

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

**Taxonomická problematika rodu *Calamagrostis*  
*phragmitoides* ve střední Evropě**

Bakalářská práce

**Veronika Schaabová**

Školitel: Ing. Milan Štech, Ph.D.

České Budějovice 2013

Schaabová, V., (2013):

Taxonomická problematika rodu *Calamagrostis phragmitoides* ve střední Evropě.

[The taxonomic problems of genus *Calamagrostis phragmitoides* in Central Europe.

Bc. Thesis, in Czech] – 44 p.,

Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Morphological characteristics of genus *Calamagrostis* cause problems in determination of individual species. Almost 20 populations of two species of this genus were studied in the Czech Republic. Morphometry and genetic methods were used to clearly determine the differences and potential relations.

This study was supported by grant SGA PřF JU in 2012.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce.

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 25.2.2013

.....

Podpis studenta

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Milanu Štechovi za trpělivost a celkovou pomoc s touto prací. Dále Petru Kouteckému za konzultace a spolupráci u cytometrie, Šárce Svobodové za pomoc v laboratoři, Pavlu Kúrovi a Petru Šmilauerovi za další cenné konzultace, Martinu Hůlkovi a dalším, kteří se jakkoliv podíleli na této práci (na konzultacích, sběru dat, úpravách dat apod). Také bych chtěla poděkovat za velkou psychickou podporu své mamince, sestře, prarodičům a svému příteli.

# Obsah

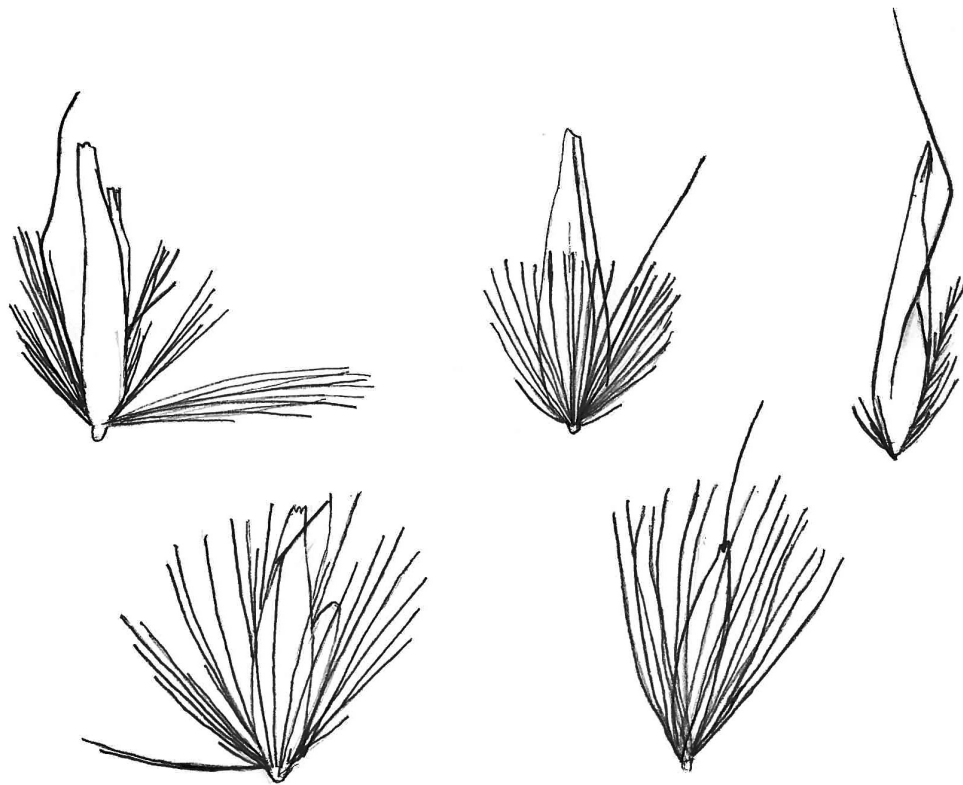
|          |                                   |           |
|----------|-----------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Úvod</b>                       | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Literární rešerše</b>          | <b>3</b>  |
| <b>3</b> | <b>Cíle práce</b>                 | <b>14</b> |
| <b>4</b> | <b>Materiál a metody</b>          | <b>15</b> |
| 4.1      | Sběr dat . . . . .                | 15        |
| 4.2      | Průtoková cytometrie . . . . .    | 20        |
| 4.3      | Morfologická analýza . . . . .    | 21        |
| 4.4      | Izolace DNA pomocí NaOH . . . . . | 23        |
| 4.5      | Sekvenace . . . . .               | 23        |
| <b>5</b> | <b>Výsledky</b>                   | <b>26</b> |
| 5.1      | Cytometrická analýza . . . . .    | 26        |
| 5.2      | Morfometrická analýza . . . . .   | 30        |
| 5.3      | Sekvenace . . . . .               | 35        |
| <b>6</b> | <b>Diskuze</b>                    | <b>37</b> |
| <b>7</b> | <b>Závěr</b>                      | <b>39</b> |
|          | <b>Reference</b>                  | <b>40</b> |
|          | <b>Přílohy</b>                    | <b>44</b> |

# 1 Úvod

Rod *Calamagrostis* patřící do čeledi *Poaceae* zahrnuje celosvětově na 300 druhů, které rostou především v mírném pásu a v chladnějších oblastech severní polokoule, v tropech pak pouze na horách (Conert, 1989). Tyto trávy jsou 20–200 cm vysoké, vytrvalé, trsnaté nebo výběžkaté (Conert, 1989; Štech in prep.) Převažujícím způsobem opylení je alogamie, ale některé druhy jsou schopny nepohlavní tvorby semen prostřednictvím apomixie. Dalším vegetativním způsobem množení a šíření jsou oddenky (Conert, 1989). Mohou tak vznikat velké polykormony obsahující jediný genotyp.

Tyto trávy mívají přímá, jednoduchá nebo větvená stébla, jejichž drsnost je jedním z taxonomických znaků (Štech in prep.). Dalšími důležitými znaky jsou počty kolének stébla, barva, rozměry a chlupatost listů, délka a chlupatost jazýčků, tvar a velikost laty a další minuciézní znaky v jednotlivých jednokvětých kláscích. Podle rozměrů a tvaru plev, pluchy, plušky, délky chlupů vyrůstajících z báze kvítku, podle umístění, délky a tvaru zalomení osiny, počtu žilek či podle přítomnosti pastopečky (rudimentu druhého kvítku) a jejího odění lze poměrně dobře rozpoznat většinu druhů (obr. 1). Tyto znaky však povětšinou nelze zkoumat bez preparačních nástrojů a binolupy, což je v terénu značně obtížné. Nejen proto je určování druhů tohoto rodu stále problematické. Habituální charakteristiky jednotlivých druhů bývají ovlivněny podmínkami prostředí a díky široké ekologické amplitudě si mohou být jednotlivé druhy tohoto rodu habituálně podobné (Štech in prep.). Dalším faktorem je nápadná změna tvaru laty v různých fenofázích vývoje rostlin, velká fenotypová plasticita jednotlivých vegetativních znaků, celková variabilita jednotlivých druhů a v neposlední řadě také poměrně častá hybridizace a značná podobnost hybridů s rodičovskými i jinými druhy (Štech in prep.). Často není snadné stanovit hranice mezi vnitrodruhovou variabilitou a introgrésí jiného druhu (Grulich, 1986).

Kritickou skupinou rodu *Calamagrostis* ve střední Evropě je taxon *Calamagrostis purpurea* s. l., který je součástí komplexu *Calamagrostis purpurea-langsdorffii-canadensis* a do kterého bývá zařazován u nás vzácný druh *Calamagrostis phragmitoides* (Conert, 1989; Hartman, 1832). Problémy při určování a vymezení tohoto druhu a záměny s druhem *C. canescens* daly impuls podrobnějšímu zkoumání a vzniku této bakalářské práce.



Obr. 1: Morfologické rozdíly v kláscích různých druhů rodu *Calamagrostis* (zleva nahoře *Calamagrostis varia*, *C. stricta*, *C. arundinacea*, pod nimi zleva *C. villosa* a *C. pseudophragmites*).

## 2 Literární rešerše

Intenzivněji se výzkumem rodu *Calamagrostis* začali vědci zabývat už v 19. století, a to především v místech největšího výskytu, tedy na severní polokouli. Byli to např. ve Švédsku Hartman (1832), v Německu Torges (1897-1904) či Kuntz (1910), řada ruských autorů (Litvinova, 1910; Reverdatto, 1941; Tzvelev, 1965) a postupem času i další autoři jako Matuszkiewicz (1948), Scholz (1964–1971), Tateoka (1974) a Nygren (1946-1962). Popsali řadu taxonů a zabývali se především morfologií, ekologií, experimenty s umělou hybridizací, cytologií, ploidií a rozmnožováním.

Asi nejvíce přispěly k porozumění rodu *Calamagrostis* výsledky mnohaleté studie švédského botanika A. Nygrena. Zabýval se mimo jiné reprodukcí jednotlivých druhů. Určil počty chromozomů a ploidní stupně některých druhů a zjistil, že *C. arundinacea* ( $2n=28$ ), *C. canescens* ( $2n=28$ ), *C. epigejos* ( $2n=28,42,56$ ), *C. neglecta* ( $2n=28$ ) a *C. varia* ( $2n=28$ ) jsou amfimikty s normální pohlavní reprodukcí (Nygren, 1946). Později autor tvrdí, že všechny druhy *Calamagrostis* s počtem chromozomů  $2n=28$  jsou sexuální (Nygren, 1948b). Některé druhy rodu *Calamagrostis* se rozmnožují fakultativní apomixí, konkrétně diplosporií. Mezi apomiktické druhy patří *C. chalybaea* ( $2n=42$ ), *C. purpurea* ( $2n=56-91$ ) a *C. lapponica* ( $2n=42-112$ ), u kterých se tedy většinou nevyvíjí pyl a rozmnožují se nepohlavně (Nygren, 1946). Apomixe je podle Nygrena důsledkem mezidruhové hybridizace a důsledkem křížení jedinců stejného druhu v kombinaci s polyploidii (Nygren, 1946). Domníval se, že vzácným křížením apomiktů by mohlo být možné obnovit sexuální reprodukci a naopak za určitých okolností by mohlo dojít ke ztrátě sexuální reprodukce a vzniku apomixe (většinou v F3 generaci) (Nygren, 1949). Náhodným zkřížením apomikta s pohlavními druhy mohou zase vzniknout nové stabilní apomiktické typy (Nygren, 1962).

Kombinace sexuality a apomixe může být pro rod *Calamagrostis* výhodná. Fakultativní apomikti si uchovávají po dlouhou dobu stejnou genetickou výbavu a zároveň si ve velmi malé míře zachovávají sexualitu (Nygren, 1951). Velmi vzácně mohou vytvářet pyl a hybridizovat tak s pohlavními druhy (Nygren, 1951). Tímto způsobem může u původně apomiktických jedinců vzniknout výhodná kombinace genů, která je následně díky apomixi efektivně udržena po další generace (Nygren, 1951). V místech, kde se překrývají areály rodičovských druhů mohou vznikat lépe adaptovaní potomci nesoucí apomiktické geny na nová území, což umožňuje apomiktickým druhům se šířit (Nygren, 1951). Hybridizace navíc zvyšuje variabilitu (Nygren, 1962), takže je pro tento rod nanejvýš výhodné

## 2. Literární rešerše

---

zachovat jak apomixi, tak sexualitu.

Apomiktické druhy tohoto rodu rostou především v arktických a subarktických oblastech severní polokoule (Nygren, 1946). Apomixe je v současné době definována jako genetický komplex vlastností, které se projevují jako schopnost produkovat asexuální semena (van Dijk & Vijverberg, 2005). Klony apomiktických rostlin mají z dlouhodobého hlediska mají hned několik evolučních nevýhod: postrádají genetickou variabilitu a schopnost adaptovat se na změny životního prostředí, a navíc nelze vyloučit potencionální degeneraci kvůli nahromadění škodlivých mutací (van Dijk & Vijverberg, 2005). Teoreticky by tedy měly být apomikti odsouzeni k zániku. Apomixe je však kontrolována geny, které mohou být přeneseny do nových klonů hybridizací sexuálních druhů s apomikty - pylovými donory (van Dijk & Vijverberg, 2005).

Sexuální druhy tedy také nesou geny pro apomixi, které mohou být při hybridizaci především s polyploidy zkombinovány a vzniklý jedinec pak v dospělosti vykazuje apomiktické chování (Nygren, 1946).

U jednotlivých individuí mohou občas vzniknout různé zvláštnosti. Nygren např. pozoroval u jednoho přirozeného klonu apomiktické *C. purpurea*, který měl v kláscích pyl, pokles sexuální reprodukce během let (Nygren, 1949). V prvním roce svého života při tvorbě klásků byla rostlina schopna normální meiosy, ale s přibývajícím stářím rostlina tuto schopnost ztratila a převládalo nepohlavní rozmnožování (Nygren, 1949). U ostatních jedinců toto pozorováno však nebylo.

V 50. letech minulého století se tento autor zaměřil na studium rodu *Calamagrostis* v Severní Americe. Spočítal počty chromozomů u 18-ti tamních druhů a u většiny z nich zkoumal pyl, zárodečné vaky a rozmnožování (Nygren, 1954). U druhů *C. canadensis* a *C. inexpansa* zjistil jak sexuální, tak semiapomiktické i apomiktické rozmnožování, zatímco u *C. purpurascens* pouze apomiktické (Nygren, 1954). Severoamerické apomiktické druhy jsou podle něj diplosporické s mitotickým dělením (Nygren, 1954).

Dále zjistil, že většina severoamerických druhů rodu *Calamagrostis* roste v malém počtu na malých plochách a domníval se, že by to mohlo znamenat, že tyto druhy jsou na ústupu (Nygren, 1954). Za nejúspěšnější druhy na tomto území označil *C. canadensis*, *inexpansa*, *purpurascens* a *rubescens* (Nygren, 1954).

Mnoho autorů se zabývalo také ploidií. Nygren zjistil, že *C. arundinacea*, *canescens*, *neglecta* a *varia* jsou tetraploidními druhy ( $2n=28$ ), zatímco *C. epigejos* může být nejen tetraploidní, ale i hexaploidní či oktoploidní (Nygren, 1946). Dále ověřil ploidiu i u severoamerických druhů. *C. scopulorum*, *C. cainii*, *C. densa*, *C. foliosa* či *C. ophitis* jsou typickými tetraploidy s  $2n=28$  (Nygren, 1954). Zatímco jiné druhy mají vyšší chromozomální čísla, nebo více ploidií, např. *C. purpurascens*  $2n=42-56$ , *C. breweri*  $2n=28$  a  $42$ , *C. perplexa*  $2n=70$ , *C. porteri*  $2n=84$  a  $87$ , *C. inexpansa*  $2n=28$ ,  $56$ ,  $58$ ,  $84-104$ , *C. canadensis*  $2n=42-66$ , či *C. crassiglumis*  $sn=140$ , což je nejvyšší počet chromozomů v rodě *Calamagrostis* (Nygren, 1954).



## 2. Literární rešerše

---

Frey (1973) shrnuje poznatky o karyologii trav a jejich zemědělském využití. Uvádí pouze dva druhy rodu *Calamagrostis*: *C. epigejos* s počty chromozomů 28 a 56 a tetraploidní *C. pseudophragmites* s 28 chromozomy (Frey, 1973).

Ploidii studoval i N. N. Tzvelev, H. J. Conert či L. Frey spolu s B. Paszko, kteří shrnuli poznatky o jednotlivých druzích rodu *Calamagrostis* a uvedli všechny jejich známé počty chromozomů a ploidní úrovně (Tzvelev, 1976; Conert, 1989; Frey & Paszko, 1999). A. Krauhulcová zase ověřovala počty chromozomů a cytotypy jednoděložných rostlin z České republiky, Slovenska a Maďarska (Krauhulcová, 2003). Do této studie zahrnula druhy *C. villosa*, *C. canescens* a *C. varia* (Krauhulcová, 2003). Krauhulcová (2003) uvádí *C. villosa* jako dekaploida ( $2n=70$ ) a *C. canescens* a *C. varia* jako tetraploidy ( $2n=28$ ).

Nygren se zabýval také pozorováním vývoje gamet jednotlivých druhů a jejich hybridů. U apomiktů *C. lapponica* a *C. purpurea* pozoroval ve zralých mateřských buňkách pylových zrn a v mateřských buňkách zárodečného vaku "mitotické dělení", čímž myslel diplosporii (Nygren, 1946). Hybridy vzniklé zkřížením *C. purpurea* se sexuálními druhy ( $2n=28$ ), stejně jako hybridy *C. arundinacea* ( $2n=28$ ) × *C. epigejos* ( $2n=56$ ) se v meioze chovali jako apomiktická *C. purpurea* (byla pozorována "mitoza") (Nygren, 1948a). Meiosa hybrida *C. arundinacea* × *C. epigejos* byla více narušená u samčích než u samičích buněk (Nygren, 1946). Mateřské buňky pylových zrn hybrida navíc pravidelně vytvářely dormantní buňky, které se dále nevyvíjely a plasmodia, což je také typické pro apomikty (Nygren, 1948b). Z obtížného křížení F1 generace byla získána generace F2, která opět vykazovala mitotické dělení. Později se Nygren pozastavuje nad určitým exemplářem *C. purpurea* z lokality Gällivare schopným výjimečně tvořit haploidy, čímž se prokazuje že i v redukovaném endospermu se může vaječná buňka vyvinout autonomně (Nygren, 1951).

Poté studoval také problematiku severoamerických druhů. Zjistil, že u *C. scopulorum* a *C. porteri* probíhá sice normální meioza, ale vzniká redukovaná triáda (u *C. porteri* někdy tetráda) buněk, ze kterých vznikne zárodečný vak (Nygren, 1958). Tyto druhy jsou tedy jasně amfimiktické. U druhu *C. perplexa*, který je blízce příbuzný *C. porteri* a měl by být také amfimiktem, však dochází k silnému narušení procesu meiozy a vznikají pylová plasmodia typická pro apomikty (Nygren, 1958). U druhu *C. crassiglumis* stejně jako u *C. inexpansa* Nygren objevil jak sexuální, tak apomiktické zárodečné vaky (Nygren, 1958). Meiosa u *C. crassiglumis* ( $2n=104$ ) byla pravidelnější než by autor u polyploida očekával (Nygren, 1958). Nenašel ale u této třtiny žádné polyvalenty, zato 60-65 bivalentů (běžně je v každé mateřské pylové buňce k vidění 10-20 univalentů) a velké množství morfologicky dobrého pylu (Nygren, 1958).

Nygren se také zabýval morfologií jednotlivých druhů a především jejich hybridů. Studoval především znaky v kláscích, ale neopomněl ani ostatní znaky. Zjistil, že stejné rostliny *C. canescens* a *C. purpurea* v různých letech mění chlupatost čepelí listů, avšak příčina tohoto jevu zůstala neobjasněná (Nygren, 1948a). Autor pouze zmiňuje domněnku,

## 2. Literární rešerše

---

že je to způsobeno vnějšími ekologickými faktory (Nygren, 1948a). Ve stejné práci uvádí, že bylo problematické morfologicky rozlišit *C. purpurea* od jejích hybridů a zároveň od sebe rozlišit hybridy vzniklé křížením *C. purpurea* s různými sexuálními druhy (Nygren, 1948a). Domníval se, že z tohoto důvodu nelze jednotlivé hybridy hodnotit jako samostatné taxonomické jednotky (Nygren, 1948a).

U hybridů *C. pseudopurpurea* × *C. villosa* pozoroval Nygren (1948b) zajímavý efekt v délce osiny. Osina u hybridů rostla ze středu hřbetu pluchy a byla delší než osina rodičovské *C. pseudopurpurea*, ačkoli samčí rodičovská rostlina var. *mutica* neměla osinu vůbec (Nygren, 1948b). Zato hybridní jedinci s redukováným počtem chromozomů vzniklí křížením *C. purpurea* s *C. canescens* se ve většině morfologických znacích shodovali s *C. canescens* (Nygren, 1948a). Fenotyp *C. purpurea*, především dlouhé jazýčky, byly tedy pravděpodobně potlačeny. U klonů *C. purpurea* si zase všiml, že jejich klásky jsou podobně shlukovité jako u druhu *C. epigejos* a považoval tento jev mylně za jasný důkaz, že *C. purpurea* obsahuje určité geny *C. epigejos* (Nygren, 1948a).

U některých hybridů *C. epigejos* × *C. arundinacea* pozoroval v generaci F<sub>2</sub> (s počty chromozomů 2n=35, 37 a 38) morfologické znaky odpovídající *C. varia* (2n=28), avšak z hlediska rozmnožování se jednalo o apomikty, což tomuto druhu neodpovídá (Nygren, 1948b).

Morfologii studoval také W. W. Mitchell na Aljašce, kde rozlišil 3 druhy komplexu *C. canadensis* na základě měření řady znaků, jako je šířka čepele listů, délka jazýčku, délka laty, délka pluchy či délka prašníků (Mitchell, 1968). Dále také T. Tateoka, který zjistil značnou morfologickou podobnost japonských tetraploidů a oktoploidů pocházející z komplexu *C. purpurea*–*langsдорffii*–*canadensis* (Tateoka, 1974). Jedinou odlišností, kterou mezi tetraploidy a oktoploidy našel, byl rozdíl ve velikosti pylových zrn (Tateoka, 1974).

Německý autor R. Heine zase studoval druhy rodu *Calamagrostis* na území Saska v údolí řek Mulde, Flöha a Zschopau a porovnal je s druhy z oblasti belgické Hohen Venn (Heine, 1972). Ve své studii také porovnává morfologii druhu *C. pseudophragmites* s druhem *C. phragmitoides* (Heine, 1972). Největší rozdíly našel samozřejmě v kláscích např. v délce bazálních chlupů, ve velikosti pluchy či poměrů plev (Heine, 1972). Nakonec došel k závěru, že belgické druhy jsou odlišné od saských, ačkoli jedinci z obou zemí jsou morfologicky podobní *C. phragmitoides* (Heine, 1972).

Dalšími autory, kteří studovali morfologii rodu *Calamagrostis* byl N. N. Cvelev, který se zaměřil na sibiřské druhy (Tzvelev, 1976), nebo český autor M. Smejkal shrnující poznatky o jím v České republice objevené *C. phragmitoides* (Smejkal, 1976). Středoevropské druhy rodu *Calamagrostis* detailně zpracoval a popsal německý autor H. J. Conert (1989).

Moderní autoři se na morfologii tolik nezaměřují, avšak např. M. Drapikowska se zabývala morfologií klásků polských populací *C. arundinacea*, přičemž dokázala morfo-

## 2. Literární rešerše

---

logicky rozlišit jednotlivé populace (Drapikowska et al., 2007). Japonští vědci při řešení otázky původu hybridního diploida *C. longiseta* var. *longe-aristata* použili kromě morfologické analýzy také RAPD analýzu (Saitou et al., 2007). Měřili nejen znaky v jednotlivých kláscích, ale také délku stébla, délku laty a délku nejhořejšího jazýčku (Saitou et al., 2007). Zjistili, že obecně má tento hybrid morfologicky intermediární charakter a větší genetickou diverzitu než jeho potenciální rodičovské druhy, což podporuje hypotézu hybridního původu zkřížením *C. longiseta* var. *longiseta* s *C. fauriei* (Saitou et al., 2007).

B. Paszko se zabývala morfologií klásků polských populací *C. varia* a našla mezi různými populacemi mírnou variabilitu (Paszko, 2008). Později s kolegou M. Nobisem zkoumali morfologii hybrida *C. × gracilescens* a jeho potenciálních rodičů *C. canescens* a *stricta* (Paszko & Nobis, 2010). Hybrid byl intermediární v morfologii klásků a lze jej podle autorů s jistotou poznat dle větvení, počtu nodů na stéble a délky kalusových trichomů (Paszko & Nobis, 2010).

Většina studií rodu *Calamagrostis* se však týká hybridizace. Asi nejvíce se zabýval experimenty s křížením A. Nygren. Zkřížením samičí *C. arundinacea* ( $2n=28$ ) se samčí *C. epigejos* ( $2n=56$ ) získal hexaploidní hybridy ( $2n=42$ ), kteří byli podle všeho apomiktictí, ale během let tyto trvalky vzácně tvořily malé množství pylu, které použil na získání další generace F<sub>2</sub> (Nygren, 1946; Nygren, 1948b). Získal tak 49 rostlin, ze kterých kvetlo 43 jedinců (Nygren, 1948b). Zabýval se také křížením *C. pseudophragmites* × *C. villosa* či křížením *C. purpurea* s různými amfimiktickými druhy ( $2n=28$ ) za vzniku hybridů ( $2n=70$ ) (Nygren, 1948b). Křížením *C. purpurea* se samčí *C. canescens* vzácně vznikají jedinci s redukovanou gametou, které Nygren označuje jako haploidní *C. purpurea* (Nygren, 1948a). Ačkoli fertilita F<sub>1</sub> hybridů *C. purpurea* s amfimikty byla velmi nízká, podařilo se vypěstovat další generaci F<sub>2</sub> (Nygren, 1962).

Nygrenovi se také experimentálně podařilo získat morfologicky shodného s *C. purpurea* (Nygren, 1946). Dosáhl toho dvěma způsoby. Při prvním semena rostlin *C. canescens* ( $2n=28$ ) ošetřil kolchicinem a získal autotetraploidy s počtem chromozomů 56, které byly morfologicky identické s *C. purpurea* (Nygren, 1946). Dále ve třech různých křížení *C. canescens* (samice) se samčí *C. epigejos* ( $2n=42$ ) získal rostliny s chromozomálním počtem 56, s větvením a dalšími morfologickými znaky typickými pro *C. purpurea* (Nygren, 1946). Tito potomci v dalších letech produkovali semena, ačkoli jejich prašníky neobsahovaly pyl (Nygren, 1948a).

Dále se Nygrenovi s obtížemi podařilo vypěstovat 40 přirozených klonů apomiktické *C. purpurey*, z nichž minimum jedinců vytvořilo pyl (Nygren, 1948a). Avšak to stačilo na zkřížení těchto klonů s různými amfimiktickými druhy (Nygren, 1949). Část hybridů měla počet chromozomů shodný s mateřskou rostlinou, část se od tohoto počtu lišila (Nygren, 1949). Nygren také pozoroval, že u některých hybridních jedinců byly z jednoho klásku produkovány jak potomci s mateřským počtem chromozomů, tak potomci s odlišným počtem a že u těchto jedinců posléze docházelo k samoopylení (Nygren,

## 2. Literární rešerše

---

1949). Nygren se na základě svého pozorování domnívá, že v některých případech došlo k aktivaci vlastního pylu pylem cizím (Nygren, 1949). Mateřský klon, který Nygren zpočátku považoval za obligátně apomiktický se nakonec ukázal být fakultativně apomiktickým (Nygren, 1949).

T. Tateoku zase zajímala hybridizace japonských druhů, konkrétně vznik hexaploidních jedinců komplexu *C. purpurea–langsdorfii–canadensis* (Tateoka, 1974).

R. Heine studoval problematiku saských druhů rodu *Calamagrostis* a zjistil, že se liší od belgických druhů morfologií (Heine, 1972). Domníval se, že tato odlišnost mohla být způsobena hybridizací s *C. phragmitoides*, ale problém hlouběji nezkoumal (Heine, 1972). Jeho kolega Scholz zase dospěl k názoru, že saský taxon *C. canescens* subsp. *vilmensis* je výsledkem dlouholeté hybridizace postglaciální *C. phragmitoides* s *C. canescens* (Scholz, 1964). Problematikou hybridizace na území Saska, konkrétně *C. pseudopurpurea* se později se svými kolegy zabýval i S. Schiebold, avšak již moderními genetickými metodami, jako je RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Schiebold et al., 2009). Zjistili, že v Sasku a Sasku-Anhaltsku existují dva odlišné RAPD genotypy *C. pseudopurpurea*, které rostou na říčních březích dvou izolovaných říčních toků, na jejichž soutoku se vyskytují obě formy (Schiebold et al., 2009). Dále se domnívali, že tento druh je blíže příbuzný s *C. canescens* a *phragmitoides*, ačkoli ani u jednoho nebylo prokázáno potenciální rodičovství *C. pseudopurpurea* (Schiebold et al., 2009).

M. Krzakowa s A. Dunajskim zase řešili, zda *C. arundinacea* nehybridizuje s *C. villosa* v anemo-orografickém systému v údolí polských Krkonoš (Krzakowa & Dunajski, 2007). Využili analýzu allozymů a za pomoci šesti lokusů peroxidázy odhalili údajný transfer genů z *C. arundinacea* do *C. villosa* (Krzakowa & Dunajski, 2007). B. Paszko a M. Nobis pomocí metody AFLP prokázali hybridizaci mezi *C. canescens* a *C. stricta*, což se podle nich projevuje tokem genů z *C. canescens* do *C. stricta* (Paszko & Nobis, 2010).

V 80.letech minulého století byla provedena první restriční enzymová analýza chloroplastové DNA jednotlivých druhů rodu *Calamagrostis* (Teeri et al., 1984). Podle očekávání vznikly na elektroforéze identické proužky, což potvrzuje příbuznost druhů tohoto rodu (Teeri et al., 1984). Chloroplastová DNA se dědí maternálně a nedochází u ní k hybridizaci, a proto je vhodná ke zjištění mateřského druhu.

E. J. Esselman et al. (1999) zase zkoumali genetické rozdíly mezi klony vzácné severoamerické *C. porteri* ssp. *insperata* a to hned několika genetickými metodami, jejichž výsledky na závěr porovnali - allozomy, RAPD a ISSR (Intersimple sequence repeat). U dvou populací metodou allozymů zaznamenali dvě alely a jeden z patnácti alelických lokusů, zatímco u dalších dvou populací našli pouze jeden genotyp (Esselman et al., 1999). Analýzami RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) a ISSR (Intersimple sequence repeat) odhalili více genotypů (Esselman et al., 1999). Autoři uvádějí, že není jisté, zda byly určité genotypy získány dřívější sexualitou, nebo nahromaděnými somatickými mutacemi starších jedinců (Esselman et al., 1999). Analýza ISSR ukázala větší diverzitu než

RAPD ve třech ze čtyř populací (Esselman et al., 1999). Variabilita odhalená analýzami RAPD a ISSR podle autorů naznačuje, že v minulosti došlo k polyploidizaci a vysvětluje vzácnost sexuality u současných populací (Esselman et al., 1999).

M. Krzakowa a Z. Celka (2007) studovali polskou populaci 30-ti jedinců *C. arundinacea* jedenácti polymorfními enzymatickými systémy, které elektroforeticky oddělili. Každá rostlina v těchto enzymatických systémech vykazovala určité individuální rozdíly v 16 lokusech, avšak populace jako celek si zachovala Hardyho-Weinbergovu rovnováhu (Krzakowa & Celka, 2007). Později tito autoři rozšířili své bádání na 25 polských populací, které zkoumali analýzou peroxidázových lokusů (11-ti allozymy) (Krzakowa & Celka, 2008). Došli k závěru, že všechny populace byly polymorfické a v Hardyho-Weinbergově rovnováze (Krzakowa & Celka, 2008). Existuje tedy určitá vnitropopulační variabilita a populace jsou geneticky vyrovnané.

Mezi modernější přístupy botanického bádání patří zkoumání genomu, který představuje soubor veškeré genetické informace určitého jedince. V současnosti se pro velikosti genomu a určení ploidie používá metody průtokové cytometrie, která využívá optických vlastností částic (zde buněčných jader vzorku) ozářených světlem. Suspenze jader vzorku obarvená fluorescenčními barvivami (AT-specifickým DAPI - 4',6-diamino-2-fenylindol dihydrochlorid, nebo interkalačním propidium jodidem - PI) na stanovení DNA a následně je nasávána cytometrem, ve kterém je ozářena světlem (laserem, nebo rtuťovou výbojkou), které prochází optickými filtry. Vzorek protéká měřícím bodem, kde je ozářen světlem a je zaznamenávána fluorescence, případně další hodnoty. Dle poměru vzorku se standardem lze určit velikost genomu a ploidiu vzorku. Standard je vybírán tak, aby byl přiměřeně blízko vzorku a umožnil přesné odečtení poměru vzorek/standard. Tato metoda zatím nebyla na rod *Calamagrostis* použita. Avšak v literatuře můžeme najít její použití na analýzy jiných druhů trav, kupříkladu pro zjištění velikosti genomu a poměru CG/AT bazí rodu *Festuca* (Šmarda et al., 2008) či jako metoda pro odhalení cytotypické variability komplexu *Phlox amabilis*-*P. woodhousei* (Fehlberg & Ferguson, 2012).

Nad otázkami fylogeneze a taxonomie se většinou zamýšlejí současní autoři, avšak i starší autoři se s omezenými možnostmi snažili vysvětlit vznik různých druhů, včetně těch z rodu *Calamagrostis*. Nygren přemýšlel nad tím, jak je možné, že se mu podařilo křížením získat hybridy odpovídající morfologicky *C. purpurea*. Domníval se, že v přírodě *C. purpurea* vzácně hybridizuje s amfimiktickými druhy rostoucími v areálu jejího rozšíření, takže geny pro tento druh a tedy i pro apomixi jsou široce rozšířeny i mezi již zmíněnými amfimikty (Nygren, 1951). Podle jeho teorie mohou být tyto geny v heterozygotních amfimiktech v přírodě potlačeny, avšak při správné hybridizaci může vzácně, avšak opakovaně vznikat *C. purpurea* (Nygren, 1951).

Nygren také formuloval hypotézu, že celý rod *Calamagrostis* může nést určité apomiktické geny pocházející z *C. purpurea* a z křížení různých druhů tohoto rodu může tedy náhodně vzniknout apomikt (Nygren, 1951). Např. při výše zmíněném zkřížení *C. epi-*

## 2. Literární rešerše

---

*gejos* s *C. arundinacea* měly vzniklé generace F1 a F2 jak apomiktické (diplosporické), tak i amfimiktické mateřské buňky zárodečného vaku (Nygren, 1951). Tato vlastnost by mohla umožnit stabilizovat apomixi v komplexu rodu, kde se dříve nevyskytovala (Nygren, 1951).

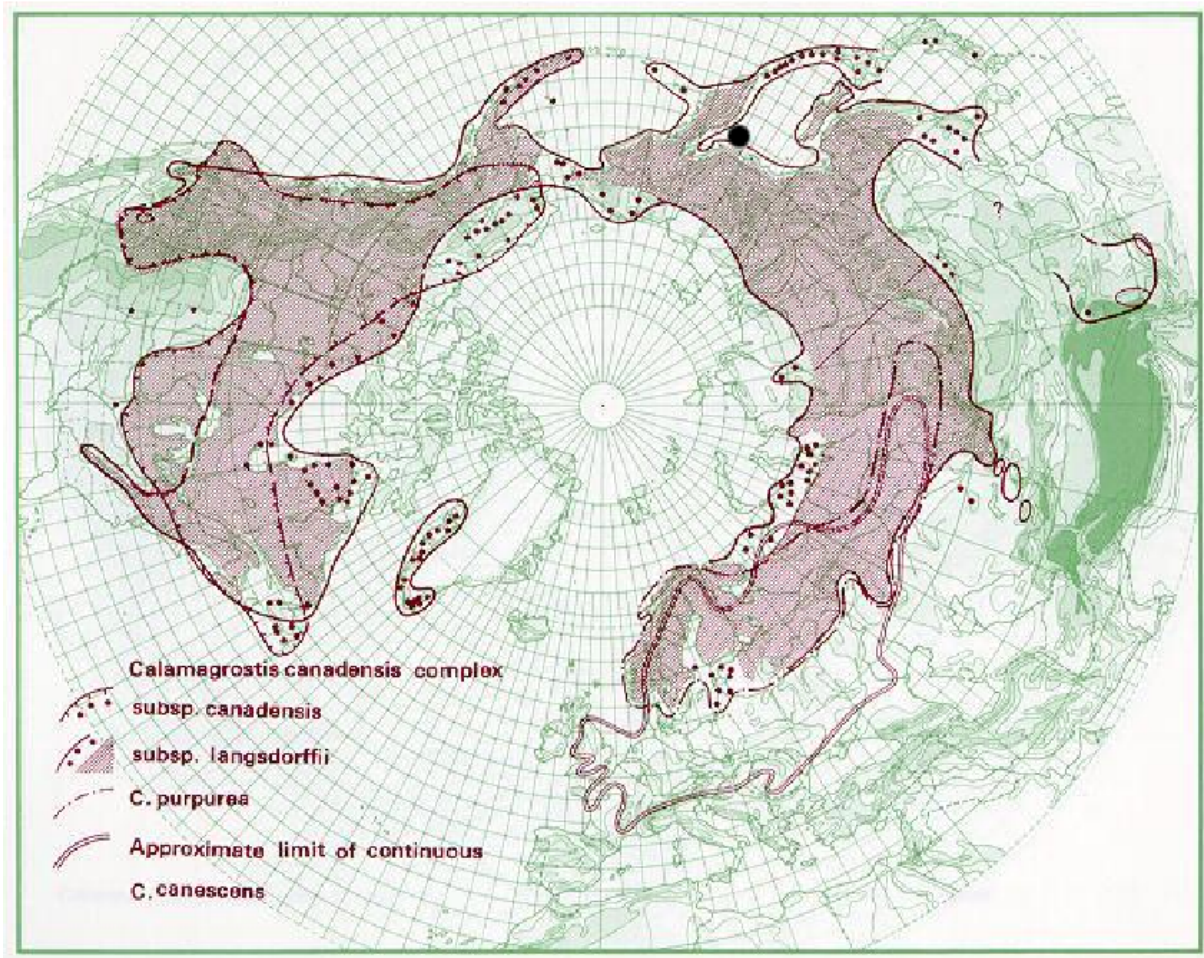
Nad přirozenou genezí *C. phragmitoides*, která je poddruhem *C. purpurea*, se pozastavil i H. Scholz, který vyslovil dvě hypotézy. První se týká zkrřížení *C. canescens* ( $2n=28$ ) se sibiřskou *C. langsdorffii* ( $2n=56$ ) (Scholz, 1971). Druhá předpokládá rodičovské druhy *C. canescens* ( $2n=28$ ) a *C. epigejos* ( $2n=42$ ) a nevyklučuje zapojení druhu *C. arundinacea* ( $2n=28$ ) (Scholz, 1971). Scholz nejprve spolu s N. N. Tzvelevem považoval za správnou první hypotézu (Scholz, 1964; Tzvelev, 1976), později se na základě výsledků experimentů A. Nygrena (1946) přiklonil k druhé hypotéze (Scholz, 1971).

H. Scholz se zabýval také nomenklaturickou problematikou názvu *C. pseudopurpurea*, která by se podle něj měla jmenovat *C. rivalis* (Scholz, 1971). Další autoři se snažili zjistit její fylogenetický původ. S. Schiebold s kolegy zjistili, že tento druh vznikl minimálně dvakrát hybridizací mezi stejnými rodičovskými druhy a poté u ní převládalo nepohlavní rozmnožování (Schiebold et al., 2009). Blíže příbuzné druhy *C. canescens* a *phragmitoides* se však neprokázali jako rodičovské a tak otázka vzniku zůstává nevyřešena (Schiebold et al., 2009).

Rod *Calamagrostis* bývá členěn do několika komplexů. Do komplexu *C. purpurea–langsdorffii–canadensis*, jehož rozšíření je cirkumpolární (obr. 2), je řazeno hned několik evropských druhů.

Předpokládá se, že z jediného předka tohoto komplexu se díky izolaci vyvinuly v době glaciálu tři skupiny: *C. canadensis* v Severní Americe, *C. langsdorffii* v sibiřské části Asie a *C. purpurea* ve Skandinávii. Nygren tvrdí, že předkem celé skupiny byl druh *C. canescens*, který byl v třetihorách údajně velmi rozšířen v cirkumpolárních oblastech a v raných čtvrtohorách z něj vznikly tyto tři druhy (Nygren, 1946). Glaciální původ jednoho z druhů (*C. phragmitoides*, který je zařazován do tohoto komplexu později podpořil i H. Scholz (Scholz, 1971).

Tímto komplexem se zabývala řada autorů, např. již zmíněný Nygren (1946-1962) či Scholz (1964 a 1971). W. W. Mitchell se zase zaměřil na aljašský komplex *C. canadensis*, ve kterém rozlišil 3 ploidní úrovně (Mitchell, 1968). Oktoploidní ( $2n=56$ ) a tetraploidní jedince ( $2n=28$ ) jedince považuje za *C. langsdorffii*, hexaploidní jedince ( $2n=42$ ) za *C. canadensis* s. str. (Mitchell, 1968). Nejvíce byli na Aljašce rozšířeni právě tetraploidi (Mitchell, 1968). Podobnou problematikou se zabýval T. Tateoka, který zjistil, že na japonském ostrově Hokkaido jsou součástí komplexu *C. purpurea–langsdorffii–canadensis* především tetraploidi ( $2n=28$ ) a oktoploidi ( $2n=56$ ), přičemž tyto tetraploidi jsou blíže příbuzní aljašským tetraploidům (mohli tedy mít v době glaciálu během spojení Asie se Severní Amerikou kontinuální rozšíření) (Tateoka, 1974). Také si všiml, že oktoploidi mají dobře vyvinutý pyl, a proto neodpovídají apomiktické *C. purpurea* (Tateoka, 1974). Autor našel



Obr. 2: Rozšíření komplexu *C. canadensis-langsdorffii-purpurea* (Hultén & Fries, 1986).

také několik málo hexaploidů ( $2n=42$ ), kteří se však liší od severoamerické hexaploidní *C. canadensis* (Tateoka, 1974). Domnívá se tedy, že se jedná o hybrida místního tetraploida a oktoploida (Tateoka, 1974).

V Severní Americe zkoumali MacDonald s Lieffersem (1991) 4 populace severoamerické *C. canadensis*, přičemž zjistili shodnou genetickou variabilitu (1,5-1,7 alel na lokus) a zároveň u 30-ti zkoumaných jedinců našli 14 různých genotypů (MacDonald & Lieffers, 1991).

Do skupiny *C. purpurea* s. l. bývá jako poddruh zařazována středoevropská *C. phragmitoides*, která roste i u nás. C. J. Hartman označil názvem *C. phragmitoides* evropské (skandinávské) rostliny (Hartman, 1832), ale skandinávští vědci používají pro tento druh Triniovo jméno *C. purpurea*.

*C. phragmitoides* roste na rašelinných loukách a v křovinách (Conert, 1989). Je to výběžkatá rostlina s tmavě zelenými až šedozelenými listy o šířce 6-11 mm (Kubát & et al., 2002; Štech in prep.). Má větvená statná stébla s 5-ti až 8-mi kolénky, bohatou, rozkladitou latu (většinou delší než 20 cm) většinou bez pylu, jazýčky jejích horních listů dosahují 6-10 mm délky a na vnější straně jsou krátce chlupaté (Kubát & et al., 2002).

## 2. Literární rešerše

---

Pluchy této třtiny obvykle mají relativně nápadnou hřbetní osinu vyrůstající z horní třetiny pluchy (Conert, 1989; Smejkal, 1976).

V České republice byla třtina nachová (*C. phragmitoides*) poprvé objevena v roce 1974 M. Smejkalem na jižním okraji rybníka Pařez, vzdáleném 1,5 km jihovýchodně od obce Kaliště na Českomoravské vrchovině (Smejkal, 1976). Sebrané rostliny byly morfometricky porovnány se skandinávskými položkami (Smejkal, 1976).

V roce 1981 byl tento druh znovu nalezen na Českomoravské vrchovině a to I. Růžičkou při východním okraji Hojkovského rašeliniště, které leží 500 m jižně od obce Hojkov a 12 km západně od Jihlavy (Růžička, 1985; Růžička, 1987). Hojkovské rašeliniště bylo roku 1982 prohlášeno chráněným přírodním výtvozem (Růžička, 1987; Růžička, 1989).

V roce 1996 našel I. Růžička tento druh na břehu lesního rybníčku Jezírko východně od Třeště a údajně i na rašelinných březích a rašeliništi u jednoho z rybníčků na lokalitě Radlice, 9 km severozápadně od Dačic (Růžička, 2005). Téhož roku našel další stanoviště tohoto druhu na Českomoravské vrchovině (nedaleko od již zmíněné lokality Jezírko u Třeště), kde tato třtina roste po obou stranách travnaté lesní cesty poblíž silnice z Otína do Pavlova (Růžička, 2005).

Později přibýly ještě další lokality *C. phragmitoides* a to v Krušných horách (Ondráček, 2012), na Šumavě (Řepka & Lustyk, 1997), v Nížkém Jeseníku (Bednář et al., 1991) a na Broumovsku (Řepka et al., 1998). Třtina nachová byla uváděna i z dalších území. Z Předšumaví, Českobudějovicka, Táborska (Chán, 1999) a Šumperska (V. Faltys, ústní sdělení). Na Táborsku byla na zarostlém rybníku Zeman kvůli litorálním porostům vysokých ostríc se třtinou nachovou vyhlášena roku 1993 přírodní památka (Albrecht, 2003), na což ostatně odkazuje i zřizovací vyhláška.

I. Růžička se v jednom ze svých článků zamýšlel nad rychlým nárůstem dalších lokalit tohoto druhu, tedy jestli se třtina nachová po Českomoravské vrchovině opravdu šíří, nebo byla pouze pro svou snadnou záměnu s jinými druhy tohoto rodu přehlížena (Růžička, 2005). V Červeném seznamu ohrožených druhů České republiky z roku 2001 měla třtina nachová označení C1 – kriticky ohrožený druh (Procházka [ed.] et al., 2001), v nejnovějším Červeném seznamu z roku 2012 je již však zařazena pouze do kategorie C2b, tedy silně ohrožený druh (Grulich, 2012). Je to pravděpodobně způsobeno růstem počtu lokalit v posledních letech.

*C. canescens*, která je podle Nygrena a Scholze potencionálním rodičovským druhem této *C. phragmitoides* roste většinou na bažinných olšinách či slatinných a rašelinných loukách (více méně po celém území naší republiky) (Kubát & et al., 2002). Stébla těchto o něco menších výběžkatých rostlin jsou méně statná, větvená, s 3-mi až 5-ti kolénky (Kubát & et al., 2002). Má spíše staženou, chudší latu (většinou kratší než 15 cm) obsahující pyl, jazýčky o délce max. 6 mm má vně řídce kratičce štětinkaté, dále sivě zelené, za sucha svinuté listy (3-7 mm široké), pluchy s nenápadnou, krátkou jemnou osinou v koncovém výkroji (Conert, 1989; Kubát & et al., 2002). *C. canescens* bývá často zaměňována



## 2. Literární rešerše

---

s *C. phragmitoides*, a to kvůli podobnosti biotopů, ve kterých oba druhy rostou, kvůli habituální podobnosti včetně větvení stébla a podobnosti morfologických znaků.

U druhu *C. phragmitoides* jsou v literatuře uváděny různé počty chromozomů, různé mechanismy vzniku a rozmnožování. Není známo, zda třeba nedochází k opakovanému vzniku tohoto druhu, nebo jestli nevzniká určitá mezi- a vnitropopulační variabilita. Také nebylo ověřeno, zda hypotéza o potenciálním rodičovství *C. canescens* je správná.

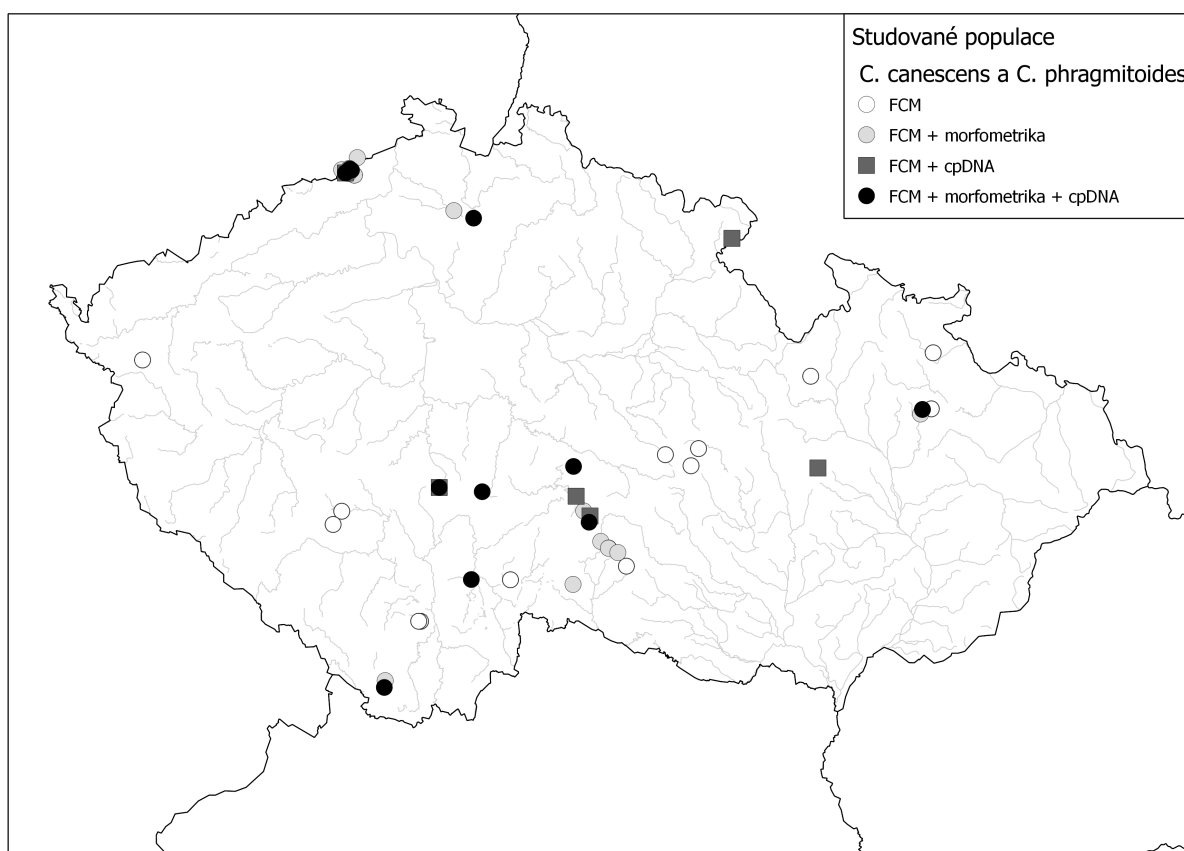
## 3 Cíle práce

1. Zjistit variabilitu ve velikosti genomu u větvených mokřadních třtin v České republice.
2. Nalézt vhodné morfologické znaky pro rozlišení druhů *C. canescens* a *C. phragmitoides*.
3. Nalézt úseky vhodné chloroplastové DNA pro odlišení druhů *C. canescens*, *C. phragmitoides*, případně *C. epigejos*.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Sběr dat

Při průzkumu udávaných lokalit (herbářové doklady, literární údaje, ústní informace) bylo nalezeno 15 populací *C. phragmitoides*, ze kterých bylo sebráno 5 až 20 rostlin (Obr. 3, Tab. 1). Počet sebraných rostlin závisel na velikosti dané populace. Dále bylo sebráno 5 až 20 rostlin z 27 populací *C. canescens* (Obr. 3, Tab. 2 a 3). Ze všech sebraných jedinců byl odebrán list na cytometrickou analýzu, u vybraných rostlin byl odebrán další list do silikagelu na sekvenaci a celá rostlina i s částí kořínků byla sebrána pro morfometrické měření. Vzorčky listů na sekvenaci byly sebrány i u 4 populací *C. epigejos* (Tab. 4). Dokladové položky ke studovaným populacím jsou uloženy v herbáři PřFJU (CBFS).



Obr. 3: Studované populace *C. canescens* a *C. phragmitoides* (FCM = cytometrická analýza, cpDNA = sekvenace chloroplastové DNA).

Tab. 1: Studované lokality *C. phragmitoides*.

| Fytochorion                        | Kód lokality | Lokalita   | Nadmořská výška (m.n.m.) | Zeměpisná šířka (WGS 84) | Zeměpisná délka (WGS 84) |
|------------------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 25a - Krušnohorské podhůří vlastní | KrDaP        | Krásný les: aluvium bezejmenného potoka pod dálnicí D8 ca 1.1 km SSV od zámku v obci pod dálnicí v údolí                         | 610                      | 50° 46' 29"              | 13° 56' 38"              |
| 25a - Krušnohorské podhůří vlastní | KrLesDal     | Krásný les: pramenišťe severně od dálnice D8 ca 1.25 km S od zámku v obci  | 620                      | 50° 46' 37"              | 13° 56' 27"              |
| 25a - Krušnohorské podhůří vlastní | KrLesPra     | Krásný les: pramenišťe u staré cesty přes pravostranný přítok Hranického potoka ca 3.1 km Z od zámku v obci                      | 625                      | 50° 46' 18"              | 13° 53' 41"              |
| 25a - Krušnohorské podhůří vlastní | KrLesPot     | Krásný Les: rozsáhlé pramenišťe v údolí Liščího potoka ca 960 m J od zámku v obci  | 660                      | 50° 45' 27"              | 13° 56' 11"              |
| 25a - Krušnohorské podhůří vlastní | KrLesNiv     | Krásný Les: zarostlé louky na pravém břehu bezejmenného potoka ca 1.6 km ZJZ od zámku v obci                                     | 670                      | 50° 45' 33"              | 13° 55' 3"               |
| 25a - Krušnohorské podhůří vlastní | Naklerov     | Nakléřov: degradované louky 940 m SSZ od křižovatky v obci   | 720                      | 50° 45' 4"               | 13° 58' 21"              |
| 58g - Broumovské stěny             | Rerisny      | Řeřišný: příkop na západním okraji rezervace Řeřišný u Machova ca 140 m Z od středu obce   | 495                      | 50° 30' 16"              | 16° 17' 29"              |
| 67 - Českomoravská vrchovina       | Hojkov       | Hojkov: louky ve východní části Hojkovského rašelinště ca 770 m J od kostela v obci  | 650                      | 49° 22' 55"              | 15° 24' 51"              |
| 67 - Českomoravská vrchovina       | MladBris     | Mladé Bříště: degradované louky v aluvii na levém břehu Kladinského potoka ca 500 m J od kostela v obci                          | 490                      | 49° 29' 9"               | 15° 20' 4"               |
| 67 - Českomoravská vrchovina       | Otin         | Otín: okraj lesní cesty východně od silnice Stonařov - Dlouhá Brtnice ca 1.6 km VJV od obce                                      | 630                      | 49° 15' 37"              | 15° 35' 27"              |
| 67 - Českomoravská vrchovina       | Parez        | Staré Hutě: litorální porosty v jižní části rybníka Parez ca 880 m J od obce   | 570                      | 49° 36' 17"              | 15° 19' 7"               |
| 67 - Českomoravská vrchovina       | Stonarov     | Stonařov: litorální porosty na jižním okraji rybníka Jezírko (Stonařovské jezírko) ca 4 km Z od kostela v obci                   | 610                      | 49° 16' 41"              | 15° 31' 59"              |
| 88g - Hornovltavská kotlina        | Plar         | Plánička: louky a pramenišťe v PP Kotlina pod Pláničských rybníkem ca 1.8 km VJV od obce   | 745                      | 48° 43' 0"               | 14° 9' 23"               |
| 98 - Nížký Jeseník                 | ValPh        | Nové Valteřice: mokřina na levém břehu potoka Lesní pod silnicí Nové Valteřice - Moravský Beroun ca 1.4 km JJZ od kostela v obci | 570                      | 49° 49' 50"              | 17° 27' 41"              |

Tab. 2: Studované lokality *C. comescens*: část I.

| Fytochorion                              | Kód lokality | Lokalita   | Nadmořská<br>výška<br>(m.n.m.) | Zeměpisná<br>šířka<br>(WGS 84) | Zeměpisná<br>délka<br>(WGS 84) |
|--|--------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 25a - Krušnohorské<br>podhůří vlastní    | Dolrybník    | Krásný les: litorální porosty na břehu malého rybníčka u dálnice D8 ca 1.3 km VSV od zámku v obci                  | 630                            | 50° 46' 12"                    | 13° 57' 17"                    |
| 25a - Krušnohorské<br>podhůří vlastní    | Petr         | Petrovice: okraje křovin a louky v nivě Petrovického potoka ca 3.5 km SVS od kostela v obci                        | 420                            | 50° 49' 7"                     | 13° 59' 25"                    |
| 36a - Blatensko                          | Hurka        | Záboří u Blatné: litorální porosty na SV okraji rybníka Pravda ca 1.4 km SV od kostela v obci                      | 530                            | 49° 22' 23"                    | 13° 50' 31"                    |
| 36a - Blatensko                          | Topic        | Blatná: litorální porosty na severozápadním okraji rybníka Zadní Topic ca 1 km Z(S)Z od kostela v obci             | 440                            | 49° 25' 33"                    | 13° 53' 41"                    |
| 37I - Českokrumlovské<br>Předšumaví      | Host         | Hostínova Lhota: pramenitě západně silničky ca 150 V od osady  | 810                            | 48° 44' 39"                    | 14° 9' 42"                     |
| 38 - Budějovická<br>pánev                | Tomac        | Křenovice: příkop u cesty na SV okraji rybníka Vítín ca 1.2 km V od okraje obce                                    | 400                            | 48° 59' 2"                     | 14° 22' 44"                    |
| 39 - Třeboňská pánev                     | Ruda         | Horusice: severní část rašelinisté Ruda na JV břehu Horusického rybníka ca 2.4 km JV od železniční zastávky v obci | 420                            | 49° 9' 8"                      | 14° 41' 27"                    |
| 42b - Tábořsko-<br>vlašimská pahorkatina | Hlasivo      | Hlasivo: degradované louky v údolí potoka Mindlovka ca 830 m SSV od kostela v obci                                 | 550                            | 49° 30' 14"                    | 14° 45' 27"                    |
| 42b - Tábořsko-<br>vlašimská pahorkatina | Jankov       | Jankov: degradované louky v údolí Jankovského potoka ca 1.5 km SSZ od kaple v obci                                 | 610                            | 49° 25' 37"                    | 15° 22' 53"                    |
| 42b - Tábořsko-<br>vlašimská pahorkatina | Křenc        | Křenovice: příkop u silničky k samotám Jednoty ca 660 m od východního okraje obce                                  | 400                            | 48° 59' 2"                     | 14° 22' 15"                    |
| 43a - Čertovo břemeno                    | Zeman        | Pohořelice: litorální porosty rybníka v PP Zeman, ca 450 m JV od obce  | 640                            | 49° 31' 15"                    | 14° 29' 38"                    |
| 51 - Polomené hory                       | NovR         | Jestřebí: křoviny a na okraji luk na severním okraji obce ca 240 m VSV od zříceniny hradu Jestřebí                 | 255                            | 50° 36' 45"                    | 14° 35' 2"                     |
| 52 - Ralsko-bezděžská<br>tabule          | Brehyne      | Břehyně: olšiny na severním břehu rybníka Břehyně ca 1.3 km SV od bašty u hráze rybníka                            | 270                            | 50° 35' 0"                     | 14° 42' 17"                    |
| 67 - Českomoravská<br>vrchovina          | Chvoj        | Dušejov: příkop na v okraji rašelinisté Chvojnov ca 1 km ZJZ od kostela v obci                                     | 610                            | 49° 24' 24"                    | 15° 25' 11"                    |

Tab. 3: Studované lokality *C. canescens*: část II.

| Fytochorion                     | Kód lokality | Lokalita  | Nadmořská<br>výška<br>(m.n.m.) | Zeměpisná<br>šířka<br>(WGS 84) | Zeměpisná<br>délka<br>(WGS 84) |
|---------------------------------|--------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 67 - Českomoravská<br>vrchovina | Matna        | Matná: okraj příkopu v PP Matenský rybník ca 1.2 km SSZ od kaple v obci   | 525                            | 49° 9' 4"                      | 14° 55' 52"                    |
| 67 - Českomoravská<br>vrchovina | Opatov       | Opatov: vlhké louky a křoviny ve střední části PR Opatovské Zákopy ca 3.2 km JJZ od kostela v obci  | 650                            | 49° 11' 52"                    | 15° 38' 30"                    |
| 67 - Českomoravská<br>vrchovina | Radlice      | Radlice: litorální porosty v SZ části největšího rybníka v PP Rašeliniště Radlice ca 1.2 km SZS od kaple v obci                             | 620                            | 49° 7' 58"                     | 15° 18' 56"                    |
| 67 - Českomoravská<br>vrchovina | Stonarov     | Stonarov: litorální porosty na východním okraji rybníka Jezírko (Stonařovské jezírko) ca 4 km Z od kostela v obci                           | 610                            | 49° 16' 43"                    | 15° 32' 4"                     |
| 67 - Českomoravská<br>vrchovina | Třešť        | Třešť: degradované louky jihovýchodně od Jezdovického rybníka ca 1 km SV od železniční zastávky v obci                                      | 540                            | 49° 18' 18"                    | 15° 29' 10"                    |
| 71b - Drahanáská<br>plošina     | Slamac       | Šubířov: degradované louky na jižním břehu rybníka Slámová Louže ca 560 m JV od kostela v obci  | 575                            | 49° 35' 55"                    | 16° 49' 10"                    |
| 74b - Opavská pa-<br>horčatina  | Křístac      | Křístanova (u Moravského Berouna): okraje Rubaniskového potoka ca 2.1 km J od kostela v obci  | 600                            | 49° 50' 0"                     | 17° 30' 57"                    |
| 75 - Jesenické<br>podhůří       | Čakoc        | Čaková: louka na pravém břehu Jeleního potoka ca 1 km Z(J)Z od křižovatky v obci  | 545                            | 50° 3' 18"                     | 17° 31' 39"                    |
| 75 - Jesenické<br>podhůří       | MorBer       | Moravský Beroun: degradované louky na levém břehu Důlního potoka ca 1.9 km SSV od kostela v obci  | 550                            | 49° 48' 37"                    | 17° 26' 59"                    |
| 86 - Slavkovský Les             | Kladc        | Kladská: západní břeh rybníka Kladský ca 270 m V od záměčku   | 820                            | 50° 1' 36"                     | 12° 40' 18"                    |
| 91 - Žďárské vrchy              | Palic        | Moravské Křižánky: degradované louky ca 280 m VSV od křižovatky silnice Křižánky - Milovy a silnice na České Milovy                         | 595                            | 49° 40' 32"                    | 16° 5' 11"                     |
| 91 - Žďárské vrchy              | Radoc        | Radostín: příkop u cesty na východním okraji obce ca 590 m V(J)V od kaple v obci  | 620                            | 49° 39' 5"                     | 15° 52' 58"                    |
| 91 - Žďárské vrchy              | Sykoc        | Tri Studně: mokřina na východním břehu rybníka Sykovec ca 760 m JJV od kaple v obci   | 720                            | 49° 36' 26"                    | 16° 2' 25"                     |
| 98 - Nížký Jeseník              | Valtec       | Nové Valteřice: degradované louky na pravém břehu potoka Lesní nad silnicí Nové Valteřice - Moravský Beroun ca 1.4 km JJZ od kostela v obci | 570                            | 49° 49' 52"                    | 17° 27' 41"                    |

Tab. 4: Studované lokality *C. epigejos*.

| Fytochorion                              | Kód lokality | Lokalita  | Nadmořská<br>výška<br>(m.n.m.) | Zeměpisná<br>šířka<br>(WGS 84) | Zeměpisná<br>délka<br>(WGS 84) |
|--|--------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 25a - Krušnohorské<br>podhůří vlastní    | KrLesE       | Krásný Les: zarostlé louky na pravém břehu bezejmenného potoka ca<br>1.6 km ZJZ od zámku v obci | 670                            | 50° 45' 33"                    | 13° 55' 3"                     |
| 37I - Českokrumlovské<br>Předšumaví      | HostE        | Hostínova Lhota: prameniště západně silničky ca 150 V od osady                                  | 810                            | 48° 44' 39"                    | 14° 9' 42"                     |
| 42b - Tábořsko-<br>vlašimská pahorkatina | HlasE        | Hlasivo: degradované louky v údolí potoka Mindlovka ca 830 m SSV<br>od kostela v obci           | 550                            | 49° 30' 14"                    | 14° 45' 27"                    |
| 43a - Čertovo břemeno                    | ZemaE        | Pohořelice: litorální porosty rybníka v PP Zeman, ca 450 m JV od obce                           | 640                            | 49° 31' 15"                    | 14° 29' 38"                    |

## 4.2 Průtoková cytometrie

Metodou průtokové cytometrie byla u *C. phragmitoides* a *C. canescens* stanovena relativní velikost genomu vybraných rostlin ze všech studovaných populací. Byly měřeny směsné vzorky po 5-ti až 10-ti rostlinách. Zároveň byla stanovena absolutní velikost genomu tří jedinců ze tří populací *C. phragmitoides* a jedné populace *C. canescens*. Jako interní standard byl použit *Pisum sativum* „Ctirad” o velikosti genomu  $2C=9,09$  pg (Doležel et al., 1998), který byl dodán Laboratoří experimentální botaniky AVCR v Olomouci.

Byl připraven barvicí roztok dle požadovaného množství vzorků. Pro barvení AT-specifickým barvivem DAPI bylo použito 25 ml citrát-fosfátového pufru Otto II (McIlvaine's buffer), 50  $\mu$ l 2-merkapt ethanolu a 1 ml zásobního roztoku DAPI (1 mg/ml). Pro barvení interkalačním barvivem propidium jodid (PI) bylo použito 20 ml pufru Otto II, 40  $\mu$ l 2-merkapt ethanolu, 1 ml zásobního roztoku PI a 1 ml zásobního roztoku RNasy IIa (obojí 100 mg/ml, výsledná koncentrace 50 mg/ml). Do plastové Petriho misky byl vložen analyzovaný vzorek a interní standard. Standardu bylo asi o čtvrtinu méně než vzorku. Bylo přidáno 400  $\mu$ l na ledu vychlazeného Otto I pufru a rostlinný materiál byl rozsekán žiletkou na jemné kousky. Suspenze byla několikrát promíchána pipetou a přefiltrována přes 42  $\mu$ l filtr (textilie Uhelon 130T) do označené zkumavky. Objem filtrátu byl přibližně 200  $\mu$ l. Opticky byla zkontrolována absence nečistot. Vzorek byl následně ponechán 5 min v klidu, což je empiricky ověřená doba stání pro tento rod. Potom bylo přidáno 800  $\mu$ l barvicího roztoku Otto II (poměr přefiltrovaného vzorku s Otto I a barvicího roztoku Otto II musí být kvůli pH přibližně 1:4), znovu byla zkontrolována čistota a vzorek byl ponechán 1 min barvit. Vzorek byl poté pro stanovení relativní velikosti genomu vložen do cytometru Partec PA II (Partec GmbH., Münster, Germany), který byl nastaven tak, aby standard byl na kanálu 200 na 1024-kanálové škále a znamenávalo se 3000 částic. Absolutní velikost genomu byla měřena na přístroji Partec CyFlow SL se zeleným laserem (532nm) na 5000 jader.

Po změření byla data zpracována pomocí programů FlowJo 7.5.5 (TreeStar, Inc., Oregon, USA), FlowMax 2.6 (Partec GmbH, Germany) a STATISTICA 10 (StatSoft Team, 2011). Byly zjištěny průměrné hodnoty pro píky obou druhů (Sample - CV mean) a pro píky standardů (Standard - CV mean) a z toho byl pro každý změřený vzorek vypočítán poměr Sample/Standard. Z těchto poměrů byla pro jednotlivé druhy vybrána nejnižší (Poměr min) a nejvyšší (Poměr max) hodnota a spočítán průměr. Následně byla spočítána variabilita v rámci druhu podle vzorce:

$$\text{Variabilita} = \frac{\text{Poměr}_{max} - \text{Poměr}_{min}}{\text{Poměr}_{min} \cdot 100} (\%)$$



Dále byl v Excelové tabulce spočítán poměr CG/AT bazí (Šmarda et al., 2008), kde bylo potřeba spočítat jako mezivýpočet tzv. „dye factor“ (DF) pro jednotlivé druhy, který se počítá z poměru fluorescencí určovaného vzorku a standardu:

$$DF_{Sample} = \frac{Sample/reference\ ratio\ with\ DAPI}{Sample/reference\ ratio\ with\ PI}$$

### 4.3 Morfologická analýza

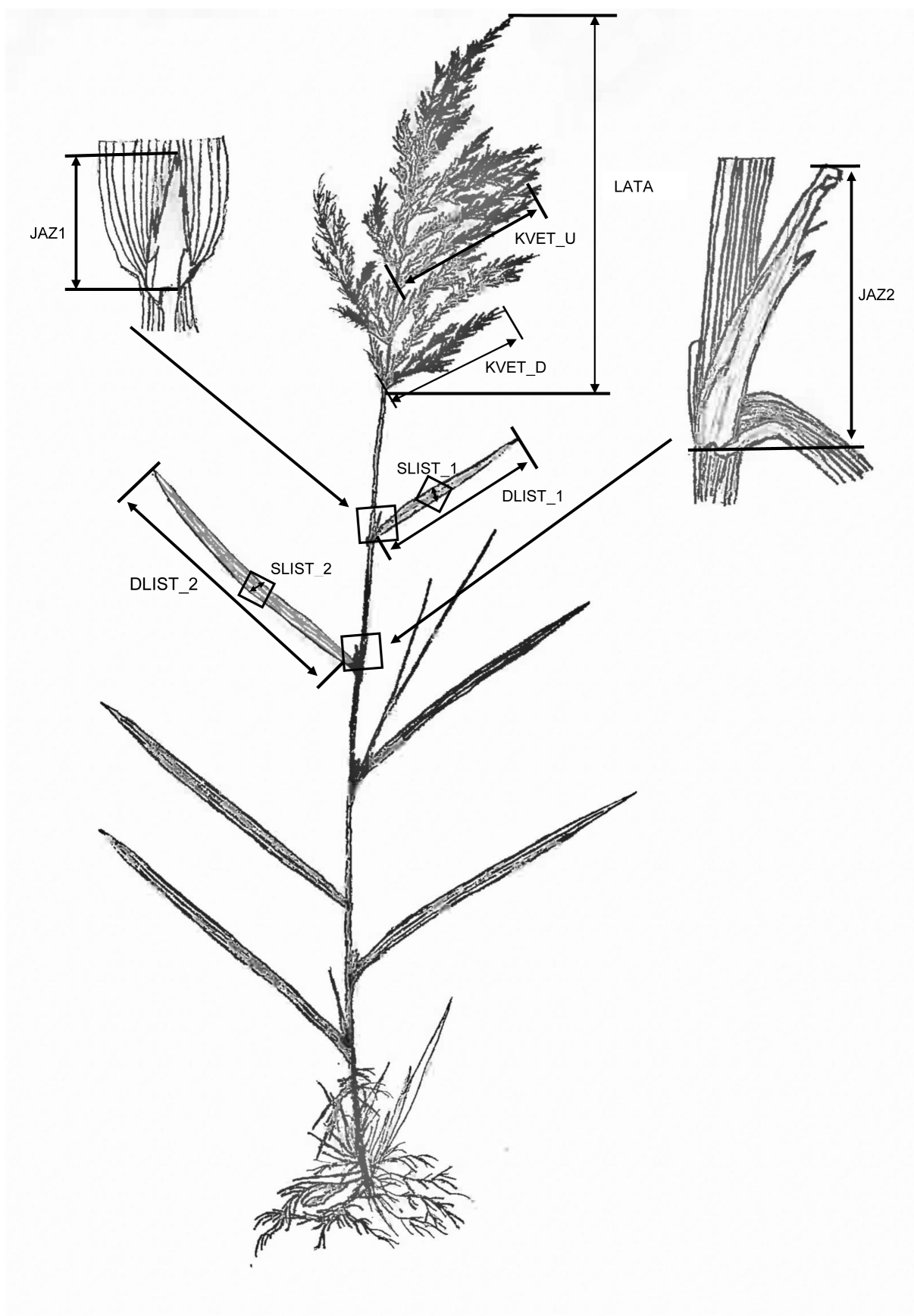
U sebraných rostlin z 12 populací *C. phragmitoides* a ze 14 populací *C. canescens* bylo počítáno a měřeno 13 znaků považovaných za taxonomicky významné v této skupině rodu (Tab. 5, Obr. 4). Rozměry byly zjišťovány pravítkem s přesností 1 mm.

Tab. 5: Měřené morfologické znaky.

| Zkratka znaku | Znaky   |
|---------------|---|
| KOL           | Počet kolének od kořínků až pod latu  |
| LATA          | Délka laty od baze její nejspodnější větve po konec nejhořejšího klásku (mm)  |
| KVET_D        | Délka nejdelší větvičky z nejspodněji rostoucích na latě (mm)   |
| KVET_U        | Délka nejdelší větvičky vyrůstající mírně pod středem laty, vyplňující její prostor v polovině (mm)                   |
| DLIST_1       | Délka čepele nejhořejšího listu (mm)  |
| SLIST_1       | Maximální šířka čepele nejhořejšího listu v nejširší části (mm)   |
| DLIST_2       | Délka čepele druhého nejhořejšího listu (mm)  |
| SLIST_2       | Maximální šířka čepele druhého nejhořejšího listu v nejširší části (mm)   |
| JAZ1          | Délka jazýčku nejhořejšího listu (mm)   |
| JAZ2          | Délka jazýčku druhého nejhořejšího listu (mm)   |
| CHLUP         | Čepel listu bez dlouhých trichomů pouze s kratičkými štětinkami = 0, řídké dlouhé chlupy = 1, husté dlouhé chlupy = 2 |
| ČERV          | Červené zbarvení stébla: žádné = 0, málo intenzivní (na nodech nebo u kořenů) = 1, červené stéblo = 2                 |
| VETV          | Binární data; stéblo se nevětví = 0, stéblo se větví = 1  |

Z naměřených hodnot byly vypočítán poměr délky k šířce dvou nejhořejších listů (D/SLIST\_1 a D/SLIST\_2), dále procento větvení obou druhů, procento chlupatosti čepele listů druhů a zbarvení stébel druhů.

Výsledky byly následně zpracovány v několika programech. Základní statistiky, jako je průměrná hodnota znaku pro jednotlivé druhy a populace, byly spočítány v programu STATISTICA 10 (StatSoft Team, 2011). Znaky délka obou jazýčků a šířka listů byly transformovány dekadickým logaritmem, aby se jejich rozložení přiblížilo normálnímu. Na základě euklidovských vzdáleností populačních průměrů byla spočítána shluková analýza



Obr. 4: Měřené morfologické znaky.

v programu R 2.15.3 (R Core Team, 2013). Jako shlukovací která optimalizuje homogenitu shluků podle určitého kritéria, kterým je minimalizace zvyšování chyby sumy čtverců odchylek bodů shluku od jeho průměru (centroidu) (Marhold et Suda, 2001). Data byla standardizována. Na výpočet matice euklidovských vzdáleností byla použita funkce `dist` z balíku `stats` a na vytvoření shlukovací analýzy - `hclust` také z balíku `stats`.

V programu R 2.15.3 (R Core Team, 2013) byla provedena také klasifikační diskriminační analýza (CDA), která testuje, jakým způsobem klasifikovat objekty a následně je klasifikuje, resp. identifikuje (Marhold et Suda, 2001). Crossvalidace byla provedena vypuštěním celých populací a analýza byla počítána funkcí LDA z balíku MASS.

V programu CANOCO 5.0 (Braak & Šmilauer, 2012) byla provedena analýza hlavních komponent (PCA) a lineární diskriminační analýza (LDA) s forward selection. Analýza hlavních komponent je ordinační metoda umožňující redukovat počet dimenzí v euklidovském znakovém prostoru tak, aby došlo k minimální ztrátě informace (Marhold et Suda, 2001). Lineární diskriminační analýza naopak rozděluje objekty na základě určitých znaků na skupiny a zjišťuje, které znaky k tomuto odlišení přispívají největší mírou (Marhold et Suda, 2001). Do lineární diskriminační analýzy nebyly použity poměry délka/šířka listu 1 a listu 2, protože tento znak se ukázal jako nevýznamný.

## 4.4 Izolace DNA pomocí NaOH

Ze vzorků určených pro analýzu DNA byl odebrán kousek listu (asi 10 x 5 mm) do eppendorfky 1,5 ml, do které byly přidány dvě wolframkarbidové kuličky. Eppendorfky se 3 min třepaly s frekvencí  $30 \text{ s}^{-1}$  v mlýnku Retsch MM400, poté byly krátce stočeny na stolní centrifuze, aby se kousky vzorků dostaly ze stěn zkumavek. Do každého vzorku bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  0,5 M NaOH a zkumavky byly zamíchány. Vzorky byly následně přepipetovány do nových zkumavek a kuličky vyndány. Poté byly vzorky centrifugovány 2,5 min na 13 800 rpm při teplotě  $22^\circ\text{C}$ . Z každého vzorku bylo odebráno 5  $\mu\text{l}$  supernatantu, který byl přidán do SAFE-LOCK zkumavek se 45  $\mu\text{l}$  100 mM Tris-HCl (pH=8,3) a tyto zkumavky byly zvortexovány.

## 4.5 Sekvenace

Podle literatury bylo vybráno devět úseků nekódující chloroplastové DNA které byly otestovány na jedné rostlině *C. phragmitoides* a jedné rostlině *C. canescens* (Tab. 6). Z nich byly vybrány tři úseky s největší variabilitou (psbA-trnH<sup>GUG</sup>, psbK-trnS<sup>GCU</sup>, rpl32F-trnL<sup>AUG</sup>R). Úsek rpl32F-trnL<sup>AUG</sup>R byl osekvenován u 9 rostlin ze 7 populací *C. phragmitoides* a 7 rostlin ze 4 populací *C. epigejos*. Úsek psbA-trnH<sup>GUG</sup> se podařilo osekvenovat u 10 rostlin ze 6 populací *C. canescens*, 8 rostlin ze 6 populací *C. phragmitoides* a 1 rostliny *C. epigejos*. Úsek psbK-trnS<sup>GCU</sup> byl úspěšně osekvenován pouze

u 4 rostlin ze 3 populací *C. canescens* u 4 rostlin ze 4 populací *C. phragmitoides* a u 1 rostliny *C. epigejos*. *C. epigejos* byla do analýzy přidána kvůli předpokládanému vzniku morfotypů odpovídajících *C. phragmitoides* z hybridizace druhů *C. canescens* a *C. epigejos*.

Tab. 6: Testované úseky cpDNA.

| Název úseku  | Primerové sekvence úseku 5'–3'                     | Citace                                    |
|--|--|---|
| psaA<br>– ycf3ex3R   | GTTCCGGCGAACGAATAAT<br>– GTCGGATCAAGCTGCTGAG       | (Ebert & Peakall, 2009)                   |
| psbA<br>– trnH <sup>GUG</sup>                              | GTTATGCATGAACGTAATGCTC<br>– CGCGCATGGATTCAACAATCC  | (Sang et al., 1997; Tate & Simpson, 2003) |
| psbK<br>– trnS <sup>GCU</sup>                              | TGTTTGGCAAGCTGCTGTAA<br>– GGGTTCGAATCCCTCTCTTT     | (Ebert & Peakall, 2009)                   |
| rpl32F<br>– trnL <sup>AUG</sup> R                          | CAGTTCCAAAAAACGTACTTC<br>– CTGCTTCTTAAGAGCAGCGT    | (Shaw et al., 2007)                       |
| rpoC1ex2L<br>– rpoC1ex1R                                   | TTCGAATTAACCTCGTAATCG<br>– CATGTGTGGTATTTGAAACGTC  | (Ebert & Peakall, 2009)                   |
| trnK <sup>UUU</sup> L<br>– matK-R                          | GGACTCGAACCCGGA ACTA<br>– TTGGGTTCGGTATTTTTAGAAAGA | (Ebert & Peakall, 2009)                   |
| trnL <sup>UAA</sup> 3'exon<br>– trnF <sup>GAA</sup> 3'exon | GGTTCAAGTCCCTCTATCCC<br>– ATTTGAACTGGTGACACGAG     | (Taberlet et al., 1991)                   |
| trnL <sup>UAA</sup> 5'exon<br>– trnL <sup>UAA</sup> 3'exon | CGAAATCGGTAGACGCTACG<br>– GGGGATAGAGGGACTTGAAC     | (Taberlet et al., 1991)                   |
| trnT <sup>UGU</sup><br>– trnL <sup>UAA</sup> 3'exon        | CATTACAAATGCGATGCTCT<br>– TCTACCGATTTCCGCATATC     | (Taberlet et al., 1991)                   |

PCR reakce probíhaly v objemu 10 µl a jejich složení bylo: 2,2 µl PCR vody, 1,2 µl forward i reverse primeru, oba o koncentraci 2,5 pmol, 5 µl 2x Plain PP Master Mixu (Top-Bio) a 0,4 µl DNA vzorku. Amplifikace probíhala v termocycleru Biometra T3000 a BIOER XP. Reakční podmínky pro jednotlivé primery jsou shrnuty v Tabulce 7.

Úspěšnost PCR byla ověřena pomocí elektroforézy. Byly smíchány vždy 2 µl PCR produktu s 0,8 µl GEL RED fluorescenčního barviva. Tato směs byla spolu s ladderem (100 bp) na 1,5% agarózový gel v pufru TBE. Elektroforéza probíhala při 120 V a výsledek byl vyfocen v UV světle pomocí programu Scion VisiCapture.

PCR produkty byly přečištěny ExoSapem. Bylo vždy smícháno 1,5 µl ExoSapu s 5 µl PCR produktu. Vzorky byly krátce stočeny stolní centrifugou, zvortexovány a vloženy do cycleru na cyklus EXOSAP (15 min 37°C, 15 min 85°C).

Poté byla připravena sekvenační směs. Do nových eppendorfek bylo přidáno 2,5 µl 10 pmol forward primeru, 5,5 µl vody a 2 µl PCR produktu a vzorky byly poslány na sekvenaci. Získané sekvence byly zpracovány v programech BioEdit 7.1.11 (Hall, 1999) a Finch TV 1.4.0 (Geospiza Research Team, 2004).

Tab. 7: Reakční podmínky pro jednotlivé použité amplifikované úseky.

| Úsek cpDNA                  | Teplota (°C) | Doba trvání (s) | Počet opakování |
|-----------------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| psbA-trnH <sup>GUG</sup>    | 94           | 300             | -               |
|                             | 94           | 30              | 35              |
|                             | 57           | 30              |                 |
|                             | 72           | 60              |                 |
|                             | 72           | 600             | -               |
| psbK-trnS <sup>GCU</sup>    | 94           | 180             | -               |
|                             | 94           | 30              | 2               |
|                             | 66           | 30              |                 |
|                             | 72           | 45              |                 |
|                             | 94           | 30              | 2               |
|                             | 63           | 30              |                 |
|                             | 72           | 45              |                 |
|                             | 94           | 30              | 2               |
|                             | 60           | 30              |                 |
|                             | 72           | 45              |                 |
|                             | 94           | 30              | 2               |
|                             | 57           | 30              |                 |
|                             | 72           | 45              |                 |
|                             | 94           | 30              | 2               |
|                             | 54           | 30              |                 |
|                             | 72           | 45              |                 |
|                             | 94           | 30              | 2               |
|                             | 51           | 30              |                 |
|                             | 72           | 45              |                 |
|                             | 94           | 30              | 30              |
|                             | 47           | 30              |                 |
|                             | 72           | 45              |                 |
|                             | 72           | 600             | -               |
| rpl32F-trnL <sup>AUGR</sup> | 95           | 180             | -               |
|                             | 95           | 45              | 35              |
|                             | 51           | 60              |                 |
|                             | 72           | 60              |                 |
|                             | 72           | 600             | -               |

# 5 Výsledky

## 5.1 Cytometrická analýza

Na základě naměřené ploidie a plodie uváděné v literatuře (Conert, 1989; Scholz, 1971) byly sebrané populace rozděleny na druhy. Byla změřena relativní a absolutní velikost genomu u *C. canescens* a *C. phragmitoides*, z čehož byly vypočítány poměry Sample/Standard a následně variabilita jednotlivých druhů. U tetraploidní *C. canescens* byla zjištěna velká variabilita ve velikosti genomu jednotlivých populací dosahující přes 17 % (Tab. 8).

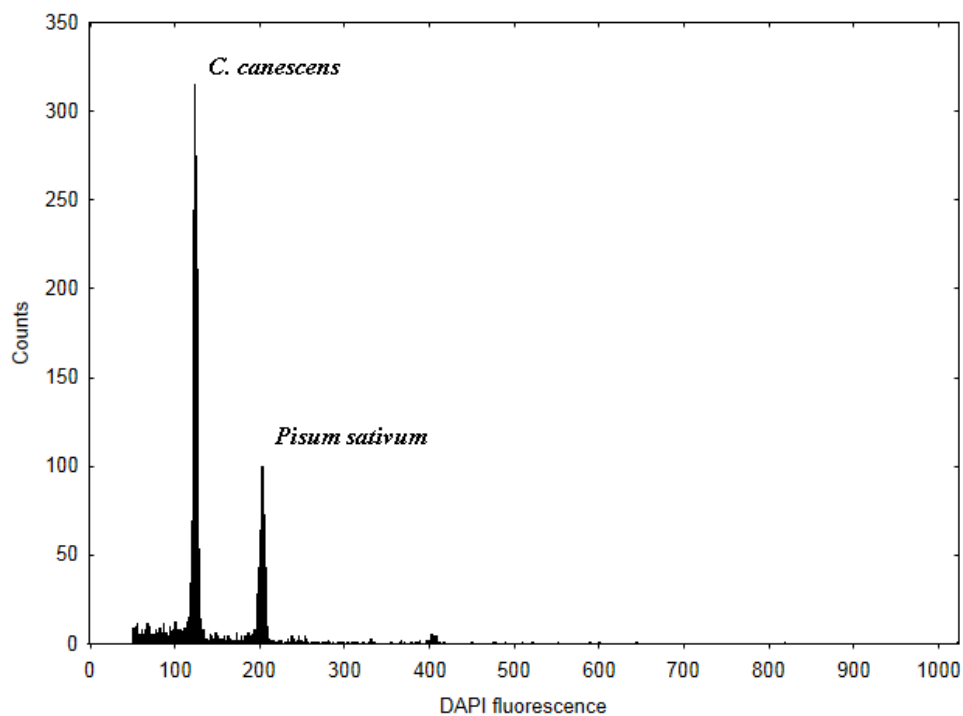
Tab. 8: Měření velikosti genomu pomocí DAPI a PI

|                    | <i>C. canescens</i> |       | <i>C. phragmitoides</i> |       |
|--------------------|---------------------|-------|-------------------------|-------|
|                    | DAPI                | PI    | DAPI                    | PI    |
| Sample - CV mean   | 3.88                | 4.30  | 2.00                    | 2.39  |
| Standard - CV mean | 2.49                | 3.03  | 2.11                    | 2.81  |
| Poměr min          | 0.552               | 0.800 | 1.103                   | 1.582 |
| Poměr průměr       | 0.609               | 0.820 | 1.137                   | 1.599 |
| Poměr max          | 0.650               | 0.845 | 1.173                   | 1.625 |
| Variabilita (%)    | 17.665              | 5.670 | 6.298                   | 2.717 |
| Počet měření       | 74                  | 9     | 44                      | 18    |

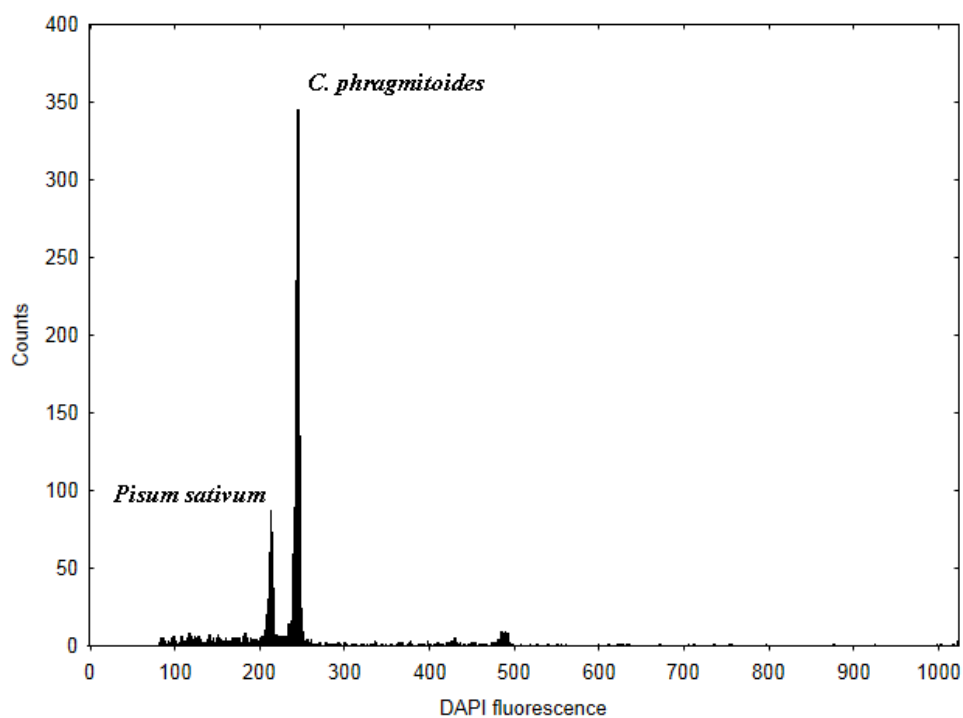
Pro *C. canescens* byl spočítán  $DF=0.7427$ , obsah CG bazí byl 44.1%, obsah AT bazí 55.9% a vzájemný poměr byl tedy 0.789. Pro *C. phragmitoides* byl spočítán  $DF=0.7111$ , obsah CG bazí byl 44.9%, obsah AT bazí 55.1% a vzájemný poměr tedy 0.815.

Příklady výsledných typických analýz průtokové cytometrie pro oba druhy se standardem *Pisum sativum* při měření s barvivem DAPI (Obr. 5, Obr. 6) či s PI (Obr. 7, Obr. 8).

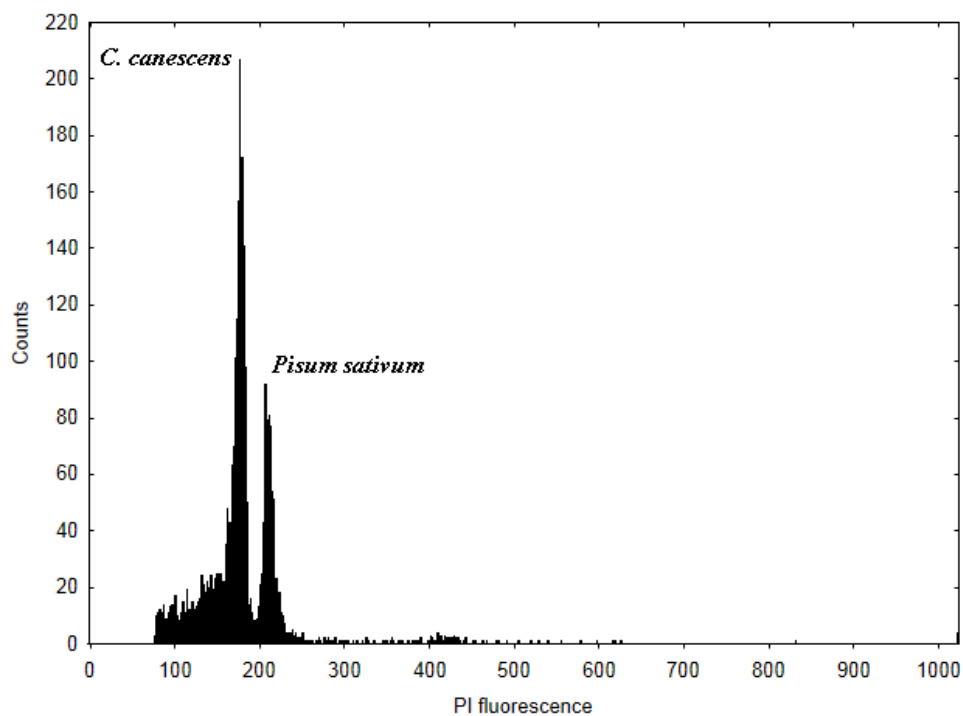
U rostlin z jedné populace (Štíty na Šumpersku), které některými znaky připomínaly *C. phragmitoides*, byl zjištěn poměr fluorescence vůči standardu odpovídající dodekaploidní úrovni ( $2n=12x$ ) (Obr. 9). Populace ve Štítech byla nalezena až na podzim a nebylo možné na ní provést morfometrická měření.



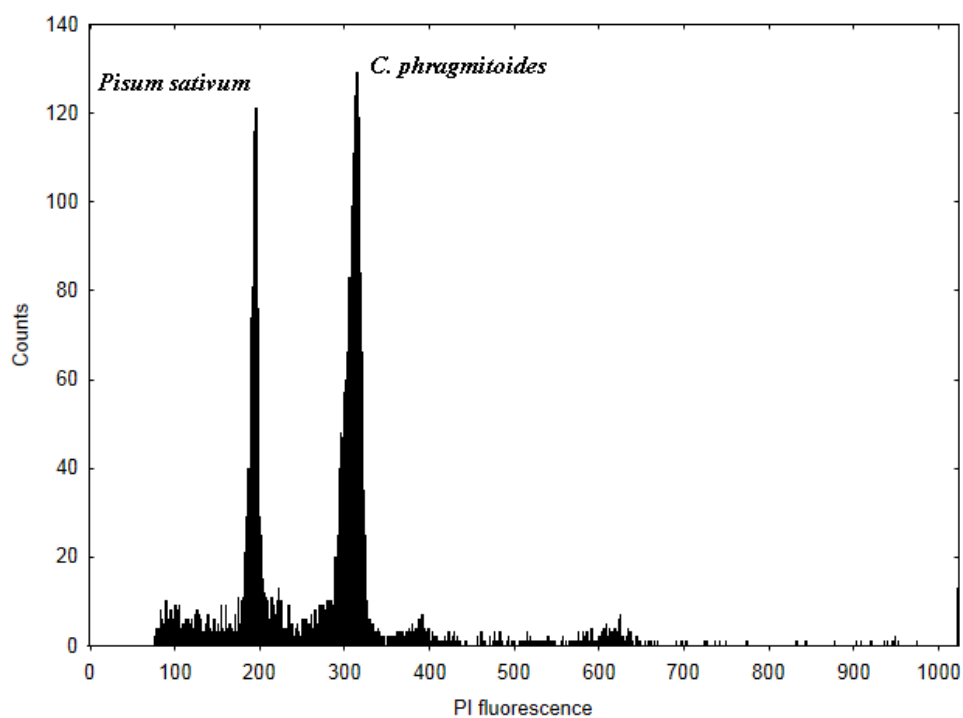
Obr. 5: Histogram fluorescence jader *C. canescens* a interného standardu *Pisum* barvených DAPI (Třešť 1-11).



Obr. 6: Histogram fluorescence jader *C. phragmitoides* a interného standardu *Pisum* barvených DAPI (Mladé Břístě 6-10).

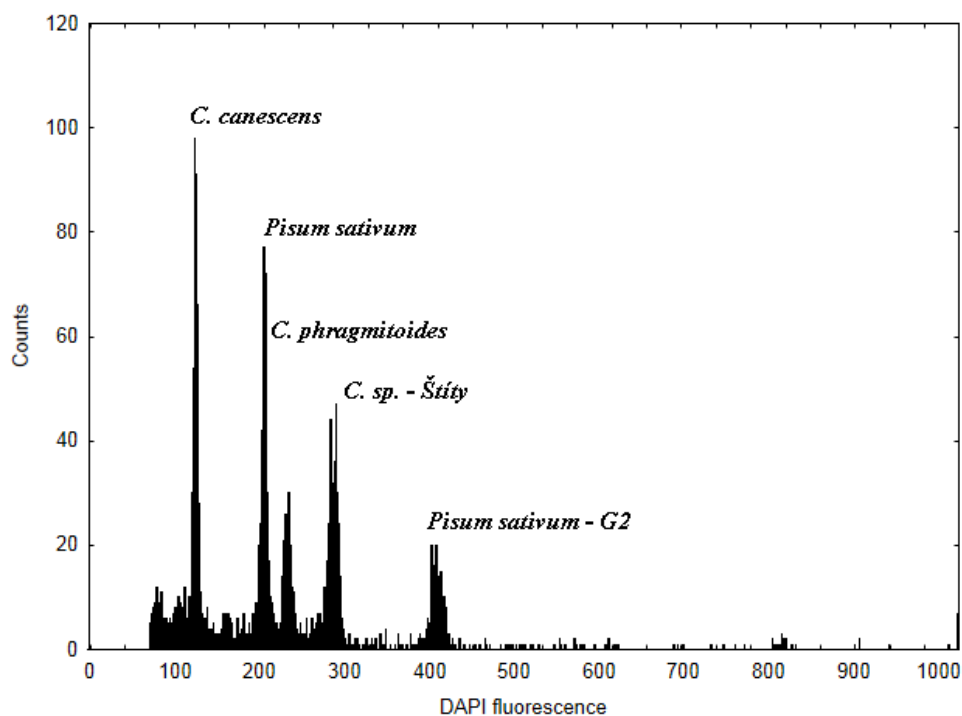


Obr. 7: Histogram fluorescence jader *C. canescens* a interného standardu *Pisum* barvených PI (Chvojnov 3.1).

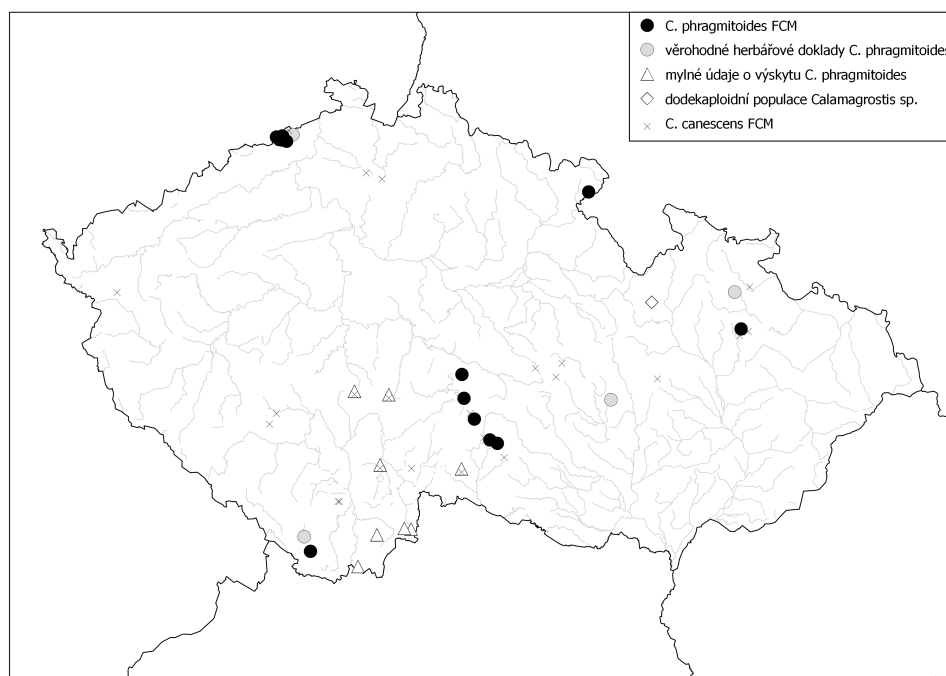


Obr. 8: Histogram fluorescence jader *C. phragmitoides* a interného standardu *Pisum* barvených PI (Hojkov-vyhon 2.1).





Obr. 9: Histogram polyanalýzy *C. canescens* (Sláma), standardu *P. sativum*, *C. phragmitoides* (Řeřišný) a *Calamagrostis* sp. (Štítý) na DAPI fluorescenci.



Obr. 10: Ověřený výskyt *C. canescens* a *C. phragmitoides* na území České republiky (FCM = ověřené cytometrickou analýzou). Mylné údaje byly vymapovány podle revidovaných herbářových chybně určených položek (data off M. Štech) a nepravděpodobných literárních údajů.

## 5.2 Morfometrická analýza

Průměrné hodnoty populací měřených znaků pro jednotlivé druhy jsou uvedeny v Tab. 9. Vybrané znaky s největšími mezidruhovými rozdíly jsou zobrazeny na Obr. 11. Z naměřených hodnot bylo spočítáno procento větvení, chlupatosti čepelí a červeného zbarvení pro jednotlivé druhy (Tab. 10).

Tab. 9: Průměrné hodnoty měřených znaků u *C. canescens* a *C. phragmitoides*.

| Znaky   | <i>C. canescens</i> | <i>C. phragmitoides</i> |
|---------|---------------------|-------------------------|
| KOL     | 6                   | 6                       |
| LATA    | 173 mm              | 209 mm                  |
| KVET_D  | 65 mm               | 76 mm                   |
| KVET_U  | 56 mm               | 70 mm                   |
| DLIST_1 | 171 mm              | 262 mm                  |
| SLIST_1 | 3 mm                | 5 mm                    |
| DLIST_2 | 239 mm              | 308 mm                  |
| SLIST_2 | 5 mm                | 6 mm                    |
| JAZ1    | 4 mm                | 11 mm                   |
| JAZ2    | 3 mm                | 8 mm                    |

Tab. 10: Vypočítaná procenta dalších morfometrických znaků *C. canescens* a *C. phragmitoides*.

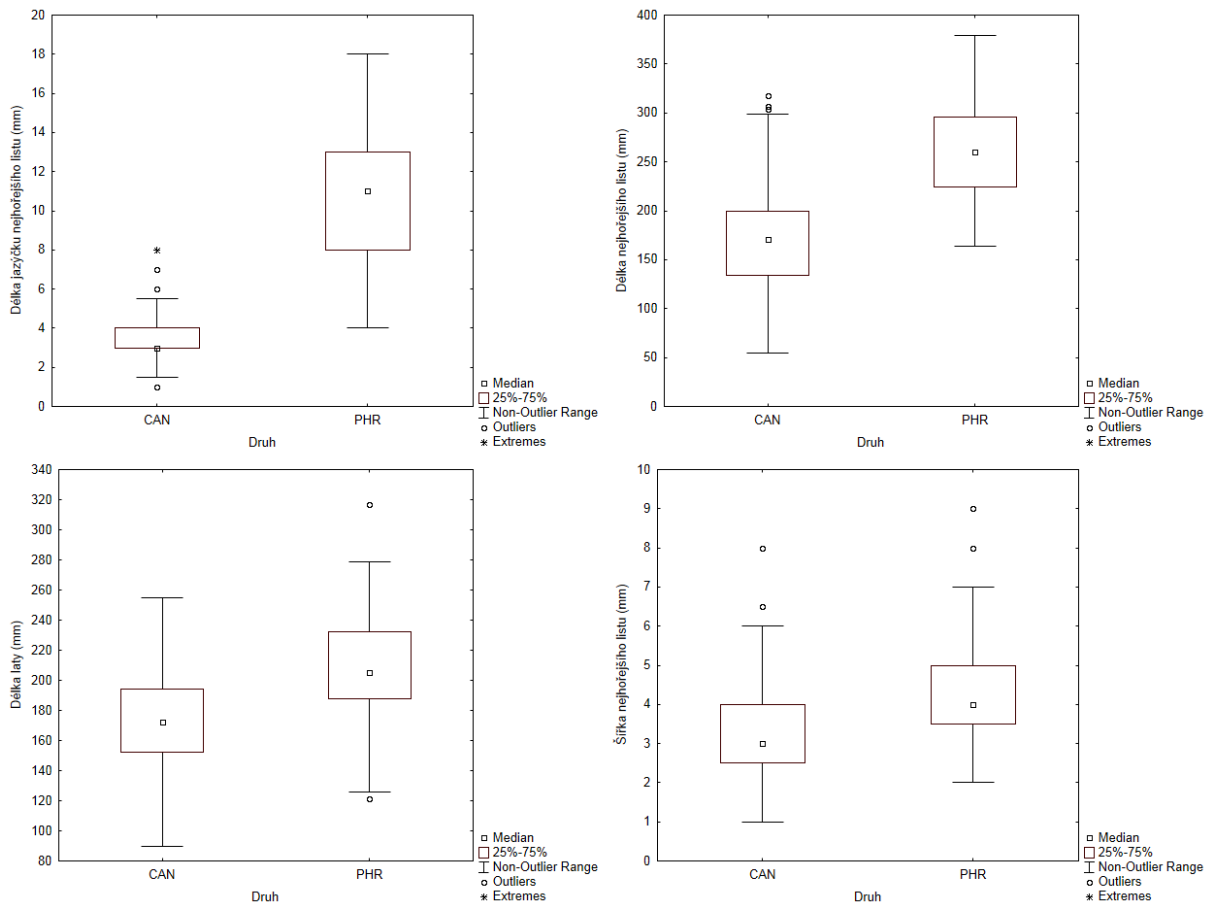
| Znaky                       | <i>C. canescens</i> | <i>C. phragmitoides</i> |
|-----------------------------|---------------------|-------------------------|
| <b>Větvení (%)</b>          | <b>98,2</b>         | <b>78</b>               |
| <b>Chlupatost listů (%)</b> | <b>87</b>           | <b>31</b>               |
| Řídké dlouhé chlupy (%)     | 16                  | 17                      |
| Husté dlouhé chlupy (%)     | 71                  | 14                      |
| <b>Červené zbarvení (%)</b> | <b>38</b>           | <b>32,7</b>             |
| Mírně červené (%)           | 24                  | 19                      |
| Celé červené (%)            | 14                  | 13,7                    |

Shluková analýza rozdělila lokality na dvě skupiny (Obr. 12). První odpovídá *C. canescens* (Jankov-Host) a druhá *C. phragmitoides* (Jezirko-ValPh). Některé populace však byly špatně zařazeny do těchto skupin.

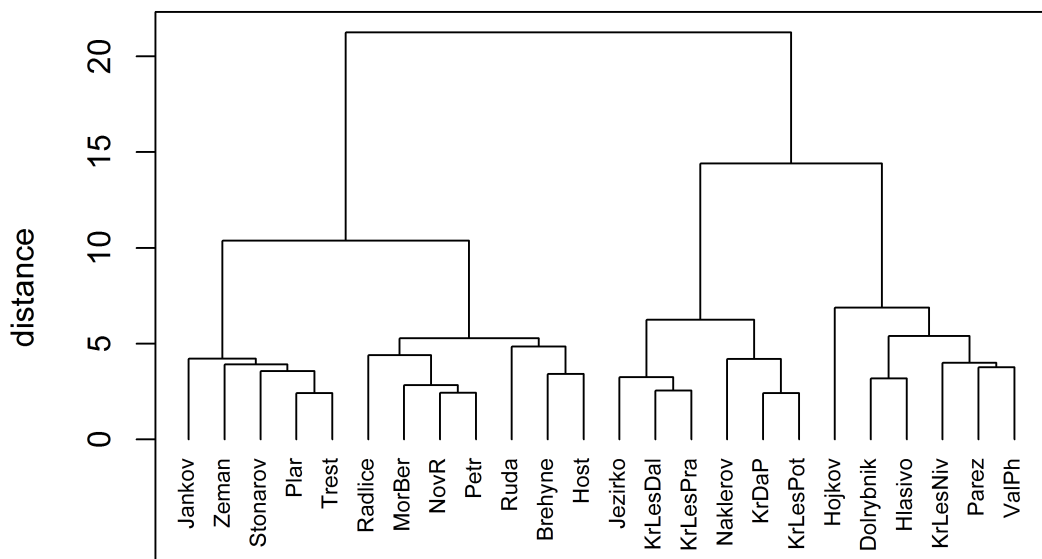
Výsledky analýzy hlavních komponent jsou prezentovány na Obr. 13. Druhy jsou rozděleny podél první osy. První tři osy vysvětlují 66,7% variability. S první osou jsou korelovány znaky délka listu 1, délka jazýčku 1, délka laty, délka prostřední větve laty, délka listu 2, délka nejspodnější větve laty, délka listu 2, větvení a chlupatost listu. S druhou osou korelují částečně poměry délka/šířka listu 1 a 2. Se třetí osou korelují nejvíce znaky šířka listu 1 a listu 2.

## 5. Výsledky

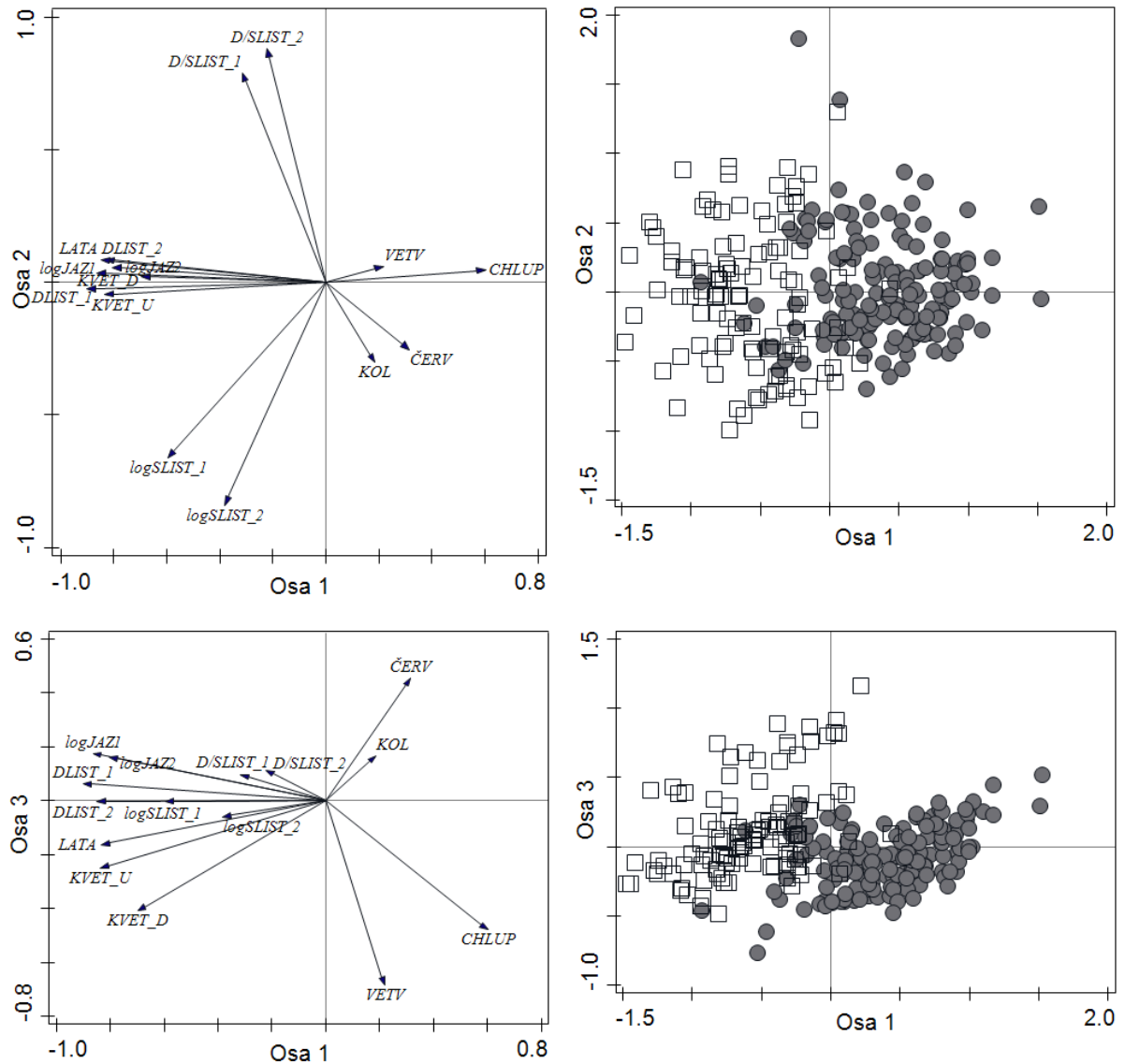
### 5.2. Morfometrická analýza



Obr. 11: Rozdíly v morfologických znacích mezi *C. canescens* a *C. phragmitoides*.



Obr. 12: Shluková analýza populací (Waardova metoda).



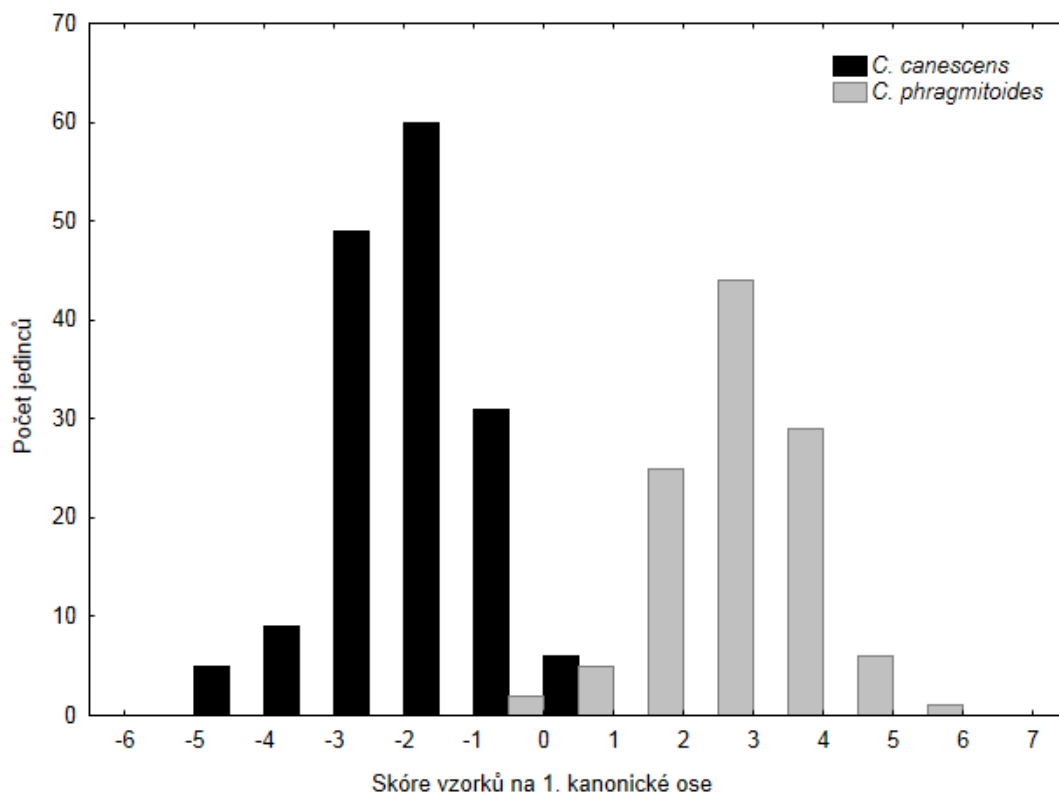
Obr. 13: Analýza hlavních komponent (PCA) – šedými kolečky jedinci *C. canescens* a prázdnými čtverci *C. phragmitoides*. Tři kanonické osy vysvětlují 40,0%, 18,2% a 8,5% celkové variability mezi druhy.

Lineární diskriminační analýza odhalila znaky, které nejlépe odlišují oba druhy (Obr. 14). Jsou to znaky délka jazýčku 1 a 2, délka listu 1 a 2, chlupatost listů, délka laty a její prostřední větve. Ve forward selection bylo zjištěno, že většina těchto znaků korelována s délkou jazýčku 1. Koeficienty vyjadřující význam znaků jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11: Morfologické znaky *C. phragmitoides* a *C. canescens* testované forward selection, jejich kondicionální a marginální efekty a korelace s osou lineární diskriminační analýzy (LDA).

| Znaky      | Kondicionální efekty |          |       | CorE score | Marginální efekty |          |       |
|------------|----------------------|----------|-------|------------|-------------------|----------|-------|
|            | Variabilita (%)      | pseudo-F | P     | Osa 1      | Variabilita (%)   | pseudo-F | P     |
| logJAZ1    | 88.8                 | 703      | 0.001 | 0.8500     | 72.3              | 703      | 0.001 |
| logJAZ2    | 2.9                  | 24.9     | 0.001 | 0.7910     | 62.6              | 451      | 0.001 |
| CERV       | 2.9                  | 27.2     | 0.001 | -0.0898    | 0.8               | 2.2      | 0.157 |
| VETV       | 1.6                  | 15.5     | 0.001 | -0.3124    | 9.8               | 29.2     | 0.001 |
| logSLIST_1 | 1.1                  | 11.6     | 0.002 | 0.4900     | 24                | 85.3     | 0.001 |
| CHLUP      | 0.8                  | 8.4      | 0.004 | -0.6226    | 38.8              | 171      | 0.001 |
| DLIST_1    | 0.4                  | n.s.     | n.s.  | -          | 49.5              | 265      | 0.001 |
| DLIST_2    | 0.6                  | n.s.     | n.s.  | -          | 32.2              | 128      | 0.001 |
| KVET_U     | -                    | n.s.     | n.s.  | -          | 31.3              | 123      | 0.001 |
| LATA       | 0.1                  | n.s.     | n.s.  | -          | 25.8              | 93.7     | 0.001 |
| KVET_D     | 0.4                  | n.s.     | n.s.  | -          | 12.9              | 39.9     | 0.001 |
| logSLIST_2 | 0.1                  | n.s.     | n.s.  | -          | 7.9               | 23.2     | 0.001 |
| KOL        | 0                    | n.s.     | n.s.  | -          | 0.5               | 1.3      | 0.282 |

Pozn.: n.s. = not significant



Obr. 14: Lineární diskriminační analýza *C. canescens* a *C. phragmitoides*.

Klasifikační diskriminační analýzou bylo určeno procento správně zařazených populací do jednotlivých druhů (Tab. 12). Nejhůře byly klasifikována populace Zeman. Chyby v klasifikaci byly i v populacích Radlice, Pláničský rybník, Krásný Les-prameniště, Hojkov a Pařez.

Tab. 12: Klasifikační diskriminační analýza (PHR=*phragmitoides*, CAN=*canescens*).

| Populace  | Taxon | CAN | PHR | Celkový počet | Procento správně určených (%) |
|-----------|-------|-----|-----|---------------|-------------------------------|
| Brehyne   | CAN   | 10  | 0   | 10            | 100                           |
| Dolrybnik | CAN   | 11  | 0   | 11            | 100                           |
| Hlasivo   | CAN   | 9   | 0   | 9             | 100                           |
| Hojkov    | PHR   | 1   | 10  | 11            | 91                            |
| Host      | CAN   | 18  | 0   | 18            | 100                           |
| Jankov    | CAN   | 17  | 0   | 17            | 100                           |
| Jezirko   | PHR   | 0   | 12  | 12            | 100                           |
| KrDaP     | PHR   | 0   | 3   | 3             | 100                           |
| KrLesDal  | PHR   | 0   | 12  | 12            | 100                           |
| KrLesNiv  | PHR   | 0   | 13  | 13            | 100                           |
| KrLesPot  | PHR   | 0   | 15  | 15            | 100                           |
| KrLesPra  | PHR   | 2   | 9   | 11            | 82                            |
| MorBer    | CAN   | 18  | 0   | 18            | 100                           |
| Naklerov  | PHR   | 0   | 5   | 5             | 100                           |
| NovR      | CAN   | 15  | 0   | 15            | 100                           |
| Otin      | PHR   | 0   | 1   | 1             | 100                           |
| Parez     | PHR   | 1   | 14  | 15            | 93                            |
| Petr      | CAN   | 7   | 0   | 7             | 100                           |
| Plar      | PHR   | 2   | 8   | 10            | 80                            |
| Pohorel   | CAN   | 2   | 0   | 2             | 100                           |
| Radlice   | CAN   | 12  | 4   | 16            | 75                            |
| Ruda      | CAN   | 19  | 0   | 19            | 100                           |
| Stonarov  | CAN   | 3   | 0   | 3             | 100                           |
| Trest     | CAN   | 4   | 0   | 4             | 100                           |
| ValPh     | PHR   | 0   | 4   | 4             | 100                           |
| Zeman     | CAN   | 3   | 8   | 11            | 27                            |

### 5.3 Sekvence

V rámci druhů *C. canescens*, *C. phragmitoides* a *C. epigejos* byly v testovaných úsecích cpDNA nalezeny 4 různé haplotypy (Tab. 13). V úseku rpl32F–trnL<sup>AUG</sup>R bylo nalezeno pět různých haplotypů (Tab. 14). Ve všech mezigenových úsecích měla *C. phragmitoides* unikátní sekvenci. V úsecích cpDNA rpl32F–trnL<sup>AUG</sup>R a psbA–trnH<sup>GUG</sup> byly u sebraných vzorků druhu *C. canescens* pozorovány 2 haplotypy (Tab. 15 a 16). V úseku psbK–trnS<sup>GCU</sup> měla *C. canescens* unikátní sekvenci (Tab. 17. U vzorků *C. epigejos* byly v úseku rpl32F–trnL<sup>AUG</sup>R pozorovány dva haplotypy. Ve zbývajících úsecích měla *C. epigejos* unikátní sekvence.

Tab. 13: Nalezené haplotypy *C. canescens*, *C. phragmitoides* a *C. epigejos* v celé cpDNA.

| Druh                    | Haplotyp | Počet jedinců |
|-------------------------|----------|---------------|
| <i>C. canescens</i>     | A        | 3             |
| <i>C. canescens</i>     | B        | 1             |
| <i>C. phragmitoides</i> | C        | 4             |
| <i>C. epigejos</i>      | D        | 1             |

Tab. 14: Nalezené haplotypy v úseku rpl32F–trnL<sup>AUG</sup>R u lokalit *C. canescens* (A,B), *C. phragmitoides* (C) a *C. epigejos* (D, E).

| Haplotyp | Populace   |
|----------|--|
| A        | Břehyně, Ruda, Slámová louže, Chvojnov, Hlasivo                          |
| B        | Dolní rybník a Zeman   |
| C        | Řeřišný, Kr.hory-dálnice, Kr.Les, Pařez, Hojkov, Mladé Bříště, Valteřice |
| D        | Zeman, Hlasivo, Krásný Les   |
| E        | Hostínova Lhota  |

Tab. 15: Zjištěné haplotypy v úseku rpl32F–trnL<sup>AUG</sup>R.

| Druh                    | Haplotyp | Počet jedinců | Pozice  |           |     |         |     |     |
|-------------------------|----------|---------------|---------|-----------|-----|---------|-----|-----|
|                         |          |               | 266-272 | 358-365   | 469 | 523-529 | 633 | 653 |
| <i>C. canescens</i>     | A        | 7             | -       | -         | C   | -       | -   | T   |
| <i>C. canescens</i>     | B        | 2             | -       | -         | C   | -       | -   | C   |
| <i>C. phragmitoides</i> | C        | 11            | TTGATAT | TTTTTCATA | C   | AATATTG | A   | C   |
| <i>C. epigejos</i>      | D        | 1             | -       | TTTTTCATA | A   | AATATTG | A   | C   |
| <i>C. epigejos</i>      | E        | 6             | -       | TTTTTCATA | C   | AATATTG | A   | C   |

Tab. 16: Nalezené haplotypy v úseku psbA–trnH<sup>GUG</sup>.

| Druh                    | Haplotyp | Počet jedinců | Pozice |       |     |     |     |
|-------------------------|----------|---------------|--------|-------|-----|-----|-----|
|                         |          |               | 53     | 97-98 | 134 | 260 | 548 |
| <i>C. canescens</i>     | A        | 7             | G      | GG    | T   | G   | T   |
| <i>C. canescens</i>     | B        | 4             | G      | CC    | T   | G   | T   |
| <i>C. phragmitoides</i> | C        | 8             | A      | CC    | T   | G   | G   |
| <i>C. epigejos</i>      | D        | 1             | G      | GG    | A   | A   | G   |

Tab. 17: Nalezené haplotypy v úseku psbK–trnS<sup>GCU</sup>.

| Druh                    | Haplotyp | Počet jedinců | Pozice |     |     |     |     |     |
|-------------------------|----------|---------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                         |          |               | 42     | 100 | 230 | 264 | 518 | 520 |
| <i>C. canescens</i>     | A, B     | 4             | A      | C   | G   | A   | T   | C   |
| <i>C. phragmitoides</i> | C        | 4             | C      | A   | T   | A   | T   | A   |
| <i>C. epigejos</i>      | D        | 1             | A      | A   | T   | C   | -   | A   |



## 6 Diskuze

Cytometrickou analýzou byla zjištěna ploidie jednotlivých sebraných jedinců obou druhů. Vypočítaný poměr CG/AT bazí byl pro *C. canescens* 0.789 a pro *C. phragmitoides* 0.815, tedy se příliš nelišil. Přestože jsou v literatuře udávány různé počty chromozomů pro druh *Calamagrostis phragmitoides* (Conert, 1989; Nygren 1946-1962), u všech měřených populací byla zjištěna jednotná velikost genomu odpovídající hexaploidům. Naopak pro druh *C. canescens* je v literatuře udáván pouze tetraploidní počet chromozómů. Tomuto počtu odpovídají i všechny analyzované rostliny. Avšak v případě tohoto druhu byla zjištěna variabilita ve velikosti genomu přes 17Přispěla k tomu zejména variabilita mezipopulační. Studium příčin této variability bude předmětem dalšího studia.

Bylo zjištěno, že z některých lokalit byl výskyt *C. phragmitoides* udáván mylně. V řadě případů se jednalo o záměny s *C. canescens*, která se *C. phragmitoides* může do značné míry podobat. K takové situaci došlo např. u lokality Zeman, která je ve skutečnosti stanovištěm *C. canescens*. Dále bylo ověřeno 27 populací *C. canescens*. U rostlin z lokality Štítý nedaleko Šumperka (udávaná jako lokalita *C. phragmitoides*) byla zjištěna velikost genomu odpovídající dodekaploidům. Tato ploidní úroveň je ze středoevropských druhů známa u druhu *C. villosa* (Conert, 1989). Jedinci z této lokality byli však morfologicky od *C. villosa* odlišní, podobali se spíše *C. phragmitoides*. Může se jednat o hybridní populaci *Calamagrostis* sp., už jen protože hybridizace je v tomto rodu běžná. Vzhledem k tomu, že populace byla navštívená až pozdě na podzim, kdy již nebyly patrné některé morfologické znaky, zůstává její určení nejasné.

Druh *C. phragmitoides* vytváří oproti *C. canescens* v průměru mohutnější rostliny, což odpovídá údajům z literatury (Kubát & et al., 2002). Největší morfologické rozdíly jsou v délce jazýčků, délce listů a délce laty. Naopak zjištěný průměrný počet kolének byl pro oba druhy stejný, ačkoli v literatuře je většinou uváděn větší počet kolének pro druh *C. phragmitoides*, tedy 5-8 kolének, pro druh *C. canescens* pak 3-5 kolének (Kubát & et al., 2002). Dále bylo zjištěno, že druh *C. phragmitoides* se sice hodně větví, ale méně (o 20%) než *C. canescens*. V literatuře je uváděno, že oba tyto druhy se větví (Kubát & et al., 2002). *C. canescens* má obvykle dlouze chlupaté čepele listů, zatímco čepele listů *C. phragmitoides* jsou jen řídce pokryty jemnými chlupy. Oba druhy měly málo červená stébla, avšak o něco zbarvenější byly u *C. canescens* a to většinou po celé délce stébla. *C. phragmitoides* zase z větší části měla zbarvená stébla do červena těsně nad kořínky či

nádech červeného zbarvení na kolénkách, což odpovídá literatuře (Smejkal, 1976).

Analýza hlavních komponent rozdělila druhy *C. canescens* a *C. phragmitoides* podle první osy, se kterou koreluje nejvíc znaků. Poměry délka/šířka listu 1 a 2 korelované s druhou osou toho příliš nevysvětlují. Lineární diskriminační analýzou byly nalezeny znaky nejlépe odlišující oba druhy, kterými jsou délka obou jazýčků a listů, chlupatost listů, délka laty a její prostřední větve. Ve forward selection se však ukázalo, že většina těchto znaků koreluje s délkou jazýčku 1. Zároveň byly vyzdviženy znaky, které s tímto znakem nekorelují (červené zbarvení stébla a větvení).

Klasifikační diskriminační analýzou bylo zjištěno, že většina populací byla správně určena. Nejhůře byla klasifikována populace Zeman, což odpovídá skutečnosti, že tato populace byla až do současnosti považována za *C. phragmitoides*. I v některých dalších populacích (Radlice, Pláničský rybník, Prameniště v Krásném Lese, Hojkov a Pařez) však byly jedna nebo dvě rostliny chybně klasifikovány. Na těchto stanovištích rostli jedinci, kteří nevypadali morfologicky jako typičtí zástupci daného druhu, a proto mohli být špatně zařazeni. Špatně zařazené lokality (Pláničský rybník, Dolní rybník a Hlasivo) se projeví i ve shlukové analýze.

U všech sekvenovaných rostlin *C. phragmitoides* byl zjištěn jediný haplotyp pcDNA. U rostlin *C. canescens* byly nalezeny dva nepřilíš odlišné haplotypy. První je rozšířen po celém území České republiky, druhý byl zjištěn pouze v populaci Zeman a Dolní rybník. Navzdory názorům H. Scholze (1971) a A. Nygrena (1946-1962), že *C. canescens* s *C. epigejos* jsou potenciálními rodičovskými druhy *C. phragmitoides*, ani jeden druh nebyl prokázán za mateřský.

## 7 Závěr

Na území České republiky byly průtokovou cytometrií zjištěny tři ploidní úrovně větvených mokřadních třtin. Tetraploidní úroveň odpovídá morfologicky *C. canescens*, hexaploidní *C. phragmitoides* a jedna populace, která odpovídá velikostí genomu dodekaploidům nebyla zatím určena. Hexaploidní populace jsou ve velikosti genomu víceméně jednotné a není důvod u nich předpokládat variabilitu v počtu chromozómů, která je v literatuře udávána pro druh *C. phragmitoides*. Naopak tetraploidní populace odpovídající *C. canescens* jsou ve velikosti genomu i morfologických znacích poměrně proměnlivé a příčinu této variability by bylo vhodné dále studovat. Přesto lze morfologicky oba druhy dobře odlišit. Nejlepšími znaky pro odlišení jsou délka jazýčku, délka laty a délka listu.

Byly nalezeny tři nekódující úseky chloroplastové DNA, ve kterých se liší oba druhy. Zatímco u všech sekvenovaných rostlin *C. phragmitoides* byl zjištěn jediný haplotyp cpDNA, u *C. canescens* byly zjištěny dva jiné vzájemně blízké haplotypy. Všechny haplotypy se však liší od haplotypů dosud zjištěných u *C. epigejos*, která je někdy považována za taxon zapojený do evoluce *C. phragmitoides*. Vybrané úseky jsou vhodné pro další studium skupiny. Toto studium je třeba zaměřit především na rostliny ze Skandinávie a Sibíře. Právě odtud jsou totiž druhy *C. phragmitoides* a blízkce příbuzná *C. purpurea* popsány. Je také nezbytně nutné, zjistit ploidní poměry u rostlin z těchto oblastí. Další studium by bylo vhodné zaměřit také na reprodukční způsob (podíl apomixe) u našich a případně zahraničních rostlin.

---

## Reference

- Albrecht, J. (2003): Českobudějovicko. – In Mackovčín P. a Sedláček M. [eds.]: Chráněná území ČR, Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno Praha, svazek VIII: 461.
- Bednář, V., Č. Deyl & Trávníček, B. (1991): Druhý floristický příspěvek ke květeně Nížkého Jeseníku. – Acta Univ. Palack. Olomouc. Fac. rer. nat. 104 . Biol. 31: 95–113.
- Braak, C. J. F. T. & Šmilauer, P. (2012): Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. – Microcomputer Power Ithaca, USA, 496.
- Conert, H. J. (1989): Calamagrostis. – In Hegi's Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Paul Parey Hamburg. 357–380.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L. & Obermayer, R. (1998): Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. – Annals of Botany 82 (Supplement A): 17–26.
- Drapikowska, M., Celka, Z., Buczkowska, K. & Kaszkowiak, E. (2007): Morphological variation of the rough small-reed (*Calamagrostis arundinacea* L.) populations from Northern and Central Poland. – Botanika - Steciana, Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu 11: 107–111.
- Ebert, D. & Peakall, R. (2009): A new set of universal de novo sequencing primers for extensive coverage of noncoding chloroplast DNA: new opportunities for phylogenetic studies and cpSSR discovery. – Molecular Ecology Resources 9: 777–783.
- Esselman, E. J., Jianqiang, L., Crawford, D. J., Windus, J. L. & Wolfe, A. D. (1999): Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. – Molecular Ecology 8: 443–451.
- Fehlberg, S. D. & Ferguson, C. J. (2012): Intraspecific cytotypic variation and complicated genetic structure in the *Phlox amabilis*-*P. woodhousei* (Polemoniaceae) complex. – American Journal of Botany 99: 1–10.
- Frey, L. (1973): Niektóre problemy z kariologii i systematyki traw w Polsce. – Wiadomości Botaniczne Tom XVII Zeszyt 3: 151–161.
- Frey, L. & Paszko, B. (1999): Remarks on the distribution, taxonomy and karyology of *Calamagrostis* species (Poaceae) with special reference to their representatives in Poland. – Fragm. Flor. Geobot. Suppl. 7: 33–45.

- 
- Geospiza Research Team (2004): FinchTV (Finch Trace Viewer) Version 1.4.0. – Geospiza, Inc. Seattle, USA.
- Grulich, V. (1986): Klíč k určování československých druhů rodu *Calamagrostis* 1. – Muzeum a současnost, řada přírodovědná edition, Roztoky u Prahy.
- Grulich, V. (2012): Red list of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. – Preslia, Praha 84: 631–645.
- Hall, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – Nucl. Acids. Sym. Ser. 41: 95–98.
- Hartman, C. J. (1832): *Calamagrostis*. – In Skandinaviens Flora innefattande Sveriges och Norrignes Vexter, till och Med Mossorna, Stockholm, 20–22.
- Heine, R. (1972): Zur Klärung der sächsischen *Calamagrostis*-Art in den Muldentälern, dem Flöha- und dem Zschopautal. – Feddes Repertorium, Berlin 83: 275–288.
- Chán [ed.], V. (1999): Komentovaný Červený seznam květeny jižní části Čech. – Příroda, Praha 16: 1–284.
- Krahulcová, A. (2003): Chromosome numbers in selected monocotyledons (Czech Republic, Hungary, and Slovakia). – Preslia, Praha 75: 97–113.
- Krzakowa, M. & Celka, Z. (2007): Intrapopulation variation of *Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth revealed by electrophoretically detected ten enzyme systems. – Biodiv. Res. Conserv. 5-8: 5–9.
- Krzakowa, M. & Celka, Z. (2008): Intraspecific differentiation of reed grass *Calamagrostis arundinacea* (L.) ROTH (Poaceae) populations revealed by peroxidase allozymes. – Acta Societatis Botanicorum Poloniae 77: 299–304.
- Krzakowa, M. & Dunajski, A. (2007): Genetic differences and hybridization between *Calamagrostis arundinacea* and *C. villosa* (Poaceae) in the anemo-orographic (A-O) system in the Karkonosze Mountains. – Biochemical Systematics and Ecology 35: 23–28.
- Grulich, V. (2002): *Calamagrostis* Adans. – In Kubát, K. & et al.: Klíč ke květeně České republiky, Academia Praha. 861–863.
- Kuntz, D. L. (1910): *Calamagrostis*. – Beihefte zum Bot. Centrallblatt Bol. 26, Abt. 2.
- Litvinova, D. I. (1910): *C. langsdorffii* (Link) Trin., *C. purpurea* Trin. i nekotorych blizkikh k nim formach. 49–77.
- MacDonald, S. E. & Lieffers, V. J. (1991): Population Variation, Outcrossing, and Colonization of Disturbed Areas by *Calamagrostis canadensis*: Evidence from Allozyme Analysis. – American Journal of Botany 78: 1123–1129.

- 
- Marhold, K. & Suda J. (2001): Analýza multivariačních dat v taxonomii (Fenetické metody), verze 0.2. – Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra Botaniky, Praha.
- Matuszkiewicz, W. (1948): Materialy do monografii rodzaju *Calamagrostis* Ad. (Materials to the Monography of the Genus *Calamagrostis* Adans.) 3. – Lublin-Polonia, Sectio C edition.
- Mitchell, W. (1968): Taxonomy, variation, and chorology of three chromosome races of the *Calamagrostis canadensis* complex in Alaska. – *Madroño* 19: 235–246.
- Nygren, A. (1946): The genesis of some Scandinavian species of *Calamagrostis*. – *Hereditas* 32: 131–262.
- Nygren, A. (1948a). Further studies in spontaneous and synthetic *Calamagrostis purpurea*. – *Hereditas* 34: 113–134.
- Nygren, A. (1948b). Some interspecific crosses in *Calamagrostis* and their evolutionary consequences. – *Hereditas* 34: 387–413.
- Nygren, A. (1949): Apomictic and sexual reproduction in *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas* 35: 285–300.
- Nygren, A. (1951): Form and biotype formation in *Calamagrostis purpurea*. – *Hereditas* 37: 519–532.
- Nygren, A. (1954): Investigation on North American *Calamagrostis*. I. – *Hereditas* 40: 377–397.
- Nygren, A. (1958): Investigation on North American *Calamagrostis*. II. – *Ann. Roy. Agric. Coll. Sweden* 24: 363–368.
- Nygren, A. (1962): Artificial and natural hybridization in European *Calamagrostis*. – *Symb. Bot. Upsal.* 17: 2–105.
- Paszko, B. (2008): Zmienność morfologiczna trzcinnika pstrego (*Calamagrostis varia*). – *Zastosowania metod statystycznych w badaniach naukowych*, Kraków 3: 405–412.
- Paszko, B. & Nobis, M. (2010): The hybrid origin of *Calamagrostis* × *gracilescens* (Poaceae) in Poland inferred from morphology and AFLP data. – *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 79: 51–61.
- Procházka [ed.], F. & Bureš, P., Čeřovský, J., Danihelka, J., Grulich, V., Hadinec, J., Havlíček, P., Hrouda, L., Chrtek jun., J., Kaplan, Z., Kirschner, J., Kirschnerová, L., Klaudivová, A., Kubát, K., Procházka, F., Řehořek, V., Skála, Z., Šída, O., Štech, M.,

- 
- Štěpánek, J., Štěpánková, J., Větvička, V., Trávníček, B. & Zázvorka, J. (2001): Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). – Příroda, Praha 18: 1–166.
- R Core Team (2013): R: A Language and Environment for Statistical Computing. – R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Reverdatto, V. V. (1941): Sistematičeskije zametki po materialam gerbarija imeni P. N. Krylova: Zametky o Calamagrostis Roth prienisejskoj flori. – 1–4.
- Růžička, I. (1985): Hojkovské rašeliniště – nový chráněný přírodní výtvar na Jihlavsku. – Památ. a Přír., Praha 10: 493–496.
- Růžička, I. (1987): Další nález třtiny nachové (*Calamagrostis phragmitoides* Hartm.) na Českomoravské vrchovině. – Vlastiv. Sborn. Vysočiny, Jihlava, sect. Natur. 8: 244–246.
- Růžička, I. (1989): Výsledky záchranného výzkumu ohrožené květeny mizejících rašelinišť a rašelinných luk na Jihlavsku. – Sborn. Vysočiny, Jihlava, sect. Natur. 9: 135–176.
- Růžička, I. (2005): Dva nové nálezy *Calamagrostis phragmitoides* Hartman na Českomoravské vrchovině. – Acta rerum naturalium 1: 57–59.
- Řepka, R., Kučera, J. & Bílek, J. (1998): Příspěvek ke květeně Řeřišného v CHKO Broumovsko. – Východočeský sborník přírodovědný. Práce a studie 6: 153–154.
- Řepka, R. & Lustyk, P. (1997): Floristické údaje vybraných druhů pro Květenu Šumavy. – Zprávy České botanické společnosti 32: 161–181.
- Saitou, K., Fukuda, T., Yokoyama, J. & Maki, M. (2007): Morphological and molecular (RAPD) analyses confirm the hybrid origin of the diploid grass *Calamagrostis longiseta* var. *Longe-aristata* (Gramineae). – Folia Geobotanica 42: 63–76.
- Sang, T., Crawford, D. J. & Stuessy, T. F. (1997): Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*). – American Journal of Botany 84: 1120–1136.
- Schiebold, S., Hensen, I., Wesche, K. & Röser, M. (2009): Extensive clonality of the endemic *Calamagrostis pseudopurpurea* Gerstl. ex O.R. Heine in central Germany revealed by RAPD markers. – Plant Biology 11: 473–482.
- Scholz, H. (1964): Zur Gramineenflora Mitteleuropas II. – Ber. Deutsch. Bot. Ges., Stuttgart 77: 145–160.
- Scholz, H. (1971): Gegenwärtige Kenntnisse über die Verbreitung der *Calamagrostis phragmitoides* Hartm. (Purpureitgras) in Mitteleuropa. – Philippia, Kassel 1: 85–90.

- 
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E. & Small, R. L. (2007): Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. – *American Journal of Botany* 94: 275–288.
- Smejkal, M. (1976): *Calamagrostis phragmitoides*, nový druh československé flóry. – *Preslia*, Praha 48: 124–130.
- Sprengel, K. (1821): Trinius agrostographische Beyträge. – In *Neue Entdeckungen im ganzen Umfang der Pflanzenkunde*, F. Fleischer Leipzig. 2: 51–54.
- StatSoft Team (2011): STATISTICA (data analysis software system) version 10. – StatSoft, Inc.
- Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Foggi, B. & Rossi, G. (2008): Genome size and GC content evolution of *Festuca*: ancestral expansion and subsequent reduction. – *Annals of Botany* 101: 421–433.
- Štech, M., in prep. *Calamagrostis* Adans. – třtina.
- 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
- Tate, J. A. & Simpson, B. B. (2003): Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origin of the polyploid species. – *Systematic Botany* 28: 723–737.
- Tateoka, T. (1974): A Cytotaxonomic Study of the *Calamagrostis purpurea* – *langsdoorffii* – *canadensis* Complex in the Lowlands of Hokkaido. – *Bot. Mag. Tokyo* 87: 237–251.
- Teeri, T., Saura, A. & Lokki, J. (1984): Chloroplast DNA from *Calamagrostis* species by selective lysis of organelles. – *Hereditas* 101: 123–126.
- Tzvelev, N. N. (1965): K sistematike pola vejnik (*Calamagrostis* Adans.) v SSSR (De genere *Calamagrostis* Adans, in URSS notulae systematicae.). – In *Novosti systematiky vyšších rastenij*, Nauka Moskva, Leningrad. 5–50.
- Tzvelev, N. N. (1976): *Zlaki SSSR*. – Nauka, Leningrad.
- van Dijk, P. J. & Vijverberg, K. (2005): The significance of apomixis in the evolution of the angiosperms: a reappraisal. – In *Plant species-level systematics: new perspectives on pattern & process*, (Bakker, F., Chatrou, L., Gravendeel, B. & Pelsers, P., [eds.]), International Association for Plant Taxonomy, Institute of Botany, University of Vienna, Austria. 101–116.



# Přílohy



*Příloha I: Část populace C. phragmitoides na lokalitě Pařez.*



*Příloha II: Detail květenství C. phragmitoides z lokality Pařez.*



*Příloha III: Detail jazýčku C. phragmitoides z lokality Jezírko.*