

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Srovnání endemické třtiny Saska *Calamagrostis rivalis*  
s rostlinami z ČR**

Bakalářská práce

**Jana Piherová**

Školitel: Ing. Milan Štech, Ph. D.

České Budějovice 2016

Piherová, J., 2016: Srovnání endemické třtiny Saska *Calamagrostis rivalis* s rostlinami z ČR. [A comparison of species *Calamagrostis rivalis* endemic in Saxony with plants from the Czech Republic. Bc. Thesis, in Czech.] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

#### Anotace

There were found several populations of uncertain taxa of genus *Calamagrostis* along the Ohře river in NW of the Czech Republic. The habitus resembled the species *Calamagrostis rivalis* that has been considered to be endemic in Saxony, Germany. In this study DNA ploidy level by FCM, morphometric characters and 3 genetic markers of 17 populations collected from both countries were studied. Based on the results we suggest to classify the plants from Czech populations as *Calamagrostis rivalis*.

This study was supported by grant SGA PŘF JU in 2015.

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

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

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

V Českých Budějovicích dne

.....

podpis studenta

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, Milanovi Štechovi, za trpělivost, vstřícnost a důvěru po celou dobu mého studia, ochotu najít si ve svém nabitém programu čas na konzultace a především za výběr tématu, které přineslo velmi hezké výsledky. Petrovi Kouckému patří velký dík za pomoc s průtokovou cytometrií, za rychlé a velmi užitečné rady se statistickými postupy a za celkový zájem o průběh výzkumu.

Další lidé, bez kterých bych se při psaní této práce neobešla, jsou Jiří Košnar, který mi vždy ochotně poradil v laboratoři, Veronika Schaabová, která mi svým předchozím výzkumem na třtinách velmi usnadnila práci, a Petr Drahník, který mě přivedl ke kytkám a se kterým jsme se navzájem podporovali v hektické době před odevzdáváním.

Za hezky strávené dny na vodě při průzkumu břehů Ohře, za slova útěchy, podpory i motivace chci poděkovat svému příteli Danielovi Nakládalovi, bez kterého bych to prostě nezvládla.

Za nejoriginálnější sběr rostlin z populace Velichov chci poděkovat svojí mamce, které jsem vždycky mohla zavolat a vypovídat se. Bez jejího nadhledu a humoru by to taky nešlo.

Celé své rodině a všem blízkým chci poděkovat za chvíle potřebného odpočinku, poklidně a především společně strávený čas. Jak vždycky říkám, jsou věci důležité a jsou věci důležitější.

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Literární rešerše .....	2
2.1	Taxonomická problematika rodu <i>Calamagrostis</i> .....	2
2.2	Polyploidizace .....	3
2.3	Hybridizace .....	4
2.4	Apomixie .....	5
2.5	Determinace druhu .....	7
2.5.1	<i>Calamagrostis rivalis</i> .....	7
2.5.2	Nomenklatura .....	8
2.5.3	Hypotézy vzniku .....	8
3	Cíle práce .....	9
4	Materiál a metody .....	9
4.1	Sběr rostlin .....	9
4.2	Průtoková cytometrie .....	13
4.3	Sekvenace .....	14
4.3.1	Izolace DNA .....	14
4.3.2	PCR .....	15
4.3.3	Purifikace .....	16
4.3.4	Vlastní sekvenace .....	17
4.4	Morfologická analýza .....	17
5	Výsledky .....	20
5.1	Lokality v ČR .....	20
5.2	Průtoková cytometrie .....	20
5.3	Molekulární analýza .....	24
5.4	Morfologická analýza .....	26
6	Diskuze .....	32
7	Závěr .....	34
8	Literatura .....	35
9	Přílohy .....	42

# 1 Úvod

Rod *Calamagrostis* (třtina) patří do čeledi *Poaceae*, podčeledi *Pooidae*, tribu *Poeae* (Soreng et al., 2015). Počet uváděných druhů se pohybuje od 150 (Tzvelev, 1989) až do 280 (Conert, 1989). Toto číslo kolísá kvůli problémům s vymezením druhu v této taxonomické skupině, které jsou způsobeny především velkou fenotypovou plasticitou (Nygren, 1946, 1948b; Štech, in prep.), polyploidizací (Grant, 1981; Green, 1984), mezidruhovou hybridizací (Nygren, 1948b; Paszko, 2002; Lu et Phillips, 2006) a vegetativním rozmnožováním pomocí apomixie (Nygren 1949, 1954; Green, 1984, Asker et Jerling, 1992).

Taxonomické problémy a nejasnosti v druhových determinačních znacích vedou k častým chybám při určování druhů. Ty jsou zpětně odhalovány při revizích herbářových položek a literárních údajů. Jedním takovým případem byly položky uložené ve Středočeském muzeu v Roztokách u Prahy. Zajímavá třtina na břehu řeky Ohře poblíž Žatce byla nalezena roku 1980 na floristickém minikurzu Severočeské pobočky tehdejší Československé botanické společnosti a určena jako *Calamagrostis pseudophragmites* (Kubát et al., 1981). Později byl údaj považován za chybnou determinaci a při další revizi herbářového dokladu byly rostliny považovány za možného hybridu *C. canescens* s některým z dalších druhů. Při návštěvě lokality v době vegetační sezóny (M. Štech, 2013) byl výskyt této třtiny znovu ověřen a byla zjištěna habituální podobnost s druhem *Calamagrostis rivalis*, považovaným za endemický druh Saska, spolkové země v sousedním Německu. Podobnost byla ve shodě i s ekologickými nároky druhu. Následně byly v herbářovém materiálu Středočeského muzea v Roztokách u Prahy zjištěny další výskyty morfologicky podobných třtin na několika lokalitách na nejdolejším toku Ohře. Předběžné studium ploidní úrovně pomocí průtokové cytometrie odhalilo, že rostliny z Ohře i saské populace *C. rivalis* jsou hexaploidní. Tato ploidní úroveň nebyla dosud známa u žádného druhu rodu *Calamagrostis* na území ČR. Za účelem testování hypotézy, že se jedná o totožný druh, vznikla tato bakalářská práce.

## 2 Literární rešerše

### 2.1 Taxonomická problematika rodu *Calamagrostis*

Trávy jako morfologická skupina rostlin jsou člověkem rozlišovány už po dlouhá staletí ve většině kultur. Důkazem je i fakt, že téměř každý jazyk má pro tuto skupinu převážně bylinných hemikryptofytů speciální označení (Soreng et al., 2015). Společný původ trav byl předpokládán už v počátcích botaniky ve starém Řecku. Vztahy uvnitř této morfologicky dobře vymezené skupiny jsou ovšem velmi komplikované. S nástupem molekulárních metod přišel nástroj objektivního posouzení fylogenetických vztahů, které se od té doby stále upřesňují.

V rámci čeledi *Poaceae*, podčeledi *Pooideae*, tribu *Poeae*, se od roku 1990 (Soreng et al., 1990) rozlišují 2 skupiny na základě typu chloroplastového genomu, typ *Poeae* a typ *Aveneae*. Rodové vymezení *Calamagrostis* je problematické, např. rostliny ze střední a jižní Ameriky jsou pravděpodobně jiného fylogenetického původu (Saarela et al., 2010), většina australských a novozélandských rostlin se recentně řadí do rodů *Deyeuxia* a *Lachnagrostis* (Edgar, 1995). Při užším pojetí rodu *Calamagrostis*, s výskytem na severní polokouli, je rod aktuálně zařazován do subtribu *Agrostidinae*, spadajícího do chloroplastového typu *Aveneae* (Quintanar et al., 2007, Saarela et al., 2010, Soreng et al., 2015).

Taxonomie rodu *Calamagrostis* byla už od počátků komplikována nejasným vymezením. Adanson použil roku 1763 jméno *Calamagrostis* pro trávy s jednokvětými klásky a s pluchou bez osiny (Adanson, 1763; Wasiljev, 1960). Ta je dnes ale považována za jeden z rodových znaků. Osinatá plucha, jednokvěté klásky a kalusové chlupy byly znaky, kterými Roth (1789) odlišil rod *Calamagrostis* od rodů *Arundo* a *Agrostis*. V pozdější práci ale popsane druhy přearazuje do rodu *Arundo* (Roth, 1827). Počáteční nejasnosti vedly k ustanovení rodu *Deyeuxia* (Clarion, 1812), který se podle Clariona některými znaky (přítomnost pastopečky, odění květních částí, vlastnosti plodu, aj.) odlišuje od rodů *Arundo* i *Calamagrostis*. Někteří autoři nepřijali jméno *Deyeuxia* jako nový rod, ale označovali jím poddruh, sekci nebo podsekcí v rámci rodu *Calamagrostis*. To ještě více zkomplikovalo taxonomickou situaci. Podrobněji problematiku rozebírá Wasiljev (1960), který ve své práci uvádí přehled systematických pojetí rodu. První z nich zpracoval Koch (Koch, 1837), roku 1898 ho nahradil složitěji řešený systém Torgese (Torges, 1898). Jako krok zpět Wasiljev označil systém

zpracovaný Roshevitzem (Roshevitz, 1934), který byl jen mírně modifikován v roce 1948 (Matuszkiewicz, 1948). Sám Wasiljev proto vytvořil nový systém rodu, který dělí na 5 podrodů, podrod *Calamagrostis* pak do dvou sekcí (Wasiljev, 1960). Sovětský botanik Tzvelev rozdělil rod *Calamagrostis* do tří sekcí, *Deyeuxia*, *Pseudophragmites* a *Calamagrostis* (Tzvelev, 1965,1976). V nejnovějších systémech se od rozdělování do sekcí upouští, hlavně asijsí autoři rozlišují samostatný rod *Deyeuxia* na základě délky pluchy a kalusových chlupů a přítomnosti pastopečky (Phillips et Chen, 2003). V rozsáhlém díle Flora of China autoři uvádějí, že rody *Agrostis*, *Deyeuxia* a *Calamagrostis* tvoří komplex tří nedostatečně rozlišených linií s nejasnými determinačními znaky (Lu et al., 2006; Lu et Phillips, 2006). Rodová problematika je tedy značně komplikovaná a vyžaduje revizi. Zásadní fenomény způsobující taxonomickou problematiku rodu *Calamagrostis* jsou polyploidizace, hybridizace a apomiktický způsob rozmnožování.

## 2.2 Polyploidizace

Jedním z nejčastějších cytogenetických procesů, které ovlivnily evoluci vyšších rostlin, je polyploidizace, tedy znásobení počtu chromozomových sádek (Stebbins, 1971). Stupeň ploidie se označuje násobkem základního čísla  $x$ , které odpovídá haploidnímu počtu chromozomů diploidní rostliny ( $2n = 2x$ ) (Briggs et Walters, 1997). Velké procento krytosemenných (30–35% Stebbins 1956,1971; 47% Grant, 1981; 70% Masterson, 1994) a více než 80% trav (Stebbins, 1956, 1985) jsou polyploidní taxony. Vysoké chromozomové počty v čeledi *Poaceae* jsou způsobeny polyploidní událostí v raných stádiích evoluce (období svrchní křídly), díky které je i základní chromozomové číslo vyšší než u jiných čeledí (Stebbins, 1985). Polyploidie byla pozorována od nástupu cytogenetických metod na začátku 20. stol. a proměnila pohled na příbuznost trav, dříve určovanou výhradně morfometrickými postupy (Stebbins, 1956).

Základní dělení na autopolyploidní a allopolyploidní taxony, jak ho zavedli Kihara et Ono (1926), příliš zjednodušuje reálnou situaci. Pozdější autoři se shodli na velmi nejasné definici těchto pojmů, někteří navrhli vlastní dělení (Stebbins, 1971; Grant, 1981; Briggs et Walters, 1997; Ramsey et Schemske, 1998). Ta pro účely této práce nejsou podstatná, demonstrují ale složitost problému, způsobenou souhrou více jevů, další dva z nich jsou rozebrány v následujících kapitolách 2.3 a 2.4.

Důsledky polyploidizace jsou pro evoluci rostlin zásadní. Na viditelné úrovni se s vyšší ploidii zvětšují rostlinné buňky a s nimi i celé orgány, čehož se využívá především u šlechtěných zemědělských plodin (Stebbins, 1971). U polyploidních taxonů je velmi často snížena schopnost sexuální tvorby semen, a to narušením průběhu meiózy nestejnou segregací chromozómů. K udržení vzniklého polyploida je tedy třeba schopnost vegetativního množení, např. pomocí výběžků, často je vznik polyploida spojen se změnou reprodukčního systému na apomiktický (Stebbins 1971; Briggs et Waters, 1997). Při vzniku polyploidního komplexu z diploidních sexuálních rodičů mají vzniklí polyploidi díky zmnoženým genům větší adaptivní možnosti a rozšiřují svůj areál, přičemž často vytěsní úzce ekologicky adaptovaný parentální taxon. Takto může vzniknout až tzv. reliktní polyploid, tedy druh s vysokým chromozomovým počtem bez žijících předků (Stebbins, 1971). Problematikou polyploidních komplexů se zabývali Stebbins (1971) a Grant (1981).

U rodu *Calamagrostis* hraje polyploidizace velkou roli, žádné diploidní druhy nejsou známy (Tateoka, 1976; Kellogg, 2015), tetraploidní druhy jsou amfimiktické a tvoří polyploidní komplexy (Nygren, 1962). Když vezmeme v úvahu, že tyto druhy vznikly polyploidizací a dávají vzniknout novým hybridům, které mohou mít vyšší ploidní úroveň (díky vzniku z neredukovaných buněk nebo druhotnou polyploidizací), získáváme velmi složité genomy. Ty se ještě komplikují následnou introgresí a případným polytopickým (několikanásobným a nezávislým) vznikem hybridů (Briggs et Walters, 1997). Taxonomické problémy jsou tedy i při využití molekulárních metod znatelné.

## 2.3 Hybridizace

Dalším mechanismem ke zvyšování diverzity a rychlé adaptaci rostlin by mohla být hybridizace. Existují na ni ovšem dva pohledy, jeden z nich jako evolučně významnou označuje pouze allopolyploidní hybridizaci, efekty ostatních typů označuje za jakýsi „evoluční šum“ lokálního významu, většinou způsobený disturbancí člověkem (Schemske, 2000). Ten druhý za zásadní zdroj adaptací považuje i homoploidní hybridizaci a introgresní mechanismy (Rieseberg et al., 2003). Rieseberg et al. (2003) ve studii adaptivních vlastností slunečnic zjistili, že při jejich evoluci hrála hybridizace podstatnou roli. Jako mechanismus rychlé evoluce označují transgresivní segregaci neboli vznik extrémních fenotypů. Zda tento závěr



platí i pro jiné organismy, je otázkou, některé metodologické nástrahy výzkumu hybridizace uvádí práce z roku 2013 (Strasburg et Rieseberg, 2013).

Obecně může hybridizace v závislosti na síle reprodukční izolace probíhat na několika úrovních, mezi různě adaptovanými populacemi, druhy, rody, dokonce je zaznamenána hybridizace mezi čeleděmi (Knobloch, 1972). I mezi druhy se liší míra reprodukční izolace, proto může mezidruhovú hybridizace vyústit ve dva scénáře. Pokud jsou druhy dostatečně příbuzné a mají homologní chromozomy, dají vznik fertílnímu potomstvu, které se může díky vyšší genetické variabilitě rychleji adaptovat. Pokud jsou druhy rozdílnější a dají vznik sterílnímu potomstvu, mohou nastat dvě alternativní situace. Nová kombinace genomů se zafixuje pomocí polyploidizace, nebo se pomocí zpětného křížení (a s ním související introgrese) modifikují populace jednoho nebo obou rodičovských druhů (Anderson et Stebbins, 1954). V každém případě se zvětší variabilita alel i genotypů, které sice nejsou primárně adaptované na specifické ekologické podmínky, ale mohou mít k adaptaci větší potenciál než rodičovské taxony (Stebbins, 1969).

V rámci rodu *Calamagrostis* se přirozenou i umělou hybridizací zabýval především Nygren (1948a, 1948b, 1962). V současné době na tématu hybridizace trtín pracuje polská autorka Paszko (2002; Paszko et Nobis, 2010). Taxon *Calamagrostis rivalis* je také považován za hybridogenní, hypotézy vzniku jsou rozebrány v kapitole 2.5.3.

## 2.4 Apomixie

Rozmnožování bez rekombinace genetické informace rodičů se nazývá apomixie. Někteří autoři do tohoto pojmu řadí i vegetativní rozmnožování pomocí např. výběžků nebo pacibulek, jiní autoři zahrnují pouze gametofytickou apomixii (Asker, 1979). V současnosti se však slovem apomixie nahrazuje dříve používaný termín agamospermie, tedy tvorba semen bez oplození (Asker et Jenkins, 1992; van Dijk et Vijverberg, 2005; Noyes, 2008). Dělí se na gametofytickou a sporofytickou (Asker 1979, 1980; Asker et Jenkins, 1992; Koltunow et al., 1995), někteří autoři druhý zmíněný typ označují jako adventivní embryonii (Naumova, 2008; Noyes, 2008).

Sporofytická apomixie se vyznačuje tím, že embryo vzniká ze somatické buňky nucellu nebo integumentu. Tento typ se často vyskytuje společně s normálním sexuálním rozmnožováním, kdy je redukovaná vaječná buňka v zárodečném vaku oplodněna a dá vznik

sexuálnímu potomkovi. Vývoj embrya stimuluje nucellus k tvorbě adventivních partenogenetických embryí, které mohou vytěsnit sexuálně vzniklé embryo a využít jeho endosperm, nebo spolu mohou koexistovat a dochází tak k polyembryonii (Asker et Jenkins, 1992). Tento typ apomixie se nejčastěji nachází u tropických rostlin, typicky citrusů (van Dijk et Vijverberg, 2005; Naumova, 2008).

Gametofytická apomixie se od sporofytické odlišuje tím, že vzniká zárodečný vak. Jeho mateřská buňka není redukována a embryo se vyvíjí partenogeneticky, je tedy geneticky shodné s mateřskou rostlinou. Dělí se na dva typy, diplosporii a aposporii. Diplosporie je charakterizována vznikem zárodečného vaku z neredukovaného megasporocytu, k čemuž může dojít buď anomálním meiotickým dělením, nebo nahrazením meiózy mitózou. Aposporie se liší tím, že zárodečný vak vzniká ze somatické buňky nucellu (Asker et Jenkins, 1992, Koltunow et al., 1995).

Genetická podstata gametofytické apomixie ještě nebyla kompletně vysvětlena. Už pilotní studie se přikláněly ke genovému, spíše než epigenetickému přenosu na potomstvo (Nogler, 1984; Carman, 1997; Koltunow et Grossniklaus, 2003;). Ač jde o komplexní proces modifikace sexuálního rozmnožování, donedávna se předpokládalo, že je dědičnost zajištěna dominantně, jediným lokusem (Nogler, 1984). Pokročilejší molekulární metody ale odhalují, že jsou modifikační kroky reprodukčního cyklu kódovány na více lokusech (Grimanelli et al., 2001; van Dijk et Vijverberg, 2005; Hand et Koltunow, 2014). Oba typy gametofytické apomixie se vyskytují téměř výhradně u polyploidních druhů (Carman, 1997; Grimanelli et al., 2001; van Dijk et Vijverberg, 2005). Až na výjimky jsou tyto druhy fakultativně apomiktické, tedy mají schopnost se množit i sexuálně (Koltunow et Grossniklaus, 2003; Hand et Koltunow, 2014). Diplosporie a aposporie se vyskytuje u velkého počtu druhů z asi 40 čeledí, nejhojněji u *Rosaceae*, *Asteraceae* a *Poaceae* (Naumova, 2008; van Dijk et Vijverberg, 2005).

U rodu *Calamagrostis* se vyskytují amfimiktické i apomiktické druhy (Nygren, 1946, 1949). Jako apomiktické Nygren označil druhy *C. lapponica*, *C. chalybaea* a *C. purpurea*. Green ve své studii uvádí 12 druhů třtin, u kterých se apomixie předpokládá, sám embryologicky zkoumal apomixii severoamerického taxonu *C. stricta* subsp. *inexpansa* (Green, 1984). Jako příčinu tvorby nefunkčních samčích gamet oba autoři určili selhání meiózy, která způsobuje tvorbu degenerovaného, nebo žádného pylu. U samičích gamet uvádějí jako primární mechanismus mitotickou diplosporii, zároveň se ale shodují, že za

určitých podmínek se může u stejného genotypu objevit i meiotické dělení (Nygren, 1946, 1949; Green, 1984). Tím potvrdili, že apomixie je fakultativním jevem i u rodu *Calamagrostis*. Reprodukční mód druhu *Calamagrostis rivalis* embryologicky zkoumán nebyl, je ale považován za apomiktický (Conert, 1989; Jäger, 2011). To potvrzuje nejen genetická uniformita populací, ale i absence vyvinutého pylu (Scholz, 1971; Schiebold at al., 2008).

## 2.5 Determinace druhu

Determinační znaky třtin a trav obecně jsou problematické. Rozlišovacích znaků nenajdeme mnoho, navíc je jejich spolehlivost značně omezena fenotypovou plasticitou. Nezanedbatelná není ani vnitrodruhová variabilita a díky mezidruhovému křížení také introgrese (Grulich, 1986). Obecně lze znaky rozdělit na vegetativní a generativní.

Vegetativní znaky, mezi které patří např. charakter porostu, větvení stébel, šířka, barva a odění listů, délka a charakter jazýčků, jsou užitečným vodítkem pro určování rostlin v terénu, herbářové položky však značnou část těchto vlastností ztrácejí. Některé ze znaků v minulosti používaných, jako je počet kolének, se v některých případech ukazují nevhodné pro odlišení druhů (Schaabová, 2013, 2015). Dalším sporným znakem je větvení stébel, které je sice znakem dobře viditelným, a proto hojně využívaným, je ale v průběhu vegetační sezóny proměnlivé (Štech in prep.).

Generativní znaky v kláscích jako délka plev, pluch, plušek a poměry mezi nimi, přítomnost a vlastnosti osiny, žilnatost plev a pluchy, délka kalusových chlupů nebo přítomnost pastopečky jsou minuciézní. Vyžadují preparační pomůcky a zvětšení stereomikroskopu, proto jsou nepraktické při determinaci v přírodě (Grulich, 1986).

### 2.5.1 *Calamagrostis rivalis*

Taxon *Calamagrostis rivalis* byl od počátku velmi problematický. Na přelomu 19. a 20. stol. byl zaměňován s druhem *C. phragmitoides*, *C. pseudophragmites*, při vymezování nového taxonu Torgesem byl popsán jako varieta *C. villosa* (Scholz, 1964; Heine, 1972). Dalšími autory už byl samostatně vymezený taxon sice považován za hybridní, ale hypotézy o rodičovských druzích se velmi lišily (viz kapitolu 2.5.3). Kvůli malému areálu nebyl

předmětem zájmu rozsáhlejších studií evropských druhů, jaké vedl např. švédský botanik Nygren (Nygren, 1946, 1948b, 1962), i proto je o něm velmi málo dostupných informací. Podrobněji se druhem zabýval německý autor H. Scholz (1964, 1971; Raus et Scholz, 2002), rozsáhlejší diagnózu v latinském i německém jazyce uvádí v práci z roku 1972 R. Heine. První molekulární studii provedli S. Schiebold et al. (2008). Morfologický popis a klíč k determinaci německých druhů včetně *C. rivalis* (= *C. pseudopurpurea*) pak uvádějí Conert (1989) a Jäger (2011).

## 2.5.2 Nomenklatura

Jméno taxonu *Calamagrostis rivalis* je provázeno nomenklatorickými nejasnostmi. Pro taxon se používají dvě jména. Dlouho užívaným jménem je *Calamagrostis pseudopurpurea* Gerstl. ex O. R. Heine. Raus a Scholz (2002) se nomenklatorickou problematikou podrobně zabývali a v práci z roku 2002 považují za správné jméno druhé používané, *Calamagrostis rivalis* H. Scholz (Raus et Scholz, 2002).

## 2.5.3 Hypotézy vzniku

Po problémech s vymezením druhu na začátku 20. stol. začali autoři považující *C. rivalis* za hybridogenní taxon vytvářet hypotézy o rodičovských druzích. Leibert (1924) označuje tento taxon *C. pseudophragmites* × *villosa*. Gerstlauer (1940) jako potenciální rodiče označuje *C. epigejos* a *C. canescens*, stejně jako později Scholz (1971). Heine (1972) uvažoval o vzniku zkřížením *C. phragmitoides* s *C. canescens* nebo *C. epigejos*.

## 3 Cíle práce

1. Srovnání populací na Ohři s populacemi *C. rivalis* v Sasku.
  - a. relativní a absolutní velikost genomu
  - b. 2 vybrané chloroplastové úseky a jaderný úsek ITS
  - c. morfologické charakteristiky
2. Zjištění skutečného výskytu taxonu v České republice.

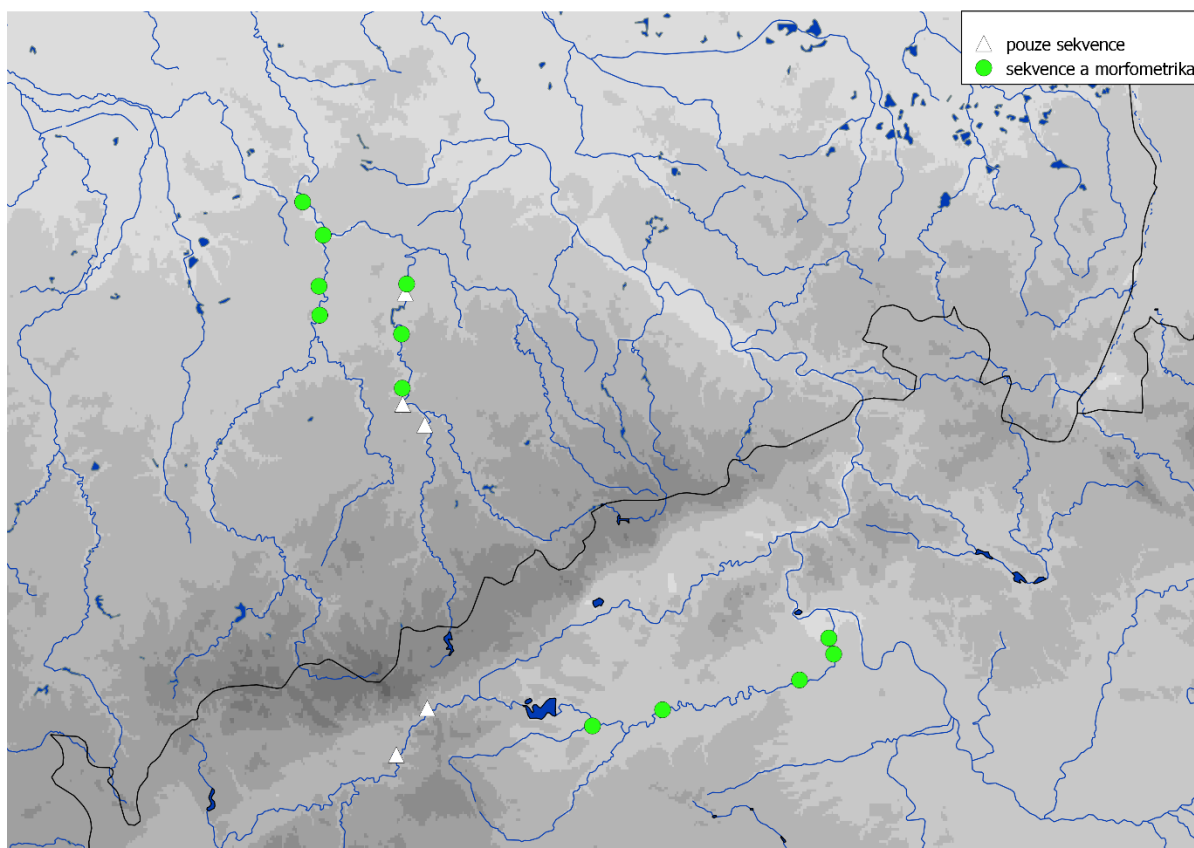
## 4 Materiál a metody

### 4.1 Sběr rostlin

Odběr rostlin probíhal během července 2014 a června a července 2015. Sbírání jedinci byli fertilní, odebírala se celá rostlina i s kořeny. Počet jedinců byl závislý na velikosti populace, z dostatečně velkých populací bylo odebráno 10 rostlin vzdálených alespoň 3 metry. U menších populací byl počet jedinců upraven tak, aby se neměnila minimální vzdálenost a nedošlo tak k odběru geneticky stejných jedinců. Z každé rostliny byl odebrán jeden list do uzavíratelného igelitového sáčku na průtokovou cytometrii, další list byl uložen do silikagelu pro izolaci DNA. Z laty každé rostliny (u 12 populací sbíraných v optimu kvetení v červnu 2015, Obr. 1) byly odebrány tři větve, z nejspodnější, střední a horní části, a byly herbářovány pro morfometrickou analýzu klásků.

Sběr byl prováděn na území spolkové země Sasko v Německu a kolem toku Ohře na severozápadě České republiky. V Sasku byly rostliny sbírány podél řek Zschopau, která se vlévá do Freiburger Mulde, Zwickauer Mulde a části toku po soutoku Freiburger a Zwickauer Mulde, řeky Vereinigte Mulde. Lokality byly vybrány podle práce Schiebolda et al. (2008). Na Ohři byly sebrány rostliny z lokalit zjištěných při revizi herbářového materiálu a dále nově nalezených lokalit.

Celkem byl získán materiál z 10 saských a 7 českých lokalit (Tab. 1, Obr. 1). Vzhledem k hypotéze, že *Calamagrostis epigejos* může být rodičovským druhem *C. rivalis*, byla na stejném území sbírána *C. epigejos* (7 lokalit/14 jedinců). Do analýz bylo také zařazeno 5 dalších druhů rodu *Calamagrostis* (16 jedinců) z evropských lokalit (Tab. 2). Dokladové položky jsou uloženy v herbáři Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity (CBFS).



Obr. 1: Lokality studovaných rostlin s grafickým rozlišením provedených analýz.

Tab. 1: Lokality *Calamagrostis rivalis*.

kód lokality	lokality	z. šířka	z. délka	rok sběru
LIBOR	ČR, Libočany: levý břeh Ohře mezi železničním mostem a jezem JVJ obce	50°19'47.748"N	13°31'8.904"E	2014 2015
BRNAR	ČR, Brňany: levý břeh Ohře ca 200 m VJV od zámečku v obci	50°28'44.724"N	14°8'54.924"E	2014 2015
DOKSR	ČR, Doksany: pravý břeh Ohře 140 m SZ od jezu jižně obce	50°27'6.516"N	14°9'41.148"E	2014 2015
POSTR	ČR, Postoloprty: pravý břeh Ohře ca 150m SV od mostu JVJ obce	50°21'26.496"N	13°42'20.880"E	2015
RADOR	ČR, Radovesice: levý břeh Ohře, roztroušeně v úseku 400 m V od mostu J obce	50°24'28.692"N	14°4'14.088"E	2015
VELIR	ČR, Velichov: levý břeh Ohře u železničního přejezdu ca 1000 m Z od silničního mostu v obci	50°16'51.312"N	12°59'49.524"E	2015
BOCR	ČR, Boč: levý břeh Ohře u silnice na JZ kraji obce	50°21'36.792"N	13°4'46.236"E	2015
FLOHR	Německo, Sasko: Flöha: levý břeh řeky Zschopau u chatové kolonie na jižním okraji města	50°50'19.896"N	13°4'22.656"E	2014
BRAUR	Německo, Sasko: Braunsdorf: pravý břeh řeky Zschopau ca 140 m Z od mostu přes řeku jižně obce	50°52'25.212"N	13°0'50.616"E	2014
SCHOR	Německo, Sasko: Schönberg: pravý břeh řeky Zschopau ca 580 m JZ od obce	51°3'36.900"N	13°1'14.196"E	2014
SORNR	Německo, Sasko: Sörnzig: levý břeh řeky Zwickauer Mulde ca 250 m VSV od lávky přes řeku v obci	51°1'22.440"N	12°47'34.692"E	2014 2015
MITTR	Německo, Sasko: Mittweida: pravý břeh řeky Zschopau ca 520 m SV od parkoviště u vodní elektrárny	50°59'28.644"N	13°0'39.060"E	2015
WALDR	Německo, Sasko: Waldheim: levý břeh řeky Zschopau ca 240 m SSV od mostu v centru města	51°4'30.432"N	13°1'28.452"E	2015
SERMUR	Německo, Sasko: Sermuth: pravý břeh řeky Freiburger Mulde ca 70 m proti proudu od mostu u restaurace "Zur Eintracht" V obce	51°9'24.624"N	12°48'8.064"E	2015
PENNR	Německo, Sasko: Penna: pravý břeh řeky Zwickauer Mulde ca 120 m Z od silnice na S okraji obce, za železniční tratí	51°4'17.076"N	12°47'27.744"E	2015
HOFGR	Německo, Sasko: Höfgen: pravý břeh řeky Mulde podél pěší stezky mezi hotelem "Zur Schiffsmühle" a přívozem SZ obce	51°12'43.488"N	12°44'51.576"E	2015
FRANR	Německo, Sasko: Frankenberg: pravý břeh řeky Zschopau, u mostu vedoucího z kruhového objezdu JZ obce	50°54'1.980"N	13°0'46.080"E	2015

Tab. 2.: Lokality a počty jedinců dalších druhů r. *Calamagrostis* použitých pro mol. analýzy.

druh	kód lokality	lokality	z. šířka	z. délka	počet rostlin
<i>C. epigejos</i>	SCHOE	Německo, Sasko: Schönberg: pravý břeh řeky Zschopau ca 580 m JZ od obce	51°3'36.900"N	13°1'14.196"E	3
<i>C. epigejos</i>	MITTE	Německo, Sasko: Mittweida: pravý břeh řeky Zschopau ca 300 m SV od parkoviště u vodní elektrárny	50°59'23.640"N	13°0'32.652"E	2
<i>C. epigejos</i>	WALDE	Německo, Sasko: Waldheim: levý břeh řeky Zschopau ca 240 m SSV od mostu v centru města	51°4'30.432"N	13°1'28.452"E	2
<i>C. epigejos</i>	SERME	Německo, Sasko: Sermuth: Na V rohu parkoviště u restaurace "Zur Eintracht" V obce	51°9'28.512"N	12°48'9.792"E	2
<i>C. epigejos</i>	ERLLE	Německo, Sasko: Erlin: pravý břeh řeky Freiburger Mulde ca 70 m od žel. přejezdu na V okraji obce	51°9'25.488"N	12°49'26.688"E	1
<i>C. epigejos</i>	DOBRE	ČR, Dobroměřice: levý břeh Ohře, ca 50 m SZ od mostu JZ obce	50°22'10.560"N	13°46'56.712"E	2
<i>C. epigejos</i>	BRNAE	ČR, Brňany: levý břeh Ohře ca 200 m VJV od zámku v obci	50°28'44.724"N	14°8'54.924"E	2
<i>C. pseudophragmites</i>	STHAPS	ČR, Ostravice: náplav na l. břehu řeky Ostravice pod hrází nádrže Šance ca 2,7 km JJV od žel. st. Ostravice	49°31'0.198"N	18°24'46.583"E	5
<i>C. pseudophragmites</i>	CIVAPS	Slovensko, Svarín: okraj silnice v údolí Čierného Váhu ca 1,9 km V od obce	49°0'46.930"N	19°52'41.948"E	1
<i>C. varia</i>	TARAV	Srbsko, Lazici: sutě v údolí potoka JZ od hráze nádrže Zaovine ca 1,2 km Z obce	43°51'47.340"N	19°24'3.816"E	1
<i>C. varia</i>	TRENV	Slovensko, Trenta: okraj lesa v údolí potoka Krajcarca ca 650 m VSV obce	46°22'57.652"N	13°45'37.786"E	1
<i>C. varia</i>	VADUV	Slovensko, Valašská Dubová: lesní okraje u cesty ca 1 km SV od středu obce	49°8'44.371"N	19°18'17.487"E	2
<i>C. canescens</i>	DUBRC	ČR, Hodonín, Hodonínská Důbrava: podmáčená zrašelinělá deprese ca 2 km SZ od železničního nádraží	48°52'4.836"N	17°6'4.788"E	2
<i>C. phragmitoides</i>	HERSPH	ČR, Bedřichov: chráněné území Hersica cca 1.7 km SSZ obce	49°28'18.589"N	16°27'47.762"E	1
<i>C. villosa</i>	CHOPVI	Slovensko, Chopok, lúčky: sjezdovka ca 1.8 km J od parkoviště u dolní stanice lanovky	48°57'49.680"N	19°36'18.684"E	1
<i>C. villosa</i>	JIVKVI	ČR, Janovice u Trutnova: okraj lesní cesty ca 1.3 km SV od železniční zastávky	50°35'45.180"N	16°5'40.371"E	1
<i>C. villosa</i>	CHUTVI	ČR: Chlum u Třeboně: les východně od silnice ca 4.2 km J od kostela v obci	48°55'33.024"N	14°55'2.892"E	1



## 4.2 Průtoková cytometrie

Metodou průtokové cytometrie byla zjišťována velikost genomu. Pro zjištění relativní velikosti genomu byly měřeny vzorky jednotlivých rostlin i směsné vzorky až 5 rostlin z populace. Jako primární 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. Z důvodu podobné velikosti genomu hrachu a studovaných rostlin byl kvůli přehlednosti histogramů do analýz přidán standard *Bellis perennis*, jehož velikost genomu  $2C=3,62$  pg byla zjištěna měřením při barvení PI proti *Pisum sativum* „Ctirad“ (Koutecký, not publ.). *Bellis* byla použita jako jediný standard v případě, že nebyl hrách k dispozici, hodnoty pak byly přepočteny pomocí poměru zjištěného kalibračního standardu *Bellis* proti hrachu. Celkem bylo provedeno 50 měření na 157 rostlinách.

Měření absolutní velikosti genomu je standardně prováděno třemi analýzami ve třech různých dnech na stejném cytometru, což zmenšuje chybu měření (Doležel et al., 2007). V této práci se tento postup dodržel pouze u několika vzorků, většina ostatních byla z časových důvodů měřena pouze dvakrát a některé vzorky bohužel jen jednou. Celkem bylo provedeno 38 měření na 22 rostlinách z 3 českých a 4 německých populací a byl vypočten průměr.

Příprava vzorku byla prováděna dvoustupňovou metodikou s tzv. Otto pufry (Otto, 1990, Doležel et al., 2007). Část listu vzorku (ca 0,5 cm<sup>2</sup>) byla spolu s interním standardem vložena do Petriho misky. Empiricky byly zjištěny vhodné poměry materiálu. Hrachu byla asi polovina množství vzorku, *Bellis* stačilo množství čtvrtinové. Ke vzorku a standardům bylo přidáno 400 µl pufru Otto I vychlazeného na ledu. Žiletkou byl rostlinný materiál rozsekán na drobné kousky. Vzniklá suspenze byla několikrát promíchána pipetou se seříznutou špičkou a přes 42 µm filtr (textilie Uhelon 130T) přepipetována do popsané zkumavky. Pohledem byla ověřena čistota roztoku. Poté bylo přidáno 800 µl připraveného barvicího roztoku. Pro měření relativní velikosti genomu byl k základní směsi 25 µl pufru Otto II a 50 µl 2-merkapt ethanolu přidán A-T specifický fluorochrom DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ve výsledné koncentraci 4 µg/ml. Pro měření absolutní velikosti genomu bylo použito interkalační barvivo propidium iodid (PI) a RNasa IIa, která zabraňuje vázání fluorochromu na RNA. Obě látky byly přidány v množství odpovídajícím finální koncentraci 50 µg/ml. Každé barvivo má jiné nároky na excitační vlnové délky, proto byly použity dva typy průtokových cytometrů. Pro měření vzorků barvených DAPI, které má excitační maximum při  $\lambda = 358$  nm, byl využit cytometr Partec PA II (Partec GmbH, Germany) se rtuťovou výbojkou HBO 100, pro měření

fluorescence PI byly vzorky analyzovány na cytometru Partec CyFlow SL (Partec GmbH, Germany) se zeleným laserem,  $\lambda = 532$  nm. Standard *Pisum sativum* „Ctirad“ byl nastaven na kanál 200 (*Bellis perennis* na kanál 100) na 1024 kanálové škále, měřeno bylo 5000 jader.

Data získaná z cytometrů byla analyzována v programu FlowJo 10. 0. 8. (Tree Star, Inc.), kde byl pro odstranění šumu proveden gating částic a ručně vymezen rozsah fluorescenčních piků. Byla vyloučena měření s  $CV > 3$  pro vzorky barvené DAPI. Pro každý vzorek byla získána hodnota odpovídající poměru fluorescence vzorek/*Pisum* a její minimální, průměrná a maximální hodnota pro české, resp. německé rostliny. Při výpočtu absolutní velikosti genomu byl poměr vzorku a standardu zjištěný při barvení PI vynásoben známou velikostí genomu standardu *Pisum sativum* „Ctirad“, 9,09 pg. Ze získaných hodnot byl vypočten průměr vícenásobných měření jedné rostliny a následně celkový průměr pro české, resp. německé rostliny. Data pro vytvoření histogramů byla exportována z programu FloMax 2. 6. (Partec, GmbH, Germany) a do obrazové podoby převedena v programu R (R Core Team, 2013). Graf box & whisker plot srovnávající velikost genomu různých druhů rodu *Calamagrostis* (data Štech, M.) byl vytvořen v programu Statistica 12 (Statsoft, Inc.)

### 4.3 Sekvenace

Sekvenovány byly 3 rostliny ze zkoumaných populací *Calamagrostis rivalis* (pouze 2 rostliny u nejmenších populací Velichov a Boč). Izolace DNA byla provedena modifikovanou metodou NaOH izolace (Schaabová, 2013). Pro sekvenaci byly vybrány úseky chloroplastové DNA *psbA-trnH<sup>GUG</sup>*, *psbK-trnS<sup>GCU</sup>*, které byly již pro rod *Calamagrostis* otestovány (Schaabová, 2013), a jaderný úsek ITS. Primery a příslušná literatura jsou uvedeny v Tabulce 3. Celkem jsme vyhodnocovali 90 jedinců, u jaderného úseku se kvůli problémům s amplifikací 8 vzorků podařilo získat jen 82 sekvencí.

#### 4.3.1 Izolace DNA

Z listů vysušených v silikagelu bylo odebráno ca 0,5 cm<sup>2</sup> a spolu se třemi wolframkarbidovými kuličkami vloženo do mikrozkuhavky typu Eppendorf o objemu 2 ml. Rozmělnění rostlinného materiálu bylo provedeno na mlýnku Retsch MM400 (frekvence 30 s<sup>-1</sup>, po dobu 5-10 minut). Po vyjmutí kuliček a krátkém stočení na stolní bylo k materiálu

napipetováno 30 µl 0,5M NaOH. Po promíchání byla suspenze přenesena pipetou do čisté mikrozkušavky. Centrifugace při 13 800 rpm a 22°C po dobu 2,5 minuty oddělila pevné části od supernatantu, ze kterého bylo odebráno 5 µl do stripů 0,2 ml mikrozkušavek. Ke každému vzorku pak bylo přidáno 45 µl 100mM Tris-HCl (pH=8,3) a po promíchání obsahu byly vzorky uskladněny v mrazáku.

Tab. 3: Primery analyzovaných úseků DNA.

primer	sekvence primeru 5'-3'	zdroj
psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang et al., 1997
trnH <sup>GUG</sup>	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	
psbK	TGTTTGGCAAGCTGCTGTAA	Ebert et Peakall, 2009
trnS <sup>GCU</sup>	GGGTTCGAATCCCTCTCTTT	
ITS 5i	AGGTGACCTGCGGAAGGATCATT	Roalson et Friar, 2000
ITS 4i	GGTAGTCCCGCCTGACCTGG	

#### 4.3.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce probíhala v objemu 10 µl. Obsahovala 5 µl Plain PP Master Mixu (Top-Bio, ČR), forward a reverse primer ve finální koncentraci 0,3 µM a 0,4 µl DNA vzorku. Objem byl doplněn PCR vodou. Ke každé probíhající PCR byl přidán kontrolní vzorek bez DNA. Amplifikace probíhala v termocykleru BIOER XP (Hangzhou BORI Technology Co., Ltd. (BIOER), China) nebo Biometra T3000 (Biometra GmbH, Germany). Průběh reakčních podmínek pro jednotlivé úseky je zobrazen v Tabulce 4.

Výsledek PCR byl zkontrolován metodou elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu v TBE puftru. Na mikrotitrační destičce byly smíchány 2 µl produktu s 0,8 µl nanášecího puftru obsahujícího fluorescenční barvivo GEL RED. Směs byla pipetována do jamek gelu, jako velikostní standard byl použit 100bp ladder (5 µl). Elektroforéza probíhala při 120 V, výsledek byl ověřen vložení gelu do komory UV transiluminátoru a vyhodnocen v programu Scion VisiCapture (Scion Corporation, USA). Byla zkontrolována čistota kontrolního vzorku.

Tab. 4: Reakční podmínky pro PCR amplifikovaných úseků.

úsek DNA	teplota (°C)	doba trvání (s)	počet cyklů
psbA-trnH <sup>GUG</sup>	94	300	-
	94	30	40
	57	30	
	72	60	
	72	600	-
psbK-trnS <sup>GCU</sup>	94	180	-
	94	30	12
	66 (-1,5)*	30	
	72	45	
	94	30	30
	47	30	
	72	45	
	72	600	-
ITS 5i-ITS 4i	94	120	-
	94	30	44
	55	60	
	72	60	
	72	600	-

\*při každém cyklu se teplota sníží o 1,5°C

#### 4.3.3 Purifikace

K přečištění PCR produktů byla v případě chloroplastových úseků psbA-trnH<sup>GUG</sup> a psbK-trnS<sup>GCU</sup> použita dvojice enzymů, tzv. Exo-SAP. Exonukleáza I štěpí jednovláknovou DNA (nepřisedlé primery), SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) odstraňuje neinkorporované dNTP. Na 1 µl produktu bylo použito 0,5 µl směsi Exo-SAP, mikrozkušavky byly promíchány a stočeny na stolní centrifuze. Aktivaci a následnou degradaci enzymů zajistil teplotní program cycleru, 15 minut inkubace ve 37°C a 15 minut inaktivace enzymů při 85°C.

Pro jaderný úsek ITS se výše uvedená metoda ukázala jako nedostatečná, proto bylo zvoleno vyříznutí produktu z agarózového gelu a následné přečištění pomocí komerčního kitu. K celému objemu PCR produktu byly přidány 3 µl nanášecího pufru s fluorescenčním barvivem SYBR Green. Obsah zkumavky byl nanesen na 1,5% gel z *low-melting* agarózy v TAE pufru, elektroforéza probíhala při 120 V. Výsledný gel byl přenesen na modré světlo a pomocí skalpelu byly vyříznuty zeleně fluoreskující proužky cílového produktu. Ty byly

umístěny do označených mikrozkušavek o objemu 2 ml a dále se postupovalo podle protokolu výrobce JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (GENOMED GmbH, Germany). Úspěšnost extrakce produktu o požadované délce byla ověřena elektroforézou. Ta probíhala stejně jako po PCR reakci, pouze se změnil objem nanášené směsi, 5  $\mu$ l produktu bylo smícháno s 2  $\mu$ l nanášecího pufru obsahujícího barvivo GEL RED.

#### 4.3.4 Vlastní sekvenace

Sekvenační reakce byly míchány podle požadavků společnosti SEQme s.r.o. (Seq & QPCR Company, CZ), která sekvenování provedla. Objem primeru byl upraven na požadovanou finální koncentraci 25 pmol, množství DNA odpovídalo zhruba 100 ng. Objem vzorku závisel na koncentraci DNA v produktu, která byla odhadnuta na základě intenzity fluorescence proužku na gelu elektroforézy. U produktů získaných extrakcí z gelu se do reakce přidávalo maximální možné množství produktu. Zbývající objem požadované 10  $\mu$ l reakce byl doplněn PCR vodou a vzorek odeslán ke zpracování.

Získané sekvence byly editovány v programu Geneious (Biomatters Ltd.). Alignment sekvencí byl proveden v programu Mafft version 7 (Katoh et Standley, 2013), trimming v programu BioEdit (Hall, 1999). Sekvence byly seskupeny do haplotypů v programu FaBox (Villesen, 2007) soubory z formátu fasta do formátu nexus byly převedeny pomocí Sequence conversion ([www.bugaco.com](http://www.bugaco.com)). Haplotypová a ribotypová síť byly vytvořeny v programu PopART (Leigh et Bryant, 2015), mapy výskytu zjištěných haplotypů a ribotypů v programu QGIS (OSGeo, Beaverton, OR, USA).

## 4.4 Morfologická analýza

K měření morfologických charakteristik bylo vybráno několik vegetativních znaků na celé rostlině (Tab. 5) i minuciézních znaků v kláscích (Tab. 6), považovaných za determinační v základní středoevropské určovací literatuře (Conert, 1989, Jäger, 2011). Bylo měřeno 10 rostlin (v jednom případě pouze 6 rostlin) ze 7 německých a 5 českých populací sebraných v optimu kvetení v roce 2015 (Tab. 1). Na lokalitách Velichov a Boč byly velmi malé populace a rostliny v době sběru již nebyly vhodné pro měření morfologických znaků.

Znaky na rostlině (Tab. 5) byly měřeny pomocí svinovacího metru s přesností na 0,5 cm a pravítka s přesností na 1 mm (délka jazýčku a šířka listů, délka větví laty). Jediným analyzovaným kvalitativním znakem bylo větvení stébla, které bylo vyhodnocováno binárně, přítomno nebo nepřítomno.

Tab. 5: Vegetativní znaky měřené na rostlinách *Calamagrostis rivalis*.

zkratka	popis znaku
LATA	délka laty od báze nejspodnější větve do konce posledního klásku (cm)
VYSK	výška rostliny od kořínků do konce posledního klásku laty (cm)
KOL	počet kolének rostliny
VETV	větvení (binární data, přítomno/nepřítomno)
DEL_1	délka čepele nejhořejšího listu (cm)
SIR_1	šířka čepele v nejširším místě nejhořejšího listu (mm)
JAZ_1	délka jazýčku nejhořejšího listu (mm)
DEL_2	délka čepele druhého nejhořejšího listu (cm)
SIR_2	šířka čepele v nejširším místě druhého nejhořejšího listu (mm)
JAZ_2	délka jazýčku druhého nejhořejšího listu (mm)
SP_LA	délka nejdelší větvičky z nejspodněji rostoucích na latě (cm)
PR_LA	délka nejdelší větvičky rostoucí nejbliže pod středem laty (cm)

Minuciézní znaky v kláscích (Tab. 6) byly měřeny v mikrometrech v programu QuickPHOTO CAMERA (Promicra, s r.o.) z fotografií pořízených ve stereomikroskopu při osminásobném zvětšení pomocí kamery Lumenera ® INFINITY (Roper Technologies, Inc). Z rostlin v optimu kvetení byly odebrány tři větve laty, z nejspodnějšího a prostředního patra květenství a z jeho horní části. Z každé větve byl náhodně vybrán jeden klásek, u kterého byly změřeny uvedené znaky. Z těchto tří klásků byla pro všechny znaky vypočtena průměrná hodnota znaku jedné rostliny. Znak SP/PLUCH byl vypočten jako poměr délky pluchy od nasednutí osiny ke špičce a délky celé pluchy.

Nejprve byly všechny vybrané znaky měřeny na 3 rostlinách z populace, poté byla provedená předběžná analýza. Při ní bylo vyhodnoceno, které znaky jsou vhodné a u těch pokračovalo měření i na zbývajících rostlinách z populace. Jednalo se o znaky D\_PL, H\_PL, PLUCH, OS, SP\_PLUCH a SP/PLUCH.

Tab. 6: Minuciézní kláskové znaky měřené na rostlinách *Calamagrostis rivalis*.

zkratka	popis znaku
D_PL	délka dolní plevy klásku ( $\mu\text{m}$ )
H_PL	délka horní plevy klásku ( $\mu\text{m}$ )
PLUCH	délka pluchy od báze po špičku ( $\mu\text{m}$ )
PLUS	délka plušky od báze po špičku ( $\mu\text{m}$ )
OS	délka osiny od místa nasednutí k pluše po špičku ( $\mu\text{m}$ )
SP_PLUCH*	délka pluchy od místa nasednutí osiny ke špičce ( $\mu\text{m}$ )
CHL	délka nejdelších kalusových chlupů ( $\mu\text{m}$ )
SP/PLUCH	poměr znaků SP_PLUCH / PLUCH

\*grafické znázornění viz Příloha 1

Před zpracováním dat byly vypočteny základní popisné statistiky a bylo testováno normální rozdělení dat v programu Statistica 12 (StatSoft, Inc). U dvou znaků (OS a SP/PLUCH) byla potřeba transformace dat, v případě délky osiny logaritmická, u poměrového znaku pomocí funkce arcsin. Ve stejném programu byla vytvořena korelační matice všech znaků a z důvodu silné závislosti (Pearsonův korelační koeficient = 0,99) znaků SP\_PLUCH a SP/PLUCH byl znak SP\_PLUCH z analýz vyřazen. Poměrový znak byl zachován z důvodu odstranění možného vlivu absolutní délky pluchy.

Byla provedena analýza hlavních komponent (PCA) pomocí programu Canoco 5 (Braak & Šmilauer, 2012). Nejprve bylo 115 měřených rostlin rozděleno do dvou skupin podle země sběru. Pak bylo vybráno 36 rostlin, na kterých byly zároveň provedeny molekulární analýzy, získali jsme tak čtyři skupiny podle zjištěných chloroplastových haplotypů. V programu R (R Core Team, 2013) byla pomocí sady funkcí pro morfometrická data MorphoTools (Koutecký, 2015) vypracována shlukovací analýza Wardovou metodou, která neukázala žádnou zřetelnou strukturu. Pomocí kanonické diskriminační analýzy byly zjištěny znaky důležité pro rozlišení skupin s odlišným haplotypem cpDNA Byla nastavena forward selection jednotlivých znaků, použit byl program Canoco 5 (Braak & Šmilauer, 2012), postup proveden podle Šmilauer et Lepš (2014).

# 5 Výsledky

## 5.1 Lokality v ČR

Při průzkumu toku Ohře od 176. říčního kilometru (Karlovy Vary) až k soutoku Ohře s Labem bylo nalezeno několik dosud neznámých populací. Většina se jich nachází na dolním toku řeky, mezi vodní nádrží Nechranice a soutokem Ohře s Labem. Dvě velmi malé populace byly nalezeny i na horním toku Ohře, u obcí Velichov a Boč. Přehled lokalit se souřadnicemi uvádí Tabulka 1.

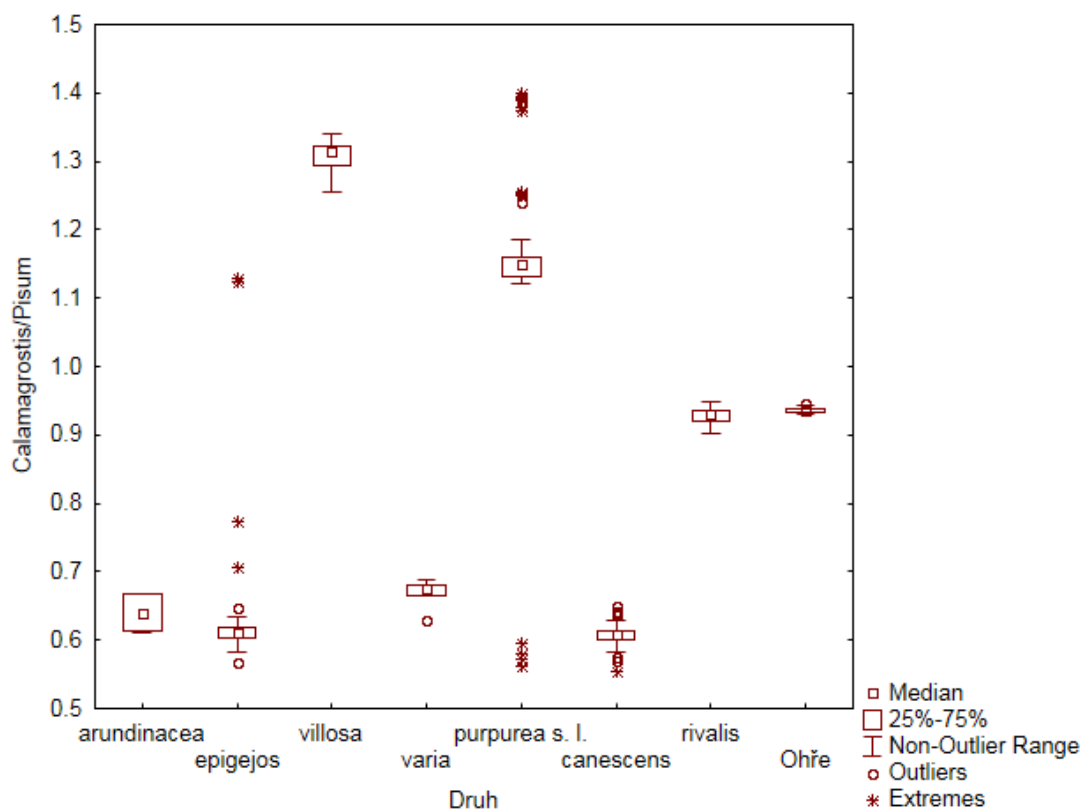
## 5.2 Průtoková cytometrie

Analýza DNA ploidní úrovně jedinců nalezených na Ohři ukázala, že rostliny jsou hexaploidní, stejně jako druh *Calamagrostis rivalis*. Tato ploidní úroveň není známa u žádného druhu uváděného z území ČR, srovnání relativní velikosti genomu (poměr *Calamagrostis/Pisum*) vybraných druhů je vyobrazeno na obrázku 2. Srovnání všech předpokládaných stupňů ploidní úrovně zastoupených v ČR, 4x, 8x a 10x, proběhlo ve společné cytometrické analýze *C. rivalis* s tetraploidní *C. canescens* a oktoploidní a dekaploidní *C. phragmitoides* (Obr. 3).

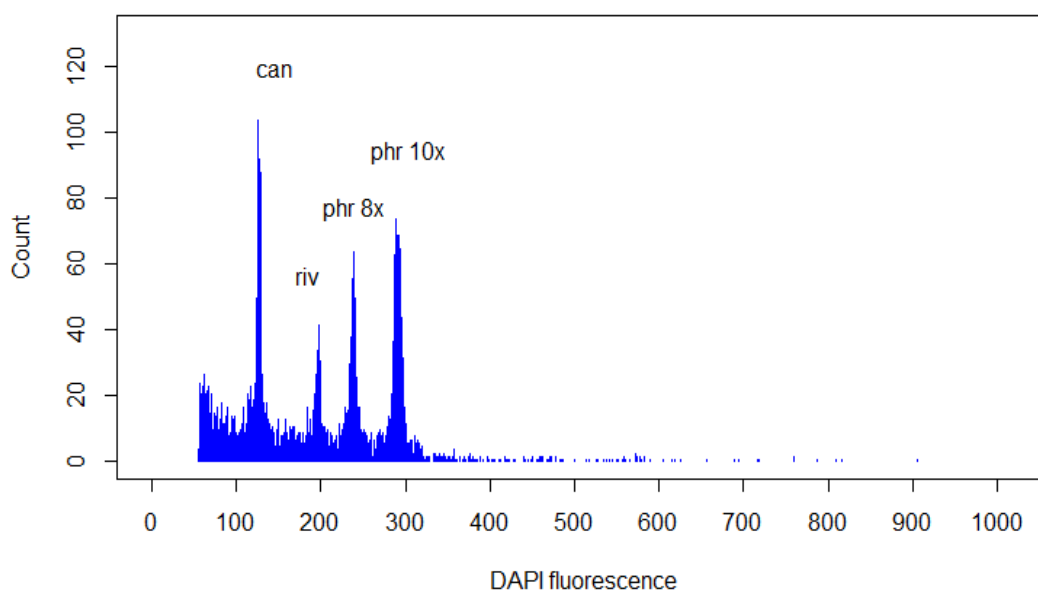
Výsledky ukazují, že se české a německé populace v relativní velikosti genomu neliší. Zároveň mají srovnatelné procento variability (Tab. 7). Box a whisker plot na obrázku 4 zobrazuje velikost genomu podle zjištěných chloroplastových haplotypů (viz kapitola 5.3).

Měření absolutní velikosti genomu barvením PI se standardem *Pisum sativum* „Ctirad“ určilo množství DNA na 11,91 pg. Ani v tomto případě se velikost u českých a německých rostlin nelišila, celková variabilita měření byla 5,5%. Histogramy fluorescence typických cytometrických analýz pro barvení DAPI i PI jsou zobrazeny na obrázcích 5 a 6.





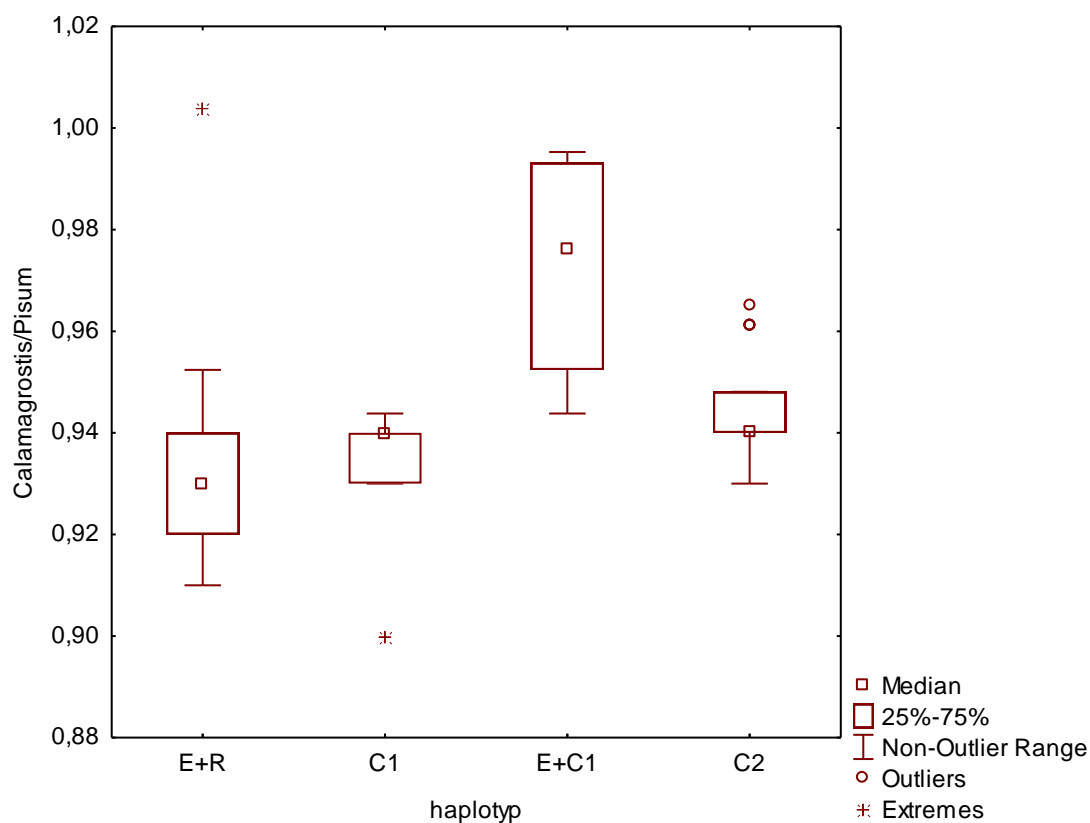
Obr. 2: Srovnání relativní velikosti genomu několika vybraných druhů třtin vyskytujících se na území ČR, saského druhu *Calamagrostis rivalis* a jedinců nalezených na březích Ohře.



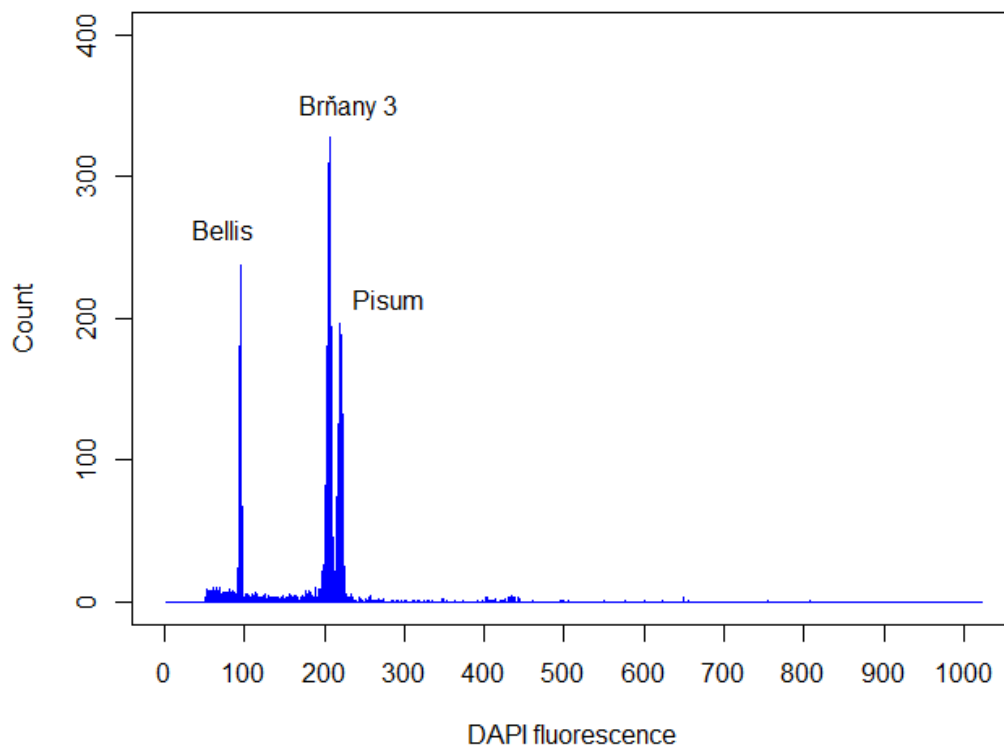
Obr. 3: Histogram fluorescence společné analýzy druhů *C. canescens* (4x), *C. rivalis* (6x) a *C. phragmitoides* (8x a 10x).

Tab. 7: Měření relativní velikosti genomu pro české a německé populace.

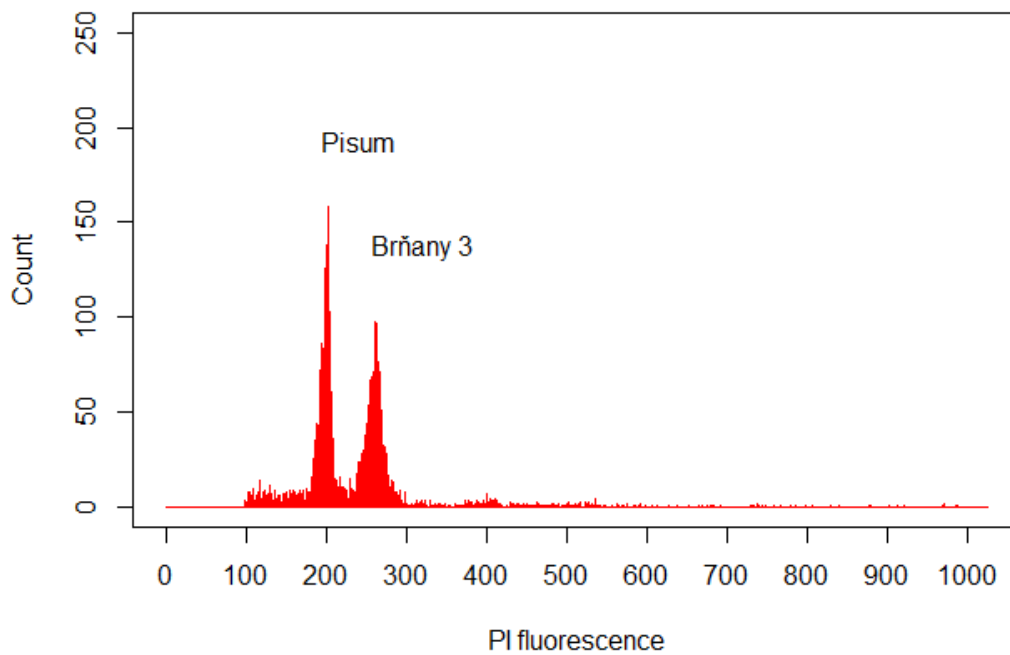
DAPI	ČR	D
Poměr min	0,90	0,91
Poměr průměr	0,94	0,94
Poměr max	0,97	1,00
Variabilita (%)	7,25	10,31
Sample - CV mean	1,81	1,91
Standard (P) - CV mean	1,45	1,50
Počet měření	22	28



Obr. 4: Srovnání relativní velikosti genomu zjištěných haplotypů (E+R a E+C1 označují směsné populace uvedených haplotypů).



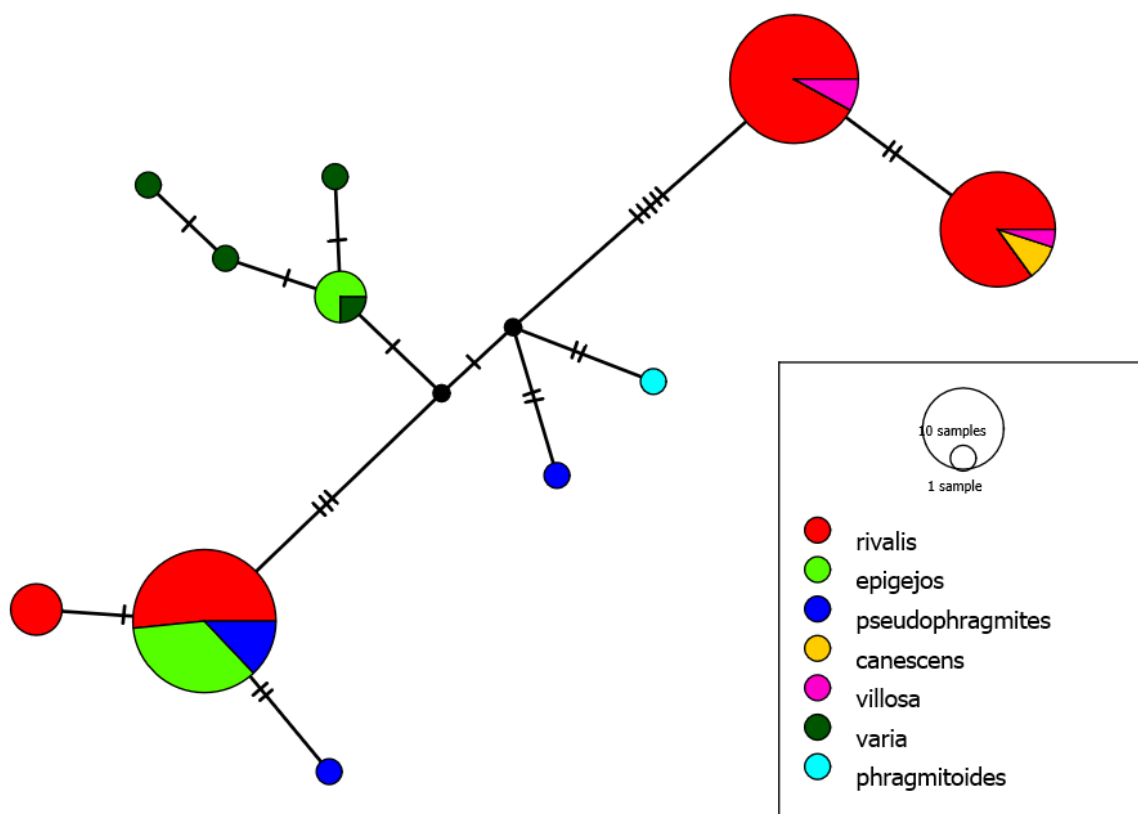
Obr. 5: Histogram fluorescence cytometrické analýzy vzorku Brňany 3 barveného DAPI.



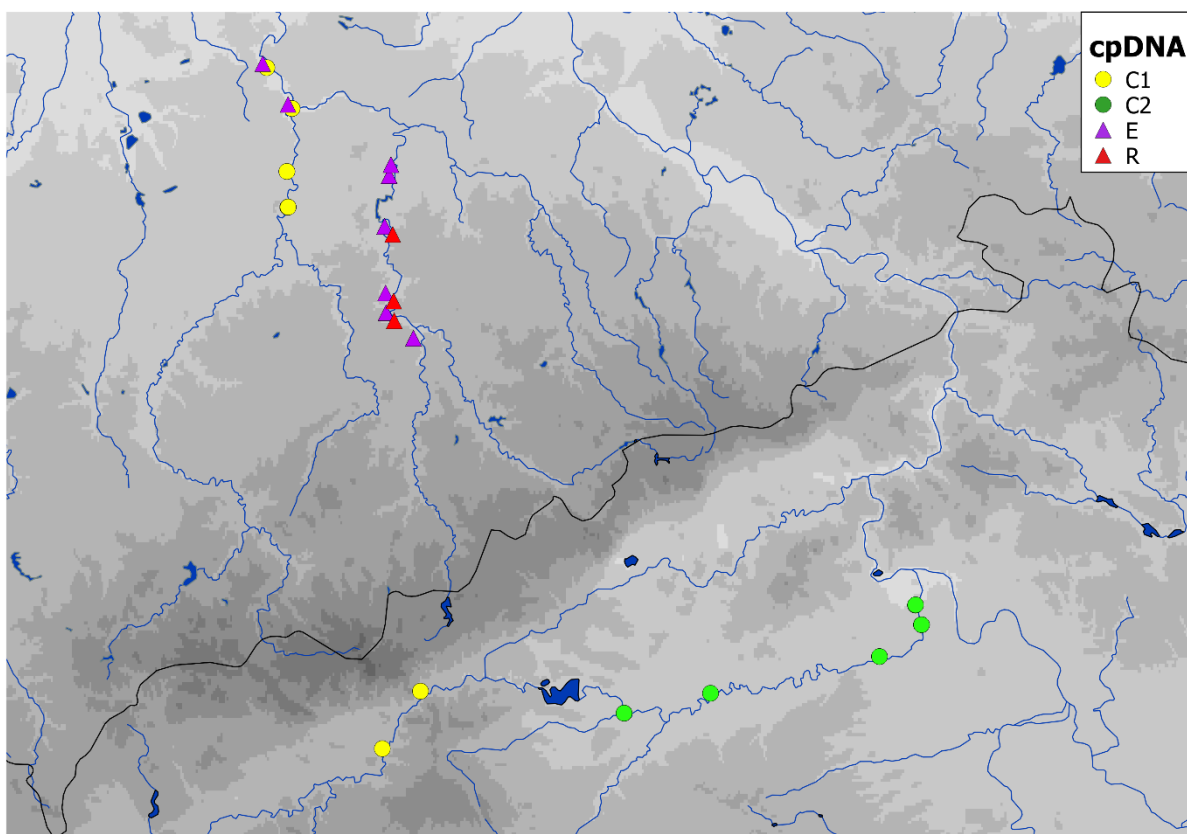
Obr. 6: Histogram fluorescence cytometrické analýzy vzorku Brňany 3 barveného PI.

### 5.3 Molekulární analýza

Délka sekvencí chloroplastových úseků *psbA-trnH<sup>GUG</sup>* a *psbK-trnS<sup>GCU</sup>* získaných z 90 jedinců byla 590 bp, resp. 594 bp. Ty byly spojeny do jednoho alignmentu (1196 bp), u kterého bylo zjištěno 11 haplotypů a byla vytvořena haplotypová síť (Obr. 7). U saských rostlin byly objeveny 3 haplotypy. Jeden z nich (E) se vyskytuje na lokalitách podél řeky Zschopau, spolu s druhým haplotypem (R), lišícím se pouze jednou 6 bp dlouhou inzercí. Třetí haplotyp (C1) se vyskytuje v populacích na řece Zwickauer Mulde a byl nalezen i v populacích z horního toku Ohře (lokality Velichov a Boč). Čtvrtý haplotyp (C2) je pak unikátní pro populace z dolního toku Ohře. Liší se od C1 haplotypu pouze dvěma substitucemi. Geografické rozmístění haplotypů zobrazuje mapa na obrázku 8. Zkratky haplotypů jsou odvozeny od příbuznosti s jinými druhy, C1 a C2 jsou příbuzné *C. canescens* (a *C. villosa* v případě haplotypu C1), E a R jsou příbuzné *C. epigejos* a *C. pseudophragmites*.

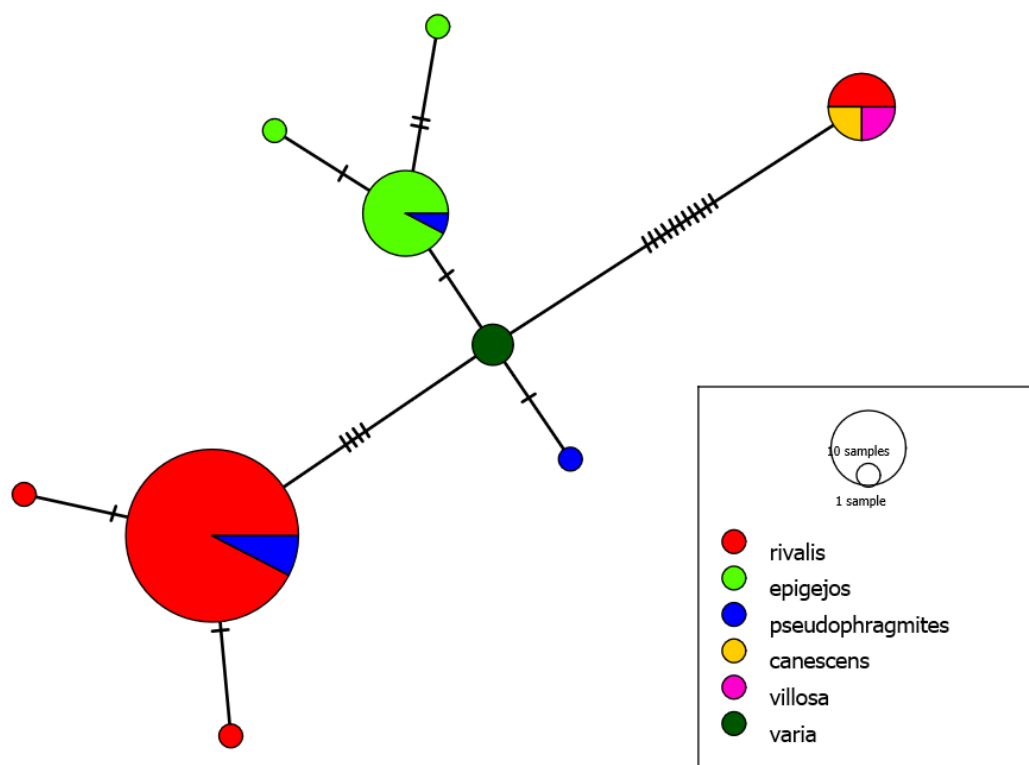


Obr. 7: Haplotypová síť chloroplastových úseků *psbA-trnH<sup>GUG</sup>* a *psbK-trnS<sup>GCU</sup>*.



Obr. 8: Geografické rozmístění zjištěných haplotypů.

Délka alignmentu jaderného úseku ITS získaného z 82 jedinců byla 536 bp. Sekvence obsahovaly i degenerované báze jako důsledek výskytu paralogů v jaderné DNA studovaných rostlin. Příčinou je hybridogenní původ některých druhů, vysoký ploidní stupeň a obecně mnohočetné kopie ITS. Sekvence obsahující degenerované nukleotidy se rozdělily do 15 ribotypů. Ribotypová síť rozlišila 9 skupin (Obr. 9), z nichž se i přes zjevné sloučení některých skutečných ribotypů do uměle vytvořených skupin jasně vytvořily dvě hlavní skupiny *C. rivalis*. Jedna skupina sdílí příbuzný ribotyp s druhy *C. canescens* a *C. villosa*, podobně jako v případě chloroplastových haplotypů. Druhá skupina se liší více než 15 mutacemi a je příbuzná jednomu z ribotypů *C. pseudophragmites* (Obr. 9).



Obr. 9: Ribotypová síť jaderného úseku ITS ze sekvencí obsahujících i pozice s degenerovanými bázemi.

## 5.4 Morfologická analýza

Průměrné hodnoty měřených znaků a procento větvících se rostlin rozdělené podle země původu jsou uvedeny v Tabulce 8, podle chloroplastového haplotypu pak v Tabulce 9. V důsledku měření morfometrických znaků jen u rostlin z roku 2015 a zároveň analýzy chloroplastových haplotypů pouze 3 rostlin z populace je druhý dataset relativně malý (36 rostlin). Znaky, které se ukázaly jako potenciálně významné už v základních popisných statistikách, jsou délka osiny a poměr špičky pluchy k celkové délce pluchy. Na obrázcích 10 a 11 je znázorněn rozdíl mezi českými a německými rostlinami i rozdíl mezi jednotlivými haplotypy. Osina českých rostlin (haplotyp C2), je delší než u německých haplotypů (Obr. 10). Poměr špičky pluchy ku pluše je odlišný především u haplotypu C1, kde je jeho hodnota menší než u dalších třech haplotypů (český C2 a německé E,R) (Obr. 11).

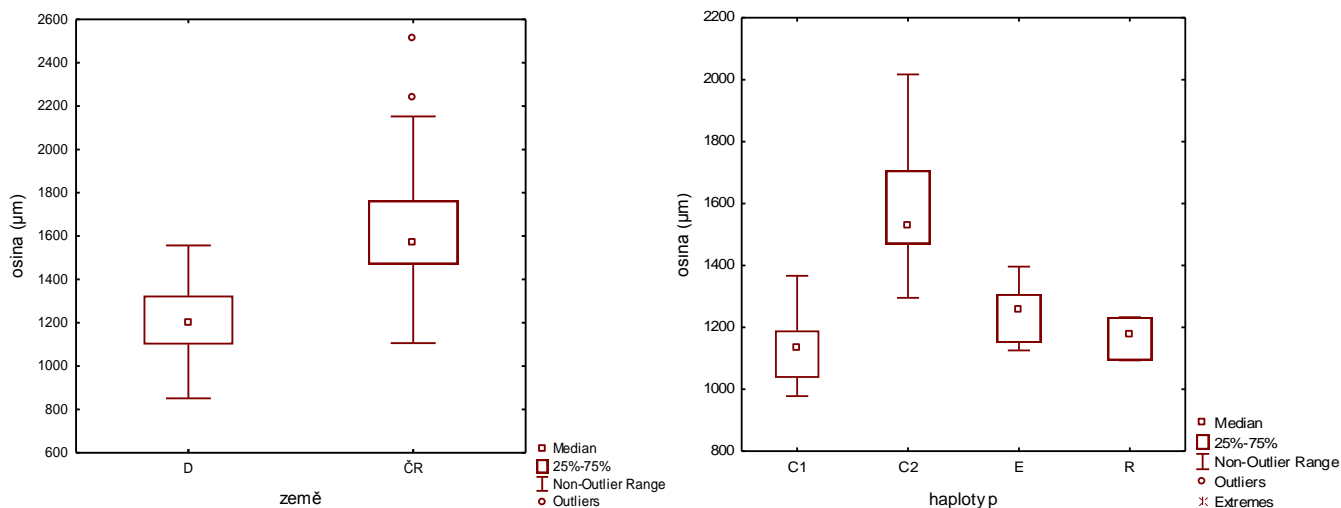
Tab. 8: Průměrné hodnoty znaků měřených na 115 rostlinách rozdělených podle země sběru.

Znak	jednotka měření	ČR	D
LATA	cm	25,6	25,0
VYSK	cm	168,5	172,0
KOL	počet	5,6	5,6
DEL_1	cm	24,6	24,3
SIR_1	mm	7,2	6,6
JAZ_1	mm	5,7	5,1
DEL_2	cm	30,7	35,2
SIR_2	mm	8,4	9,3
JAZ_2	mm	5,4	5,5
SP_LA	cm	9,3	10,1
PR_LA	cm	9,4	9,4
D_PL	μm	6995	6798
H_PL	μm	6251	6076
PLUCH	μm	3482	3443
OS	μm	<b>1628</b>	<b>1213</b>
SP_PLUCH	μm	<b>749</b>	<b>442</b>
SP/PLUCH	poměr	<b>0,21</b>	<b>0,13</b>
VETV	%	53,06	51,89

(tučně jsou zvýrazněny nejvíce odlišné hodnoty)

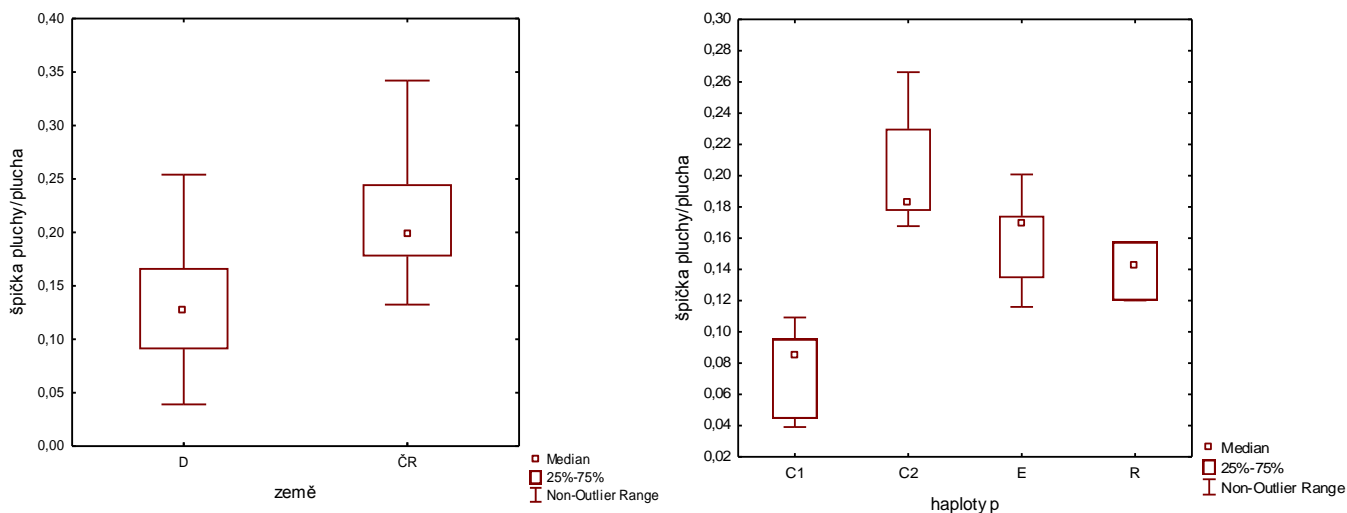
Tab. 9: Průměrné hodnoty znaků měřených na 36 rostlinách rozdělených podle haplotypů.

znak	jednotka měření	C1	C2	E	R
LATA	cm	25,2	25,7	26,3	26,2
VYSK	cm	171,1	168,1	177,6	177,5
KOL	počet	5,6	5,4	5,6	5,7
DEL_1	cm	24,7	25,3	25,7	24,8
SIR_1	mm	6,7	7,3	6,8	6,2
JAZ_1	mm	5,2	6,1	5,4	5,0
DEL_2	cm	35,0	31,2	35,6	34,8
SIR_2	mm	9,3	8,4	9,7	9,2
JAZ_2	mm	5,4	5,7	5,7	5,7
SP_LA	cm	10,2	9,6	10,6	10,4
PR_LA	cm	9,4	9,5	9,6	9,4
D_PL	μm	6781	7011	6677	6473
H_PL	μm	6068	6252	6003	5766
PLUCH	μm	3450	3481	3418	3309
OS	μm	1216	1614	1217	1208
SP_PLUCH	μm	455	746	514	553
SP/PLUCH	poměr	0,13	0,21	0,15	0,17
VETV	%	54,22	51,28	48,78	46,15



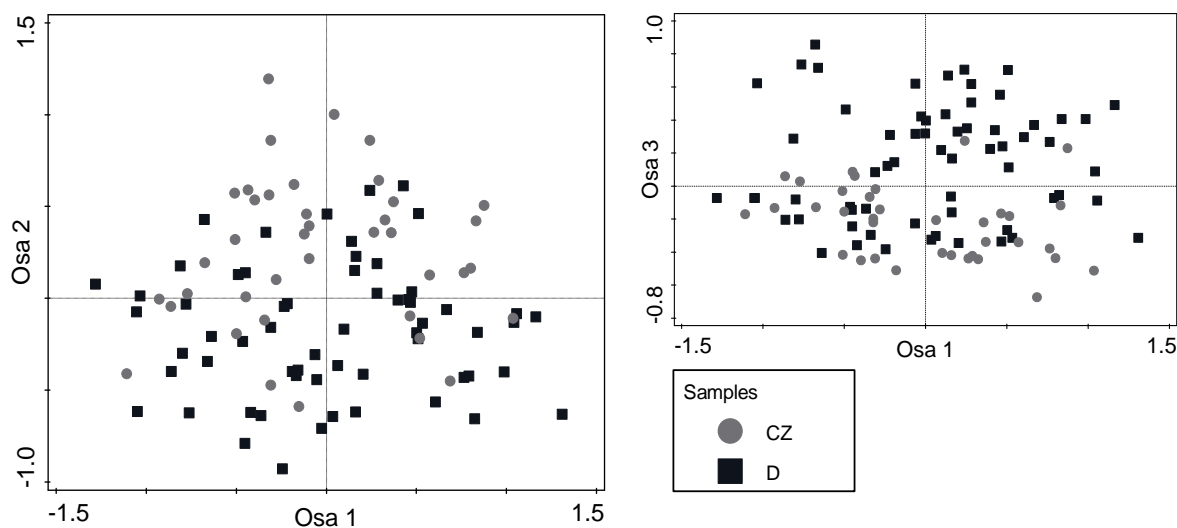
Obr. 10: Délka osiny podle země sběru (vlevo) a jednotlivých haplotypů měřených rostlin (vpravo).





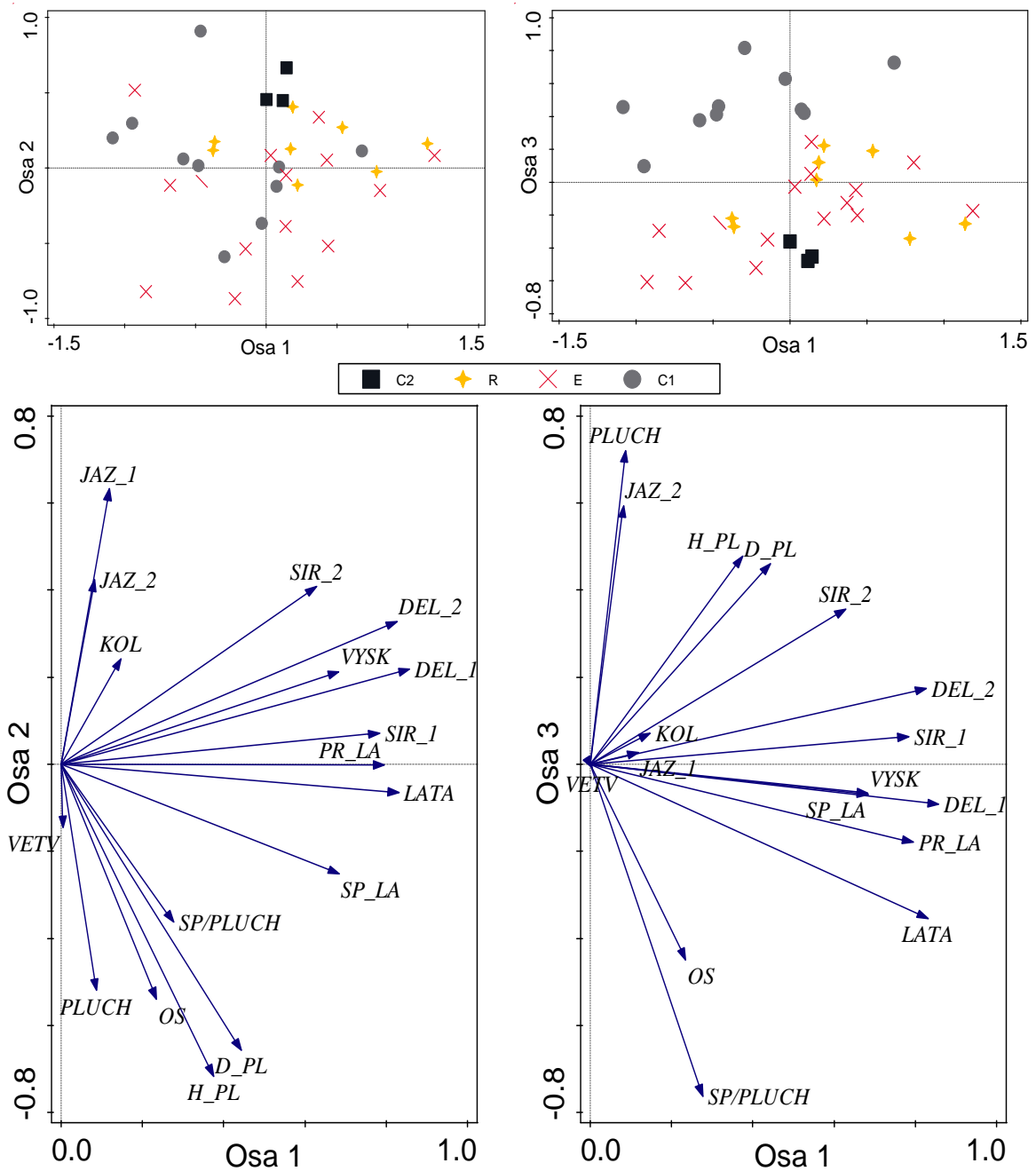
Obr. 11: Poměr špičky pluchy a celé pluchy podle země sběru (vlevo) a jednotlivých haplotypů měřených rostlin (vpravo).

Analýza hlavních komponent (PCA) 115 rostlin s označením objektů podle země sběru neukazuje žádné rozdíly v morfologii (Obr. 12). První osa vysvětluje 30,36 % variability, druhá osa 16,35 %, třetí 11,15 %, celkem tedy 57,86 % variability.



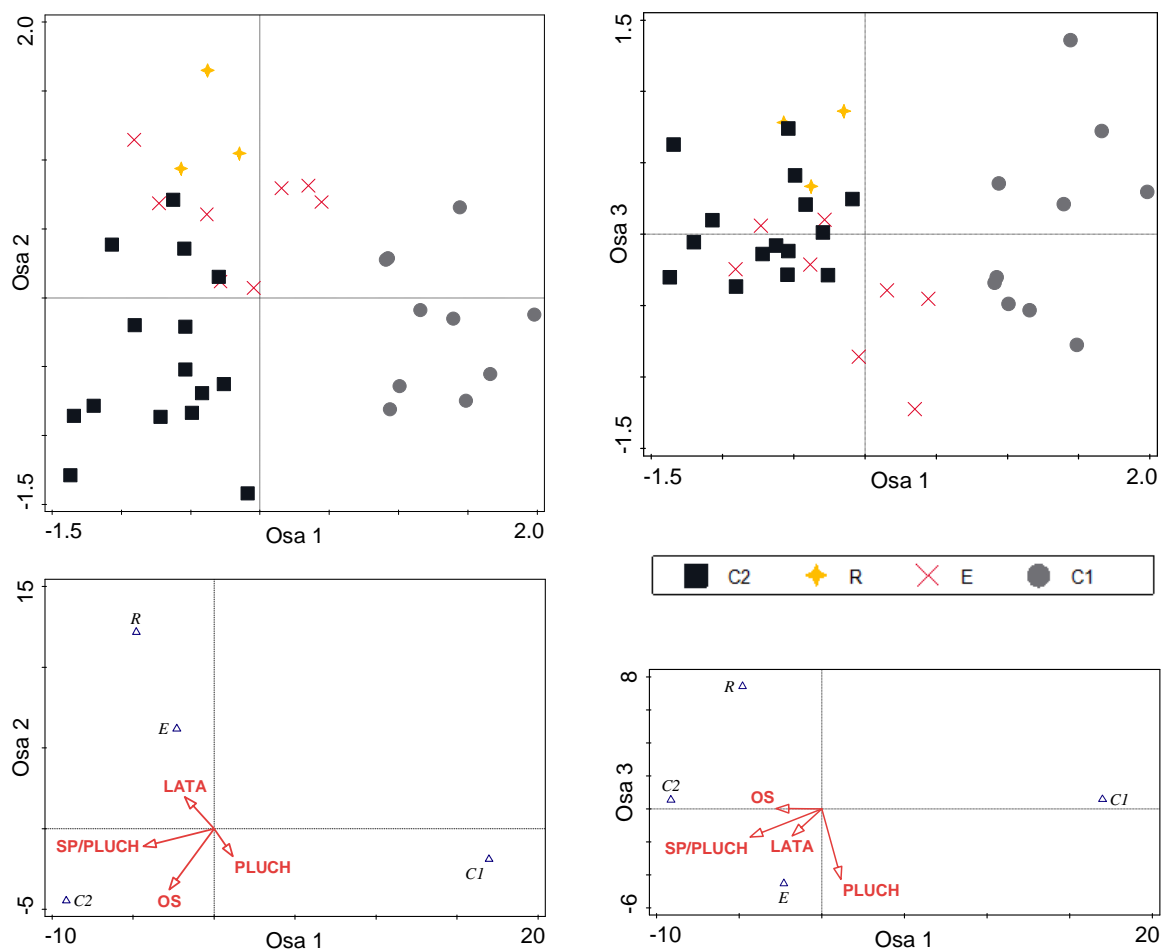
Obr. 12: Ordinační diagramy PCA, označení rostlin podle země původu.

PCA 36 rostlin se zjištěným haplotypem ukazuje, že se podle třetí osy, se kterou koreluje hlavně znaky PLUCH, JAZ\_2, SP/PLUCH a OS, oddělil haplotyp C1 (Obr. 13), první osa vysvětluje 30,63 % variability, druhá osa 16,13 %, třetí 14,37 %, celkem tedy 61,13 % variability.



Obr. 13: Ordinační diagramy PCA, označení rostlin podle haplotypů.

Kanonická diskriminační analýza (CDA) ukázala znaky, které nejlépe odlišují jednotlivé haplotypy (Obr. 14). První osa odděluje skupinu haplotypu C1, druhá osa částečně odděluje haplotyp C2 od R a E. S první a třetí osou jsou korelovány především znaky SP/PLUCH a PLUCH, s druhou osou znaky PLUCH a OS, jak ukazují standardizované koeficienty diskriminačních funkcí 4 znaků vybraných forward selection (Tab. 10).



Obr. 14: Ordinační diagram CDA, klasifikace podle haplotypů, efekty 4 nejvýznamnějších vysvětlujících znaků.

Tab. 10: Standardizované koeficienty diskriminačních funkcí pro 4 nejvýznamnější znaky a 3 kanonické osy.

znak	osa 1	osa 2	osa 3
SP/PLUCH	-18.7373	5.75433	-13.6999
PLUCH	10.7373	-8.04199	-22.0167
OS	-1.74385	-9.32656	5.50264
LATA	-3.51653	5.87678	-0.6685

## 6 Diskuze

Německými populacemi se zabývala práce Schiebold et al. z roku 2008. V této studii zkoumali jedince ze 43 populací podél břehů dvou toků a jejich soutoku. Řeka Zschopau se vlévá do Freiburger Mulde, která se po soutoku s Zwickauer Mulde jmenuje Vereinigte Mulde. Výsledkem provedené RAPD analýzy bylo rozlišení dvou homogenních linií, vázaných na jednotlivé toky řek (Zschopau + Freiburger Mulde; Zwickauer Mulde), po jejichž soutoku se rozlišené linie vyskytovaly ve směsných populacích. Proto byl z důvodu předpokládané genetické jednotnosti počet sebraných saských populací snížen na 9. Provedená studie zjistila rovněž 2 skupiny chloroplastových haplotypů, které jsou rozšířeny podle stejného schématu. U jednoho z nich se ovšem vyskytuje 6 bp dlouhá inzerce, která se vyskytuje v několika populacích spolu se svým ancestrálním haplotypem. To naznačuje unikátní vznik této inzerce a druhotné rozšíření haplotypu vegetativním množením po proudu řeky.

Před započítáním výzkumu byl druh znám pouze od Žatce, odkud byl mylně publikován jako *C. pseudophragmites* (Kubát, 1981). Další výskyty byly na základě revize herbářového materiálu známy z nejdolejšího toku Ohře. Nově nalezené lokality po středním a dolním toku Ohře ukazují, že druh je na Ohři mnohem častější než se původně předpokládalo. Nelze vyloučit, že druh roste i na dalších vhodných řekách v území. Vzhledem k malému celkovému areálu a charakteru biotopu, jakým jsou převážně šterkové náplavy v klidnějších místech toku za úsekem rychleji proudící vody, by v úvahu připadala např. řeka Bílina.

Hexaploidní úroveň zjištěná průtokovou cytometrií je i mezi třtinami, které mají často i v rámci jednoho druhu více stupňů ploidní úrovně, celkem vzácná. *Calamagrostis chalybaea*, *C. lapponica* a *C. epigejos*  $2n = 6x = 42$  jsou uváděny ze Skandinávie (Nygren, 1946), *C. epigejos* i z Kazachstánu (Rudyka, 1990). Hexaploidní *Calamagrostis villosa* je uváděna ze Slovenska (Murín et Májovský, 1976). Pokud nejde o omyl, jde o výjimečný výskyt, jak ukazuje práce Krahulcové (2003), kde byl ve 13 zkoumaných českých a slovenských populacích zjištěn u *C. villosa* jen dekaploidní počet ( $2n = 10x = 70$ ). Zjištěná hexaploidní úroveň *C. rivalis* ovšem neodpovídá chromozomovému počtu uváděnému v dřívější literatuře Heine (1972) uvádí pro druh tehdy považovaný za endemický pro Sasko 56 chromozómů a označuje ho jako tetraploida. Později se v literatuře objevují údaje 56 a 28 chromozómů (Conert, 1989; Raus et Scholz, 2002), což odpovídá oktoploidní, resp. tetraploidní úrovni. Originální zdroje těchto chromozomových počtů nejsou jasné. K vyřešení bude nutno ověřit

počet chromozómů u zkoumaných rostlin s předpokládanou hexaploidní úrovní přímým počítáním chromozómů.

Relativně vyšší procento variability velikosti genomu německých rostlin (10,31 %) je způsobeno dvěma extrémními hodnotami a vyšší velikostí genomu směsných populací haplotypů E a C2. Ty ovšem v jednotných populacích mají velikost nižší a shodnou. Je otázkou, jestli se jedná o chybu měření, nebo je velikost genomu variabilní.

Na haplotypové síti cpDNA je vidět, že se vyzemily dvě skupiny haplotypů, které se liší více než 10 substitucemi. Jedna genetická linie je příbuzná *C. canescens* a *C. villosa*, druhá pak *C. pseudophragmites* a *C. epigejos*. Lze předpokládat, že linie mohly vzniknout opakovaným recipročním křížením *C. canescens* a *C. pseudophragmites* nebo *C. epigejos*. Tuto hypotézu podporuje i analýza ITS, kde se i přes přítomnost četných degenerovaných bazí vyzemily dvě podobné skupiny jako u chloroplastových haplotypů. Z dvojice *C. epigejos* a *C. pseudophragmites* se v analýze ITS ukázala jako pravděpodobnější rodičovský taxon *C. pseudophragmites*. Problémy s paralogy v úseku ITS se často řeší pomocí klonování, které je ale v případě vysokých polyploidů časově a finančně náročné a vyžaduje získání velkého počtu klonů. Situaci komplikuje i výskyt mnohočetných kopií ITS (Álvarez et Wendel, 2003).

Hypotézu vzniku *C. rivalis* opakovanou hybridizací zmínil i Schiebold et al. (2008), který však ve své studii nezahrnul druh *C. pseudophragmites* a jako geneticky nejbližší taxony označil *C. canescens* a *C. phragmitoides*. Částečným vodítkem pro určení rodičovských taxonů může být ploidní stupeň a s ním související mechanismus produkce gamet. To je důvod, proč z druhů *C. canescens* a *C. villosa*, kterým je příbuzná jedna ze skupin haplotypů i ribotypů *C. rivalis* byl jako potenciální rodičovský taxon označen pouze *C. canescens*. *C. villosa* je dekaploidní (Krahulcová, 2003), proto je téměř nemožné, aby dala vzniknout hexaploidnímu hybridovi. Musela by se zkřížit s diploidem, který mezi recentními třtinami není znám (Tateoka, 1976; Kellogg, 2015). *C. canescens* a *C. pseudophragmites*, které z analýz vyplývají jako nejpravděpodobnější parentální druhy, jsou tetraploidní (Nygren, 1946; Krahulcová, 2003; Tateoka, 1976; Gregor et Hand, 2009). Ke vzniku hexaploidního křížence by tedy bylo potřeba splynutí redukované a neredukované gamety (Briggs et Walters, 1997; Ramsey et Schemske, 1998). Stejnou hypotézu uvedl Nygren pro vznik *C. chalybea* ( $2n = 6x = 42$ ), předpokládal zkřížení dvou tetraploidních amfimiktických druhů, *C. arundinacea* a *C. canescens* (Nygren, 1946). Tato problematika vyžaduje další studium, nejlépe pomocí celogenomových metod, ať už zobrazovacích (GISH), nebo sekvenováním typu NextGen.

Morfologie odpovídá popisu v základní středoevropské determinační literatuře (Conert, 1989; Jäger, 2011). V rámci malého areálu se ovšem vyskytují patrné rozdíly především v délce pluchy a ve znacích spojených s osinou, konkrétně její délka a vzdálenost nasednutí od špičky pluchy, jak ukázala diskriminační analýza. Tyto rozdíly se ovšem vyskytují hlavně v rámci německých rostlin, v závislosti na haplotypu chloroplastu. Tato skutečnost a sdílení stejného chloroplastového haplotypu napříč státy podporují předpoklad, že se rostliny z našeho území neliší od saského druhu *Calamagrostis rivalis*.

## 7 Závěr

Při průzkumu toku řeky Ohře v letech 2014 a 2015 bylo objeveno 7 lokalit studovaného taxonu. Rostliny byly srovnány s druhem *Calamagrostis rivalis*, považovaným za endemický v Sasku, odkud byl materiál získán z 10 lokalit. Relativní velikost genomu rostlin z obou států se neliší, DNA ploidní úroveň byla určena jako hexaploidní. Absolutní velikost genomu byla vypočtena na 11,91 pg. Analýza dvou chloroplastových úseků, psbA-trnH<sup>GUG</sup> a psbK-trnS<sup>GCU</sup>, rozlišila 3 německé a 2 české haplotypy, 1 z nich je sdílený rostlinami z obou zemí. Studium jaderného úseku ITS i přes problémy s degenerovanými nukleotidy v důsledku výskytu paralogických sekvencí ukázalo dvě hlavní skupiny ribotypů studovaných rostlin. Příbuznost těchto skupin s *C. canescens* a *C. pseudophragmites* odpovídá výsledkům chloroplastové analýzy a obě tyto metody podporují hypotézu o původu druhu *C. rivalis* opakovaným recipročním křížením *C. canescens* a *C. pseudophragmites*. Morfologická analýza ukázala rozdíly mezi jednotlivými haplotypy, nejvýznamnějšími znaky jsou délka pluchy a osiny, poměr špičky pluchy od nasednutí osiny ku celé pluše a délka laty. Největší rozdíl je patrný mezi dvěma genetickými liniemi německých rostlin, české rostliny se v morfometrických analýzách shlucovaly s jednou z nich. Tyto výsledky vedou k závěru, že studované rostliny z českých populací jsou druhem *Calamagrostis rivalis*.

## 8 Literatura

- Adanson M. (1763): Familles des plantes. Chez Vincent, Paris.
- Alvarez I. & Wendel J. F. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417–434.
- Anderson E. & Stebbins G. L. Jr. (1954): Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8: 378–388.
- Asker S. & Jerling L. (1992): Apomixis in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Asker S. (1979). Progress in apomixis research. *Hereditas* 91: 231–40.
- Asker S. (1980). Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. *Hereditas* 93: 277–93.
- ter Braak C. J. F. & Šmilauer P. (2012). Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA.
- Briggs D. & Walters S. M. (1997). Plant Variation and Evolution, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Carman J. G. (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 51–94.
- Clarion M. (1812). *Deyeuxia*. In Essai d'une nouvelle Agrostographie ou Nouveaux genre des Graminees, Palisot de Beauvois A. M. F. I. Imprimerie de Fain, Paris.
- Conert H. J. (1989). *Calamagrostis*. In Ilustrierte Flora von Mitteleuropa, 357–380, Hegi G. (ed.). Paul Parey, Hamburg.
- van Dijk P. J. & Vijverberg K. (2005). The significance of apomixis in the evolution of the angiosperms: a reappraisal. In Plant species-level systematics: new perspectives on pattern and process, 101–116, Bakker F., Chatrou L., Gravendeel B. & Pelsner P. B. (eds.). A. R. G. Gantner, Ruggell.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233–2244.

- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M. A., Nardi L. & Obermayer R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 17–26.
- Ebert D. & Peakall R. (2009). A new set of universal de novo sequencing primers for extensive coverage of noncoding chloroplast DNA: new opportunities for phylogenetic studies and cpSSR discovery. *Molecular Ecology Resources* 9: 777–783.
- Edgar E. (1995). New Zealand species of *Deyeuxia* P. Beauv. and *Lachnagrostis* Trin. (Gramineae: Aveneae) *New Zealand Journal of Botany* 33: 1–33.
- Gerstlauer L. (1940). Eine umstrittene sächsische *Calamagrostis*. *Hercynia* 3: 174–176.
- Grant V. (1981). Plant speciation, 2nd edition. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Green C. W. (1984). Sexual and apomictic reproduction in *Calamagrostis* (Gramineae) from Eastern North America. *American Journal of Botany* 71: 285–293.
- Gregor T. & Hand R. (2009): Chromosomenzahlen von Farn- und Samenpflanzen aus Deutschland. *Kochia* 4: 37–46.
- Grimanelli D., Leblanc O., Perotti E. & Grossniklaus U. (2001). Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics* 17: 597–604.
- Grulich V. (1986). Klíč k určování československých druhů rodu *Calamagrostis*. Muzeum a současnost, řada přírodovědná edition, Roztoky u Prahy.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hand M. L. & Koltunow A. M. (2014). The genetic control of apomixis: asexual seed formation. *Genetics* 197: 441–450.
- Heine R. (1972). Zur Klärung der sächsischen *Calamagrostis*-Art in den Muldentälern, dem Flöha und Zschopautal. *Feddes Repertorium* 83: 275–288.
- Jäger E. J. (2011). Rothmaler Exkursionsflora von Deutschland. Gefäßpflanzen: Grundband. 20. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.



- Katoh K. & Standley D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kellogg E. A. (2015). *Poaceae*. In *The Families and Genera of Vascular Plants*, Kubitzki K. (ed.). Springer, New York, NY, USA.
- Kihara H. & Ono T. (1926). Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der *Rumex*-Arten. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 4:475–481.
- Knobloch I. W. (1972). Intergeneric hybridization in flowering plants. *Taxon* 21:97–103.
- Koch G. J. (1837). *Synopsis florae germanicae et helveticae*. Sumptibus Frederici Wilmans, Frankfurt am Main.
- Koltunow A. M. & Grossniklaus U. (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547–574.
- Koltunow A. M., Bicknell R. A. & Chaudhury A. M. (1995). Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology* 108: 1345–1352.
- Koutecký, not publ. FCM, velikost genomu *Bellis perennis*.
- Koutecký P. (2015). MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. *Plant Systematics and Evolution* 301:1115–1121.
- Krahulcová A. (2003). Chromosome numbers in selected monocotyledons (Czech Republic, Hungary and Slovakia). *Preslia* 75: 97–113.
- Kubát K., Lorber J. & Sládek J. (1981). Floristické kursy Severočeské pobočky ČSBS v Mašřově a v Žatci. *Severočeskou Přírodou* 12: 57–80.
- Lehbert R. (1924). Neue Ergebnisse der *Calamagrostis*-Forschung in den Jahren 1913 bis 1916. *Beil. Pharmacia* (Reval): 1–21.
- Leigh J. W. & Bryant D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1110–1116.
- Lu S. L., Chen W. L. & Phillips S. M. (2006). *Deyeuxia* Clarion ex P. Beauvois. In *Flora of China – Poaceae* 22: 348–359, Wu Z. Y., Raven P. H. & Hong D. Y. (eds). Science Press, Beijing, China & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, MO, USA.

- Lu S. L. & Phillips S. M. (2006). *Calamagrostis*. In Flora of China – *Poaceae* 22: 359–361, Wu Z. Y., Raven P. H. & Hong D. Y. (eds). Science Press, Beijing, China & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, MO, USA.
- Masterson J. (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421–424.
- Matuszkiewicz W. (1948). Materiały do monografii rodzaju *Calamagrostis* Adans. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska*, Sectio C 3(7): 223–256.
- Murín A. & Májovský J. (1976). In IOPB chromosome number reports LIII, Löve Á. (ed.). *Taxon*, 25: 483–500.
- Naumova T. N. (2008). Apomixis and amphimixis in flowering plants. *Cytology and Genetics* 42: 179–188.
- Nogler G. A. (1984). Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Botanica Helvetica* 94: 411–422.
- Noyes R. D. (2008). Sexual devolution in plants: apomixis uncloaked? *Bioessays* 30: 798–801.
- Nygren A. (1946). The Genesis of Some Scandinavian Species of *Calamagrostis*. *Hereditas* 32: 131–261.
- Nygren A. (1948a). Further Studies in Spontaneous and Synthetic *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas* 34: 113–134.
- Nygren A. (1948b). Some Interspecific Crosses in *Calamagrostis* and Their Evolutionary Consequences. *Hereditas* 34: 387–413.
- Nygren A. (1949). Apomictic and Sexual Reproduction in *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas* 35: 285–300.
- Nygren A. (1954). Investigations on North-American *Calamagrostis*. *Hereditas* 40: 377–397.
- Nygren A. (1962). Artificial and natural hybridization in European *Calamagrostis*. *Symbolae Botanicae Upsalienses*. 17: 1–105.
- Otto F. (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In Methods in Cell Biology, Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. (eds.). Academic Press, New York, NY, USA.

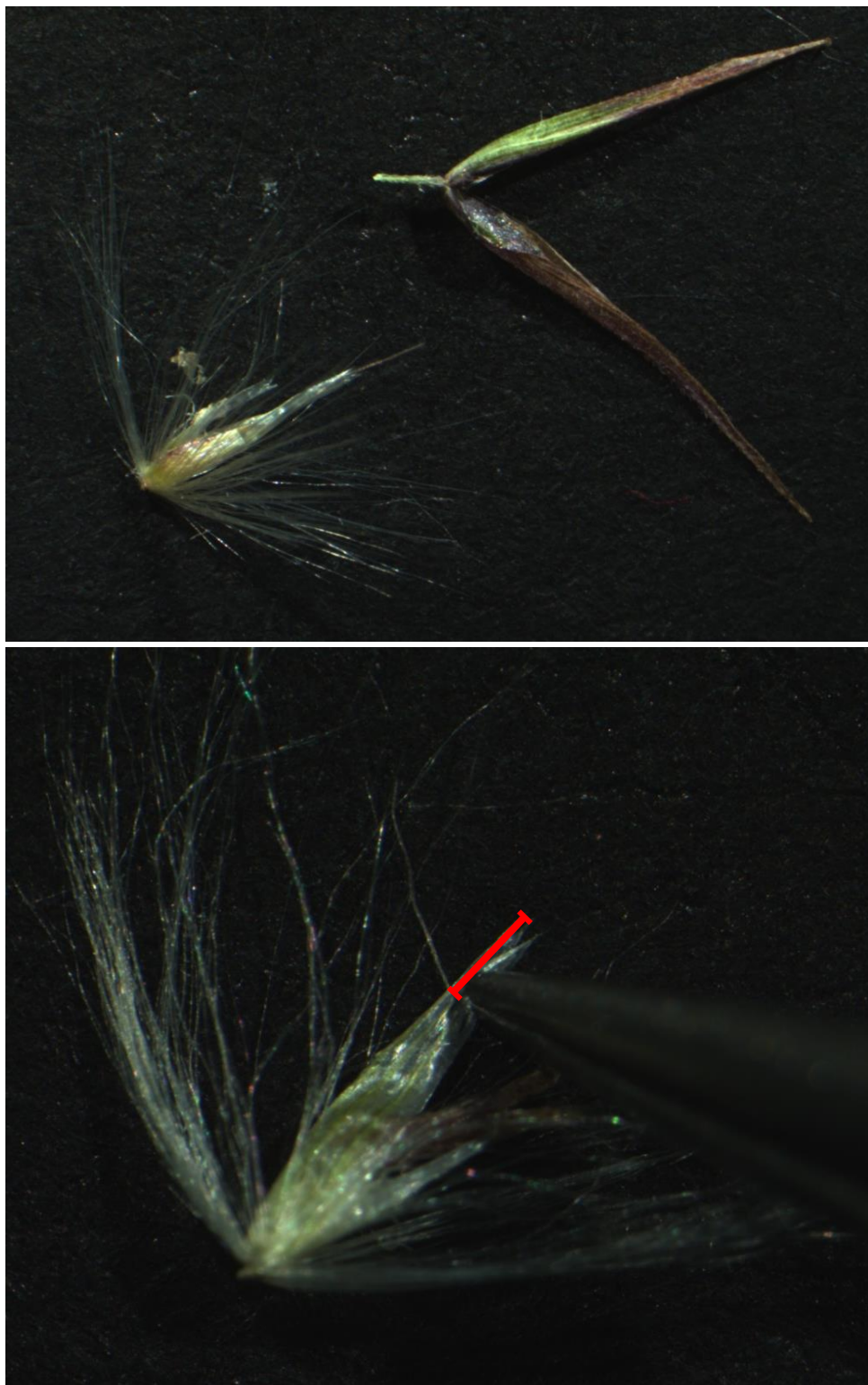
- Paszko B. & Nobis M. (2010). The hybrid origin of *Calamagrostis* × *gracilescens* (*Poaceae*) in Poland inferred from morphology and AFLP data. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 79(1): 51–61.
- Paszko B. (2002). Hybridization as a cause of taxonomic problems in the genus *Calamagrostis* in Poland. *Ecological Questions* 2: 151–157.
- Phillips S. M. & Chen W. L. (2003). Notes on grasses (*Poaceae*) for the Flora of China I: *Deyeuxia*. *Journal of Botanical Nomenclature* 13: 318–321.
- Quintanar A., Castroviejo S. & Catalan, P. (2007). Phylogeny of the tribe *Aveneae* (*Pooideae*, *Poaceae*) inferred from plastid trnT-F and nuclear ITS sequences. *American Journal of Botany* 94: 1554–1569.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ramsey J. & Schemske D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 29: 467–501.
- Raus T. & Scholz H. (2002). Once again: The correct name of the endemic *Calamagrostis* from Saxony (Germany). *Feddes Repertorium* 113: 271–272.
- Rieseberg L. H., Raymond O., Rosenthal D. M., Lai Z., Livingstone K., Nakazato T., Durphy J. L., Schwarzbach A. E., Donovan L. A. & Lexer C. (2003). Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301: 1211–1216.
- Roalson E. H. & Friar E. A. (2000). Infrageneric classification of *Eleocharis* (*Cyperaceae*) revisited: evidence from the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA. *Systematic Botany* 25: 323–336.
- Roshevitz R. (1934). *Calamagrostis*. In Fl. USSR 2, Komarov V. L. (ed.). Academiae Scientiarum URSS, Leningrad.
- Roth A. G. (1789). Tentamen Florae Germanicae. T. II, pars I. In bibliopolio I. G. Mülleriano, Lipsiae.
- Roth A. G. (1827). Enumeratio plantarum phaenogamarum in Germania sponte nascentium. Pars prima. Sectio prior. J. F. Gleditsch, Lipsiae.

- Rudyka E. G. (1990): Chromosome numbers of vascular plants from the various regions of the USSR. *Botanicheskii Zhurnal SSSR* 75: 1783–1786.
- Saarela J. M., Liu Q., Peterson P. M., Soreng R. J. & Paszko, B. (2010). Phylogenetics of the grass ‘*Aveneae*-type plastid DNA clade’ (*Poaceae: Pooideae, Poeae*) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequence data. In Diversity, phylogeny and evolution in the monocotyledons, Seberg Q., Peterson G., Baxford A. S. & Davis J. I. (eds.). Aarhus University Press, Aarhus.
- Sang T., Crawford D. J. & Stuessy T. F. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia*. *American Journal of Botany* 84: 1120–1136.
- Schaabová V. (2013). Taxonomická problematika rodu *Calamagrostis phragmitoides* ve střední Evropě. Bc. Thesis, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Schaabová V. (2015). Variabilita *Calamagrostis phragmitoides* v ČR a srovnání s morfologicky podobnými druhy. Mgr. Thesis, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Schemske D. W. (2000). Understanding the origin of species. *Evolution* 54: 1069–1073.
- Schiebold S., Hensen I., Wesche K. & Röser M. (2008). Extensive clonality of the endemic *Calamagrostis pseudopurpurea* Gerstl. ex OR Heine in Central Germany revealed by RAPD markers. *Plant Biology* 11(3): 473–482.
- Scholz H. (1964). Zur Gramineenflora Mitteleuropas II. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 77: 145–160.
- Scholz H. (1971). Gegenwärtige Kenntnisse über die Verbreitung der *Calamagrostis phragmitoides* HARTM. (Purpureitgras) in Mitteleuropa. *Philippia* 1: 85–90.
- Soreng R. J., Peterson P. M., Romaschenko K., Davidse G., Zuloaga F. O., Judziewicz E. J., Filgueiras T. S., Davis J. I. & Morrone O. (2015). A worldwide phylogenetic classification of the *Poaceae* (*Gramineae*). *Journal of Systematics and Evolution* 53 (2): 117–137.
- Soreng R., Davis J. & Doyle, J. (1990). A Phylogenetic Analysis of Chloroplast DNA Restriction Site Variation in *Poaceae* subfam. *Pooideae*. *Plant Systematics and Evolution* 172: 83–97.

- Stebbins G. L. (1956). Cytogenetics and evolution of the grass family. *American Journal of Botany* 43: 890-905.
- Stebbins G. L. (1969). The significance of hybridization for plant taxonomy and evolution. *Taxon* 18: 26-35.
- Stebbins G. L. (1971). Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold, London.
- Stebbins G. L. (1985). Polyploidy, Hybridization, and the Invasion of New Habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72: 824-832.
- Strasburg J. L. & Rieseberg L. H. (2013). Methodological challenges to realizing the potential of hybridization research. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 259–260.
- Šmilauer P. & Lepš J. (2014). Multivariate analysis of ecological data using Canoco5. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Štech M. (in prep.). *Calamagrostis* Adans. – třtina.
- Tateoka T. (1976). Chromosome numbers of the genus *Calamagrostis* in Japan. *The Botanical magazine, Tokyo* 89: 99–114.
- Torges E. (1898). Zur Gattung *Calamagrostis* Adans. *Mitteilungen des Thüringischen Botanischen Vereins*. Neue Folge, Heft XII: 22–25. Weimar.
- Tzvelev N. N. (1965). K sistematike roda vejnik (*Calamagrostis* Adans.) v SSSR. *Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii, Moskva-Leningrad* 2: 5–50.
- Tzvelev N. N. (1976): Zlaki SSSR (*Poaceae* URSS). Nauka, Leningrad.
- Tzvelev N. N. (1989). The System of Grasses (*Poaceae*) and Their Evolution. *The Botanical Review* 55: 141–204.
- Villesen P. (2007). FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes* 7: 965–968.
- Wasiljev W. N. (1960). Das System der Gattung *Calamagrostis*. *Feddes Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 63: 229–251.

## 9 Přílohy

Příloha 1: Vypreparovaný květ *C. rivalis*. Na spodním obrázku zobrazen znak SP\_PLUCH.



Příloha 2: Charakter porostu a biotopu *C. rivalis*, lokalita LIBOR (Libočany u Žatce).



Příloha 3: Lata *C. rivalis* v optimu kvetení, lokalita LIBOR (Libočany u Žatce).

