

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDĚCKÁ FAKULTA

KATEDRA BOTANIKY



**Biosystematická studie *Poa* sect. *Bolbophorum*  
ve střední Evropě**

**Diplomová práce**

Autor: **Bc. Veronika Valová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika

Forma studia: Prezenční

V Olomouci 2024

Vedoucí práce: **RNDr. Michal Hroneš, Ph.D.**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Biosystematická studie *Poa* sect. *Bolbophorum* ve střední Evropě“ vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Michala Hroneše, Ph.D. s použitím uvedených literárních pramenů.

V Olomouci dne 15. 5. 2024

Bc. Veronika Valová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především mému vedoucímu práce Michalovi Hronešovi za jeho nekonečnou trpělivost se mnou a mojí prací a pomoc při jejím vzniku. Velký dík patří také všem sběratelům vzorků a zapisovatelům morfometriky, mezi nimi hlavně Alče Uvírové, která mi byla skvělou společností na výpravách za lipnicemi. Dále bych chtěla poděkovat Luce Kobřové za ochotu a pomoc v laboratoři. V neposlední řadě patří dík také mé rodině a kamarádům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

## **Bibliografická identifikace**

**Jméno a příjmení autora:** Veronika Valová

**Název práce:** Biosystematická studie *Poa* sect. *Bolbophorum* ve střední Evropě

**Typ práce:** Diplomová práce

**Pracoviště:** Katedra botaniky PřF UP, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc

**Vedoucí práce:** RNDr. Michal Hroneš, Ph.D., Katedra botaniky PřF UP

**Rok obhajoby práce:** 2024

**Abstrakt:** Lipnice sekce *Bolbophorum* jsou vysoce polyploidní skupinou se značnou diverzitou reprodukčních systémů (apomixie, cizosprašnost, pseudoviviparie). Tato sekce je značně taxonomicky problematická, což je kromě polyploidie a apomixie způsobeno také morfologickou plasticitou a nedostatkem morfologických znaků. Skupina zahrnuje v širší střední Evropě dle různých autorů až šest druhů, z nichž se tato práce nejvíce zaměřuje na *Poa crassipes*, u které není jasné, zda se jedná o samostatný druh. Dále se jedná o *Poa alpina*, *P. badensis*, *P. molinerii*, *P. pumila* a *P. ursina*. *P. crassipes* se vyskytuje pouze na dvou lokalitách, první je Kotouč (CZE), druhou pak Vršatské bradlá (SVK). Morfometrika byla provedena u 27 populací (celkem 193 jedinců šesti taxonů) a zahrnovala 15 znaků (11 kvantitativních, 4 kvalitativní). Druhy se od sebe statisticky lišily ve všech studovaných znacích a podařilo se tak odlišit *P. crassipes* od ostatních druhů. Pomocí průtokové cytometrie byla určena absolutní (47 jedinců) a relativní (274 jedinců) velikost genomu studovaných druhů a FCSS metodou také reprodukční systémy *P. crassipes*. U relativní velikosti genomu bylo zjištěno deset cytotypů, u absolutní velikosti genomu šest. V rámci absolutní velikosti genomu byly mezi druhy signifikantní rozdíly a bylo zjištěno, že *P. crassipes* se liší od ostatních druhů. Výsledky průtokové cytometrie byly doplněny o počty chromozomů, u *P. crassipes* byl zjištěn počet  $2n = 21$ . *P. crassipes* tedy byla pomocí biosystematických metod oddělena od ostatních druhů sekce *Bolbophorum* a zároveň bylo zjištěno, že česká a slovenská populace *P. crassipes* se od sebe neliší. FCSS metodou byly u *P. crassipes* zjištěny reprodukční systémy, obilky byly vzniklé převážně sexuální cestou (25 obilek), jedna obilka vznikla apomikticky. Pro rekonstrukci fylogenetických vztahů byl použit chloroplastový úsek TLF a byla v něm odhalena velká vnitrodruhová a vnitropopulační variabilita, ukázal se tedy pro rekonstrukci vztahů v sekci *Bolbophorum* nevhodný.

**Klíčová slova:** *Bolbophorum*, *Poa*, *Poa crassipes*, taxonomie, morfologie, průtoková cytometrie, FCSS, cpDNA

**Počet stran:** 43

**Počet příloh:** 3

**Jazyk:** Český

## **Bibliographic identification**

**Author's first name and surname:** Veronika Valová

**Title of thesis:** Biosystematic study of *Poa* sect. *Bolbophorum* in Central Europe

**Type of thesis:** Master thesis

**Department:** Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc

**Supervisor:** RNDr. Michal Hroneš, Ph.D., Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University

**The year od presentation:** 2024

**Abstract:** *Poa* sect. *Bolbophorum* is a highly polyploid group with a considerable diversity of reproductive systems (apomixis, cross-pollination, pseudovivipary). This section is quite taxonomically problematic, which is caused, in addition to polyploidy and apomixis, by morphological plasticity and the lack of morphological characters. According to different authors, the group includes up to six species in wider Central Europe, of which this work focuses most on *Poa crassipes*, for which it is not clear whether it is a separate species. Other species are *Poa alpina*, *P. badensis*, *P. molinerii*, *P. pumila* and *P. ursina*. *P. crassipes* occurs only in two localities, the first is Kotouč (CZE) and the second is Vršatské bradlá (SVK). Morphometrics were analysed on 27 populations (a total of 193 individuals of six taxa) and included 15 characters (11 quantitative, four qualitative). The species differed statistically from each other in all the characters studied and it was possible to distinguish *P. crassipes* from the rest of species. The absolute (47 individuals) and relative (274 individuals) genome size of the studied species was determined using flow cytometry, and the reproductive systems of *P. crassipes* were also determined using the FCSS method. Ten cytotypes were found for relative genome size, six for absolute genome size. Within absolute genome size, there were significant differences between species. *P. crassipes* was found to be different from other species. The results of flow cytometry were supplemented with chromosome numbers. In *P. crassipes*, it was found that  $2n = 21$ . Thus, *P. crassipes* was separated from the other species of the *Bolbophorum* section using biosystematic methods. At the same time it was found that the Czech and Slovak populations of *P. crassipes* were separated from each other no different. The reproductive systems of *P. crassipes* were determined by the FCSS method, the grains were formed mainly sexually (25 grains), one grain was produced

apomictically. The chloroplast section of TLF was used to reconstruct phylogenetic relationships. A large intra-species and intra-population variability was revealed, so it turned out to be unsuitable for reconstructing relationships in the *Bolbophorum* section.

**Keywords:** *Bolbophorum*, *Poa*, *Poa crassipes*, taxonomy, morphology, flow cytometry, FCSS, cpDNA

**Number of pages:** 43

**Number of appendices:** 3

**Language:** Czech

# Obsah

1 ÚVOD .....	1
2 CÍLE PRÁCE .....	2
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	3
<b>3.1 <i>Poa</i> L.</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2 <i>Poa</i> sect. <i>Bolbophorum</i></b> .....	<b>5</b>
3.2.1 Taxonomie <i>Poa</i> sect. <i>Bolbophorum</i> .....	5
3.2.2 Morfologie <i>Poa</i> sect. <i>Bolbophorum</i> .....	6
<b>3.3 Taxony sect. <i>Bolbophorum</i></b> .....	<b>7</b>
3.3.1 <i>Poa alpina</i> L. (lipnice alpská).....	7
3.3.2 <i>Poa badensis</i> Haenke ex Willd. (lipnice bádenská) .....	9
3.3.3 <i>Poa crassipes</i> Domin ex Šourek (lipnice tlustonohá) .....	11
3.3.4 <i>Poa molinerii</i> Balbis (lipnice Molineriho).....	12
3.3.5 <i>Poa pumila</i> Host .....	13
3.3.6 <i>Poa ursina</i> Velen. (syn. <i>Poa media</i> Schur) .....	13
4 MATERIÁL A METODIKA .....	14
<b>4.1 Rostlinný materiál</b> .....	<b>14</b>
<b>4.2 Morfometrická analýza</b> .....	<b>15</b>
<b>4.3 Statistická analýza morfometrických dat</b> .....	<b>15</b>
<b>4.4 Průtoková cytometrie</b> .....	<b>16</b>
<b>4.5 Počítání chromozomů</b> .....	<b>17</b>
<b>4.6 Izolace genomické DNA</b> .....	<b>17</b>
<b>4.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a sekvenování cpDNA</b> .....	<b>18</b>
<b>4.8 Statistická analýza sekvenačních dat</b> .....	<b>18</b>
5 VÝSLEDKY.....	19



5.1 Morfometrika .....	19
5.2 Absolutní a relativní velikost genomu, FCSS.....	27
5.3 Počítání chromozomů .....	32
5.4 Sekvenování cpDNA.....	33
6 DISKUZE.....	34
6.1 Morfologická diferenciacie <i>Poa</i> sect. <i>Bolbophorum</i> v širší střední Evropě .....	34
6.2 Cytologie <i>Poa</i> sect. <i>Bolbophorum</i> .....	35
6.3 Reprodukční mód u <i>P. crassipes</i> .....	36
6.4 Využití chloroplastového úseku <i>trnL-trnF</i> pro rekonstrukci fylogenetických vztahů <i>Poa</i> sect. <i>Bolbophorum</i> .....	37
7 ZÁVĚR .....	39
8 LITERATURA.....	40
PŘÍLOHY .....	44

# 1 ÚVOD

*Poa* L. je největším rodem čeledi *Poaceae* s rozsáhlým areálem od mírného pásma přes arktické a boreální oblasti až po tropy, zahrnuje okolo 575 druhů, mezi nimi i důležité druhy pro kulturní trávníky a krmiva, invazní druhy a také plevely (Clayton & Renvoize 1986; Gillespie & Soreng 2005). V rámci tohoto rodu se objevuje jak velká druhová diverzita, tak mnoho endemitů. Výskyt polyploidie, hybridizace, apomixie a nedostatek rozlišujících morfologických znaků dělá tento rod značně taxonomicky náročný. (Soreng 1990; Gillespie & Soreng 2005). Tato práce se zaměřuje na sekci *Bolbophorum* ve střední Evropě, přesněji na stanovení taxonomické hodnoty nejasného taxonu *Poa crassipes* vyskytujícího se v České republice a na Slovensku a jeho porovnání s dalšími druhy této sekce vyskytujícími se v širší střední Evropě pomocí různých biosystematických metod.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce je za pomoci širšího spektra biosystematických metod přispět k rozlišení jednotlivých taxonů *Poa* sect. *Bolbophorum* ve střední Evropě.

Práce je zaměřena na:

- 1) Vyhledání a testování vhodných morfologických znaků k odlišení jednotlivých taxonů
- 2) Stanovení ploidie a velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie a počítání chromozomů
- 3) Stanovení hlavních reprodukčních systémů u jednotlivých populací/taxonů pomocí metody FCSS
- 4) Optimalizaci izolace DNA a hledání vhodných variabilních jaderných a chloroplastových markerů
- 5) Rekonstrukci fylogenetických vztahů v rámci středoevropských populací

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 *Poa* L.

Lipnice jsou rod jednoletých nebo vytrvalých trav, květenstvím je lata, klásky jsou ze strany zploštělé, s jedním až deseti květy. Plevy jsou kýlnaté, blanité, obvykle trojžilné, spodní jednožilné. Pluchy jsou pětižilné, kýlnaté, blanité, bezosinaté nebo vzácně s terminální krátkou osinou. Plušky jsou dvoukýlné, na kýlech draslavé nebo brvité. Obilky jsou oválné (Edmondson 1980).

Oproti jiným velkým rodům v čeledi *Poaceae* je rod *Poa*, až na několik druhů, které by mohly být z rodu vyčleněny, považován za převážně monofyletický (Soreng 1990; Gillespie & Soreng 2005). Jeho vnitrorodová taxonomie však není ustálená a neustále dochází k přesunům jak mezi podrody a sekcemi, tak i mezi blízkými příbuznými rody (Gillespie & Soreng 2005; Gillespie et al. 2007, 2008). Hlavní roli v taxonomické nestabilitě rodu hraje především hybridizace a polyploidie, které jsou spojené s následným apomiktickým rozmnožováním některých cytotypů a způsobují tak retikulární evoluci, při které vzniká složitý propletenec příbuzenských vztahů (Soreng 1990; Gillespie & Soreng 2005). Gillespie & Soreng (2005) ve své fylogenetické studii rozdělují rod *Poa* na základě cpDNA do pěti větví, ArcSyl (*Poa* subg. *Arctopoa* sect. *Arctopoa* a *Aphydris*, a *P.* subg. *Poa* sect. *Sylvestres*), BAPO (*P.* subg. *Poa* sect. *Alpinae*, *Bolbophorum*, *Ochlopoa* a *Parodiochloa*), SPOSTA (*P.* subg. *Poa* sect. *Abbreviatae*, *Orienos*, *Pandemos*, *Secundae*, a *Tichopoa*), PoM, (*P.* subg. *Poa* sect. *Macropoa* a *Poa*) a HAMBADD (*P.* subg. *Poa* sect. *Acutifoliae*, *Austrofestuca*, *Brizoides*, *Dasypoa*, *Dioicopoa*, *Homalopoa*, *Madropoa* a neformální skupiny *Australopoa* a *Punapoa*). Později Gillespie et al. (2007) navrhuje na základě analýzy chloroplastového úseku *trnT-trnL-trnF* (TLF) rozlišovat v rámci rodu *Poa* pět podrodů (subg. *Arctopoa*, *Ochlopoa*, *Poa*, *Pseudopoa* a *Stenopoa*). Podrod *Arctopoa* se sekcemi *Arctopoa* a *Aphydris* je posléze na základě kombinované analýzy jaderného markeru ITS a chloroplastového úseku TLF z rodu *Poa* vyčleněn a je nadále považován za samostatný rod (Gillespie et al. 2008). Zároveň je v této studii skupina *Arctopoa* sect. *Sylvestres* povýšena na samostatný podrod. Stejně výsledky pak přinesla studie zaměřená jen na diploidní druhy (Soreng et al. 2010). Studie zahrnující buď větší množství jaderných a chloroplastových markerů (Tkach et al. 2020) nebo využívající „next generation sequencing“ přístupy (Orton et al. 2019, 2021) zatím nepřinesly v systematice rodu *Poa* větší průlom, protože zahrnuly pouze omezené množství vzorků.

V prozatím poslední celoevropském taxonomickém zpracování rodu se podle Edmondsona (1980) v Evropě vyskytuje celkem třináct sekcí, konkrétně jsou to sekce *Ochlopoa* (zahrnuje například *P. annua*, *P. supina*), *Coenopoa* (např. *P. trivialis*, která ale podle Gillespie & Soreng (2005) patří do sect. *Pandemos*), *Poa* (např. *P. pratensis*, *P. angustifolia*), *Cenisia* (bývá někdy vyčleňována ze sect. *Poa*; např. *P. granitica*), *Macropoa* (např. *P. longifolia*), *Homalopoa* (např. *P. chaixii*, *P. remota*), *Leptophyllae* (*P. stiriaca*, podle Gillespie & Soreng (2005) i Soreng et al. (2010) figuruje jako *incertae sedis*, tj. tuto sekci nezařazují do žádné z větví), *Oreinos* (např. *P. laxa*), *Tichopoa* (*P. compressa*), *Stenopoa* (např. *P. palustris*, *P. glauca*, *P. nemoralis*), *Abbreviatae* (*P. abbreviata*), *Nanopoa* (*P. trichophylla*, Gillespie & Soreng (2005) tuto sekci nezařazují do žádné z větví) a jako poslední sect. *Bolbophorum*, které se věnuje tato práce a její druhy jsou uvedeny dále.

## 3.2 *Poa* sect. *Bolbophorum*

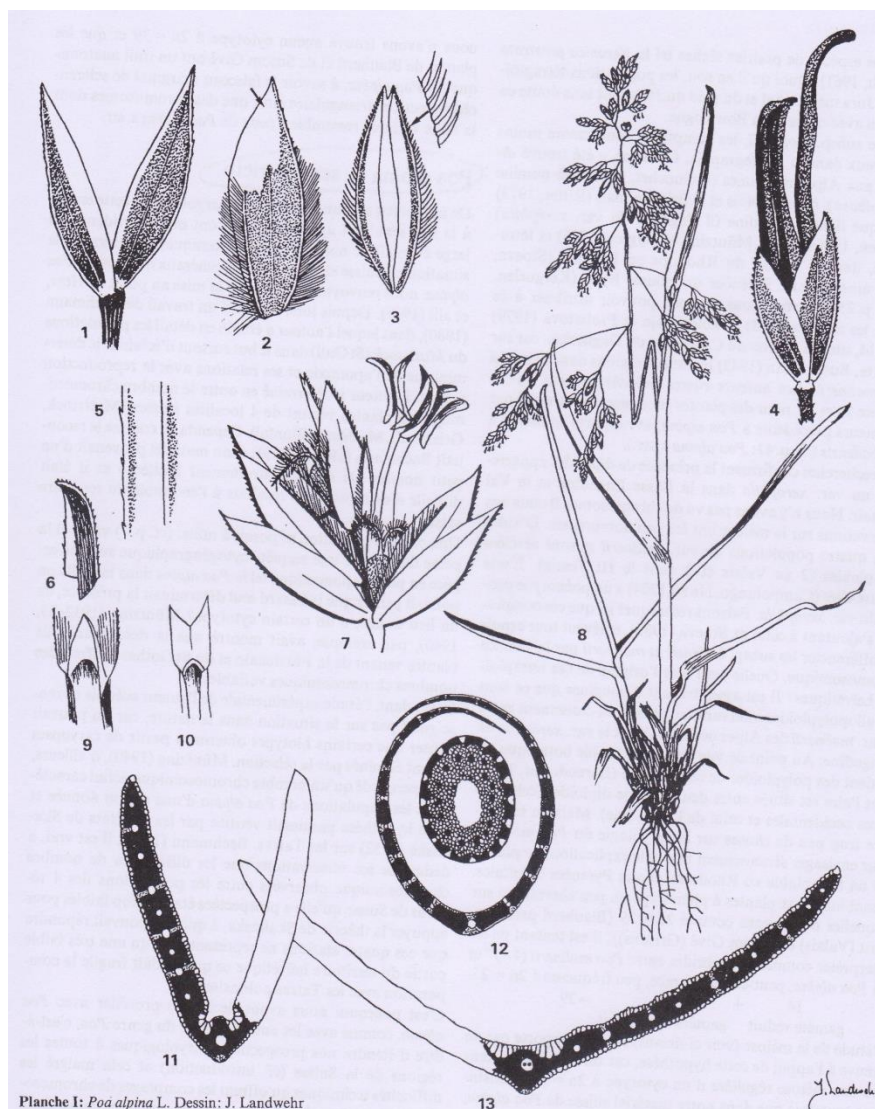
### 3.2.1 Taxonomie *Poa* sect. *Bolbophorum*

Podle koncepce Aschersona & Graebnera (1898–1902) sekce *Bolbophorum* sdružuje druhy *Poa bulbosa* a *P. concinna* s druhy okolo *P. alpina* a *P. badensis*, s touto koncepcí souhlasí i Nannfeldt (1935), který pro sekci používá název *Subbulbosae* (Fries v Nannfeldt 1935), podle Edmondsona nomen nudum (Heywood 1978). Oproti těmto názorům Lindmann (Nannfeldt 1935) odděluje skupinu *P. bulbosa* (= *Arenariae* Heg.) od *Alpinae* Heg. (k těm patří i *P. laxa* a *P. minor*). Také Roshevitz & Schischkin (1934) rozlišují dvě série, *Bulbosae* Rosh. a *Alpinae* Rosh. Sukopp a Scholz (1968) považují pojetí Roshevitzze za vylepšení oproti koncepci Aschersona & Graebnera, *P. bulbosa* je zde ostře oddělena od *P. alpina*, *P. badensis* a dalších jejích příbuzných druhů. Toto rozdělení je částečně založeno na ekologiii, je tedy otázkou, zda se lze takto provést. Narušuje ho problematické přiřazení taxonu *P. timoleontis*, který se vyskytuje na Balkánu. Tyto dvě skupiny sdružuje kromě existence taxonu *P. timoleontis* také viviparie u *P. alpina* a *P. bulbosa*; přítomnost diploidních, mediteránních nebo stepních taxonů v *Alpinae* (*P. badensis*, *P. pumila*, *P. ligulata*) i *Bulbosae* (*P. bulbosa* subsp. *delicatula*, *P. concinna*); vysoký počet cytotypů *P. alpina* a *P. bulbosa*; frekvence výskytu aneuploidních cytotypů u *P. alpina* a *P. bulbosa*; většinou distální heterochromatin u *P. alpina* a *P. bulbosa*; stejný vzhled chromozomů u *P. alpina* a *P. bulbosa* v podobě výrazného rozdílu v délce mezi největším a nejmenším chromozomem v sadě. Tyto dvě skupiny se tedy pravděpodobně vyvinuly paralelně nebo divergentně z diploidních taxonů s úzkými morfologickými vztahy. Z těchto důvodů je následována koncepce Edmondsona (1978, 1980) a je tedy ponechána jediná sekce *Bolbophorum*, zahrnující jak *P. alpina* a *P. badensis*, tak *P. bulbosa* a *P. perconcinna* (Duckert-Henriod M. M. & Favarger C. 1987).

Řada autorů (Meusel 1965, Hess 1967, Edmondson 1980, Welten & Sutter 1982) odděluje *Poa alpina* L. od skupiny *P. badensis* Haenke, krátkolisté formy *P. alpina* L. s. str. je však často náročné od *P. badensis* s. l. odlišit. Z výše uvedeného tedy plyne, že v rámci sekce *Bolbophorum* lze rozlišit dvě morfologicky odlišné skupiny, sdružené okolo *P. alpina* a *P. bulbosa*. Pro přehlednost jsou v této práci tyto dvě skupiny považovány za odlišné druhové agregáty a práce se od tohoto bodu dále zabývá zejména *P. alpina* agg.

### 3.2.2 Morfologie *Poa* sect. *Bolbophorum*

Sekce *Bolbophorum* (Ascherson & Graebner) zahrnuje řídké až hustě trsnaté lipnice s vnitropochevním větvením. Stébla jsou hladká, cibulkovitá na bázi nebo oděná do pochev starých listů, často pouze s malým počtem kolének. Listy jsou ploché až složené, obvykle s kápovitou špičkou, u některých druhů s chrupavčitém lemem na okraji. Větve laty jsou hladké až draslavé. Klásky jsou v obrysu vejčité, zelené až fialově naběhlé, s 2–9 květy. Pluchy jsou na kýlu a krajních žilkách chlupaté, chlupy jsou tuhé, často dlouhé, někdy krátké, na abaxiální straně často přitisklé. Kýly pluch jsou draslavé až brvité (Edmondson 1980). Morfologii zástupce *Poa* sect. *Bolbophorum*, *Poa alpina*, ukazuje Obrázek č. 1.



**Obrázek č. 1:** Ukázka morfologie jednoho z taxonů *Poa* sect. *Bolbophorum*, *Poa alpina* (Duckert-Henriod & Favarger 1987). 1 – plevy, 2 – plucha, 3 – pluška, 4 – živorodý klásek, 5 – okraj listu, 6 – kápovitá špička listu, 7 – klásek s prašníky, 8 – celá rostlina, 9 – jazýček stébelného listu (není zpravidla ostrý jako zde na obrázku), 10 – jazýček přízemního listu, 11 – řez přízemním listem, 12 – řez stéblem a pochvou stébelného listu, 13 – řez stébelným listem.

### 3.3 Taxony sect. *Bolbophorum*

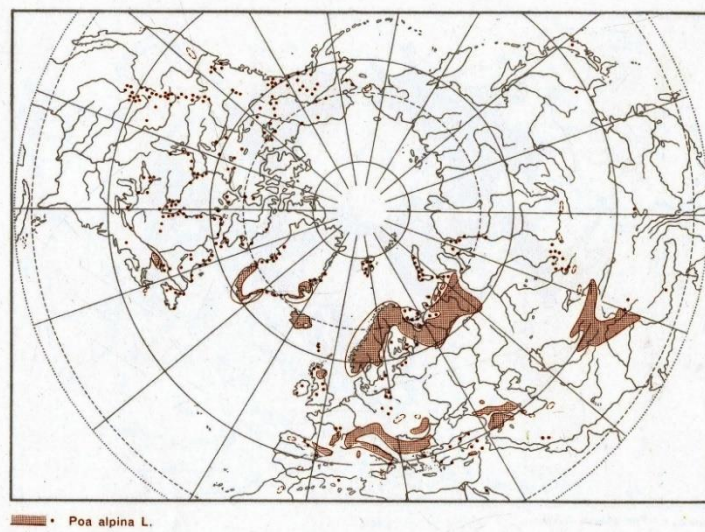
#### 3.3.1 *Poa alpina* L. (lipnice alpská)

**Morfologie:** Lipnice alpská (Obrázek č. 2) je volně trsnatá, se stébly 15–40 cm vysokými, přímými nebo kolénkatě vystoupavými, bez ztlustlých bází. Listy jsou 4–10 cm dlouhé, 2–4,5 mm široké, sytě zelené až nasivělé, bez bělavých chrupavčitých lemů. Jazyček přízemních listů je 1–3 mm dlouhý, uťatý, jazyček stébelných listů 3–5 mm dlouhý, často dřípený. Lata jehlancovitá s větvemi ve spodních nodech ve dvojicích. Klásky nařialovělé, s 4–9 květy, často živorodé. Plevy jsou nestejně, pluchy hustě chlupaté na kýlech a žilkách, řídce chlupaté mezi žilkami, obvykle řídce huňatá na bázi, plušky dole na kýlu brvité (Edmondson 1980; Dostál 1989; Ciocârlan 2000; Martinčič et al. 2007; Fischer, Oswald & Wagner 2008; Špryňar & Štěpánek 2019).

**Počet chromozomů:**  $2n = 22, 26, 28, 33–35, 37–40, 42–46, 56$  (Edmondson 1980);  $2n = 21, 22, 26, 28, 33–46$  (Dostál 1989);  $2n = 14–74$  (Ciocârlan 2000);  $2n = 28$  až ca 70 (Špryňar & Štěpánek 2019).

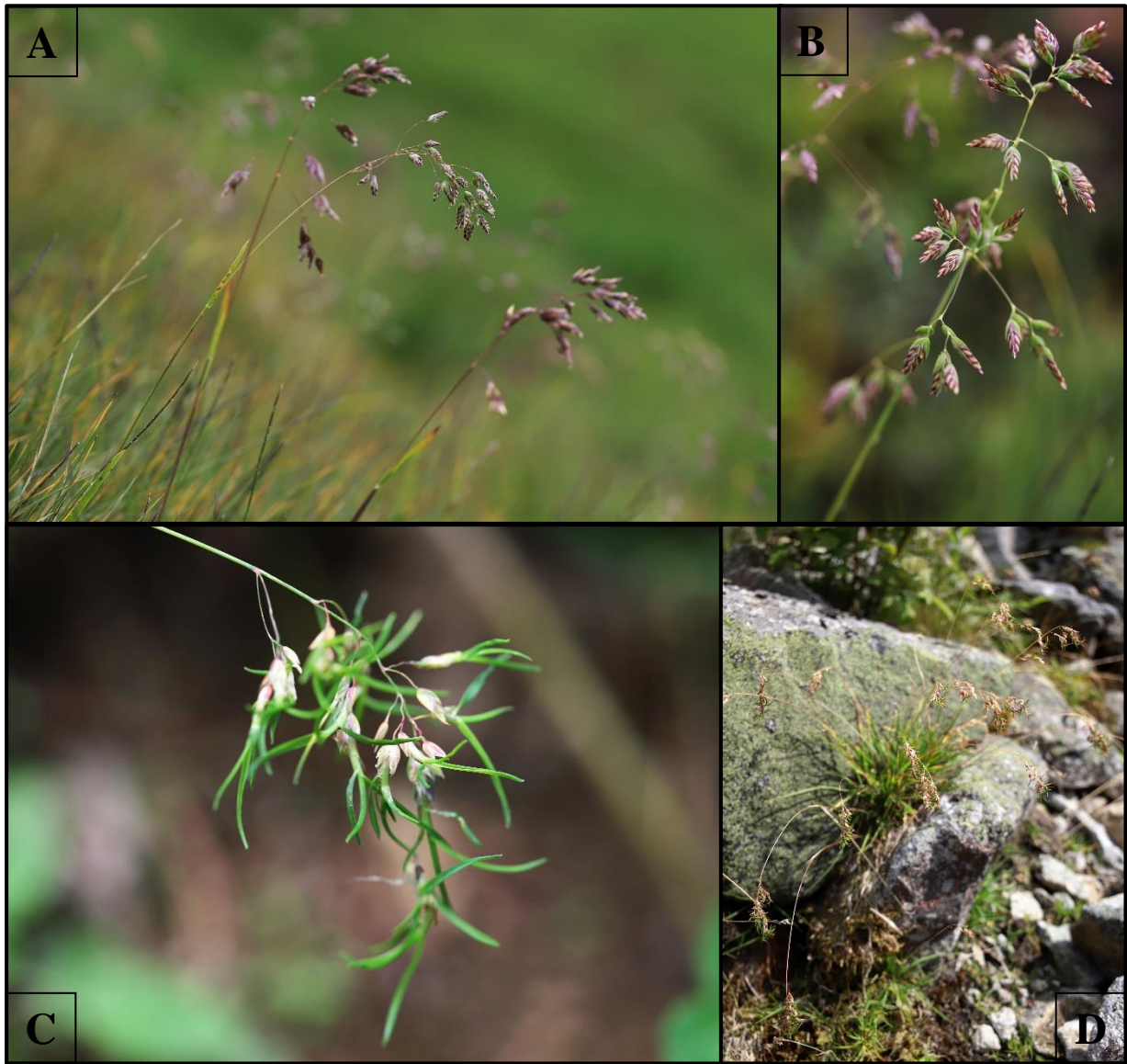
**Ekologie:** Horské pastviny a exponované trávníky, skalní štěrbiny, kamenité svahy, trávníky v karech (Edmondson 1980; Špryňar & Štěpánek 2019).

**Rozšíření:** Areál výskytu je rozsáhlý, arкто-alpinský, na severní polokouli až po 81°40' severní šířky (Schröter 1926), celkové rozšíření zobrazuje Obrázek č. 2 (Hultén & Fries 1986); v Evropě se vyskytuje v horách a lokálně také na severu v nižších nadmořských výškách (Edmondson 1980).



Obrázek č. 2: Celkový arкто-alpinský areál výskytu *Poa alpina* (Hultén & Fries 1986).





**Obrázek č. 3:** *Poa alpina*: neživorodé rostliny ve Velké kotlině v Hrubém Jeseníku (CZ) – A a B; živorodé rostliny v Belianských Tatrách (SK) – C a ve Vysokých Tatrách u Popradského plesa (SK) – D.

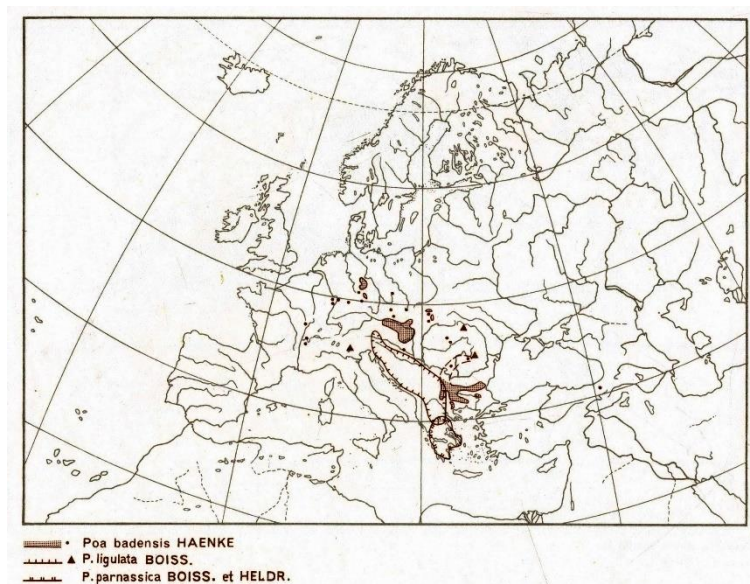
### 3.3.2 *Poa badensis* Haenke ex Willd. (lipnice bádenská)

**Morfologie:** Lipnice bádenská (Obrázek č. 5) je hustě trsnatá, se stébly 15–35 cm vysokými, na bázi bez cibulkatě ztlustlých pochev. Listy jsou šedozelené, tuhé, s nápadnými bělavými chrupavčitými okraji, bazální 1,5–6 cm dlouhé, 2–5 mm široké, ploché až svinuté. Jazyček je až 1–3 mm dlouhý, zaoblený až uťatý, dřípený. Stébelné listy složené, krátké, s jazýčky 2–6 mm dlouhými, špičatými. Lata hustá, 2–7 cm dlouhá, vejčitá, se spodními párovitými větévkami, klásky 4–8 mm dlouhé, zelenavé, někdy nafialovělé, hustě nahloučené, s 5–9 květy, nikdy živorodé. Plevy nestejně. Pluchy bělavě chlupaté na kýlu a žilkách a řídce také mezi kýlem a žilkami, řídce dlouze vlnitě chlupaté na bázi. Kýly na plušce drsné (Edmondson 1980; Dostál 1989; Ciocârlan 2000; Martinčič et al. 2007; Fischer, Oswald & Wagner 2008; Špryňar & Štěpánek 2019).

**Počet chromozomů:**  $2n = 14 + 0-8 B, 18, 21, 28$  (Edmondson 1980);  $2n = 14$  (Dostál 1989);  $2n = 14-74$  (Ciocârlan 2000);  $2n = 14, 18, 21, 28$  (Špryňar & Štěpánek 2019).

**Ekologie:** suché skály a písčité půdy, suché kamenité a travnaté stráně, skalnaté svahy na zásaditých horninách, především vápencích (Edmondson 1980; Fischer, Oswald & Wagner 2008; Špryňar & Štěpánek 2019).

**Rozšíření:** střední Evropa a severní část Balkánského poloostrova (Edmondson 1980), viz Obrázek č. 4 (Hultén & Fries 1986).



Obrázek č. 4: Celkový areál *Poa badensis* (Hultén & Fries 1986).





**Obrázek č. 5:** *Poa badensis* v PP Skalky u Sedlece (CZ) (foto vpravo: František Lamla).

### 3.3.3 *Poa crassipes* Domin ex Šourek (lipnice tlustonohá)

**Morfologie:** Lipnice tlustonohá (Obrázek č. 6) tvoří kompaktní trsy měkkých, plochých, okolo 2 mm širokých sivozelených listů bez výrazného lemu, má stébla na bázi válcovitě až cibulkatě ztlustlá, obalená pochvami. Lata je řídká, 3–4 cm dlouhá, lesklá, s pětikvětými klásky, nikdy živorodými (Šourek 1959; Dostál 1989; Špryňar & Štěpánek 2019).

**Počet chromozomů:**  $2n = 14$  (Dostál 1989).

**Ekologie:** vápence (Špryňar & Štěpánek 2019).

**Rozšíření:** Kotouč u Štramberka (CZ) a Vršatec (SK) (Dostál 1989).

*Poa crassipes* byla popsána K. Dominem v roce 1950, kdy se k němu dostala položka z Vršatce s předchozím určením jako *Poa alpina*. Nový druh byl popsán jako lipnice mnoha znaky náležející do skupiny *Poa alpina*, *P. bulbosa*, *P. badensis*, *P. pseudoconcinna* atd., která se jeví jako mikrodrůh (Šourek 1959). Tento taxon je označován za nejasný, vyžadující další studium. Předpokládá se příbuznost s lipnicí bádenskou, od které ji odlišují delší listy s nevýrazným lemem a podobá se tak spíše lipnici alpské (Dostál 1989, Špryňar & Štěpánek 2019).



**Obrázek č. 6:** *Poa crassipes* rostoucí na skalkách na Chmeľové nedaleko Vršatce (SK).



### 3.3.4 *Poa molinerii* Balbis (lipnice Molineriho)

**Morfologie:** Lipnice Molineriho (Obrázek č. 7) je hustě trsnatá, se stébly 8–20 cm vysokými, na bázi s hustě přilehlými, někdy cibulkatě ztlustlými pochvami. Listy jsou 2–6 cm dlouhé, 1–2,5 mm široké, šedozelené, obvykle těsně složené, někdy ploché, s okraji více či méně chrupavčitými. Jazyček přízemních listů do 1 mm, tupý, často dřipený, jazyček stébelných listů 1–3,5 mm dlouhý, špičatý. Lata 1,5–4 cm dlouhá, hustá, úzce oválná až vejčitá, s větvemi ve spodním nodech většinou po dvou. Klásky více či méně nafialovělé, 2,5–8,5 mm dlouhé, se 2–8 květy, plevy téměř stejné, pluchy více či méně dlouze chlupaté na kýlu a žilkách, řídce chlupaté mezi žilkami, plušky níže na kýlu brvité nebo celé draslavé (Edmondson 1980; Dostál 1989; Ciocârlan 2000; Martinčič et al. 2007; Fischer, Oswald & Wagner 2008).

**Počet chromozomů:**  $2n = 14$  (Edmondson 1980; Ciocârlan 2000);  $2n = 14, 28$  (Dostál 1989).

**Ekologie:** suché, výslunné stráně, pahorky a skály, zpravidla vápence, hory (Edmondson 1980; Dostál 1989).

**Rozšíření:** hory severní a střední Evropy (Edmondson 1980).



**Obrázek č. 7:** *Poa molinerii* v lomu nedaleko Muráně v NP Muráňská planina (SK).

### 3.3.5 *Poa pumila* Host

**Morfologie:** *Poa pumila* je hustě trsnatým druhem se stébly 5–30 cm vysokými. Listy jsou 2–5 cm dlouhé, 0,2–1,5 mm široké, složené nebo ploché, zelené, bez chrupavčitých lemů. Jazyčky u bazálních listů 1–2 mm dlouhé, uťaté, u stébelných listů 2–3 mm dlouhé, špičaté. Lata 2,5–5 cm dlouhá, spíše otevřená, oválná až vejcovitá, s 2–3 větévkami. Klásky nazelenalé až nafialovělé, se 4–6 květy, plevy jsou téměř stejné. Pluchy jsou krátce chlupaté na kýlu a žilkách, lysé mezi žilkami, řídce huňaté na bázi. Plušky na kýlu mírně draslavé nebo naspodu řídce krátce chlupaté (Edmondson 1980; Ciocârlan 2000; Martinčič et al. 2007; Fischer, Oswald & Wagner 2008).

**Počet chromozomů:**  $2n = 14$  (Edmondson 1980; Ciocârlan 2000).

**Ekologie:** horské pastviny, skalní štěrby, skalnaté trávníky, na bazickém podkladu (Edmondson 1980; Fischer, Oswald & Wagner 2008).

**Rozšíření:** východní Alpy, hory Balkánského poloostrova a Rumunska (Edmondson 1980).

### 3.3.6 *Poa ursina* Velen. (syn. *Poa media* Schur)

**Morfologie:** *Poa media* je volně trsnatý, nasivěle zbarvený druh se stébly od 15 do 40 cm. Listy jsou 4–9 cm dlouhé, 1–2 mm široké, ploché až složené a bez chrupavčitého lemu. Jazyčky mají 1–2,5 mm, jsou zaoblené, více či méně dřípené. Lata jsou 3,5–5 cm dlouhé, kompaktní, oválné, s jednou, častěji dvěma větvemi ve spodním nodu. Klásky jsou zabarvené do fialova, s 3–5 květy, nikdy živorodé. Plevy jsou nestejně, pluchy chlupaté na kýlu a žilkách, málo nebo vůbec chlupaté na bázi. Plušky jsou na spodní polovině kýlu brvitě (Edmondson 1980; Ciocârlan 2000).

**Počet chromozomů:**  $2n = 14 + 0-2B$  (Edmondson 1980);  $2n = 14$  (Ciocârlan 2000).

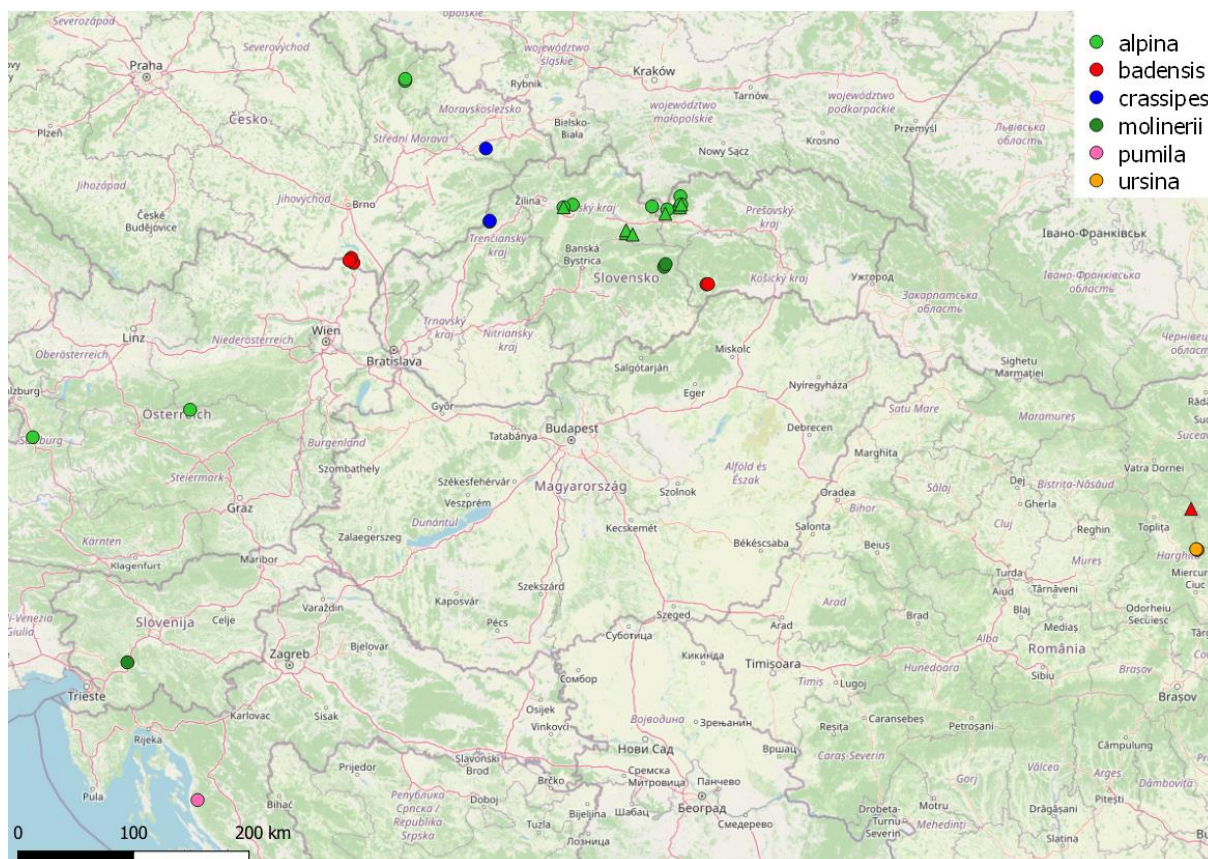
**Ekologie:** horské pastviny (Edmondson 1980)

**Rozšíření:** Balkánský poloostrov, severní a východní Karpaty (Edmondson 1980)

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Rostlinný materiál

Sběr rostlinného materiálu probíhal v letech 2011–2023 na území České republiky, Slovenska, Rakouska, Slovinska, Chorvatska a Rumunska (Obrázek č. 8). Materiál byl odebírán nejčastěji z 10 jedinců (trsů) v populaci. Z rostlin byl odebrán list ke stanovení absolutní a relativní velikosti genomu průtokovou cytometrií a molekulární analýzou. Z některých rostlin byly také odebrány části trsu, které byly dále kultivovány na katedře botaniky PřF UP a dále použity pro odběr kořenů využitých k počítání chromozomů a obilek ke zjištění reprodukčních systémů, morfometrice či molekulární analýze. Všechny vzorky byly označeny třípísmenným kódem jedinečným pro lokalitu a číslem označujícím jedince. Lokality se zkratkami jsou uvedeny v Příloze č. 2.



**Obrázek č. 8:** Mapa populací, u kterých byla provedena morfometrika a byly podrobeny cytologickému studiu pomocí průtokové cytometrie (kolečka) nebo byly pouze analyzovány pomocí průtokové cytometrie (trojúhelníky). Body znázorňují jednotlivé populace, barvy jednotlivé taxony.

## 4.2 Morfometrická analýza

Morfometrika byla ve většině případů prováděna v terénu, v optimu vegetační sezóny jednotlivých druhů od května do července v letech 2021 a 2022, nejčastěji na deseti jedincích v populaci, s výjimkou malých populací a populací rostlin již dříve kultivovaných na katedře botaniky PřF UP v Olomouci. Za jedince zde byl považován trs a pro měření byly, pokud možno, vybírány trsy s alespoň třemi kvetoucími stébly, aby bylo možné pro každý znak na jedinci provést tři měření. Bylo hodnoceno 11 kvantitativních (výška stébla, délka laty, počet kolének, délka nejvyššího stébelného listu, délka jazýčku nejvyššího stébelného listu, počet větví ve spodním nodu, délka klásku, počet květů v klásku, délka přízemního listu, šířka přízemního listu, šířka lemu přízemního listu) a 4 kvalitativní znaky (plevy stejné/nestejně, živorodost/neživorodost, barva listu, barva klásku) na celkem 193 jedincích z 27 populací (Tabulka č. 1).

**Tabulka č. 1:** Počet populací a jedinců jednotlivých druhů využitých k morfometrické analýze.

druh	počet populací	počet jedinců
<i>Poa alpina</i>	12	70
<i>Poa badensis</i>	5	45
<i>Poa crassipes</i>	3	28
<i>Poa molinerii</i>	3	22
<i>Poa pumila</i>	1	3
<i>Poa ursina</i>	3	25

## 4.3 Statistická analýza morfometrických dat

Před mnohorozměrnou analýzou byla otestována normalita dat pomocí Shapiro-Wilkova testu normality. Následně byly všechny kvantitativní znaky transformovány pomocí odmocninové (výška stébla, délka jazýčku nejvyššího stébelného listu, délka klásku) a logaritmicke (délka laty, délka nejvyššího stébelného listu, délka přízemního listu, šířka přízemního listu) transformace. Následně byla vytvořena korelační matice pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (pro kvantitativní znaky). Žádný z párů znaků nedosahoval korelace  $|r| \geq 0,85$  a proto byla nadále použita celá sada znaků. Poté byla provedena deskriptivní statistika pro jednotlivé taxony. Rozdíly v kvantitativních znacích mezi taxony byly testovány pomocí analýzy variance (ANOVA) a Tukey-Kramerova testu mnohonásobného porovnání a zobrazeny v podobě boxplotů. Rozdíly mezi kvalitativními znaky byly testovány pomocí chí-kvadrát testu a zobrazeny jako frekvence pomocí skládaných sloupcových grafů. Dále



byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA) pro dva datasety, celkový a bez živorodých rostlin s Gowerovým koeficientem pro smíšená data. Deskriptivní statistika, ANOVA a Tukey-Kramerův test byly provedeny v programu NCSS 9 (Hintze 2013), PCoA byla vypočítána pomocí statistického balíku MorphoTools 2 (Šlenker, Koutecký & Marhold 2022) v prostředí R.

#### 4.4 Průtoková cytometrie

Absolutní a relativní velikost genomu rostlin byla stanovena metodou průtokové cytometrie za použití vnitřního standardu (Doležel et al. 2007). Jako vnitřní standard byly použity listy hrachu (*Pisum sativum* L. 'Ctirad' 2C = 9,09 pg), případně žita (*Secale cereale* L. 'Daňkovské' 2C = 16,19 pg) v případě překrývání píku vzorku a píku standardu hrachu, kdy byla hodnota následně přepočítána k hodnotě standardu hrachu. Část čerstvého listu vzorku byla společně s částí listu standardu homogenizována žiletkou v Petriho misce s 1 ml pufru LB01 o pH 7,8 PVP-40 (20 mg/ml; Doležel & Bartoš 2005). Homogenát byl napipetován přes nylonový filtr do kyvety a bylo přidáno dalších 500  $\mu$ l pufru. U stanovení relativní velikosti genomu bylo nakonec přidáno 50  $\mu$ l DAPI (o konečné koncentraci 5  $\mu$ g/ml) a takto připravené vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru Partec Cy Flow ML (Partec GmbH, Münster, Německo) a u každého vzorku bylo změřeno 3000 jader. Hodnota výsledného indexu byla zjištěna podílem pozice G0/G1 píku vzorku k pozici G0/G1 píku standardu. U absolutní velikosti genomu bylo ke vzorku přidáno 50  $\mu$ l RNAsy a 50  $\mu$ l propidium jodidu (obojí o konečné koncentraci 50  $\mu$ g/ml), vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru Partec PAS (Partec GmbH, Münster, Německo) vybaveného zeleným laserem Cobolt Samba (Cobolt Samba AB, Stockholm, Švédsko) a u každého vzorku bylo změřeno 5000 jader. U každého jedince byly provedeny alespoň tři měření. V případě, že se jedno z měření odchylovalo od ostatních, byl vzorek změřen po čtvrté. Pro relativní velikost genomu bylo změřeno 274 jedinců, pro absolutní velikost genomu bylo změřeno 47 jedinců. Absolutní i relativní velikosti genomu byly rozděleny do deseti diskretních tříd (A–J) odpovídajících zřejmě jednotlivým cytotypům. Boxploty byly sestrojeny v programu NCSS 9. Pomocí průtokové cytometrie byly také u 26 obilek pocházejících ze třech jedinců (CHM2, VPH1, KOT1) *Poa crassipes* z kultivace tvořících obilky zjištěny reprodukční systémy metodou FCSS (Flow Cytometry Seed Screen), kdy se hodnotí poměr relativní velikosti genomu embrya a endospermu (Matzk et al. 2000; Šarhanová et al. 2012). Jako vnitřní standard byly opět použity listy hrachu (*Pisum sativum* L. 'Ctirad' 2C = 9,09 pg). Příprava

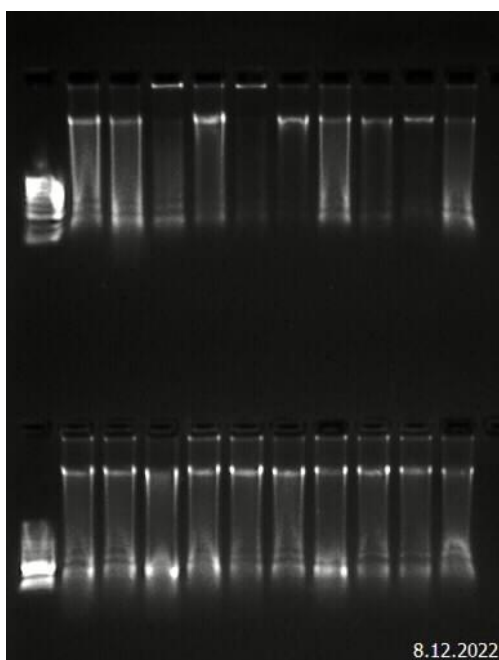
vzorků probíhala stejným, výše uvedeným způsobem, jako při měření relativní velikosti genomu u listů.

#### 4.5 Počítání chromozomů

Počítání chromozomů bylo prováděno v metafázních buňkách kořenových špiček z rostlin v kultivaci. Nejprve byly odebrané kořeny 24 hodin předpůsobeny ve tmě v ledové vodě. Následně byly přeneseny do Farmerovy fixáže (96% ethanol : ledová kyselina octová, 3 : 1) a ponechány alespoň 24 hodin ve tmě při 4 °C. Před barvením byly kořeny propláchnuty ve vodě, umístěny na 8 minut při 60 °C do 1N HCl a nakonec opět propláchnuty ve vodě. Barvení bylo prováděno pomocí Schiffova reagens (80 minut ve tmě). Byla odříznuta kořenová špička a roztlakové preparáty byly zhotoveny v kapce kyseliny octové.

#### 4.6 Izolace genomické DNA

Genomická DNA byla izolována celkem z 60 jedinců pěti druhů, u většiny případů ze tří jedinců na populaci. Izolace DNA probíhala metodou CTAB z listů uchovaných v silikagelu podle protokolu Doyle & Doyle (1987) s drobnými úpravami. Po izolaci byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA na NanoDropu 2000 (ThermoFisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) a následně byla provedena separace elektroforézou (viz Obrázek č. 9). Před PCR pak byly vzorky s koncentrací DNA nad 50 ng/μl naředěny ddH<sub>2</sub>O na koncentraci 50 ng/μl.



**Obrázek č. 9:** Výsledek separace izolované DNA elektroforézou u části vzorků.

## 4.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a sekvenování cpDNA

U vzorků izolované genomické DNA byla pro namnožení chloroplastového úseku *trnL-trnF* provedena polymerázová řetězová reakce (PCR). Pro amplifikaci úseku byly použity primery C a F (Taberlet et al. 1991). Složení PCR mixu uvádí Tabulka č. 2, podmínky PCR jsou uvedeny v Tabulce č. 3. Výsledný produkt byl přečištěn a sekvenován firmou Macrogen Europe (<https://www.macrogen-europe.com>).

**Tabulka č. 2:** Složení PCR mixu pro jeden vzorek.

PCR mix	Objem (μl)
dd H <sub>2</sub> O	9,4
Buffer	2,5
MgCl <sub>2</sub>	1,25
Primery F, R	0,25
dNTPs	0,25
Taq DNA Polymerase	0,1
DNA	1

**Tabulka č. 3:** Podmínky PCR (36 cyklů).

Fáze PCR	Doba trvání (min)	Teplota (°C)
Počáteční denaturace	03:00	95
Denaturace	00:30	95
Annealing	00:30	52
Elongace	00:30	72
Terminace	15:00	72
Zchlazení		4

## 4.8 Statistická analýza sekvenačních dat

Sekvence byly do finálního alignmentu seřazeny a dále statisticky hodnoceny v programu MEGA 11 (Tamura et al. 2021). K sekvenačním datům byly z databáze Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) přidány sekvence vzorků *Poa sect. Bolbophorum* z publikace Stoneberg Holt et al. (2004). Nejlepší model byl vybrán pomocí funkce „Model selection“ metodou Maximum Likelihood na základě nejnižší hodnoty Bayesiánského informačního skóre (BIC). Jako výsledný model byl vybrán model Tamura se třemi parametry (Tamura 1994) a Gamma substituční distribucí (T92+G). Fylogenetický strom byl vypočítán na základě výše uvedeného modelu metodou Maximum Likelihood (ML) s 1000 bootstrap replikacemi.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Morfometrika

Výsledky deskriptivní statistiky pro všechny kvantitativní znaky všech taxonů, výsledky jednocestné ANOVA (F a p hodnoty) a Tukey-Kramerova testu jsou uvedeny v Tabulce č. 4. Variabilitu taxonů v měřených kvantitativních znacích graficky znázorňují boxploty na Obrázku č. 10 a 11. Obrázky č. 12 a 13 zobrazují výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) pro dva datasety, celkový a bez živorodých rostlin. Proporce kvalitativních znaků u jednotlivých taxonů v procentech a výsledky  $\chi^2$  testu jsou uvedeny v Tabulce č. 5 a graficky znázorněny skládanými sloupcovými grafy na Obrázku č. 14.

Studované taxony se signifikantně odlišovaly ve všech studovaných kvantitativních i kvalitativních znacích. Odlišnost v rámci jednoho znaku však často způsoboval vždy jeden nebo několik taxonů, např. *P. badensis* a *P. pumila* se od ostatních taxonů i od sebe navzájem odlišovaly šířkou lemu přízemního listu, ostatní taxony byly v tomto znaku nevariabilní.

V analýze hlavních koordinát se při zahrnutí všech studovaných rostlin podle první osy vytvořily tři skupiny: 1) *P. badensis* a *P. molinerii*, 2) *P. crassipes*, *P. ursina* a část studovaných jedinců *P. alpina* a *P. pumila* a 3) *P. alpina* a *P. pumila*. Podél druhé osy došlo k částečnému oddělení *P. badensis* a *P. molinerii* a také *P. crassipes* od zbytku skupiny 2. Při zobrazení první a třetí osy vytváří *P. badensis*, *P. crassipes* a *P. molinerii* samostatné shluky, oddělené od zbývajících taxonů a *P. ursina* tvoří zřetelný shluk na okraji variability *P. alpina* (Obrázek č. 12). Podobný pattern následně ukazuje i analýza bez živorodých jedinců (Obrázek č. 13).

**Tabulka č. 4:** Přehled deskriptivní statistiky měřených kvantitativních znaků a výsledků ANOVA pro jednotlivé znaky. U každého taxonu je pro každý znak uveden průměr, směrodatná odchylka, minimum a maximum. Horní indexy u průměrů ukazují výsledky Tukey-Kramerova testu, tedy které taxony se svými průměry od daného taxonu liší. Výsledky ANOVA jsou reprezentovány hodnotou F a p hodnota ukazuje pravděpodobnost shodnosti průměrů měřeného znaku.

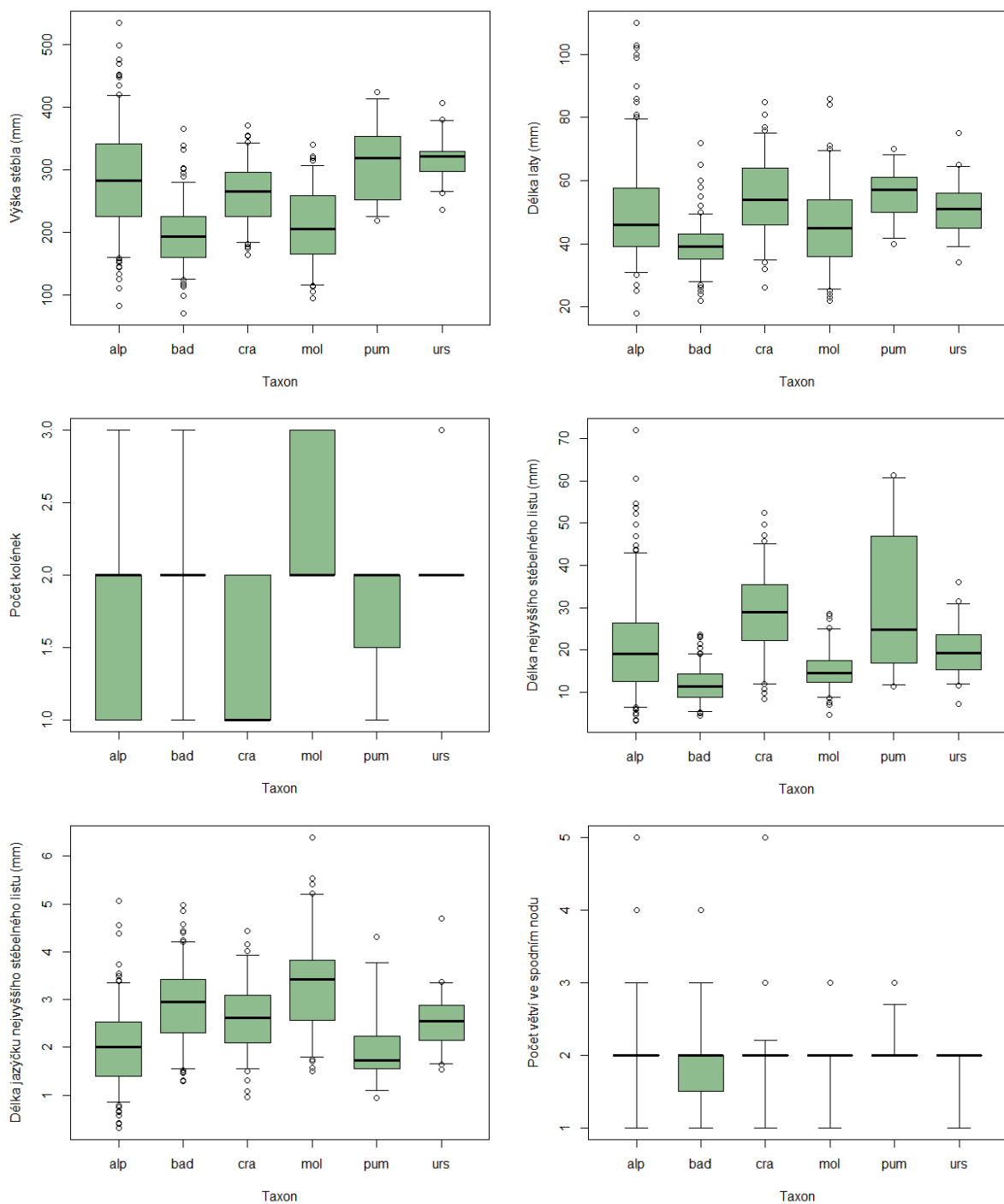
taxon	znak	výška stébla (mm)	délka laty (mm)	počet kolének	délka nejvyššího stébelného listu (mm)	délka jazýčku nejvyššího stébelného listu (mm)	počet větví ve spodním nodu
<i>Poa alpina</i>	průměr	287.40 <sup>b, c, m</sup>	49.92 <sup>b</sup>	1.68 <sup>b, c, m, u</sup>	20.88 <sup>b, c, m, p</sup>	2.02 <sup>b, c, m, u</sup>	2.10 <sup>b, m</sup>
	±SD	80.96	15.85	0.61	11.48	0.82	0.61
	min–max	83–534	18–110	1–3	3.36–71.95	0.32–5.07	1–5
<i>Poa badensis</i>	průměr	195.18 <sup>a, c, p, u</sup>	39.15 <sup>a, c, m, p, u</sup>	1.97 <sup>a, c, m</sup>	11.82 <sup>a, c, p, u</sup>	2.91 <sup>a, m</sup>	1.81 <sup>a</sup>
	±SD	49.47	7.52	0.45	4.23	0.80	0.55
	min–max	71–365	22–72	1–3	4.46–23.63	1.3–4.98	1–4
<i>Poa crassipes</i>	průměr	261.95 <sup>a, b, m, u</sup>	54.68 <sup>b, m</sup>	1.34 <sup>a, b, m, u</sup>	29.12 <sup>a, b, m, u</sup>	2.64 <sup>a, m</sup>	1.97
	±SD	48.35	12.72	0.47	10.39	0.76	0.51
	min–max	164–370	26–85	1–2	8.49–52.43	0.96–4.44	1–5
<i>Poa molinerii</i>	průměr	207.33 <sup>a, c, p, u</sup>	45.73 <sup>b, c</sup>	2.47 <sup>a, b, c, p, u</sup>	15.23 <sup>a, c, p</sup>	3.38 <sup>a, b, c, p, u</sup>	1.83 <sup>a</sup>
	±SD	57.31	13.19	0.50	5.02	1.03	0.45
	min–max	95–340	22–86	2–3	4.65–28.62	1.51–6.39	1–3
<i>Poa pumila</i>	průměr	310.14 <sup>b, m</sup>	55.57 <sup>b</sup>	1.71 <sup>m</sup>	32.21 <sup>a, b, m, u</sup>	2.08 <sup>m</sup>	2.14
	±SD	69.96	9.44	0.45	19.19	1.01	0.35
	min–max	218–424	40–70	1–2	11.32–61.41	0.94–4.31	2–3
<i>Poa ursina</i>	průměr	315.68 <sup>b, c, m</sup>	50.96 <sup>b</sup>	2.04 <sup>a, c, m</sup>	20.12 <sup>b, c, p</sup>	2.55 <sup>a, m</sup>	1.88
	±SD	35.82	8.96	0.20	6.46	0.65	0.32
	min–max	236–406	34–75	2–3	7.33–36.11	1.53–4.70	1–2
F		45.32	18.65	39.92	42.71	33.23	5.35
p		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**Tabulka č. 4 – Pokračování**

taxon	znak	délka klásku (mm)	počet květů v klásku	délka přízemního listu (mm)	šířka přízemního listu (mm)	šířka lemu přízemního listu (mm)
<i>Poa alpina</i>	průměr	4.19 <sup>b, c, m, u</sup>	2.40 <sup>b, c, m, u</sup>	69.31 <sup>b, m</sup>	4.05 <sup>b, m</sup>	0 <sup>b, p</sup>
	±SD	1.19	1.67	28.60	1.54	0
	min–max	2.35–8.68	1–8	23.48–160.2	2.04–11.24	0
<i>Poa badensis</i>	průměr	5.69 <sup>a, m</sup>	5.04 <sup>a, m, p, u</sup>	27.96 <sup>a, c, p, u</sup>	3.09 <sup>a, c, p, u</sup>	0.11 <sup>a, c, m, p, u</sup>
	±SD	1.06	1.44	9.99	0.77	0.04
	min–max	3.13–8.32	3–10	6.72–75.54	1.53–5.16	0.02–0.21
<i>Poa crassipes</i>	průměr	5.79 <sup>a, m</sup>	4.75 <sup>a, m, u</sup>	71.84 <sup>b, m</sup>	4.32 <sup>b, m</sup>	0 <sup>b, p</sup>
	±SD	1.20	1.15	28.22	1.06	0
	min–max	3.04–8.59	3–7	24.8–154.18	1.9–6.77	0
<i>Poa molinerii</i>	průměr	4.90 <sup>a, b, c</sup>	4.02 <sup>a, b, c, u</sup>	29.28 <sup>a, c, p, u</sup>	2.92 <sup>a, c, p, u</sup>	0 <sup>b, p</sup>
	±SD	1.32	1.40	10.53	0.86	0
	min–max	2.8–7.93	2–7	14.11–56.59	1.24–4.77	0
<i>Poa pumila</i>	průměr	5.24	3.14 <sup>b, u</sup>	77.85 <sup>b, m</sup>	4.36 <sup>b, m</sup>	0.03 <sup>a, b, c, m, u</sup>
	±SD	0.43	0.83	16.69	0.58	0.02
	min–max	4.67–6	2–5	49.99–95.71	2.85–4.84	0.01–0.06
<i>Poa ursina</i>	průměr	5.51 <sup>a</sup>	6.28 <sup>a, b, c, m, p</sup>	75.57 <sup>b, m</sup>	4.00 <sup>b, m</sup>	0 <sup>b, p</sup>
	±SD	0.57	0.96	26.66	0.85	0
	min–max	4.5–7.04	5–7	33.3–142	2.6–5.7	0
F		36.60	74.11	83.88	21.64	508.31
p		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

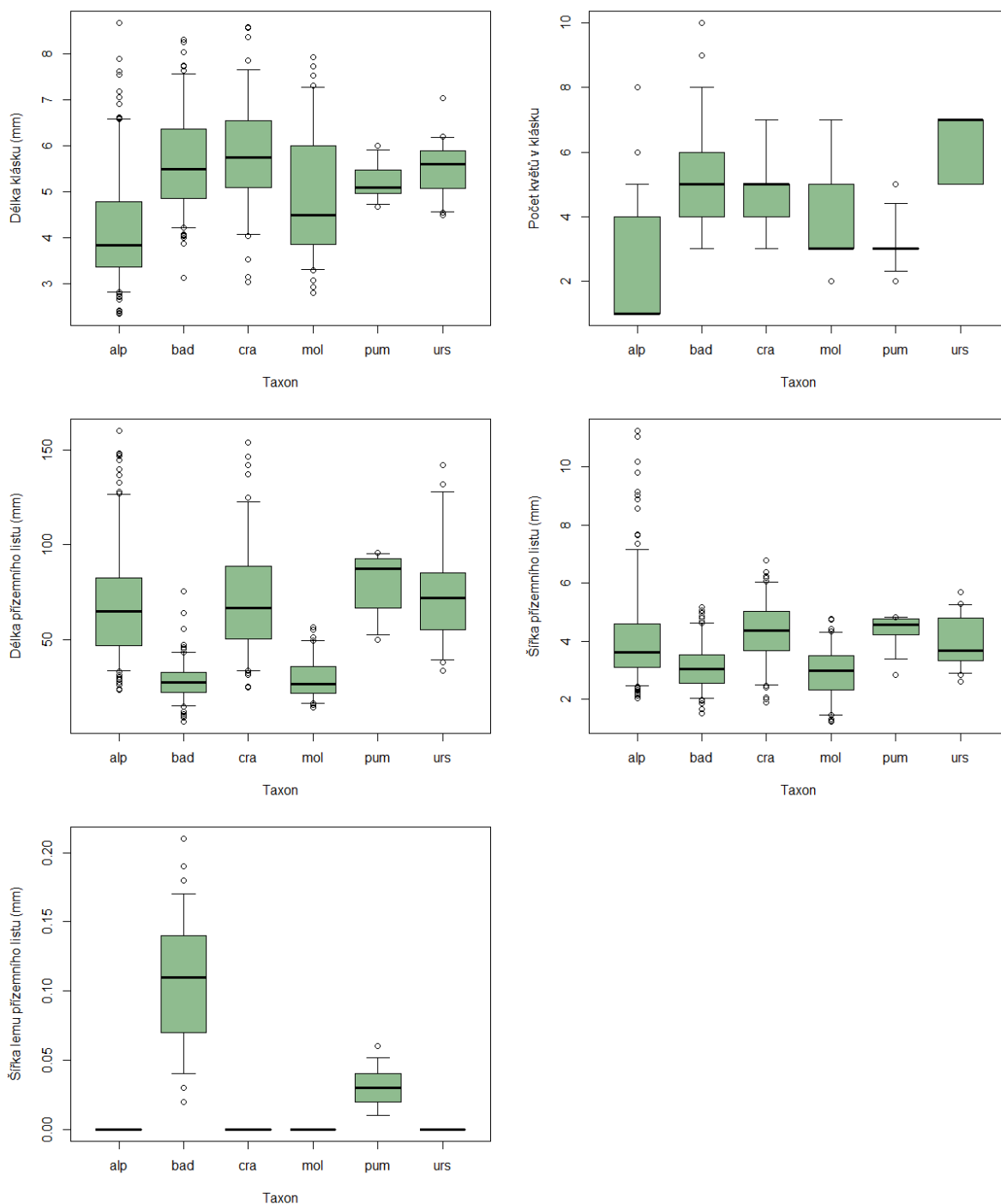
**Tabulka č. 5:** Přehled podílů stavů kvalitativních znaků v procentech pro jednotlivé druhy a výsledky  $\chi^2$  testu porovnání hodnot znaku u jednotlivých druhů.

znak	stav znaku	proporce kvalitativních znaků u jednotlivých taxonů						$\chi^2$	P
		<i>alpina</i>	<i>badensis</i>	<i>crassipes</i>	<i>molinerii</i>	<i>pumila</i>	<i>ursina</i>		
barva listu	zelená	1	0	0	0	1	1	529.0000	<0.001
	sivá	0	1	1	1	0	0		
barva klásku	zelená	0.785	0.444	1	0.091	1	0	605.0578	<0.001
	nařialovělá	0.215	0.556	0	0	0	1		
	sivá	0	0	0	0.909	0	0		
plevy	nestejně	0.995	0.941	1	0.197	0.429	1	320.2516	<0.001
	stejně	0.005	0.059	0	0.803	0.571	0		
živorodost	neživorodé	0.497	1	1	1	1	1	192.7446	<0.001
	živorodé	0.503	0	0	0	0	0		

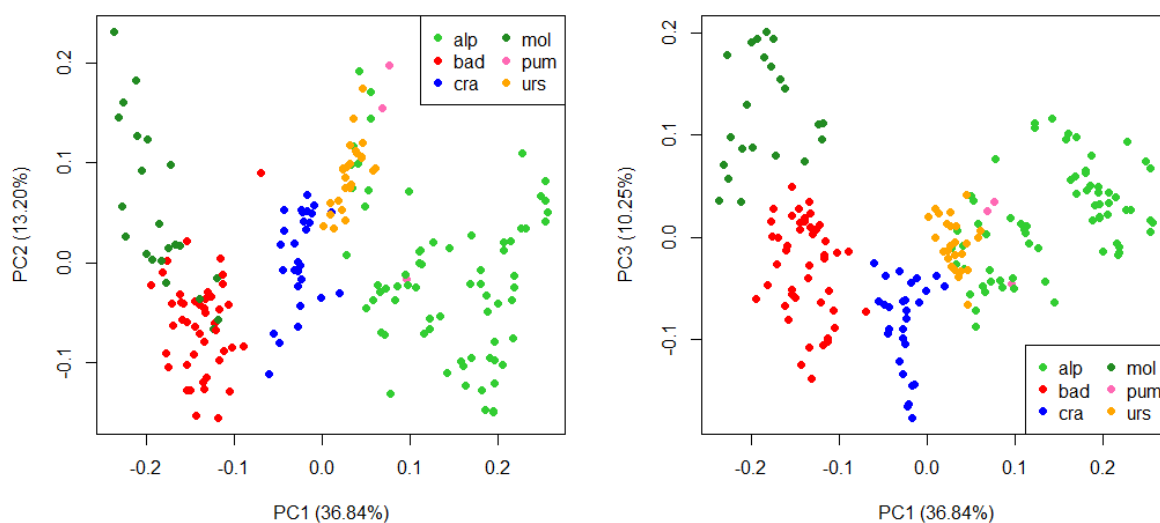


**Obrázek č. 10:** Variabilita měřených kvantitativních znaků v rámci jednotlivých taxonů a mezi taxony: výška stébla, délka lody, počet kolének, délka nejvyššího stébelného listu, délka jazýčku nejvyššího stébelného listu, počet větví ve spodním nodu (na ose x jsou jednotlivé taxony: *P. alpina* (alp), *P. badensis* (bad), *P. crassipes* (cra), *P. molinerii* (mol), *P. pumila* (pum) a *P. ursina* (urs)); osa y udává hodnotu pro daný kvantitativní znak; krabice znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, tlustá čára uvnitř krabice medián, vousy zbytek variability a prázdná kolečka odlehlé hodnoty).

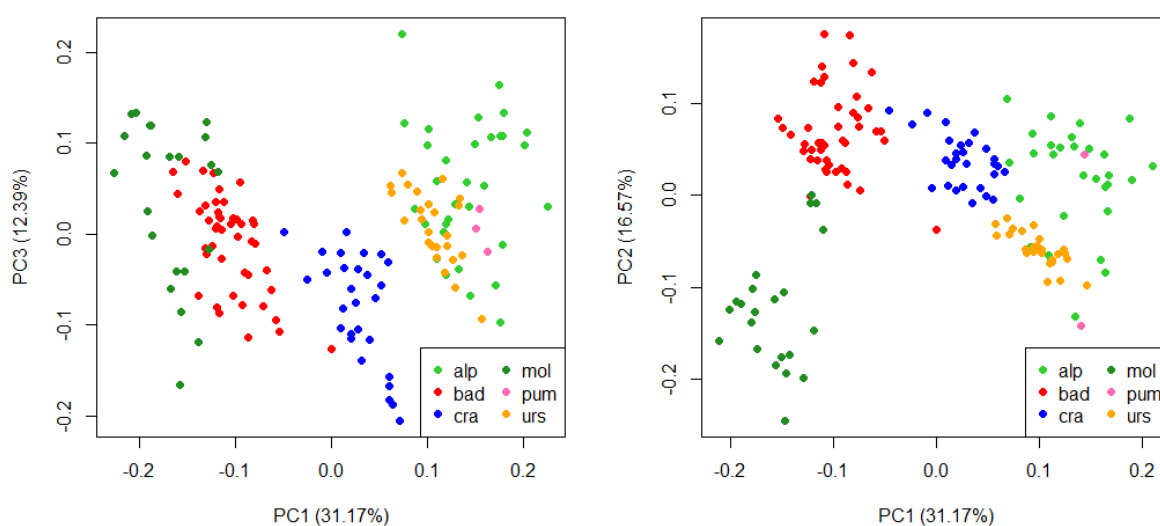




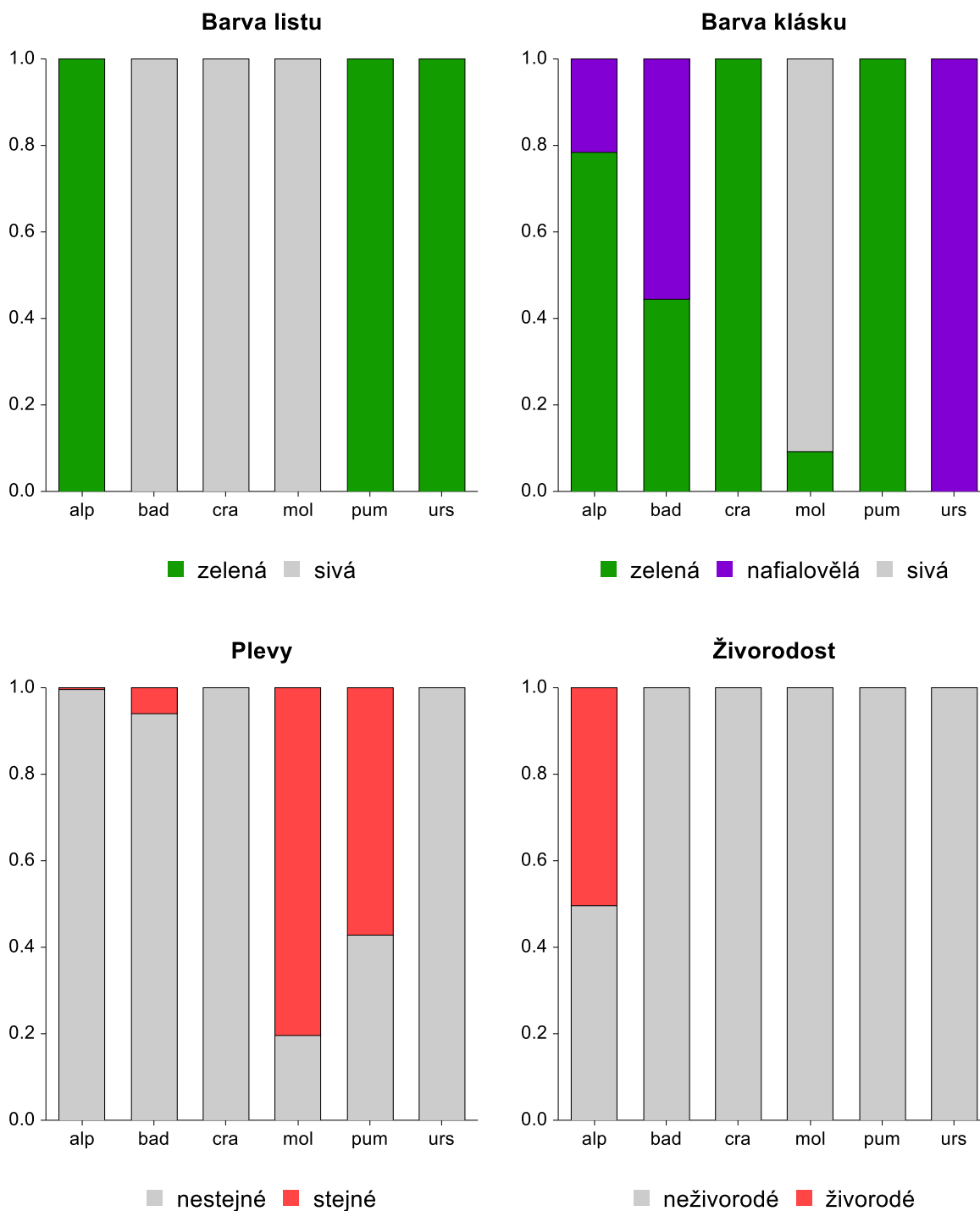
**Obrázek č. 11:** Variabilita měřených kvantitativních znaků v rámci jednotlivých taxonů a mezi taxony: délka klásku, počet květů v klásku, délka přízemního listu, šířka přízemního listu, šířka lemu přízemního listu (na ose x jsou jednotlivé taxony: *P. alpina* (alp), *P. badensis* (bad), *P. crassipes* (cra), *P. molinerii* (mol), *P. pumila* (pum) a *P. ursina* (urs); osa y udává hodnotu pro daný kvantitativní znak; krabice znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř krabice medián, vousy zbytek variability a prázdná kolečka odlehlé hodnoty).



**Obrázek č. 12:** PCoA diagramy pro taxony: *P. alpina* (alp), *P. badensis* (bad), *P. crassipes* (cra), *P. molinerii* (mol), *P. pumila* (pum) a *P. ursina* (urs) a pro všechny měřené morfologické znaky: výška stébla, délka lavy, počet kolének, délka nejvyššího stébelného listu, délka jazýčku nejvyššího stébelného listu, počet větví ve spodním nodu, délka klásku, počet květů v klásku, délka přízemního listu, šířka přízemního listu, šířka lemu přízemního listu, plevy stejné/nestejné, živorodost/neživorodost, barva listu a barva klásku. První osa vysvětluje 36,84 % variability, druhá 13,20 % a třetí 10,25 %.



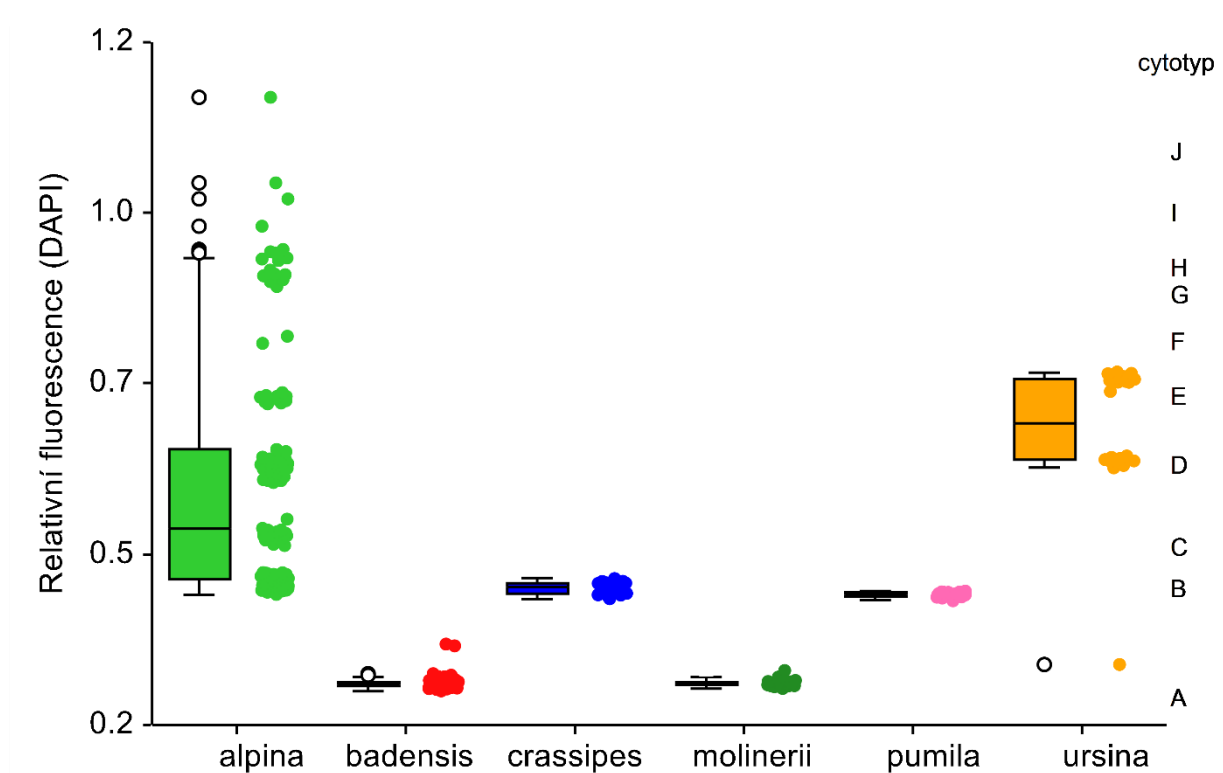
**Obrázek č. 13:** PCoA diagramy pro taxony: *P. alpina* (alp), *P. badensis* (bad), *P. crassipes* (cra), *P. molinerii* (mol), *P. pumila* (pum) a *P. ursina* (urs) a pro všechny měřené morfologické znaky, kde byly vynechány živorodé rostliny *P. alpina*. První osa vysvětluje 31,17 % variability, druhá 16,57 % a třetí 12,39 %.



**Obrázek č. 14:** Procentuální skládané sloupcové grafy pro srovnání kvalitativních znaků mezi taxony: barva listu, barva klásku, plevy a živorodost (na ose x jsou znázorněny jednotlivé taxony: *P. alpina* (alp), *P. badensis* (bad), *P. crassipes* (cra), *P. molinerii* (mol), *P. pumila* (pum) a *P. ursina* (urs); na ose y procentuální zastoupení stavů daného znaku).

## 5.2 Absolutní a relativní velikost genomu, FCSS

Měření relativní velikosti genomu (relativní fluorescence) pomocí průtokové cytometrie ukázalo značnou cytologickou variabilitu studovaného souboru vzorků. Relativní velikosti genomu se seskupily do deseti víceméně diskrétních skupin, které jsou pro přehlednost označeny písmeny A až J, kdy A má nejmenší velikost genomu a J největší. U *P. badensis*, *P. crassipes*, *P. molinerii* a *P. pumila* byl zjištěn pouze jeden cytotyp, u *P. ursina* tři cytotypy a u *P. alpina* devět cytotypů. Výsledek měření relativní velikosti genomu shrnuje Obrázek č. 15 a přehled deskriptivní statistiky Tabulka č. 6.

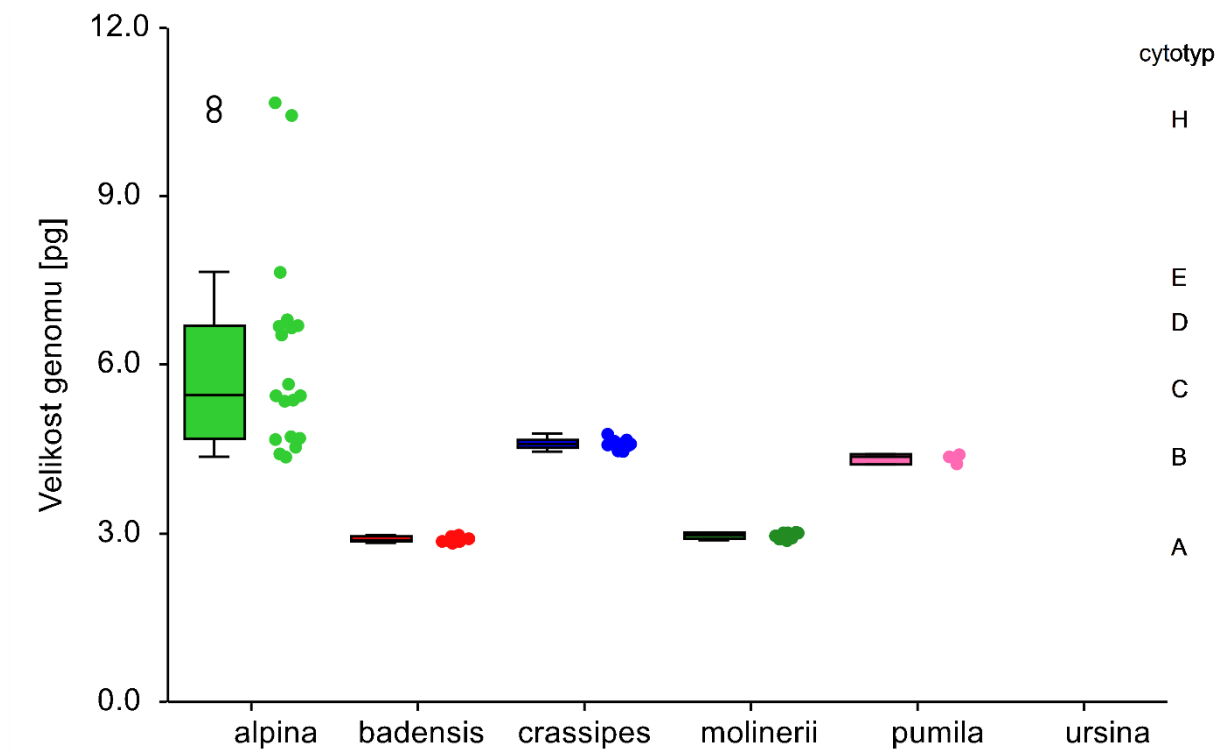


**Obrázek č. 15:** Relativní velikost genomu u jednotlivých taxonů (na ose x jsou jednotlivé taxony; osa y udává hodnotu indexu pozice G0/G1 píku vzorku vzhledem k pozici G0/G1 píku standardu; krabice znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř krabice medián, vousy zbytek variability a prázdná kolečka odlehlé hodnoty; barevná kolečka znázorňují jednotlivé hodnoty naměřených indexů). Písmena vpravo od grafu znázorňují jednotlivé cytotypy A až J.

**Tabulka č. 6:** Přehled deskriptivní statistiky relativní velikosti genomu pro cytotypy A–J jednotlivých taxonů. U každého taxonu je pro každý cytotyp uvedeno minimum, maximum, průměr, medián hodnot indexu pozice G0/G1 píku vzorku vzhledem k pozici G0/G1 píku standardu a počet měření daného cytotypu v rámci taxonu.

taxon	cytotyp	min	max	průměr	medián	n
<i>P. alpina</i>	B	0.39	0.42	0.42	0.42	48
	C	0.46	0.5	0.48	0.48	16
	D	0.56	0.6	0.6	0.6	28
	E	0.67	0.69	0.68	0.68	12
	F	0.77	0.77	-	-	1
	G	0.84	0.87	0.86	0.86	7
	H	0.88	0.9	0.89	0.89	6
	I	0.93	0.99	0.97	0.97	3
	J	1.12	1.12	-	-	1
<i>P. badensis</i>	A	0.25	0.32	0.26	0.26	56
<i>P. crassipes</i>	B	0.39	0.41	0.40	0.40	26
<i>P. mollineri</i>	A	0.25	0.28	0.26	0.26	23
<i>P. pumila</i>	B	0.38	0.40	0.39	0.39	20
<i>P. ursina</i>	A	0.29	0.29	-	-	1
	D	0.58	0.59	0.59	0.59	12
	E	0.69	0.72	0.71	0.71	13

Měření absolutní velikosti genomu u většiny studovaných taxonů prokázalo poměrně nízkou cytologickou variabilitu a odhalilo šest cytotypů, které odpovídaly cytotypům A–E a H z analýzy relativní velikosti genomu. Nejnižší cytotyp (A) byl objeven u *P. badensis* a *P. molinerii*, cytotyp B u *P. crassipes* a *P. pumila* (vzorky *P. pumila* měly mírně nižší velikost genomu než vzorky *P. crassipes*) a u vzorků *P. alpina* byly objeveny cytotypy B–E a H. Vzorky *P. ursina* nebyly do analýzy zařazeny. Výsledek měření absolutní velikosti genomu shrnuje Obrázek č. 16, přehled deskriptivní statistiky Tabulka č. 7.

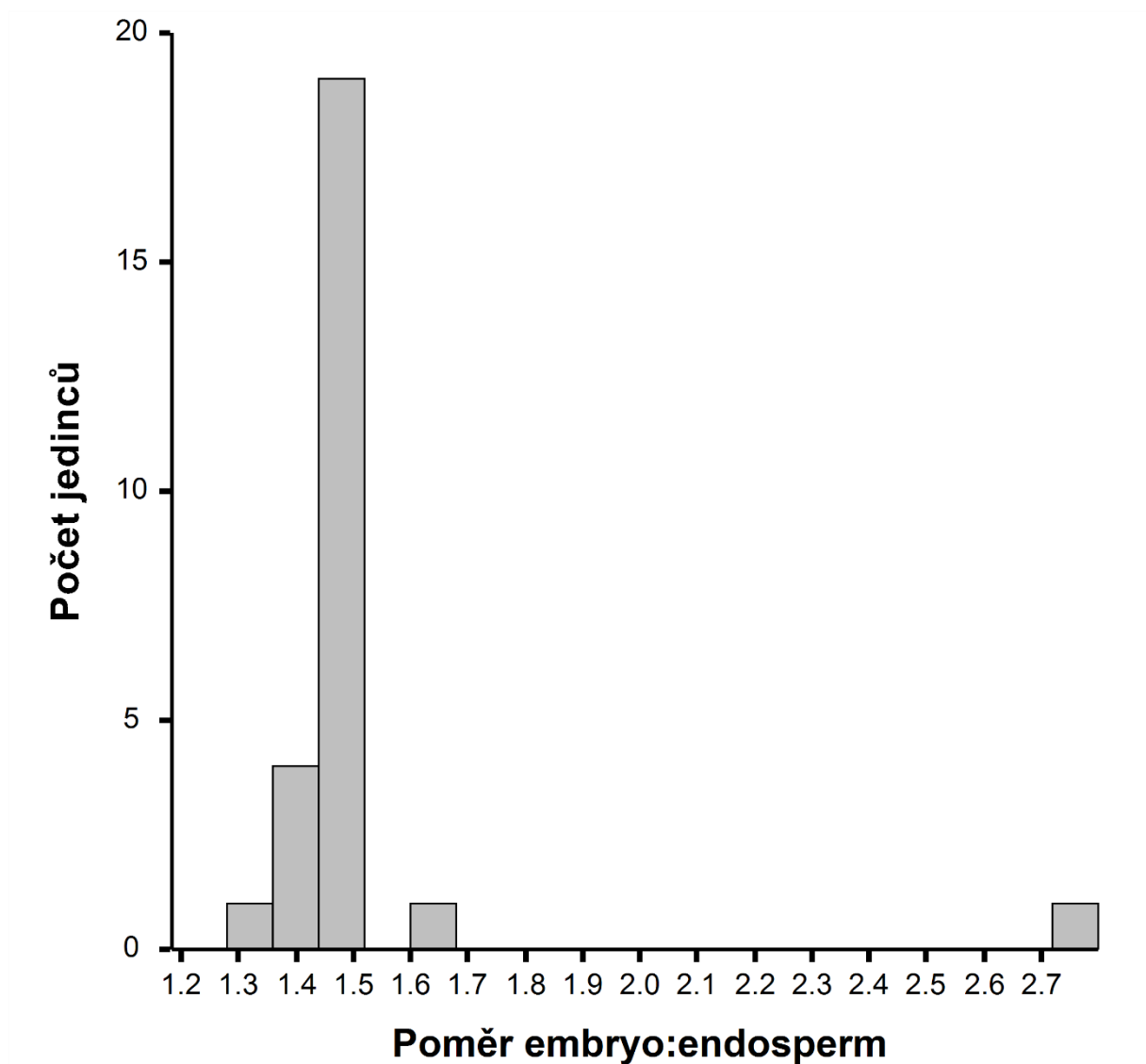


**Obrázek č. 16:** Absolutní velikost genomu u jednotlivých taxonů (na ose x jsou jednotlivé taxony, osa y udává hodnotu absolutní velikosti genomu v pg; krabice znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř krabice medián, vousy zbytek variability a prázdná kolečka odlehlé hodnoty; plná kolečka vpravo od boxplotu znázorňují jednotlivé hodnoty pro daný taxon). Písmena vpravo od grafu znázorňují jednotlivé cytotypy A až H. Pro taxon *P. ursina* nebyla absolutní velikost genomu zjišťována.

**Tabulka č. 7:** Přehled deskriptivní statistiky absolutní velikosti genomu pro cytotypy A–H jednotlivých taxonů. U každého taxonu je pro každý cytotyp uvedeno minimum, maximum, průměr a medián velikosti genomu v pg a počet měření daného cytotypu v rámci taxonu.

taxon	cytotyp	min	max	průměr	medián	n
<i>P. alpina</i>	B	4.36	4.72	4.57	4.6	6
	C	5.35	5.66	5.46	5.45	5
	D	6.53	6.8	6.68	6.69	5
	E	7.65	7.65	-	-	1
	H	10.44	10.67	10.56	10.56	2
<i>P. badensis</i>	A	2.83	2.97	2.9	2.89	8
<i>P. crassipes</i>	B	4.46	4.77	4.59	4.59	9
<i>P. molinerii</i>	A	2.87	3.02	2.96	2.99	8
<i>P. pumila</i>	B	4.24	4.4	4.33	4.36	3

Výsledek FCSS (Flow Cytometry Seed Screen) u *P. crassipes* zobrazuje Obrázek č. 17. Poměr embryo:endosperm okolo 1,5, který byl naměřen u většiny obilek, ukazuje na sexuálně vzniklá semena. Od tohoto poměru se odchyľuje několik vzorků s hodnotami  $\leq 1,4$  (dvě obilky) a  $\geq 1,6$  (jedna obilka). U jedné obilky byl naměřen poměr  $\geq 2,0$ , který ukazuje na semeno vzniklé apomikticky.

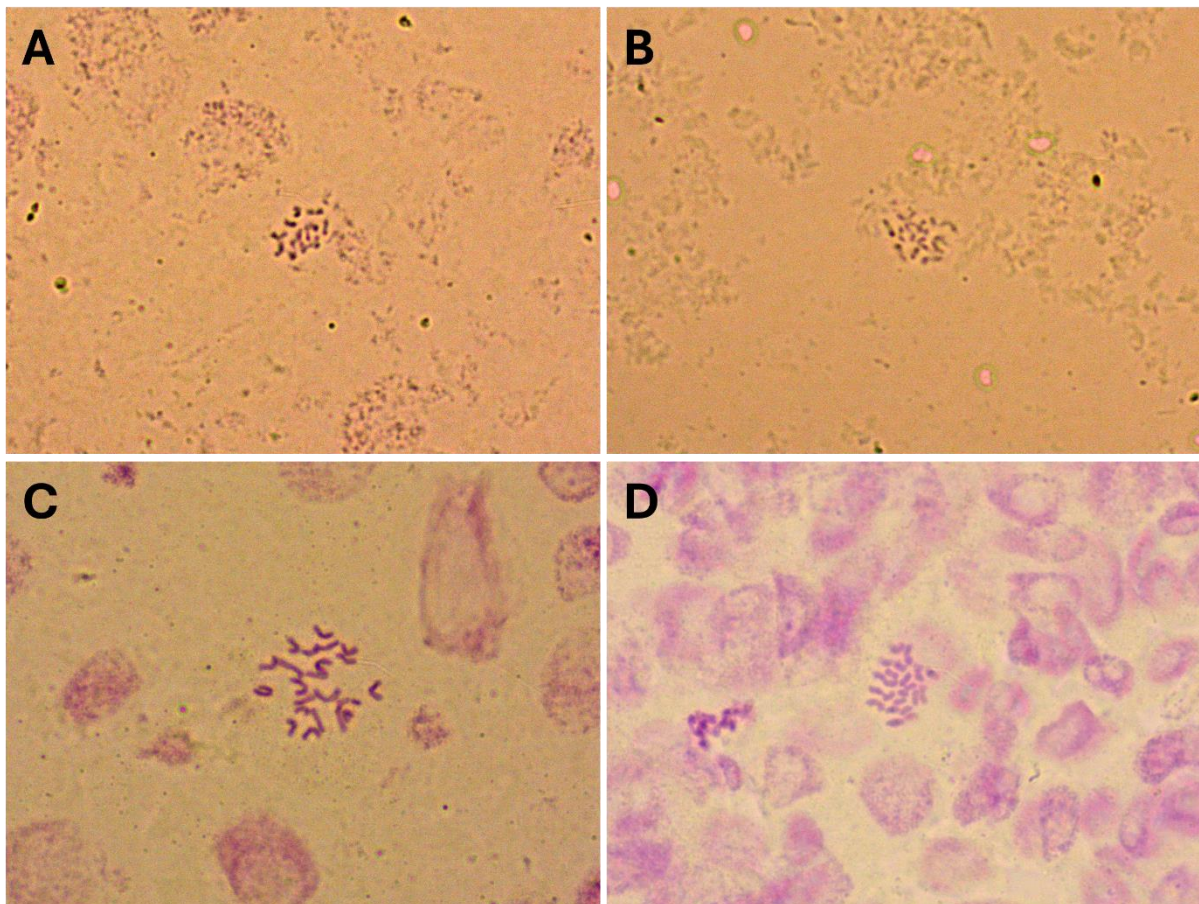


**Obrázek č. 17:** Histogram četností poměrů embryo:endosperm u *P. crassipes*. Na ose x jsou velikosti poměrů embryo:endosperm, na ose y počty měřených jedinců pro tyto poměry.



### 5.3 Počítání chromozomů

Roztlakové preparáty byly vytvořeny pro všechny sbírané populace druhů *P. badensis* (SKA, ŠIB, SVK, JOV, BRZ), *P. crassipes* (VPH, CHM, KOT) a *P. molinerii* (MOL, WES, LOM). Přes velké množství vytvořených preparátů nebylo možné jednoznačně určit počet chromozomů u *P. crassipes*, nejčastěji viditelný počet chromozomů byl  $2n = 21$  (Obrázek č. 18 – C, D). U *P. badensis* byl pozorován počet chromozomů  $2n = 14$  (Obrázek č. 18 – A). U *Poa molinerii* se také nepodařilo vytvořit dobře počítatelný roztlak, počet je ale pravděpodobně stejně jako u *P. badensis* tedy  $2n \approx 14$  (Obrázek č. 18 – B). Počty chromozomů odpovídají cytotypům A (14 chromozomů) a B (21 chromozomů) zjištěným pomocí průtokové cytometrie a odpovídají tak při  $x = 7$  diploidnímu a triploidnímu cytotypu.



**Obrázek č. 18:** Roztlakové preparáty kořenových špiček: A – *P. badensis* (BRZ1),  $2n = 14$ ; B – *P. molinerii* (WES8),  $2n \approx 14$ ; C – *P. crassipes* (KOT2),  $2n = 21$ ; D – *P. crassipes* (VPH10),  $2n = 21$ .

## **5.4 Sekvenování cpDNA**

Výsledný alignment měl délku 835 nukleotidů a obsahoval 38 jednonukleotidových polymorfismů (SNP) a devět insercí/delecí o počtu tři, dva, 31, pět, 24, 20, šest, tři a sedm nukleotidů. V rámci alignmentu byla objevena značná vnitrodruhová variabilita, kdy ani jedno z variabilních míst nebylo specifické pro daný taxon, a dokonce ani pro jednotlivé populace. Výsledný fylogenetický strom tak měl velmi nízké statistické podpory a neukázal žádný hodnotitelný pattern (Příloha 1).

## 6 DISKUZE

### 6.1 Morfologická diference *Poa* sect. *Bolbophorum* v širší střední Evropě

Pro rod *Poa* je charakteristický nedostatek rozlišujících morfologických znaků (Gillespie & Soreng 2005). Na morfometriku bylo vybráno celkem 15 v terénu měřitelných znaků, a ačkoliv se všechny zkoumané druhy ve všech znacích signifikantně lišily (jak je patrné z Tabulek č. 4 a 5 doplněných Obrázky č. 10–14), přesto je potřeba je odlišit i jinak než morfologicky. Pro determinaci jednotlivých druhů je obvykle potřeba použít kombinaci většího množství kvantitativních i kvalitativních znaků.

Měřené morfometrické znaky byly vybrány na základě evropských botanických klíčů, hodnoty vybraných znaků jsou níže porovnávány s naměřenými hodnotami (Edmondson 1980; Dostál 1989; Ciocârlan 2000; Martinčič et al. 2007; Fischer, Oswald & Wagner 2008; Špryňar & Štěpánek 2019). Většina znaků uvedených v klíčích se od zjištěných průměrů příliš neliší. Ve srovnání s literaturou se například liší *Poa alpina* v délce jazýčku stébelného listu, v klíčích se uvádí okolo 3–5 mm, z deskriptivní statistiky ale vychází průměrná délka 2,02 mm. Dále se oproti klíčům liší počet květů v klásku, klíče uvádí 4–9, průměrně se však v klásku vyskytovalo 2,4 květu. Průměr však v tomto případě zkresluje živorodé klásky, které jsou vždy počítány jako jeden květ. U *Poa crassipes* je uváděná šířka přízemních listů okolo 2 mm, zjištěný průměr je 4,32 mm, u *P. molinerii* je šířka 1–2,5 mm, zjištěný průměr pak 2,92. Dále byl u *P. molinerii* naměřen průměr délky laty 45,73 mm, uváděno je 15–40 mm. U *P. pumila* byl zjištěn oproti zdrojům vyšší průměr délky listu a šířky listu, dále byl naměřen chrupavčitý lem okolo 0,03 mm široký, v literatuře je však tento druh uváděn bez lemu. Tento druh byl však v morfometrické analýze zastoupen pouze třemi jedinci, chrupavčitý lem je navíc vzhledem k malé velikosti v terénu nejhůře měřitelným vybraným znakem. U *P. ursina* byl oproti údajům z klíčů zjištěn větší průměr šířky listu a větší průměrný počet květů.

*Poa crassipes* je ve svém protologu (Šourek 1959) srovnávána především s *P. alpina*, za kterou byly její populace na Vršatci dříve považovány. Od *P. alpina* se *P. crassipes* v souboru vzorků analyzovaných v této práci liší sivými listy, delším nejhořejším stébelným listem, delším jazýčkem nejhořejšího stébelného listu a delšími klásky s více květy. Šourkem (1959) uváděná přítomnost tenkého lemu listů nebyla zaznamenána. Druh byl dále považován za přechodný typ mezi *P. alpina* a *P. badensis* (Holub in verb. in Šourek 1959). Tomuto pojetí nasvědčuje pozice vzorků *P. crassipes* mezi těmito druhy v analýze hlavních koordinát, od

obou druhů se však v této analýze dostatečně odlišuje. Dostálem (Dostál 1950) byl druh považován za *P. molinerii*. Od ní se však odlišuje delšími a širšími přízemními listy, delšími stébelnými listy, menším počtem kolének, zelenými klásky a nestejně dlouhými plevami.

Další otázkou je taxonomická homogenita populací ze slovenského Vršatce a ze Štramberka, kde doposud přežívá už jen na vrchu Kotouč. Populace ze Štramberka byly poprvé k Vršateckým přiřazeny Holubem (Holub et al. 1971; Dostál 1989). V morfometrické analýze se populace ze Štramberka dobře přiřazuje k populacím z Vršatce. Po morfologické stránce tedy jde o homogenní shluk populací.

## 6.2 Cytologie *Poa* sect. *Bolbophorum*

Základní chromozomové číslo je u rodu *Poa*  $x = 7$ , u některých druhů s výskytem apomixie však převažuje aneuploidie a zároveň je u nich velká intraspecifická variabilita v počtu chromozomů (Müntzing 1954) a interpretace ploidního stupně je tak často složitá, jako například u *Poa alpina*, u které autoři uvádí mnoho různých chromozomových počtů:  $2n = 22, 26, 28, 33-35, 37-40, 42-46, 56$  (Edmondson 1980);  $2n = 21, 22, 26, 28, 33-46$  (Dostál 1989);  $2n = 14-74$  (Ciocârlan 2000);  $2n = 28$  až ca 70 (Špryňar & Štěpánek 2019). Pro *P. pumila* a *P. ursina* je obvykle uváděn počet  $2n = 14$  (Strid & Franzen 1981; Edmondson 1980). U *P. badensis* se oproti literatuře, kde se uvádí více chromozomových počtů:  $2n = 14 + 0-8 B, 18, 21, 28$  (Edmondson 1980);  $2n = 14$  (Dostál 1989);  $2n = 14-74$  (Ciocârlan 2000);  $2n = 14, 18, 21, 28$  (Špryňar & Štěpánek 2019), podařilo u roztlakových preparátů pozorovat pouze počet  $2n = 14$ . U *P. molinerii* jsou ve zdrojích uváděny pouze dva chromozomové počty:  $2n = 14$  (Edmondson 1980; Ciocârlan 2000);  $2n = 14, 28$  (Dostál 1989), v rámci této práce byl pravděpodobně pozorován diploidní počet  $2n = 14$ , roztlaky však nebyly dostatečně dobře počítatelné. Z žádného preparátu kořenových špiček *P. alpina* a *P. pumila* se počet chromozomů bohužel zjistit nepodařilo. Nejdůležitějším pro tuto práci bylo zjistit chromozomový počet pro *P. crassipes*. V literatuře se pro tento taxon uvádí jediný počet chromozomů, a to  $2n = 14$  (Holub et al. 1971). Z roztlakových preparátů se oproti tomuto podařilo opakovaně zjistit počet chromozomů  $2n = 21$ , což by naznačovalo, že jde o triploidy. Tento výsledek by bylo však vzhledem k nepříliš spolehlivé kvalitě preparátů vhodné dále ověřit, aby bylo možné chromozomový počet potvrdit.

Při zjišťování relativní velikosti genomu nevycházela měření v čistých násobcích, proto byly skupiny stejného cytotypu místo tradičních násobků označeny písmeny A–J, kdy na této škále cytotyp A je nejmenší a cytotyp J největší. Nejrozsáhlejší škálu cytotypů má ze zkoumaných druhů jednoznačně *P. alpina*, jejíž značné cytotypové variabilitě jsem se věnovala ve své bakalářské práci, kde jen v rámci pohoří Západních Karpat a Sudet bylo zjištěno šest ploidních úrovní (Valová 2020). Zjištěná diverzita cytotypů také odpovídá velkému množství chromozomových počtů uváděných v literatuře (Edmondson 1980; Ciocârlan 2000). Předpokládá se, že toto velké množství cytotypů vzniká autoployploidní cestou (Müntzing 1940) a jsou dále fixované apomixií nebo pseudoviviparním rozmnožováním (Müntzing 1966; Steiner et al. 2012). *Poa alpina* je ze zde vymezených skupin zastoupena od cytotypu B až po cytotyp J. Nejnižší cytotyp A byl nalezen u *P. badensis* a *P. molinerii*, pro které je toto jediný cytotyp. Podle provedených chromozomových počtů lze soudit, že cytotyp A odpovídá diploidnímu počtu  $2n = 14$ , který je pro oba druhy uváděn jako nejčastější (Edmondson 1980; Ciocârlan 2000). Cytotyp A byl dále nalezen ještě u *P. ursina*, pro kterou byly dále zjištěny další dva cytotypy, D a E. Počet chromozomů je však pro tento druh uváděn pouze jako  $2n = 14$  (Edmondson 1980). K cytotypu B byly kromě *P. alpina* přiřazeny také *P. crassipes* a *P. pumila*. Z Obrázku č. 15 je však patrné, že ačkoliv byly *P. crassipes* a *P. pumila* zařazeny ke stejnému cytotypu, *P. crassipes* má mírně vyšší absolutní velikost genomu než *P. pumila* (cra – průměr 4,58 pg; pum – průměr 4,33 pg) a to tyto taxony odlišuje. U *P. pumila* však bylo změřeno jen málo jedinců, bylo by tedy vhodné dataset o další jedince tohoto druhu rozšířit, aby se odlišnost v absolutní velikosti genomu potvrdila. Nicméně z měření velikosti genomu je patrné, že česká a slovenské populace náleží ke stejnému taxonu, jak ukazují i výsledky morfometrické analýzy. Velikostí genomu i zjištěnými počty chromozomů cytotyp B odpovídá triploidnímu počtu chromozomů ( $2n = 21$ ), což kontrastuje s doposud uváděnými počty  $2n = 14$  pro oba taxony (Holub et al. 1971; Strid & Franzen 1981). Vzhledem k tomu, že oba tyto druhy byly cytologicky uniformní, bude nutné počty do budoucna podrobit revizi.

### 6.3 Reprodukční mód u *P. crassipes*

Ačkoliv většina jedinců v kultivaci netvořila obilky, ze všech tří zkoumaných populací *Poa crassipes* se podařilo od jednoho jedince z každé populace několik obilek odebrat a pomocí FCSS zjistit, zda obilky vznikly sexuální cestou nebo apomikticky. Histogram na Obrázku č. 17 ukazuje, že se *Poa crassipes* rozmnožuje převážně sexuální cestou s poměrem embryo : endosperm okolo 1,5, což odpovídá standardnímu dvojímu oplození (Matzk et al. 2000).

Apomikticky vznikla dle měření pouze jedna obilka z jedince náležejícího k populaci CHM, tento jedinec tedy tvořil obilky oběma cestami, jak sexuálně, tak apomikticky. Množství cytometricky změřených obilek však bylo poměrně malé, stejně jako počet jedinců *Poa crassipes* v kultivaci. Přinejmenším česká populace na Kotouči je poměrně malá, jak naznačují data z morfometrického měření, kdy bylo v roce 2021 napočítáno pouze sedm kvetoucích trsů, proto bylo do kultivace odebráno jen nezbytné množství částí trsů a ty vytvořily jen malé množství obilek.

Fakultativní až obligátní apomixie je v rodu *Poa* velmi častá (Kellogg 1987; Naumova et al. 1999; Matzk et al. 2000, Kelley et al. 2009; Yudakova 2009). Obvykle je uváděna buď aposporie, při kterém vzniká zárodečný vak z buněk sporofytického pletiva nebo diplosporie, při které vzniká zárodečný vak z mateřské buňky megasporu. Zároveň hraje roli pseudogamie, kdy je pro vývoj semene třeba pyl pro vznik endospermu, ale embryo vzniká z neredukované vaječné buňky bez oplození. Zjištěný poměr embryo : endosperm 2,7 u apomikticky vzniklé obilky *P. crassipes* zhruba odpovídá 2C a 5C peakům, tedy pravděpodobně triploidnímu embryu a heptaploidnímu až oktoploidnímu endospermu. Ploidie embrya a endospermu odpovídá pseudogamii (Matzk et al. 2000). Jedno apomiktické semeno z celkových 26 analyzovaných obilek zhruba odpovídá 3,8 %. Výrazně nižší frekvence byly zjištěny u *P. badensis* (Yudakova 2009), u *P. alpina* je naopak frekvence tvorby apomiktických obilek výrazně častější (Matzk et al. 2000; Kelley et al. 2009).

#### **6.4 Využití chloroplastového úseku *trnL-trnF* pro rekonstrukci fylogenetických vztahů *Poa* sect. *Bolbophorum***

Chloroplastový úsek TLF je nejhojněji užívaným úsekem pro rekonstrukci fylogenetických vztahů v rodu *Poa* (Stoneberg Holt et al. 2004; Gillespie et al. 2007; Gillespie et al. 2008; Soreng et al. 2010; Raggi et al. 2015; Tkach et al. 2020). Tyto studie však obvykle zahrnují jeden nebo jen velmi málo vzorků od jednoho druhu, ale obvykle poskytují dobře rozlišenou fylogenezi. Je proto překvapivé, že byla v rámci studovaného souboru nalezena velká vnitrodruhová, a dokonce vnitropopulační variabilita v tomto úseku nejen v případě jednonukleotidových mutací, ale i v přítomnosti insercí a delecí. Výsledky tak ukazují na to, že je tento úsek hypervariabilní a pro rekonstrukci fylogenetických vztahů v rámci *Poa* sect. *Bolbophorum* není příliš vhodný. Vysoká zjištěná variabilita by mohla souviset s hybridizací

a fakultativní apomixií, kdy jsou jednotlivé haplotypy v rámci populace zafixované a jedinci v populacích jsou reprodukčně izolovaní od ostatních.

## 7 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala odlišením šesti druhů lipnic ze sekce *Bolbophorum* vyskytujících se v širší střední Evropě pomocí morfometriky, cytologie a genetiky, a především vymezením nejasného taxonu *Poa crassipes*. Prvním z cílů práce bylo vyhledání a testování vhodných morfologických znaků k odlišení jednotlivých druhů, což bylo splněno za použití 15 vybraných znaků, 11 kvantitativních a 4 kvalitativních. Druhy se od sebe signifikantně lišily ve všech těchto znacích. Druhým cílem bylo stanovení ploidie a velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie a s tím spojené počítání chromozomů, tento cíl byl splněn pouze částečně vlivem špatně proveditelných roztakových preparátů z kořenových špiček. U *P. badensis* se podařilo ověřit jeden z uváděných počtů  $2n = 14$ , u *P. molinerii* byl z roztlaků počet  $2n = 14$  spíše odhadován. Zajímavým zjištěním byl počet  $2n = 21$  u *P. crassipes* oproti literaturou uváděnému počtu  $2n = 14$ . Při zjišťování relativní velikosti genomu vytvořila měření deset skupin, cytotypů, z nichž v devíti z nich byla zastoupená *P. alpina*, *P. ursina* ve třech a ostatní druhy v jednom cytotypu. Měření absolutní velikosti genomu objevila pouze šest z těchto cytotypů. Nejnižší cytotyp pravděpodobně odpovídá diploidnímu počtu chromozomů a zahrnuje *P. badensis* a *P. molinerii*, vyšší cytotyp zřejmě odpovídá triploidnímu počtu chromozomů a vyskytuje se u *P. crassipes*, *P. pumila* a začíná se od něj výše objevovat *P. alpina*. *Poa crassipes* je od *P. pumila* odlišena o něco málo vyšší velikostí genomu. Třetím bodem práce bylo stanovení hlavních reprodukčních systémů u jednotlivých populací pomocí FCSS metody. Reprodukční systémy byly stanoveny jen z malého množství obilek *P. crassipes*, většina vznikla sexuální cestou, výjimkou byla pouze jediná vzniklá apomikticky, což nasvědčuje fakultativní apomixii u tohoto druhu. Pro rekonstrukci fylogenetických vztahů ve skupině byl vybrán chloroplastový úsek *trnL-trnF*, který se však ukázal jako hypervariabilní a tím pádem pro tento úkol nepoužitelný. Z fylogenetického stromu nebylo možné vyvodit žádné závěry, žádné z variabilních míst nebylo specifické ani pro taxony, ani pro populace. Ačkoliv se studované druhy podařilo částečně morfologicky a také cytologicky oddělit, sekce *Bolbophorum*, a především taxon *P. crassipes*, ztatečně vyžaduje další studium, především využití dalších chloroplastových a jaderných markerů, a také počítání chromozomů, které doplní získaná cytometrická data.



## 8 LITERATURA

- Ciocârlan V. (2000): *Poa* L. – Flora Ilustrată a României: Pteridophyta et Spermatophyta. – Ed. Ceres, 1012–1014.
- Clayton W. D. & Renvoize S. A. (1986): Genera graminum. Grasses of the world. – Kew Bulletin, Additional Series, (13): 1–389.
- Doležel J. & Bartoš J. A. N. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. – Annals of botany, 95(1): 99–110.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – Nature protocols, 2: 2233–2244.
- Dostál J. (1950) Květena ČSR. – Přírodovědecké nakladatelství, Praha.
- Dostál J. (1989): Nová květena ČSSR 2. Vol. 2. – Academia, Praha.
- Doyle J. J. & Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – Phytochemical Bulletin, 19: 11–15.
- Duckert-Henriod M.M. & Favarger C. (1987): Section *Bolbophorum* Asch. et Graebn., 1900. – Contribution à la cytotaxonomie et à la cytogéographie des *Poa* (*Poaceae* = *Gramineae*) de la Suisse. – Birkhäuser Basel, 32–63.
- Edmondson J. R. (1980): *Poa* L. – Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A.: Flora Europaea. Vol. 5. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 159–167.
- Fischer M. A., Oswald K. & Wagner W. (2008): *Poa* – Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. 3., verb. Aufl., Biologiezentrum d. Oberöstr. Landesmuseen, Linz, 1166–1171.
- Gillespie L. J. & Soreng R. J. (2005): A phylogenetic analysis of the bluegrass genus *Poa* based on cpDNA restriction site data. – Systematic Botany, 30(1): 84–105.
- Gillespie L. J., Archambault A. & Soreng R. J. (2007): Phylogeny of *Poa* (*Poaceae*) based on trnT–trnF sequence data: major clades and basal relationships. – Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany, 23(1): 420–434.

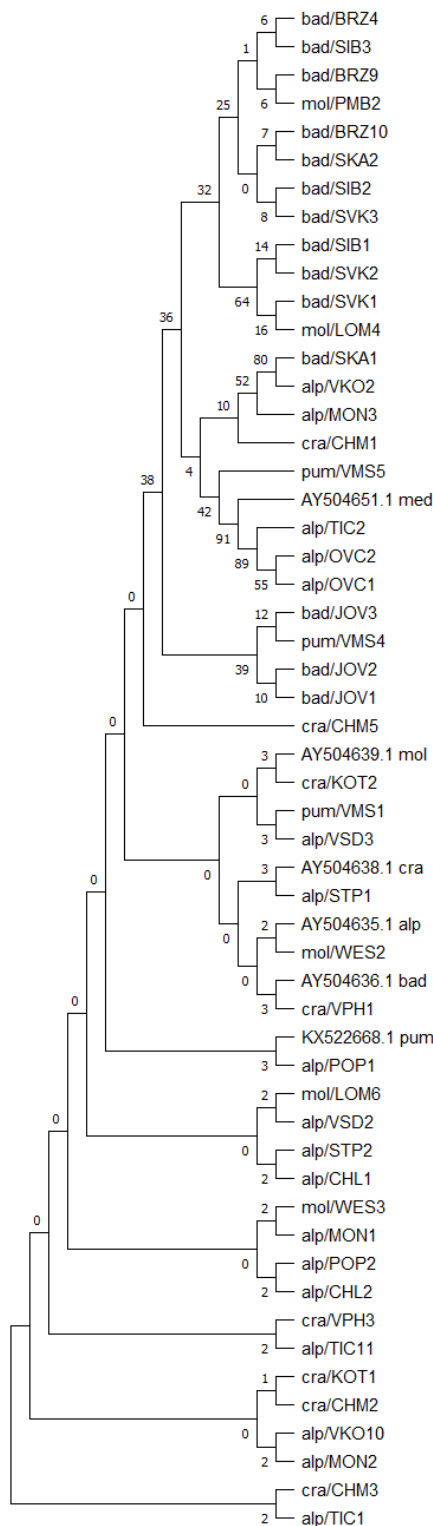
- Gillespie L. J., Soreng R. J., Bull R. D., Jacobs S. W. & Refulio-Rodriguez N. F. (2008): Phylogenetic relationships in subtribe *Poinae* (*Poaceae*, *Poeae*) based on nuclear ITS and plastid trn T–trn L–trn F sequences. – *Botany*, 86(8): 938–967.
- Hintze J. (2013): NCSS 9. – NCSS, LLC, Kaysville, Utah, USA.
- Holub J., Měsíček J. & Javůrková V. (1971): Annotated chromosome counts of Czechoslovak plants (16–30) (Materials for “Flóra ČSSR” – 2). *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 6, 179–214.
- Hultén E. & Fries M. [eds] (1986): Atlas of North European vascular plants. – Koeltz Scientific Books, Königstein.
- Kelley A. M., Johnson P. G., Waldron B. L. & Peel M. D. (2009): A survey of apomixis and ploidy levels among *Poa* L. (*Poaceae*) using flow cytometry. – *Crop Science*, 49(4): 1395–1402.
- Kellogg E. A. (1987): Apomixis in the *Poa secunda* complex. – *American Journal of Botany*, 74(9): 1431–1437.
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B. & Vreš B. (2007): *Poa* L. – Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. 4., dopolnjena in spremenjena izd. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije, 864–869.
- Matzk F., Meister A. & Schubert I. (2000): An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. – *The Plant Journal*, 21(1): 97–108.
- Müntzing A. (1940): Further studies on apomixis and sexuality in *Poa*. – *Hereditas*, 26: 115–190.
- Müntzing A. (1954): The cytological basis of polymorphism in *Poa alpina*. – *Hereditas*, 40: 459–516.
- Müntzing A. (1966): Apomixis and sexuality in new material of *Poa alpina* from middle Sweden. – *Hereditas*, 54(3): 314–337.
- Naumova T. N., Osadtchiy J. V., Sharma V. K., Dijkhuis P. & Ramulu K. S. (1999): Apomixis in plants: structural and functional aspects of diplospory in *Poa nemoralis* and *P. palustris*. – *Protoplasma*, 208: 186–195.

- Orton L. M., Burke S. V. & Duvall M. R. (2019): Plastome phylogenomics and characterization of rare genomic changes as taxonomic markers in plastome groups 1 and 2 *Poeae* (*Pooideae*; *Poaceae*). – *PeerJ*, 7: e6959.
- Orton L. M., Barberá P., Nissenbaum M. P., Peterson P. M., Quintanar A., Soreng R. J. & Duvall M. R. (2021): A 313 plastome phylogenomic analysis of *Pooideae*: Exploring relationships among the largest subfamily of grasses. *Molecular phylogenetics and evolution*. – 159: 107110.
- Raggi L., Bitocchi E., Russi L., Marconi G., Sharbel T. F., Veronesi F. & Albertini E. (2015): Understanding genetic diversity and population structure of a *Poa pratensis* worldwide collection through morphological, nuclear and chloroplast diversity analysis. – *PLoS One*, 10(4): e0124709.
- Schröter C. (1926): *Pflanzenleben der Alpen*, vol. 2 Auflage. – Verlag A. Raustein, Zürich.
- Soreng R. J. (1990): Chloroplast-DNA phylogenetics and biogeography in a reticulating group: study in *Poa* (*Poaceae*). – *American Journal of Botany*, 77(11): 1383–1400.
- Soreng R. J., Bull R. D. & Gillespie L. J. (2010): Phylogeny and reticulation in *Poa* based on plastid trnTLF and nrITS sequences with attention to diploids. – *Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledons* 619–643.
- Steiner B. L., Armbruster G. F., Scheepens J. F. & Stöcklin J. (2012): Distribution of bulbil- and seed-producing plants of *Poa alpina* (*Poaceae*) and their growth and reproduction in common gardens suggest adaptation to different elevations. – *American Journal of Botany*, 99(12): 2035–2044.
- Stoneberg Holt S. D., Horová L. & Bureš P. (2004): Indel patterns of the plastid DNA trnL–trnF region within the genus *Poa* (*Poaceae*). – *Journal of Plant Research*, 117: 393–407.
- Strid A. & Franzen R. (1981): In *Chromosome number reports LXXIII*. *Taxon*, 30: 829–842.
- Šarhanová P., Vašut R. J., Dančák M., Bureš P. & Trávníček B. (2012): New insights into the variability of reproduction modes in European populations of *Rubus* subgen. *Rubus*: how sexual are polyploid brambles? – *Sexual plant reproduction*, 25: 319–335.
- Šlenker M., Koutecký P. & Marhold K. (2022): MorphoTools2: an R package for multivariate morphometric analysis. *Bioinformatics*, 38: 2954–2955.

- Šourek J. (1959): *Poa crassipes* Domin sp. n. a *Poa pratensis* L. ssp. *eupratensis* Hayek var. *corcontica* Domin var. n. – Preslia, 31: 284–286.
- Špryňar P. & Štěpánek J. (2019): *Poa* L. – Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. [eds]: Klíč ke květeně České republiky. – Academia, Praha, 301–307.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. – Plant Molecular Biology, 17: 1105–1109.
- Tamura K. (1994): Model selection in the estimation of the number of nucleotide substitutions. – Molecular biology and evolution, 11(1): 154–157.
- Tamura K., Stecher G. & Kumar S. (2021): MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular biology and evolution, 38(7): 3022–3027.
- Tkach N., Schneider J., Döring E., Wölk A., Hochbach A., Nissen J., Winterfeld G., Meyer S., Gabriel J., Hoffmann M. H. & Röser M. (2020): Phylogenetic lineages and the role of hybridization as driving force of evolution in grass supertribe *Poodeae*. – Taxon, 69(2): 234–277.
- Valová V. (2020): Cytogeografie lipnice alpské (*Poa alpina* L.) v Západních Karpatech a Sudetech. – Bakalářská práce dostupná na <https://theses.cz/>
- Yudakova O. I. (2009): Abnormalities of female gametophyte development in apomictic bluegrass forms. – Russian Journal of Developmental Biology, 40: 150–156.

# PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Výsledný fylogenetický strom založený na chloroplastovém úseku *trnL-trnF* sestrožený metodou Maximum Likelihood s 1000 bootstrapy. Vzorky KX a AY pocházejí ze studie Stoneberg Holt et al. (2004).



**Příloha 2:** Abecední přehled použitých populací řazený podle jejich zkratk. Následující zkratky označují provedené analýzy: M = morfometrika, RGS = relativní velikost genomu, GS = absolutní velikost genomu, S = sekvenování cpDNA. Zkratky zemí: AUT = Rakousko, CZE = Česká republika, HRV = Chorvatsko, ROU = Rumunsko, SVK = Slovensko, SVN = Slovinsko.

<b>ID</b>	<b>Taxon</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>GPS</b>	<b>M</b>	<b>RGS</b>	<b>GS</b>	<b>S</b>	<b>Sběratel/é</b>
BALh	ursina	ROU	Balan, Ecem	46°40'24.199"N, 25°50'19.290"E	ANO	ANO	NE	NE	M. Hroneš, A. Uvírová
BALm	ursina	ROU	Balan, Haghimasul Mic	46°40'52.236"N, 25°50'6.042"E	ANO	ANO	NE	NE	M. Hroneš, A. Uvírová
BALs	ursina	ROU	Balan, Cabana Piatra Singuratica	46°41'0.503"N, 25°49'27.766"E	ANO	ANO	NE	NE	M. Hroneš, A. Uvírová
BRZ	badensis	SVK	Rožňava, Brzotín	48°37'9.054"N, 20°30'24.254"E	ANO	ANO	NE	ANO	V. Valová, A. Uvírová
HOC	alpina	AUT	Hochkar	47°42'38.942"N, 14°54'4.334"E	ANO	NE	ANO	NE	M. Sochor
CHL	alpina	SVK	Malá Fatra, Chleb	49°11'13.488"N, 19°3'17.328"E	ANO	ANO	ANO	ANO	F. Lamla
CHM	crassipes	SVK	Vršatské Podhradie, Chmeľová	49°4'25.448"N, 18°9'14.739"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, H. Dian, A. Smolíková
JOV	badensis	SVK	Rožňava, Jovice	48°37'13.924"N, 20°31'30.474"E	ANO	ANO	NE	ANO	V. Valová, A. Uvírová

ID	Taxon	Země	Lokalita	GPS	M	RGS	GS	S	Sběratel/é
KOT	crassipes	CZE	Kotouč u Štramberka	49°35'2.493"N, 18°6'44.039"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, J. Kocián
KRA	alpina	SVK	Nízké Tatry, Krakova hoľa	48°59'5"N, 19°37'58"E	NE	ANO	NE	ANO	M. Sochor
LOM	molinerii	SVK	Muráň, lom	48°44'40.596"N, 20°2'50.931"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, A. Uvírová
LUK	alpina	SVK	Nízké Tatry, Poludnica	49°00'22"N, 19°38'05"E	NE	ANO	NE	NE	M. Sochor
MOL	molinerii	SVN	Postojna, Petričev hrib	45°50'1.697"N, 14°13'12.203"E	ANO	ANO	ANO	ANO	B. Trávníček
MON	alpina	SVK	Vysoké Tatry, Monkova dolina	49°14'47.279"N, 20°13'28.057"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, A. Uvírová
OHN	alpina	SVK	Nízké Tatry, Ohniště	48°58'32"N, 19°42'21"E	NE	ANO	NE	NE	M. Sochor
OVC	alpina	CZE	Hrubý Jeseník, Ovčárna	50°4'14.521"N, 17°14'16.153"E	NE	ANO	ANO	ANO	V. Valová, A. Uvírová, M. Hroneš, M. Dančák
POP	alpina	SVK	Vysoké Tatry, Popradské pleso	49°9'10.040"N, 20°4'52.083"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, A. Uvírová
SKA	badensis	CZE	Skalky u Sedlece	48°46'25.782"N, 16°40'28.346"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, M. Hroneš, A. Uvírová, F. Lamla

<b>ID</b>	<b>Taxon</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>GPS</b>	<b>M</b>	<b>RGS</b>	<b>GS</b>	<b>S</b>	<b>Sběratel/é</b>
SKP	alpina	SVK	Vysoké Tatry, Skalnaté pleso	49°11'19.579"N, 20°13'58.960"E	ANO	ANO	NE	NE	V. Valová
SUC	alpina	SVK	Malá Fatra, Suchý	49°10'11.000"N, 18°57'22.000"E	ANO	ANO	NE	NE	M. Sochor
SVK	badensis	CZE	Mikulov, Svatý Kopeček	48°48'30.780"N, 16°39'0.036"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, M. Valová
ŠIB	badensis	CZE	Mikulov, Šibeničnick	48°47'21.624"N, 16°37'48.362"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, M. Valová
ŠTP	alpina	SVK	Vysoké Tatry, Štrbské pleso	49°7'25.706"N, 20°3'36.167"E	ANO	ANO	NE	ANO	V. Valová
TIC	alpina	SVK	Vysoké Tatry, Tichá dolina	49°10'29.127"N, 19°54'59.059"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, A. Uvírová
TUL	badensis	ROU	Tulghes, Piatra Ranuncului	46°58'58.920"N, 25°46'10.229"E	NE	ANO	NE	NE	M. Hroneš, A. Uvírová
VKO	alpina	CZE	Hrubý Jeseník, Velká kotlina	50°3'27.612"N, 17°14'8.876"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, A. Uvírová, M. Hroneš, M. Dančák
VMS	pumila	HRV	Velebit	44°46'58.658"N, 14°58'56.476"E	ANO	ANO	ANO	ANO	M. Sochor
VPH	crassipes	SVK	Vršatské Podhradie, Vršatec	49°3'59.591"N, 18°9'7.778"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, H. Dian, A. Smolíková



<b>ID</b>	<b>Taxon</b>	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>GPS</b>	<b>M</b>	<b>RGS</b>	<b>GS</b>	<b>S</b>	<b>Sběratel/é</b>
VSD	alpina	SVK	Vysoké Tatry, Velká studená dolina	49°10'6.457"N, 20°13'0.878"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová
WER	alpina	AUT	Werfen, Eisriesenwelt	47°30'36.814"N, 13°11'36.278"E	ANO	ANO	NE	NE	M. Dančák
WES	molinerii	SVK	Muráň, Wesselényiho jaskyňa	48°45'50.748"N, 20°3'49.324"E	ANO	ANO	ANO	ANO	V. Valová, A. Uvírová

**Příloha 3:** Korelační matice kvantitativních znaků. Vysvětlení zkratk: vys\_steb\_mm = výška stébla (mm), del\_lat\_mm = délka laty (mm), poc\_kol = počet kolének, del\_lodlist\_mm = délka nejvyššího stébelného listu (mm), del\_jaz\_mm = délka jazýčku nejvyššího stébelného listu (mm), poc\_vetv = počet větví ve spodním nodu, del\_klas\_mm = délka klásku (mm), poc\_kvet = počet květů v klásku, del\_prizlist\_mm = délka přizemního listu (mm), sir\_prizlist\_mm = šířka přizemního listu (mm), sir\_lem\_mm = šířka lemu přizemního listu (mm).

Spearman	vys_steb_mm	del_lat_mm	poc_kol	del_lodlist_mm	del_jaz_mm	poc_vetv	del_klas_mm	poc_kvet	del_prizlist_mm	sir_prizlist_mm	sir_lem_mm
vys_steb_mm	1	0.626	0.121	0.477	-0.21	0.252	0.011	0.072	0.653	0.307	-0.445
del_lat_mm	0.626	1	0.115	0.679	0.1	0.077	0.234	0.128	0.628	0.356	-0.407
poc_kol	0.121	0.115	1	-0.229	0.202	-0.105	0.063	0.18	-0.163	-0.098	0.186
del_lodlist_mm	0.477	0.679	-0.229	1	0.054	0.113	0.119	0.014	0.617	0.361	-0.495
del_jaz_mm	-0.21	0.1	0.202	0.054	1	-0.292	0.272	0.147	-0.265	-0.155	0.263
poc_vetv	0.252	0.077	-0.105	0.113	-0.292	1	-0.094	-0.041	0.147	0.143	-0.209
del_klas_mm	0.011	0.234	0.063	0.119	0.272	-0.094	1	0.824	-0.104	-0.074	0.265
poc_kvet	0.072	0.128	0.18	0.014	0.147	-0.041	0.824	1	-0.102	-0.035	0.27
del_prizlist_mm	0.653	0.628	-0.163	0.617	-0.265	0.147	-0.104	-0.102	1	0.439	-0.566
sir_prizlist_mm	0.307	0.356	-0.098	0.361	-0.155	0.143	-0.074	-0.035	0.439	1	-0.279
sir_lem_mm	-0.445	-0.407	0.186	-0.495	0.263	-0.209	0.265	0.27	-0.566	-0.279	1