

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

Variabilita *Calamagrostis phragmitoides* v ČR  
a srovnání s morfologicky podobnými druhy.

Diplomová práce

**Bc. Veronika Schaabová**

Školitel: Ing. Milan Štech, Ph.D.

České Budějovice 2015

Schaabová, V., (2015): Variabilita *Calamagrostis phragmitoides* v ČR a srovnání s morfologicky podobnými druhy.

[The variability of *Calamagrostis phragmitoides* in the Czech Republic and its comparison with morphologically similar species.

Mgr. Thesis, in Czech] – 57 pp. + 30 pp. Appendix,

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

Anotace: *Calamagrostis phragmitoides* belongs to taxonomically complex *C. purpurea* aggregate with circumpolar distribution area. The relations between morphologically similar taxa of this aggregate are not clear. Populations of *C. purpurea* agg. from Central Europe, Scandinavia and Siberia (including one plant from the North America) were genetically studied (cpDNA, ITS, ploidy level by FCM). Allozyme and morfological variability of populations *C. phragmitoides* and morphologically similar *C. canescens* was also studied in the Czech Republic.

This study was supported by grant SGA PřF JU in 2014.

**Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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 11.12.2015

.....

Podpis studenta

### **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Milanu Štechovi za trpělivost a celkovou pomoc s touto prací. Dále Petru Kouteckému za sběr bajkalských třtin a pomoc s některými metodami, Bohumilu Trávníčkovi, Jiřímu Danihelkovi a Alžbětě Čejkové za poskytnutí herbářového materiálu, Liborovi Ekrtovi a všem, kteří sbírali třtiny. Dále bych chtěla poděkovat Jirkovi Košnarovi za pomoc v laboratoři, Ondřeji Hornychovi, Janě Piherové a dalším, kteří se jakkoliv podíleli na této práci (na konzultacích, sběru dat, úpravách dat apod). Chtěla bych poděkovat své sestře Hance, že přežila moje vztekání během psaní. Také bych chtěla poděkovat za velkou psychickou podporu své mamince, prarodičům a především svému příteli, který se mnou jezdil do terénu a po celou dobu psaní práce mi vařil samé dobroty.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>2</b>
2.1	Členění rodu <i>Calamagrostis</i>	2
2.2	Agregát <i>Calamagrostis purpurea</i>	3
2.3	Hypotézy vzniku <i>C. phragmitoides</i>	4
2.4	<i>C. canescens</i>	5
2.5	Morfologie <i>C. phragmitoides</i>	6
2.6	Rozšíření <i>C. phragmitoides</i>	6
2.7	Rozšíření <i>C. phragmitoides</i> v ČR	7
2.8	Ekologie <i>C. phragmitoides</i>	7
2.9	Apomixie	7
2.10	Apomixie v rodu <i>Calamagrostis</i>	8
2.11	Průtoková cytometrie	9
2.12	Analýza izozymů	10
<b>3</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>13</b>
4.1	Průtoková cytometrie	13
4.2	Morfologická analýza	14
4.3	Isozymová analýza	15
4.3.1	Testování	15
4.3.2	Odběr vzorků	16
4.3.3	Izolace	16
4.3.4	Elektroforéza	17
4.3.5	Histochemické barvení	18
4.3.6	Vysušení a uchování gelů	19
4.3.7	Vyhodnocení gelů	20
4.4	Sekvenování	21
4.4.1	Sběr materiálu	21
4.4.2	Izolace DNA pomocí NaOH	21



4.4.3	PCR, purifikace a příprava směsi na sekvenování . . . . .	21
4.5	Klonování . . . . .	24
4.6	Vyřezávání PCR produktu z gelu . . . . .	26
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>27</b>
5.1	Cytometrická analýza . . . . .	27
5.2	Morfometrická analýza . . . . .	32
5.3	Isozymová analýza . . . . .	38
5.4	Sekvenování . . . . .	41
5.4.1	Chloroplastové úseky . . . . .	41
5.4.2	Jaderný úsek (ITS) . . . . .	44
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>47</b>
6.1	Agregát <i>C. purpurea</i> . . . . .	47
6.2	Odlišení taxonů <i>C. purp.</i> agg. a morf. podob. typů . . . . .	49
6.3	Průtoková cytometrie . . . . .	50
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>51</b>
	<b>Literatura</b>	<b>52</b>
	<b>Přílohy</b>	<b>58</b>

# 1 Úvod

Rod *Calamagrostis* (třtina) patří do čeledi *Poaceae* a zahrnuje celosvětově na 300 druhů rostoucích především v mírném a boreálním pásu severní polokoule, v tropech pak pouze v horách (Conert, 1989). Jsou to vytrvalé, 20–200 cm vysoké trávy (hemikryptofyty) tvořící buďto trsy díky výhonům rostoucím v pochvách, anebo jsou výběžkaté díky výhonům rostoucím z báze pochev (Conert, 1989). Kromě vegetativního rozmnožování se třtiny rozmnožují převážně sexuálně, některé druhy však mohou tvořit semena i nepohlavně (apomikticky).

Určování jednotlivých druhů rodu *Calamagrostis* na základě morfologických znaků bývá poměrně problematické (Grulich, 1986). Většina vegetativních znaků používaných k determinaci jednotlivých druhů (např. barva, délka a šířka listů, délka jazýčků, nebo velikost laty) je značně plastická a mění se v závislosti na podmínkách prostředí. Celou situaci komplikuje široká ekologická amplituda a velká fenotypová plasticita mnohých druhů.

Mezi poměrně stabilní znaky patří naopak především generativní znaky, které nejsou tolik ovlivněny vnějšími vlivy a jsou mnohem vhodnější pro určování jednotlivých druhů. Jedná se však o minuciézní znaky v jednokvětých kláscích, jako je např. délka a zalomení osiny, rozměry a tvar plev, pluchy, přítomnost pastopečky apod.

Další komplikací při určování jednotlivých druhů rodu *Calamagrostis* je také častá hybridizace a podobnost hybridů s rodičovskými i jinými druhy (Conert, 1989). Proto v mnohých případech nejsou ani generativní znaky zcela spolehlivé.

Kritickou skupinou rodu *Calamagrostis* ve střední Evropě je okruh *Calamagrostis purpurea*, který je součástí komplexu *Calamagrostis purpurea-langsdorfii-canadensis* s cirkumpolárním rozšířením (Conert, 1989). Do této taxonomicky obtížné skupiny je zařazována řada taxonů. U mnohých z nich se předpokládá apomiktický způsob reprodukce, který je mimo jiné příčinou velké morfologické variability. Ve střední Evropě se vzácně vyskytují rostliny označované jako *Calamagrostis phragmitoides* (Smejkal, 1976; Grulich, 1986; Conert, 1989; Krok et al., 2013). Tento taxon byl popsán ze Skandinávie, kde je hojný. Vztah evropských a asijských rostlin (morfologicky nejbližší *C. purpurea* popsána od jezera Bajkal) je nejasný a samostatnost evropských rostlin není některými autory akceptována (Nygren, 1946; Lid et al., 1994). Rozlišování, variabilita a evoluční historie skupiny v Evropě byla tedy poměrně nejasná a proto vznikla tato diplomová práce.

## 2 Literární rešerše

### 2.1 Členění rodu *Calamagrostis*

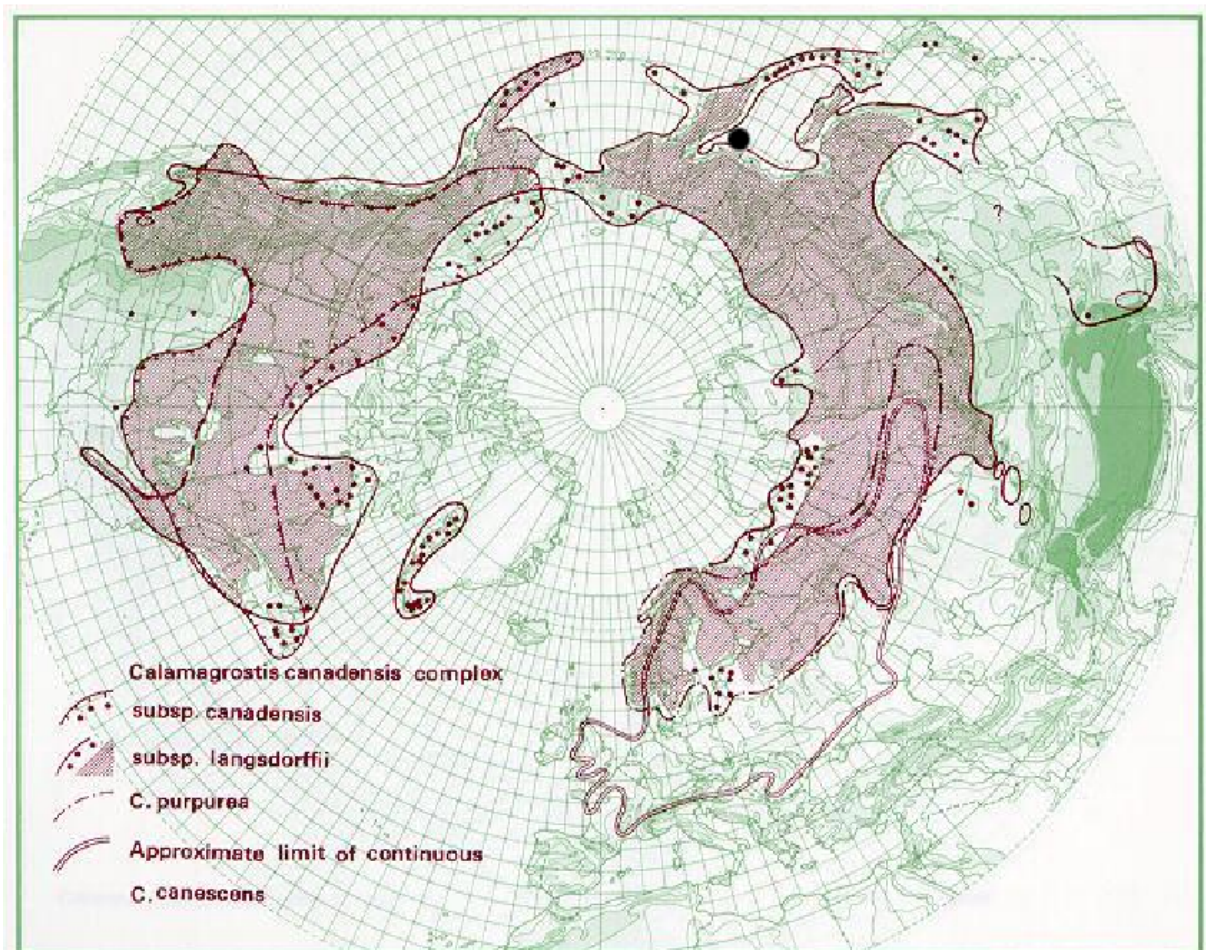
Již více než století se snaží různí botanici klasifikovat rod *Calamagrostis* Adans., který byl popsán už v roce 1763. V roce 1812 byl popsán rod *Deyeuxia* Clarion ex P. Beauv., který dnes někteří autoři považují za podrod *Calamagrostis*. Z těchto popisů vychází Torges (1898), který se věnoval německým zástupcům rodu *Calamagrostis* a rozdělil je do sekcí. Do sekce *Paragrostis* Torges zařazuje druh *C. tenella*, který se od dalších druhů významně odlišuje a v současnosti je řazen do rodu *Agrostis* (Torges, 1898). Zbylou část rodu *Calamagrostis* rozdělil na dvě sekce: *Quinquenerviae* (5-žilná spodní pleva a bazální osina) a *Trinerviae* (3-žilná spodní pleva). Do sekce *Trinerviae* zahrnuje druhy *C. littorea* (= *C. pseudophragmites*) a *C. epigejos* (Torges, 1898). Sekci *Quinquenerviae* dělí na základě trichomů v klásku, přítomnosti pastopečky a konzistence pluchy a osiny na podseky *Homoeotricha* a *Deyeuxia* (Torges, 1898). Do podseky *Homoeotricha* zařadil *C. lanceolata* (= *C. canescens*), *C. villosa* a *C. phragmitoides* (Torges, 1898). V podseky *Deyeuxia* Torges (1898) vymezil sérii *Orthoatherae*, kam zařadil druh *C. neglecta* (= *C. stricta*) s jemnou pluchou a rovnou osinou. Do série *Ankylatherae* v podseky *Deyeuxia* zařadil třtiny s výraznou kolénkatou osinou – *C. varia* a *C. arundinacea* (Torges, 1898).

Na práci Torgese navázal Roshevitz (1934) ve flóře Sovětského svazu a dále Wasiljew (1961), který přidal několik skupin a zahrnul některé příbuzné druhy rostoucí mimo území bývalého Sovětského svazu. Tzvelev (1965) se zabýval pouze druhy rodu *Calamagrostis*, které rostly na území bývalého Sovětského svazu a rozdělil je do třech sekcí: *Deyeuxia*, *Pseudophragmites* a *Calamagrostis*. Další autoři zpochybnili existenci sekce *Deyeuxia*, protože hlavní rozlišovací znak – přítomnost pastopečky – je příliš variabilní a není dostatečný na vymezení celé sekce (Conert, 1989). Jako další rozlišovací znaky mezi rody *Calamagrostis* a *Deyeuxia* jsou uváděny poměr délky pluchy a plev, odění kalusu a odění pastopečky (Phillips et Chen, 2003). Rodová problematika je však značně komplikovaná a vyžaduje revizi. Někteří autoři uznávají jako samostatný rod *Deyeuxia* a řadí do něj většinu druhů třtin, včetně např. *C. arundinacea* a *C. purpurea* (Lu et al., 2006). Podle těchto autorů však tvoří tyto rody společně s rodem *Agrostis* jeden komplex, ve kterém existují přechodné typy (Lu et al., 2006). Většina autorů však chápe rod *Calamagrostis* široce, avšak podle současných molekulárních studií se zdá, že v ne-

jiřším vymezení je rod výrazně polyfyletický. Samostatné postavení si zřejmě zaslouží zástupci vyskytující se v Jižní a Střední Americe (Saarela et al., 2010).

## 2.2 Agregát *Calamagrostis purpurea*

Jednou z kritických skupin rodu *Calamagrostis* je agregát *C. purpurea* (podle pojetí některých autorů komplex *C. canadensis*). Tento agregát má cirkumpolární rozšíření (Obr. 1). Předpokládá se, že z původního předka se v glaciálu díky izolaci diferencovaly 3 skupiny: *C. canadensis* v Severní Americe, *C. langsdorffii* v sibiřské části Asie a *C. purpurea* od střední Evropy přes Skandinávii až po sibiřskou část Asie (Hultén, 1986). Podle Nygrena (1946) a později i Scholze (1971) byl předkem celé této skupiny druh *C. canescens*, u kterého předpokládají cirkumpolární rozšíření v třetihorách a v důsledku izolace diferenciaci v raných čtvrtohorách na výše zmíněné druhy.



Obr. 1: Rozšíření komplexu *C. canadensis-langsdorffii-purpurea* (Hultén & Fries, 1986).

*C. canadensis* (Michx.) Beauv. byla popsána roku 1803 z Kanady. Roste v Severní Americe a v Japonsku. Charakteristická je relativně dlouhými a širokými listy, 3-6 nody na zřídka větveném stéble, dlouhými robustními klásky a jemnou osinou na blanité pluše

(Mitchell, 1968). Roste na otevřených stanovištích i v podrostu smíšených boreálních lesů s *Picea glauca* a *Populus tremuloides* na vlhkém minerálním podloží (Mitchell, 1968). Po disturbancích rychle kolonizuje území a její pevné trsy brání nárůstu konkurence. Mitchell (1968) zjistil na Aljašce 3 ploidní úrovně: oktoploidní ( $2n=56$ ) a tetraploidní ( $2n=28$ ) jedince považoval za *C. langsdorfii*, hexaploidní jedince ( $2n=42$ ) za *C. canadensis*. Zjistil, že tetraploidi na Aljašce dominují. Naopak na japonském ostrově Hokkaido převažují kromě tetraploidů i oktoploidi ( $2n=56$ ) (Tateoka, 1974). Japonští tetraploidi jsou morfologicky podobní aljašským tetraploidům, což podle Tateoky (1974) může naznačovat kontinuální rozšíření podobných typů během spojení Asie se Severní Amerikou v době glaciálu. Tateoka (1974) našel na Hokkaido také několik hexaploidů ( $2n=42$ ), kteří se však morfologicky liší od severoamerické hexaploidní *C. canadensis*. Domnívá se proto, že se jedná o hybrida místního tetraploida s oktoploidem (Tateoka, 1974). Vymezení *C. canadensis* v komplexu *C. purpurea* není stále jasné. Druhy *C. canadensis* a *C. purpurea* jsou totiž morfologicky podobné a v literatuře nejsou uváděny jasné rozdíly.

*C. langsdorfii* (Link) Trin. je někdy považovaná za poddruh *C. purpurea* (Tzvelev, 1965), jindy za poddruh *C. canadensis* (Mitchell, 1968) a někteří autoři dokonce považují *C. langsdorfii* za synonymum k *C. purpurea* (Lu et al., 2006). *C. langsdorfii* byla popsána roku 1821 z Aleutských ostrovů (Link, 1895) a je uváděna ze sibiřské části Asie. Roste v přímořských oblastech, v bažinách, křovinách, na pořičních pískách, nebo v lesích (Tzvelev, 1965). Morfologicky je podobná *C. purpurea* a *C. canadensis*. Oproti *C. purpurea* je však *C. langsdorfii* mohutnější, má širší šedozelené listy (4–8 mm), řidší široce rozložené laty a delší klásky (3–6 mm dlouhé) s osinou vyrůstající ze středu pluchy. Podle Tzveleva (1965) se vyskytuje jako tetraploid ( $2n=28$ ), hexaploid ( $2n=42$ ) a oktoploid ( $2n=56$ ).

*C. purpurea* Trin. má jasně zelené, 3–6 mm široké listy, poměrně husté laty s nahlučenými klásky, které jsou 2,5–4,5 mm dlouhé (Tzvelev, 1965). Roste na rašeliništích, na rašelinných loukách, v křovinách, na pořičních píscích a štěrcích. Nygren (1946) uvádí u druhu *C. purpurea* variabilní počet chromozomů ( $2n=28, 56-91$ ). Tento druh byl popsán Triniem od Bajkalu (Trinius, 1821). Evropské rostliny agregátu *C. purpurea* bývají označovány jako *C. phragmitoides* (Krok et al., 2013; Conert, 1989). Tento taxon byl popsán v roce 1832 ze Skandinávie Hartmanem (Hartman, 1832). Je často uváděn pouze jako poddruh *C. purpurea* nebo s ním bývá dokonce zcela ztotožňován (Nygren, 1946; Lid et al., 1994; Webb, 2010).

## 2.3 Hypotézy vzniku *C. phragmitoides*

Existuje několik hypotéz vzniku *C. phragmitoides*. Předpokládá se, že morfologicky podobný druh *C. canescens* je jedním z možných rodičovských druhů *C. phragmitoides*. *C. canescens* ( $2n=28$ ) má poloviční ploidii oproti *C. phragmitoides* ( $2n=56$ ), jejich areály se překrývají a tyto druhy jsou si morfologickými znaky a ekologickými nároky podobné.

Nejčastěji se uvažuje o hybridizaci druhu *C. canescens* s dnes pouze asijským taxonem *C. langsdorffii* (Scholz, 1971).

Další hypotéza předpokládá hybridizaci *C. canescens* s druhem *C. epigejos* a nevyklučuje zapojení druhu *C. arundinacea* (Scholz, 1971). Scholz v roce 1964 nejprve stejně jako Tzvelev (1976) považuje za správnou hypotézu o hybridizaci *C. canescens* s *C. langsdorffii*, avšak později se na základě výsledků Nygrenových experimentů přiklání k druhé hypotéze (Scholz, 1971).

Schaabová (2013) zjistila, že všechny populace *C. phragmitoides* na území České republiky mají unikátní haplotyp chloroplastové DNA odlišný od haplotypů střeoevropských populací druhů *C. canescens* a *C. epigejos*. Střeoevropské populace *C. canescens* ani *C. epigejos* tedy nelze považovat za potenciální mateřské rostliny druhu *C. phragmitoides* (Schaabová, 2013).

## 2.4 *C. canescens*

*C. canescens* (Weber) Roth je větvená výběžkatá třtina s cca 6 kolénky (Schaabová, 2013). Má sivě zelené, za sucha svinuté listy (cca 5 mm široké), jazýčky o délce 1–8 mm má vně řídké kratičce štětinkaté nebo téměř lysé, dále má spíše staženou, chudší latu (okolo 17 cm dlouhou) s kvítky obsahujícími pyl a pluchy s nenápadnou, krátkou jemnou osinou v koncovém výkroji (Conert, 1989; Grulich, 2002; Schaabová, 2013).

*C. canescens* roste v polostínu na lesních prameništích, v bažinných olšínách, na slatinových a rašelinných loukách, v mokřích příkopech, na krajích cest, březích rybníků a v rákosinách (Conert, 1989). Preferuje středně živinami i bázemi bohatá, neutrálně až slabě kyselá místa, která jsou sezónně zaplavovaná (Conert, 1989). Tato třtina se vyskytuje od nížin do hor (např. Kladská – ca 815 m n. m.). V Evropě je druh hojně rozšířen s výjimkou Iberského poloostrova (kromě několika málo lokalit v severním Španělsku), Islandu a Irsku. Vyskytuje se běžně ve Velké Británii, Francii, Dánsku, jižním Norsku, Švédsku, Finsku, v Pobaltí, dále v Holandsku, Belgii, Německu, Polsku, Švýcarsku, Rakousku, v České a Slovenské republice, v Itálii, na severu bývalé Jugoslávie, v Maďarsku, Rumunsku a na Ukrajině (Conert, 1989). Areál *C. canescens* pokračuje přes pohoří Kavkaz, Turecko, pohoří Ural, poostrov Kola, Karelii a je udáván i ze Sibiře. Podle Conerta (1989) roste *C. canescens* na západě Sibiře víceméně ve všech regionech, ve východní Sibiři roste pouze v oblasti Sajanského pohoří u řeky Angary (u Bajkalu).

*C. canescens* bývá často zaměňována s morfologicky podobným druhem *C. phragmitoides*, zejména kvůli habituální podobnosti (např. větvení stébla). Oba druhy se také vyskytují na podobných biotopech.

## 2.5 Morfologie *C. phragmitoides*

*C. phragmitoides* je výběžkatá tráva s větvenými stébly, která má 5–8 kolének a šedo-zelené listy s kratičce chlupatými, 6–10 mm dlouhými jazýčky (Grulich, 2002). Laty jsou až 30 cm dlouhé, bohaté, rozkladité a jednotlivé kvítky jsou bez pylu (Grulich, 2002). Úzce kopinaté klásky mají téměř stejně dlouhé, kopinaté plevy, krátkou pastopečku a 5–žilnou blanitou pluchu, z jejíž horní třetiny vyrůstá šikmo odstálá osina (Conert, 1989; Štech, in prep.).

Morfologickými znaky *C. phragmitoides* se důkladněji zabývala Schaabová (2013), hledala vhodné morfologické znaky pro rozlišení habituelně podobných druhů *C. phragmitoides* a *C. canescens*. Ve své bakalářské práci Schaabová (2013) ověřila, že *C. phragmitoides* vytváří oproti *C. canescens* celkově mohutnější rostliny a nejvíce se liší v délce jazýčků, délce listů a délce laty. Většina znaků je korelována s délkou jazýčku nejvyššího listu (Schaabová, 2013). Druh *C. phragmitoides* se o 20 % méně větví než *C. canescens*. Dále zjistila, že často udávaný rozdíl v počtu kolének není spolehlivý a že středoevropské populace *C. phragmitoides* se od *C. canescens* liší v chlupatosti čepele listu a zbarvení stébla (Schaabová, 2013).

## 2.6 Rozšíření *C. phragmitoides*

*C. phragmitoides* byla popsána z Laponska C. J. Hartmanem (Hartman, 1832) a je hojně rozšířená po celé střední a severní Skandinávii (v Norsku, Švédsku a západním Finsku). První zmínka o výskytu *C. phragmitoides* ve střední Evropě je již z roku 1883, a to z německého pohoří Hoher Meißner v Hesensku (Haeckel, 1883). Postupně byly objevovány další německé lokality a to kromě Hesenska (na hoře Mathes-Berg, na vrchovišti Rotes Moor, u obce Willingen, v okrese Waldeck, nebo na Waldecker Upland), také na pomezí Hesenska-Durynska (v pohoří Hohe Rhön), v jihovýchodním Durynsku (Schleizer Wald), v Sasku (okres Plauen u Mißlareuth), v Bavorsku (blízko měst Roth a Ginolfs, na Lindenberg Moos), nebo v Bádensku-Württembersku (u Ellbachsee v severním Schwarzwaldu a také v jižním Schwarzwaldu) (Conert, 1989).

Po roce 1971 byly kromě Německa postupně objeveny nové lokality také ve východní Belgii (u Malmedy na bažinách Hohes Venn, nebo v údolí řeky Warche), ve východní Francii (na hoře Ballon d'Alsace v pohoří Vogézy) a v severovýchodním Švýcarsku (blízko obce Sennwald v kantonu St. Gallen) (Conert, 1989). V roce 2015 našel tuto třtinu P. Koutecký v Nízkých Tatrách, což je první nález na Slovensku.

Kromě střední Evropy byla *C. phragmitoides* objevena také v Pobaltí, v Karelii, na poloostrově Kola, na horním toku Dněpru nebo na Velkém Kavkazu (Conert, 1989).

## 2.7 Rozšíření *C. phragmitoides* v České republice

*C. phragmitoides* byla v České republice objevena v roce 1974 M. Smejkalem na jižním okraji rybníka Pařez na Českomoravské vrchovině (Smejkal, 1976). Později lokalit *C. phragmitoides* v tomto regionu přibýlo – např. Hojkovské rašeliniště jižně od obce Hojkov u Jihlavy (Růžička, 1985; Růžička, 1987) nebo rybník Jezírko východně od Třeště a okraj lesní cesty u Otína nedaleko Pavlova (Růžička, 2005).

Postupně přibývaly další nálezy i z jiných částí České republiky: z Nížkého Jeseníku (Bednář et al., 1991), Šumavy (Řepka et Lustyk, 1997), Broumovska (Řepka et al., 1998), Krušných hor (Ondráček, 2011). V roce 2013 byl potvrzen výskyt na lokalitě Hersica v okrese Blansko, který byl nalezen již v roce 1996 (leg. K. Sutorý, BRNM). V roce 2011 našel V. Faltys (ústní sdělení) druh u Štítů na Šumpersku, kde byla zjištěna odlišná ploidie od ostatních českých populací (Schaabová, 2013). Recentně byl druh nalezen i v Podkrkonoší (2013, leg. P. Koutecký).

Druh *C. phragmitoides* byl tedy zjevně dosud přehlížen. Vzhledem k jeho ekologickým nárokům není možné, aby se teprve nedávno na své lokality rozšířil. Na základě nových nálezů byl druh zařazen v novém vydání Červeného seznamu ohrožených druhů České republiky do kategorie C2b – silně ohrožený druh (Grulich, 2012) namísto kategorie C1 – kriticky ohrožený druh, kam byl zařazen ve verzi předchozí (Procházka et al., 2001). Na druhou stranu z některých lokalit byl druh udáván mylně z důvodu záměny *C. phragmitoides* s *C. canescens*. Jedná se například o některé lokality z Předšumaví, Táborska, Českobudějovicka, ale i z Českomoravské vrchoviny (Radlice severozápadně od Dačic) (Schaabová, 2013).

## 2.8 Ekologie *C. phragmitoides*

*C. phragmitoides* roste v polostínu primárně na lesních prameništích, ale také v mokřích příkopech, na krajích cest, březích rybníků, rákosinách, na vlhkých loukách, v bažinných olšinách a mokřadech (Conert, 1989). Preferuje mírně živinami i bázemi bohatá až slabě kyselá místa (Conert, 1989). Většina střeoevropských lokalit tohoto druhu leží v nadmořských výškách mezi 440–950 m, což již uvádí Smejkal (1976). *C. phragmitoides* však může výjimečně růst i v nadmořské výšce okolo 1000 m, např. ve Schwarzwaldu (Conert, 1989), nebo v Nízkých Tatrách na hoře Ďumbier – 1570 m (2015, leg. Koutecký).

## 2.9 Apomixie

Apomixie je způsob rozmnožování pomocí asexuálně vzniklých semen (Ozias-Akins, 2006; Strasburger et al., 2002). U apomiktických druhů chybí redukce chromozomů v meioze při embryonálním vývoji a protože nedochází ke splnutí dvou různých gamet (jako



u sexuálního rozmnožování), vzniká dceřiná rostlina geneticky identická s rostlinou mateřskou (Ozias-Akins, 2006; Strasburger et al., 2002; van Dijk et Vijverberg, 2005). Apomixie je vlastně narušení sexuálního procesu podporované genovou expresí (Ozias-Akins, 2006). Tento způsob rozmnožování může být pro rostliny výhodným, protože udržuje výhodné genetické vlastnosti vhodné do konkrétních podmínek prostředí (Ozias-Akins, 2006). Apomixie je naopak nevýhodná z důvodu snížení schopnosti rostlin reagovat na změny prostředí, dále kvůli chybějící genetické variabilitě a z toho plynoucí potenciální degeneraci kvůli nahromadění škodlivých mutací (Ozias-Akins, 2006; van Dijk et Vijverberg, 2005). Předpokládá se, že apomixie je kontrolována geneticky a epigeneticky. Geny zodpovědné za apomixii mohou být přeneseny do nových klonů hybridizací sexuálními druhy s apomikty jako pylovými donory a tím je zabráněno potenciálnímu zániku apomiktických druhů (van Dijk et Vijverberg, 2005).

Apomixie se dělí na sporofytickou – embryo vzniká z nucellu nebo integumentů vajíčka (adventivní embryonie) a gametofytickou (apomeiotickou) – vaječná buňka neprojde meiózou nebo meiózu nedokončí (Ozias-Akins, 2006). Gametofytická apomixie se dále dělí na aposporii (ze zárodečného vaku vajíčka vzniká neredukovaný samičí gametofyt a nedochází k redukčnímu dělení v meióze) a diplosporii (embryo vzniká z mateřské buňky megaspory a pak opět nedochází k redukčnímu dělení v meióze) (Ozias-Akins, 2006).

Zatímco o apomixii u některých skupin je známo hodně – např. *Taraxacum* (Vašut et al., 2015), nebo *Hieracium* a *Pilosella* (Hand et al., 2015), trávy nejsou tolik studované.

## 2.10 Apomixie v rodu *Calamagrostis*

Rod *Calamagrostis* obsahuje několik apomiktických druhů, např. *C. lapponica*, *C. chalybea*, nebo skandinávská *C. phragmitoides* (dle Nygrenova pojetí *C. purpurea*), pro který je udávána diplosporická apomixie typu *Antennaria* (Nygren, 1951). Při mitotické diplosporii embryo vzniká z mateřské buňky megaspory, která prochází pouze mitózou (Ozias-Akins, 2006). V případě diplosporie typu *Antennaria* se mateřská buňka megaspory místo meiózy třikrát mitoticky rozdělí za vzniku osmijaderného neredukovaného (diploidního) zárodečného vaku (Singh, 2002). Mitotické dělení v mateřských buňkách zárodečného vaku (tedy diplosporii) pozoroval A. Nygren již ve 40. letech, kdy se začal zabývat křížením, rozmnožováním, morfologií a počtem chromozomů různých druhů rodu *Calamagrostis* (Nygren, 1946). Zjistil, že apomiktické druhy tohoto rodu rostou především v arktických a subarktických oblastech severní polokoule a že ne všechny druhy jsou obligátně apomiktické (Nygren, 1951). Kupříkladu u skandinávské *C. phragmitoides* (v jeho pojetí *C. purpurea*) vzácně pozoroval vznik funkčního pylu v kláscích, který úspěšně použil v hybridizačních experimentech (Nygren, 1949). Domníval se, že rod *Calamagrostis* vhodně využívá kombinace apomixie a amfimixie ke vzniku výhodné kombinace genů, která je následně díky

apomixii předávána po další generace (Nygren, 1951).

U severoamerických druhů rodu *Calamagrostis* je způsob rozmnožování v některých případech poměrně komplikovaný. A. Nygren tam pozoroval různé zvláštnosti, např. že druh *C. perplexa* (blízce příbuzný sexuálnímu druhu *C. porteri*, nepříbuzný *C. canadensis*) má silně narušený proces meiózy a vznikají u něj pylová plasmodia typická pro apomikty (Nygren, 1958). Největší zvláštností, kterou Nygren objevil, byla přítomnost sexuálních i apomiktických zárodečných vaků u druhů *C. inexpansa* a *C. crassiglumis* (Nygren, 1958). U druhu *C. crassiglumis* ( $2n=104$ ) navíc probíhala meióza pravidelněji než u polyploida očekával. Zároveň měl tento druh velké množství morfologicky dobrého pylu (Nygren, 1958).

## 2.11 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní metoda, která využívá optických vlastností částic ozářených světlem. Suspenze částic je obarvena fluorescenčními barvivy a po ozáření světlem o příslušné vlnové délce je zaznamenána fluorescence.

První publikovaná informace o průtokové cytometrii je z roku 1934, kdy A. Moldovan zmiňuje novou foto-elektrickou metodu na počítání buněk (Moldovan, 1934). Většího uplatnění se průtoková cytometrie dočkala v pozdějších letech, kdy bylo díky různým vylepšením možné zjišťovat velikost a kvalitu buněk, nebo buňky třídít na základě jejich fluorescence (Doležel et al., 2007b). Průtoková cytometrie má využití zejména v medicíně (při vyšetřování vzorků krve, třídění rakovinových buněk od zdravých apod.), dále také v mikrobiologii, parazitologii, biochemii, nebo v botanice (Doležel et al., 2007b).

V botanice se k barvení jader buněk používá barvivo DAPI (4',6-diamino-2-fenylindol dihydrochlorid), které se specificky váže na AT baze, nebo interkalační PI (propidium jodid). Na základě poměru fluorescence vzorku o známé velikosti genomu lze určit velikost genomu a ploidii vzorku (Doležel et al., 2007a).

Vzhledem k potenciální variabilitě v počtu chromozomů i ploidii je průtoková cytometrie pro studium rodu *Calamagrostis* velmi vhodnou metodou. Poprvé byla využita v roce 2013, kdy Schaabová (2013) zjišťovala u druhů *C. phragmitoides* a *C. canescens* ploidii, relativní velikost genomu a variabilitu ve velikosti genomu obou druhů. Bylo zjištěno, že většina českých populací *C. phragmitoides* odpovídá oktoploidní úrovni ( $2n=56$ ) a má stejnou velikost genomu (Schaabová, 2013). Výjimečnou populací na území České republiky je populace Štítý nedaleko Šumperka, která odpovídá dekaploidní úrovni ( $2n=10x$ ) (Schaabová, 2013). Cytometrickou analýzou Schaabová (2013) potvrdila tetraploidní úroveň všech zkoumaných populací *C. canescens* ( $2n=28$ ). U tohoto druhu byla zjištěna mezipopulační variabilita ve velikosti genomu až 17 % (Schaabová, 2013).

## 2.12 Analýza izozymů

Isozymy byly objeveny v roce 1957 (Hunter et Markert, 1957). Jsou to různé varianty enzymů se stejnou nebo podobnou funkcí v určitém jedinci, které mají stejnou katalytickou aktivitu (Soltis et Soltis, 1990; Acquaah et Dudley, 1992). Isozymy se mohou skládat z několika jednotek (polypeptidických řetězců) a podle toho rozeznáváme monomery, dimery a vyšší struktury (Acquaah et Dudley, 1992). Jednotlivé formy izozymů se liší elektroforetickou mobilitou. Toho lze využít při jejich separaci v určitých typech médií. V minulosti se používaly škrobové nebo agarózové gely, v současnosti se používá polyakrylamidový gel (Acquaah et Dudley, 1992).

K detekci jednotlivých allozymů se využívá jejich katalytické reakce s různými barvivy, přičemž v místě aktivity enzymu vzniká barevná zóna (Acquaah et Dudley, 1992; Soltis et Soltis, 1990). Při pozitivní reakci vzniká nerozpustný barevný produkt na rozpustném bezbarvém substrátu, zatímco při negativní reakci vzniká bezbarvý produkt na barevném substrátu. Při spřažené reakci je přeměna bezbarvého substrátu a produktu spojena s dalšími reakcemi (oxidace/redukce), jejichž projev lze detekovat (např. systém ADH).

Z výsledného zymogramu (sada proužků na gelu) lze odečíst počet a relativní mobilitu různých enzymů (Soltis et Soltis, 1990). Na základě přítomných izozymů lze také usuzovat kombinaci alel v lokusu. Isozymy jsou kodominantní marker, takže u heterozygotů vidíme i recesivní alely (Acquaah et Dudley, 1992). Určitá kombinace alel ve všech lokusech nám definuje genotypy a na základě jejich zastoupení lze porovnávat jednotlivé populace, nebo druhy.

Isozymová analýza je v posledních letech zastíněna modernějšími molekulárními technikami, které jsou sice jednodušší, ale také dražší. Mezi nevýhody izozymové analýzy patří nutnost čerstvého materiálu nebo časová náročnost. Isozymová analýza se používá především v populační biologii při zkoumání rozsahu vnitropopulační a mezipopulační genetické variability (Krzakowa et Celka, 2008; Petit et al., 2015), lze ji také použít k identifikaci nižších taxonů (Kadereit, 1995; Sonnante et al., 1997), identifikaci jejich klonů (MacDonals et Lieffers, 1991), ke studiu hybridizace na podrodové úrovni (Stecconi, 2004; Krzakowa et Dunajski, 2007), nebo variability v rámci rodu (Thebaud et Abbott, 1995).

Isozymová analýza byla v rodě *Calamagrostis* použita v roce 1991, kdy MacDonald a Lieffers pomocí 10 enzymatických systémů zjišťovali, zda mají severoamerické populace *C. canadensis* rozdílnou genetickou variabilitu nebo frekvenci alel v různých sukcesních stádiích. Zajímalo je také, jakým způsobem tento druh kolonizuje nová území a jakým způsobem se rozmnožuje. Zjistili, že *C. canadensis* se na raně sukcesních stanovištích rozmnožuje pohlavně a šíří se semeny na další stanoviště, kde už se rozmnožuje převážně nepohlavně (MacDonals et Lieffers, 1991). Mezipopulační variabilita byla nízká.

M. Krzakowa s A. Dunajskim (2007) pomocí izozymů ověřovali potenciální hybridizaci *C. arundinacea* s *C. villosa* v anemo-orografickém systému v údolí polských Krkonoš. Za pomoci šesti lokusů peroxidázy odhalili údajný transfer genů z *C. arundinacea* do *C. vil-*

*losa* (Krzakowa et Dunajski, 2007).

M. Krzakowa a Z. Celka (2007) studovali pomocí 11 izozymových systémů vnitropopulační variabilitu jedné populace *C. arundinacea*. Každá z 30-ti zkoumaných rostlin vykazovala určité individuální rozdíly v 16 lokusech, avšak populace jako celek se udržovala v Hardy-Weinbergově rovnováze (Krzakowa et Celka, 2007). Později byla tato studie rozšířena na 25 populací *C. arundinacea* z různých regionů Polska (Krzakowa et Celka, 2008). Analýzou peroxidázových lokusů (11 allozymů) autoři zjistili, že všechny populace byly polymorfické a v Hardyho-Weinbergově rovnováze (Krzakowa et Celka, 2008).

Další studium rodu *Calamagrostis* pomocí izozymové analýzy by mohlo odhalit rozdíly ve vnitropopulační a mezipopulační variabilitě u *C. phragmitoides* a *C. canescens* vzhledem k předpokládaným rozdílům v reprodukčních systémech obou druhů (apomixie vs. sexualita). U apomiktické *C. phragmitoides* může navíc být rozdíl ve variabilitě mezi populacemi dvou různých ploidních úrovní (oktoploidní a dekaploidní).

## 3 Cíle práce

1. Stanovit ploidní úroveň u všech v ČR známých populací *C. phragmitoides*, u několika populací i velikost genomu. Srovnat morfologické charakteristiky populací s odlišnou ploidní úrovní.
2. Srovnat vybrané středoevropské rostliny s rostlinami ze Skandinávie a ze Sibiře, odkud byly *C. phragmitoides* a *C. purpurea* popsány. Zahrnout do analýz i potenciální rodičovské druhy – *C. langsdorfii*, *C. canescens* a *C. epigejos*.
  - a. Stanovit ploidní úroveň, případně velikost genomu skandinávských a sibiřských rostlin.
  - b. Srovnat vybrané nekódující úseky chloroplastové DNA a v případě úspěchu i ITS jaderné DNA.
3. Na základě analýzy izozymů porovnat populační strukturu populací *C. phragmitoides* a *C. canescens*.

# 4 Materiál a metody

## 4.1 Průtoková cytometrie

Metodou průtokové cytometrie byla stanovena relativní velikost genomu rostlin ze 36 populací *C. purpurea* agg. a 33 populací *C. canescens* (Příloha I a II). Byly měřeny směsné vzorky po 5-ti až 10-ti rostlinách. Zároveň byla stanovena velikost genomu v piko-gramech DNA u 24 jedinců z 10 populací *C. purpurea* agg. a 24 jedinců z 9 populací *C. canescens*. Jako interní standard byl použit hrách (*Pisum sativum* „Ctirad“) o velikosti genomu  $2C = 9,09$  pg (Doležel et al., 1998), získaný z Laboratoře experimentální botaniky AVČR v Olomouci.

Barvení bylo provedeno upravenou metodou Otto (Otto, 1990; Doležel et al., 2007a). Vzorek s interním standardem byl rozsekán žiletkou ve 400  $\mu$ l vychlazeného Otto I na jemné kousky. Standardu bylo asi o čtvrtinu méně než vzorku. Suspenze byla několikrát promíchána pipetou a přefiltrována přes 42  $\mu$ l filtr (textilie Uhelon 130T) do označené zkumavky. Opticky byla zkontrolována absence nečistot. Potom bylo do vzorku přidáno 800  $\mu$ l barvicího roztoku Otto II s 2-merkapt ethanolu a AT-specifickým barvivem DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Při barvení interkalačním barvivem propidium jodid (PI) se postupovalo stejně – ke vzorku se přidalo 800  $\mu$ l roztoku Otto II, 2-merkapt ethanolu, PI a RNasy IIa, která zabraňuje navázání propidia na RNA (zkomplikovalo by to analýzu). Vzorek byl poté pro stanovení relativní velikosti genomu pomocí DAPI vložen do cytometru Partec PA II (Partec GmbH., Münster, Germany) s rtuťovou výbojkou, který byl nastaven tak, aby standard byl na kanálu 200 na 1024-kanálové škále a zaznamenávalo se 3000 částic. Měření velikost genomu pomocí PI byla provedena na přístroji Partec CyFlow SL se zeleným laserem (532 nm) na 5000 jader.

Získaná data byla zpracována v programu FlowJo 10 (TreeStar, 2015), FlowMax 2.6 (Partec GmbH, 2007) a STATISTICA 12 (StatSoft, 2015). Byly zjištěny průměrné hodnoty fluorescence pro *C. canescens* a *C. purpurea* agg., průměrné hodnoty fluorescence pro standard a průměr CV hodnot (koeficientů variance) pro fluorescenční píky vzorků i standardů. Ze zjištěných hodnot byl vypočítán poměr Sample/Standard. Z dat byly vyloučeny vzorky s hodnotami  $CV > 3$  pro měření na DAPI a s  $CV > 4$  pro měření PI. Z těchto poměrů byl vypočten průměr (Poměr průměr) a určena minimální a maximální hodnota (Poměr min, Poměr max). Následně byla spočítána vnitropopulační, mezipopu-

lační variabilita a celková variabilita pro každou ploidii *C. purpurea* agg. a *C. canescens* podle vzorce 4.1.

$$\text{Variabilita [\%]} = \frac{\text{Poměr}_{max} - \text{Poměr}_{min}}{\text{Poměr}_{mean}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

Zjištěná variabilita poměru vzorek/standard na DAPI u jednotlivých ploidních úrovní z různých regionů byla vynesena do grafu (Box and Whiskers) v programu STATISTIKA 12 (StatSoft, 2015), kde byl rovněž spočítán t-test pro porovnání shodných ploidních úrovní z různých regionů. Z měření na PI byla také spočítána velikost genomu pro každou změřenou ploidii *C. purpurea* agg. a *C. canescens*. Z velikosti genomu byla spočítána Cx-hodnota (velikost chromozomové sádky) každého druhu (Greilhuber, 2005).

Dále byl 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:

$$DF_{Sample} = \frac{\text{Sample/reference ratio with DAPI}}{\text{Sample/reference ratio with PI}} \quad (4.2)$$

## 4.2 Morfologická analýza

Bylo sebráno 10 celých rostlin (s částí kořenů) z každé ze dvou nových populací *C. phragmitoides* v České republice – z oktoploidní populace Borovnice a dekaploidní populace Štítý. Dále bylo sebráno 10 rostlin tetraploidní *C. canescens* z populací rostoucích ve stejných regionech. Dokladové položky ke studovaným populacím jsou uloženy v herbáři PřF JU (CBFS).

U sebraných rostlin (Příloha I a II) bylo počítáno a měřeno 13 znaků považovaných za taxonomicky významné (Tab. 1) Tyto znaky byly úspěšně použity na rozlišení druhů *C. phragmitoides* a *C. canescens* už v bakalářské práci (Schaabová, 2013). Rozměry byly zjišťovány pravítkem s přesností 1 mm.

Z hodnot byl vypočítán poměr délky k šířce dvou nejhořejších listů (D/SLIST\_1 a D/SLIST\_2). U znaků CHLUP, CERV a VETV byl spočítán počet rostlin, které odpovídaly jednotlivých typům znaku (např. kolik rostlin mělo chlupy „kratke“). Znaky délka obou jazýčků (JAZ1 a JAZ2) a šířka listů (SLIST\_1 a SLIST\_2) byly transformovány dekadickým logaritmem, aby se jejich rozložení přiblížilo normálnímu.

Naměřené hodnoty 4 nových populací byly přidány k datům naměřených znaků z předchozí práce, kdy bylo změřeno 222 rostlin ze 14 populací *C. canescens* a 150 rostlin z 12 populací *C. phragmitoides* (Schaabová, 2013). Celkem tedy bylo hodnoceno 242 ros-

tlin z 16 populací *C. canescens*, 170 rostlin ze 14 populací *C. phragmitoides*.

Výsledky byly následně zpracovány v programu CANOCO 5.0 (Braak et Šmilauer, 2012) analýzou hlavních komponent (PCA). Lineární diskriminační analýza (LDA) s forward selection byla použita pro hledání znaků významných pro odlišení druhů *C. phragmitoides* a *C. canescens* a pro odlišení různých ploidních úrovní druhu *C. phragmitoides*. Do lineární diskriminační analýzy nebyly použity poměry délka/šířka listu 1 a listu 2, protože tento znak se ukázal jako nevýznamný.

Tab. 1: Měřené morfologické znaky.

Zkratka znaku	Znaky
KOL	Počet kolének od báze po latu
LATA	Délka laty od nejspodnější větve po horní klásek (mm)
KVET_D	Délka nejdelší nejdelší větve na bázi laty (mm)
KVET_U	Délka nejdelší větve vyrůstající pod středem laty, vyplňující její prostor v polovině (mm)
DLIST_1	Délka čepele nejhořejšího listu (mm)
SLIST_1	Maximální šířka čepele nejhořejšího listu (mm)
DLIST_2	Délka čepele druhého nejhořejšího listu (mm)
SLIST_2	Maximální šířka čepele druhého nejhořejšího listu (mm)
JAZ1	Délka jazýčku nejhořejšího listu (mm)
JAZ2	Délka jazýčku druhého nejhořejšího listu (mm)
CHLUP	Odění čepele listů (Kratke = čepel listu bez dlouhých trichomů pouze s kratičkými štětinkami, ridke = řídké dlouhé chlupy, huste = husté dlouhé chlupy)
ČERV	Zbarvení stébela (Žádné = zbarvení stébela bez červené barvy, malo = málo intenzivní červené zbarvení – na nodech nebo u kořenů, hodne = červené stéblo)
VETV	Větvení stébela, 0 = stéblo se nevětví, 1 = stéblo se větví

## 4.3 Isozymová analýza

### 4.3.1 Testování

Za účelem optimalizace metody byly vybrány dvě populace *C. phragmitoides* a dvě populace *C. canescens*. Z každé populace byly vykopáno 15 rostlin vzdálených od sebe přibližně 10 m. Rostliny byly odebírány na podzim a pěstovány ve skleníku PřF JU v Českých Budějovicích s cílem získat vhodné listy pro izolaci isoenzymů. Za účelem výběru vhodných enzymatických systémů byly z každé populace izolovány 3 rostliny. K izolaci byl testován pufr „Luzula”, který se osvědčil.



Extrakční pufr „Luzula“ (dle návodu izozymové laboratoře BÚ AVČR, Průhonice):

Množství jednotlivých složek odpovídá 100 ml pufru.

Tris base .....	0.91 g
ascorbic acid .....	50 mg
1,4-Dithioerythritol (DTE) .....	120 mg
<i>úprava na pH = 7,5 pomocí H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></i>	
2-mercaptoethanol .....	100 µl
PVP .....	4 g

Na izolovaných extraktech bylo testováno 15 enzymatických systémů (postup viz níže podkapitoly Elektroforéza a Histochemické barvení): 6-PGDH, AAT, ADH, DIA, EST, G-6-PDH, IDH, LAP, MDH, NADHDH, PGI, PGM, PRX, SKDH, SOD. Některé z těchto enzymatických systémů byly na rod *Calamagrostis* úspěšně použity v minulosti: 6-PGDH, AAT, ADH, DIA, MDH, PGI, PGM, PRX, SKDH (Krzakowa et Dunajski, 2007; Krzakowa et Celka, 2007; Krzakowa et Celka, 2008; MacDonals et Lieffers, 1991). Z testovaných 15 systémů byly vybrány 4 nejvariabilnější systémy (6-PGDH, AAT, ADH a DIA), které byly použity na analýzu dalších vzorků. Odběr vzorků z rostlin pěstovaných ve skleníku se příliš neosvědčil (hynutí rostlin, přerůstání dalšími druhy trav a ostřic a následná obtížná determinace mladých výhonů trav). V následující sezóně byly proto rostliny odebírány přímo v terénu.

### 4.3.2 Odběr vzorků

Ze známých českých populací *C. phragmitoides* bylo vybráno pět větších populací z různých regionů (Krušnohorské podhůří, Českomoravská vrchovina, Šumpersko, Podkrkonoší a Předšumaví) a ke každé této populaci byla do dvojice vybrána větší populace *C. canescens* v blízkém okolí. Navíc byla vybraná ještě jedna velká populace *C. canescens* z Českolipska, kde je tento druh hojně rozšířen. V těchto 11 populacích (Příloha I a II) byl z deseti rostlin vzdálených přibližně 10 metrů odebrán nejhořejší zdravý list do vlhkého ubrousku. List byl uložen do vlhkého ubrousku, uzavřen do plastového sáčku a vložen do termosky s ledem.

### 4.3.3 Izolace

Následující den po sběru byly ze sebraných listů izolovány extrakty. Listy byly homogenizovány tlučkem ve vychlazené třecí misce v 500 µl vychlazeného izolačního pufru „Luzula“ (viz návod na přípravu výše) a špetkou Dowex-Cl. Homogenát byl přepipetován (špičkou s ustřiženým koncem) do 1,5 ml eppendorfky a centrifugován 10 min při 13800 rpm v centrifuze vychlazené na 4°C. Výsledný supernatant byl rozpipetován po 90 µl do dvou až tří 0,5 ml eppendorfek a vzorky byly uschovány v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

### 4.3.4 Elektroforéza

Pro elektroforézu byla použita aparatura Hoefler 600SE, na které byly používány 4 vertikální gely s 28 jamkami. Diskontinuální akrylamidové gely (spodní 8,16% separační a horní 4% zaostřovací – koncentrační gel) byly připraveny den předcházející analýze v odpoledních hodinách a zatuhlé s jamkami zaplněnými elektrodoým pufrem (Tris-glycine) a zakryté alobalem byly uloženy do lednice.

#### Složení separačního gelu:

Množství jsou uváděna na 4 gely (1 elektroforézu).

1,82 M Tris-HCl, pH = 8,9 .....	27 ml
Zásobní roztok Akrylamid + BIS .....	19 ml
Destilovaná voda .....	46 ml
10% APS .....	430 $\mu$ l
10% TEMED .....	430 $\mu$ l

#### Složení koncentračního gelu:

Množství jsou uváděna na 4 gely (1 elektroforézu).

69 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 6,9 .....	18 ml
Zásobní roztok Akrylamid + BIS .....	2 ml
10% APS .....	120 $\mu$ l
10% TEMED .....	120 $\mu$ l

Následně byla připravena aparatura na následující den: spodní vana elektroforézy byla naplněna 2,4 l elektrodoého pufru a 1,8 l destilované vody a umístěna do větší plastové nádoby do lednice pro elektroforézu. Plastová nádoba byla postavena na magnetickou míchačku míchadlo a do vany bylo dáno míchadlo. Dále byl do vany zasunut skleněný výměník tepla. Aparatura byla chlazená v lednici přes noc při vypnutém do-datečném chlazení.

Další den bylo zapnuto vnější chlazení aparatury a magnetické míchadlo. Aparatura elektroforézy byla obsypána ledem. Mikrostríkačkou („Hamiltonkou“) bylo na gel nanášeno vždy 5  $\mu$ l vzorku. Mikrostríkačka byla mezi vzorky proplachována destilovanou vodou. Skla s gely byla připevněna na horní vanu elektroforézy a vložena do spodní vany tak, aby výměník tepla zůstal mezi gely. Do horní vany byl nalit elektrodoý pufr, vana byla zakryta víkem a elektroforéza byla zapnuta na 4,5 – 5,5 hod na 90 mA (dokud zbarvené čelo elektroforézy nedosáhlo 0,5 – 1 cm od spodního okraje). Po skončení elektroforézy byly gely vyjmuty ze skel aparatury. Koncentrační gel byl odříznut a pro správnou orientaci vzorků na gelu byl šikmo oříznut pravý spodní roh gelu. Gely byly přemístěny do misek s destilovanou vodou, kde byly krátce oplachovány.

### 4.3.5 Histochemické barvení

Do kádinek obalených alobalem byly na analytických vahách naváženy látky podle receptů pro jednotlivé enzymové systémy (6-PGDH, AAT, ADH a DIA). Byly odměřeny příslušné objemy pufrů s daným pH, které tyto enzymové systémy potřebují. Těsně před barvením byla vylita voda z misky s daným gelem. Miska s gelem byla přenesena do temné místnosti, kde byly za tmy smíchány látky v kádince s pufrem pro daný enzymový systém a důkladně rozmíchaný roztok byl vylit na gel do misky.

#### 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH = PGD) E.C. 1.1.1.44

6-phosphogluconic acid ..... 10 mg

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O ..... 30 mg

NADP<sup>+</sup> ..... 5 mg

MTT ..... 5 mg

PMS ..... 1 mg

Barvicí roztok byl připraven za tmy a hned nalit do misky s gelem.

#### Aspartate aminotransferase (AAT) E.C. 2.6.1.1

*Roztok A:*

0,1 M Tris-HCl buffer, pH = 8,4 ..... 20 ml

aspartic acid ..... 240 mg

α-ketoglutaric acid ..... 40 mg

*Roztok B:*

0,1 M Tris-HCl buffer, pH = 8,4 ..... 20 ml

pyrodoxal-5-phosphate ..... 25 mg

Fast Blue BB salt ..... 50 mg

Fast Violet B salt ..... 50 mg

Roztok A byl připraven na světle min. 15 min předem. Při rozpouštění byl roztok zahříván na 50°C. Roztok B byl připraven za tmy, smíchán s vychladlým roztokem A (stále za tmy) a směs byla ihned nalita na gel.

Alcohol dehydrogenase (ADH) E.C. 1.1.1.1*Roztok A:*

0,1 M Tris-HCl buffer, pH = 7,5 ..... 40 ml

NAD<sup>+</sup> ..... 15 mg

MTT ..... 10 mg

PMS ..... 1 mg

*Roztok B:*

čistý etanol ..... 10 ml

Roztok A byl připraven za tmy, přidán ke gelu a po 2–3 min v termostatu (35°C) byl přidán roztok B. V některých případech gel barvil slabě (přibližně po 1 hod), a proto byla přidána další dávka etanolu.

Diaphorase (DIA) E.C. 1.6.-.-

0,1 M Tris-HCl buffer, pH = 8,0 ..... 50 ml

NADH (reduced) ..... 13 mg

MTT ..... 5 mg

2,6-dichlorindophenol (sodium salt hydrate) ..... 2 mg

Barvicí roztok byl připraven za tmy a hned nalit do misky s gelem.

Krouživým pohybem misky po stole byl roztok rozlit po celém gelu a miska byla umístěna (stále za tmy) do termostatu nastaveného na 35°C. Barvicí roztoky na gelech byly ve tmě průběžně promíchávány a po vyzkoušené době (u každého systému jiná – Tab. 2) byl za minimálního osvětlení kontrolován stav barvení. Po skončení barvení byl barvicí roztok slit do nádoby pro nebezpečný odpad a gel oplachován destilovanou vodou, dokud se z gelu nevymyly zbytky barvicího roztoku (nejčastěji do druhého dne).

Tab. 2: Průměrná doba barvení u použitých enzymatických systémů.

Enzymatický systém	Typ isozymu	Průměrná doba barvení (min)
6-PGDH	Dimer	25
AAT	Dimer	25
ADH	Dimer	100
DIA	Monomer	40

**4.3.6 Vysušení a uchování gelů**

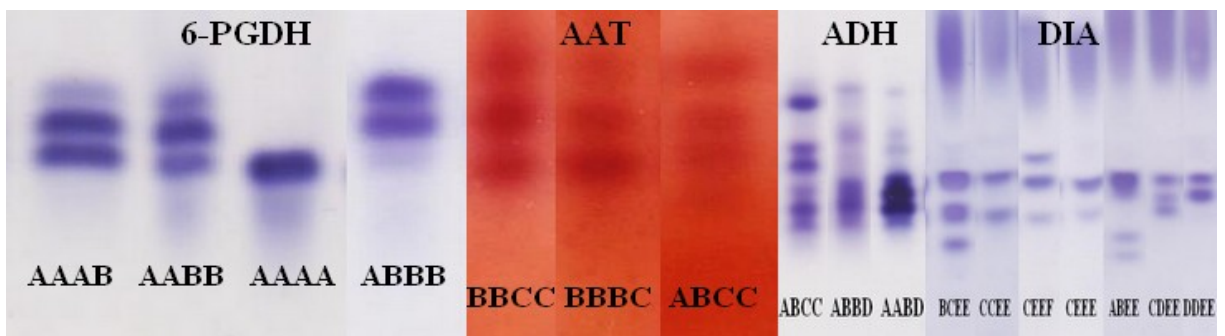
Z opláchnutých gelů byly seříznuty zbytečné okraje. Každý gel byl ve vodě umístěn mezi dva listy celofánu, které byly napnuty pomocí kolíčků na plastový rámeček tak, aby nikde nebyla vzduchová bublina. Po okapání vody byly rámečky připnuty na pevnou podložku, aby se vysychající celofán nezkroutil. Gely v celofánu byly sušeny na vzduchu min-

imálně 24 hodin a poté byl vysušený gel vyjmut z rámečků a celofán zkrácen. Gely byly popsány, naskenovány a uschovány mezi knihy, aby se nezkroutily.

### 4.3.7 Vyhodnocení gelů

Ve všech zkoumaných enzymových systémech byl hodnocen pouze jeden lokus. Dva lokusy byly detekovány pouze u systému AAT, ovšem jeden z lokusů nebyl variabilní. U tetraploidní *Calamagrostis canescens* byly zymogramy odečteny alelicky (Obr. 2). Odečítání frekvencí alel druhu *C. phragmitoides* bylo komplikované. V některých případech nebylo možné s jistotou určit správný poměr alel, protože zkoumané populace *C. phragmitoides* byly okto- a dekaploidní a měly by tedy mít 8 a 10 alel. U populací *C. phragmitoides* byla proto určena pouze přítomnost nebo nepřítomnost alel a jejich poměrné zastoupení, které bylo zakódováno jako tetraploidní.

Na základě všech isozymových systémů byly určeny jednotlivé genotypy. Následně byly pak vyhodnoceny počty genotypů v jednotlivých populacích a vzájemně srovnány populace a druhy. V programu CANOCO 5.0 (Braak et Šmilauer, 2012) byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA) založená na přítomnosti alel a matici frekvence alel v jednotlivých enzymatických systémech u *C. phragmitoides* a *C. canescens*. Pro PCoA přítomnosti alel bylo použito binární kódování a pro výpočet sekundární matice byla použita Soerensenova vzdálenost. Pro PCoA frekvence alel byla každé alele přiřazena hodnota vystihující její frekvenci, např. u AAAB dostala alela A hodnotu 3 a alela B hodnotu 1. Hodnoty byly navíc zlogaritmovány ( $\log_{10} x + 1$ ), aby byl posílen vliv přítomnosti. Pro výpočet sekundární matice byla použita Euklidovská vzdálenost.



Obr. 2: Ukázka vyhodnocování zymogramů v jednotlivých isozymových systémech (6-PGDH – dimer, AAT – dimer, ADH – dimer, DIA – monomer).

## 4.4 Sekvenování

### 4.4.1 Sběr materiálu

K dispozici jsme měli 80 rostlin z agregátu *C. purpurea* (21 rostlin ze 12 populací ze střední Evropy, 29 rostlin z 20 populací ze Skandinávie, 29 rostlin z 25 populací ze Sibíře a 1 rostlinu z 1 populace ze Severní Ameriky) a 25 rostlin *C. canescens* (25 rostlin z 20 populací ze střední Evropy a 2 rostliny z 1 populace ze Skandinávie – (Příloha I a II). Do některých analýz byly zahrnuty i sekvence dalších druhů, které připadají v úvahu jako potenciální rodiče *C. phragmitoides*, nebo se u nich předpokládá hybridizace se studovanými druhy (35 rostlin *C. epigejos*, 8 rostlin *C. pseudophragmites*, 7 rostlin *C. stricta*, 8 rostlin *C. arundinacea*, 15 rostlin *C. varia*, 10 rostlin *C. villosa* a 1 rostlina *C. ×strigosa*) (Příloha III).

Živý i herbářový materiál od jezera Bajkal byl přivezen Petrem Kouteckým (CBFS). Další materiál ze Sibíře byl získán z herbářových položek zapůjčených z herbáře MU v Brně (BRNU), dále byly využity sběry Alžběty Čejkové uložené v CBFS. Většina materiálu ze Skandinávie byla získána při mezioborové exkurzi do Skandinávie 2013. Část materiálu ze Skandinávie nám byla poskytnuta Bohumilem Trávníčkem (herbář OL), některé rostliny byly nasbírány L. Ekrtem a J. Košnarem 2015.

### 4.4.2 Izolace DNA pomocí NaOH

Z připravených listů byla odebrána část (asi 10 x 5 mm) do eppendorfky 1,5 ml, do které byly přidány tři wolframkarbidové kuličky. Eppendorfky se 3 min třepaly s frekvencí 30 s<sup>-1</sup> 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 µl 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°C. Z každého vzorku bylo odebráno 5 µl supernatantu, který byl přidán do SAFE-LOCK zkumavek se 45 µl 100 mM Tris-HCl (pH=8,3) a tyto zkumavky byly zvortexovány.

### 4.4.3 PCR, purifikace a příprava směsi na sekvenování

Pro sekvenování byly vybrány tři nekódující úseky chloroplastové DNA: psbA-trnH<sup>GUG</sup>, psbK-trnS<sup>GCU</sup>, rpl32F-trnL<sup>AUG</sup>R (Tab. 3), které byly s úspěchem použity v minulosti (Schaabová, 2013). Z důvodu častých problémů s amplifikací v úseku rpl32F-trnL<sup>AUG</sup>R u vzorků z herbářového materiálu byl navržen nový forward primer pomocí programu Primer 3 verze 0.4.0 s defaultním nastavením (Koressaar et Remm, 2007; Untergasser et al., 2012). Takto upravený primer označuji rpl32FCal. Dále byl sekvenován jeden úsek jaderné DNA (ITS1P-ITS4).

PCR reakce probíhaly v objemu 10  $\mu$ l a jejich složení bylo: 2,2  $\mu$ l PCR vody, 1,2  $\mu$ l forward i reverse primeru, oba o koncentraci 2,5 pmol, 5  $\mu$ l 2x Plain PP Master Mixu (Top-Bio) a 0,4  $\mu$ l DNA vzorku. Amplifikace probíhala v termocyleru Biometra T3000 a BIOER XP. Reakční podmínky pro jednotlivé primery jsou shrnuty v Tab. 4 a Tab. 5 (reakční podmínky pro rpl32F-trnL<sup>AUG</sup>R a rpl32FCal-trnL<sup>AUG</sup> se nelišily).

Tab. 3: Použité primery.

Název primeru	Primerová sekvence úseku 5´-3´	Citace
psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang et al., 1997
trnHGUG	CGCGCATGGATTCACAATCC	Sang et al., 1997
psbK	TGTTTGGCAAGCTGCTGTAA	Ebert et Peakall, 2009
trnSGCU	GGTTTCGAATCCCTCTCTTT	Ebert et Peakall, 2009
rpl32F	CAGTTCCAAAAAACGTAATTC	Shaw et al., 2007
rpl32FCal	GGGCAACAACAACAACAAA	-
trnLAUG	CTGCTTCTTAAGAGCAGCGT	Shaw et al., 2007
ITS1P	CTTTATCATTTAGAGGAAGAAAG	Selosse et al., 2002
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990

Úspěšnost PCR byla ověřena pomocí elektroforézy. Byly smíchány vždy 2  $\mu$ l PCR produktu s 0,8  $\mu$ l 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  $\mu$ l ExoSapu s 5  $\mu$ l 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  $\mu$ l 10 pmol forward primeru, 5,5  $\mu$ l vody a 2  $\mu$ l PCR produktu a vzorky byly poslány na sekvenaci. V případě nečitelného začátku sekvence byl vzorek sekvenován reverzním primerem.

Získané sekvence byly zpracovány v programech BioEdit 7.1.11 (Hall, 1999) a Geneious, verze 9.0.4 (Kearse et al., 2012). Alignment celého souboru sekvencí byl proveden v programu Mafft version 7 (Katoh et Standley, 2013) za těchto nastavení: algoritmus hledání alignmentu GINS-i, skórovací matice pro nukleotidové sekvence 1PAM  $k = 2$ , postih za otevření gapu = 1. Idely byly zakódovány v programu SeqState version 1.4.1 (Müller, 2005) metodou Simple coding (Simmons et Ochoterena, 2000). Poté byly ručně zakódovány jako nukleotidy A/C. Vytvořené alignmenty jednotlivých úseků byly spojeny v programu FaBox (Villesen, 2007) a převedeny do formátu nexus vhodného pro program PopART 1.7 (Leigh et Bryant, 2015). V programu PopART byla metodou TCS Networks (Clement et al., 2002) vytvořena haplotypová síť pro úseky cpDNA.

Tab. 4: 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	-



Tab. 5: Reakční podmínky pro použitý jaderný úsek DNA.

Úsek nDNA	Teplota (°C)	Doba trvání (s)	Počet opakování
ITS1P-ITS4	95	180	-
	95	30	45
	50	30	
	72	60	
	72	600	-

## 4.5 Klonování

Z důvodu amplifikačních problémů (přítomnost paralogů) v sekvencích ITS bylo nutné některé vzorky klonovat (7 vzorků). Klonování je genetická metoda, pomocí které lze vytvořit rekombinantní molekula vnesením fragmentu DNA do vektoru (plazmidu). Nejprve bylo nutné amplifikovat úsek DNA, který bude klonován. Byly testovány 2 polymerázy s minimální chybovostí (ExTaq a OneTaq), ze kterých byla vybrána ta úspěšnější. Byl namíchán PCR mix s OneTaq polymerázou: 3,4  $\mu$ l PCR vody, 0,6  $\mu$ l 5 pmol ITS1P primeru, 0,6  $\mu$ l 5 pmol ITS4 primeru a 5  $\mu$ l Master Mixu s OneTaq polymerázou. Reakční podmínky PCR jsou uvedeny v Tab. 6. PCR probíhala v termocykleru Biometra T3000.

Tab. 6: Reakční podmínky pro klonovaný jaderný úsek s OneTaq polymerázou.

Úsek nDNA	Teplota (°C)	Doba trvání (s)	Počet opakování
ITS1P-ITS4	95	180	-
	95	30	35
	50	30	
	68	105	
	68	600	-

Pro další postup bylo potřeba získat čistý PCR produkt. Bylo smícháno vždy 6  $\mu$ l PCR produktu s 2  $\mu$ l směsí Loading Dye + Sybr Green (nanášecí pufr s barvivem). Po 10 min inkubaci byla tato směs nanášena na 1,5 % gel low-melting agarózy v 1x TAE pufru. Elektroforéza byla spuštěna na 60 V. Na modrém světle byly za pomoci skalpelu vyřezány cílové proužky PCR produktu a přemístěny do 0,5 ml zkumavek.

Potom bylo potřeba PCR produkt extrahovat z gelu a ligovat. Zkumavky byly inkubovány v termobloku 10 min při 65 °C. Ve flow boxu byla připravena směs „melted gel mixture“ do nových 0,5 ml zkumavek: 1,75  $\mu$ l sterilní vody, 0,25  $\mu$ l pGEM-T Easy Vector (Promega) a 0,25  $\mu$ l roztavené agarózy s PCR produktem. Směs byla promíchána a inkubována dalších 10 min při 65 °C. Do sterilní zkumavky byla připravena ligační směs (17,5  $\mu$ l 2x ligačního pufru, 1,75  $\mu$ l T4 ligázy pro 7 vzorků), která byla rozpipetována po 2,5  $\mu$ l do stripu. K ligační směsi bylo přidáno 2,5  $\mu$ l „melted gel mixture“. Po nabrání

vzorku do špičky pipety je nutné asi 3 sekundy počkat na ochladnutí vzorky, aby nebyla poškozena T4 ligáza. Po promíchání byla spuštěna ligace v termocycleru Biometra T3000: 14 hod při 16°C.

Následně byla provedena transformace našeho úseku do bakterie. Zkumavky se vzorky byly umístěny na 15 min do 65°C do termobloku, poté byly naředěny 20 µl sterilní vody, aby se zabránilo gelovatění vzorku. Do nových 1,5 ml zkumavek bylo smícháno 40 µl kompetentních buněk *E. coli* (kmen K12, mod. DHα) a 10 µl ligační směsi. Vzorky byly lehce proklepány, krátce stočeny na stolní centrifuze a inkubovány 20 min na ledu, aby došlo ke stabilizaci směsi. Následně byla provedena transformace teplotním šokem: vzorky byly inkubovány 45 s při 42°C na termobloku a ihned umístěny na 2 min na led.

Potom bylo nutné bakterie kultivovat na médiu. Ke každému vzorku bylo přidáno 300 µl SOC média a zkumavky byly inkubovány ve vodorovné poloze v termomixeru 45 min při 37°C, 150 rpm. Byly připraveny kultivační misky s LB/Amp: na každý vzorek bylo do 250 ml tekutého LB média přidáno 250 µl zásobního roztoku Amp (0,1 g/ml) a médium bylo nalito na misku. Ve sterilní zkumavce bylo smícháno 64 µl sacharidu X-Gal (12,5 mg/ml) a 3,5 µl genového kofaktoru IPTG (240 mg/ml). Směs byla nanášena na povrch tuhého média v misce a rovnoměrně rozetřena pomocí sterilní skleněné kličky. Stejným způsobem byly připraveny další misky. Na každou misku bylo nanášeno 200 µl suspenze kultury transformovaných bakteriálních buněk a tato směs byla rovněž rozetřena. Mezi jednotlivými vzorky byla klička sterilizována namočením do lihu a opálením nad kahanem. Misky obrácené dnem vzhůru byly inkubovány přes noc v termostatu při 37°C.

Následující den byly vyhodnoceny kolonie. Pomocí sterilního párátko byly ve flow-boxu odebrány vzorky bílých kolonií (u bíle zbarvených kolonií došlo k inzerci PCR produktu do plazmidu, zatímco u modrých ne) do stripů se 40 µl PCR vody. Stripy byly inkubovány 5 min při 94°C v cycleru (program „Denatur“), aby se plazmidy uvolnily z bakterií. Potom byla připravena směs pro přímou PCR s primery, které nasedají na plazmid v těsném okolí vkládaného inzertu: 3 µl PCR vody, 0,8 µl 5 pmol SP6 primeru, 0,8 µl 5 pmol T7 primeru a 5 µl 2x Plain PP Master Mixu (Top-Bio). Do PCR směsi bylo přidáno 0,4 µl vzorku denaturované DNA z bakterií. Vzorky byly vloženy termocycleru Biometra T3000 na program „SP6\_T7“ (Tab. 7).

Tab. 7: Reakční podmínky pro programu SP6\_T7.

Úsek nDNA	Teplota (°C)	Doba trvání (s)	Počet opakování
SP6-T7	94	180	-
	94	30	45
	50	60	
	72	60	
	72	600	-

Výsledek PCR byl ověřen na 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru (2 µl PCR pro-

duktu s 0,8  $\mu$ l GELRED fluorescenčního barviva). Vzorčky byly přečištěny na kolonkách Invitrek PCR Product Purification podle protokolu výrobce a připraveny na sekvenování (viz protokol výše).

## 4.6 Vyřezávání PCR produktu z gelu

V některých případech (50 vzorků) měly PCR produkty v úseku ITS1P-ITS4 dva proužky na gelu. Proto byly do těchto PCR produktů přidány 3  $\mu$ l směsi LD+SG a po 10 min inkubaci byla tato směs nanesena na 1,5% gel *low-melting* agarózy v 1x TAE pufru. Elektroforéza byla spuštěna na 60 V. Na modrém světle byly za pomoci skalpelu vyřezány cílové proužky PCR produktu a přemístěny do 0,5 ml zkumavek. Pomocí Gel Extraction Spin Kit (JET QUICK) byl z gelu extrahován PCR produkt (podle protokolu výrobce). Úspěšnost extrakce byla ověřena na 1,5% gelu v 1x TBE pufru (8  $\mu$ l získaného PCR produktu bylo smícháno s 2,5  $\mu$ l GelRed barviva). Vzorčky byly připraveny na sekvenaci smícháním 1  $\mu$ l primeru ITS1P (nebo reversního primeru ITS4) s 9  $\mu$ l PCR produktu. Pokud byl začátek získané sekvence nečitelný, byla připravena nová sekvenční směs s reverzním primerem.

# 5 Výsledky

## 5.1 Cytometrická analýza

Sebrané populace byly rozděleny na skupinu *C. purpurea* agg. a druh *C. canescens* na základě morfologických znaků udávaných v literatuře (Tzvelev, 1965; Conert, 1989) a naměřené ploidní úrovni.

U rostlin řazených ke skupině *C. purpurea* byly průtokovou cytometrií zjištěny hodnoty odpovídající 3 různým ploidním úrovním: tetraploidní, oktoploidní a dekaploidní. Tetraploidní úroveň byla zjištěna pouze na Sibíři. V Evropě je dominantní oktoploidní úroveň, která byla zjištěna u 18-ti populací ve střední Evropě a 10-ti populací ve Skandinávii. Bylo zjištěno, že variabilita ve velikosti genomu střeoevropských a skandinávských oktoploidních populací se neliší ( $t = -1.905$ ,  $df = 85$ ,  $p = 0.0602$ ) (Obr. 3).

V České republice byly objeveny dvě populace odpovídající dekaploidní úrovni. Vedle již známé populace z lokality Štítý (Schaabová, 2013) je to další populace na okraji Českomoravské vrchoviny v PP Hersica u Bedřichova v okrese Blansko. Ve Skandinávii byla z 29 studovaných rostlin nalezena pouze jediná dekaploidní rostlina v populaci Lakshol na severu Norska. Další dvě rostliny z této populace byly normálně oktoploidní.

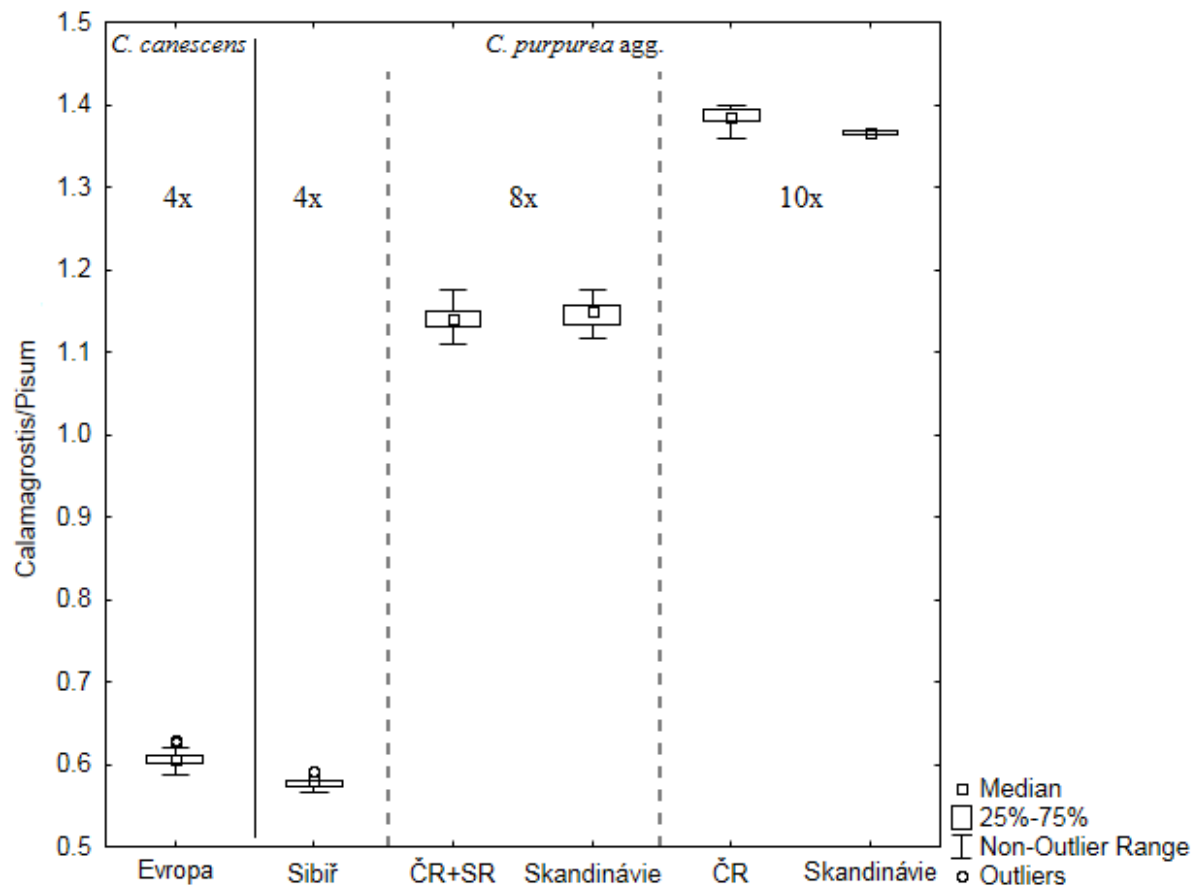
U všech studovaných populací *C. canescens* byla zjištěna velikost genomu odpovídající tetraploidní úrovni. U druhu *C. purpurea* byla zjištěna menší mezipopulační variabilita (5 %, Tab. 9) než u *C. canescens* (až 7 %, Tab 8).

Tab. 8: Poměrné charakteristiky cytometrického měření *C. canescens* pomocí DAPI a PI (CV = koeficient variance píku).

Barvivo	DAPI	PI
Sample CV mean	2,35	3,30
Standard CV mean	1,69	2,94
Poměr min	0,59	0,82
Poměr průměr	<b>0,61</b>	<b>0,84</b>
Poměr max	0,63	0,87
Variabilita (%)	<b>7,05</b>	<b>7,61</b>
Mezipop. variabilita (%)	6,79	3,72
Počet měření	52	52
Počet populací	33	9

Tab. 9: Poměrné charakteristiky cytometrického měření různých ploidií *C. purpurea* agg. pomocí DAPI a PI (CV = koeficient variance píku).

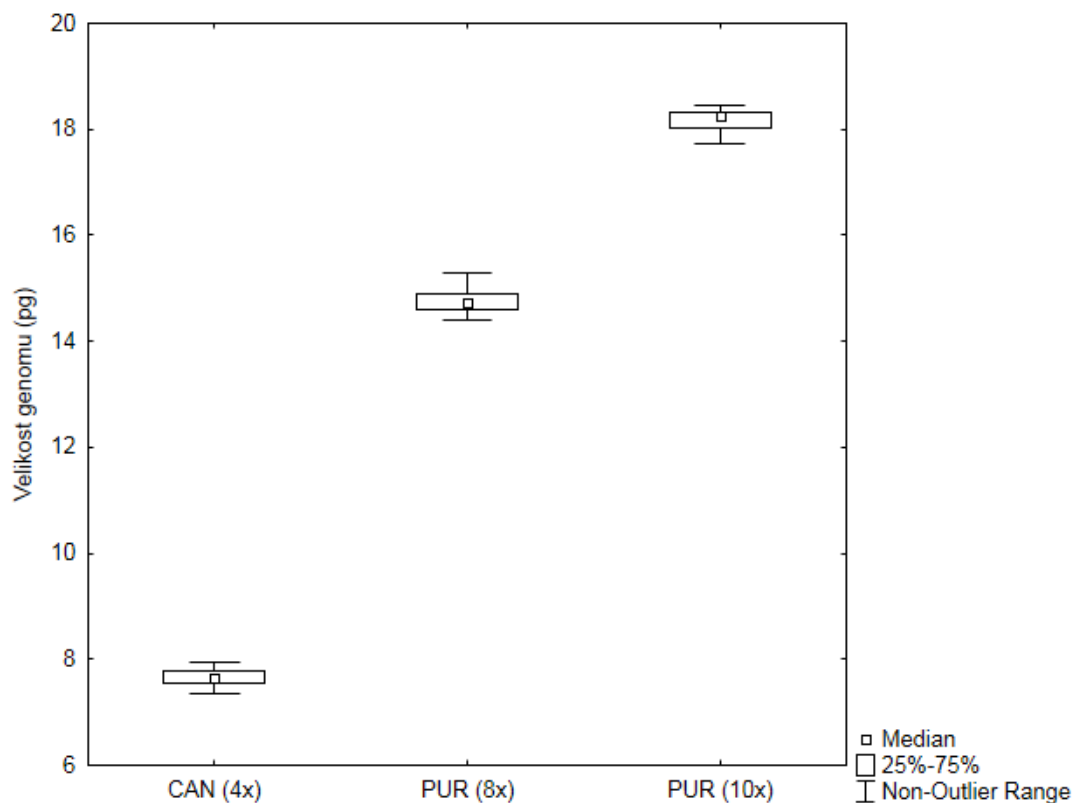
Barvivo	DAPI			PI	
	4x	8x	10x	8x	10x
Ploidie					
Sample CV mean	2.94	2.04	1.70	2.81	2.31
Standard CV mean	1.44	2.02	1.72	2.81	2.95
Poměr min	0.57	1.11	1.36	1.59	1.90
Poměr průměr	<b>0.58</b>	<b>1.14</b>	<b>1.38</b>	<b>1.62</b>	<b>1.98</b>
Poměr max	0.59	1.18	1.40	1.68	2.03
Variabilita (%)	<b>4.67</b>	<b>5.96</b>	<b>2.98</b>	<b>6.04</b>	<b>6.66</b>
Mezipop. variabilita (%)	4.67	4.99	1.93	2.24	4.32
Počet měření	5	87	12	45	16
Počet populací	5	28	3	7	3

Obr. 3: Srovnání poměru *Calamagrostis/Pisum* mezi evropskou *C. canescens* a třemi ploidními úrovněmi *C. purpurea* agg. z různých regionů – tetraploidními rostlinami ze Sibíře, oktoploidními rostlinami ze Skandinávie, České a Slovenské republiky a dekaploidními rostlinami ze Skandinávie, České a Slovenské republiky (měřeno na DAPI).

Pro *C. canescens* a dvě ploidie *C. purpurea* agg. byl z výsledků měření spočítán „dye factor” (DF), obsah AT/CG bazí a průměrná velikost genomu (Tab. 10, Obr. 4). Bylo zjištěno, že změřené rostliny *C. canescens* (středoevropské a skandinávské) mají průměrnou velikost genomu 7,67 pg, oktoploidní rostliny *C. purpurea* agg. (asijské a evropské) mají průměrnou velikost genomu 14,73 pg a evropské dekaploidní rostliny 18,18 pg. Dále bylo zjištěno, že *C. canescens* nemá výrazně vyšší obsah AT bazí (55,5 %) ve srovnání s oběma ploidními úrovní *C. purpurea* agg. (55,0 % a 54,8 %). Tyto výsledky odpovídají výsledkům Schaabové (2013).

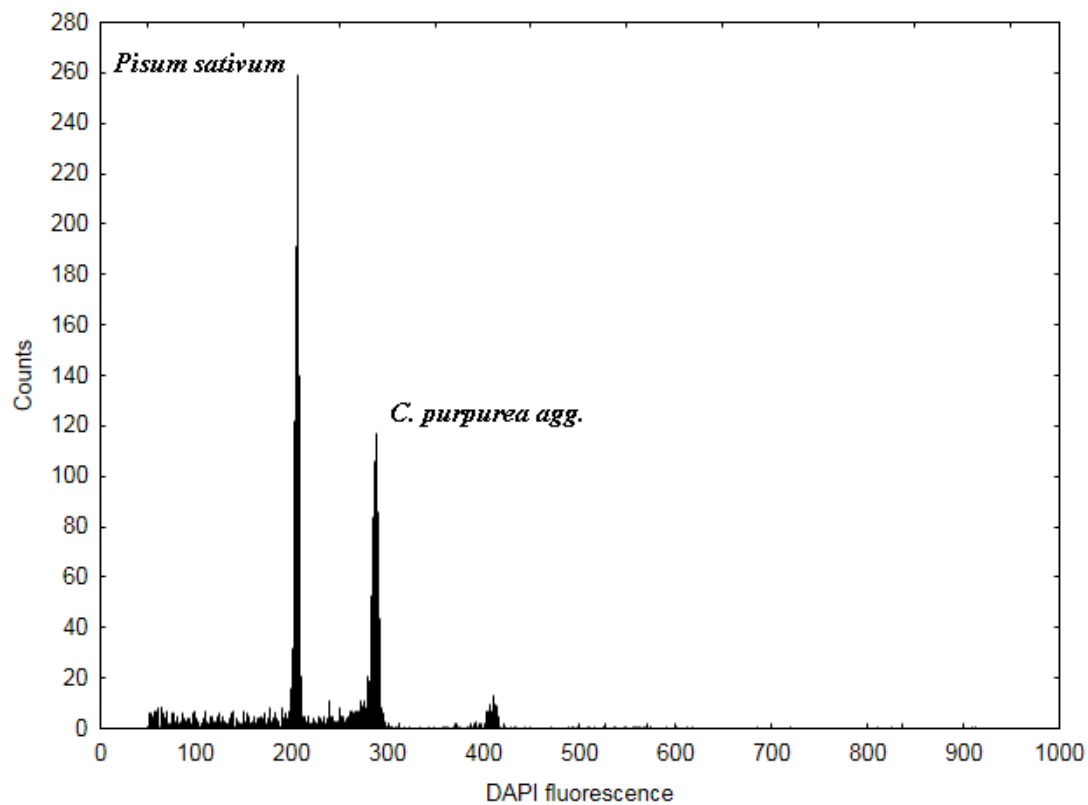
Tab. 10: Vypočítané hodnoty „dye factor” (DF), obsah AT/CG bazí a průměrná velikost genomu *C. canescens* a dvou ploidí *C. purpurea* agg.

	DF	AT (%)	CG (%)	Průměrná velikost genomu (pg)
<i>C. canescens</i>	0,726	55,513	44,487	7,67
<i>C. purpurea</i> agg. (8x)	0,705	55,003	44,997	14,73
<i>C. purpurea</i> agg. (10x)	0,696	54,778	45,222	18,18

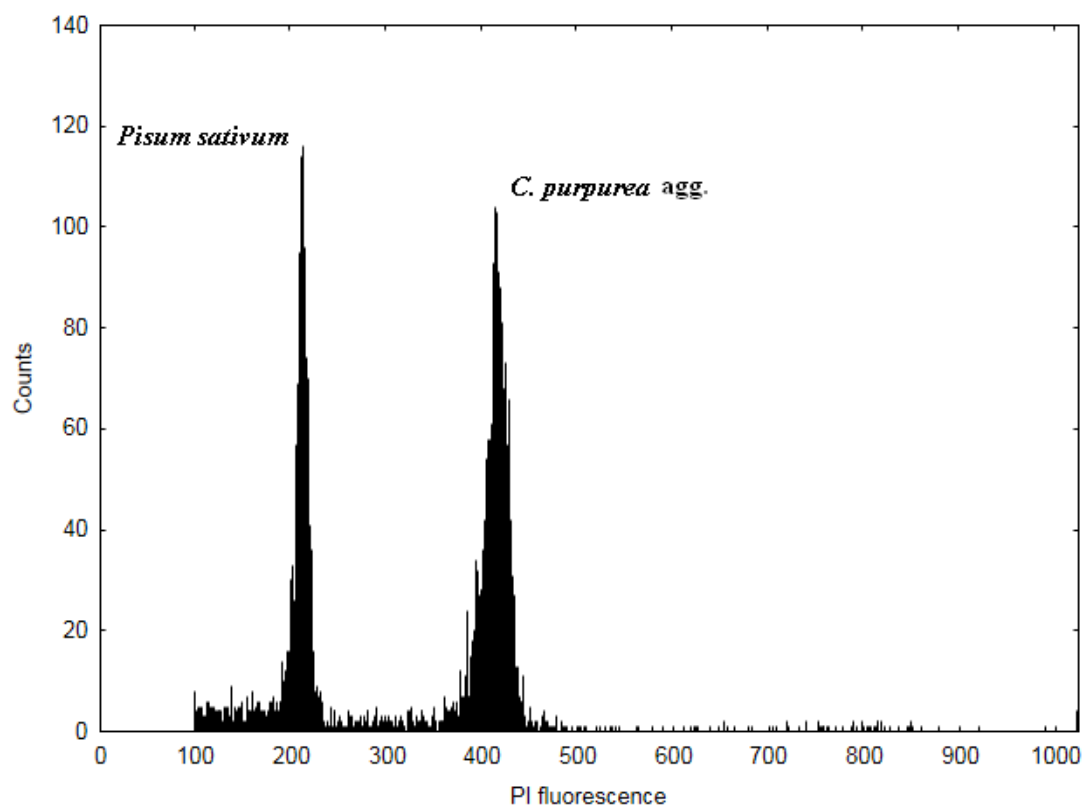


Obr. 4: Variabilita ve velikosti genomu *C. canescens* a dvou ploidí *C. purpurea* agg.

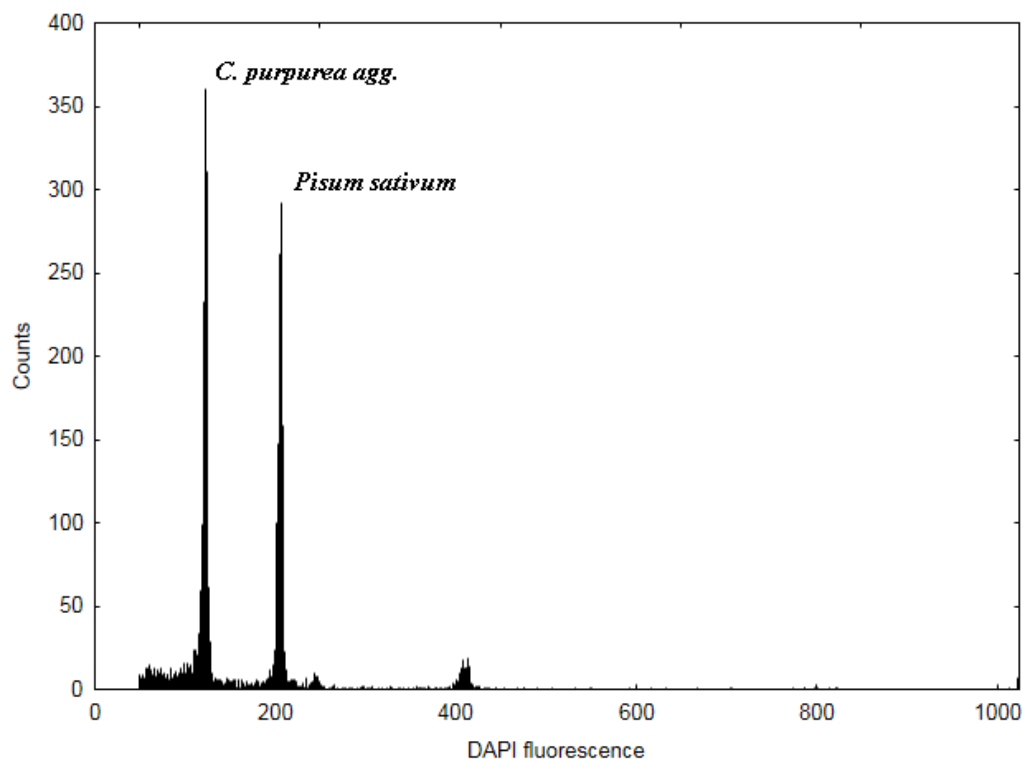
Z průměrné velikosti genomu byla spočítána Cx-hodnota *C. purpurea* agg. (velikost jedné chromozomé sádky): 1.84 pg pro oktoploidní úroveň. Za předpokladu, že vyšší ploidní úroveň je dekaploidní, Cx-hodnoty jsou totožné. Pro *C. canescens* byla spočítána Cx-hodnota 1.92 pg.



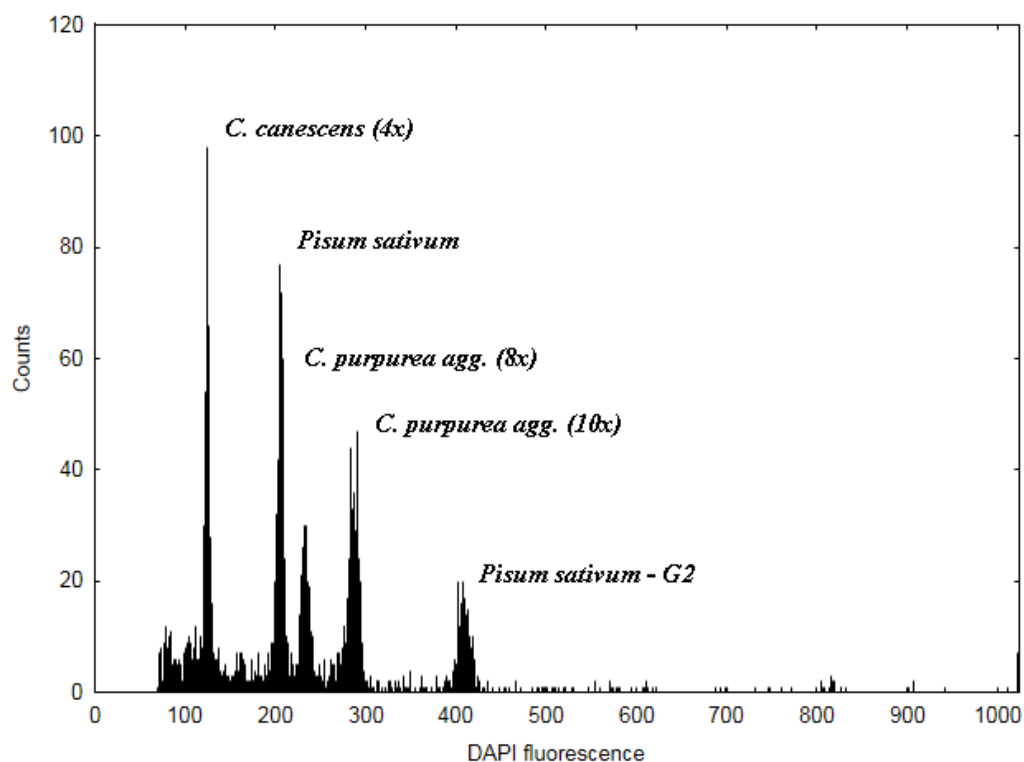
Obr. 5: Histogram fluorescence jader dekaploidní *C. purpurea* agg. a interního standardu *Pisum sativum* barvených DAPI (lokality Štítý, 3 rostliny).



Obr. 6: Histogram fluorescence jader dekaploidní *C. purpurea* agg. a interního standardu *Pisum sativum* barvených PI (lokality Hersica).



Obr. 7: Histogram fluorescence jader tetraploidní *C. purpurea agg.* a interního standardu *Pisum sativum* DAPI (lokalita Sibiř, Uljon-hory, 8 rostlin).



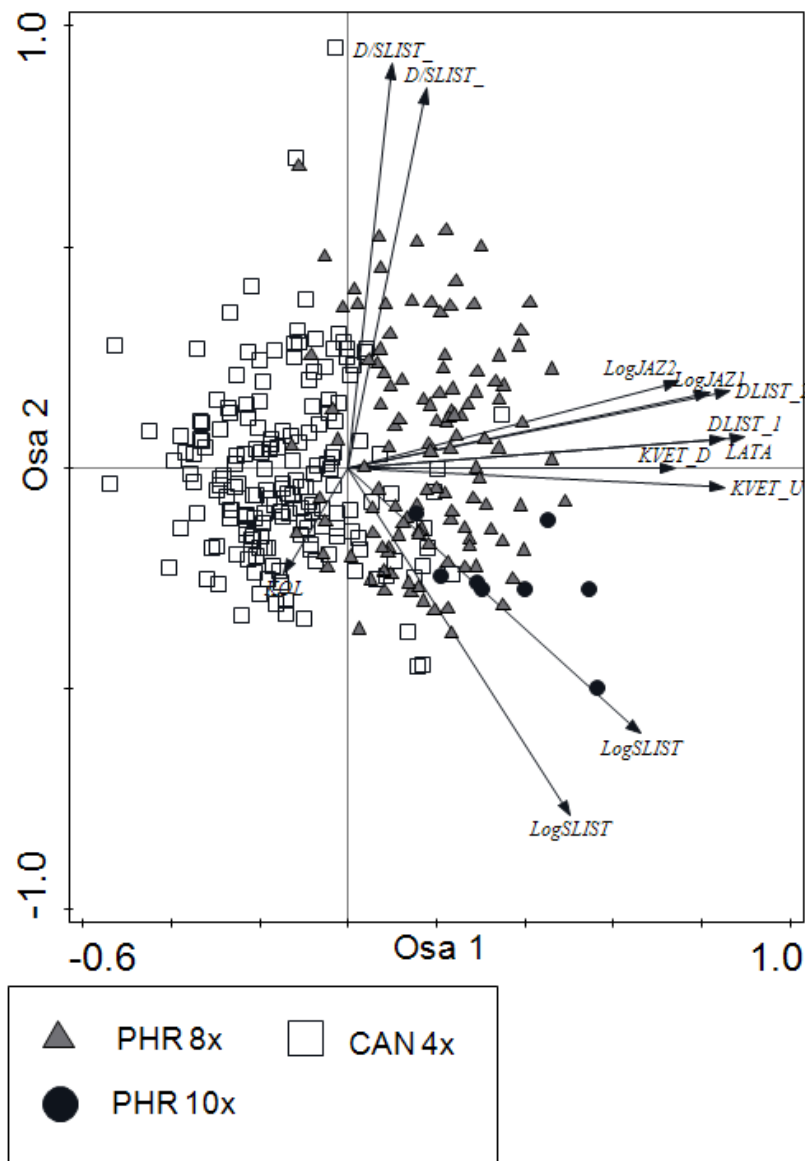
Obr. 8: Histogram fluorescence jader tetraploidní *C. canescens*, okto- a dekaploidní *C. purpurea agg.* a interního standardu *Pisum sativum* barvených DAPI (lokalita Sláma – *C. canescens*, Řeřišný – *C. purpurea* 8x, Štítý – *C. purpurea* 10x).



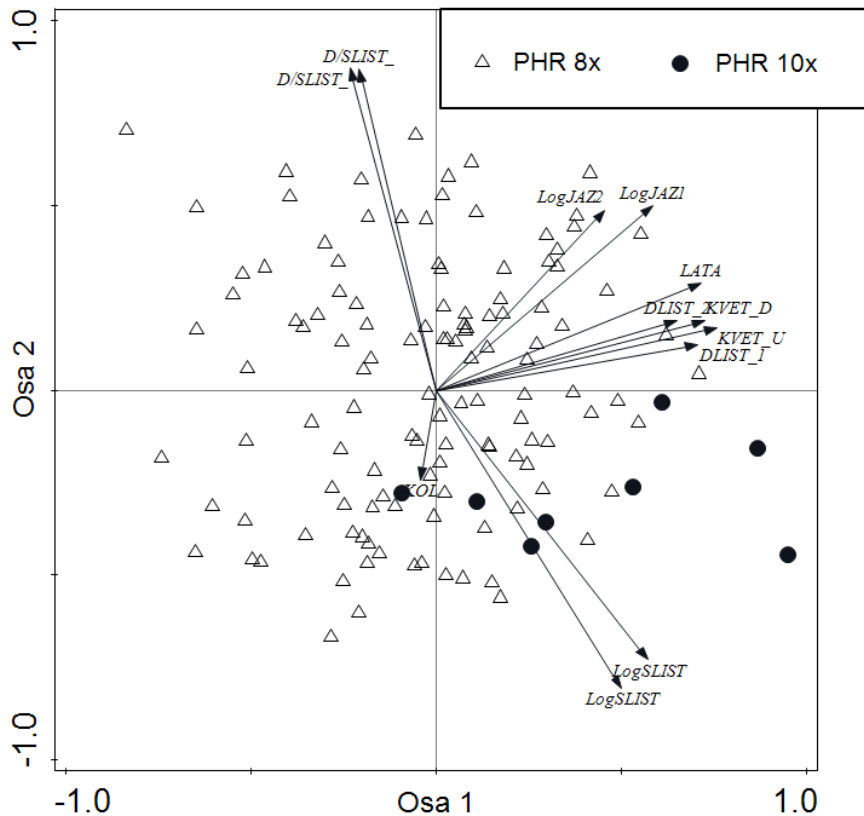
## 5.2 Morfometrická analýza

Analýza hlavních komponent ukázala, že druhy *C. canescens* a *C. phragmitoides* se soustředily na různých stranách diagramu podél první kanonické osy (Obr. 9). První dvě kanonické osy vysvětlují 46,13 % a 22,68 % celkové variability. S první osou jsou korelovány znaky délka listu 1 a 2, délka laty, délka prostřední a nejspodnější větve laty. S druhou osou částečně koreluje poměr délka/šířka listu 1 a 2, nebo počet kolének.

Analýza dvou ploidií druhu *C. phragmitoides* ukázala, že tento druh je morfologicky homogenní (Obr. 10). Dekaploidní populace Štítý se nachází v okrajové části morfologické variability oktaploidních populací. První dvě kanonické osy vysvětlují 31,32 % a 28,56 % celkové variability.



Obr. 9: Analýza hlavních komponent (PCA) druhů *C. canescens* a *C. phragmitoides*. První dvě kanonické osy vysvětlují 46,13 % a 22,68 % celkové variability mezi druhy.



Obr. 10: Analýza hlavních komponent (PCA) dvou ploidii druhu *C. phragmitoides*. Dvě kanonické osy vysvětlují 31,32 % a 28,56 % celkové variability.

Lineární diskriminační analýza potvrdila některé v minulosti uváděné znaky, které nejlépe odlišují druhy *C. canescens* a *C. phragmitoides* (Schaabová, 2013). Jsou to délka jazýčku listu 1 a 2 (Tab. 11). Diskriminační analýza obou ploidii *C. phragmitoides* ukázala, že se ploidní úrovně liší šířkou druhého nejhořejšího listu (SLIST2), délkou laty (LATA), počtem kolének (KOL), délkou jazýčku nejhořejšího listu (JAZ1) a červeným zbarvením laty (CERV.hodne) (Tab. 12). Příspěvek některých znaků (délka nejdelší větvičky z nespodněji rostoucích na latě KVET\_D, délka nejdelší větvičky vyrůstající mírně pod středem laty KVET\_U) k rozlišení obou ploidii je omezen v případě výběru forward selection.

Provedené analýzy odhalily rozdíly mezi druhy *C. canescens* a *C. phragmitoides*. *C. canescens* se větví častěji než *C. phragmitoides* (Tab. 13). Poměrné zastoupení větvíček se rostlin bylo u dekaploidní populace *C. phragmitoides* nejmenší ze všech zkoumaných skupin. Na čepeli listu převažují u *C. canescens* husté chlupy, zatímco u zkoumaných populací *C. phragmitoides* byly přítomny především krátké chlupy (u dekaploidní populace 9 z 10 rostlin). Oba druhy mají stéblo bez červeného zbarvení (10x *C. phragmitoides* obzvláště), ale u *C. canescens* má necelá čtvrtina měřených rostlin (58 rostlin) hodně červené stéblo.

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

Znaky	Kondicionální efekty			CorE score	Marginální efekty		
	Variabilita (%)	pseudo-F	P	Osa 1	Variabilita (%)	pseudo-F	P
LogJAZ1	89,6	852	0,001	0,8585	73,7	852	0,001
VETV	2,5	25,6	0,001	-0,3112	2,1	25,6	0,001
LogJAZ2	2,5	27,9	0,001	0,7893	2	27,9	0,001
LogSLIST1	1,4	16,1	0,001	0,476	1,1	16,1	0,001
CERV.hodne	1,1	14	0,001	-0,1624	0,9	14	0,001
CHLUP.kratke	1	12,2	0,002	-	0,8	12,2	0,002
DLIST_1	0,6	7,1	0,010	0,7141	0,5	7,1	0,010
KVET_D	0,3	4,5	0,031	-	0,3	4,5	0,031
D/SLIST_1	0,3	n.s.	n.s.	-	0,2	3,4	0,065
CERV.malo	0,1	n.s.	n.s.	0,0444	0,1	1,6	n.s.
CERV.zadne	0,1	n.s.	n.s.	0,1022	0,1	1,6	n.s.
CHLUP.huste	0,1	n.s.	n.s.	-	<0.1	1,4	n.s.
LogSLIST2	<0.1	n.s.	n.s.	-	<0.1	1,1	0,319
KVET_U	<0.1	n.s.	n.s.	-	<0.1	0,2	0,623

Pozn.: n.s. = not significant

Tab. 12: Morfologické znaky *C. phragmitoides* a *C. canescens* testované forward selection, jejich kondicionální a marginální efekty a korelace s osou lineární diskriminační analýzy (LDA). Morfologické znaky odlišující oktoploidní a dekaploidní rostliny *C. phragmitoides* vybrané forward selection, jejich kondicionální a marginální efekty a korelace s kanonickou osou lineární diskriminační analýzy (LDA).

Znaky	Kondicionální efekty			CorE score	Marginální efekty		
	Variabilita (%)	pseudo-F	P	Osa 1	Variabilita (%)	pseudo-F	P
LogSLIST2	34,9	24,6	0,001	0,4026	34,9	24,6	0,001
LATA	19,8	15,5	0,001	0,3466	25,9	17,3	0,001
KoL	12,2	10,2	0,003	0,2797	16,8	10,8	0,006
LogJAZ1	9,2	8,2	0,006	-0,0878	1,7	1	0,345
CERV.hodne	9,4	8,9	0,004	-0,1002	2,2	1,3	0,385
KVET_D	4,8	4,6	0,031	-	27,5	18,6	0,001
VETV	3,8	3,7	0,065	-	2,7	1,6	0,345
LogSLIST1	1,7	1,7	0,198	-	10,2	6,3	0,014
LogJAZ2	2,6	2,6	0,12	-	1,5	0,9	0,347
CHLUP.huste	0,4	0,4	0,483	-	1,5	0,9	0,613
KVET_U	0,4	0,4	0,475	-	27,9	18,9	0,001
DLIST_1	0,4	0,4	0,536	-	1,3	0,8	0,415
DLIST_2	0,4	0,4	0,53	-	7,9	4,9	0,032
CHLUP.kratke	-	n.s.	n.s.	-	2,4	1,5	0,29
CERV.zadne	-	n.s.	n.s.	0,1065	2,4	1,5	0,285
CHLUP.ridke	-	n.s.	n.s.	-	0,8	0,5	0,668
CERV.malo	-	n.s.	n.s.	-0,0403	0,4	0,2	1

Pozn.: n.s. = not significant

V počtu kolének se *C. phragmitoides* a *C. canescens* neliší (Tab. 14 a 15). Z ostatních měřených znaků vyplývá, že rostliny *C. canescens* jsou celkově menší – ať už se jedná o délku laty a jejích částí, délku a šířku obou horních listů, nebo délku jazýčků obou horních listů. Rostliny z dekaploidní populace Štítý jsou oproti oktoploidním rostlinám *C. phragmitoides* mohutnější – všechny měřené znaky mají vyšší hodnoty. Dokonce mají o jedno kolénko na stéble více (Tab. 16).

Tab. 13: Počty rostlin *C. canescens* a *C. phragmitoides* s určitým typem morfologického znaku.

Znaky	<i>C. canescens</i> (4x)	<i>C. phragmi- toides</i> (8x)	<i>C. phragmi- toides</i> (10x)
Větví se	237	127	6
Nevětví se	4	33	4
Krátké chlupy	28	106	9
Rídké chlupy	43	33	1
Husté chlupy	171	21	0
Žádné zbarvení	145	110	9
Málo červené	39	29	1
Hodně červené	58	21	0
<b>Celkem jedinců</b>	<b>242</b>	<b>160</b>	<b>10</b>

Tab. 14: Změřené hodnoty morfologických znaků tetraploidních populací *C. canescens* (kromě počtu kolének jsou všechny znaky v mm).

Znaky	Průměr	Std. Error of mean	Mini- mum	Maxi- mum
KoL	6	0,06	4	8
LATA	175	2,01	90	258
KVET_D	66	0,95	22	113
KVET_U	57	0,76	25	99
DLIST_1	172	3,35	55	318
SLIST_1	3	0,08	1	8
DLIST_2	237	3,69	84	429
SLIST_2	5	0,10	2	11
JAZ1	4	0,08	1	8
JAZ2	3	0,07	1	8
D/SLIST_1	55	1,14	17	123
D/SLIST_2	51	1,34	14	163

Tab. 15: Změřené hodnoty morfologických znaků oktoploidních populací *C. phragmitoides* (kromě počtu kolének jsou všechny znaky v mm).

Znaky	Průměr	Std. Error of mean	Minimum	Maximum
KoL	6	0,06	4	7
LATA	210	2,67	121	317
KVET_D	76	1,32	30	116
KVET_U	70	0,93	40	97
DLIST_1	265	3,98	164	380
SLIST_1	5	0,13	2	9
DLIST_2	312	4,26	195	432
SLIST_2	6	0,15	2	11
JAZ1	11	0,26	4	18
JAZ2	8	0,25	3	16
D/SLIST_1	61	1,64	27	121
D/SLIST_2	58	1,73	26	127

Tab. 16: Změřené hodnoty morfologických znaků dekaploidních populací *C. phragmitoides* (kromě počtu kolének jsou všechny znaky v mm).

Znaky	Průměr	Std. Error of mean	Minimum	Maximum
KoL	7	0,33	5	8
LATA	263	9,88	211	309
KVET_D	100	4,55	73	118
KVET_U	88	5,37	68	111
DLIST_1	282	13,22	222	330
SLIST_1	6	0,81	3	12
DLIST_2	351	7,03	321	385
SLIST_2	10	0,50	9	14
JAZ1	9	0,80	6	13
JAZ2	7	0,80	4	11
D/SLIST_1	47	4,87	28	70
D/SLIST_2	35	1,68	24	43

### 5.3 Isozymová analýza

Isozymová analýza zjistila u *C. phragmitoides* 7 isozymových genotypů a u *C. canescens* 18 genotypů (Příloha tab. IV a V). Většina genotypů *C. phragmitoides* se lišila poměrným zastoupením alel, zatímco většina genotypů *C. canescens* se lišila přítomností alel (11 genotypů). *C. canescens* měla pouze ve dvou isozymových systémech (AAT, DIA) víc alel než *C. phragmitoides*.

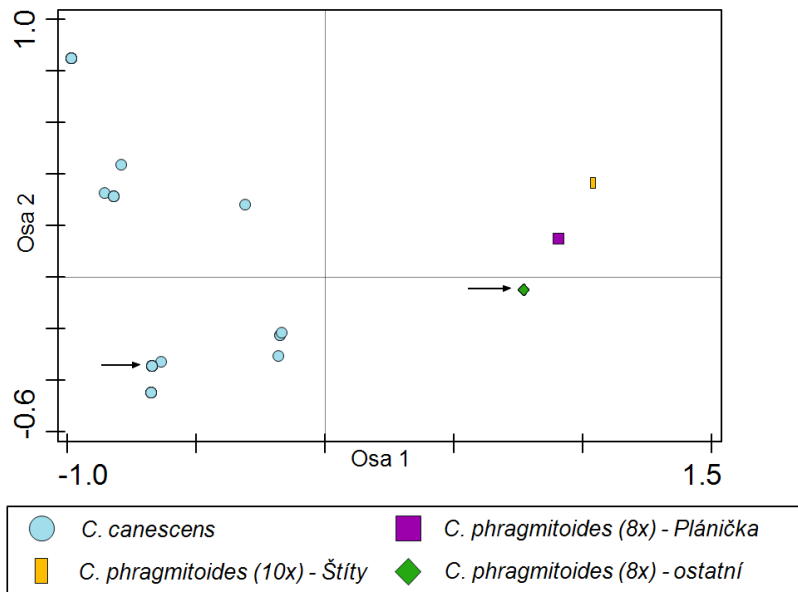
Zkoumané populace *C. phragmitoides* se skládaly z 1-3 genotypů, zatímco zkoumané populace *C. canescens* měly 1–7 genotypů (Tab. 17). Nejvíce genotypů bylo zjištěno u *C. canescens* na lokalitě Břehyně (BREHC) na Českolipsku. Tato populace má unikátní alelu F v systému DIA.

Analýza hlavních koordinát (PCoA) založená na matici přítomnosti alel ukazuje rozdělení *C. phragmitoides* a *C. canescens* podél první osy (Obr. 11). První dvě osy vysvětlují 60.91 % a 13.77 % celkové variability. *C. canescens* má zřetelně větší vnitropopulační a mezipopulační genotypovou variabilitu, zatímco 4 populace *C. phragmitoides* mají podle přítomnosti alel jednotný genotyp a odlišují se populace Plánička (PLANIPH) a Štítý (STITPH), které mají unikátní alelu E v systému ADH. Populace Štítý má navíc unikátní alelu A v systému DIA. *C. canescens* se odlišuje od *C. phragmitoides* alelou D v systému ADH (*C. phragmitoides* má alelu C). V systému AAT je pro jednu populaci *C. canescens* (STONC) unikátní alela A (Tab. 17).

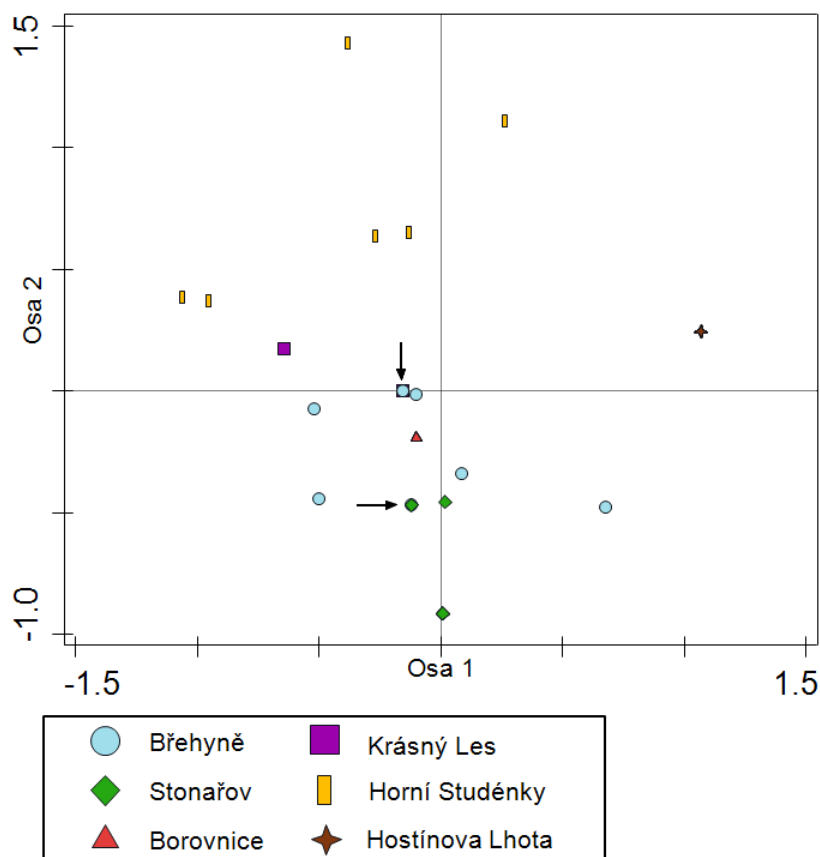
Odlišení druhů ukazuje i analýza hlavních koordinát (PCoA) založená na frekvenci alel v jednotlivých enzymatických systémech (Obr. 12 a Obr. 13). Pokud se rozlišují genotypy na základě frekvence alel, variabilita obou druhů se jeví jako větší. Nárůst variability s frekvencí alel je patrný především v populacích KRLEPH a BOROPH.

Tab. 17: Počet genotypů a přítomnost alel v jednotlivých populacích *C. phragmitoides* a *C. canescens*. Vzácné alely omezené maximálně na dvě populace jsou zvýrazněny.

Druh	Ploidie	Populace	Počet genotypů	Přítomnost alel			
				AAT	ADH	DIA	6-PGDH
<i>C. phragmit.</i>	10x	STITPH	1	BC	AB <u>CE</u>	<u>A</u> BE	AB
<i>C. phragmit.</i>	8x	KRLEPH	3	BC	ABC	BCE	AB
<i>C. phragmit.</i>	8x	STONPH	1	BC	ABC	BCE	AB
<i>C. phragmit.</i>	8x	BOROPH	2	BC	ABC	BCE	AB
<i>C. phragmit.</i>	8x	PLANIPH	1	BC	AB <u>CE</u>	BCE	AB
<i>C. canescens</i>	4x	KRLEC	3	BC	ABD	CE	AB
<i>C. canescens</i>	4x	BREHC	7	BC	ABD	BCE <u>F</u>	AB
<i>C. canescens</i>	4x	STONC	3	ABC	<u>A</u> BD	CE	AB
<i>C. canescens</i>	4x	HOSTC	1	BC	ABD	CDE	A
<i>C. canescens</i>	4x	HSTUC	6	BC	ABD	CDE	AB
<i>C. canescens</i>	4x	BOROC	1	BC	ABD	CE	AB

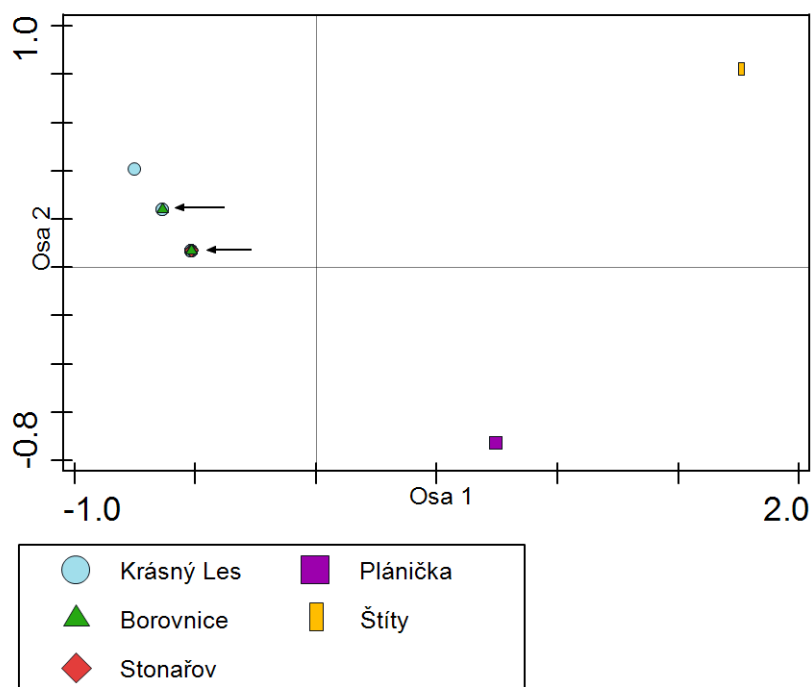


Obr. 11: Analýza hlavních koordinát (PCoA) – isozymové genotypy *C. canescens* a *C. phragmitoides* na základě přítomnosti alel (kódováno 0/1). Šipky ukazují na genotypy, které sdílí více populací. První dvě kanonické osy vysvětlují 60.91 % a 13.77 % celkové variability.



Obr. 12: Analýza hlavních koordinát (PCoA) založená na matici frekvencí alel *C. canescens* jednotlivých isozymových systémů. Šipky ukazují na genotypy, které sdílí více populací. Dvě kanonické osy vysvětlují 36.40 % a 24.36 % celkové variability.





Obr. 13: Analýza hlavních koordinát (PCoA) založená na matici frekvencí alel *C. phragmitoides* jednotlivých isozymových systémů. Šipky ukazují na genotypy, které sdílí více populací. Dvě kanonické osy vysvětlují 66.60 % a 20.44 % celkové variability.

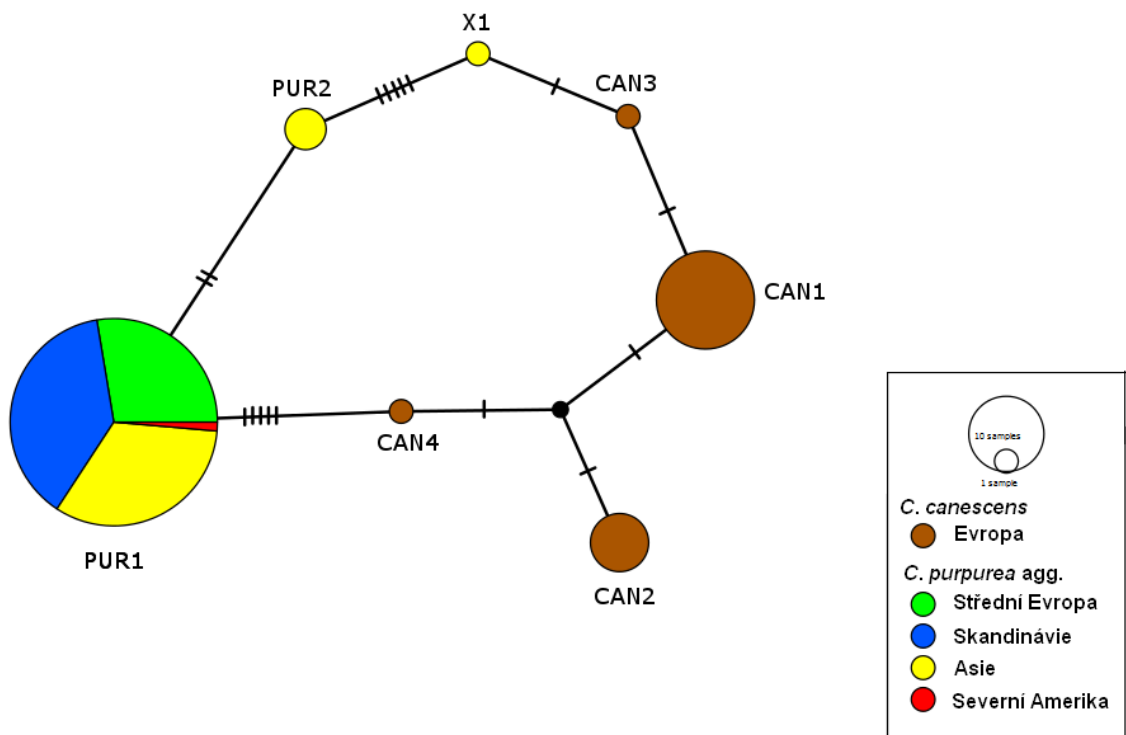
## 5.4 Sekvenování

### 5.4.1 Chloroplastové úseky

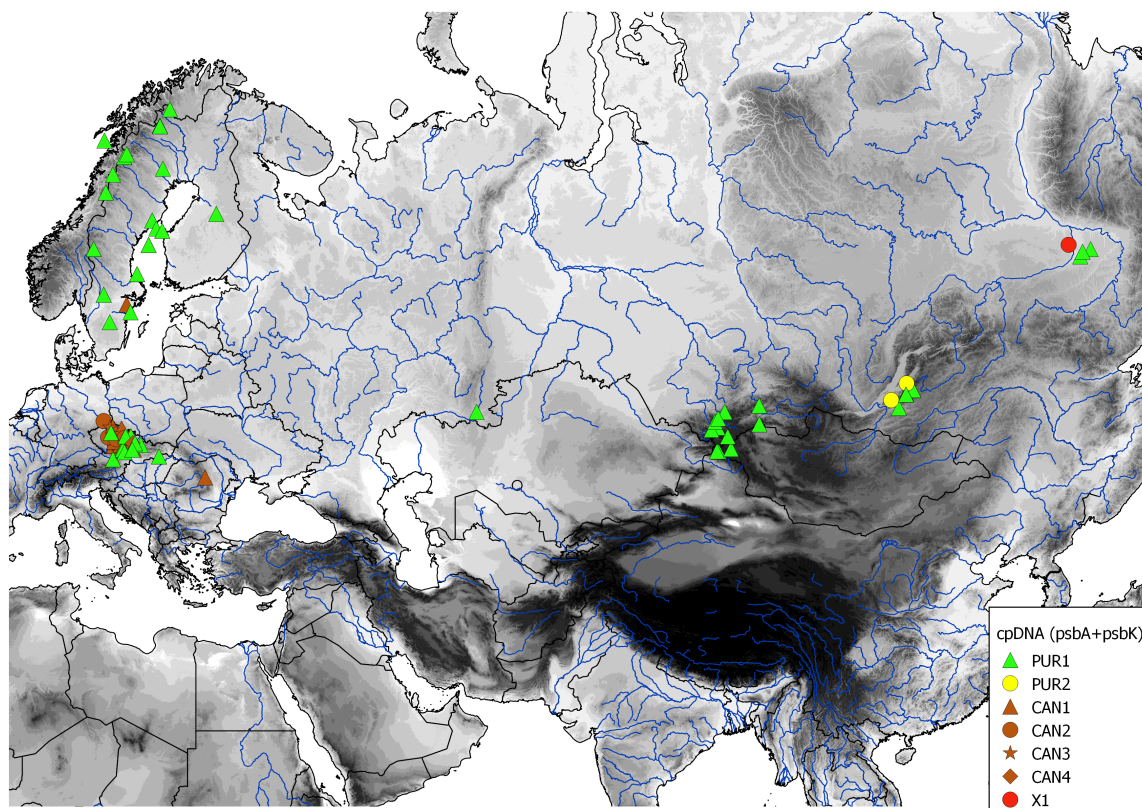
Vzhledem k obtížím při sekvenování úseku *rpl32-trnL* bylo provedeno několik analýz. Nejvíce rostlin (25 rostlin *C. canescens* a 80 rostlin *C. purpurea* agg. – 21 ze střední Evropy, 29 ze Skandinávie, 29 z Asie a 1 ze Severní Ameriky) bylo zařazeno do společné analýzy chloroplastových úseků *psbA-trnH* (délka zalignovaného úseku byla 594 bází) a *psbK-trnS* (délka zalignovaného úseku byla 577 bází). Tato analýza odhalila ve skupině *C. purpurea* agg. 2 velmi blízké haplotypy. Dominantní haplotyp Pur1 byl zaznamenán u drtivé většiny rostlin z Evropy, Asie i u jediné rostliny ze Severní Ameriky. Druhý haplotyp (Pur) lišící se pouze dvěma bázemi byl zaznamenán pouze u 3 rostlin ze 2 populací u jezera Bajkal (Obr. 14 a Obr. 15). Přičemž v jedné z těchto populací byl zaznamenán i haplotyp Pur1.

U druhu *C. canescens* byla zjištěna podstatně vyšší variabilita v chloroplastové DNA. Na území střední Evropy byly zjištěny 4 haplotypy (CAN 1–4) lišící se jednou nebo dvěma substitucemi (Obr. 16). Dominantní haplotyp byl také zjištěn u rostlin ze Skandinávie.

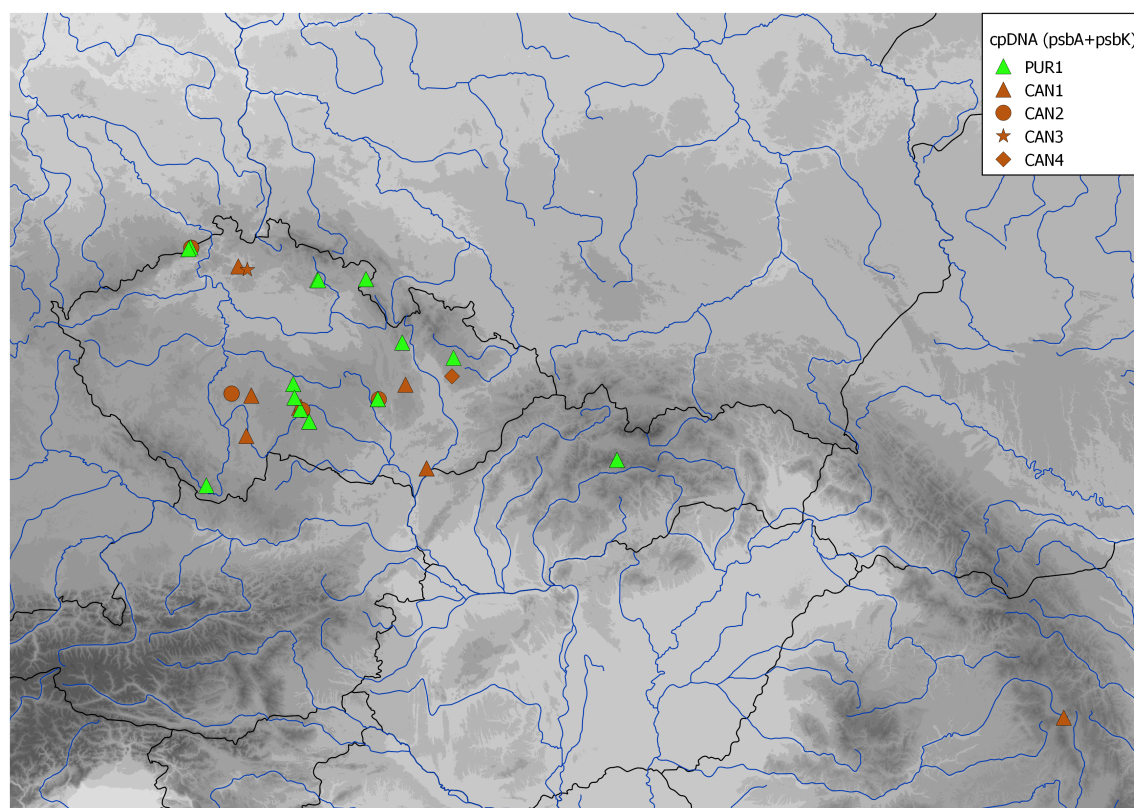
V oblasti řeky Leny byl u rostlin morfologicky podobných *C. purpurea* zjištěn haplotyp (X1) blízký haplotypům *C. canescens* (Obr. 15).



Obr. 14: Haplotypová síť (úseky *psbA-rnH<sup>GUG</sup>* a *psbK-trnS<sup>GCU</sup>*) sekvenovaných populací *C. purpurea* agg. a *C. canescens*.



Obr. 15: Výskyt zjištěných haplotypů cpDNA (psbA-trnH+ psbK-trnS) v populacích *C. purpurea* agg. (PUR 1–2, X1) a *C. canescens* (CAN 1–4).

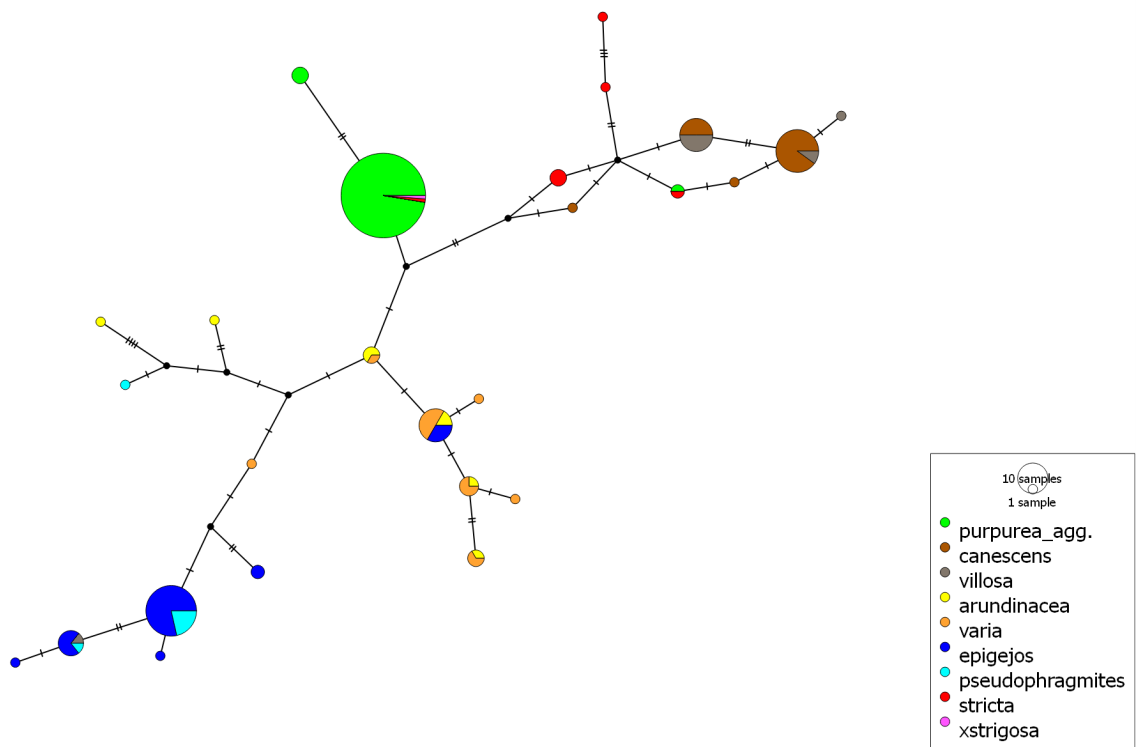


Obr. 16: Výskyt zjištěných haplotypů cpDNA (psbA-trnH+ psbK-trnS) v populacích *C. purpurea* agg. (PUR 1) a *C. canescens* (CAN 1–4).

Do další analýzy těchto dvou úseků byly zahrnuty i sekvence dalších druhů, které přicházejí v úvahu jako potenciální rodiče námi studované *C. phragmitoides* (patřící do agregátu *C. purpurea*), nebo se předpokládá existence možných hybridů se studovanými druhy (bylo použito 35 rostlin *C. epigejos*, 8 rostlin *C. pseudophragmites*, 7 rostlin *C. stricta*, 8 rostlin *C. arundinacea*, 15 rostlin *C. varia*, 10 rostlin *C. villosa* a 1 rostlina *C. ×strigosa*). Výsledná haplotypová síť poměrně dobře ukazuje odlišení na několik skupin (Obr. 17). Hlavní dva haplotypy *C. phragmitoides* se zdají být téměř unikátní. Byly zjištěny pouze u dvou dalších rostlin. Jedna rostlina z Asie morfologicky odpovídala *C. stricta* a druhá ze Skandinávie, která byla morfologicky určena jako *C. ×strigosa* (= *C. epigejos* × *stricta*). Třetí haplotyp zaznamenaný v Asii, blízký *C. canescens* je opět sdílen s druhem *C. stricta*.

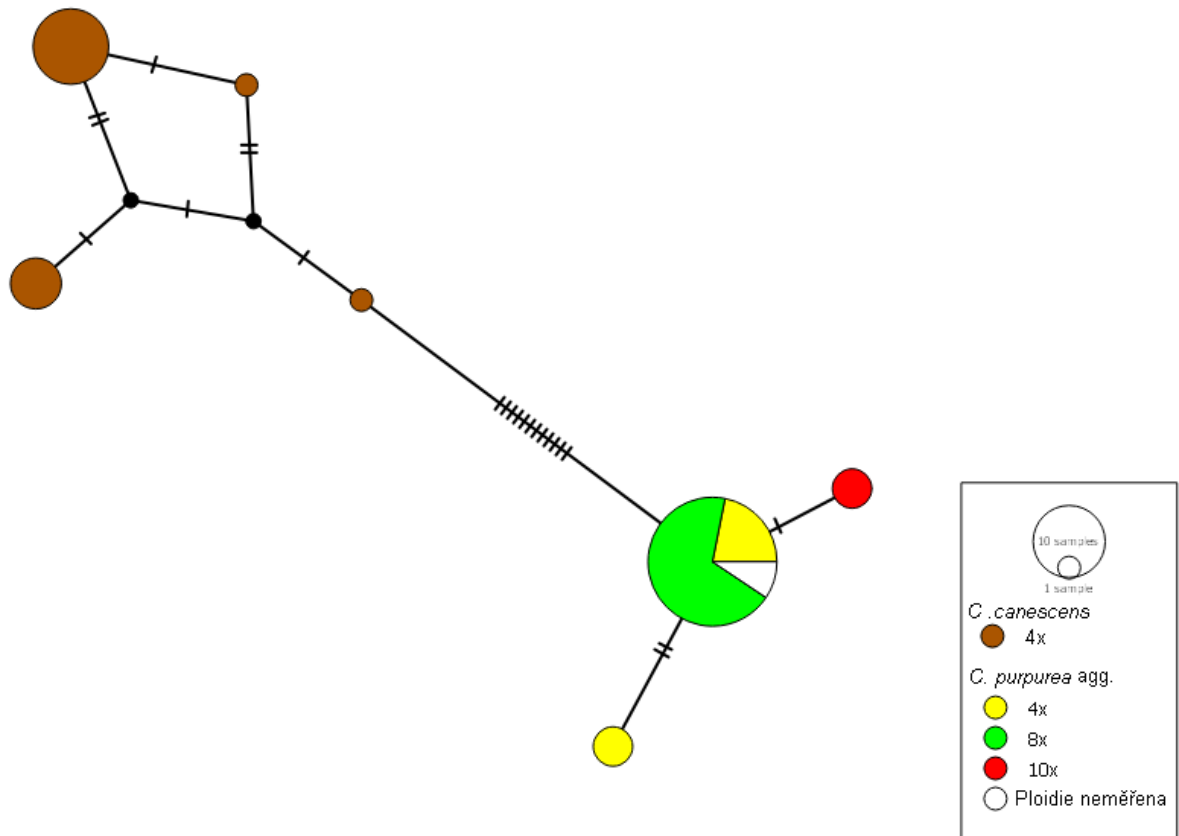
Haplotypy *C. stricta* jsou blízké haplotypům *C. canescens*, které jsou převážně sdíleny s *C. villosa* (Obr. 17).

*C. epigejos* patří do další skupiny haplotypů, které sdílí s *C. pseudophragmites*. Do této skupiny se přimíchávají i *C. varia* a *C. arundinacea*. *C. epigejos* je poměrně geneticky vzdálená od *C. phragmitoides* i *C. canescens*.



Obr. 17: Haplotypová síť (úseky psbA-trnH a psbK-trnS) sekvenovaných populací *C. purpurea* agg., *C. canescens* a sekvenovaných populací zájmových taxonů.

Všechny 3 úseky chloroplastové DNA (psbA-trnH, psbK-trnS, rpl32-trnL) byly oskvenovány u 18 rostlin *C. canescens* a 38 rostlin *C. purpurea* agg. Délka zalignovaného úseku rpl32-trnL byla 539 bází. Po přidání třetího úseku cpDNA do analýzy nepřibýly další haplotypy *C. canescens* (Obr. 18). U *C. purpurea* přibyl jeden haplotyp s osmi-bázovým indelem, který je omezen pouze na dekaploidní rostliny, pro které je unikátní neohledě na region (Skandinávie, nebo střední Evropa, Obr. 19).



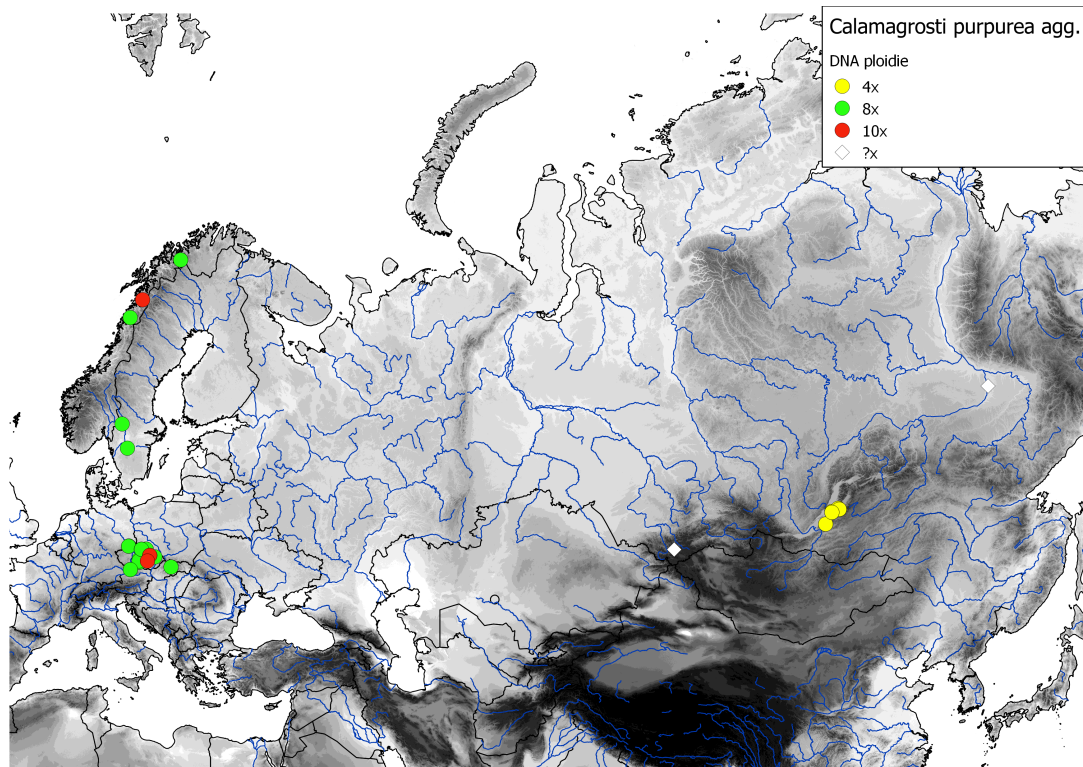
Obr. 18: Haplotypová síť (úseky *psbA-trnH*, *psbK-trnS*, *rpl32-trnL*) sekvenovaných populací *C. purpurea* agg. a *C. canescens*. Jednotlivé ploidní úrovně jsou vyznačeny barevně.

### 5.4.2 Jaderný úsek (ITS)

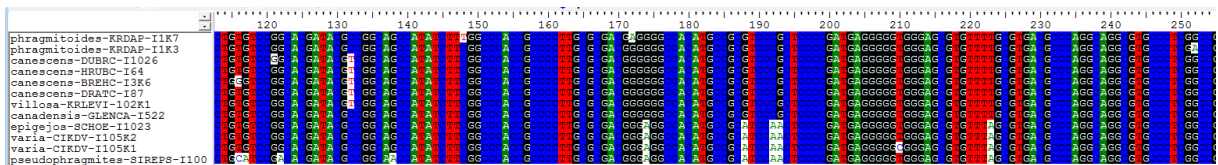
Získané ITS sekvence obsahovaly četné paralogy a byly přímo čitelné jen v některých případech. U několika málo rostlin byly tedy sekvence klonovány. Z různých druhů a z klonovaných sekvencí bylo získáno 12 čistých sekvencí (délka zalignovaného úseku ITS1P-ITS4 byla 579 bází). Přes tyto potíže se ukázalo, že se vymezily dvě jasné skupiny. *C. phragmitoides*, *C. canescens*, *C. canadensis* a *C. villosa* patří do první skupiny, zatímco *C. epigejos*, *C. varia* a *C. pseudophragmites* patří do druhé skupiny (Obr. 20). Tyto výsledky podpořila také výsledná ribotypová síť (Obr. 21).

Když do analýzy zahrneme i další sekvence se zjevnými paralogy – degenerovanými bázemi (106 sekvencí), je celkem patrné, že obě skupiny se stále separují (Obr. 22). V rámci těchto skupin však došlo ke spojení v důsledku degenerovaných bází.

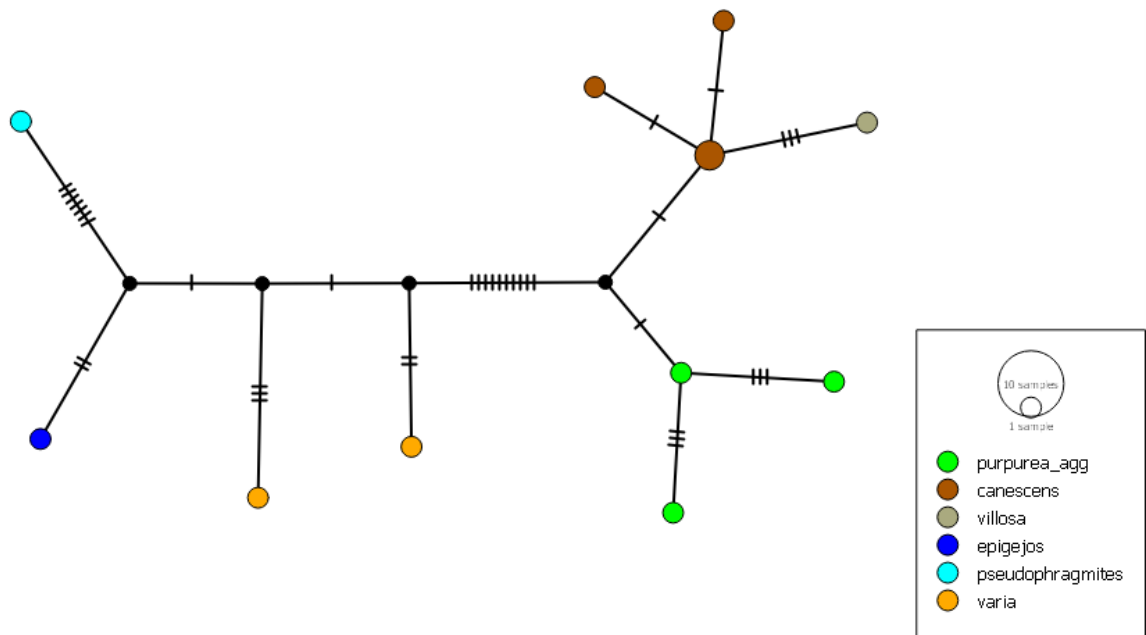




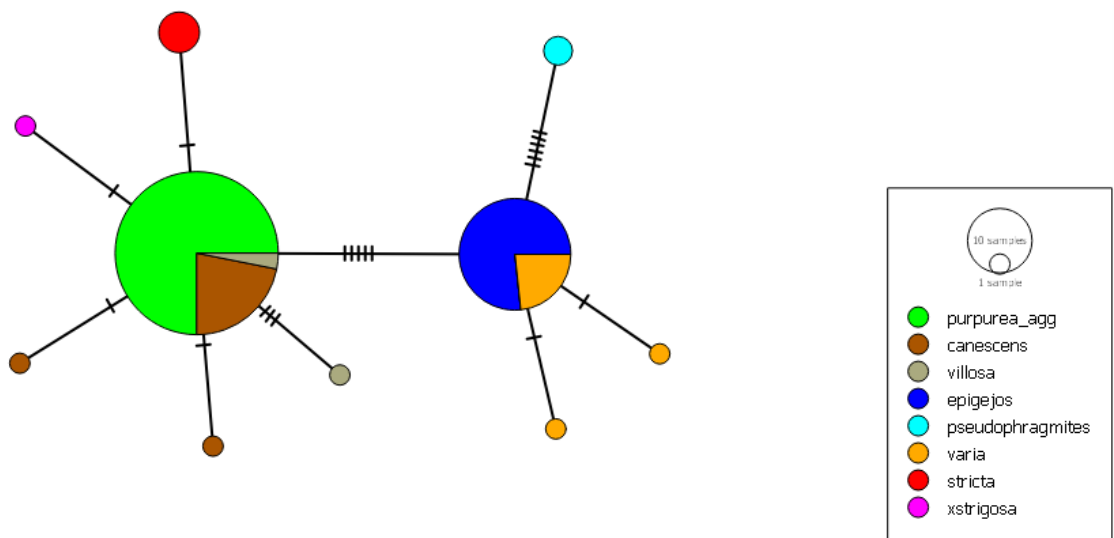
Obr. 19: Výskyt zjištěných ploidních úrovní v populacích *C. purpurea* agg. (PUR 1), ze kterých byly získány sekvence. Otazník značí sekvenované populace, u kterých nebyla změřena ploidie.



Obr. 20: Nalezené ribotypy v úseku ITS1P-ITS4.



Obr. 21: Ribotypová síť (úsek ITS1P-ITS4) *C. purpurea* agg. a dalších druhů rodu *Calamagrostis* z přímých sekvencí bez zřetelné přítomnosti paralogů a klonovaných sekvencí. Jednotlivé druhy a skupiny jsou vyznačeny barevně. Zahrnuty jsou i sekvence s degenerovanými bazemi. Jednotlivé druhy a skupiny jsou vyznačeny barevně.



Obr. 22: Ribotypová síť (úsek ITS1P-ITS4) *C. purpurea* agg. a dalších druhů rodu *Calamagrostis* z přímých i klonovaných sekvencí. Zahrnuty jsou i sekvence s jasnými paralogy, a tedy degenerovanými bázemi. Jednotlivé druhy a skupiny jsou vyznačeny barevně.

# 6 Diskuze

## 6.1 Agregát *C. purpurea*

V literatuře je pro agregát *Calamagrostis purpurea* uváděna značná variabilita v ploidní úrovni i počtu chromosomů (Mitchell, 1968; Tzvelev, 1965). Chromosomové počty uváděné pro evropské rostliny *C. phragmitoides* (Conert, 1989) jsou z velké části založeny na údajích Nygrena. Uváděné hodnoty jsou 56–91 (Nygren, 1946). Na území Evropy však jednoznačně převládají oktoploidní populace, kterým odpovídá počet chromosomů 56. Velmi vzácná je úroveň dekaploidní odpovídající  $2n=70$ . Zdá se velmi pravděpodobné, že variabilita v počtu chromosomů v přírodních populacích není tedy tak velká a výskyt aneuploidních rostlin, které se uvádějí v literatuře, je mimořádně vzácný. Nelze vyloučit, že se tyto údaje (56–91) vztahují především na rostliny získané umělou hybridizací mezi druhy *C. canescens* a *C. epigejos* (Nygren, 1946).

O situaci mimo území Evropy lze na základě našich dat jen těžko dělat závěry, protože množství zkoumaných populací je velmi malé a lokálně omezené. Ovšem je třeba zmínit, že v okolí jezera Bajkal byly zjištěny pouze tetraploidní populace ( $2n=28$ ).

Většina taxonů *C. purpurea* agg. jsou morfologicky podobné typy, u kterých dosud nebyly s výjimkou izozymů zkoumány molekulární markery. Zjistili jsme, že všechny zkoumané dekaploidní populace *C. purpurea* agg. se od oktoploidních populací liší indelem v úseku *rpl32-trnL*. Protože všechny dosud zkoumané dekaploidní rostliny sdílí tento unikátní haplotyp, lze předpokládat, že mají společný původ nezávislý na vzniku oktoploidních populací. Tato ploidní úroveň se zdá být na území Evropy velmi vzácná. Tetraploidní populace *C. purpurea* agg. ze Sibíře mají jeden unikátní haplotyp a další haplotyp částečně sdílí s oktoploidními populacemi. Vzhledem k výsledkům cytometrického měření lze předpokládat, že se tetraploidi v Evropě nevyskytují a nejsou ani udávány v literatuře (Conert, 1989). Vzhledem k dosud zjištěné variabilitě a variabilitě uváděné na Sibíři se zdá zatím vhodnější neodlišovat Evropské rostliny od Sibiřských. Minimálně ne na druhové úrovni a do doby než bude dostatečně známa distribuce cytotypů napříč celou Eurasií.

Hybridizace je u třtin často uváděným jevem. Známá je např. *C. ×strigosa* (hybrid *C. stricta* s *C. epigejos*), běžně je udávána *C. ×acutiflora* (hybrid *C. arundinacea* s *C. epigejos*), a také hybridizace mezi nepříliš podobnými druhy – např. *C. ×gracilescens*



(hybrid *C. canescens* a *C. stricta*), *C. hartmaniana* (*C. arundinacea* a *C. canescens* a mnohé další (Conert 1989). Analýza haplotypů potvrzuje, že hybridizace hraje naopak významnější roli ve skupině *C. arundinacea*, *C. varia* a *C. epigejos*, případně u *C. pseudophragmites*. Vznik evropských rostlin *C. purpurea* je rovněž tradičně vysvětlován také hybridizací, a to *C. canescens* s některým z dalších druhů (Scholz, 1971).

Zjištěné údaje však poněkud mění tradiční pohled na míru hybridizace v tomto agregátu. Detekované haplotypy cpDNA ukazují, že hybridizace ve skupině *C. purpurea* nebude příliš běžným jevem a ani v minulosti tomu tak spíše nebylo. Ve skupině *C. purpurea* agg. by potenciálně mohla vzácně probíhat hybridizace s *C. stricta*, čemuž napovídá společný haplotyp několika rostlin *C. purpurea* agg. a *C. stricta* na Sibiři. Navíc dominantní haplotyp *C. purpurea* agg. byl zjištěn také u rostlin *C. stricta* a *C. ×strigosa*.

Zajímavým výsledkem je sdílení haplotypů *C. canescens* a *C. villosa*. I když jsou u *C. villosa* uváděny různé chromozomové počty (Conert, 1989), je velmi pravděpodobné, že zcela převažujícím nebo dokonce výhradním cytotypem *C. villosa* jsou dekaploidi ( $2n=70$ ; Krauhlová, 2003; naše nepublikované analýzy). Vzhledem k této skutečnosti a předpokládané alespoň částečné mezi-ploidní bariéře lze spíše spekulovat, že sdílení haplotypů mezi druhy *C. canescens* a *C. villosa* lze spíše vysvětlit jako důsledek dávného vzniku *C. villosa* za účasti *C. canescens* jako mateřské rostliny než jako indikátor nějaké recentnější hybridizace mezi těmito druhy (Krauhlová, 2003).

Naše data jednoznačně vylučují teoretický vznik *C. phragmitoides* hybridizací *C. canescens* s *C. epigejos* jak byl formulován především na základě morfologického srovnání (Nygren, 1946; Scholz, 1971; Tzvelev, 1965). *C. phragmitoides* má převažující haplotypy, které nejsou blízce příbuzné se zjištěnými haplotypy *C. canescens* ani *C. epigejos*. Ani jeden z těchto druhů nemůže být proto mateřskou rostlinou. *Calamagrostis epigejos* navíc nesdílí s *C. purpurea* ani žádné charakteristiky v jaderné DNA, takže nelze předpokládat její podíl ani na základě tohoto markeru. Naopak, ITS ribotypy *C. canescens* a *C. purpurea* jsou velmi blízké a navíc se zdá, že se v některých populacích především *C. purpurea* kombinují. Ani vyšší ploidní úroveň evropských rostlin *C. purpurea* neříká nic o vztahu tohoto druhu k *C. canescens*. Na Sibiři se vyskytuje stejná ploidní úroveň *C. purpurea* agg. jako má *C. canescens* a rostliny se zdají být dobře vymezené a morfologicky velmi podobné evropským rostlinám s vyšší ploidí. Zdá se, že by *C. canescens* a *C. purpurea* mohly být dva už poměrně dávno izolované a samostatné taxony. Areál *C. canescens* asi není moc rozsáhlý. Tento druh nebyl potvrzen ani z Uralu, odkud je udáván a odkud pocházela rostlina určená původními sběrateli jako *C. canescens*. Při podrobném morfologickém studiu se však i tato rostlina shoduje důležitými znaky (např. odění jazýčku) s ostatními rostlinami *C. purpurea* a její morfologie je tak v souladu se zjištěnými molekulárními charakteristikami.

## 6.2 Odlíšení taxonů *C. purpurea* agg. a morfologicky podobných typů

Zkoumané rostliny agregátu *C. purpurea* byly porovnávány s druhem *C. canescens*, se kterým byl druh v minulosti zaměňován a je mu značně podobný a roste na velmi podobných biotopech (Grulich, 1986; Grulich in Kubát et al., 2002).

V literatuře se druhy *C. phragmitoides* a *C. canescens* rozlišují na základě několika znaků: počet kolének, barva a délka listů, délka jazýčků a jejich odění, délka laty a pozice osiny na pluše (Grulich in Kubát et al., 2002; Conert, 1989). Bylo zjištěno, že *C. canescens* jsou oproti střeoevropským rostlinám *C. phragmitoides* celkově menší, a to v délce laty a jejich částí, délce obou listů, nebo délce obou jazýčků, což odpovídá údajům z literatury (Grulich in Kubát et al., 2002; Conert, 1989). Kromě těchto morfologických znaků byly zjištěna rozdíly mezi těmito druhy v šířce listů, odění listu a délky částí laty. Rostliny *C. canescens* se častěji větví, mají častěji červeně zbarvené stéblo a husté chlupy na čepeli listu. Obě zjištěné ploidie *C. phragmitoides* (8x a 10x) se větví méně často a na čepeli listů mají nejčastěji jen krátké chlupy. Rozdíly uváděné v dosavadní literatuře v počtu kolének (Grulich in Kubát et al., 2002) neodpovídají skutečnosti.

Zjištěné morfologické rozdíly potvrdila i lineární diskriminační analýza (LDA). Bylo zjištěno, že nejlépe lze druhy *C. canescens* a *C. phragmitoides* rozlišit na základě znaků: délka jazýčku 1 a 2, větvení a šířka listu 1. Navýšení počtu populací, u kterých byly změřeny morfologické znaky oproti bakalářské práci (Schaabová, 2013) zdůraznilo význam větvení a šířky nejhořejšího listu.

Změřená dekaploidní populace se nachází na kraji morfologické variability *C. phragmitoides*. Rostliny z dekaploidní populace Štítý jsou oproti oktoploidním rostlinám celkově mohutnější, větší a méně se větví. Nejlépe je lze od oktoploidních rostlin rozlišit na základě šířky druhého nejvyššího listu, délky laty, počtem kolének a délkou jazýčku nejhořejšího listu. Morfologické rozdíly v ploidních úrovních jsou však příliš malé na to, aby mělo smysl ploidie morfologicky rozeznávat.

Ačkoliv je *C. phragmitoides* morfologicky velmi podobná ostatním taxonům *C. purpurea* agg., v literatuře jsou uváděny některé rozdíly: *C. canadensis* se zřídka větví, má dlouhé a široké listy, dlouhé robustní klásky a jemnou osinou na blanité pluše (Mitchell, 1968), zatímco *C. purpurea* má užší listy jasně zelené barvy, poměrně husté laty s o něco kratšími nahloučenými klásky (Tzvelev, 1965). *C. langsдорfi* má být oproti *C. purpurea* mohutnější, má mít širší šedo-zelené listy, řidší široce rozložené laty a delší klásky (Tzvelev, 1965). Fenotypový projev znaků je však pod silným tlakem prostředí a bylo by potřeba pořádně je prozkoumat v centru morfologické diverzity.

## 6.3 Průtoková cytometrie

Podle výsledků průtokové cytometrie předpokládáme u druhu *C. canescens* pouze tetraploidní úroveň ( $2n=28$ ), zatímco u druhu *C. purpurea* tetraploidní ( $2n=28$ ), oktaploidní ( $2n=56$ ) a dekaploidní úroveň (pravděpodobně  $2n=70$ ). Bylo zjištěno, že mezipopulační variabilita druhu *C. canescens* je poměrně značná a přesahuje 7 % (v měření na DAPI). U změřených oktaploidních rostlin *C. purpurea* byla zjištěna variabilita ve velikosti genomu na DAPI necelých 6% (většina variability je mezipopulační). Vnitropopulační variabilita obou ploidí *C. purpurea* na DAPI je přes 1 %, což je v rámci chyby měření cytometru (cytometr Partec PA II má chybu měření až 4 %). Pro oktaploidní úroveň *C. purpurea* byla spočítána Cx-hodnota (velikost jedné chromozomé sádky): 1.84 pg, zatímco pro dekaploidní populace byla Cx-hodnota 1,82 pg. V literatuře se uvádí pouze Cx-hodnota pro druh *C. epigejos* a to 2.20 pg (Zonneveld, 2005).

## 7 Závěr

Rod *Calamagrostis* je taxonomicky komplikovaný z důvodu poměrně velkého množství popsaných druhů, které nejsou snadno poznatelné, mají velkou fenotypovou plasticitu a malé množství spolehlivých morfologických znaků, kterými by je bylo možné od sebe snadno rozlišit. Cirkumpolární agregát *C. purpurea*, ve kterém je rozlišováno množství taxonů (*C. phragmitoides*, *C. purpurea*, *C. langsдорфii*, *C. canadensis*) je toho důkazem. V tomto agregátu se na území Evropy podařilo rozlišit 2 ploidní úrovně. Oktoploidní úroveň jednoznačně dominuje, dekaploidní úroveň je vzácná. Naopak v Asii byly zjištěny pouze tetraploidní rostliny. Variabilita asijských třtin bude pravděpodobně větší než jak se může zdát z našeho malého množství dat. Nicméně je zajímavé, že tetraploidi rostly výhradně v Asii, zatímco oktoploidi v Evropě.

Oktoploidní a dekaploidní populace jsou morfologicky téměř shodné, avšak liší se indelem v jednom chloroplastovém úseku (rpl32-trnL). Většina oktoploidních a tetraploidních populací napříč Eurasii sdílí jediný haplotyp cpDNA a nejeví jasné rozdíly ani v ITS úseku jaderné DNA. Proto není zjevný důvod oddělovat evropské rostliny do samostatného druhu. Lze vyloučit, že by evropské rostliny vznikly hybridizací *C. canescens* a *C. epigejos*. Zřetelná a důsledná odlišnost haplotypů chloroplastové DNA mezi druhy *C. phragmitoides* a *C. canescens* vylučuje, že by rostliny *C. canescens* mohly v případné dávné hybridizaci těchto skupin vystupovat jako mateřské rostliny.

Je pravděpodobné, středoevropské rostliny agregátu *C. purpurea* nejsou obligátně apomiktické, jak se předpokládalo. Naopak izozymová variabilita druhu *C. canescens* víceméně odpovídá jeho předpokládané sexuální reprodukci.

---

## Reference

- Acquaah, G. et Dudley, T. R. (1992). Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research. DIOSCORIDES PRESS, Portland, Oregon.
- Bednář, V., Deyl, Č. et Trávníček, B. (1991). Druhý floristický příspěvek ke květeně Nížkého Jeseníku. Acta Univ. Palack. Olomouc., Fac. ner. nat. 104. Biol. 31, 95–113.
- Braak, C. J. F. T. et Šmilauer, P. (2012). Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer Power Ithaca, USA.
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D. et Crandall, K. (2002). TCS: Estimating Gene Genealogies. In 16th International Parallel and Distributed Processing Symposium vol. 2, p. 184, Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp, Fort Lauderdale, FL, USA.
- Conert, H. J. (1989). *Calamagrostis*. In Illustrierte Flora von Mitteleuropa, (Hegi, G., ed.), pp. 357–380. Paul Parey Hamburg.
- van Dijk, P. J. et 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 pp. 101–116. International Association for Plant Taxonomy, Institute of Botany, University of Vienna Vienna. Austria.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L. et Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. Annals of Botany 82 (Supplement A), 17–26.
- Doležel, J., Greilhuber, J. et Suda, J. (2007a). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature Protocols 2, 2233–2244.
- Doležel, J., Greilhuber, J. et Suda, J., eds (2007b). Flow Cytometry with Plant Cells. WILEY-VCH, Weinheim.
- Greilhuber, J. (2005). The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms 'Genome Size' and 'C-Value' to Describe Nuclear DNA Contents. Annals of Botany 95, 255–260.
- Grulich, V. (1986). Klíč k určování československých druhů rodu *Calamagrostis*. Muzeum a současnost, řada přírodovědná edition, Roztoky u Prahy. 1, 31–40.
- Grulich, V. (2002). *Calamagrostis* Adans. In Klíč ke květeně České republiky, (Kubát, K. et al., eds), pp. 861–863. Academia Praha.
- Grulich, V. (2012). Red list of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. Preslia, Praha 84, 631–645.

- 
- Haeckel, E. (1883). Über das Vorkommen von *Calamagrostis phragmitoides* Hartm. in Deutschland. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 1, 161–162.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95–98.
- Hand, M. L., Vít, P., Krahulcová, A., Johnson, S. D., Oelkers, K., Siddons, H., Chrtek, J., Fehrer, J. et Koltunow, A. M. G. (2015). Evolution of apomixis loci in *Pilosella* and *Hieracium* (*Asteraceae*) inferred from the conservation of apomixis-linked markers in natural and experimental populations. Heredity 114, 17–26.
- Hartman, C. J. (1832). *Calamagrostis*. In Skandinaviens Flora innefattande Sveriges och Norriges Vexter, till och Med Mossorna pp. 20–22. Zacharias Haeggstroem Stockholm.
- Hultén (1986). Atlas of north European vascular plants north of the Tropic of Cancer. 3 vols. Koeltz Scientific Books, Königstein.
- Hunter, R. et Markert, C. (1957). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science 125, 1294–1295.
- Kadereit, J. (1995). Chloroplast DNA and isozyme analysis of the progenitor-derivative species relationship between *Senecio nebrodensis* and *S. viscosus* (*Asteraceae*). American Journal of Botany 89, 1179–1185.
- Koressaar, T. et Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics (Oxford, England) 23, 1289–1291.
- Krahulcová, A. (2003). Chromosome numbers in selected monocotyledons (Czech Republic, Hungary, and Slovakia). Preslia, Praha 75, 97–113.
- Krok, T., Almquist, S., Jonsell, L. et Jonsell, B. (2013). Svensk flora: Fanerogamer och kärlkryptogamer. Liber, Stockholm.
- Krzakowa, M. et 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. et 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. et 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.

- 
- Leigh, J. W. et Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 1110–1116.
- Lid, J., Elven, R. et Lid, D. T. (1994). Norsk flora. Norske samlaget.
- Link, H. F. (1895). *Enumeratio Plantarum Horti Regii Botanici Berolinensis altera. Pars I. Mo. Bot. Garden.*
- Lu, S., Chen, W. et Phillips, S. M. (2006). 87. DEYEUXIA Clarion ex P. Beauvois, Ess. *Agrostogr.* 43. 1812. In *Flora of China*, (Wu, Z., Raven, P. et Hong, D., eds), vol. 22, pp. 348–359. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- MacDonals, S. E. et 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.
- Mitchell, W. (1968). Taxonomy, variation, and chorology of three chromosome races of the *Calamagrostis canadensis* complex in Alaska. *Madroño* 19, 235–246.
- Moldovan, A. (1934). Photoelectric Technique For The Counting of Microscopical Cells. *Science* 80, 188–189.
- Nygren, A. (1946). The Genesis of Some Scandinavian Species of *Calamagrostis*. *Hereditas* 32, 131–262.
- 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. (1958). Investigation on North American *Calamagrostis*. II. *Ann. Roy. Agric. Coll. Sweden* 24, 363–368.
- Ondráček, Č. (2011). Rozšíření třtiny nachové (*Calamagrostis phragmitoides* Hartman) a poznámky k výskytu *C. canescens* (Weber) Roth v Krušných horách. *Severočeská Příroda, Ústí nad Labem* 42, 21–30.
- Otto, F. (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In *Methods in Cell Biology*, (Crissman, H. A. and Darzynkiewicz, Z., eds), vol. 33, pp. 105 – 110. Academic Press New York.
- Ozias-Akins, P. (2006). Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 199–214.
- PartecGmbH (2007). FloMax 2.6.

- 
- Petit, C., Arnal, H. et Darmency, H. (2015). Effects of fragmentation and population size on the genetic diversity of *Centaurea cyanus* (*Asteraceae*) populations. *Plant Ecology and Evolution* 148, 191–198.
- Phillips, S. M. et Chen, W.-L. (2003). Notes on grasses (*Poaceae*) for the Flora of China I: Deyeuxia. *Novon* 13, 318–321.
- Procházka, F., Danihelka, J., Grulich, V., Hadinec, J., Havlíček, P., Hrouda, L., Chrtek, J. j., Kaplan, Z., Kirschner, J., Kirschnerová, L., Klaudisová, A., Kubát, K., Řehořek, V., Skála, Z., Šída, O., Štech, M., Štěpánek, J., Štěpánková, J., Větvíčka, V., Trávníček, B., Zázvorka, J., Bureš, P. et Čerovský, J. (2001). Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000) (Black and Red List of Vascular Plants of the Czech Republic - 2000). *Příroda*, Praha.
- Roshevitz, R. (1934). *Calamagrostis*. In *Fl. USSR* 2, (Komarov, V. L., ed.), vol. 2, pp. 189–230. *Academiae Scientiarum URSS Leningrad*.
- 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. (2005). Dva nové nálezy *Calamagrostis phragmitoides* Hartman na Českomoravské vrchovině. *Acta rerum naturalium* 1, 57–59.
- Řepka, R., Kučera, J. et Bílek, J. (1998). Příspěvek ke květeně Řeřišného v CHKO Broumovsko. *Východočeský sborník přírodovědný. Práce a studie* 6, 153–154.
- Řepka, R. et Lustyk, P. (1997). Floristické údaje vybraných druhů pro Květenu Šumavy. *Zprávy České botanické společnosti* 32, 161–181.
- Saarela, J. M., Liu, Q., Peterson, P. M., Soreng, R. J. et Paszko, B. (2010). Phylogenetics of the grass ‘*Aveneae*-type plastid DNA clade’ (*Poaceae: Pooideae, Poeae*) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequence data. *Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledons* -, 557–587.
- Schaabová, V. (2013). Taxonomická problematika rodu *Calamagrostis phragmitoides* ve střední Evropě. Bc. thesis, Jihočeská Univerzita České Budějovice.
- Scholz, H. (1971). Gegenwärtige Kenntnisse über die Verbreitung der *Calamagrostis phragmitoides* Hartm. (Purpureitgras) in Mitteleuropa. *Philippia. Abhandlungen und Berichte aus dem Naturmuseum im Ottoneum zu Kassel. Kassel* 1, 85–90.



- 
- Simmons, M. P. et Ochoterena, H. (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic biology* 49, 369–381.
- Singh, R. J. (2002). *Plant Cytogenetics*. Second edition edition, CRC Press, New York.
- Smejkal, M. (1976). *Calamagrostis phragmitoides*, nový druh československé flóry. *Preslia*, Praha 48, 124–130.
- Soltis, D. E. et Soltis, P. S., eds (1990). *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, London.
- Sonnante, G., Spinosa, A., Marangi, A. et Pignone, D. (1997). Isozyme and RAPD Analysis of the Genetic Diversity Within and Between *Vigna luteola* and *V. marina*. *Annals of Botany* 80, 741–746.
- StatSoft, I. (2015). STATISTICA 12 (data analysis software system).
- Stecconi, M. (2004). Natural Hybridization between a *Deciduous* (*Nothofagus antarctica*, *Nothofagaceae*) and an Evergreen (*N. dombeyi*) Forest Tree Species: Evidence from Morphological and Isoenzymatic Traits. *Annals of Botany* 94, 775–786.
- Strasburger, E., Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. et Bresinsky, A. (2002). *Strasburger - Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 34. Aufl. korr. nachdruck edition, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Foggi, B. et 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.
- Tateoka, T. (1974). A Cytotaxonomic Study of the *Calamagrostis purpurea* – *langsdorffii-canadensis* Complex in the Lowlands of Hokkaido. *Bot. Mag. Tokyo* 87, 237–251.
- Thebaud, C. et Abbott, R. J. (1995). Characterization of Invasive *Conyza* Species (*Asteraceae*) in Europe: Quantitative Trait and Isozyme Analysis. *American Journal of Botany* 82, 360.
- Torges, E. (1898). Zur Gattung *Calamagrostis* Adans. In *Mittheilungen des Thüringischen Botanischen Vereins*. pp. 22–25. Im selbstverlage des Vereins. Weimar.
- TreeStar, I. (2015). FlowJo 10.0.8.
- Trinius, C. B. (1821). Trinius agrostographische Beyträge. In *Neue Entdeckungen im ganzen Umfang der Pflanzenkunde*, (Sprengel, K., ed.), pp. 51–54. F. Fleischer Leipzig 2 edition.

- 
- Tzvelev, N. N. (1965). K sistematike roda vejnik (*Calamagrostis* Adans.) v SSSR. (De genere *Calamagrostis* Adans, in URSS notulae systematicae.). Nov. Sist. Vysš. Rast., Moskva-Leningrad 2, 5–50.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. et Rozen, S. G. (2012). Primer3–new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40, e115.
- Vašut, R. J., Vijverberg, K., van Dijk, P. J. et de Jong, H. (2015). Fluorescent in situ hybridization shows diplosporous located on one of the nor chromosomes in apomictic dandelions (*Taraxacum*) in the absence of a large hemizygous chromosomal region. Genome 57, 609–620.
- Wasiljev, W. N. (1961). Das System der Gattung *Calamagrostis*. Feddes Repert. Sp. Nov. Regni Veg. 63, 229–251.
- Webb, D. A. (2010). *Calamagrostis* Adanson. In Flora Europaea, (Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H. et Walters, S. M., eds), pp. 236–239. Cambridge University Press.
- Zonneveld, B. J. M. (2005). First Nuclear DNA Amounts in more than 300 Angiosperms. Annals of Botany 96, 229–244.

# Přílohy

## Příloha I

Příloha I: Lokality *C. purpurea* agg. Znak 'X' značí, jaká metoda byla pro danou populaci provedena. Souřadnice jsou v systému WGS 84.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rpl32	ITS	Isozymy	Popis lokality
HERSPH	10x	X		X	X	X	X		ČR, Českomoravská vrchovina, Bedřichov: chráněné území Hersica cca 1.7 km SSZ obce, 615 m n. m.; 49.4718 N, 16.4632 E; 2013-06-26; Schaabová V. et Štech M.
BLIZPH	8x	X							ČR, Šumava, Bližná: okraj rašelinné louky ca 1.5 km JJV od obce, 740 m n. m.; 48.7099 N, 14.1047 E; 2013-06-24; Schaabová V. et Štech M.
BOROPH	8x			X	X	X	X	X	ČR, Podkrkonoší, Borovnice I, zazeněný lesní rybníček, zrašelinělý (rašeliníky + <i>Polytrichum commune</i> , <i>Cx. canescens</i> , <i>Cx. rostrata</i> , <i>Junc. filiformis</i> , <i>Agrostis canina</i> ,...), porost cca 10 x 20 m, 480 m n. m., 50.4956 N, 15.6389 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
BOR2PH	8x			X	X	X	X		ČR, Podkrkonoší, Borovnice, Borovnička: zarůstající nekosená rašelinná louka v nivě potoka asi 1,3 km JZ od kostela, 470 m n. m.; 50.4952 N, 15.6527 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
HOJKPH	8x	X	X	X	X	X	X		ČR, Českomoravská vrchovina, Hojkov: louky ve východní části Hojkovského rašeliniště ca 770 m J od kostela v obci, 650 m n. m.; 49.3820 N, 15.414 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
KRDAPH	8x	X	X	X	X	X	X		ČR, Krušné hory, Krásný Les: aluvium bezejmenného potoka pod dálnicí D8 ca 1.1 km SSV od zámku v obci pod dálnicí v údolí, 610 m n. m.; 50.7748 N, 13.9439 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
KRDPPH	8x	X	X						ČR, Krušné hory, Krásný Les: pramenišťe severně od dálnice D8 ca 1.25 km S od zámku v obci, 620 m n. m.; 50.7771 N, 13.9408 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
KRHRPH	8x	X	X						ČR, Krušné hory, Krásný les: pramenišťe u staré cesty přes pravostranný přítok Hraničního potoka ca 3.1 km Z od zámku v obci, 625 m n. m.; 50.7718 N, 13.8948 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
KRLAPH	8x	X	X						ČR, Krušné hory, Krásný Les: rozsáhlé pramenišťe v údolí Liščího potoka ca 960 m J od zámku v obci, 660 m n. m.; 50.7576 N, 13.9366 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
KRLEPH	8x	X	X	X	X	X		X	ČR, Krušné hory, Krásný Les: zarostlé louky na pravém břehu bezejmenného potoka ca 1.6 km ZJZ od zámku v obci, 670 m n. m.; 50.7592 N, 13.9176 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
MLADPH	8x	X		X	X	X			ČR, Českomoravská vrchovina, Mladé Bříšťe: degradované louky v aluviu na levém břehu Kladinského potoka ca 500 m J od kostela v obci 490 m n. m.; 49.4859 N, 15.3346 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
NAKLPH	8x		X						ČR, Krušné hory, Nakléřov: degradované louky 940 m SSZ od křižovatky v obci 720 m n. m.; 50.7513 N, 13.9727 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	trp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
VALTPH	8x	X	X	X	X		X		ČR, Jesenické Podhůří, Nové Valteřice: mokřina na levém břehu potoka Lesní pod silnicí Nové Valteřice - Moravský Beroun ca 1.4 km JJZ od kostela v obci, 570 m n. m.; 49.8308 N, 17.4615 E; 2012-07-03; Schaabová V. et Štech M.
OTINPH	8x	X	X						ČR, Českomoravská vrchovina, Otín: okraj lesní cesty východně silnice Stonařov - Dlouhá Brtnice ca 1.6 km VJV od obce, 630 m n. m.; 49.2605 N, 15.5909 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
PLANIPH	8x	X	X	X	X	X	X	X	ČR, Šumava, Plánička: louky a prameniště v PP Kotlina pod Pláničských rybníkem ca 1.8 km VJV od obce 745 m n. m.; 48.7167 N, 14.1564 E; 2013-06-24; Schaabová V. et Štech M.
PAREPH	8x	X	X	X	X	X			ČR, Českomoravská vrchovina, Proseč, Staré Hutě: litorální porosty v jižní části rybníka Pařez ca 880 m J od obce 570 m n. m.; 49.6047 N, 15.3187 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
RERIPH	8x	X	X	X	X	X	X		ČR, Sudetské mezihoří, Řeřišný: příkop na západním okraji rezervace Řařišný u Machova ca 140 m Z od středu obce 495 m n. m.; 50.5045 N, 16.2913 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
STONPH	8x	X	X					X	ČR, Českomoravská vrchovina, Stonařov: litorální porosty na jižním okraji rybníka Jezírko (Stonařovské jezírko) ca 4 km Z od kostela v obci 610 m n. m.; 49.278084 N, 15.533083 E; 2011-06-27; Schaabová V. et Štech M.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
DRATPH	8x	X		X	X		X		ČR, Českomoravská vrchovina, Stonařov: zarostlé plochy pod elektrickým vedením u jižního přítoku rybníka Stonařovské Jezírko ca 4 km Z od kostela v obci, 650 m n. m.; 49.2774 N, 15.5322 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
STITPH	10x	X	X	X	X	X	X	X	ČR, Hanušovická vrchovina, Štítý: levý břeh řeky Břežná ca 1 km V od kostela v obci, 440 m n. m.; 49.9625 N, 16.7755 E; 2012-09-10; Štech M. et Lustyk P.
DUMBPH	8x	X		X	X	X	X		Slovensko, Nízké Tatry, Ďumbier: karu pod vrcholem, v porostu <i>Salix helvetica</i> v pramenné oblasti Ludárova potoka, 1570 m n. m.; 48.9421 N, 19.6477 E; 2015-07-14; Koutecký P.
ROKUPH	8x			X	X		X		Skandinávie, Finsko, Oulun lääni, NP Rokua: písčité břeh jezera Pitkäjärvi, 140 m n. m.; 64.5547 N, 26.4969 E; 2001-06-29; Koutecký P.
BIRTPH		X		X	X	X	X		Skandinávie, Severní Norsko, Birtavarre: dolní část rokle Sorbmejokta (Ankerlia) ca 9.4 km JV od města Birtavarre, 270 m n. m.; 69.4222 N, 20.9555 E; 2015-08-29; Ekrt L. et Košnar J.
FREDPH		X		X	X		X		Skandinávie, Norsko, souostroví Lofoty, Fredvang: podél turistické cesty na rašeliništi ca 2.3 km SZ od obce Fredvang, 95 m n. m.; 68.0725 N, 13.1236 E; 2015-08-27; Ekrt L. et Košnar J.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
LAKSPH		X		X	X	X	X		Skandinávie, Norsko, Rago national park, Lakshol: spodní část říčního údolí ca 1,3 km od sídla Lakshol, 55 m n. m.; 67.4469 N, 15.8075 E; 2015-09-01; Ekrt L. et Košnar J.
SVARPH		X		X	X	X	X		Norsko, Svartisdal: podél cesty k ledovci Svartisen, na břehu jezera Svar-tisvand v březovém lese, ca 4,9 km ZSZ od sídla Svartisdal, 85 m n. m.; 66.5022 N, 14.1408 E; 2015-08-27; Ekrt L. et Košnar J.
ALIDPH	8x			X	X				Skandinávie, Skandinávie, Åliden: příkop u silnice ca 230 m JV od středu obce, 150 m n. m.; 63.7945 N, 19.3301 E; 2013-07-12; Štech M.
LISCPH	8x	X		X	X		X		Skandinávie, Edsätter: svad nad zálivem moře u poloostrova Edsätter-holmen, 10 m n. m.; 62.9134 N, 18.4075 E; 2013-07-11; Štech M.
JEZEPH	8x	X		X	X		X		Skandinávie, Fauske: okraj silnice ca 7.7 km SSV od obce 40 m n. m.; 67.3242 N, 15.4816 E; 2013-07-19; Štech M.
SKARPH	8x	X		X	X		X		Skandinávie, Skarda: okraj silnice na SZ okraji obce, 260 m n. m.; 64.2119 N, 18.8381 E; 2013-07-12; Štech M.
SNASPH	8x			X					Skandinávie, Snåsa: okraj složiště dřeva na jižním břehu jezera Snåsavat-net, 40 m n. m.; 64.1706 N, 12.0493 E; 2013-07-20; Štech M.
SODRPH	8x			X	X		X		Skandinávie, Söderhamn, 20 m n. m.; 61.27972222 N, 17.02777778 E; 2012; Trávníček B.
SOLEPH	8x	X		X	X				Skandinávie, Sølendet: prameniště v rezervaci Sølendet, 770 m n. m.; 62.6909 N, 11.8406 E; 2013-07-22; Štech M.



Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
SORBPH	8x			X	X		X		Skandinávie, Sörböle, 0 m n. m.; 63.6680 N, 20.0313 E; 2012; Trávníček B.
SILNPH	8x	X		X	X	X	X		Skandinávie, Torsby: okraj silnice ca 7.5 km JJV od města, 100 m n. m.; 60.0739 N, 13.0401 E; 2013-07-23; Štech M.
MUDDPH	8x			X	X				Skandinávie, Laponsko, Muddus: prameniště ca 900 m S od tábořiště Skajdde 290 m n. m.; 66.7794 N, 20.1169 E; 2013-07-13; Štech M.
FULEPH	8x	X		X					Skandinávie, Švédsko, NP Fulufjällets: prameniště u potůčku u informačního střediska na V okraji národního Parku, 700 m n. m.; 61.6366 N, 12.7187 E; 2013-07-23; Štech M.
BILIPH				X	X	X	X		Skandinávie, Švédsko, Skövde, oblast Bilingen: mokřady ca 5 km ZSZ od centra města, 285 m n. m.; 58.4008 N, 13.7611 E; 2015-08-23; Ekrt L. et Košnar J.
UPPSPH	8x			X	X		X		Skandinávie, Katrineholm: okraj silnice ca 3 km SV od středu města, 60 m n. m.; 59.0096 N, 16.2466 E; 2013-07-10; Štech M.
OVRTPH	8x			X	X				Skandinávie, Øvre Dividal: okolí potoka jižně tábořiště Langneset, 300 m n. m.; 68.7249 N, 19.7544 E; 2013-07-16; Štech M.
OVREPH	8x			X	X		X		Skandinávie, Øvre Dividal: údolí potoka v NP jižně od Tronga, 330 m n. m.; 68.69726803 N, 19.76809703 E; 2013-07-16; Štech M.
UKOKP				X	X		X		Rusko, Altaj, Pánev Ukok, u malého jezera u řeky Shumaly, 2257 m n. m.; 49.5196 N, 88.0212 E; 2002-08-09; Staudinger M.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
EDIGPU			X	X	X				Rusko, Altaj, oblast Chermal, Edigan: údolí říčky Adylda, 12 km VSV od obce, 1445 m n. m.; 51.1463 N, 86.4193 E; 2006-07-30; Otypková Z., Kočí M. et Lučeničová B.
KUYUPU			X	X	X		X		Rusko, Altaj, oblast Chermal, Údolí řeky Kuyum 0.5 SV od sídla, 622 m n. m.; 51.5753 N, 86.1134 E; 2005-08-14; Danihelka J., Chytrý M. et Lučeničová B.
SOVEP			X				X		Rusko, Altaj, oblast Choya, U silnice 8 km V od obce, 346 m n. m.; 50.0384 N, 86.7429 E; 2006-07-24; Danihelka J., Kubešová S. et Lučeničová B.
PASPPU			X	X	X		X		Rusko, Altaj, oblast Choya, Údolí Uchek 15 km JJV od obce, 461 m n. m.; 51.8300 N, 86.4809 E; 2006-07-23; Lustyk P. et Kočí M.
SEMIP			X	X					Rusko, Altaj, oblast Ongudai, Seminskii Ridge, nad pravým břehem říčky Tuekta, 2 km SZ od sídla, 1325 m n. m.; 50.9847 N, 85.6812 E; 2005-08-12; Hájková P. et Hájek M.
TUROP			X	X			X		Rusko, Altaj, oblast Turochak, Údolí řeky Siya 13 km VSV od obce, 324 m n. m.; 52.3091 N, 87.2621 E; 2006-07-25; Lustyk P. et Kočí M.
ULAGPU			X	X	X		X		Rusko, Altaj, oblast Ulagan, Plošina blízko jezera Uzunkeľ 28 km JZ od obce, 1986 m n. m.; 50.4742 N, 87.6282 E; 2006-07-18; Lustyk P. et Kočí M.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
BORGPU			X	X	X		X		Rusko, Jakutsko, republika Sakha, oblast Ust'-Aldanskii, Město Borogontsy: plošina nad bažinama 8.9 km ZSZ(-Z) od města, 144 m n. m.; 62.6869 N, 130.9997 E; 2010-08-15; Lustyk P. et Kočí M.
OGORP			X	X	X		X		Rusko, Jakutsko, republika Sakha, oblast Ust'-Aldanskii, Niva řeky Lena 2.8 km S od sídla, 84 m n. m.; 62.5355 N, 130.0323 E; 2010-08-17; Lustyk P. et Kočí M.
KILDL			X	X	X		X		Rusko, Jakutsko, republika Sakha, Yakutsk, Terasa řeky Lena ca 2.8 km Z od obce, 94 m n. m.; 62.2788 N, 129.7596 E; 2010-08-04; Lustyk P. et Kočí M.
KUZEPU				X	X		X		Rusko, Kemerovo, oblast Novokuznetsk, Pravý břeh říčky Bolšhoi Tesh 6.6 km V od obce, 260 m n. m.; 53.3392 N, 87.2922 E; 2012-07-04; Danihelka J. et Kubešová S.
SHANP			X				X		Rusko, Krasnojarsk region, Západní Sajany, Západní Sajany: údolí říčky Cholbak-Mys, 2 km S od Khemchik Ridge, 33 km S od obce Shanchi, 1549 m n. m.; 51.8420 N, 91.9260 E; 2004-08-03; Lustyk P.
YULDPU			X	X					Rusko, Republika Bashkortostan, plošina Zilairskoe, oblast Zilair, Vlevo od silnice do Ziliar, ca 15 km Z od obce, podmáčený les s <i>Betula pubescens</i> , 642 m n. m.; 52.3177 N, 57.6168 E; 2007-07-20; Danihelka J., Kubešová S. et Martynenko V. B.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
K74PU	4x			X	X	X	X		Rusko, Republika Buryatia, oblast Barguzinsky, Ulyun, ca 10 km SZ od obce, travnatá místa mezi keři ( <i>Salix spp.</i> , <i>Betula ermani</i> , <i>B. pendula</i> , <i>Alnus fruticosa</i> , etc.) v horském údolí na hranici lesa, 1450 m n. m.; 53.8838 N, 109.7983 E; 2013-07-19; Koutecký P.
KKULPU	4x			X	X	X	X		Rusko, Republika Buryatia, oblast Barguzinsky, Ust-Barguzin, ca 25 km SSZ od města, poloostrov Svjatoj Nos, hranice silnice (v tajze) do obce Monakhovo, 470 m n. m.; 53.6261 N, 108.9436 E; 2013-07-19; Koutecký P.
K80PU	4x			X	X	X	X		Rusko, Republika Buryatia, oblast Pribaykalsky, ca 23 km JJV od obce, levý břeh řeky Khaim, 490 m n. m.; 52.6058 N, 108.0908 E; 2013-07-26; Koutecký P.
TAKNL				X	X		X		Rusko, Republika Tuva, Západní Sajany, Západní Sajany: údolní říčka Taknalyk, 10 km S od soutoku s řekou Khermchik, 1525 m n. m.; 51.4 N, 91.4 E; 2004-08-04p.; Lustyk P.
SOSNPU				X	X		X		Rusko, Západní Sajany, údolí Jeniseje, Dzhoiskaya Sosnovka, 668 m n. m.; 52.7719 N, 91.3821 E; 2003-07-26; Šmarda P.
MALAPU				X					Rusko, Západní Sajany, údolí Jeniseje, Pramen říčky Malaya Golaya, 1585 m n. m.; 52.5083 N, 92.0275 E; 2003-08-02; Šmarda P.
K79L	4x			X	X	X	X		Rusko, Republika Buryatia, oblast Barguzinsky, Ulyun, ca 2.5 km JV od obce, podmáčené louky a okraje jezírek v aluviu řeky Barguzin, 475 m n. m.; 53.8072 N, 109.9330 E; 2013-07-25; Koutecký P.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
K54L	4x			X	X	X	X		Rusko, Republika Buryatia, oblast Barguzinsky, Ust-Barguzin, ca 18 km SZ od města, mokřady na poloostrově Svjatoj Nos, 450 m n. m.; 53.5625 N, 108.9325 E; 2013-07-12; Koutecký P.
116/1PU				X	X				Kazachstán, Altaj, Arshaty: niva ca 2 km SSZ od obce, 1200 m n. m.; 49.3067 N, 86.5479 E; 2006-08; Čejková A.
220PU				X	X		X		Kazachstán, Altaj, Šubarğas: kamenná suť v údolí potoka ca 3.7 km JJV od obce, 1230 m n. m.; 49.3391 N, 86.3399 E; 2010; Čejková A.
P34L					X				Kazachstán, Altaj, Arshaty: horské svahy ca 7.7 km SV od obce, 2350 m n. m.; 49.3410 N, 86.6269 E; 2006-08; Čejková A.
GLENCA				X	X	X	X		USA, Illinois, Glencoe, IS 198/9., Spont.: Cook County NAD NPP Pareniste, Illinois, Glencoe, IS 198/9., 300 m n. m.; 44.7308 N, 94.1516 W

---

## Příloha II

Příloha II: Lokality *C. canescens*. Znak "X" značí, jaká metoda byla pro danou populaci provedena. Souřadnice jsou v systému WGS 84.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
HURKC	4x	X							ČR, Blatensko, Záboří u Blatné: litorální porosty na SV okraji rybníka Pravda ca 1.4 km SV od kostela v obci 530 m n. m.; 49.373121 N, 13.841983 E; 2011-06-21; Schaabová V. et Štech M.
CERNC	4x								ČR, Budějovická pánev, Černiš, Chán et al. 1999, R. Kurka 1988 CB, J. Štěpánová 1988 CB 380 m n. m.; 49.002505 N, 14.428475 E; 1999;
TOMAC	4x	X							ČR, Budějovická pánev, Křenovice: příkop u cesty na SV okraji rybníka Vítín ca 1.2 km V od okraje obce 400 m n. m.; 48.984102 N, 14.379122 E; 1999;
KRENC	4x	X							ČR, Budějovická pánev, Křenovice: příkop u silničky k samotám Jednoty ca 660 m od východního okraje obce 400 m n. m.; 48.9840742 N, 14.3709889 E; 2013-06-24; Štech M.
BREHC	4x	X	X	X	X	X	X	X	ČR, Českolipsko, Břehyně: olšiny na severním břehu rybníka Břehyně ca 1.3 km SV od bašty u hráze rybníka 270 m n. m.; 50.583442 N, 14.70494 E; 2014-07; Schaabová V.
NOVOC	4x	X	X	X	X		X		ČR, Českolipsko, Jestřebí: křoviny a na okraji luk na severním okraji obce ca 240 m VSV od zříceniny hradu Jestřebí 255 m n. m.; 50.612554 N, 14.583899 E; 2012-08-17; Štech M. et Štechová T.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rpl32	ITS	Isozymy	Popis lokality
HER3C	4x			X	X	X			ČR, Českomoravská vrchovina, Bedřichov: chráněné území Hersica cca 1.7 km SSZ obce 615 m n. m.; 49.47237 N, 16.44874 E; 2013-06-26; Schaabová V. et Štech M.
HER0C	4x			X	X	X	X		ČR, Českomoravská vrchovina, Bedřichov: chráněné území Hersica cca 1.7 km SSZ obce 615 m n. m.; 49.47607 N, 16.44823 E; 2013-06-26; Schaabová V. et Štech M.
BEDRC	4x			X	X		X		ČR, Českomoravská vrchovina, Bedřichov: údolí Bedřichovského potoka ca 1 km SSZ od obce 620 m n. m.; 49.47109 N, 16.46254 E; 2013-06-26; Schaabová V. et Štech M.
CHVOC	4x	X		X	X	X			ČR, Českomoravská vrchovina, Dušejov: příkop na V okraji rašeliniště Chvojnov ca 1 km ZJZ od kostela v obci 610 m n. m.; 49.406904 N, 15.419809 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
CERIC	4x			X	X	X	X		ČR, Českomoravská vrchovina, Hojkov: okraj lesní cesty ca 360 m VSV vrcholu vrchu Čeřínek jihovýchodně od obce 710 m n. m.; 49.3777 N, 15.44097 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
JANKC	4x	X	X	X	X	X	X		ČR, Českomoravská vrchovina, Jankov: degradované loučky v údolí Jankovského potoka ca 1.5 km SSZ od kaple v obci 610 m n. m.; 49.4271 N, 15.381458 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.



Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	trp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
OKLIC	4x			X	X	X	X		ČR, Českomoravská vrchovina, Milíčov: prameniště u silnice ca 600 m SV od obce 640 m n. m.; 49.3986717 N, 15.3981978 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
OPATC	4x	X							ČR, Českomoravská vrchovina, Opatov: vlhké louky a křoviny ve střední části PR Opatovské Zákopy ca 3.2 km JJZ od kostela v obci 650 m n. m.; 49.1979186 N, 15.6416842 E; 2011-07-04; Štech M. et Štechová T.
RADLC	4x	X	X						ČR, Českomoravská vrchovina, Radlice: litorální porosty v SZ části největšího rybníčka v PP Rašelině Radlice ca 1.2 km SZS od kaple v obci 620 m n. m.; 49.132862 N, 15.315582 E; 2011-06-27; Schaabová V. et Štech M.
RADOC	4x	X							ČR, Českomoravská vrchovina, Radostín: příkop u cesty na východním okraji obce ca 590 m V(J)V od kaple v obci 620 m n. m.; 49.65158 N, 15.88294 E; 2012-09-29; Štech M.
STONC	4x	X	X	X		X	X	X	ČR, Českomoravská vrchovina, Stonařov: litorální porosty na východním okraji rybníka Jezírko (Stonařovské jezírko) ca 4 km Z od kostela v obci 610 m n. m.; 49.278853 N, 15.53449 E; 2011-06-27; Schaabová V. et Štech M.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
DRATC	4x			X	X		X		ČR, Českomoravská vrchovina, Stonařov: zarostlé plochy pod elektrickým vedením u jižního přítoku rybníka Stonařovské Jezírko ca 4 km Z od kostela v obci 650 m n. m.; 49.27727 N, 15.53229 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
SLAMC	4x	X		X	X	X			ČR, Českomoravská vrchovina, Šubířov: degradované louky na jižním břehu rybníka Sláмова Louže ca 560 m JV od kostela v obci 575 m n. m.; 49.59868 N, 16.81958 E; 2012-09-10; Štech M.
TRESC	4x	X	X						ČR, Českomoravská vrchovina, Třešť: degradované louky jihovýchodně od Jezdovického rybníka ca 1 km SV od železniční zastávky v obci 540 m n. m.; 49.305071 N, 15.486134 E; 2011-06-27; Schaabová V. et Štech M.
SYKOC	4x	X							ČR, Českomoravská vrchovina, Tři Studně: mokřina na východním břehu rybníka Sykovec ca 760 m JJV od kaple v obci 720 m n. m.; 49.60743 N, 16.04037 E; 2012-09-30; Štech M.
HSTUC	4x			X				X	ČR, Hanušovická pahorkatina, Horní Studénky: prameniště na JV břehu rybníka Sychrov ca 850 m S od kostela v obci 560 m n. m.; 49.96461 N, 16.8045 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
DUBRC	4x			X	X		X		ČR, Hodonínsko, Hodonín, Hodonínská Důbrava: podmačena zrašelinělá deprese ca 2 km SZ od železničního nádraží 170 m n. m.; 48.86801 N, 17.10133 E; 2014-06-07; Koutecký P.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
MORBC	4x	X	X						ČR, Jesenické Podhůří, Moravský Beroun: degradované louky na levém břehu Důlního potoka ca 1.9 km SSV od kostela v obci 550 m n. m.; 49.8103306 N, 17.4498164 E; 2012-07-03; Schaabová V. et Štech M.
VALTC	4x	X							ČR, Jesenické Podhůří, 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 m n. m.; 49.83115 N, 17.46163 E; 2012-07-03; Schaabová V. et Štech M.
DOLRC	4x	X	X	X	X	X		X	ČR, Krušné hory, Krásný Les: litorální porosty na břehu malého rybníčka u dálnice D8 ca 1.3 km VSV od zámku v obci 630 m n. m.; 50.77016 N, 13.95497 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
PETRC	4x	X	X						ČR, Krušné hory, Petrovice: okraje křovin a louky v nivě Petrovického potoka ca 3.5 km SVS od kostela v obci 420 m n. m.; 50.81874 N, 13.99044 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
TIPEC	4x			X					ČR, Moravský kras, PR Moravský kras: PR Mokřad pod Tipečkem, podmáčená louka v J části rezervace 460 m n. m.; 49.3279542 N, 16.7387144 E; 2003-06-20; Unaj J.
HRUBC	4x			X	X	X	X		ČR, Olomoucko, Hrubá Voda: břeh říčky Bystřice ca 250 m SV od železniční zastávky 340 m n. m.; 49.670345 N, 17.4414322 E; 2013-08-11; Štech M. et Štechová T.

Kód lokality	Ploidie	Cytometrie	Morfometrika	psbA	psbK	rp132	ITS	Isozymy	Popis lokality
BOROC	4x			X	X	X	X		ČR, Podkrkonoší, Borovnice, Borovnička: okraj vlhké louky ca 880 m ZJZ od železniční zastávky Borovnička 490 m n. m.; 50.49843 N, 15.6452 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
KLADC	4x	X							ČR, Slavkovský les, Kladská: západní břeh rybníka Kladský ca 270 m V od zámečku 820 m n. m.; 50.026799 N, 12.671742 E; 2012-06-24; Štech M.
HOSTC	4x	X	X	X	X	X	X	X	ČR, Šumava, Hostimova Lhota: prameniště západně silničky ca 150 V od osady 810 m n. m.; 48.744193 N, 14.161913 E; 2013-06-24; Schaabová V. et Štech M.
HLASC	4x	X	X	X	X	X	X		ČR, Táborsko, Hlasivo: degradované louky v údolí potoka Mindlovka ca 830 m SSV od kostela v obci 550 m n. m.; 49.50401 N, 14.75772 E; 2012-08-18; Štech M.
ZEMAC	4x	X	X	X	X	X	X		ČR, Táborsko, Pohořelice: litorální porosty rybníka v PP Zeman, ca 450 m JV od obce 640 m n. m.; 49.52085 N, 14.49399 E; 2012-08-18; Štech M.
RUDAC	4x	X	X	X	X	X	X		ČR, Třeboňská pánev, Horusice: severní část rašelinště Ruda na JV břehu Horusického rybníka ca 2.4 km JV od železniční zastávky v obci 420 m n. m.; 49.152368 N, 14.690957 E; 2012-08-30; Štech M.
VOSLC	4x			X	X	X			Rumunsko, Karpaty, Rumunsko, Voslabeni 770 m n. m.; 46.62678 N, 25.62153 E; 2012-06-11; Štech M.
UPPSC	4x			X	X	X			Skandinávie, Katrineholm: okraj silnice ca 3 km SV od středu města 60 m n. m.; 59.00965503 N, 16.24664401 E; 2013-07-10; Štech M.

---

## Příloha III.

Příloha III: Lokality populací ostatních druhů *Calamagrostis*. Znak "X" značí, jaká metoda byla pro danou populaci provedena. Souřadnice jsou v systému WGS 84.

Kód lokality	Druh	psbA	psbK	trp132	ITS	Popis lokality
BEDRE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Českomoravská vrchovina, Bedřichov: údolí Bedřichovského potoka ca 1 km SSZ od obce, 615 m n. m.; 49.47146 N, 16.45028 E; 2013-06-26; Schaabová V. et Štech M.
HER7E	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Českomoravská vrchovina, Bedřichov: chráněné území Hersica cca 1.7 km SSZ obce - epigejos 107, 615 m n. m.; 49.47354 N, 16.44924 E; 2013-06-26; Schaabová V. et Štech M.
PAREE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Českomoravská vrchovina, Proseč: východní okraj rybníka Pařez ca 900 m SZ od obce, 560 m n. m.; 49.60633 N, 15.31954 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
CERIE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Českomoravská vrchovina, Hojkov: okraj lesní cesty ca 360 m VSV vrcholu vrchu Čerřínek jihovýchodně od obce, 710 m n. m.; 49.3777 N, 15.44097 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.
CIKAE	<i>C. epigejos</i>	X	X	X	X	ČR, Džbán, Bílichov: slatinná louka Cikánský dolík ca 1.6 km SZ od obce, 380 m n. m.; 50.27106 N, 13.89758 E; 2013-08-01; Štech M.
HSTUE	<i>C. epigejos</i>	X	X	X	X	ČR, Hanušovicá pahorkatina, Horní Studénky: prameniště na JV břehu rybníka Sychrov ca 850 m S od kostela v obci, 560 m n. m.; 49.96461 N, 16.8045 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
KRLEE	<i>C. epigejos</i>	X		X	X	ČR, Krušné hory, Krásný Les: zarostlé louky na pravém břehu bezejmenného potoka ca 1.6 km ZJZ od zámku v obci, 670 m n. m.; 50.75925 N, 13.91765 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.

Kód lokality	Druh	psbA	psbK	rp132	ITS	Popis lokality
NOVOE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Krušné hory, Načetín, Novodomské rašeliníště: okraj cesty ca 2.8 km J od obce, 830 m n. m.; 50.54962 N, 13.28249 E; 2013-07-30; Štech M.
PETRE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Krušné hory, Petrovice, 0 m n. m.; 50.81874 N, 13.99044 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
NAKLE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Krušné hory, Nakléřov: degradované louky 940 m SSZ od křižovatky v obci, 720 m n. m.; 50.7513 N, 13.97276 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
HRUBE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Olomoucko, Hrubá Voda: okraj cesty ca 230 ZJZ od železniční zastávky, 340 m n. m.; 49.66906 N, 17.43533 E; 2013-08-11; Štech M. et Štechová T.
DOBRE	<i>C. epigejos</i>	X	X			ČR, Pooohří, Dobroměřice: levý břeh Ohře, ca 50 m SZ od mostu JZ obce, 0 m n. m.; 50.3696 N, 13.78242 E; 2015-06-24; Štech M. et Piherová J.
BRNAE	<i>C. epigejos</i>	X	X			ČR, Pooohří, Brňany: levý břeh Ohře ca 200 m VJV od zámečku v obci, 150 m n. m.; 50.47909 N, 14.14859 E; 2014-07-28; Štech M. et Piherová J.
JABKE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Střední Čechy, Jabkenice: zbytek louky na J břehu rybníka Zachkov ca 1.5 km SSZ od obce, 230 m n. m.; 50.33884 N, 15.00849 E; 2013-09-21; Štech M. et T. Štechová
HOSTE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Šumava, Hostimova Lhota: prameniště západně silničky ca 150 V od osady, 810 m n. m.; 48.74419 N, 14.16191 E; 2013-06-24; Schaabová V. et Štech M.

Kód lokality	Druh	psbA	psbK	rp132	ITS	Popis lokality
HLASE	<i>C. epigejos</i>	X	X	X	X	ČR, Tábořsko, Hlasivo: degradované louky v údolí potoka Mindlovka ca 830 m SSV od kostela v obci, 550 m n. m.; 49.50401 N, 14.75772 E; 2012-08-18; Štech M.
ZEMAE	<i>C. epigejos</i>	X	X	X		ČR, Tábořsko, Pohořlice: litorální porosty rybníka v PP Zeman, ca 450 m JV od obce, 640 m n. m.; 49.52085 N, 14.49399 E; 2012-08-18; Štech M.
ZBYTE	<i>C. epigejos</i>	X	X	X	X	ČR, východní Čechy, Zbytka, 0 m n. m.; 50.29472 N, 16.06168 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
ZATEE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	ČR, Žatecko, Žatec : pravý břeh Ohře ca 150 JV od železničního mostu přes Ohři na SZ okraji města, 200 m n. m.; 50.32984 N, 13.51939 E; 2013-07-31; Štech M.
DEBRE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	Maďarsko, , Debrečen, Haláp: paseka ca 2.3 km JJV od obce, 130 m n. m.; 47.50964 N, 21.84089 E; 2013-08-20; Štech M. et Drahník P.
SERME	<i>C. epigejos</i>	X	X			Německo, Sasko, Sermuth: Na V rohu parkoviště u restaurace "Zur Eintracht" V obce, 0 m n. m.; 51.15792 N, 12.80272 E; 2015-06-24; Štech M. et Piherová J.
ERLLE	<i>C. epigejos</i>	X	X			Německo, Sasko, Erlin: pravý břeh řeky Freiburger Mulde ca 70 m od železničního přejezdu na V okraji obce, 140 m n. m.; 51.15708 N, 12.82408 E; 2015-06-24; Štech M. et Piherová J.
WALDE	<i>C. epigejos</i>	X	X			Německo, Sasko, Waldheim: levý břeh řeky Zschopau ca 240 m SSV od mostu v centru města, 0 m n. m.; 51.07512 N, 13.02457 E; 2015-06-24; Štech M. et Piherová J.



Kód lokality	Druh	psbA	psbK	rp132	ITS	Popis lokality
SCHOE	<i>C. epigejos</i>	X	X		X	Německo, Sasko, Schönberg: pravý břeh řeky Zschopau ca 580 m JZ od obce, 0 m n. m.; 51.06025 N, 13.02061 E; 2014-07-28; Štech M. et Piherová J.
MITTE	<i>C. epigejos</i>	X	X			Německo, Sasko, Mittweida: pravý břeh řeky Zschopau ca 300 m SV od parkoviště u vodní elektrárny, 240 m n. m.; 50.9899 N, 13.00907 E; 2015-06-24; Štech M. et Piherová J.
SIREE	<i>C. epigejos</i>		X		X	Rumunsko, Rumunsko, Siret, náplavy, 0 m n. m.; 46.61352 N, 26.98228 E; 2012-06-14; Štech M.
YSTAE	<i>C. epigejos</i>	X	X	X	X	Skandinávie, Švédsko, Ystad: ruderální plochy JV od přístavu, 1 m n. m.; 55.42282 N, 13.83616 E; 2013-07-24; Štech M.
SVEDE	<i>C. epigejos</i>	X	X	X	X	Skandinávie, Svedala, ruderální plochy u čerpací stanice na SV okraji obce, 50 m n. m.; 55.51559 N, 13.24729 E; 2013-07-24; Štech M.
BELAV	<i>C. varia</i>	X	X	X	X	ČR, Českolipsko, Bělá: les nad silnicí ca 340 m JZ železniční zastávky Bělá pod Bezdězem zastávka, 140 m n. m.; 50.49731 N, 14.86525 E; 2012-08-17; Štech M.
MAEEV	<i>C. varia</i>	X	X	X	X	ČR, Českolipsko, Malý Bezděz, echt varia, 500 m n. m.; 50.53883 N, 14.71491 E; 2014-07-15; Štech M.
CIKDV	<i>C. varia</i>	X	X	X	X	ČR, Džbán, Bříchov: okraj slatinné louky Cikánský dolík ca 1.6 km SZ od obce, 380 m n. m.; 50.27083 N, 13.89728 E; 2013-08-01; Štech M.
LOUCV	<i>C. varia</i>	X	X	X	X	ČR, Střední Čechy, Loučeň: lesní loučka ca 330 m SZ od Loučeňské myslivny S od obce, 240 m n. m.; 50.29967 N, 15.01867 E; 2013-09-21; Štech M. et Štechová T.

Kód lokality	Druh	psbA	psbK	rp132	ITS	Popis lokality
VRUTV	<i>C. varia</i>	X	X		X	ČR, Střední Čechy, Mělnická Vrutice, 200 m n. m.; 50.34299 N, 14.54362 E; 2012-08-17; Štech M.
ROZSV	<i>C. varia</i>	X	X		X	SK, Malá Fatra, Rozsutec, 870 m n. m.; 49.23179 N, 19.08078 E; 2013-09-01; Štech M. et Štechová T.
TRENV	<i>C. varia</i>	X	X			Slovensko, Trenta, 660 m n. m.; 46.38268 N, 13.7605 E; 2014-07-23; Štech M.
VADUV	<i>C. varia</i>	X	X			SR, Chošské vrchy, Valašská Dubová, 800 m n. m.; 49.14566 N, 19.30486 E; 2015-07-08; Štech M.
TARAV	<i>C. varia</i>	X	X			Srbsko, NP Tara, 840 m n. m.; 43.86315 N, 19.40106 E; 2014-06-27; Štech M.
HERSVI	<i>C. villosa</i>	X	X	X	X	ČR, Českomoravská vrchovina, Bedřichov: chráněné území Hersica cca 1.7 km SSZ obce 108, 615 m n. m.; 49.47376 N, 16.44941 E; 2013-06-26; Schaabová V. et Štech M.
KRLEVI	<i>C. villosa</i>	X	X		X	ČR, Krušné hory, Krásný Les, 0 m n. m.; 50.75084 N, 13.94067 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
CHOPVI	<i>C. villosa</i>	X	X			SR, Nízké Tatry, Chopok, lúčky: sjezdovka ca 1.8 km J od parkoviště u dolní stanice lanovky, 1300 m n. m.; 48.9638 N, 19.60519 E; 2015-07-10; Štech M.
JIVKVI	<i>C. villosa</i>	X	X			ČR, Szdetské mezihoří, Janovice u Trutnova: okraj lesní cesty ca 1.3 km SV od železniční zastávky, 660 m n. m.; 50.59588 N, 16.09455 E; 2015-09-03; Štech M.

Kód lokality	Druh	psbA	psbK	trp132	ITS	Popis lokality
CHUTVI	<i>C. villosa</i>	X	X			ČR, Třeboňsko, Chlum u Třebon: les východně od silnice ca 4.2 km J od kostela v obci, 450 m n. m.; 48.92584 N, 14.91747 E; 2015-07-15; Štech M.
CERNVI	<i>C. villosa</i>	X	X		X	ČR, Českomoravská vrchovina, Černovice, rašeliniště, 0 m n. m.; 49.48674 N, 16.43675 E; 2013-06-26; Schaabová V. et Štech M.
POLVI	<i>C. villosa</i>	X	X		X	ČR, Českomoravská vrchovina, Borová: les u železničního přejezdu ca 1.8 km ZSZ od železniční zastávky v obci, 660 m n. m.; 49.7499 N, 16.13756 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
BREZVI	<i>C. villosa</i>	X	X			ČR, Šumava, Březník, 0 m n. m.; 48.98013 N, 13.41836 E; ;
NOVOVI	<i>C. villosa</i>	X	X		X	ČR, Krušné hory, Načetín, Novodomské rašeliniště: lesní okraj ca 2.8 km J od obce, 830 m n. m.; 50.54962 N, 13.28249 E; 2013-07-30; Štech M.
BORVI	<i>C. villosa</i>	X	X			ČR, Podkřkonoší, Borovnice, Borovnička: les u potůčku ca 1500 m JZ od železniční zastávky Borovnička, 470 m n. m.; 50.49598 N, 15.6388 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
JULIA	<i>C. arundinacea</i>	X	X	X	X	ČR, Českolipsko, Vranov: Juliina vyhlídka na JZ úpatí vrchu Ralsko ca 340 m SV obce, 370 m n. m.; 50.6685 N, 14.7567 E; 2012-08-17; Štech M. et Štechová T.
CIKHA	<i>C. arundinacea</i>	X	X		X	ČR, Českomoravská vrchovina, Cikháň, 710 m n. m.; 49.6468 N, 15.9429 E; 2012-11-04; Štech M.
MLBRA	<i>C. arundinacea</i>	X	X			ČR, Českomoravská vrchovina, Mladé Břístě, 500 m n. m.; 49.4848 N, 15.3340 E; 2013-06-28; Schaabová V. et Štech M.

Kód lokality	Druh	psbA	psbK	trp132	ITS	Popis lokality
KRHRA	<i>C. arundinacea</i>	X	X		X	ČR, Krušné hory, Krásný Les: prameniště u staré cesty přes pravostranný přítok Hraničního potoka ca 3.1 km Z od zámku v obci, 625 m n. m.; 50.7718 N, 13.8948 E; 2012-07-05; Schaabová V. et Štech M.
NEKOA	<i>C. arundinacea</i>	X	X			ČR, východní Čechy, Nekoř, 430 m n. m.; 50.0648 N, 16.5406 E; 2014-07-31; Schaabová V. et Štech M.
BORJA	<i>C. arundinacea</i>	X	X		X	Gruzie, , Borjomi, 1400 m n. m.; 41.7644 N, 43.1845 E; 2011-07-27; Štech M.
SUMEA	<i>C. arundinacea</i>	X	X			Gruzie, , Sumela, 1320 m n. m.; 40.6895 N, 39.6583 E; 2011-07-22; Štech M.
116-2A	<i>C. arundinacea</i>	X			X	Kazachstán, Altaj, Arshaty: niva ca 2 km SSZ od obce, 1200 m n. m.; 49.3068 N, 86.5479 E; ; Čejková A.
STHAPS	<i>C. pseudophragmites</i>	X	X		X	ČR, Beskydy, Staré Hamry, směsná, 450 m n. m.; 49.5167 N, 18.4129 E; 2015-08-08; Štech M. et Štechová T.
CIVAPS	<i>C. pseudophragmites</i>	X	X			SR, Nízké Tatry, Čierny Váh, 740 m n. m.; 49.0130 N, 19.8783 E; 2015-07-10; Štech M.
SIREPS	<i>C. pseudophragmites</i>	X	X		X	Rumunsko, Rumunsko, Siret, náplavy, 150 m n. m.; 46.6135 N, 26.9823 E; 2012-06-14; Štech M.
SORBS	<i>C. stricta</i>	X	X		X	Skandinávie, Sörbøle, 0 m n. m.; 63.6681 N, 20.0314 E; 2013-07-12; Štech M.
LJOSS	<i>C. stricta</i>	X	X	X	X	Skandinávie, Ljosenshammer, Trollhagen: rašeliniště u silnice severně osady, 510 m n. m.; 67.0346 N, 15.1930 E; 2013-07-20; Štech M.

Kód lokality	Druh	psbA	psbk	rp132	ITS	Popis lokality
SUNDS	<i>C. stricta</i>		X		X	Skandinávie, Sundsvall, 80 m n. m.; 62.3734 N, 17.2844 E; 2012; Trávníček B.
VESTS	<i>C. stricta</i>	X	X		X	Skandinávie, Norsko, Vesteraly, Vesteraly, Nykvåg: rašeliniště ca 2.6 km V od obce, 80 m n. m.; 68.7777 N, 14.5280 E; 2013-07-18; Štech M.
AP26S	<i>C. stricta</i>	X	X		X	Kazachstán, Altaj, Jezero Jazevoje: údolí potoka ca 3 km JJZ od jižního břehu jezera, 1600 m n. m.; 49.5255 N, 86.2908 E; 2006-08; Čejková A.
SONGS	<i>C. stricta</i>	X	X			Kýrgyzstán, Mokřady na východním břehu jezera Song Kol, ca 6.5 km SZ od nejnáchodnějšího okraje jezera, 3025 m n. m.; 41.8347 N, 75.2898 E; 2012-08-03; Ekrt L. et Košnar J.ří
K54S	<i>C. stricta</i>	X	X		X	Rusko, Republika Buryatia oblast Barguzinsky, Ust-Barguzin, ca 18 km SZ od města, mokřady na poloostrově Svjatoj Nos, 450 m n. m.; 53.5625 N, 108.9325 E; 2013-07-12; Koutecký P.
K56S	<i>C. stricta</i>	X	X	X	X	Rusko, Republika Buryatia, Barguzinsky district, Ust-Barguzin, ca 22 km NW of the town, wetlands at the Svjatoj Nos peninsula isthmus, 450 m n. m.; 53.59 N, 108.8883 E; 2013-07-19; Koutecký P.
EDEFST	<i>C. × strigosa</i>	X	X		X	Skandinávie, Edefors, 400 m n. m.; 62.6 N, 16.3 E; 2012; Trávníček B.

## Příloha IV

Příloha IV: Zjištěné genotypy *C. phragmitoides* v jednotlivých enzymatických systémech.

Genotyp	AAT	ADH	DIA	6-PGDH
1	BBBC	AABBCCCE	BBCCEEEE	AAAB
2	BBBC	AABBCCCC	BBCCEEEE	AAAB
3	BBBC	AABBCCCC	BBCCEEEE	AABB
4	BBBC	ABBBCCCE	AABBEEEE	AAAB
5	BBBC	AABCCCCC	BBCCEEEE	AAAB
6	BBBC	AABCCCCC	BBCCEEEE	AABB
7	BBBC	AABCCCCC	BBCCEEEE	ABBB

## Příloha V

Příloha V: Zjištěné genotypy *C. canescens* v jednotlivých enzymatických systémech.

Genotyp	AAT	ADH	DIA	6-PGDH
1	BBBC	AABD	CCEE	AAAB
2	BBBC	AABD	CDEE	AABB
3	BBBC	ABBD	CDEE	AABB
4	BBBC	AABB	CEEE	ABBB
5	BBBC	ABBD	CEEE	ABBB
6	BBBC	ABBD	DDEE	ABBB
7	BBBC	AABD	CDDD	AABB
8	BBBC	ABBD	CDEE	AAAA
9	BBCC	AABD	CCEE	AAAB
10	BBCC	ABBD	CCEE	AAAB
11	ABCC	ABBD	CCEE	AAAB
12	BBCC	ABBD	BCEF	AAAB
13	BCCC	ABBD	BCEE	AABB
14	BBBC	AABD	BCCE	AAAA
15	BBBC	AABD	BCCE	AABB
16	BBBC	AABD	CEEF	AAAB
17	BBBC	AABD	CEEE	AABB
18	BBBC	AABD	CEEE	AAAB

---

## Příloha VI



Příloha VI: Detail květenství *C. phragmitoides* z lokality Hojkov.



---

## Příloha VII



Příloha VII: Část populace *C. canescens* na lokalitě Stonařovské jezírko.