<i>Luzula</i> /kromosomi/velikost jedrnega genoma/C-vrednost/slikovna citometrija DNA
AV	ČURMAN, Andreja
SA	DOLENC KOCE, Jasna (mentorica)/BAČIČ, Tinka (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2013
IN	KARIOLOGIJA IN VELIKOST JEDRNEGA GENOMA SKUPINE POLJSKE BEKICE (<i>Luzula campestris</i> agg.) V ALPAH IN NA BALKANU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 30 str., 6 pregl., 2 sl., 1 pril., 32 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Skupina poljske bekice (<i>Luzula campestris</i> agg.) je taksonomsko najbolj raznolika skupina znotraj rodu <i>Luzula</i> . Na račun poliploidije in agmatoploidije so vrste znotraj te skupine zastopane z različnimi kromosomskimi števili. Hkrati je širok tudi razpon njihovih vrednosti 2C, ki predstavljajo mero velikosti jedrnega genoma. Preučili smo 47 populacij, ki so uspevale na območju Alp in Balkana. Prešteli smo število kromosomov in izmerili velikost jedrnega genoma v celicah koreninskih vršičkov kalic z uporabo slikovne citometrije DNA. Potrdili smo naslednje kariotipe in taksone: 2n = 12 AL (<i>L. campestris</i> , <i>L. taurica</i>), 2n = 12 AL + 24 BL (<i>L. alpina</i>), 2n = 24 AL (<i>L. divulgata</i>), 2n = 24 BL (<i>L. exspectata</i> , <i>L. divulgatiformis</i>), 2n = 48 CL (<i>L. sudetica</i>), 2n = 36 AL (<i>L. multiflora</i>). Za sedem taksonov (<i>L. campestris</i> , <i>L. alpina</i> , <i>L. divulgata</i> , <i>L. exspectata</i> , <i>L. divulgatiformis</i> , <i>L. sudetica</i> , <i>L. multiflora</i>) smo prispevali nove ocene velikosti jedrnega genoma, za balkansko vrsto <i>L. taurica</i> pa je bila velikost jedrnega genoma ocenjena prvič (2C = 0,82 pg DNA). Iz dobljenih velikosti jedrnega genoma so razvidni trije ploidni nivoji: diploidni (<i>L. campestris</i> , <i>L. taurica</i> , <i>L. exspectata</i> , <i>L. divulgatiformis</i> , <i>L. sudetica</i>) z vrednostmi 2C od 0,81 do 0,92 pg DNA, tetraploidni (<i>L. alpina</i> in <i>L. divulgata</i>) z vrednostima 2C 1,62 in 1,69 pg DNA ter heksaploidni nivo (<i>L. multiflora</i>) z vrednostjo 2C = 2,52 pg DNA. Potrdili smo, da so kariotipi 2n = 24 BL, 2n = 48 CL in delno tudi 2n = 12 AL + 24 BL agmatoploidnega izvora, kariotipa 2n = 24 AL in 2n = 36 AL pa poliploidnega.

KEY WORDS DOKUMENTATION

DN	Dn
DC	UDK 581:57(043.3)=163.6
CK	Luzula/chromosome/nuclear genome size/C-value/DNA-image cytometry
AU	ČURMAN, Andreja
AA	DOLENC KOCE, Jasna (supervisor)/BAČIČ, Tinka (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY	2013
TI	KARIOLOGY AND NUCLEAR GENOME SIZE OF <i>Luzula campestris</i> GROUP IN THE ALPS AND BALKAN
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	X, 30 p., 6 tab., 2 fig., 1 ann., 32 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The <i>Luzula campestris</i> group is taxonomically the most diverse group within the genus. Taxa within the group have several different chromosome numbers due to polyploidy and agmatoploidy. They also have a wide range of 2C values, which represent the measure of nucleus genome size. We examined 47 populations from the Alps and Balkan. Chromosomes were counted and the nuclear DNA amount was measured in root tip cells of seedlings, using interphase-peak DNA image cytometry. The following taxa and karyotypes were confirmed: 2n = 12 AL (<i>L. campestris</i> , <i>L. taurica</i>), 2n = 12 AL + 24 BL (<i>L. alpina</i>), 2n = 24 AL (<i>L. divulgata</i>), 2n = 24 BL (<i>L. exspectata</i> , <i>L. divulgatiformis</i>), 2n = 48 CL (<i>L. sudetica</i>), 2n = 36 AL (<i>L. multiflora</i>). For seven taxa (<i>L. campestris</i> , <i>L. alpina</i> , <i>L. divulgata</i> , <i>L. exspectata</i> , <i>L. divulgatiformis</i> , <i>L. sudetica</i> , <i>L. multiflora</i>) we provided new estimates of nuclear genome size and the first assessment of balkan taxon <i>L. taurica</i> (2C = 0,82 pg DNA). 2C- value data reveal three ploidy levels: diploid level (<i>L. campestris</i> , <i>L. taurica</i> , <i>L. exspectata</i> , <i>L. divulgatiformis</i> , <i>L. sudetica</i>) with 2C values arranged from 0,81-0,92 pg DNA, tetraploid level (<i>L. alpina</i> in <i>L. divulgata</i>) with 2C-values 1,62 pg and 1,69 pg DNA and heksaploid level (<i>L. multiflora</i>) with 2C-value of 2,52 pg DNA. We proofed that the karyotypes 2n = 24 BL, 2n = 48 CL and partly also 2n = 12 AL + 24 BL are of agmatoploid origin and karyotypes 2n = 24 AL and 2n = 36 AL are polyploids.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOKUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE.....	IX
SEZNAM PRILOG.....	X
1 UVOD	1
1.1 Cilji diplomske naloge.....	2
1.2 Delovne hipoteze.....	2
2 PREGLED DOSEDANJIH OBJAV.....	3
2.1 Poliploidija.....	3
2.2 Agmatoploidija	4
2.3 Kromosomi v rodu <i>Luzula</i>	4
2.4 Pregled kariotipov skupine poljske bekice, ki se pojavljajo v Evropi	6
2.6 Velikost jedrnega genoma	8
2.7 Slikovna citometrija	8
2.8 Velikosti jedrnega genoma pri skupini poljske bekice.....	9
3 MATERIAL IN METODE	11
3.1 Rastlinski material.....	11
3.2 Kalitev semen	11
3.2.1 Fiksiranje korenin kalic	11
3.3 Analiza velikosti genoma	12
3.3.1 Barvanje po Feulgenu.....	12
3.3.2 Priprava mikroskopskih preparatov mečkancev	13
3.3.3 Merjenje vrednosti C s slikovno citometrijo DNA	13
3.3.4 Določanje števila kromosomov.....	14
3.3.5 Statistična analiza podatkov.....	14
4 REZULTATI.....	15
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	20
5.1 Razprava	20
5.1.1 Ugotovljeni kariotipi in velikost genoma	20
5.1.2 Variabilnost velikosti jedrnega genoma	21
5.1.3 Komentar k populacijam, ki so bile zajete v raziskavo	22
5.1.3.1 Populacije iz Slovenije	22
5.1.3.2 Populacije iz Avstrije in Italije.....	23
5.1.3.3 Populacije iz Balkanskega polotoka.....	23
5.2 Sklepi.....	25
6 POVZETEK	26
7 VIRI.....	28

ZAHVALA

PRILOGE

Priloga A: Seznam lokalitet

KAZALO SLIK

Slika 1: Kariogrami preučevanih taksonov iz skupine poljske bekice.	15
Slika 2: Velikosti jedrnega genoma vrst iz skupine poljske bekice.....	19

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Evropski taksoni skupine poljske bekice in njihovi kariotipi	6
Preglednica 2: Kariotipi taksonov skupine poljske bekice, ki se pojavljajo v Sloveniji, Avstriji in na Balkanskem polotoku	7
Preglednica 3: Velikost jedrnega genoma (vrednost 2C) pri osmih taksonih sekcije <i>Luzula</i> ...	10
Preglednica 4: Rezultati kariološke analize po posameznih vzorcih	16
Preglednica 5: Rezultati kariološke analize po taksonih	18
Preglednica 6: Razmerja med vrednostmi 2C v skupini poljske bekice	19

OKRAJŠAVE

2n	število kromosomov v jedrih somatskih celic
A	<i>L. alpina</i>
a.e.	arbitrarne enote
AL	nefragmentirani kromosomi
BL	kromosomi polovične velikosti, ki nastanejo po fragmentaciji kromosomov tipa AL
C	<i>L. campestris</i>
CL	kromosomi četrtinske velikosti, ki nastanejo po fragmentaciji kromosomov tipa BL
D	<i>L. divulgata</i>
DF	<i>L. divulgatiformis</i>
E	<i>L. exspectata</i>
IOG	integrirana optična gostota
KV	koeficient variabilnosti
MH	<i>L. multiflora</i>
n. m.	nad morjem
SD	standardni odklon
S	<i>L. sudetica</i>
T	<i>L. taurica</i>

SEZNAM PRILOG

Priloga A: Seznam lokalitet

1 UVOD

Skupina poljske bekice (*Luzula campestris* agg.) je najbolj variabilna in taksonomsko zapletena skupina rodu *Luzula* (fam. *Juncaceae*). Ustreza sekciji *Luzula* (Kirschner, 1992, 2002) oz. kompleksu *Luzula campestris-multiflora* (Nordenskiöld, 1951). V Evropi je zastopana s 17 taksoni, širše v svetu pa uspeva približno 50 vrst (Bačič in sod., 2007b).

Določanje vrst na podlagi morfoloških znakov je zaradi minimalnih razlikovanj težavno, zato so v veliko pomoč kariološki podatki, kot sta število kromosomov in velikost jedrnega genoma.

Različno kromosomsko število pri posameznih vrstah v skupini *Luzula campestris* je odraz dveh pojavov, prave poliploidije in agmatoploidne poliploidije. Agmatoploidija nastane kot posledica simultane kromosomske fragmentacije, ki se pojavi pri kromosomih z difuzno ali policentrično centromero (Nordenskiöld, 1951). Pravi poliploidi so navadno hibridne sestave. Izvirajo iz oploditve nereduciranih gamet, navadno preko semisterilnih križancev, skoraj nikoli pa iz podvojitve kromosomov v hibridni zigoti (Greilhuber in Ehrendorfer, 1988). Pojavlja se tudi križanje med vrstami. Zaradi tovrstnih pojavov je bilo na področjih kariologije in križanja med pripadniki sekcije *Luzula* narejenih veliko raziskav.

V Sloveniji je bilo pred nekaj leti narejenih več raziskav, ki so prispevale k boljšemu pregledu razširjenosti in pojavljanja taksonov skupine poljske bekice na slovenskih tleh. Seveda so hkrati odprle nova vprašanja o problematiki te skupine. Odkriti sta bili dve novi vrsti – *Luzula exspectata* Bačič & Jogan in *Luzula divulgatiformis* Bačič & Jogan ter nov kariotip na tem območju (Bačič in sod., 2007a).

Iz skupine poljske bekice se za območje Slovenije navaja 7 vrst (Bačič, 2007): *L. campestris*, *L. divulgatiformis*, *L. divulgata*, *L. multiflora*, *L. sudetica*, *L. alpina* in *L. exspectata*.

Za območje Avstrije Kirschner (2002) navaja 6 vrst: *L. pallescens*, *L. alpina*, *L. divulgata*, *L. campestris* subsp. *campestris*, *L. sudetica*, *L. multiflora* subsp. *multiflora*, v eni od zadnjih raziskav pa je bila na tem območju potrjena tudi vrsta *L. exspectata* (Bačič in sod., 2007a).

Balkanski polotok je eden od centrov diverzitete bekic. Vrste, ki naj bi se tam pojavljale, so: *L. pallescens*, *L. alpina*, *L. taurica*, *L. divulgata*, *L. campestris* subsp. *campestris*, *L. sudetica*, *L. multiflora* subsp. *multiflora*, *L. fallax*, *L. multiflora* subsp. *snogerupii* (Kirschner, 2002). O razširjenosti in kariologiji teh vrst na Balkanu ni dosti znanega.

Tako v Sloveniji kot Evropi je slabo raziskana in zato še posebej zanimiva problematika alpskih taksonov. Tako naj bi v nižinah prevladovala heksaploidne populacije vrste *L. multiflora*, v višinah pa naj bi te zamenjale tetraploidne populacije. Razlikujejo se po rastišču in morfološko. Heksaploidne populacije se pojavljajo širom po Evropi, tetraploidne pa na območjih nekaterih evropskih gorovij (Kirschner, 1996). Raziskave Bačič in sod. (2007a) doslej niso potrdile tetraploidnih populacij vrste *L. multiflora* v Sloveniji, v Avstriji pa so bile v okviru te raziskave potrjene na več lokalitetah.

1.1 Cilji diplomske naloge

- V izbranih populacijah različnih vrst agregata poljske bekice iz Alp in Balkanskega polotoka bomo določili velikost jedrnega genoma in kariotip.
- Z zanesljivo določitvijo vrst za vse v raziskavo vključene populacije bomo prispevali k poznavanju razširjenosti teh vrst, kar je še posebej pomembno za območje Balkanskega polotoka, kjer je takšnih raziskav zaenkrat malo. Rezultati analize bodo služili kot temelj za širše zasnovano taksonomsko in horološko raziskavo skupine *L. campestris*, ki poteka na tem območju in vključuje terensko delo, revizije lokalnih herbarijev in morfometrijo.
- Raziskava balkanskih vzorcev bo zajela tudi vrste, za katere do zdaj velikosti genoma še niso bile znane.

1.2 Delovne hipoteze

- Za Slovenijo in Avstrijo pričakujemo, da bomo potrdili vse do zdaj znane kariotipe in prispevali nove podatke o velikosti jedrnega genoma za vse vrste, ki uspevajo na tem območju.
- Razmerja med velikostmi genomov diploidov, tetraploidov in heksaploidov bodo naraščala s faktorjem 2 in 3 pri pravih poliploidih, pri agmatoploidih pa bodo velikosti genoma ostajale približno enake, kljub naraščanju števila kromosomov.

2 PREGLED DOSEDANJIH OBJAV

2.1 Poliploidija

Kromosomsko število je število kromosomov v posamezni celici. Na splošno velja, da je kromosomsko število pri vseh posameznikih določene vrste konstantno. Velja tudi, razen za enostavne večkratnike tega števila, da, bolj kot so si vrste sorodne, bolj verjetno imajo enako kromosomsko število in manj kot so si sorodne, bolj verjetno je, da bo njihovo kromosomsko število različno (Stace, 1989).

Kljub temu tudi med ozko sorodnimi vrstami (npr. znotraj rodu) prihaja do precejšnjih razlik v kromosomskem številu. Razlike najpogosteje temeljijo na pojavu poliploidije. V rodu bilnic (*Festuca*) na primer imajo vrste kromosomska števila $2n = 14, 28, 42, 56$ in 70 ; te vrste so znane kot diploidi, tetraploidi, heksaploidi, oktoploidi in dekaploidi. Ta števila očitno temeljijo na številu 7 , ki je gametofitno kromosomsko število diploidnih vrst. To število imenujemo tudi osnovno kromosomsko število (x). Pri diploidni vrsti je $x = n$, pri poliploidni vrsti pa je n večkratnik x . Za neko heksaploidno bilnico tako velja $2n = 6x = 42$ oz. $n = 3x = 21$. Poliploidija je pri rastlinah izredno razširjena in je velika posebnost evolucije rastlin. Ocene deleža vrst kritosemenk, ki so poliploidi, variira med 30% do 70% (Stace, 1989).

Poznamo dva načina izvora poliploidije, in sicer preko somatskega in preko mitotskega procesa. Pri prvem načinu se kromosomsko število v celici podvoji zaradi mitotske jedrne delitve, ki pa je ne spremlja delitev celice (citokineza). Če je taka celica del mladega embria ali meristema, se lahko hitro razvije v bistven del tkiva, ki da izvor za rastlino ali poganjek, ki nato tvori cvetove z diploidnimi sporami (pelodnimi zrni oz. enoceličnimi embrionalnimi vrečkami) in posledično diploidnimi gametami, v primeru uspešne oploditve pa nastanejo poliploidna semena. Pri drugem načinu se na diploidni rastlini diploidne mikro- in megaspore razvijejo zaradi pre-miotičnega podvojevanja ali ne-redukcije pri mejozi. Ponovno so rezultat poliploidna semena.

Če so diploidne rastline na katere se nanašata ta dva načina, različne vrste, katerih genom lahko ponazorimo z AA , bodo tetraploidi, ki izhajajo iz njih, avtopoliploidi ali avtoploidi (avtotetraploidi, označeni z $AAAA$). Če pa je bila diploidna rastlina križanec med dvema rastlinama z neenakim genomom (AB), bo dobljen tetraploid alopoliploid oz. aloploid (alotetraploid, $AABB$) (Stace, 1989). Vse seveda v primeru podvojitve genoma tako v moški kot ženski gameti.

Zgoraj opisani tipi poliploidije se imenujejo evploidija. Znana in pogosta je tudi anevploidija, kjer se kromosomsko število razlikuje od mnogokratnika osnovnega kromosomskega števila (Stace, 1989).

2.2 Agmatoploidija

Agmatoploidija je pojav, ki je možen le pri holocentričnih kromosomih, t.j. kromosomih, ki kažejo centromerno aktivnost vzdolž svoje celotne dolžine. Ti se pojavljajo pri nekaterih skupinah alg in nekaterih rodovih semenk (ostričevke, ločkovke, lilijevke: *Chionographis*). Vsi kromosomski fragmenti se ob celičnih delitvah pravilno dedujejo, saj ohranijo mesta pritrditve na delitveno vreteno. Kromosomi lahko fragmentirajo ali se povežejo (zlepijo) in tako zlahka nastanejo nova števila ob nespremenjeni količini DNA. Fenomen se lahko pojavi v kombinaciji z normalno poliploidijo (Greilhuber in Ehrendorfer, 1988).

2.3 Kromosomi v rodu *Luzula*

Za niz ozkosorodnih vrst znotraj rodu *Luzula* so značilna kromosomska števila, ki dajejo vtis različne stopnje ploidnosti ($2n = 12, 24, 36, 48$) v resnici pa so posledica simultane fragmentacije vseh kromosomov, torej agmatoploidije. Nordenskiöld (1951) je proučevala somatske kromosome in kromosomska števila rodu *Luzula* in ugotovila, da se pri različnih vrstah pojavljajo različno veliki kromosomi. Opredelila je tri različne tipe kromosomskih nepravilnosti:

a) Prava poliploidija

To je običajni tip poliploidije, pri katerem je osnovni kromosomski niz podvojen dvakrat, trikrat oz. štirikrat do tetraploidov, heksaploidov in oktoploidov. Pri teh poliploidih se vsepovsod v celicah pojavljajo kromosomi tako imenovanega AL-tipa.

b) Agmatoploidija

Ta poseben tip poliploidije je Nordenskiöld (1951) poimenovala endonuklearna poliploidija. Vzorec 12 somatskih kromosomov, kjer so kromosomi dolgi 1-2 μm in debeli približno 0,5 μm , je označila kot kromosomski tip AL. Druge vrste imajo kromosome manjše od AL-tipa. Za agmatoploidijo je značilna soodvisnost med številom kromosomov in njihovo velikostjo. Ko se namreč dve ozkosorodni vrsti razlikujeta tako, da ima ena npr. 12 in druga 24 kromosomov, ima tista s 24 kromosomi v resnici pol manjše kromosome, ki so posledica simultane fragmentacije kromosomov. Ta manjši kromosomski tip je poimenovala tip BL. Nekatero vrsto z 48 kromosomi imajo kromosomski tip CL. Ti kromosomi so približno pol manjši kot so kromosomi tipa BL (torej $\frac{1}{4}$ velikosti kromosomov tipa AL) in so med metafazo skoraj kroglasti.

c) Delna agmatoploidija

Kromosomski tipi pri določenih vrstah kažejo poseben tip aneuploidije, ki ga je Nordenskiöld (1951) interpretirala kot polovično endonuklearno poliploidijo. Pri kromosomskem vzorcu teh aneuploidov dva kromosoma BL-tipa zamenjata enega od AL-tipa pri standardnem kromosomskem vzorcu, dva od CL-tipa pa ustrezata enemu od BL-tipa pri endonuklearnih poliploidih.

Mnogo raziskav je bilo narejenih na področjih kariologije in križanja med pripadniki sekcije *Luzula*. Nordenskiöld (1951) je zaslužna za razumevanje karioloških in genetskih odnosov znotraj sekcije *Luzula*.

Kirschnerjeve študije (1992, 1993, 1996, 2002) zajemajo kariološke, horološke in taksonomske raziskave, raziskave križanja, itd.

Bačič in sod. (2007a) so proučevali kariologijo in velikost genoma sedmih vrst na območju jugovzhodnih Alp, ob tem pa so na tem območju odkrili dve novi vrsti s kariotipom $2n = 24$ BL.

2.4 Pregled kariotipov skupine poljske bekice, ki se pojavljajo v Evropi

V Evropi se skupaj s pred nedavnim odkritima vrstama pojavlja 17 taksonov iz skupine poljske bekice (pregl. 1). Skupno so zastopani s sedmimi različnimi kariotipi (12 AL + 24 BL, 24 BL, 12 AL, 48 AL, 24 AL, 36 AL in 48 CL).

Preglednica 1: Evropski taksoni skupine poljske bekice in njihovi kariotipi

Takson	Kariotip (2n)	Razširjenost v Evropi
<i>L. alpina</i> Hoppe	12 AL + 24 BL	Alpe in V Pireneji
<i>L. calabra</i> Tenore	24 BL	J Italija
<i>L. campestris</i> (L.) DC. subsp. <i>campestris</i>	12 AL	Evropa
<i>L. campestris</i> (L.) DC. subsp. <i>navadensis</i>	? (poliploid)	Španija
<i>L. congesta</i> (Thuill.) Lei	48 AL	Z Evropa (od Z in S Skandinavije in Nemčije do Španije in Portugalske)
<i>L. divulgata</i> Kirschner	24 AL	Od V Švedske in S Poljske, srednje Evrope do Bolgarije in Bosne
<i>Luzula divulgatiformis</i> Bačič & Jogan	24 BL	Submediteranska Slovenija, SZ Hrvaška, SV Italija
<i>Luzula exspectata</i> Bačič & Jogan	24 BL	Slovenija, Italija, Avstrija
<i>L. fallax</i> Kirschner	24 BL	Balkanski polotok od Bolgarije do evropskega dela Turčije
<i>L. multiflora</i> (Ehrh.) Lej. ssp. <i>multiflora</i>	24 AL, 36 AL	Evropa
<i>L. multiflora</i> subsp. <i>frigida</i> (Buchen.) V.I.Krecz.	36 AL	Severna Evropa, Islandija, Grenlandija
<i>L. multiflora</i> subsp. <i>hibernica</i> Kirschner & T. C. G. Rich	24 AL	Irska
<i>L. multiflora</i> subsp. <i>snogerupii</i> Kirschner	12 AL + 24 BL	Bolgarija, Grčija
<i>L. multiflora</i> ssp. <i>monticola</i> Kirschner	24 BL	J. Pireneji v Španiji
<i>L. pallescens</i> Sw.	12 AL	Evropa
<i>L. sudetica</i> (Willd.) Schult.	48 CL	Evropa od Islandije, Skandinavije in srednjeevropskih gorstev do Pirenejv, Severne Italije in Balkana
<i>L. taurica</i> (V. I. Krecz.) Novikov	12 AL	Balkan, Krimski polotok, Turčija

Podatki so povzeti iz objav Kirschner (1993, 2002) ter Bačič in sod. (2007a); kot nomenklaturni standard je uporabljena monografija ločkovk (Kirschner, 2002)

2.5 Kariotipi skupine poljske bekice, značilni za območja Slovenije, Avstrije in Balkana

Na območju Slovenije, Avstrije in Balkanskega polotoka se pojavlja šest različnih kariotipov (pregl. 2). Kariotip $2n = 12$ AL imajo vrste *L. campestris*, *L. pallescens* in *L. taurica*, kariotip $2n = 24$ AL pa *L. divulgata* in *L. multiflora* (tetraploid). Vrstam *L. divulgatiformis*, *L. exspectata* in *L. fallax* pripada kariotip $2n = 24$ BL, vrstama *L. alpina* in *L. multiflora* subsp. *snogerupii* pa kariotip $2n = 12$ AL + 24 BL. Vrsto *L. multiflora* (heksaploid) predstavlja kariotip $2n = 36$ AL, vrsto *L. sudetica* pa kariotip $2n = 48$ CL.

Preglednica 2: Kariotipi taksonov skupine poljske bekice, ki se pojavljajo v Sloveniji, Avstriji in na Balkanskem polotoku

Območje	Kariotip (2n)	Takson
Slovenija	12 AL	<i>L. campestris</i>
	24 AL	<i>L. divulgata</i>
		<i>L. multiflora</i> (tetraploid)
	24 BL	<i>L. divulgatiformis</i>
		<i>L. exspectata</i>
	36 AL	<i>L. multiflora</i> (heksaploid)
	48 CL	<i>L. sudetica</i>
	12 AL + 24 BL	<i>L. alpina</i>
Avstrija	12 AL	<i>L. campestris</i>
		<i>L. pallescens</i>
	24 AL	<i>L. divulgata</i>
		<i>L. multiflora</i> (tetraploid)
	24 BL	<i>L. exspectata</i>
	36 AL	<i>L. multiflora</i> (heksaploid)
	48 CL	<i>L. sudetica</i>
	12 AL + 24 BL	<i>L. alpina</i>
Balkanski polotok	12 AL	<i>L. campestris</i>
		<i>L. pallescens</i>
		<i>L. taurica</i>
	24 AL	<i>L. divulgata</i>
	24 BL	<i>L. fallax</i>
	36 AL	<i>L. multiflora</i> (heksaploid)
	48 CL	<i>L. sudetica</i>
	12 AL + 24 BL	<i>L. alpina</i>
		<i>L. multiflora</i> subsp. <i>snogerupii</i>

Podatki so povzeti iz objav Kirschner (1993, 2002) ter Bačić in sod. (2007a)

2.6 Velikost jedrnega genoma

Genom je celotna genska informacija celice ali organizma, tudi molekula DNA, ki to informacijo vsebuje (Dermastia, 2007).

Vsak genom ima svojo velikost, ki jo lahko izrazimo z njegovo maso v pikogramih DNA ali s številom baznih parov. Holoploidna velikost jedrnega genoma (iz grščine, v kateri holos pomeni celoten) je količina DNA v vseh kromosomih jedra ne glede na stopnjo poliploidnosti. Označujemo jo kot vrednost C. Vrednost 1C pomeni količino DNA v nepodvojenem reduciranem kromosomskem kompletu (npr. po mejozi), kar izhaja iz aritmetičnega pravila, da je 1C polovica zigotne vrednosti 2C (Dermastia, 2007).

Količina jedrne DNA se med celičnim ciklom spreminja. V somatskih celicah sporofitov kritosemenk, ki se mitotsko delijo, jedra vsebujejo vrednosti DNA od 2C (telofaza mitoze, faza G1) do 4C (faza G2, profaza mitoze) ter vmesne vrednosti, ko se DNA med fazo S podvojuje (Dolenc Koce, 2001).

Količino DNA lahko izrazimo na več načinov. Relativno količino DNA izrazimo z arbitrarnimi enotami, vendar ima taka mera zelo omejeno uporabnost, saj to ni enota, ki bi bila umerjena in zato ne omogoča primerjave med laboratoriji oz. metodami. Z uporabo standardnih umeritvenih vrst z znano vrednostjo C lahko relativno količino DNA pretvorimo v absolutno, ki jo izrazimo v pikogramih DNA ali kot število nukleotidnih parov (Dolenc Koce, 2001). Pretvorba števila nukleotidnih parov v pg DNA znaša 1 pg DNA na 978 megabaznih parov (Doležel in Greilhuber, 2010).

2.7 Slikovna citometrija

Najbolj pogosto uporabljene metode za merjenje količine jedrne DNA temeljijo na kvantitativnem barvanju molekul DNA in situ, torej v celotnem celičnem jedru, ne da bi DNA kakorkoli ekstrahirali. Metode, namenjene za take meritve, lahko razvrstimo v dve skupini: fluorometrične in denzitometrične.

Fluorometrija temelji na barvanju DNA s fluorokromi, kot npr. propidijev jodid, pri tem je količina DNA ocenjena iz količine oddajane svetlobe, merjene z mikroskopskim fotometrom ali bolj pogosto s pretočnim citometrom.

Denzitometrija na drugi strani, obsega metode, ki opisujejo količino DNA v jedru z optično gostoto obarvanih regij. V tem primeru je najbolj razširjen in zanesljiv postopek za barvanje DNA Feulgenova reakcija. Klasična denzitometrična metoda, ki se uporablja v botaniki že več kot 50 let, vključuje meritve optične gostote z inštrumenti, ki združujejo mikroskop s fotometrom in so različno poimenovani, kot npr. mikrodenzitometri, citofotometri in mikrospektrofotometri. Danes fotometer nadomešča računalniški sistem za analizo slike, ki zajame slike iz mikroskopa preko video ali digitalne kamere in izračuna optično gostoto iz sivih vrednosti pikslov v jedru. Klasična metoda se imenuje fotometrična citometrija, metoda,

kjer spektrofotometer nadomešča računalniški sistem za analizo slike, pa slikovna citometrija DNA (Vilhar in sod., 2001).

Vilhar in sod. (2001) so v svoji študiji testiranja zanesljivosti slikovne citometrije za meritve količine jedrne DNA, dokazali, da so ocene velikosti jedrne DNA, pridobljene z različnimi citometričnimi metodami, ob ustrezni pripravi rastlinskega materiala in ustrezni uporabi barve za DNA, med seboj primerljive.

Prednost slikovne citometrije je uporabnost fiksiranega materiala. To je še posebej pomembno pri rastlinah, pri katerih svež material ni vedno na voljo. Slikovna citometrija omogoča tudi določanje števila kromosomov, stopnje ploidnosti in količine DNA na istem preparatu, ob uporabi enakih postopkov barvanja. Jedra, ki nas zanimajo za meritve, lahko izberemo. Preparati za slikovno citometrijo so trajni in tako na voljo za več meritev (Dolenc Koce, 2001).

2.8 Velikosti jedrnega genoma pri skupini poljske bekice

Temelje, ki jih je s svojo raziskavo postavila Nordenskiöld (1951), so nadgradili raziskovalci: Mello-Sampayo (1961), Halkka (1964), Barlow in Newin (1976), Sen in sod. (1990), Mukherjee in sod. (1993), Kuta in sod. (2004) in Bačič in sod. (2007a).

V svojih študijah ugotavljanja velikosti genoma so Mello-Sampayo (1961), Halkka (1964), Barlow in Nevin (1976), Sen in sod. (1990) in Mukherjee in sod. (1993) uporabili metodo fotometrične citometrije, Bačič in sod. (2007a) pa metodo slikovne citometrije. Vsi so meritve izvajali na meristemskih celicah koreninskih vršičkov. Kuta in sod. (2004) so uporabljali metodo pretočne citometrije, meritve pa izvajali na izoliranih celicah iz tkiv listov.

Preglednica 3 prikazuje izmerjene velikosti jedrnega genoma osmih vrst znotraj sekcije *Luzula*, ki so bile vključene v raziskave zgoraj omenjenih avtorjev. Velikosti genoma so podane z vrednostjo 2C. Zaradi boljšega pregleda so rezultati Sen in sod. (1990) ter Mukherjee in sod. (1993), ki sta jih navedla kot vrednost 4C, preračunani v vrednost 2C.

Preglednica 3: Velikost jedrnega genoma (vrednost 2C) pri osmih taksonih sekcije *Luzula*

Takson	2n	Mello-Sampayo (1961)	Halkka (1964)	Barlow in Nevin (1976)	Sen in sod. (1990)	Mukherjee in sod. (1993)	Kuta in sod. (2004)	Bačič in sod. (2007)
<i>L. campestris</i>	12 AL	-	-	-	3,45 pg	2,95 pg	-	0,97 pg
<i>L. pallescens</i>	12 AL	4,1 a.e., 4,2 a.e.	2,80 a.e.	-	-	-	-	-
<i>L. multiflora</i>	24 AL	8,4 a.e.	-	1,84 pg	-	-	-	1,88 pg
<i>L. multiflora</i>	36 AL	-	6,32 a.e.	-	-	-	3,034 pg	2,73 pg
<i>L. sudetica</i>	48 CL	4,6 a.e., 5,0 a.e.	2,94 a.e.	-	-	3,44 pg	-	0,91 pg
<i>L. alpina</i>	12 AL + 24 BL	-	-	-	-	-	-	2,06 pg
<i>L. divulgata</i>	24 AL	-	-	-	-	-	-	2,09 pg
<i>L. divulgatiformis</i>	24 BL	-	-	-	-	-	-	0,83 pg
<i>L. exspectata</i>	24 BL	-	-	-	-	-	-	0,96 pg

pg: pikogrami DNA, a.e.: arbitrarne enote

Primerjava rezultatov med študijami je težavna. Ob pomanjkanju podatkov otežuje primerjavo tudi to, da so nekatere ocene podane v arbitrarnih enotah. Tako je primerjava s podatki iz študij Mello-Sampayo (1961) in Halkka (1964) izključena, uporabna so le razmerja, ki jih lahko izračunamo iz njih (npr. velikost genoma pri diploidih vs. tetraploidi ali diploidi vs. heksaploidi).

Agmatoploidija je bila s primerjavo velikosti genoma dokazana v raziskavah Mello-Sampayo (1961), Halkka (1964), Mukherjee in sod. (2004) in Bačič in sod. (2007), poliploidija pa pri Mello-Sampayo (1961), Halkka (1964) in Bačič in sod. (2007a).

Bačič in sod. (2007a) so izmerili velikost genoma sedmih vrst v sekciji in tako nazorno prikazali povezave med ozkosorodnimi vrstami. Dognali so, da je vrednost 2C med diploidno vrsto (*L. campestris*) in agmatoploidnimi vrstami (*L. sudetica*, *L. exspectata*, *L. divulgatiformis*) podobna, pri pravih poliploidih se podvoji (tetraploida *L. divulgata* in *L. multiflora*) oz. potroji (heksaploid *L. multiflora*), pri delnemu agmatoploidu (*L. alpina*) pa je približno enaka kot pri pravih tetraploidih.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Rastlinski material

Rastline in z njimi semena so bila predhodno nabrana na terenskih ekskurzijah na območju Balkanskega polotoka (države Albanija, Bolgarija, Bosna in Hercegovina, Črna gora, Hrvaška, Kosovo, Makedonija in Srbija) in Alp (državi Avstrija in Slovenija) v letih 2001-2010. Podatki o nabiralcih so zbrani v prilogi A.

Ustrezno etiketiran vavčerski material, ki je bil nepogrešljiv pri izvedbi raziskave, saj je predstavljal osnovo za določanje vrst, je hranjen v herbariju LJU (46 herbarijskih pol). Podatki s herbarijskih etiket so podani v prilogi A. Določanje posameznih primerkov vavčerskega materiala do vrste je potekalo s pomočjo različnih evropskih določevalnih ključev (Mala flora Slovenije (Bačič, 2007), avstrijska ekskurzijska flora (Fischer in sod., 2008), monografije o ločkovkah (Kirschner, 2002) in izbranih člankov (Bačič in sod., 2007b ter Kirschner, 1993)).

Vzorci semen so bili označeni in urejeni v semensko zbirko.

3.2 Kalitev semen

Semena, ki so bila namenjena za kariološko analizo, smo kalili na filtrirnem papirju v plastičnih petrijevkah pri sobni temperaturi in v temi. Med kalitvijo smo filtrirni papir vlažili z destilirano vodo. Semena so vzkalila po 9-14 dneh. Ko so bile koreninice dolge približno 5 mm, so bile primerne za nadaljni postopek fiksiranja.

Istočasno smo s semeni bekic v plastičnih kalilnikih kalili tudi semena graha (*Pisum sativum* L. cv. Kleine Rheinländerin), ki je služil kot umeritvena standardna vrsta. Semena graha so vzkalila po štirih dneh. Vse nadaljne postopke (fiksiranje, barvanje po Feulgenu, priprava preparatov mečkancev) smo izvajali vzporedno za obe vrsti vzorcev.

3.2.1 Fiksiranje korenin kalic

Fiksiranje korenin bekic in graha smo opravili v zgodnjih jutranjih urah. Izkazalo se je namreč, da ob tem času fiksiran rastlinski material vsebuje največ metafaz. Koreninice smo ločili od semena in jih 90 minut pri sobni temperaturi fiksirali v majhnih stekleničkah s formaldehidnim fiksativom (4 % formaldehid, pripravljen v Sørensovem pufru).

Formaldehidni fiksativ smo nato zamenjali s fiksativom metanol-ocetna kislina (MAA 3:1 (v:v)). V fiksativu MAA smo vzorec pustili stati 15 min, potem pa tekočino odpipetirali in zopet nalili svež fiksativ. Tak postopek smo ponovili še trikrat. V zadnji mešanici fiksativa smo vzorce fiksirali čez noč pri 4°C. Nato smo fiksativ MAA odlili in vzorce prelili s 96 % etanolom ter jih shranili pri -20 °C.

Postopek izdelave Sørensenovega pufra (pH 6,8)

- V merilno bučo dodaj 4,54 g KH_2PO_4 in 12,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$.
- Dodaj destilirano vodo do 1000 ml.

Pufer hrani pri 4 °C največ nekaj tednov.

3.3 Analiza velikosti genoma

3.3.1 Barvanje po Feulgenu

Fiksirane koreninice smo pobarvali s Schiffovim reagentom (Feulgen in Rossenbeck, 1924) po postopku, prirejenem po Dolenc Koce in sod. (2003). Pri barvanju s Feulgenovo reakcijo pride do škrlatnega obarvanja jeder po vezavi Schiffovega reagenta na najmanj dve aldehydni skupini, nastali po odstranitvi purinskih baz adenina in gvanina s predhodno hidrolizo (Feulgen in Rossenbeck, 1924).

Predhodno fiksirane koreninice smo najprej za 5 min spirali v destilirani vodi. Tako smo odstranili prebitke fiksativa. Potem ko smo destilirano vodo odstranili, smo v stekleničke z vzorci nalili kalibrirano 5 M HCl (Merek). Stekleničke smo za 90 min dali v vodno kopel, ki je bila ogreta na 20 °C. S Pasteurjevo kapalko smo iz stekleničk odpipetirali kislino in na vzorec nalili ledeno vodo, da smo prekinili hidrolizo.

Ledeno vodo v stekleničkah smo zamenjali dvakrat, skupno po 5 min. Nato smo vzorce prelili s Feulgenovim reagentom.

V nadaljevanju postopka smo imeli dve možnosti: barvanje vzorcev je lahko potekalo čez noč pri 4°C (v tem primeru smo z delom nadaljevali naslednji dan) ali pa je barvanje potekalo 120 min v vodni kopeli pri 20 °C.

Prebitni Feulgenov reagent smo po končanem barvanju sprali z žveplovo vodo (SO_2 -vodo), in sicer trikrat po dve minuti, nato dvakrat po deset minut in na koncu še enkrat dvajset minut.

Obarvane vzorce smo do priprave preparatov mečkancev shranili v destilirani vodi pri 4°C (vendar največ 1 dan).

Postopek izdelave Schiffovega reagenta

- 4 g pararosanilin klorida (Pararosaniline chloride, BDH, VB) raztopi v 800 ml vrele destilirane vode, premešaj in pusti ohladiti na 50 °C.
- Raztopino vakumsko prefiltriraj preko filtra iz steklenih vlaken (Microfibre filters, Whatman GF/C).
- Raztopini dodaj 120 ml 1M HCl in 12g kalijevega metabisulfita $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Fisons, VB).
- Raztopino čez noč pusti v temi na sobni temperaturi.

- Raztopini dodaj 2 do 4 g aktivnega oglja za razbarvanje (decolourising charcoal, BDH, VB) in premešaj.
- Raztopino vakuumsko prefiltriraj preko filtra iz steklenih vlaken v suho steklenico (barvilo mora biti prozorno).
- Raztopino hrani v hladilniku pri 4 °C do 1 leta (v barvilu ne sme biti precipitata).

Postopek izdelave žveplove vode (SO₂ – voda)

- V 475 ml destilirane vode dodaj 25 ml 1M HCl.
- Raztopini dodaj 2,5 g kalijevega metabisulfita K₂S₂O₅.
- Žveplove voda naj bo vedno sveže pripravljena in shranjena v tesno zaprti steklenici.

3.3.2 Priprava mikroskopskih preparatov mečkancev

Koreninice bekic in graha smo najprej za 5-15 min namočili v 45 % očetno kislino, da se je tkivo koreninic zmeščalo. Medtem smo objektna stekelca očistili s 45 % očetno kislino in jih primerno označili.

Koreninski vršiček dolžine približno 1 mm smo z britvico odrezali od preostalega dela koreninice in ga s pinceto prenesli na objektno stekelce, na katerega smo predhodno kanili kapljico 45 % očetne kisline. Tkivo smo prekrili s krovnim stekelcem in s preparirno iglo rahlo po njem tolkli v smeri od sredine proti periferiji. Nato smo krovnik prekrili s filtrirnim papirjem in nanj močno in navpično pritisnili s palcem. Na enak način smo na drugi polovici istega objektnega stekelca pripravili mečkanec iz koreninskega vršička graha.

Preparate smo postavili na suhi led (CO₂ v trdnem stanju) ter jih tam pustili najmanj 10 minut, da je tkivo primrznilo na objektno stekelce. Nato smo krovnike odluščili z britvico, preparate pa za 3 min potopili v 96 % etanol. Preparate smo nato sušili na zraku in v temi. Suhe preparate smo pospravili v škatle za shranjevanje.

3.3.3 Merjenje vrednosti C s slikovno citometrijo DNA

Količino DNA v interfaznih jedrih smo določali s slikovno citometrijo, ki je moderna izvedba mikrodenzitometrije.

Sistem za analizo slike so sestavljali:

- svetlobni mikroskop (Axioscope MOT, Carl Zeiss),
- CCD kamera (Sony DXC-950P),
- osebni računalnik,
- zajemalnik slike (Matrox Meteor) in
- programski paket za analizo slike KS 400 (Carl Zeis Vision).

Približno 90 min pred začetkom meritev smo prižgali CCD kamero in luč na mikroskopu, da se je merilni sistem ogrel in stabiliziral.

Količino jedrne DNA na mikroskopskih preparatih naših vzorcev smo merili s pomočjo imerzijskega objektiva s 63x povečavo ob uporabi zelenega filtra (540 nm) in Köhlerjevi osvetlitvi.

Pri izvedbi umeritve je bil prvi korak nastavitve osvetlitve, nato je sledila optična umeritev sistema z nizom 7 nevtralnih filtrov (transmisije: 79, 70, 63, 50, 20, 5 %) skladno z makro podprogrami v programskem paketu (DNA_IOD1.mcr, DNA_IOD2.mcr in DNA_IOD3.mcr). Krivulja, ki jo je računalnik ob tem izrisal, je služila za vzpostavitev linearnosti denziometrične meritve (Dolenc Koce, 2001).

V tretjem koraku smo izmerili obarvanost jeder kot integrirano optično gostoto (IOG) 100 do 200 interfaznih jeder, in sicer posebej za bekice in za pripadajoči umeritveni standard. Poleg IOG smo izmerili tudi površino izbranih interfaznih jeder.

3.3.4 Določanje števila kromosomov

S svetlobnim mikroskopom z imerzijskim objektivom (100x povečavo) smo sproti na istih preparatih, na katerih smo merili velikost jedrnega genoma, določali tudi število kromosomov.

3.3.5 Statistična analiza podatkov

Statistična obdelava podatkov je potekala s pomočjo programskega paketa Microsoft Excel. Z makro podprogrami smo podatke o integrirani optični gostoti (IOG) razvrstili po velikosti in na njihovi podlagi iz njih izrisali graf kumulativne frekvence. Vrhova tega grafa sta ponazarjala vrednost 2C in vrednost 4C. Izračunane vrednosti so predstavljale relativno količino DNA, izraženo v arbitrarnih enotah.

Za izračun absolutne količine jedrne DNA (pg DNA) smo uporabili umeritveno standardno vrsto grah z vrednostjo 2C je 8,84 pg DNA (Greilhuber in Ebert, 1994).

Kakovost meritev smo preverjali s tremi kriteriji (Vilhar in sod., 2001):

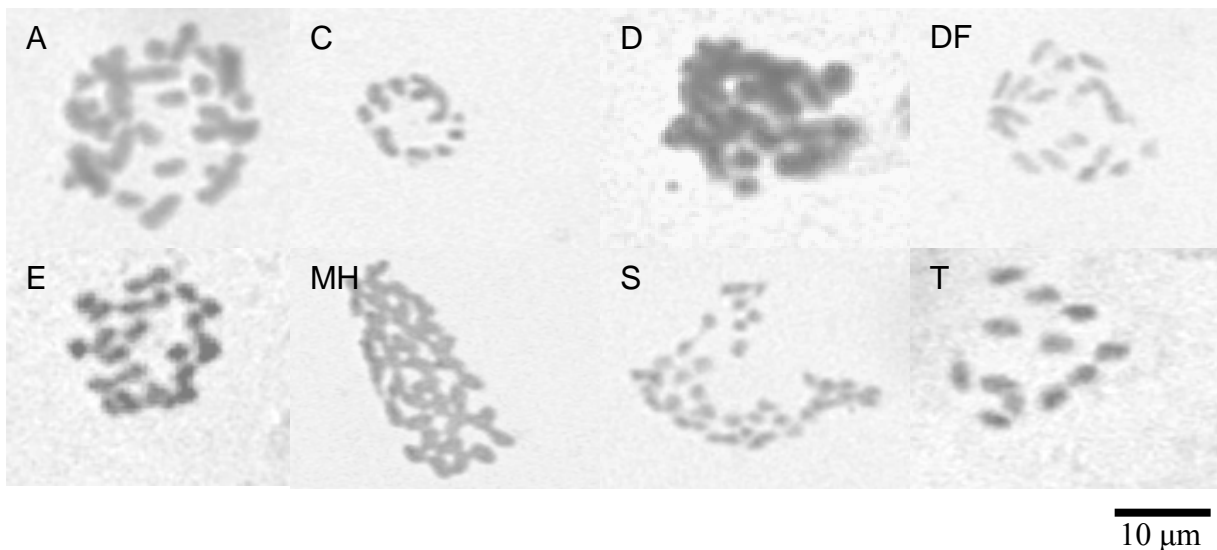
- razmerje med vrednostjo 4C in 2C ne sme za več kot 5 % odstopati od 2,
- širina vrha 2C ne sme presegati 6 % in
- korelacijski koeficient med vrednostjo C in površino jeder v vrhu ne sme presegati 0,4.

4 REZULTATI

Kariološka raziskava je bila opravljena na 46 vzorcih, ki so bili označeni glede na območje nahajališča in oštevilčeni. Enajst vzorcev (A10-A23) je bilo nabranih v avstrijskih Alpah, en (I1) v italijanskih Alpah, petnajst (S1-S23) v Sloveniji, devetnajst pa na Balkanskem polotoku (B1-B22). V prilogi A so navedeni podrobnejši podatki o tem, kje točno so bili vzorci nabrani ter kdaj in kdo jih je nabral ter določil.

Iz skupine poljske bekice je bilo v raziskavi zajetih 8 različnih vrst (*L. alpina*, *L. campestris*, *L. divulgata*, *L. divulgatiformis*, *L. expectata*, *L. multiflora*, *L. sudetica* in *L. taurica*). V avstrijskih Alpah so bile potrjene 4 vrste (*L. alpina*, *L. expectata*, *L. multiflora* in *L. sudetica*). Na območju italijanskih Alp je bila potrjena vrsta *L. alpina*. Populacije iz Balkana so pripadale 4 vrstam (*L. divulgata*, *L. expectata*, *L. taurica* in *L. divulgatiformis*), 3 vzorci (B1, B13, B14) so ostali nedoločeni. Na območju Slovenije je bilo potrjenih pet vrst (*L. multiflora*, *L. expectata*, *L. alpina*, *L. divulgatiformis* in *L. campestris*).

8 potrjenih vrst je imelo 6 različnih kariotipov (12 AL, 24 AL, 24 BL, 36 AL, 48 CL, 12 AL + 24 BL) (slika 1).



Slika 1: Kariogrami preučevanih taksonov iz skupine poljske bekice.

A: *L. alpina* (A15), C: *L. campestris* (S12), D: *L. divulgata* (B5), Df: *L. divulgatiformis* (S11), E: *L. expectata* (B9), MH: *L. multiflora*-heksaploid (S9), S: *L. sudetica* (A20), T: *L. taurica* (B8). V oklepajih so navedene oznake fotografiranih vzorcev.

Rezultati velikosti jedrnega genoma so v preglednici 4 podani kot vrednosti 2C za posamezne populacije. Zajetih je bilo od 1-10 primerkov na vzorec. Vrednosti 2C se pri posameznih vrstah gibljejo v sorazmerno majhnih razponih: *L. alpina*, med 1,53-1,74 pg DNA; *L. divulgatiformis*, med 0,71-0,92 pg DNA; *L. exspectata*, med 0,75-1,01 pg DNA; *L. multiflora*, med 2,42-2,71 pg DNA; *L. sudetica*, med 0,69-0,86 pg DNA; *L. taurica*, med 0,79-0,92 pg DNA. Vrednosti 2C za *L. campestris* in *L. divulgata*, ki štejeta vsaka le po en vzorec, znašata 0,92 pg in 1,69 pg DNA.

Preglednica 4 : Rezultati kariološke analize po posameznih vzorcih

Vrsta	Vzorec	Kariotip 2n	Vrednost 2C (pg DNA)	Št. izmerjenih kor. vršičkov (N)
<i>L. alpina</i>	A12	12 AL+24 BL	1,65	9
<i>L. alpina</i>	A14	12 AL+24 BL	1,59	8
<i>L. alpina</i>	A15	12 AL+24 BL	1,53	7
<i>L. alpina</i>	A19	12 AL+24 BL	1,55	6
<i>L. alpina</i>	A23	12 AL+24 BL	1,65	7
<i>L. alpina</i>	I1	12 AL+24 BL	1,73	5
<i>L. alpina</i>	S5	/	1,74	1
<i>L. campestris</i>	S12	12 AL	0,92	6
<i>L. divulgata</i>	B5	cca. 24 AL	1,69	1
<i>L. cf. divulgatiformis</i>	B12	24 BL	0,92	3
<i>L. divulgatiformis</i>	B15	24 BL	0,71	5
<i>L. divulgatiformis</i>	S11	24 BL	0,85	7
<i>L. exspectata</i>	A16	24 BL	0,87	1
<i>L. exspectata</i>	A17	24 BL	0,80	3
<i>L. exspectata</i>	B6	24 BL	0,75	1
<i>L. exspectata</i>	B9	24 BL	1,01	1
<i>L. exspectata</i>	B11	24 BL	0,79	1
<i>L. exspectata</i>	S2	24 BL	0,80	2
<i>L. exspectata</i>	S3	24 BL	0,85	2
<i>L. exspectata</i>	S13	24 BL	0,8	9
<i>L. exspectata</i>	S14	24 BL	0,85	7
<i>L. exspectata</i>	S15	24 BL	0,84	9
<i>L. exspectata</i>	S19	24 BL	0,85	7
<i>L. exspectata</i>	S21	24 BL	0,82	7
<i>L. exspectata</i>	S22	24 BL	0,78	5
<i>L. exspectata</i>	S23	24 BL	0,81	5
<i>L. multiflora</i>	A10	36 AL	2,42	5
<i>L. multiflora</i>	S1	36 AL	2,71	6
<i>L. multiflora</i>	S9	36 AL	2,54	8

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 4 : Rezultati kariološke analize po posameznih vzorcih

Vrsta	Vzorec	Kariotip 2n	Vrednost 2C (pg DNA)	Št. izmerjenih kor. vršičkov (N)
<i>L. multiflora</i>	S10	36 AL	2,42	8
<i>L. sudetica</i>	A20	48 CL	0,86	8
<i>L. sudetica</i>	A21	48 CL	0,69	2
<i>L. sudetica</i>	A22	48 CL	0,76	3
<i>L. taurica</i>	B7	12 AL	0,86	4
<i>L. taurica</i>	B8	12 AL	0,87	2
<i>L. taurica</i>	B10	12 AL	0,83	4
<i>L. taurica</i>	B16	12 AL	0,79	5
<i>L. taurica</i>	B17	12 AL	0,79	10
<i>L. taurica</i>	B18	12 AL	0,81	3
<i>L. taurica</i>	B19	12 AL	0,92	5
<i>L. taurica</i>	B20	12 AL	0,79	9
<i>L. taurica</i>	B21	12 AL	0,79	7
<i>L. taurica</i>	B22	12 AL	0,81	7
nedoločeno	B1	24 BL oz. več kot 12	0,83	1
nedoločeno	B13	24 in več	0,90	1
nedoločeno	B14	24 BL	0,90	4

Preglednica 5 prikazuje rezultate kariološke analize po posameznih taksonih. Povprečna vrednost 2C je bila izračunana iz povprečij vzorcev - populacij (oznaka A) in iz vrednosti za posamezne primerke (oznaka B). V preglednici sta navedeni tudi meri variabilnosti: standardni odklon (SD) in koeficient variabilnosti (KV).

Za analizo velikosti genoma je bilo preiskovanih od 1 do 14 populacij oz. od 1 do 60 primerkov (koreninskih vršičkov) na takson. Vrednost 2C za 8 različnih taksonov je bila izračunana iz podatkov IOG.

Diploiden kromosomski set 12 AL pripada vrstama *L. campestris* in *L. taurica*. Ostale diploidne vrste so agmatoploidi *L. exspectata* in *L. divulgatiformis* s 24 BL ter *L. sudetica* z 48 CL kromosomi. Predstavniki poliploidov imajo tri kariotipe. Tetraploidna kariotipa sta $2n = 24 AL$ (*L. divulgata*) in $2n = 12 AL + 24 BL$ (delni agmatoploid *L. alpina*). Heksaploidni kariotip, ki pripada vrsti *L. multiflora*, pa je $2n = 36 AL$.

Pri diploidnih vrstah (*L. campestris*, *L. divulgatiformis*, *L. exspectata*, *L. sudetica* in *L. taurica*) se vrednosti 2C gibljejo med 0,81 pg in 0,92 pg DNA. V tej skupini ima največjo vrednost $2C = 0,92$ pg DNA vrsta *L. campestris*. 2C vrednosti ostalih predstavnikov znašajo: 0,82 pg DNA za *L. taurica*, 0,82 pg DNA za *L. divulgatiformis*, 0,83 pg DNA za *L. exspectata* in 0,81 pg DNA za *L. sudetica*. *L. divulgata* in delni agmatoploid *L. alpina*, kot predstavnika

tetraploidov, imata vrednost $2C = 1,69$ pg oz. $1,62$ pg DNA. Izmerjena vrednost za *L. multiflora*, edinega predstavnika heksaploidov, pa je $2,52$ pg DNA.

Preglednica 5: Rezultati kariološke analize po taksonih

A: povprečna vrednost $2C$, izračunana iz povprečij populacij, B: povprečna vrednost $2C$, izračunana iz vrednosti za posamezne primerke.

Vrsta	Kariotip	Ploidni nivo	Število vzorcev (N)	Povprečna vrednost $2C$ v pg DNA (SD)		Število koreninskih vršičkov (N)	Povprečna vrednost $2C$ v pg DNA (SD)	
				A	KV (%)		B	KV (%)
<i>L. alpina</i>	12 AL + 24 BL	4x	7	1,63 (0,08)	5,04	43	1,62 (0,09)	5,72
<i>L. campestris</i>	12 AL	2x	1	0,92	-	6	0,92 (0,06)	6,68
<i>L. divulgata</i>	24 AL	4x	1	1,69	-	1	1,69	-
<i>L. divulgatiformis</i>	24 BL	2x	3	0,83 (0,11)	12,93	15	0,82 (0,10)	12,17
<i>L. exspectata</i>	24 BL	2x	14	0,83 (0,06)	7,4	60	0,83 (0,05)	6,34
<i>L. multiflora</i> (heksaploid)	36 AL	6x	4	2,52 (0,14)	5,44	27	2,52 (0,13)	5,32
<i>L. sudetica</i>	48 CL	2x	3	0,77 (0,09)	11,1	13	0,81 (0,09)	10,53
<i>L. taurica</i>	12 AL	2x	10	0,83 (0,04)	5,36	56	0,82 (0,07)	8,81

SD-standardni odklon; KV-koeficient variabilnosti

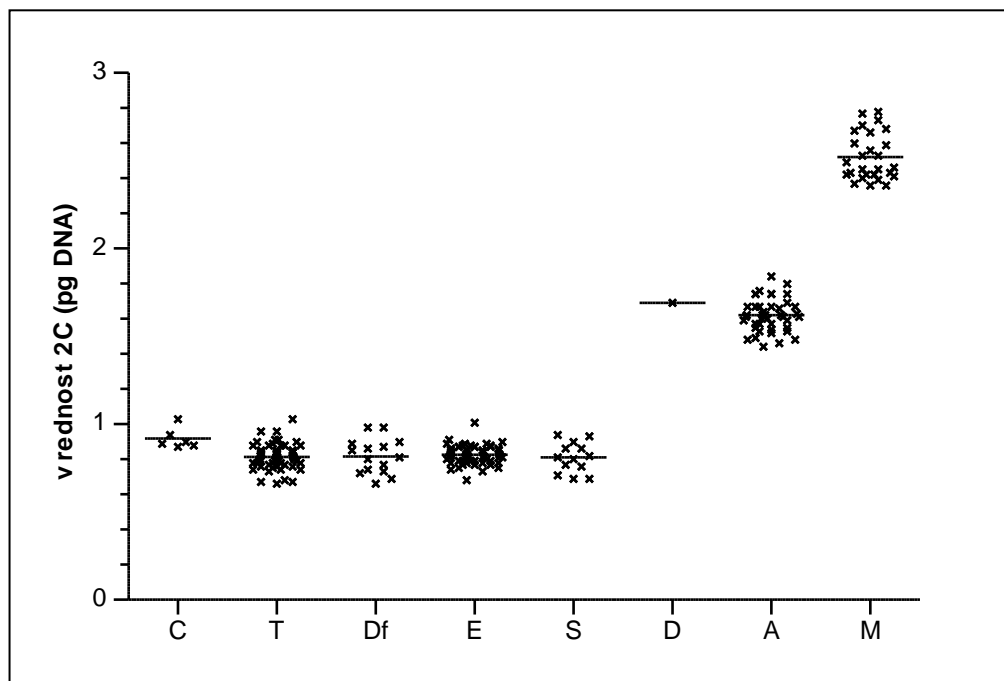
V naši raziskavi nismo potrdili prisotnosti vrste *L. pallescens*. Za namen primerjave z našimi meritvami smo vrednost $2C$ za vrsto *L. pallescens* izračunali s pomočjo arbitrarnih podatkov, ki jih navaja Halkka (1964). Kot standard smo uporabili vrsto *L. sudetica* in na podlagi vrednosti $2C$ omenjene vrste ($2C = 0,81$ pg DNA) izračunali vrednost $2C$ še za *L. pallescens* ($2C = 0,77$ pg DNA).

Preglednica 6 prikazuje razmerja med vrednostmi $2C$ v skupini poljske bekice. Razmerje med diploidi se giblje med vrednostima 0,9 in 1,2, med tetraploidi in diploidi med vrednostima 1,8 in 2,2, med heksaploidi in diploidi med vrednostima 2,7 in 3,3, razmerje med heksaploidi in tetraploidi pa je 1,5 in 1,6, kar ustreza pričakovanjem. Na sliki 2, kakor tudi v preglednici 6, so jasno razvidni trije ploidni nivoji: diploidni, tetraploidni in heksaploidni.

Preglednica 6: Razmerja med vrednostmi 2C v skupini poljske bekice

Razmerja so izračunana iz vrednosti 2C, navedenih v preglednici 5. P: *L. pallescens* (vrednost 2C = 0,77 pg izračunana iz podatkov Halkka, 1964), C: *L. campestris*, DF: *L. divulgatiformis*, E: *L. expectata*, S: *L. sudetica*, T: *L. taurica*, A: *L. alpina*, D: *L. divulgata*, MH: *L. multiflora*.

	Diploidni nivo					Tetraploidni nivo			Heksaploidni nivo
	P	C	T	DF	E	S	A	D	MH
P	-	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	2,1	2,2	3,3
C		-	0,9	0,9	0,9	0,9	1,8	1,8	2,7
T			-	1	1,0	0,99	1,98	2,1	3,1
DF				-	1,0	1	2	2,1	3,1
E					-	1	2	2	3,0
S						-	2	2,1	3,1
A							-	1,0	1,6
D								-	1,5
MH									-



Slika 2: Velikosti jedrnega genoma vrst iz skupine poljske bekice.

C: *L. campestris*, T: *L. taurica*, Df: *L. divulgatiformis*, E: *L. exspectata*, S: *L. sudetica*, D: *L. divulgata*, A: *L. alpina*, M: *L. multiflora* (heksaploid). Križci označujejo vrednosti 2C posameznega koreninskega vršička, črta pa označuje njihovo povprečje.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

5.1.1 Ugotovljeni kariotipi in velikost genoma

Raziskava je potrdila vse najpogostejše kariotipe iz skupine poljske bekice, ki se navajajo za območje Avstrije, Slovenije in Balkanskega polotoka (Kirschner, 1993, 2002; Bačič in sod., 2007a): $2n = 12 AL$ (*L. campestris*, *L. taurica*), $2n = 12 AL + 24 BL$ (*L. alpina*), $2n = 24 AL$ (*L. divulgata*), $2n = 24 BL$ (*L. expectata*, *L. divulgatifformis*), $2n = 36 AL$ (*L. multiflora*), $2n = 48 CL$ (*L. sudetica*).

V raziskavi smo za vrsto *L. taurica* prvič izmerili velikost jedrnega genoma. Podatkov o velikosti genoma znotraj agregata *L. campestris* kot tudi v splošnem za male vrste agregatov je malo, saj je te vrste težko določiti. Zato so podatki, pridobljeni v naši raziskavi, pomembni. Prispevek novih ocen vrednosti $2C$ za ostalih sedem vrst pomeni potrditev tudi že znanih vrednosti $2C$, dobljenih v prejšnjih raziskavah (Kuta in sod., 2004; Bačič in sod., 2007).

Iz izmerjenih velikosti genoma pri preučevanih taksonih so razvidni trije ploidni nivoji: diploidni nivo (*L. campestris*, *L. taurica*, *L. divulgatifformis*, *L. expectata*, *L. sudetica*), tetraploidni nivo (*L. divulgata*, *L. alpina*) in heksaploidni nivo (heksaploidne populacije *L. multiflora*).

Znotraj določenega nivoja ploidnosti so opazne manjše razlike v velikosti genoma. Vrednosti diploidnih taksonov variirajo za 5,4 %, vrednosti dveh tetraploidnih taksonov pa za 3 %. Da se kromosomi določenega tipa od vrste do vrste nekoliko razlikujejo, je ugotovila že Nordenskiöld (1951). Pri pojavu gre za naravno variabilnost, ki je običajna in hkrati nujna, saj omogoča boljše prilagoditve osebkov na okolje, na daljše obdobje pa lahko pripelje celo do nastanka novih vrst.

Po teoriji o agmatoploidnem izvoru kariotipov, naj bi bila vsebnost DNA približno enaka pri vrstah s kariotipom $2n = 12 AL$, $2n = 24 BL$ in $2n = 48 CL$, vsebnost DNA v jedru delnih agmatoploidov s kariotipom $2n = 12 AL + 24 BL$ pa naj bi bila enaka tisti pri pravih tetraploidih s kariotipom $2n = 24 AL$ (Bačič, 2006).

Velikost genoma diploidnih agmatoploidov (*L. divulgatifformis*, *L. expectata*, *L. sudetica*) se, z razmerji med 0,9 in 1,2, res ujema z vrednostmi za *L. pallescens*, *L. campestris* in *L. taurica*, kar je očitni dokaz o agmatoploidnem poreklu kariotipov $2n = 24 BL$ in $2n = 48 CL$. Vrednost $2C$ parcialnega agmatoploida *L. alpina* pa se ujema s tetraploidno vrednostjo $2C$ pri *L. divulgata* (razmerje 1,0).

Pri pravih poliploidih se količina DNA poveča skladno s stopnjo ploidije; podvoji se pri tetraploidih in potroji pri heksaploidih. Povprečna vrednost $2C$ tetraploida *L. divulgata* je 1,9

krat, heksaploida *L. multiflora* pa 2,9 krat večja od vrednosti 2C pravih diploidov *L. campestris* in *L. taurica*.

Pri vrsti *L. campestris* ($2C = 0,92$ pg DNA) se ugotovljena vrednost 2C ne razlikuje veliko od vrednosti, ki so jo v svoji raziskavi izmerili Bačič in sod. (2007a), razlikuje pa se od vrednosti, ki so jo določili Sen in sod. (1990) in Mukherjee in sod. (1993). Njihova vrednost je kar 3 do 4-krat višja. Vzrok zato bi lahko bila možna napačna določitev ali pa dejstvo, da so meritve izvajali z drugačno metodo (fotometrična citometrija), poleg tega pa so uporabili tudi drugačno metodo fiksacije in barvanja. Na vpliv metodologije v meritvah velikosti genoma so namreč opozorili že Vilhar in sod. (2001).

Enako velja pri oceni vrednosti 2C, ki jo Mukherjee in sod. (1993) podajajo za vrsto *L. sudetica* ($2C = 0,77$ pg DNA). Razliko, ki se kaže kar v 88 % odstopanju, lahko ponovno pripišemo možni napačni določitvi ali pa vrsti uporabljene citometrične metode, torej fotometrične citometrije. Medtem ko se ocena Bačič in sod. (2007a), ki so uporabljali slikovno citometrijo DNA, razlikuje le za 15 %.

Pri heksaploidu *L. multiflora* je ocena vrednosti 2C ($2C = 2,52$ pg DNA) podobna kot oceni, ki ju podajajo Kuta in sod. (2004) ter Bačič in sod. (2007a). Njihova ocena je za 17 % oz. 8 % višja. Kuta in sod. (2004) so uporabili drugačno citometrično tehniko in meritveni standard, kljub temu pa razlika ni zelo velika.

Vrednosti 2C za ostale štiri vrste (*L. alpina*, *L. divulgata*, *L. divulgatiformis* in *L. expectata*) se bolj ali manj dobro ujemajo z vrednostmi, ki so jih za iste vrste določili Bačič in sod. (2007a), saj so odstopanja do 20 %. V primeru vrste *L. divulgatiformis* ($2C = 0,83$ pg DNA) sta oceni celo enaki. Kljub uporabi iste citometrične metode lahko nekatere (večje) razlike med obema raziskavama pripišemo dejstvu, da je oceno vrednosti 2C ponekod predstavljala zgolj ena populacija (*L. campestris*, *L. divulgata*) ali celo le en primerek (*L. divulgata*), in so zato ocene vrednosti 2C tudi manj zanesljive in manj primerne za primerjavo.

5.1.2 Variabilnost velikosti jedrnega genoma

Meri variabilnosti, standardni odklon in koeficient variabilnosti, kažeta, da podatki niso preveč razpršeni, torej je variabilnost velikosti genoma pri vseh taksonih relativno majhna. To je odraz upoštevanja standardov za kontrolo kakovosti, ki smo jim sledili med postopkom.

Variabilnost med posamezniki znotraj taksona, izražena s koeficientom variabilnosti, je med 5,32 % pri heksaploidni vrsti *L. multiflora* in 12,17 % pri vrsti *L. divulgatiformis*.

Pri taksonih, kjer je bila meritev opravljena na več kot eni populaciji, je bila medpopulacijska variabilnost med 5,04 % pri vrsti *L. alpina* in 12,93 % pri vrsti *L. divulgatiformis*. Vzrokov za variabilnost velikosti jedrnega genoma ni malo. Prav gotovo gre za odraz biološke različnosti med posamezniki znotraj taksona. Razlog so lahko tudi metodološke napake, ki se pojavljajo tekom meritev.

Greilhuber (1998) in Petrov (2001) sta ugotovila, da se med populacijami iste vrste, razlike v velikosti genoma pojavijo zaradi sprememb na kromosomih, kot so duplikacije, delecije, aneuploidija in poliploidija, B-kromosomi, heterokromatinske regije, transpozicijski elementi, mikrosatelitna DNA.

Znotrajvrstna variabilnost velikosti genoma se lahko tudi poveča, če so populacije ločene, kot v primeru geografskih barrier ali če je zmanjšan pretok genov v populaciji (Greilhuber, 1998). V sekciji *Luzula* variacijski vzorec določa prevladujoča avtogamija (Kirschner, 1992b). Tako vrste obstajajo kot relativno uniformne populacije, ki se znatno razlikujejo med seboj. Kar pa ne velja za vrsto *L. campestris*, kjer naj bi bilo navzkrižno opraševanje precej pogosto (Kirschner, 1995).

5.1.3 Komentar k populacijam, ki so bile zajete v raziskavo

5.1.3.1 Populacije iz Slovenije

Vrsta *L. exspectata* spada med štiri najbolj razširjene vrste iz skupine poljske bekice v Sloveniji (Bačič in sod., 2007b). V naši raziskavi pripada 9 od skupno 15 proučevanih populacij omenjeni vrsti. Nahajališča teh populacij so bila visoko v gorah, na nadmorski višini od 1600 do 2000 m n. m. Največ vzorcev je bilo nabranih v pogorju Karavank (S13, S14, S15, S19, S21, S23), en vzorec je bil prinešen iz Julijskih Alp (S22), dva pa iz Kamniško-Savinjskih Alp (S2, S3). *L. exspectata* je vrsta, ki uspeva na zakisanih travnikih in pašnikih v montanskem in subalpinskem pasu (Bačič, 2007) in v takem, se pravi, montanskem okolju, so uspevale tudi vzorčene populacije.

Vrsta *L. multiflora* je po številu v našo raziskavo vključenih populacij druga najbolj zastopana. Vzorci te vrste izhajajo iz dveh fitogeografskih območij - iz alpskega območja (S1, Pohorje) in iz dinarskega območja (S9, planina Golobinjek in S10, Radensko polje). Prva lokacija se razprostira na višini 1260 m n. m., drugi dve zaobjemata višino od 200 do 900 m n. m. Torej je tudi iz naših podatkov razvidno, da vrsta uspeva od nižin do montanskega pasu, kakor navajajo že Bačič (2007) ter Bačič in sod. (2007b).

Vrsti *L. campestris* in *L. divulgatiformis*, ki prav tako spadata med četverico najbolj razširjenih vrst v Sloveniji (Bačič in sod., 2007b), sta bili v naši raziskavi potrjeni le enkrat. Primerka izhajata z območja Primorske (Kras), torej iz nižinskega sveta (325 m n. m.). Taka razširjenost je značilna predvsem za *L. divulgatiformis*, medtem ko se *L. campestris* pojavlja na pašnikih in travnikih še vse do montanskega pasu (Bačič, 2007).

Zajet je bil tudi en primerek vrste *L. alpina*, ki velja v Sloveniji za redko vrsto (Bačič in sod., 2007b). To je vrsta, ki uspeva samo na alpskih travnikih (Bačič in sod., 2007b ter Bačič, 2007). V naši raziskavi je bil primerek (S5) nabran na Mangartu na višini 1939 m n.m., in gre za potrditvev na že znanem nahajališču.

Na območju Slovenije prav tako kot Bačič in sod. (2007b) nismo uspeli dokazati vrsti *L. pallescens* in *L. sudetica*. Glede na to, da je *L. sudetica* relativno pogosta v sosednjih alpskih državah, obstaja še verjetnost za njeno odkritje v Sloveniji, medtem ko je za *L. pallescens* to težko verjetno (Bačič in sod., 2007b).

5.1.3.2 Populacije iz Avstrije in Italije

Pet populacij iz avstrijskih Alp pripada vrsti *L. alpina*. To je vrsta, ki je endemična v Alpah in vzhodnih Pirenejih; zajema območja Švice, Italije, Slovenije in naprej do S Nemčije (Kirschner, 2002). Naši vzorci izvirajo iz tirolskih in štajerskih Alp. Nabrani so bili na travnikih na višini od 1700 - 2150 m n. m.. Vzorec II je bil nabran v Italiji, prav tako v Alpah (2234 m n. m.).

Tri populacije so pripadale vrsti *L. sudetica*, ki uspeva na gorskih in alpskih vlažnih travnikih na šotnih tleh (Bačič in sod., 2007b). Nabrane so bile v štajerskih Alpah, na višini okrog 1650 m n. m.. *L. sudetica* je v Avstriji prisotna in pogosta, o tem poroča Kirschner (1993, 2002).

L. exspectata je vrsta, ki je bila opisana šele pred nedavnim. Bačič in sod. (2007a) so jo v Avstriji že potrdili. Uspeva na gorskih in alpskih travnikih (Bačič in sod., 2007b). Naš material je bil nabran na avstrijskem Koroškem, na višini 1900-2000 m n. m..

Populacija (A10) s $2n = 36$ AL kromosomi iz tirolskih Alp (1700 m n. m.) pripada vrsti *L. multiflora*, kar je presenetljivo, saj ta citotip ponavadi uspeva v nižjih legah, v višjih pa ga nadomešča tetraploidni (Kirschner, 1996). Tudi vsi primerki, ki so jih, na višini od 1600 do 1900 m n. m., v Avstriji našli Bačič in sod. (2007a), pripadajo tetraploidnemu citotipu.

5.1.3.3 Populacije iz Balkanskega polotoka

Polovica obdelanih vzorcev z Balkana pripada vrsti *L. taurica*. To je vrsta, ki uspeva v gorstvih Balkana, na subalpskih in alpskih traviščih (Kirschner, 1993). Velika večina naših balkanskih vzorcev je bila nabrana na takšnih rastiščih, na nadmorski višini od cca. 1300 m do čez 2000 m n.m.. Nižje sta bila nabrana le 2 vzorca: B12 (Plitvička jezera) in B15 (Rab), oba na Hrvaškem. Dejstvo, da smo imeli v raziskavi na razpolago predvsem vzorce z večjih nadmorskih višin, je razlog, da nekaterih neobičajnih vrst, ki se na tem območju pojavljajo v nižinah – npr. *L. campestris* in *L. multiflora* s. str., nismo zajeli. Vzorci vrste *L. taurica* so bili nabrani v Bosni in Hercegovini, Srbiji, Makedoniji, Črni gori, Albaniji in v Bolgariji. Vrsto *L. divulgata* smo z vzorcem B5 potrdili v Srbiji.

Nova je v tej raziskavi ugotovitev, da uspeva pred kratkim opisana vrsta *L. divulgatiformis* tudi na Hrvaškem. Morfološko in kariološko smo jo potrdili na otoku Rabu (B15), precej verjetno pa tudi na Plitvičkih jezerih (B12), vendar so bile te rastline precej osute in v slabem stanju, zato določitev ni povsem zanesljiva in bi jo morali potrditi na materialu v boljšem stanju (ponovno vzorčenje) (Bačič, ustno).

Dva balkanska vzorca sta pripadala vrsti *L. exspectata*, ki do zdaj s teh območij prav tako ni bila znana, saj je bila opisana šele pred nekaj leti. Populacija B9 je uspevala v Makedoniji (Pelister) in B11 v Srbiji (Kopaonik), obe na večjih nadmorskih višinah (nad 1700 m n. m.).

Pri treh balkanskih vzorcih smo imeli težave pri zanesljivi določitvi vrste, saj ugotovljeni morfološki znaki niso ustrezali dobljenemu kariotipu. Vzorec B1 (Srbija, Stol) je diploid z veliko BL kromosomi, pri katerem nismo uspeli natančno prešteti kromosomov, gre pa za agmatoploida. Po morfoloških znakih vrste nismo mogli določiti, ker so bila stanja znakov nasprotujoča si: okrogla semena in dolge karunkule – kot pri *L. campestris* in *L. divulgata*, ostali znaki pa so bolj ustrezali *L. multiflora* s. str. (kratek vrat, razmerje dolžin prašničnih niti proti dolžini prašnic 1:1) (Bačič, ustno).

Vzorec B13 iz Bolgarije (Vitoša) se je prav tako izkazal za diploidnega, ugotovljena je bila velikost genoma $2C = 0,9$ pg DNA. Kromosomskega števila nismo uspeli natančno prešteti, vsekakor pa je bilo očitno, da so kromosomi tipa BL in jih je več kot 12. Morfološko te rastline spominjajo na vrsto *L. taurica* (podolgovata semena, dolgi vratovi in dolge prašnice), ugotovljeno kromosomsko število pa ne ustreza. Na podobno situacijo smo naleteli tudi pri vzorcu B14, nabranem v Bosni (Troglav), s kariotipom $2n = 24$ BL z $2C = 0,9$ pg DNA. Kirschner (1993) navaja vrsto *L. taurica* za Vitošo, a njegovi vzorci so se izkazali za prave diploide $2n = 12$ AL in ne agmatoploide. Morda gre le za citotip te vrste ali pa celo za kakšen še neopisan takson.

Da bi lahko prišli do kakšnega zanesljivega zaključka glede vzorcev B1, B13 in B14, bi bile nujne nadaljne raziskave: ponovno vzorčenje in preverjanje naših ugotovitev, iskanje nadaljnjih takšnih populacij na območju, poglobljena morfološka in kariološka študija, primerjava z že znanimi taksoni. Vavčerske rastline so bile nabrane v času zrelosti semena, torej že precej posušena. Opazovanje stanj znakov je bilo že zaradi tega razloga težje (Bačič, ustno). Na probleme glede morfoloških znakov (npr. prekrivanje mer pri drobnih kvantitativnih znakih) pa opozarja tudi Kirschner (1993).

5.2 Sklepi

- Na območju Alp in Balkana so bili potrjeni naslednji kariotipi in taksoni: $2n = 12 AL$ (*L. campestris*, *L. taurica*), $2n = 12AL + 24 BL$ (*L. alpina*), $2n = 24 AL$ (*L. divulgata*), $2n = 24 BL$ (*L. expectata*, *L. divulgatiformis*), $2n = 48 CL$ (*L. sudetica*), $2n = 36 AL$ (*L. multiflora*).
- Izmerjena je bila prva ocena velikosti jedrnega genoma za balkansko vrsto *L. taurica* ($2C = 0,82$ pg DNA).
- Za sedem taksonov agregata (*L. campestris*, *L. alpina*, *L. divulgata*, *L. expectata*, *L. divulgatiformis*, *L. sudetica*, *L. multiflora*) smo prispevali nove podatke o velikosti jedrnega genoma.
- Iz dobljenih velikosti jedrnega genoma so razvidni trije ploidni nivoji - diploidni, tetraploidni in heksaploidni.
- Vrednost $2C$ pri diploidnih taksonih (*L. campestris*, *L. taurica*, *L. expectata*, *L. divulgatiformis*, *L. sudetica*) se giblje med 0,81 pg in 0,92 pg DNA; pri tetraploidih (*L. alpina* in *L. divulgata*) med 1,62 pg in 1,69 pg DNA, pri heksaploidu *L. multiflora* pa 2,52 pg DNA.
- Pokazali smo, da so kariotipi $2n = 24 BL$, $2n = 48 CL$ in delno tudi $2n = 12 AL + 24 BL$ agmatoploidnega izvora. Kariotipa $2n = 24 AL$ in $2n = 36 AL$ sta poliploidna.

6 POVZETEK

Skupina poljske bekice (*Luzula campestris* agg.) sodi v sekcijo *Luzula*, ki je najbolj variabilna in taksonomsko zapletena skupina rodu *Luzula* (fam. *Juncaceae*). Za rod so značilni kromosomi z difuzno ali policentrično centromero in simultana kromosomska fragmentacija, imenovana agmatoploidija. Poleg agmatoploidije se pri skupini poljska bekica pojavlja še poliploidija.

Morfološka diferenciacija pretežno sledi kariologiji populacij, a se navadno kaže le v drobnih kvantitavnih znakih in tako so makromorfološke določitve materiala pogosto nezanesljive. Za določanje vrst so zato zelo pomembni kariološki znaki (število kromosomov in velikost genoma), ki smo jih uporabili v naši raziskavi.

Namen naše naloge je bil v izbranih populacijah različnih vrst agregata poljske bekice določiti velikost jedrnega genoma (izraženo kot vrednost C) in kariotip.

Ves razpoložljiv material (rastline in semena) je bil nabran v letih 2001 do 2010 na območju Balkana in vzhodnih Alp.

Kariološka analiza je v več korakih potekala v laboratoriju. Semena bekic in standardne umeritvene vrste graha (*Pisum sativum*) so kalila pri sobnih razmerah. Ko so po nekaj dneh pognale ustrezno dolge koreninice, smo jih porezali in fiksirali s 4% formalinom in MAA (3:1). Po fiksiranju smo koreninice hranili v 96 % etanolu pri -20 °C do priprave preparatov.

Fiksirane koreninice smo sprali z destilirano vodo, hidrolizirali v kalibrirani 5M HCl in obarvali s Feulgenovim reagentom. Prebitno barvilo smo izprali s SO₂-vodo in vzorce do priprave mečkancev shranili v destilirani vodi.

Sledila je priprava preparatov mečkancev. Najprej smo koreninske vršičke rahlo zmečkali s 45 % očetno kislino. Nato smo jih prenesli na objektno steklice, pokrili s krovnikom in zmečkali v enojno plast. Preparate smo dehidrirali v 96% etanolu in jih shranili v temi. Preparati so bili pripravljene za pregledovanje z mikroskopom.

Velikost jedrnega genoma smo izmerili s slikovno citometrijo DNA. Na vsakem preparatu smo za grah in za bekico izmerili 100-150 interfaznih jeder in njihovo površino.

Na istih preparatih smo določali tudi število kromosomov.

Po opravljenih meritvah smo podatke statistično obdelali. V programskem paketu Excel smo podatke o relativni količini DNA (arbitrarne enote) preračunali v vrednosti za absolutne količine jedrne DNA (pg DNA). Z uporabo umeritvene standardne vrste (vrednost 2C znaša 8,84 pg DNA) smo izračunali količino jedrnega genoma v pg DNA za vse taksone skupine *Luzula*.

V raziskavi smo pregledali 46 populacij. Določili smo osem taksonov - *L. campestris*, *L. taurica*, *L. exspectata*, *L. divulgatifformis*, *L. sudetica*, *L. alpina*, *L. multiflora* in *L. divulgata*.

Ugotovili smo, da imajo vrste naslednje kariotipe: $2n = 12 AL$ (*L. campestris*, *L. taurica*), $2n = 24 AL$ (*L. divulgata*), $2n = 24 BL$ (*L. exspectata*, *L. divulgatifformis*), $2n = 48 CL$ (*L. sudetica*), $2n = 12 AL + 24 BL$ (*L. alpina*) in $2n = 36 AL$ (*L. multiflora*).

Za vrsto *L. taurica* iz Balkana, ki je eden izmed centrov diverzitete bekic, smo izmerili prvo oceno velikosti genoma (vrednost $2C = 0,83$ pg DNA).

Iz rezultatov je razvidno, da se količina jedrne DNA pri zgoraj omenjenih vrstah izraža v treh ploidnih nivojih - diploidnem, tetraploidnem in heksaploidnem. V diploidnem nivoju so vrednosti $2C$ zastopane v razponu med 0,81 in 0,92 pg DNA, v tetraploidnem nivoju sta vrednosti 1,62 in 1,69 pg DNA, heksaploidni nivo pa predstavlja vrednost 2,52 pg DNA.

Obenem je bila s pomočjo dobljenih podatkov o velikosti jedrne DNA v naši raziskavi ponovno potrjena teorija o agmatoploidnem razvoju vrst. Agmatoploidne vrste *L. exspectata* ($2C = 0,83$ pg DNA), *L. divulgatifformis* ($2C = 0,83$ pg DNA) in *L. sudetica* ($2C = 0,77$ pg DNA) imajo podobno vrednost $2C$ kot prava diploida *L. campestris* ($2C = 0,92$ pg DNA) in *L. taurica* ($2C = 0,83$ pg DNA). Delni agmatoploid *L. alpina* ($2C = 1,63$ pg DNA) pa podobno kot pravi tetraploid *L. divulgata* ($2C = 1,69$ pg DNA).

Vrednosti $2C$ dokazujejo tudi, da se velikost jedrne DNA pri pravih poliploidih poveča skladno s ploidnim nivojem. Velikost genoma tetraploida *L. divulgata* ($2C = 1,69$ pg DNA) je tako za približno dvakrat, heksaploida *L. multiflora* ($2C = 2,52$ pg DNA) pa za približno trikrat večja od velikosti genoma pravih diploidov (*L. campestris*, *L. taurica*).

Meri variabilnosti, koeficient variabilnosti in standardni odklon, sta razkrili, da razpršenost podatkov ni prevelika, torej je variabilnost velikosti genoma pri vseh taksonih relativno majhna. Variabilnost, izražena s koeficientom variacije, znaša med posamezniki znotraj taksona med 5,32 in 12,17 %, med populacijami znotraj taksona pa med 5,04 in 12,93 %.

7 VIRI

- Bačič T. 2006. Sistematika in horologija skupine poljske bekice (*Luzula campestris* agg.) v Sloveniji: doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 134 str.
- Bačič T. 2007. *Luzula* DC. – bekica. V: Mala flora Slovenije. Ključ za določevanje praprotnic in semenk. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M. A., Eler K., Surina B. Četrta, dopolnjena in spremenjena izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 789-793
- Bačič T., Jogan N., Dolenc Koce J. 2007a. *Luzula* sect. *Luzula* in the south-eastern Alps: karyology and genome size. *Taxon*, 56: 129-136
- Bačič T., Dolenc Koce J., Jogan N. 2007b. *Luzula* sect. *Luzula* (Juncaceae) in the South-Eastern Alps: morphology, determination and geographic distribution. *Botanica Helvetica*, 117: 75-88
- Bačič T. 2012. "Problematične populacije Balkana". martina.bacic@bf.uni-lj.si (osebni vir, 14.nov. 2012)
- Barlow P. W., Nevin D. 1976. Quantitative Karyology of Some Species of *Luzula*. *Plant Systematics and Evolution*, 125: 77-86
- Bennett M. D., Leitch I. J.. Plant DNA C-values Database. 2010. RBG Kew (dec. 2010). <http://www.kew.org/cvalues/> (20. dec. 2012)
- Dermastia M. 2007. Pogled v rastline. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 237 str. Dolenc Koce J., Vilhar B., Bohanec B., Dermastia M. 2003. Genome size of Adriatic seagrasses. *Aquatic Botany*, 77: 17-25
- Dolenc Koce J. 2001. Ugotavljanje variabilnosti količine jedrne DNA pri standardnih rastlinskih vrstah in morskih kritosemenkah s slikovno citometrijo: doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 128 str.
- Doležel J., Greilhuber J. 2010. Nuclear genome size: Are we getting closer. *Cytometry Part A*, 77A: 635-642
- Fischer M. A., Oswald K., Adler W. 2008. Exkursionsflora für Österreich, Lichtenstein und Südtirol. 3. Auflage. Linz, Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen: 1392 str.

- Feulgen R., Rossenbeck H. 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 135: 203-248
- Greilhuber J., Ehrendorfer F. 1988. Karyological approaches to plant taxonomy. Plants & Animals, 1: 289-297
- Greilhuber J., Ebert I. 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. Genome, 37: 646-655
- Greilhuber J. 1998. Intraspecific variation in genom size: a critical reassessment. Annals of Botany, 82: 27-35
- 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: 255-260
- Halkka O. 1964. A photometric study of the *Luzula* problem. Hereditas, 52: 81-88
- Kirschner J. 1992a. Karyological differentiation of *Luzula* sect. *Luzula* in Europe. Thaiszia, 2: 11-39
- Kirschner J. 1992b. *Luzula* sect. *Luzula* (Juncaceae) in Spain. Plant Systematics and Evolution, 200: 1-11
- Kirschner J. 1993. Taxonomic Survey of *Luzula* sect. *Luzula* (Juncaceae) in Europe. Folia Geobot. Phytotax., 28: 141-182
- Kirschner J. 1995. Allozyme analysis of *Luzula* sect. *Luzula* (Juncaceae) in Ireland: evidence of the origin of tetraploids. Folia Geobotanica & Phytotaxonomica, 30: 283-290
- Kirschner J. 1996. Tetraploid populations of *Luzula multiflora* subsp. *multiflora* (Juncaceae) in Europe. Preslia, Praha, 67:219-223
- Kirschner J. 2002. Juncaceae 1: *Rostkovia* to *Luzula*, Species Plantarum: Flora of the World. Part 6. Canberra, Australian Biological Resources Study: 237 str.
- Kuta E., Bohanec B., Dubas E., Vižintin L., Przywara L. 2004. Chromosome and nuclear DNA study on *Luzula*- a genus with holokinetic chromosomes. Genome, 47: 246-256
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M. A., Eler K., Surina B. 2007. Mala flora Slovenije: ključ za določevanje praprotnic in semenk. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.

- Mello-Sampayo T. 1961. Differential polyteny and karyotype evolution in '*Luzula*': a critical interpretation of morphological and cytophotometric data. *Genetica Iberica* 13: 1-22
- Mukherjee S., Sen J., Sharma A. K. 1993. Cytophotometric DNA estimation in *Luzula* species. *Current Science* 65: 987-989
- Nordenskiöld H. 1951. Cyto-taxonomical studies in the genus *Luzula*. I. Somatic chromosomes and chromosome numbers. *Hereditas*, 37: 325-355
- Petrov D. A. 2001. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet*, 17: 23-28
- Sen J., Mukherjee S., Sharma A. K. 1990. Study of chromosomes, DNA amount, and *in vitro* growth in different species of *Luzula*. *Genome*, 33: 143-147
- Stace C. A. 1989. *Plant taxonomy and biosystematics*. Second edition. Cambridge, University press: ISBN
- Vilhar B., Greilhuber J., Dolenc Koce J., Tensch E. M., Dermastia M. 2001. Plant Genome Size Measurement with DNA Image Cytometry. *Annals of Botany*, 87: 719-728

ZAHVALA

Iskreno in v največji meri se zahvaljujem mentorici doc. dr. Jasni Dolenc Koce in somentorici doc. dr. Tinki Bačič. Neizmerno sem hvaležna za Vajino znanje, s katerim sta dodatno obogatili mojega, nasvete in ideje, s katerimi sta mi bili v pomoč pri izdelavi te naloge ter za navdih in spodbudo, ki sta ju vselej premogli. Odlikuje Vaju zelo preprost in razumevajoč pristop do nas študentov kot posameznikov, kar naredi atmosfero dela pod Vašim okriljem zelo sproščeno in prijetno.

Tudi ostalim sodelavcem iz Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin, hvala za morebitno tehnično pomoč ali pomoč v obliki sproščenega klepeta.

Prav posebna zahvala gre mojim staršem, ki so mi omogočili ta čudovit študij, Jožeku, ki me je vsa ta leta spremljal in mi stal ob strani, sestri in Urošu, ki sta mi zmeraj na kakršen koli način pomagala in mi naredila bivanje v Ljubljani enostavnejše in babici, ki mi je zmeraj nudila vso svojo podporo in bila moja največja učiteljica skozi življenje.

Zahvaljujem se tudi prijateljici in sošolki Živi, ki mi je zadnja leta študija še dodatno popestrila in polepšala. Zasluge nosiš za širjenje mojega obzorja. Upam in želim si, da se zaradi oddaljenosti, najini življenjski poti ne bi preveč razšli.

Hvala tudi ostalim mojim prijateljicam, ki sem vas spoznala v teh čudovitih letih in ste danes, na žalost, ne del mojega vsakdana, ampak del moje dosedanje zgodbe in s katerimi vsekakor hočem ohraniti stike še naprej, pa najsibo le prek računalnika ali telefona.

Zahvaljujem se tudi preostalemu kolektivu Oddelka za Biologijo, s katerim sem se imela srečo spoznati tekom teh let. Celotni kolektiv odlikuje mnogo vrlin, med drugim profesionalnost in nesebično razdajanje svojega znanja ter dostopnost in povezanost s študenti, na kar sem zelo ponosna. Vse Vas, vključno z zgradbo, katero preveva domač duh, bom ohranila v zelo lepem spominu.

PRILOGE

Priloga A: Seznam lokalitet

Slovenija

- Vzorec S1

Slovenija, Pohorje, Lovrenc nad Pohorjem, zakisan travnik nad domom nad klopem vrhu; [RTŠB Lovrenc na Pohorju 2005], 30.7.2005, B. Frajman in M. Turjak

- Vzorec S2

Slovenija, Raduha, Železna Kapla (Eisenkapell), 50 m nad Durci, 2.9.2005, B. Frajman

- Vzorec S3

Slovenija, Kamniške Alpe, Solčava, Kamniško sedlo, 1.9.2005, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec S5

Slovenija, Mangart, mali vrh, 1939 m, Nerdetum strictae, 12. 7. 2007, I. Dakskobler

- Vzorec S9

Slovenija, Dolenjska, Kočevsko: planina Golobnjek, SV od vasi Koprivnik; 900 m, gozdna meja, 25.7.2008, B. Frajman

- Vzorec S10

Slovenija, Grosuplje, Radeljsko polje, 21.5.2009, T. Bačič

- Vzorec S11

Slovenija, Primorska, Kras, med vasema Dobrovlje in Kozarje, 325 m, 2.6.2009, B. Frajman

- Vzorec S12

Slovenija, Primorska, Kras, med vasema Dobrovlje in Kozarje, 325 m, 2.6.2009, B. Frajman

- Vzorec S13

Slovenija, Gorenjska, Karavanke, Košuta, severno od doma na Kofcah, zaraslo melišče z debelim gruščem, 1800 m n. m., 3.8.2008, Š. Novak

- Vzorec S14

Slovenija, Gorenjska, Karavanke, Košuta, Toplar, alpska trata nad potjo, 2000 m n.m, 1.8.2008, Š. Novak

- Vzorec S15

Slovenija, Gorenjska, Karavanke, Košuta, severno od doma na Kofcah, zaraslo melišče nad potjo, 1700 m n.m., 3.8.2008, Š. Novak

- Vzorec S19

Slovenija, Gorenjska, Karavanke, Košuta, Malo Kladivo, skalna trata, 2000 m n. m. 6.8.2009, Š. Novak

- Vzorec S21

Slovenija, Gorenjska, Karavanke, Košuta, Sv od planine Šilja, skalna trata, 1600 m n. m., 5.8.2009, Š. Novak

- Vzorec S22

Slovenija, Julijske Alpe, Malo polje ob velem polju, vlažen travnik, 1650 m n. m., 19.8.2009, Š. Novak

- Vzorec S23

Slovenija, Gorenjska, Karavanke, Košuta, Tegoška gora, skalna trata, 1900 m n. m., 15.8.2009, Š. Novak

Balkan

- Vzorec B1

Srbija, V Srbija, Bor, SSV pobočje Stola, 950-1000m, kisel travnik, 20.6.2006, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec B5

Srbija, V Srbija, peš pot iz vasi Rtanj do vrha gore Rtanj (J od vasi Lukovo), c 1000-1500 m, subalpinski travnik, 29. 6. 2006, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec B6

Makedonija, SZ Makedonija, Šar planina, Popova Šapka-Mali Jelak-Ceripašina (nad krajem Tetovo), 1845-2500 m, subalpinski travnik, 13.7.2005, M. Turjak in B. Frajman

- Vzorec B7

Bosna in Hercegovina, Bosna, Čvrstica: Jelak nad jezerom Blidinje jezero, 1350-1550 m, subalpinski travnik, 3.7.2005, F. Bogunić, M. Turjak in B. Frajman

- Vzorec B8

Makedonija, Osogovske planine, Z pobočje Rujen, 1800-2252m, kisel travnik na silicijevem substratu, 14.6.2006, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec B9

Makedonija, V Makedonija, Pelister, Nižepole-Orlove bari, 1800-2150m, kisel travnik, 21.8.2006, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec B10

Črna gora/Makedonija, Komovi, Kom Kučki, Z in J pobočja, 1900-2487m, zakisani alpski travniki, apnenec, 23.8.2006, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec B11

Srbija, Centralna Srbija, Kopaonik, S pobočje Suvo Rudište, 1750-1850m, kisel travnik, 13.6.2006, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec B12

Hrvaška, Plitvička jezera, JV od Repušnica (J od Kapela Korenička), SV od Štwtina draga, 710 m, 14.7.2006, B. Frajman in P. Schönswetter, KEC projekt

- Vzorec B13

Bolgarija, Sofia, Vitoša, aleko center, 23.6.2006, Simona Strgulc Krajšek

- Vzorec B14

Bosna in Hercegovina, Bosna, Troglav (sedlo), Dinarsko g., 17.7.2007, B.Frajman

- Vzorec B15

Hrvaška, Rab, Lopar, 4.6.2010, B. Frajman

- Vzorec B16

Albanija, Tropojë, alpet Shqiptare, dolina Valbona, po poti od Dragobi do sedla Z od Maja Hekuraves, pri drevesni meji, (itinerarna številka 777), 1611 m, nizki alpinski travniki, apnenec, 16.8.2010, P. Schönswetter, B. Frajman in D. Kutnjak

- Vzorec B17

Kosovo, Prokletje, Gjeravica/Đeravica, V greben Male Đeravice (itinerarna številka 767), 2211 m, relativno izpostavljen alpski travnik s krajšo snežno odejo preko silicijeve trdne podlage, 14.8. 2010, P. Schönswetter, B.Frajman in D. Kutnjak

- Vzorec B18

Bosna in Hercegovina, Hercegovina, Prenj, po poti med planino Tisovica in goro Lupoglav (itinerarna številka 733), 1606 m, zakisan subalpski travnik, apnenec, 7.8.2010, P. Schönswetter, B.Frajman in D. Kutnjak

- Vzorec B19

Bosna in Hercegovina, Hercegovina, Čvrsnica, planina Zaglavje po poti do gore Veliki Vilinac (itinerarna številka 740), 1559 m, zakisan pašnik/travnik, apnenec, 9.8.2010, P. Schönswetter, B.Frajman in D. Kutnjak

- Vzorec B20

Črna Gora/ Makedonija, Durmitor, sedlo mala previja J od Terezin Bogaz (itinerarna številka 754), 2203 m, izpostavljen alpski pašnik, apnenec, rahlo zakisan, 11.8.2010, P. Schönswetter, B.Frajman in D. Kutnjak

- Vzorec B21

Črna Gora/Makedonija, Z od Trešnjevik sedlo Kolašin-Andrijevića (itinerarna številka 759), 1572 m, zakisan travnik in gozdna meja, 12.8.2010, P. Schönswetter, B.Frajman in D. Kutnjak

- Vzorec B22

Črna Gora/Makedonija, Kumovi, zgornja dolina Međukomlje, tik pod sedlom (itinerarna številka 762), 2197 m, rahlo zakisan, izpostavljen alpski pašnik, apnenec, 13.8.2010, P. Schönswetter, B.Frajman in D. Kutnjak

Avstrija in Italija

- Vzorec A10

Avstrija, Tirolska, Stubair Alpen, Sulztal, 1,8 km JV Gries, 1700 m, kisel pašnik, 10.8.2008, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec A 12

Avstrija, Tirolska, Stubair Alpen, Sulztal, 1,8 km JV Gries, 1700 m , kisel gorski travnik, 10.8.2008, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec A14

Avstrija, Tirolska, Silvretta, Hohes Rad, 1,9 km SSV od vrha Breittalbach, 2120-2140 m, vlažna grmičasta resava, 24.8.2008, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec A15

Avstrija, Tirolska, Samnaungruppe, Schönjöchel (SZ Fiss), JV Kamm, 2000-2150 m, grmičasta resava, 27.8.2008, B. Frajman in P. Schönswetter

- Vzorec A16

Avstrija, Koroška, Železna Kapla (Eisenkappel), pogorje Pece, pod Bistriško špico, caa 2000 m, 29.8.2005, B. Frajman

- Vzorec A17

Avstrija, Koroška, Železna Kapla (Eisenkappel), pogorje Pece, Bistriška špica, zakisan travnik med Veško kopo in B. Špico, caa 1900 m, 29.8.2005, B. Frajman

- Vzorec A19

Avstrija, Štajerska, Nördliche Kalkalpen, Hochschwab, JZ rob travnika Hinterwiesen med Kaelkochkogel in glavnim vrhom Hochschwab, 1929 m, alpski travniki preko apnenca, rahlo zakisan, 8.2.2010, P. Schönswetter in B. Frajman

- Vzorec A20

Avstrija, Štajerska, Ennstaler Alpen, Lugauer, sedlo med Hochpolstrom in Lugaurom, 1700 m, nizek alpinski pašnik, apnenec, 8.30.2009, P. Schönswetter in R. Flatscher

- Vzorec A21

Avstrija, Štajerska, Eisenerzer Alpen, Ochsenboden S Wildfeld, 1650 m, vlažno mesto in rahlo kisel subalpinski pašnik preko nečistega apnenca, 8.27.2009, P. Schönswetter in R. Flatscher

- Vzorec A22

Avstrija, Štajerska, Eisenerzer Alpen, Ochsenboden S Wildfeld, 1650 m, vlažno mesto in rahlo kisel subalpinski pašnik preko nečistega apnenca, 8.27.2009, P. Schönswetter in R. Flatscher

- Vzorec A23

Avstrija, Štajerska, Eisenerzer Alpen, Reiting, zgornji del Bechlgrabna, 2000 m, rahlo zakisan alpski travnik čez apnenec, 8.28.2009, P. Schönswetter in B. Frajman

- Vzorec I1

Italija, Trentino-Alto Adige, Trento, S okolica Passa di San Pellegrino, Jz bok Lom Picola, 2234 m, pašnik, 5.9.2010, B. Frajman, R. Flatscher in P. Schönswetter