

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Morfologická a molekulární variabilita, rozšíření a
ekologie druhů *Lewinskya affinis* a *Lewinskya*
*fastigiata***

Bakalářská práce

Kristýna Pokorná

Školitel: Doc. Jan Kučera, Ph.D

České Budějovice 2020

Pokorná, K., 2020: Morfologická a molekulární variabilita, rozšíření a ekologie druhů *Lewinskya affinis* a *Lewinskya fastigiata*. Morphological and molecular variability, distribution and ecology of *Lewinskya affinis* a *Lewinskya fastigiata* species. Bc. Thesis, in Czech] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This thesis deals morphological and molecular differentiation of *Lewinskya affinis* s. str. and *L. fastigiata*, two closely related and morphologically similar species described already in 19th century but until recently considered synonymous in taxonomic literature. My aims were the thorough morphological description and morphometric analysis of measured characters, evaluation of molecular features and distribution data in selected regions of the Czech Republic.

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, 9. 12. 2020

.....
Kristýna Pokorná

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Honzovi Kučerovi za velkou trpělivost a dobré vedení, Bety Manukjanové za instrukce v laboratoři, Petrovi Kouckému za uvedení do statistických analýz a provedení CDA, Ondrovi Hornychovi za pomoc se statistikou a Evči Holé za dobré rady a podporu.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	<i>Lewinskya affinis</i> a <i>L. fastigiata</i> v systému mechorostů.....	2
1.2	Použití molekulárních metod v systematice mechorostů.....	8
1.3	Cíle práce.....	10
2	Metodika	11
2.1	Popis materiálu	11
2.1.1	Sběr vzorků	11
2.1.2	Charakteristiky zaznamenávané u lokalit a sbíraných vzorků	11
2.2	Morfologické vyhodnocení sběrů	14
2.3	Metodika získání molekulárních dat.....	18
3	Výsledky	20
3.1	Molekulární znaky	20
3.2	Morfologie.....	21
3.2.1	Směsné položky.....	25
3.2.2	Vyhodnocení morfologických odlišností obou druhů podle molekulárně ověřených položek	30
3.3	Rozšíření a relativní zastoupení druhů na lokalitách	35
3.4	Ekologické znaky.....	35
4	Diskuse.....	38
4.1	Molekulární variabilita druhů <i>Lewinskya affinis</i> a <i>L. fastigiata</i> a jejich odlišení ..	38
4.2	Variabilita druhů <i>Lewinskya affinis</i> a <i>L. fastigiata</i> v morfologických znacích a jejich odlišení	38
4.3	Ekologické znaky.....	41
5	Závěr	42
6	Literatura.....	43
	Přílohy	46

Příloha 1	46
Příloha 2	48

1 Úvod

Systematika mechorostů je v současné době konfrontována s mnoha výzvami. Jednou z nich je například existence kryptických a semikryptických druhů, které jsou objevovány či znovuobjevovány většinou až při použití molekulárních metod, protože oproti cévnatým rostlinám je rozlišování mechů ztíženo redukovanou morfologií. Často se jedná o druhy, které jsou známé svým širokým rozšířením a velkou morfologickou variabilitou. Až studie, které se začaly zabývat daným druhem detailněji, objevily dříve přehlíženou variabilitu.

Mezi mechorosty byla odhalena skrytá diverzita například u lupenitých jätrovek *Aneura pinguis* (Bączkiewicz et al. 2017) a *Conocephalum conicum* (Odrzykoski & Szweykowski 1991) nebo u listnaté jätrovky *Porella platyphylla* (Heinrichs et al. 2011). U mechů lze jmenovat například *Hamatocaulis vernicosus* (Hedenäs & Eldenäs 2007) nebo *Ulota crispa* (Caparrós et al. 2016).

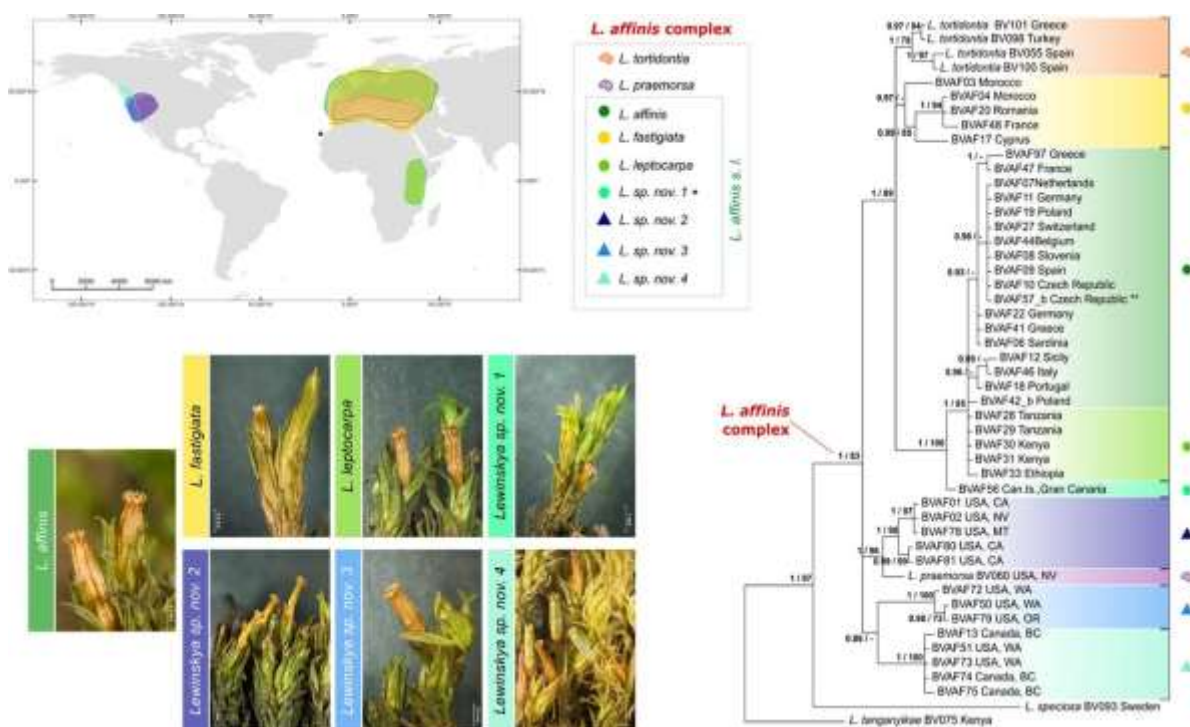
Příkladem takového objevu dříve nerozeznávaných nebo dříve synonymizovaných druhů je i komplex široce rozšířeného druhu *Lewinskya affinis* (Vigalondo et al. 2019). Ve střední Evropě se v současnosti vyskytují 2 druhy z tohoto komplexu, a to *Lewinskya affinis* a *L. fastigiata*. Oba druhy byly popsány již v první polovině 19. století, mnoho autorů je však postupně přestalo rozlišovat a ve většině literatury došlo k synonymizaci těchto názvů. V současné době se však objevuje stále více prací, které podporují a diskutují oprávněnost jejich rozlišování (Frahm 2011, Guerra et al. 2014, Ignatov & Ignatova 2018, Vigalondo et al. 2019).

1.1 *Lewinskya affinis* a *L. fastigiata* v systému mechorostů

Lewinskya affinis a *L. fastigiata* patří mezi mechy řádu Orthotrichales a čeledi Orthotrichaceae, která zahrnuje epifyticky nebo epiliticky rostoucí mechy, které je možné podle publikací Pilous & Duda (1960), Smith (2004), Váňa (2006), (Váňa 2007), Guerra et al. (2014) charakterizovat pomocí následujících znaků. Rostliny obvykle vytvářejí tmavé polštáře. Jejich lodyžky jsou vzpřímené nebo poléhavé, jednoduché či svazčité větvené. Lístky vyrůstají hustě na lodyžce, za vlhka odstávají od lodyžky, za sucha jsou buď kadeřavě zkroucené nebo rovné a přitisklé k lodyžce. Tvar lístků může být od čárkovitě kopinatého po vejčité kopinatý. Okraje listů jsou obvykle ohrnuté. Žebro listů je jednoduché, končící většinou pod špičkou, výjimečně vybíhá v hrot nebo chlup. Některé druhy mají na lístcích gemy. Mohou být dvoudomé nebo jednodomé; akrokarpní nebo kladokarpní. Štět většinou velmi krátký, tobolka často zanořená mezi lístky, vždy přímá, válcovitá, ve stěně přítomny průduchy; buňky exothecia často rozlišeny v podélná žebra. Obústí je diplolepidní, tvořené 16 nebo 8 hygroskopickými zuby exostomu a 8 nebo 16 tenkými zuby endostomu. Narozdíl od většiny ostatních ze skupiny Bryidae nemají brvky endostomu. Vzácně je peristom redukovaný na jednu řadu nebo úplně chybí; čepička je kápoovitá, kuželovitá nebo zvonkovitá. V Evropě se vyskytují tradičně rozlišované rody *Orthotrichum*, *Ulota* a *Zygodon*, z nichž byly nedávno na základě molekulárně fylogenetických prací Goffinet et al. (2004), Sawicki et al. (2010), Sawicki et al. (2017) vylišeny rody *Codonoblepharon*, *Lewinskya*, *Nyholmiella*, *Plenogemma* a *Pulvigera*. Z nich se u nás vyskytují zástupci rodů *Lewinskya*, *Nyholmiella* a *Pulvigera*.

Rod *Lewinskya* byl vylišen z rodu *Orthotrichum* v práci (Plášek et al. 2015). Různé studie již dříve (Goffinet et al. 1998, 2004) naznačovaly, že rod *Orthotrichum* v širokém pojetí není monofyletická skupina a bude potřeba rozdělit jej na několik menších rodů. Ve studii Goffinet et al. (2004) je například podpořeno oddělení rodu *Nyholmiella* od rodu *Orthotrichum*. Oddělení rodu *Lewinskya*, je založeno zejména na molekulárních pracích Sawického a kolektivu (Sawicki et al. 2009, 2010, 2012, 2017), avšak poprvé byl platně popsán v práci (Lara et al. 2016). Rod byl pojmenován na počest Jette Lewinsky-Haapasaari, která se dlouhodobě zabývala čeledí Orthotrichaceae a je charakterizovaný svrchními průduchy na tobolce a monoickým rozmístěním gametangií. Zahrnuje asi 70 taxonů (Lara et al. 2016). Nedávno byl z Kavkazu popsán další druh, *Lewinskya transcaucasica* (Eckstein et al. 2017) a poté *L. lamyana* z hor Pyrenejského poloostrova (Lara et al. 2018). Dva druhy

(*L. fastigiata* a *L. leptocarpa* byly do rodu nově nakombinovány v práci Vigalondo et al. (2019). Oba jsou součástí komplexu *Lewinskya affinis*, který je pravděpodobně parafyletickou skupinou a zahrnuje sedm molekulárně i morfologicky odlišitelných druhů, popsanych v práci Vigalondo et al. (2020) (Obrázek 1). Na našem území se vyskytují dva druhy z tohoto komplexu, a to *L. affinis* s. str. a *L. fastigiata* (Vigalondo et al. 2019). Tři další, které rostou v Severní Americe, byly popsány až v roce 2020, stejně tak jeden druh, vyskytující se pouze na Kanárských ostrovech (Vigalondo 2020). V Evropě a severní Africe rostou *L. affinis* s. str. a *L. fastigiata*, která byla dříve rozeznávána v rodu *Orthotrichum*, v poslední době však byla obvykle považována za synonymum druhu *L. affinis* (viz níže). Ve východní Africe roste *L. leptocarpa*, která byla rovněž považována za synonymum druhu *L. affinis*.



Obrázek 1: Rozšíření, fylogenetické vztahy a habitus nově rozpoznávaných druhů komplexu *Lewinskya affinis*. Převzato (Vigalondo et al. (2019)

V následujících odstavcích jsou popisy našich druhů komplexu *L. affinis*, sestavené podle prací Limpricht (1895), Pilous & Duda (1960), Vondráček (1993), Smith (2004) a Vigalondo et al. (2020).

L. affinis s. str. tvoří rozvolněnější bohaté žlutozelené polštáře, vysoké od 0,4 až do 4 cm. Listy za sucha volně přiléhají k lodyžce a trochu vyčnívají do různých směrů. Vegetativní lístky 2,0–3,6 × 0,5–0,9(–1,0) mm, kopinaté, někdy vejčité-kopinaté, okraje ohrnuté.

Perichaetiální lístky $3,0-4,6 \times 0,6-1,2$ mm, vejčitě-kopinaté, většinou krátce zašpičatělé, okraj ohrnutý. Čepička je řídce nebo mírně chlupatá. Štět $0,5-1,3$ mm dlouhý, vyčnívající nad vaginulu ($0,3-0,6$ mm). Tobolka $1,8-2,8$ mm dlouhá, ponořená nebo více či méně vyčnívající. Suché a prázdné tobolky oválně-válcovité nebo mírně zúžené pod obústím. Žebra na tobolece výrazně odlišená, ale úzká, tvořená 2–4 řadami buněk u ústí tobolky, níže pak 4–6 řadami. Exostom tvořen 8 páry zubů, žlutobílý, někdy mírně mřížovaný nebo okénkatý ve špičce, ornamentovaný červíčkovitými liniemi nebo drobnými papilami. Endostom tvořen 8–16 segmenty. Spory papilnaté s malými, někdy velkými papilami. Z našeho území byla také nedávno popsána varieta *Orthotrichum affine* var. *bohemicum* zkratka (Plášek et al. 2011), která se liší počtem zubů endostomu. Má jich 16 oproti obvyklým 8. Dalším rozlišovacím znakem je papilnatost listů. Zatímco *O. affine* má papily téměř vždy kuželovité, *O. affine* var. *bohemicum* má papily téměř vždy vidličnatě rozvětvené (Plášek et al. 2011). Autoři Guerra et al. (2014) a Ignatov & Ignatova (2018) tuto varietu ve svých publikacích nezmiňují. Vigalondo et al. (2019) ji zahrnují do jedné z hypotéz o fylogenetických vztazích uvnitř komplexu *L. affinis*. V následující práci (Vigalondo et al. 2020) ji však na základě molekulárních a morfologických analýz považují za součást morfologické variability *L. affinis* s. str.

Lewinskya fastigiata je celkově menší. Rostlinky jsou dlouhé $0,6-1,8(-2,5)$ cm. Tvoří kompaktní polštáře. Lístky jsou za sucha rovné, těsně přitisknuté k lodyžce. Vegetativní lístky kopinaté až vejčitě kopinaté, špička lístku může být krátce zašpičatělá, často asymetrická, okraj ohrnutý. Perichaetiální lístky $2,5-4,1 * 0,6-1,2$ mm, většinou vejčitě kopinaté, špička ostrá až nasazená, často asymetrická s ohrnutými okraji. Čepička je řídce chlupatá až lysá. Štět $0,3-0,8$ mm dlouhý, většinou celý zakrytý vaginulou ($0,3-0,5$ mm). Tobolky $1,7-2,5$ mm dlouhé, zanořené mezi listy nebo mírně, většinou z poloviny vyčnívající; suché a prázdné tobolky zúžené před obústím, hluboce žebernaté. Žebra tobolky jsou široká 4 řady buněk u obústí, dále 6–8 řad. Exostom z 8 párů zubů, žlutavé vzácně oranžové, ve špičce mřížované a okénkaté; často ornamentované dlouhými liniemi nebo červíčkovitými či kulatými papilami. Endostom ornamentovaný, z 8 poměrně robustních segmentů, částečně nebo úplně dvouřadý. Spory s bradavčitými nepravidelnými papilami, tvořící linie, někdy i tenčí papily.

Lewinskya affinis byla jako druh poprvé popsána v roce 1801 pod jménem *Orthotrichum affine*. Vzhledem ke svému širokému rozšíření a variabilitě byl během historie druh popsán pod řadou dalších druhových jmen; na našem území se častěji používalo synonymum *Orthotrichum octoblephare* (Pilous & Duda 1960), které bylo popsáno ve stejné práci jako

O. affine. *Lewinskya fastigiata* byla popsána v roce 1827 jako *Orthotrichum fastigiatum*. Nedlouho poté Huebener změnil status druhu na varietu druhu *Orthotrichum affine* (Huebener, 1833). Hartmanova kombinace bez udání ranku (Hartman 1838) je interpretována jako poddruh (Missouri Botanical Garden 2020). Většina autorů konce 20. a začátku 21 století zahrnula *O. fastigiatum* do synonymiky druhu *O. affine* (Nyholm 1998), (Smith 2004). někteří autoři však druh stále rozlišovali. Takovým příkladem je práce Vondráčka (1993), který pro oba druhy poskytuje popisy, mapy rozšíření a ilustrace. Novější práce z našeho území však již *O. fastigiatum* nerozlišují. Přehodnocování taxonomické hodnoty drobných druhů v důsledku molekulárních studií i celkově se měnící přístup k taxonomii v posledních desetiletích ale opět některé autory vedly ke kritickému zhodnocení dříve popisovaných znaků (Frahm 2011, Guerra *et al.* 2014). Autoři se přiklání k názoru, že se jedná o taxony, které by měly být rozlišovány patrně na úrovni poddruhů vzhledem tomu, že nebyly nalezeny znaky, podle kterých by se taxony daly s jistotou rozlišit. Práce Vigalondo *et al.* (2019) použila při kritickém zhodnocení komplexu *L. affinis* poprvé i molekulární znaky. Autoři navrhují v komplexu popis několika dalších druhů včetně *L. fastigiata* i přes to, že ani oni nenašli znaky pro jasné morfologické rozlišení. Jedním ze silných argumentů pro samostatnost taxonu *L. fastigiata* na druhové úrovni je fakt, že *L. affinis* s. str. a *L. fastigiata* spolu mohou tvořit směsné polštáře, ve kterých se dají morfologicky rozlišit (Blytt *et al.*, 1842; Frahm, 2011; Vigalondo *et al.*, 2019).

Oba druhy rostou na kůře listnatých stromů, na dřevěných plotech, na doškových střeších, výjimečně na vápencových kamenech, zídkách nebo na betonu. Jejich oblíbenými dřevinami v České republice jsou vrba a topol, dále často rostou i na jasanu ztepilém, javoru klenu. V Británii je jako jeden z nejčastějších substrátů uváděna bříza (Smith 2004), zatímco u nás z této dřeviny není udáván (Vondráček 1993).

V literatuře můžeme narazit na mnoho rozlišovacích znaků, ve kterých jednotliví autoři viděli rozdíly mezi těmito druhy (Tabulka 1). Nejčastěji jsou popisovány rozdíly ve velikosti rostlinek, v míře zanořenosti tobolek mezi listy, v šířce žeber na tobolce a v ornamentaci exostomu. *L. fastigiata* je uváděna jako menší, kompaktnější, se zanořenějšími tobočkami a širšími podélnými žebry na tobolce a odlišnou ornamentací exostomu. Za zmínku také stojí, že byly publikovány 2 morfotypy spor *L. affinis* s. l. (Medina *et al.* 2009), které by mohly odpovídat těmto dvěma druhům, jak ve své práci uvádí Vigalondo *et al.* (2020). Otázka ovšem zůstává, jak je možné, že byla nalezena i tobolka z oběma typy spor v práci Medina *et al.* (2009). Autoři práce vyslovují hypotézu, že tento znak nemá taxonomickou hodnotu, protože byl nalezen i jedinec s oběma typy spor s tím, že nebyl nikdy pozorován dimorfismus

spor v rámci jedné tobolky. Tuto variabilitu by podle nich mohl způsobovat například vliv genetických faktorů, a zdrojů energie pro vývoj spor.

Tabulka 1: Rozlišovací znaky mezi *Lewinskya fastigiata* a *Lewinskya affinis* s.str. podle jednotlivých autorů: 1 (Bridel-Brideri 1827), 2 (Wilhelm & Hübener 1833), 3 (Blytt et al. 1842), 4 (Hooker 1845), 5 (Limpricht 1895), 6 (Jensen 1952), 7 (Nyholm 1954), 8 (Pilous & Duda 1960), 9 (Vondráček 1993), 10 (Smith 2004), 11 (Frahm 2011), 12 (Vigalondo et al. 2020).

znak	<i>L. affinis</i> s. str.	<i>L. fastigiata</i>
celkový vzhled za sucha	lístky volně přiléhají a mírně odstávají do různých směrů ^{5; 4} , žlutozelené ⁵	listy, za sucha těsně přitisklé k lodyžce ^{5; 4}
výška	2-3 cm ⁵ , 2-4 cm ³ , do 2,5 cm ¹⁰ , 0,4-2,2(-4,0) cm ¹²	do 1 cm ⁵ , 1-1,5 cm ⁸ , 0,6-1,8 (-2,5) cm ¹²
polštáře	větší ^{5; 4} bohaté, rozvolněné ⁵	menší, husté ^{5; 8; 4; 10}
lodyžky		svazčité větvené ^{4; 1}
lístky	až 3,5 mm dlouhé, protáhlejší, špička jemně vroubkovaná papilami, mírně zahnutá dozadu ⁵ lístky jak kopinaté pozvolna se zužující, tak vejčité kopinaté ukončené náhlou špičkou ⁹ , špička obvykle asymetrická ¹²	až 3 mm dlouhé ⁵ , kratší a širší ^{4; 5; 12} , špička zubatá papilami ⁵ lístky vejčité kopinaté, zakončené kratičkým hrotem ⁹ roztroušeně zubaté ¹
vegetativní lístky	2,0-3,6*0,5-0,9(-1,0) mm, kopinaté, vzácněji vejčité kopinaté, špičaté, někdy s nasazenou špičkou, okraj listu zahnuté až podvinuté; žebro 40-80 μm široké na bázi, 30-60 μm široké uprostřed, buňky čepele listu 13-20 * 8-14 μm ¹²	2,1-3,1 3 0,5-0,9 mm, kopinaté až vejčité kopinaté, špičaté až krátce zašpičatělé, často asymetrický; většinou okraje listů podvinuté; žebro 50-80 μm široké u báze listu, ve střední části listu široké 40-70 μm; buňky čepele listu 12-20 * 8-12 μm ¹²
perichaetální lístky	3,0-4,6 × 0,6-1,2 mm, vejčité kopinaté; špička listu většinou krátce nasazená; okraj listu ohrnutý ¹²	2,5-4,1 × 0,6-1,2 mm, obvykle vejčité kopinaté někdy kopinaté, špičaté až s nasazenou špičkou, někdy zašpičatělé, často asymetrické; okraje listu podvinuté ¹²
horní buňky na žebro lístku	zhuštěné, kolenchymatické stěny, podélné stěny bývají širší ¹¹	rovnoměrně ztlustlé buněčné stěny ¹¹

papily na listech	jednoduché, zřídka dvojité, tupé ⁵	jednoduché i dvojité, špičaté ⁵ méně nápadně papilnaté ⁴
perigonia	žlutá, četná, velmi malá (0,6 mm) ⁵	žluto-červená ⁵
pozice tobolky	ponořená nebo z poloviny vynořená ⁵ , obvykle krátce vyčnívající ¹²	ponořená ⁵ , ponořenější než u <i>L. affinis</i> ¹⁰ , obvykle z poloviny zanořená ¹²
štět	delší ^{5:4} , vyčnívá nad ochreou ⁹ , do 0,6 mm délky ⁵ , 0,5–1,3 mm ¹²	celý zakrytý vaginulou ⁹ , kratší ^{5:4} 0,3 mm ⁵ , 0,3–0,8 mm ¹²
tobolka	do 2 mm ⁵	kolem 1,25 mm ⁵
tvar prázdné tobolky za sucha	válcovitá nebo mírně zúžená před ústím tobolky ^{5:4:12} eliptická ⁴ , úzce, ale výrazně žebrovaná ¹²	podlouhle hruškovitá ⁴ , výrazně zúžená před ústím tobolky ^{11:12} , hluboce brázditá ¹²
krk	pomačkaný, zužující se do štětu, téměř polovina tobolky ⁵ 0,5–1,2 mm ¹²	protáhlý hruškovitý, asi 2/3 tobolky ⁵ , 0,5–0,9 mm ¹²
žebra na tobolce	užší (2-3 řady buněk u obústí, dál na tobolce 3-4 řady) ⁵ 2–3 (–4) řady buněk v distální části, 4–6 níže; 45–105 μm široké; od ústí oddělené 2–3 (–4) krátkými zploštělými buňkami ¹²	širší ^{4:8} , tvoří je více řad buněk (4 u ústí, dál 5–6) ⁵ , širší podélné stěny buněk ¹¹ , v distální části 4 řady buněk, dále 6–8; 92–158 μm široké; od ústí odděleny 1–2 (–4) řadami krátkých zploštělých buněk ¹²
pruhy mezi žebry tobolky	mnohem širší (kolem 10 řad buněk) ⁵	jen o trochu širší ⁵
poloha průduchů	pod středem tobolky (1-2 řady) ⁵	ve spodní části tobolky ⁵
víčko	kratší špička ⁵	delší špička ⁵ , větší víčko ⁴
zuby endostomu	úzké papilnaté, s podélnou dělicí čarou ⁵ z 8 segmentů, zřídka z 16, obvykle asymetricky dvouřadé, někdy jednořadé, se slabě nebo středně ztlustlými stěnami buněk v dolní polovině ¹²	kratší než exostom ⁵ širší a kratší než <i>affinis</i> ⁴ , výrazněji článkované, jen z 1 řady buněk, robustnější ² Endostom z 8 segmentů, poměrně robustní, částečně nebo úplně dvouřadý, mírně zesílené příčné stěny nebo klikatá střední čára v dolní polovině ¹²
zuby exostomu	za sucha bělavé, do 280 μm dlouhé, na vrcholu okénkaté, zakončené 3 hroty ^{5:8} ; obvykle nažloutle bělavé; někdy ve špičce slabě mřížkované nebo slabě okénkaté ¹²	ve špičce červíkovitě čárkované ⁸ , tříhroté ⁹ za sucha světle žluté, 200–240 μm dlouhé, zakončené strukturou ve tvaru kříže ⁵ nepravidelně děrované ² žlutavé, zřídka oranžové; ve špičce mřížkované a často okénkaté ¹²

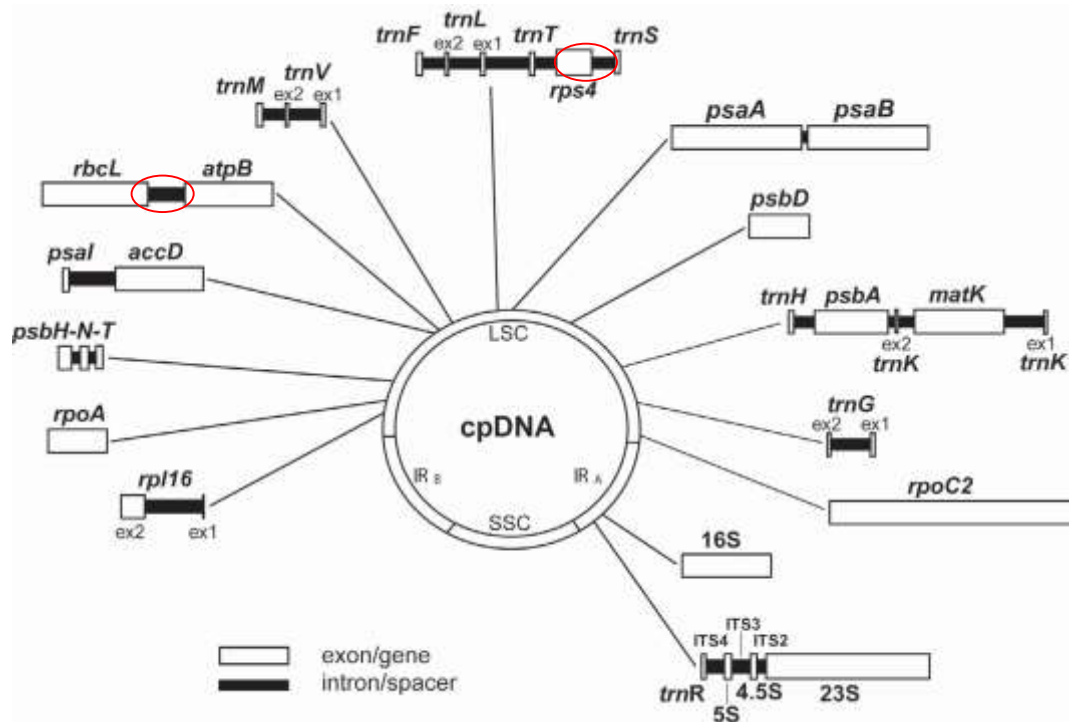
vnější povrch exostomu	rovnoměrně jemně papilnaté ^{5:8} ornamentovaná krátkými červíčkovitými liniemi s různou orientací a hustotou, někdy se smíšenými papilami ¹²	papily splývají v červíčkovité linie ^{5:9} , nepravidelně rýhované, hrubě papilnaté ⁹ variabilně ornamentované, často s dlouhými paprscitými liniemi někdy ornamentované červíčkovitými liniemi nebo malými rozptýlenými papilami ¹²
vnitřní povrch exostomu	s řídkými nebo hustými papilami, zejména na distální polovině ¹²	hladký nebo slabě ornamentovaný ¹²
spory	S drobnějšími ornamentovanými papilami ⁵ hustě pokryté tenkými nepravidelnými někdy i tlustšími papilami ¹²	bradavičnaté hladké papily ⁵ s bradavčitými a nepravidelnými papilami, obvykle tvořícími ojedinělé nepravidelné hrubé pásy, někdy s tenčími papilami ¹²
velikost spor [μm]	20-24 ⁷ , 18-24 ⁹ , 14-18 ⁵ ; 15-24 ¹²	18-20 ⁷ , 16-18 ⁹ , 16-20 ⁵ ; 14-21 ¹²
zralost spor	červen – srpen ⁶ , červen – červenec ^{5:4} , o měsíc později ¹²	květen ⁶ , duben – květen ⁵ ; o 1 měsíc dřív ¹²
čepička	2,4 mm dlouhá ⁵ , žlutozelená ^{4:5} , mírně chlupatá, delší, užší, dosahuje skoro až ke krku ^{5:3} zvonkovitá ^{4:1} řídce chlupatá, někdy mírně chlupatá, většinou krátké chlupy ¹²	kratší, méně chlupatá, ² 2,1 mm dlouhá kuželovitá ⁵ , slámově žlutá ⁴ , nahnědlá spoře chlupatá ^{3:4:5} , nebo hladká, zvonkovitá ^{4:3} , tmavý vrchol ³ , na bázi třásnitá ¹¹ řídce chlupatá s krátkými chlupy ¹²
biotop	v čistějším prostředí ¹¹ ; častější v lesnatém a mezickém prostředí ¹²	na okrajích „epifytických pouští“ mírně znečištěné prostředí a aluviální lesy ¹¹ ; dominuje na sušších a více exponovaných místech, dobře roste na solitérních stromech ¹²
doprovodné druhy	<i>Radula complanata</i> , <i>Metzgeria furcata</i> ¹¹	<i>Orthotrichum diaphanum</i> ¹¹

1.2 Použití molekulárních metod v systematice mechorostů

I blízce příbuzné druhy se obvykle liší v sekvenci bází DNA variabilnějších úseků v genomu. K takovým úsekům patří např. jaderné nekódující úseky ITS1 a ITS2 mezi geny pro velkou a malou podjednotku ribozomální RNA, nekódující úseky chloroplastové DNA nebo rychle se vyvíjející geny, jako chloroplastové geny *matK* či *ycf1*. Mezi nejčastěji používané markery u mechorostů patří *trnL-F*, *rbcL*, *rps4*, a ITS vzhledem ke snadné amplifikaci a sekvenaci a obvykle dostatečné variabilitě.

Mezi obvyklé chloroplastové markery patří úsek *trnS-trnF*, kam patří spacery mezi geny *trnF-trnL*, *trnL-trnT*, *trnT-rps4*, intron genu *trnL* a také úsek *trnS-rps4* použitý v této práci (Obrázek 2). Většinu tohoto úseku tvoří gen pro jeden z proteinů malé ribozomální podjednotky (Mizia et al. 2019). Stal se jedním z nejpoužívanějších markerů pro fylogenezi mechorostů, zatímco u krytosemenných rostlin se používá mnohem méně. Velikost genu je 609 bp s výjimkou vzácně udávaných delecí jako třibázová delece u Funariaceae (Stech & Quandt 2010). Byl používán k odvození vztahů mezi základními skupinami mechů a později i jätrovek a dále k dělení na čeledě a rody (Stech & Quandt 2010). Je ale také velmi užitečný jako marker pro barcoding mechorostů (Yan et al. 2011).

Spacer mezi geny *atpB* a *rbcL* (Obrázek 2) se začal používat později než ostatní, často používané markery, ale časem se stal jedním z nejpoužívanějších chloroplastových markerů. Leží mezi geny pro podjednotku B atp syntázy a genem pro velkou podjednotku enzymu RuBisCO. Ve srovnání se semennými rostlinami je u mechorostů kratší (cca. 370–700 bp). Často obsahuje indely (2–8 bp) (Stech & Quandt 2010).



Obrázek 2: Struktura chloroplastového genomu. Červeně jsou označené úseky *rps4-trnS* a *atpB-rbcL*, používané v této práci. Převzato z práce Stech and Quandt (2014) a upraveno.

1.3 Cíle práce

1. Zhodnocení genetické variability druhů *Lewinskya affinis* a *L. fastigiata* ve vybraných sekvencích chloroplastové DNA a možnosti jejich rozlišování na základě sekvenace těchto úseků.
2. Měření a analýza vybraných morfologických znaků a zhodnocení možností jejich použití pro determinaci druhů komplexu *Lewinskya affinis* na území České republiky.
3. Zhodnocení ekologických preferencí druhů *Lewinskya affinis* a *L. fastigiata* a revize jejich rozšíření ve vybraných lokalitách.

2 Metodika

2.1 Popis materiálu

2.1.1 Sběr vzorků

Sběr vzorků probíhal na podzim roku 2019 v několika oblastech (v okolí Brna, Českých Budějovic, Žďáru nad Sázavou a v Novohradských horách) a v každé z nich na 4–5 lokalitách, (Tabulka 2).

Ty byly vybírány tak, aby se od sebe lišily (například vlhkostí, biotopem, zástínem, mírou osídlení lidmi a podobně) a byly od sebe vzdáleny 2–10 km. Aby se daly mezi sebou porovnávat hojnosti výskytu jednotlivých druhů, byla na každé lokalitě vymezena plocha cca 2 ha, kde probíhal sběr zhruba 2 hodiny. Příležitostně, kvůli zvýšení pravděpodobnosti nalezení vzácnějšího druhu, probíhal extenzivní sběr i v jiných oblastech. K morfometrickým měřením byly kromě vlastních sběrů použity také 3 položky ze sběrů J. Kučery, uložených v herbáři CBFS. Položky, nasbírané pro tuto práci byly uloženy tamtéž (Příloha 1).

Byly sbírány mechy komplexu *Lewinskya affinis*, příslušnost k této skupině byla zjištěna pomocí kombinace několika znaků: jedná se o větší relativně větší epifytický mech, rostoucí v polštářích, má za sucha rovné lístky, přitisklé k lodyžce, 8 zubů exostomu, a rýhovanou tobolku, částečně krytou lístky. Pod mikroskopem byla ověřena příslušnost k rodu *Lewinskya* (přítomnost svrchních průduchů) (Obrázek 3).



Obrázek 3: Průduchy na tobolce: rozdíl mezi spodními a svrchními průduchy, které jsou typické pro rod *Lewinskya* Vlevo a uprostřed: spodní průduchy (kryptopory), vpravo: svrchní průduchy (faneropory).

2.1.2 Charakteristiky zaznamenávané u lokalit a sbíraných vzorků

K lokalitám byly zaznamenávány tyto údaje: stručný popis biotopu, svažítost, expozice ke světovým stranám a nadmořská výška. Nadmořská výška byla odečítána z map

(www.mapy.cz) po vynesení zaznamenaných bodů. Z mapy byla zjištěna též přítomnost blízkého vodního zdroje (vodní tok nebo stálá vodní nádrž), vzdáleného do 30 m od sběru. V terénu byly u každé sbírané položky zaznamenávány tyto informace: druh dřeviny; výška od země ve které mech rostl a obvod stromu v této výšce; obvod stromu v prsní výšce; umístění na stromě (na kmeni, na větvi nebo v paždí větve); úhel, který svíral substrát se zemí (kategorie byly odhadovány: 0°, 30°, 45°, 60°, 75°, 90°); zastínění (semikvantitativní stupnice o 4 hodnotách: světlo (otevřená krajina), polosvětlo (světlý les), polostín (listnatý/smíšený les), stín (tmavý les)); doprovodné druhy, které rostly v nejbližším okolí (na stejném substrátu cca v okruhu 20 cm kolem sbíraného mechu); souřadnice (měřeno pomocí GPS přístroje Garmin eTrex Summit) (Tabulka 2).

Tabulka 2: Základní informace o lokalitách.

oblast	lokalita	expozice a svažitost	Biotop	Souřadnice N	Souřadnice E	Nadmořská výška (m)
novohradské hory	Horní Stropnice		Lužní les	48,75302	14,73672	565
	Pohoří na Šumavě		Alej	48,60491	14,69500	905
	Ulrichov	Z svah	Bučina	48,62207	14,64487	875-890
	Dobrá Voda		Remízky	48,73935	14,71949	750-760
	Jelení vrch	V svah	Smíšený les	48,65102	14,61051	920
okolí Českých Budějovic	Včelná	J svah	Okraj lesa, doubrava	48,91382	14,44861	475
	Hluboká		Niva potoka	49,03659	14,44240	375
	České Budějovice, Stromovka		Městský park	48,97006	14,45301	395
	Rudolfov, sad		Sad	48,99595	14,53181	450
	Rudolfov, potok	Dno údolí	Lužní les	48,99178	14,55395	475
okolí Žďáru nad Sázavou	Vápenice		Smíšený les	49,58228	15,90164	600
	Žďár		pás stromů podél řeky	49,56778	15,94357	570
	Světnov		Lužní les	49,62925	15,96619	620
	Žákova hora	Z svah	Bučina	49,65645	15,99136	800
okolí Brna	Babí lom	vrchol	Dubohabřina	49,30488	16,57582	505-525

	Ivanovice	S svah	Akátina	49,26399	16,57870	290-305
	Říčka, S svah	S svah	Mladá habřina	49,23368	16,72970	295-340
	Říčka, niva	Dno údolí	Lužní les	49,22958	16,72025	285-290

2.1.2.1 Popis lokalit v jednotlivých oblastech

Novohradské hory

Jelení vrch: Lokalita se nachází asi 1 km JV od obce Bělá v nadmořské výšce 850-959 m n. m., na východním svahu. Jedná se o smíšený lesní porost zejména smrku a buku.

Ulrichov: Lokalita se nachází asi 5,5 km od obce Pohorská Ves na západním svahu v nadmořské výšce 870-880 m. n. m. Jedná se o acidofilní květnatou bučinu. Protéká jí Kabelský potok.

Horní Stropnice: Na severu Horní Stropnice u Farského rybníka v nadmořské výšce 560 m n. m. Rozvolněně rostoucí stromy kolem rybníka a zapojený lesní porost v nivě potoka.

Dobrá Voda: JZ od kostela v obci Dobrá Voda v nadmořské výšce 750 m n. m. Mozaikovitá krajina tvořená loukami zahradami a remízky i okrajem lesa. Hlavní dřeviny topol, jeřáb, střemcha, bez černý.

Pohoří na Šumavě: V obci Pohoří na Šumavě v nadmořské výšce 905 m n. m. Obec je obklopena podmáčenými loukami a protéká tudy Pohořský potok. Stromy podél silnice, převládají javory, dále vrba jíva, bříza.

Okolí Žďáru nad Sázavou

Vápenice: Asi 2 km severně od obce Hamry nad Sázavou v nadmořské výšce 600 m n. m. u zatopeného lomu Vápenice. Dominují tu buk, javor klen, dále smrk, jeřáb ptačí a líska.

Žákova hora: Nachází se asi 2 km SV od obce Cikháj v nadmořské výšce asi 790–805 m n. m. Jedná se o bučinu na západním svahu.

Světnovské údolí: Lokalita se nachází asi 1,5 km SZ od obce Světnov v nadmořské výšce 620 m n. m. Protéká tudy meandrující Sklenský potok. Dominují vrby, olše a jasany.

Žďár nad Sázavou – Staviště: Lokalita se nachází ve městě Žďár nad Sázavou v nadmořské výšce 570 m n. m. Stromy kolem vodní spojky Staviště, která vede z řeky Sázavy do nádrže Staviště. Dominují olše dále ořešák, krušina jeřáb a líska.

Okolí Brna

Babí lom: Nachází se v Adamovské vrchovině asi 2 km severně od obce Lelekovice v Nadmořské výšce 500-525 m. n. m. Dubohabřina kolem skalnatého hřebene Babího lomu. Hlavními dřevinami jsou tu habry a duby, dále javor babyka, buk a lípa.

Údolí Říčky – severní svah: Lokalita se nachází asi 2 km JJZ od obce Ochoz u Brna v nadmořské výšce 300-340 m. n. m. Na severním svahu. Protéká tudy potok Říčka. Dominuje habr.

Údolí Říčky – niva: Lokalita se nachází v údolí potoka Říčky asi 3 km SZ od obce Ochoz u Brna v nadmořské výšce 290 m. n. m. Jedná se o nivu potoka, kde dominují habr, líska, javor klen.

Brno – Ivanovice: Lokalita se nachází v městské části Brno-Ivanovice v nadmořské výšce ca 300 m. n. m. Na severním svahu v zahrádkářské kolonii. Z dřevin tu dominuje trnovník akát a v podrostu se vyskytuje bez černý a hloh.

Okolí Českých Budějovic

Včelná: Lokalita leží na jihu obce Včelná. Nachází se v mírném svahu s jižní expozicí. Jedná se o smíšený les tvořený převážně smrkem a borovicí, na jeho okrajích v průseku jsou časté duby, topoly a javory.

Hluboká nad Vltavou: Lokalita se nachází na jihu města Hluboká nad Vltavou. Je to pás stromů kolem potoka a cyklostezky. Rostou zde hlavně vrby, olše a duby, v podrostu bez černý.

Údolí Rudolfovského potoka: Niva Rudolfovského potoka se zapojeným lesním porostem. Hlavními dřevinami jsou tu olše, vrby, javory. V podrostu často roste bez černý.

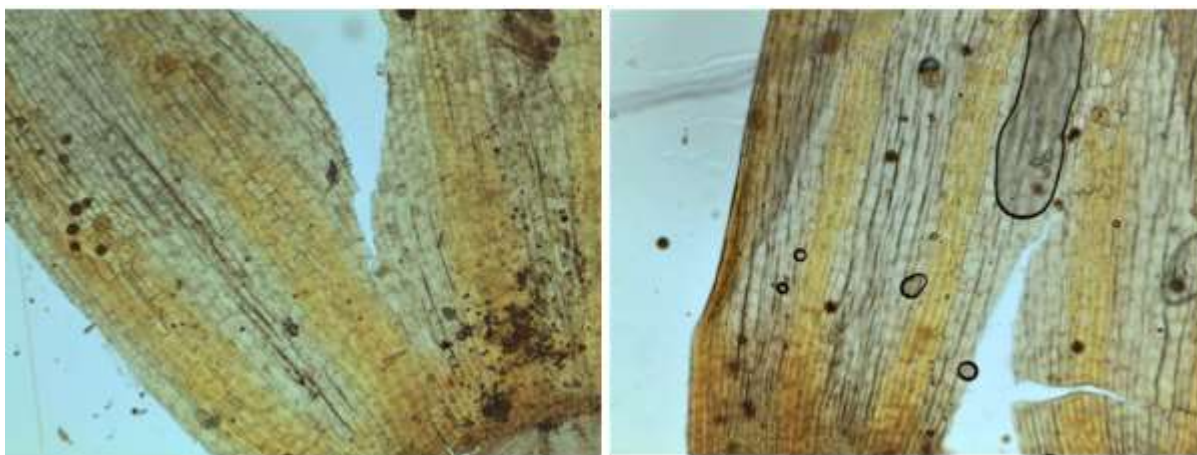
Rudolfov – sad: Jedná se o třešňový sad v polích na SZ města Rudolfov na okraji Českých Budějovic. Hlavními dřevinami jsou třešně, v podrostu ostružiní a bez černý.

Č. Budějovice – Stromovka: Lokalita se nachází v parku Stromovka v Českých Budějovicích. Vyskytují se tu různé druhy stromů (často lípy, topoly a duby), rostoucí soliterně nebo v menších skupinách. Nachází se zde vodní nádrž Bagr.

2.2 Morfologické vyhodnocení sběrů

U všech pozorovaných vzorků *Lewinskya affinis* s. l. (321 položek) byly rostliny předběžně přiřazeny k jednomu ze dvou možných druhů, *L. fastigiata* nebo *L. affinis* s. str. podle znaků udávaných v literatuře, zejména podle šířky žeber na exotheciu tobolky. Ostatní položky byly zařazeny mezi sporné. *Lewinskya fastigiata* se vyznačuje širšími žebry na tobolce, skoro tak širokými, jako mezery mezi nimi. *L. affinis* s. str. má žebra užší než mezery mezi nimi

(Obrázek 4). Tobolky byly podélně rozříznuty žiletkou přibližně na čtvrtiny a pozorovány pod mikroskopem při zvětšení 400x. Pokud se počty řad buněk žebor pohyboval mezi 5–7, byly takové rostliny označeny jako *L. fastigiata*, pokud měly 2–4 řady, byly považovány za *L. affinis*. Rostliny s 4–6 řadami buněk na žebrech byly označeny jako sporné. Po tomto rozřídění bylo vybráno 14 položek, ze kterých byly získány sekvence úseku *rps4* (viz kapitola 2.3). Všechny položky určené jako *L. affinis* byly sekvenováním potvrzeny (4), všechny sporné položky (4) byly sekvenováním určeny jako *L. affinis*, zatímco dvě položky z šesti původně určených jako *L. fastigiata* na základě výsledků sekvenace přeurčeny jako *L. affinis*; zbylé (4) byly potvrzeny jako *L. fastigiata*. Za základě těchto výsledků bylo přehodnoceno původní určení všech položek. Položky původně označené jako sporné byly přiřazeny k druhu *L. affinis* a položky původně určené jako *L. fastigiata*, ale na hranici určení se spornými položkami (měly alespoň v jednom žeboru 6 řad buněk, ne víc), byly označeny jako sporné. Toto chybné nastavení hranic by způsobeno tím, že u prvních sekvenovaných vzorků *L. fastigiata* byla žebra tobolky relativně úzká a podle toho jsem pak určovala dál. S dalšími sekvenovanými položkami se ukázalo, že to byla spíše dolní hranice variability tohoto znaku. Také jsem nečekala, že položek druhu *L. fastigiata* by bylo tak málo oproti *L. affinis*. Po tomto přerazení bylo v kategorii *L. affinis* 282 položek, v kategorii sporných 18 položek a v kategorii *L. fastigiata* 21 položek. Pro morfometrické analýzy bylo vybráno 41 položek (13 ze skupiny určených jako *L. fastigiata*, 15 sporných a 13 *L. affinis*). Do hodnocení ekologie druhů byly zařazeny jen systematicky sbírané položky (viz kapitola 2.1.1), tedy 256 od *L. affinis* s. str., 18 od *L. fastigiata* a 18 sporných.



Obrázek 4 Exothecium druhů *Lewinskya fastigiata* a *L. affinis*. Vlevo *Lewinskya fastigiata*, vpravo *L. affinis*. Převzato od Thomase Kiebachera.

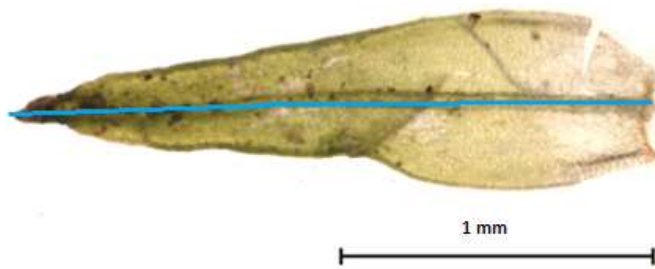
Nejprve bylo pozorováno a zaznamenáváno více potenciálně významných znaků (podle různých kritérií, viz níže), ale z důvodu časové náročnosti a obtížnosti kvantifikace některé

znaky nebyly dále zaznamenávány a hodnoceny. Byly to například tyto znaky: šířka perichaetiálních listů; barva, chlupatost a tvar čepičky; tvar buněk ve středu čepele; tvar buněk v horní části žebra; papilnatost okraje lístku na špičce; charakter zubů exostomu (tvar špiček zubů, barva, ornamentace); počet řad buněk endostomu; tvar tobolky za sucha; poměr délky zobánku víčka k jeho průměru; zanořenost tobolky.

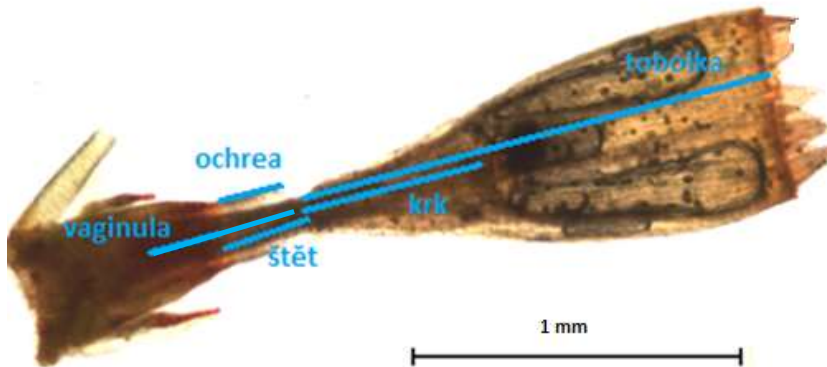
Pro morfometrickou analýzu bylo vybráno několik znaků, které statisticky významně odlišovaly oba druhy podle práce (Vigalondo et al. 2019) (délka rostliny, délka štětu, tobolky, šířka žebor na tobolce a počet podélných řad buněk v žebrech tobolky, délka perichaetiálních listů, ornamentace spor) (Příloha 2). U 30 ze 41 položek pro morfometrii byly zaznamenávány také znaky, které uvádějí jiní autoři a které nejsou snadno měřitelné (papilnatost špičky listu, chobotnaté bazální buňky, ornamentace, struktura a barva peristomu, vzhled čepičky, tvar suché tobolky, a přisedlost lístků k lodyžce) nebo znaky, které se používají u jiných druhů (pozice průduchů, barva rostlinek).

Z každého trsu byly vybrány 1–3 sporofyty s perichaetiálními lístky. Délka perichaetiálních lístků byla měřena na odtržených lístcích, od báze lístku po jeho špičku (Obrázek 5). Délka štětu byla měřena od báze průsvitného límečku obalujícího štět (ochrea) po začátek tobolky, který byl stanoven v místě, kde se štět začíná náhleji rozšiřovat (Obrázek 6). Délka krku byla měřena od konce štětu po začátek výtrusnice, která prosvítá zevnitř tobolky (Obrázek 6). Délka tobolky byla měřena od konce štětu po ústí tobolky (Obr. 6). Parametry žebor na tobolce (šířka žebor tobolky a počet řad buněk, kterými jsou tvořeny) byly měřeny asi v pětině délky tobolky od obústí (Obrázek 7). Žebra jsou vymezena tmavší barvou a širšími stěnami buněk. Byl zaznamenán charakter ornamentace spor, velikost papil na povrchu a jejich splývání v pásy.

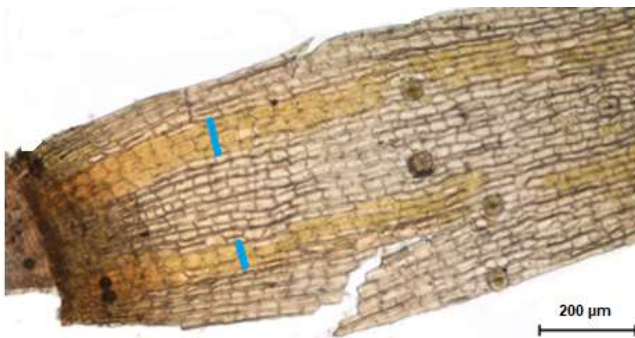
Délka rostlinek byla měřena od místa, kde rostlinka přirůstá k podkladu po nejvyšší strukturu (konec posledních lístků nebo tobolky, za pomoci pravítka s přesností 1 mm. Délka lístků a rozměry sporofytu byly měřeny pod mikroskopem při zvětšení 40x. Počet řad buněk a šířka žebor tobolky byly sledovány pod zvětšením 100x. Spory byly pozorovány při zvětšením 1000x. Měřené objekty byly vyfoceny a změřeny pomocí kamery Lumenera INFINITY v programu QuickPHOTO MICRO 3.1. Zkratky měřených charakteristik jsou uvedeny v tabulce (Tabulce 3).



Obrázek 5: Měření délky perichaetiálních lístků



Obrázek 6: Rozměry měřené na sporofytu (štět, krk, tobolka) a další struktury (vaginula a ochrea)



Obrázek 7: Počet řad buněk v žebrech na tobolce a šířka žebek byla měřena ve vzdálenosti asi 1/5 délky tobolky měřeno od ústí tobolky.

Tabulka 3: Měřené znaky a jejich zkratky

znak	zkratky
délka rostlinky	delrost
délka perichaetiálních lístků	delperlist
délka štětu	delstet

délka krku	delkrk
délka tobolky	deltob
šířka žeber tobolky	sirzeb
počet řad buněk v žeburu tobolky	pocradzeb
počet řad buněk mezi žebry tobolky	pocradmezzeb
srůst papil na sporách do linií / bez srůstu papil do linií	srustpap / bezsrustpap

Morfometrická data byla vyhodnocena pomocí mnohorozměrných analýz. Pro neomezenou ordinaci byla použita analýza hlavních komponent (PCA). Z ordinačního grafu je možné pozorovat, nakolik se operativně vymezené taxony (na základě výše použitých kritérií) v měřených znacích morfologicky skutečně odlišují a které znaky s tímto odlišením nejvíce korelují. Do analýzy bylo zahrnuto 8 z měřených znaků, z analýzy byl vyřazen znak počet řad buněk v žeburu, který byl silně korelovaný se znakem šířka žeber tobolky. Dále byla provedena redundanční diskriminační analýza (RDA), která byla provedena zvlášť pro sekvenované položky a zvlášť pro všechny měřené. U RDA pro sekvenované položky byl vyřazen silně korelovaný znak počet řad buněk v žeburu tobolky a u RDA pro všechny měřené položky byl navíc vyřazen znak šířka žeber tobolky, podle kterého byly vzorky určeny do druhu.

Následovala CDA (klasifikační diskriminační analýza), kterou bylo ověřováno, jestli na základě všech znaků (opět s vyřazením hodně korelovaných znaků) sedí morfologické určení položek na rozdělení druhů podle sekvenovaných položek. V druhé fázi byly položky rozděleny bez ohledu na sekvenaci.

Mnohorozměrné analýzy byly provedeny v programech Canoco 5 (PCA, RDA) a R verze 4.0.3 (CDA).

2.3 Metodika získání molekulárních dat

Pomocí sekvenace některých úseků DNA bylo zjišťováno, jestli se tyto druhy v těchto sekvencích liší tak, aby případné rozdíly bylo možné použít ke spolehlivému rozlišení, resp. ověření určení sporných položek. V době začátku shromažďování molekulárních dat pro mou práci nebyly ve veřejně dostupné databázi GenBank srovnávací sekvence taxonu *Lewinskya fastigiata*, proto jsme se rozhodli získat sekvence často používaného markeru, chloroplastového úseku *atpB-rbcL*, který byl pro odlišení taxonů na druhové úrovni použit např. v práci Medina et al. (2012) nebo Eckstein and Zündorf (2017). Pro zjištění molekulárních odlišností taxonů *L. affinis* nebo *L. fastigiata* jsme vybrali pět vzorků (Příloha

1). Tři z nich byly morfologicky jasně přiřaditelné k jednomu z druhů, zbylé dva vzorky byly morfologicky nejasné.

Během provádění níže popsaných analýz byla publikována práce Vigalondo et al (2019), ve které byly z taxonů *Lewinskya affinis* a *L. fastigiata* získány sekvence chloroplastových úseků *rps4* a *rpl32-trnL^(UAG)*, a anonymních jaderných úseků, označených jako EST-115 a EST-317. Ve všech těchto úsecích se oba taxony odlišovaly, proto jsme později sekvenovali dalších 14 vzorků na úsek *rps4*. Pro tento úsek byly použity primery *rps5*: 5'-ATG TCC CGT TAT CGA GGA CCT- 3' (Nadot et al. 1994) a *trnS-86R*: 5' -GGA AAG ATG GCC GAG TGG TC- 3' (Kučera, nepublikováno) Pro úsek *atpB-rbcL* byly použity primery *atpB-1*: 5'-ACATCKARTACKGGA CCAATAA-3' a *rbcL-1*: 5'-AACACCAGCTTTTRAATCCAA- 3' (Chiang et al. 1998)

Postup izolace DNA, PCR, purifikace a sekvenace probíhal s menšími modifikacemi podle protokolů katedry botaniky JU (Koutecký et al. 2012).

Izolace DNA pomocí NaOH: Z každé položky byla odebrána část rostliny o délce lodyžky asi 2 mm. Ve zkumavce k ní bylo přidáno 40 µl 0,5 M NaOH. Vzorek byl poté rozdrcen pomocí homogenizátorku a písku o stěnu zkumavky. Suspenze byla centrifugována 1,5 minuty při přetížení 16550 g.

PCR: 5 µl supernatantu bylo přepipetováno do 50 µl 100 mM Tris-HCl (pH= 8,3). Po stočení bylo ke každému vzorku přidáno 1,5 µl vody, 0,9 µl od každého z primerů o koncentraci 2,5 pmol/µl a 3,75 µl Plain PP Master Mixu (TopBio). Směs byla promíchána a centrifugována a zkumavky vloženy do termocykleru (TC-XP-D, Bioer). PCR reakce probíhala při následujících parametrech (Hodgetts et al. 2020) 3 min denaturace při 94 °C, následované 40 cykly (94 °C/1 min; 58 °C/1 min; 65 °C/2 min) a finální elongace 65 °C/5 min.

Úspěšnost PCR reakce byla zkontrolována vizualizací DNA na gelu pomocí elektroforézy. 0,2 µl vzorku bylo smícháno s 0,8 µl GelRed a napipetováno do jamek v gelu. Kromě vzorků byl napipetován i kontrolní vzorek a DNA žebříček (3µl λ DNA-HindIII).

Purifikace: Produkty PCR byly purifikovány pomocí metody exo-SAP. K 1,5 µl PCR produktu bylo přidáno 0,5 µl směsi exo-AP. V termocykleru byly roztoky zahřáty na 37 °C/15 minut a na 85 °C/15 minut.

Příprava sekvenační reakce: Ke každému purifikovanému vzorku (2 µl) bylo přidáno 6 µl vody a 2 µl primeru o koncentraci 10 pmol/µl. Sekvenace probíhala formou placené služby v laboratořích GATC Kolín n. Rýnem. Získané DNA sekvence byly zpracovány v programu BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999).

3 Výsledky

3.1 Molekulární znaky

Molekulárně bylo analyzováno 19 vzorků. 14 z nich na úsek *rps4* a 5 na úsek *atpB-rbcL*. Amplifikace probíhala bez problému až na jeden vzorek na úsek *atpB-rbcL*, což bylo nejspíš způsobené špatným stavem rostlinek. Délka amplikonu byla u *rps4* 674 bází a u *atpB-rbcL* 281–283 bází.

Po vyhodnocení sekvencí bylo zjištěno, že na obou úsecích, *rps4* i *atpB-rbcL*, jsou studované druhy odlišitelné.

Na úseku *rps4* se sekvence druhů *L. affinis* a *L. fastigiata* liší jednou substitucí na pozici 55 od 5' začátku amplikonu (Obr. 8). V rámci druhů byly sekvence uniformní. Ze

Obrázek 8: Srovnání odlišné části úseku *rps4* u několika ze sekvenovaných položek

		40	50	60	70	80
	
456	<i>L. affinis</i>	TTACCAGGAT	TAACAAATAA	AACAGCTCAA	TTAAAATCTA	GTTCTGTCAA
507	<i>L. affinis</i>	TTACCAGGAT	TAACAAATAA	AACAGCTCAA	TTAAAATCTA	GTTCTGTCAA
446	<i>L. fastigiata</i>	TTACCAGGAT	TAACAAATAA	AACACCTCAA	TTAAAATCTA	GTTCTGTCAA
451	<i>L. fastigiata</i>	TTACCAGGAT	TAACAAATAA	AACACCTCAA	TTAAAATCTA	GTTCTGTCAA

sekvenovaných vzorků 10 byla *L. affinis* a 4 *L. fastigiata* (Příloha 1)

Na úseku *atpB-rbcL* se sekvence těchto druhů lišily delecí dvou bází na pozici 175-176 od 5' začátku amplikonu (Obr. 9). Jinak byly uniformní. Tento úsek byl sekvenován u 5 vzorků.

Z nich se 2 ukázaly jako *L. affinis* a 3 jako *L. fastigiata*. (Příloha 1).

Všechny sekvenované položky původně označované jako sporné se po sekvenaci ukázaly jako *L. affinis*. Hranice mezi druhy v tomto znaku je tedy dále, než jsem předpokládala na začátku určování (viz metodika).

		150	160	170	180	190
	
1394A	<i>L. affinis</i>	GAAAAAATTA	AAAAGTGTAA	GAACTAAAAA	AAAAATATAA	TTAAATAATA
1735A	<i>L. affinis</i>	GAAAAAATTA	AAAAGTGTAA	GAACTAAAAA	AAAAATATAA	TTAAATAATA
1733A	<i>L. fastigiata</i>	GAAAAAATTA	AAAAGTGTAA	GAACTAAAAA	AAAA--TAAA	TTAAATAATA
1734A	<i>L. fastigiata</i>	GAAAAAATTA	AAAAGTGTAA	GAACTAAAAA	AAAA--TAAA	TTAAATAATA

Obrázek 9: Srovnání části úseků *atpB-rbcL* u několika ze sekvenovaných položek

3.2 Morfologie

Na vybraných lokalitách bylo podle výše uvedené metodiky (kap. 2.1.1) sebráno 292 položek mechů z komplexu *L. affinis*. Podle počtu řad buněk v žebrech tobolky bylo 256 z nich určeno jako *L. affinis* s. str., 18 jako *L. fastigiata*, dvě položky obsahovaly polštáře obou druhů a 18 položek obsahovalo rostliny, které se podle výše uvedeného znaku nedaly přiřadit k žádnému z těchto druhů. Mimo sběry z porovnatelných lokalit jsem morfologicky měřila 4 další položky, 3 z nich byly určeny sekvenací úseku *atpB-rbcL*. Dva z nich jako *L. fastigiata* a 1 jako *L. affinis*. 2 další vzorky byly osekvenovány z mých příležitostných sběrů. Jeden z nich byl *L. affinis* a druhý *L. fastigiata*.

Pro morfometrické analýzy bylo měřeno 135 lodyžek ze 41 položek. 31 z nich bylo vybráno z morfologicky jednoznačných rostlin zařaditelných k druhu *L. affinis* a 10 z rostlin přiřaditelných morfologicky jednoznačně k druhu *L. fastigiata*. V těchto počtech jsou zahrnuty i tři dvojice položek, u kterých byla při pozorování pod mikroskopem zjištěna pravděpodobná přítomnost obou druhů. Takové položky byly rozděleny a považovány za dvě samostatné. V jednom z těchto případů se pomocí molekulární analýzy ukázalo, že morfologicky odlišné rostliny patří ke stejnému druhu. Druhá dvojice byla sekvenací ověřena jako 2 druhy a u třetí dvojice byla jedna rostlina určena molekulárně a druhá se od ní výrazně morfologicky lišila, a byla proto považována za druhý druh. Za směsné tedy byly nakonec považovány jen dvě položky.

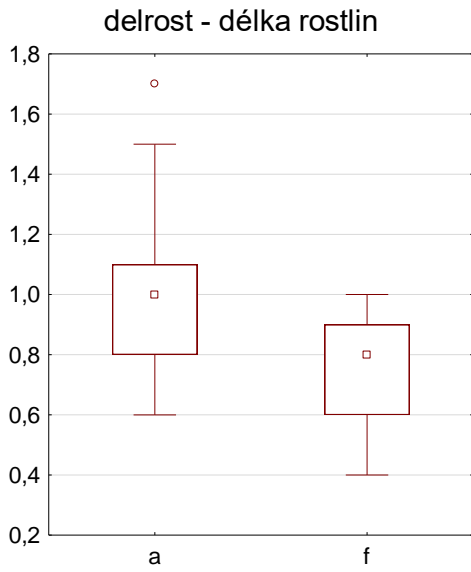
Za jedince pro popisnou statistiku byly považovány jednotlivé lodyžky. Délky tobolky, krku, štětu a celé rostlinky byly zadávány jako přímé hodnoty, protože na jednu lodyžku mohly být měřeny vždy jen jednou. Délky lístků jsou uváděny jako průměr ze 3 lístků pocházejících z 1 lodyžky. Šířka a počet buněk žeber tobolky jsou průměry všech měřitelných žeber na tobolce (tedy maximálně osmi). Stejně tak jsou zprůměrována data o počtu buněk mezi žebry. Údajů o posledním jmenovaném znaku je ale podstatně méně, kvůli zřasení stěny tobolky pod sklíčkem, které mnohdy znemožnilo počítání buněk. Jediným použitým kategoriálním znakem byl typ ornamentace spor. Přítomnost linií na sporách byla zaznamenána, pokud byla pozorována alespoň u jedné spory ve vzorku.

Z měření vyplývá, že *Lewinskya affinis* je obvykle větší, má delší perichaetiální lístky, užší žebra na tobolce tvořená menším počtem řad buněk a prostor mezi žebry se skládá z více řad buněk než u *L. fastigiata* (Tabulka 4). U *L. affinis* převládá ornamentace spor bez linií, kdežto u většiny spor *L. fastigiata* papily na sporách splývají v linie (Tabulka 5), (Obrázek 12).

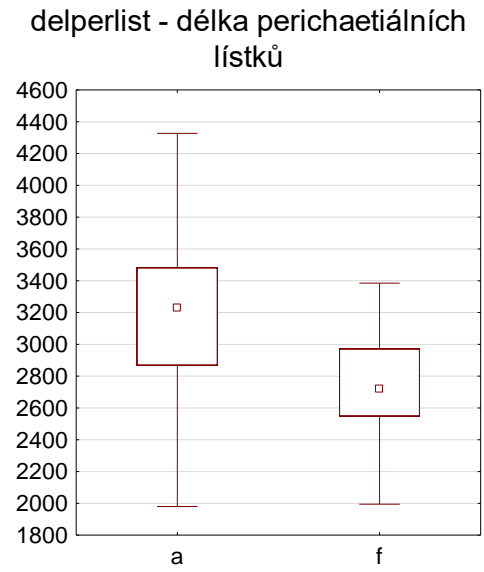
Tabulka 4: popisné statistiky pro jednotlivé znaky a druhy

znak (v závorce zkratka používaná v analýzách)	druh	Počty	Průměr	směrodatná odchylka	5% percentil	95% percentil
délka rostliny [mm] (delrost)	<i>L. affinis</i>	31	9,1	2,7	6	14
	<i>L. fastigiata</i>	10	7	2	4	10
délka perichaetiálních lístků [mm] (delperlist)	<i>L. affinis</i>	100	3,22	0,45	2,53	4,08
	<i>L. fastigiata</i>	28	2,74	0,36	2,05	3,31
délka štětu [mm] (delstet)	<i>L. affinis</i>	102	0,326	0,20	0,18	0,53
	<i>L. fastigiata</i>	29	0,236	0,77	0,11	0,36
délka krku [mm] (delkrk)	<i>L. affinis</i>	102	0,818	0,20	0,51	1,18
	<i>L. fastigiata</i>	29	0,877	0,20	0,56	1,16
délka tobolky [mm] (deltob)	<i>L. affinis</i>	102	2,21	0,36	1,67	2,74
	<i>L. fastigiata</i>	29	2,23	0,39	1,46	2,79
šířka žebber tobolky [μm] (sirzeb)	<i>L. affinis</i>	101	72	17	47	100
	<i>L. fastigiata</i>	30	125	18	98	159
počet řad buněk žebber tobolky (pocradzeb)	<i>L. affinis</i>	101	3,6	0,9	2,3	5,0
	<i>L. fastigiata</i>	30	5,7	0,7	4,4	6,8
počet řad buněk mezi žebry tobolky (pocradmezizeb)	<i>L. affinis</i>	100	10,9	1,1	9,0	12,6
	<i>L. fastigiata</i>	26	9,2	0,9	8,0	10,7

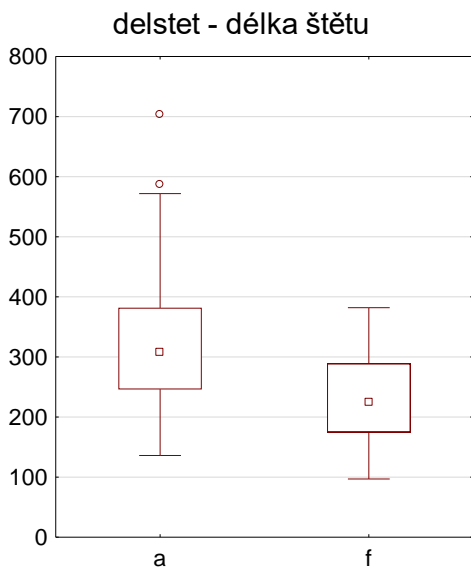
Odlišení druhů v jednotlivých znacích bylo testováno dvouvýběrovým t – testem v programu Statistica 13.2 StatSoft (Obrázky 10, 11). Ten prokázal, že se druhy od sebe průkazně liší na pětiprocentní hladině významnosti ve všech znacích kromě délky tobolky a délky krku (tedy délkou rostliny, délkou perichaetiálních lístků, délkou štětu, šířkou žebber tobolky, počtem řad buněk v žebrech tobolky i počtem řad buněk mezi žebry tobolky).



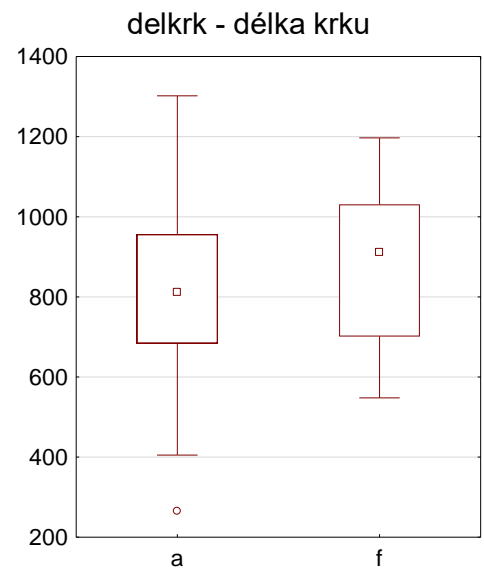
t=2,5331; p=0,015439



t=5,2446; p=0,000001



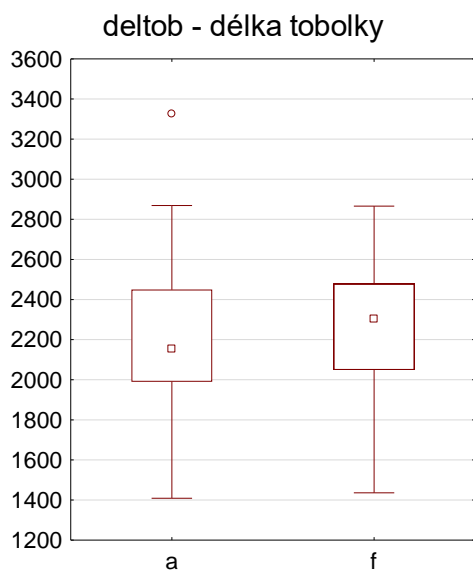
t=4,1434; p=0,000062



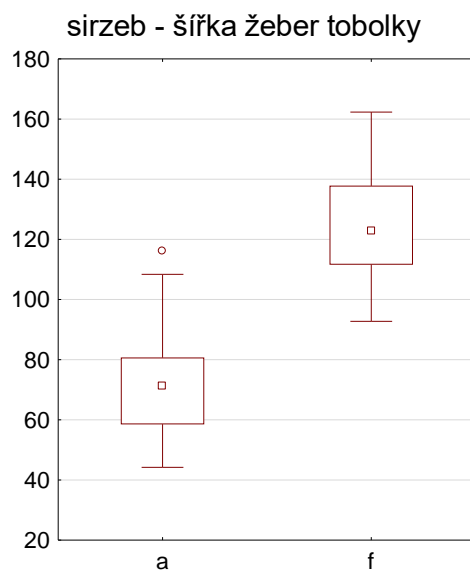
t=-1,3794; p=0,170159

Obrázek 10: Krabicové grafy znázorňující kvantitativní znaky u jednotlivých druhů a výsledky t-testů.

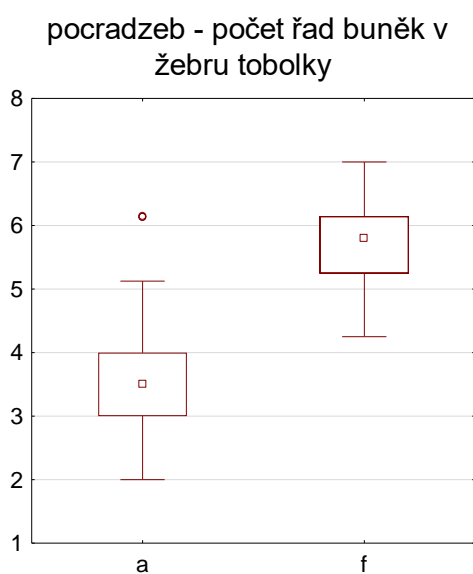
a - *Lewinskya affinis*, f - *L. fastigiata*



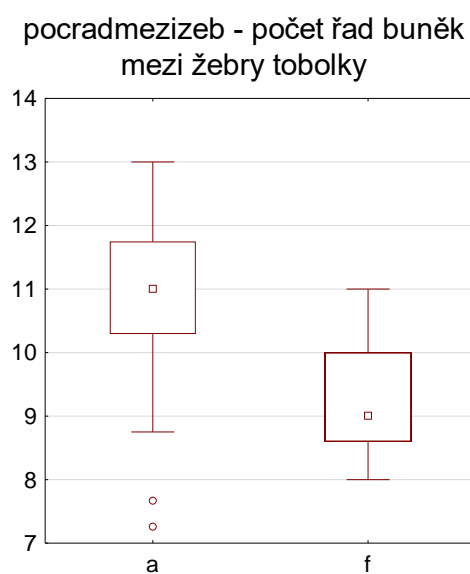
$t=-0,2473$; $p=0,805086$



$t=-15,1633$; $p=< 10^{-6}$



$t=-12,4532$; $p=< 10^{-6}$

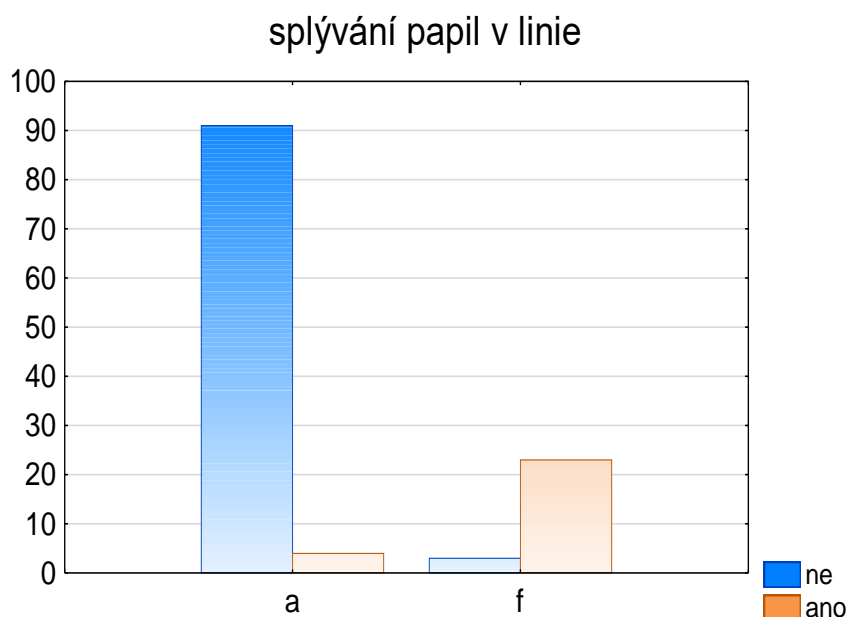


$t=7,1017$; $p=< 10^{-6}$

Obrázek 11: Krabicové grafy znázorňující kvantitativní znaky u jednotlivých druhů a výsledky t-testů a - Lewinskyia affinis, f - L. fastigiata (pokračování).

Tabulka 5: Typ ornamentace spor u jednotlivých druhů.

druh	papily srostlé do linií				
	ano (počty)	ne (počty)	součet	ano [%]	ne [%]
<i>L. affinis</i>	4	91	95	4,2	95,8
<i>L. fastigiata</i>	24	3	27	88,9	11,1
součet	28	94	122	77	23

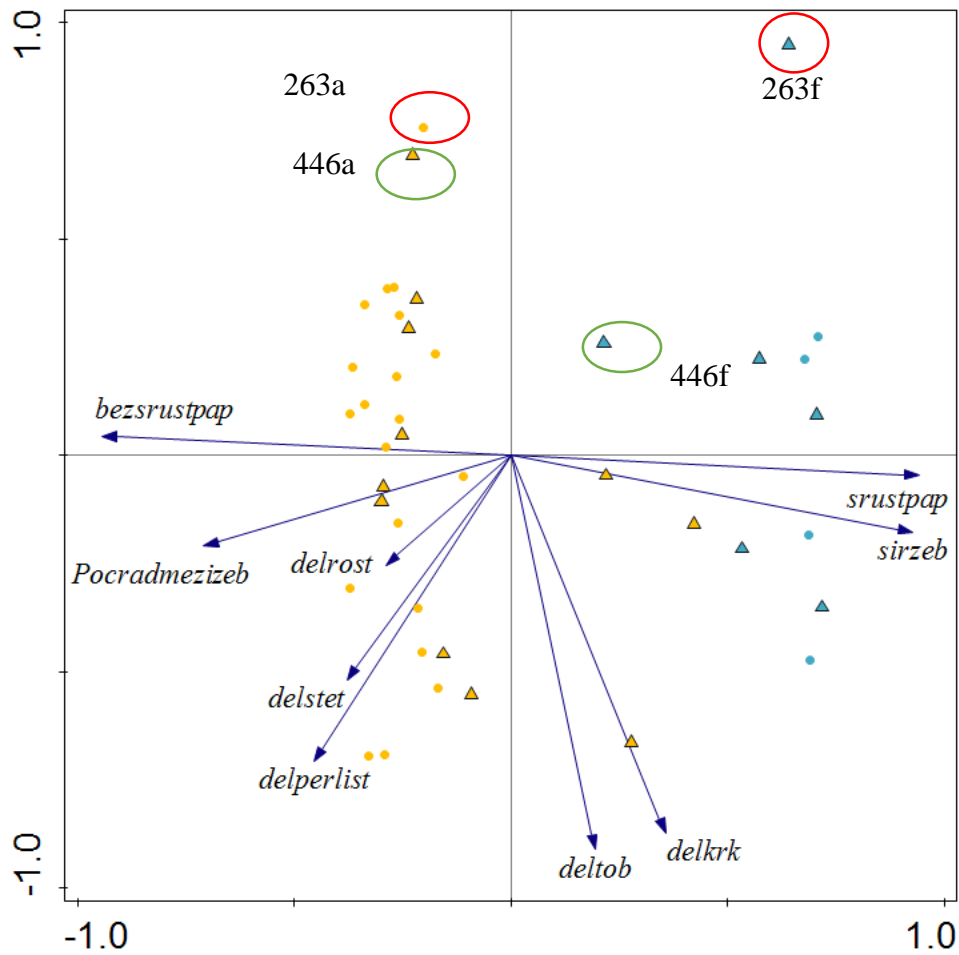


Obrázek 12: Počet jedinců u kterých bylo pozorováno splývání papil na sporách do linií. a - *L. affinis*, f - *L. fastigiata*

3.2.1 Směsné položky

Cennou informací nám poskytují položky, ve kterých byly nalezeny oba druhy. Díky společnému výskytu může být částečně odfiltrován vliv prostředí na rozdíly v jejich morfologii. Byly nalezeny 2 takové dvojice (položky 446 a 263), které byly následně rozděleny (446a, 446f a 263a, 263f) (Příloha 1). U obou položek se jednalo o dva různé trsy. Nebyl tedy zaznamenán žádný trs, ve kterém by se nacházely oba druhy zároveň. V položce 446 bylo toto zjištění potvrzeno sekvenací u obou trsů. U vzorku 263 byl 1 trs molekulárně určen jako *L. fastigiata* a druhý se od něj výrazně morfologicky lišil v klíčových znacích. To také vyplývá z PCA grafu (Obrázek 13), kde jsou položky 263a a 263f od sebe vzdálené podle vodorovné osy, která vysvětluje nejvíc variability, ale podle svislé osy, která koresponduje s nevýznamnými znaky se téměř neliší. Naproti tomu u položek 446a a 446f je tomu spíš naopak. Na následujících obrázcích (obrázek 14-22) je ilustrováno na některých znacích, v čem se druhy v těchto položkách lišily. Někteří autoři uvádějí, že *L. fastigiata* má oproti *L. affinis* zanořenější tobolku a lístky za sucha více přitisklé k lodyžce. Na obou položkách mají polštáře *L. fastigiata* znatelně přitisklejší listy než rostliny *L. affinis*, které mají listy pokroucenější. Oproti tomu zanořenost tobolek je u vzorku 263 velmi podobná a u vzorku 446 dokonce větší u *L. affinis*. Délka štětu bývá v literatuře taky považována jako rozlišující a na obou položkách je štět značně delší u *L. affinis*. Stejně tak šířka žebra tobolek souhlasí s literaturou, kde *L. fastigiata* má výrazně širší žebra, skládající se z více řad buněk.

Rozdíly byly pozorovány i v ornamentaci spor, kdy jen u *L. fastigiata* u obou vzorků bylo pozorováno splývání papil do linií u některých spor.

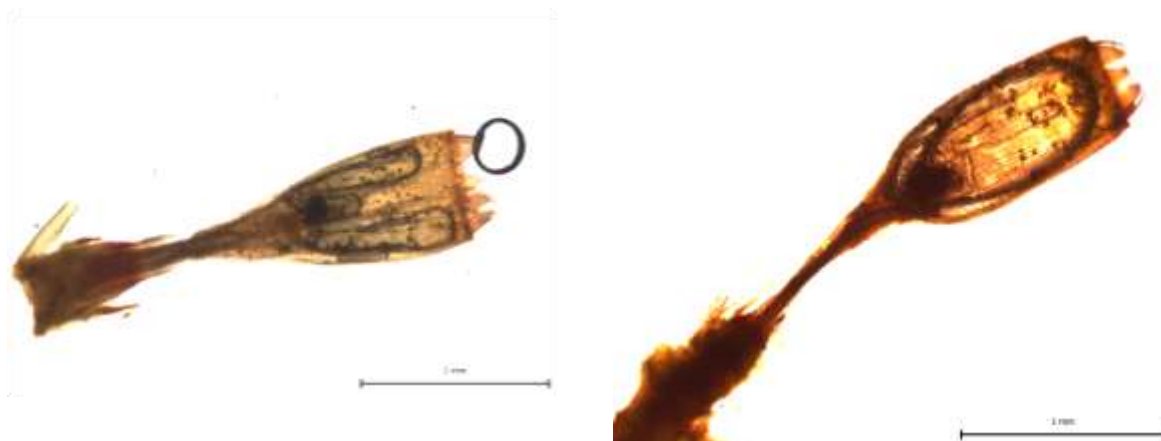


Obrázek 13: Vyznačení směsných položek v grafu z analýzy hlavních komponent

Dokumentace některých morfologických odlišností druhů u směsné položky 263:



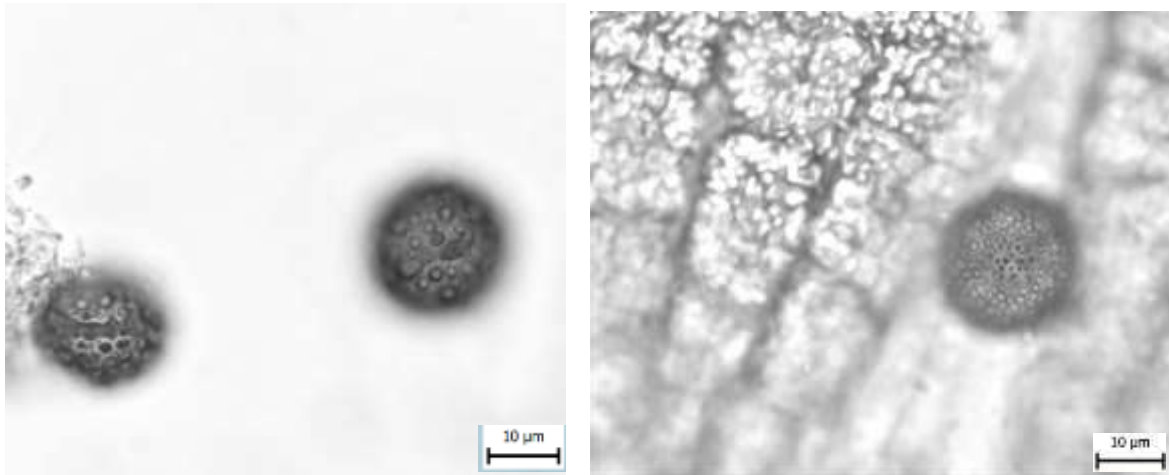
Obrázek 14: porovnání vzhledu polštářů. Vlevo *L. fastigiata*, vpravo *L. affinis*.



Obrázek 15: Sporofyt. Vlevo *L. fastigiata*, vpravo *L. affinis*.

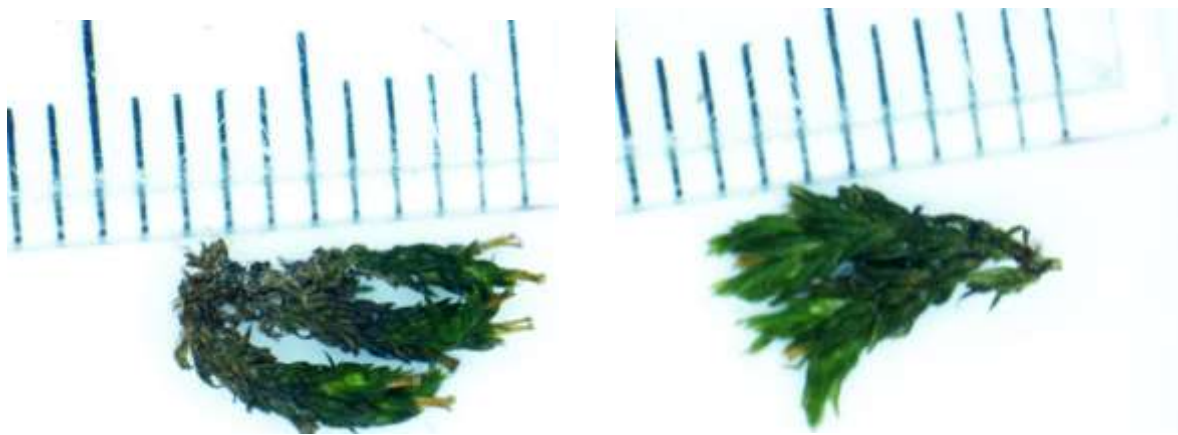


Obrázek 16: Žebra exothecia tobolky. Vlevo *L. fastigiata*, vpravo *L. affinis*.



Obrázek 17: Ornamentace spor. Vlevo *L. fastigiata*, vpravo *L. affinis*.

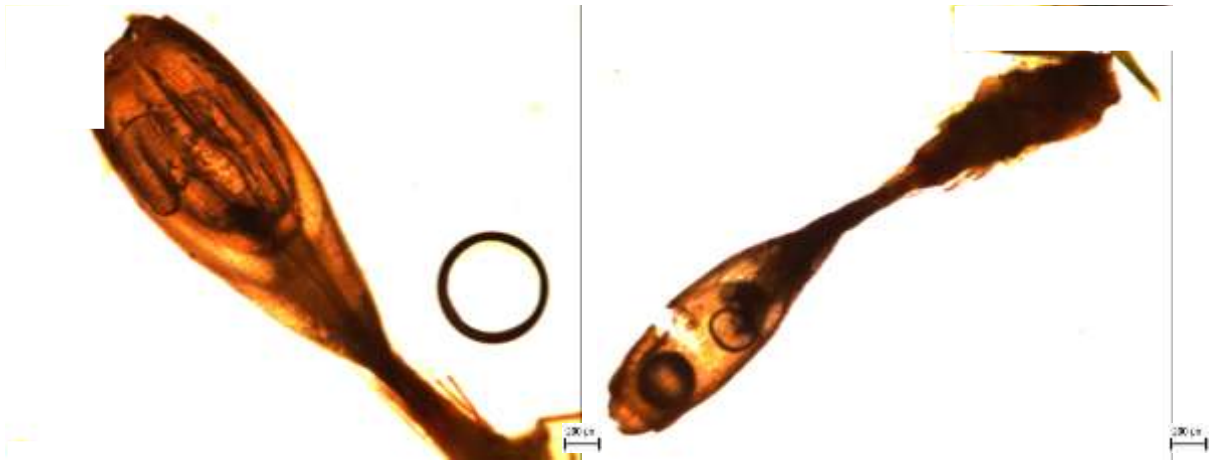
Dokumentace některých morfologických odlišností druhů u směsné položky 446:



Obrázek 18: Lodyžky. Vlevo *L. fastigiata*, vpravo *L. affinis*.



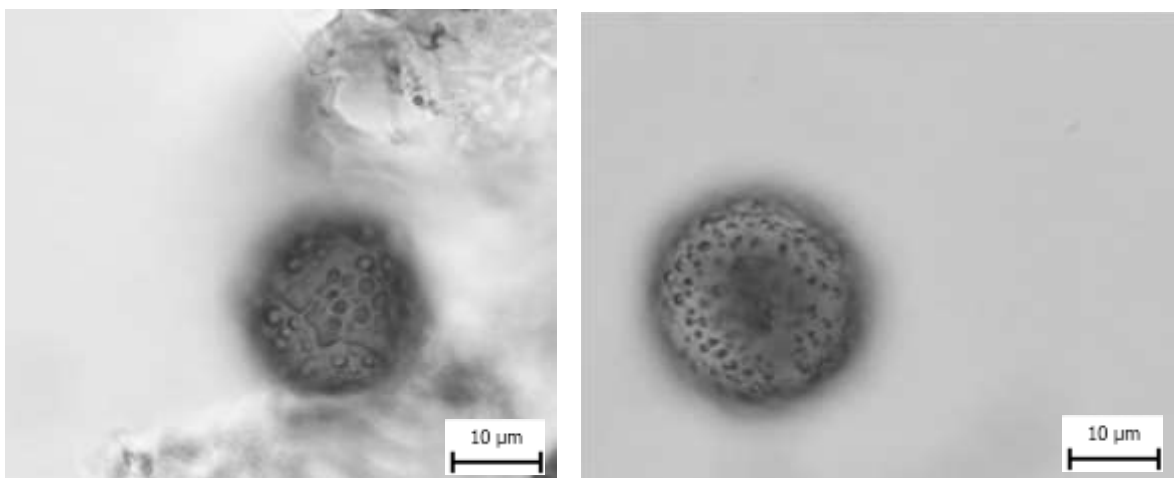
Obrázek 19: Perichaetiální lístky. Vlevo *L. fastigiata*, vpravo *L. affinis*.



Obrázek 20: Sporofyt. Vlevo *L. fastigiata*, vpravo *L. affinis*.



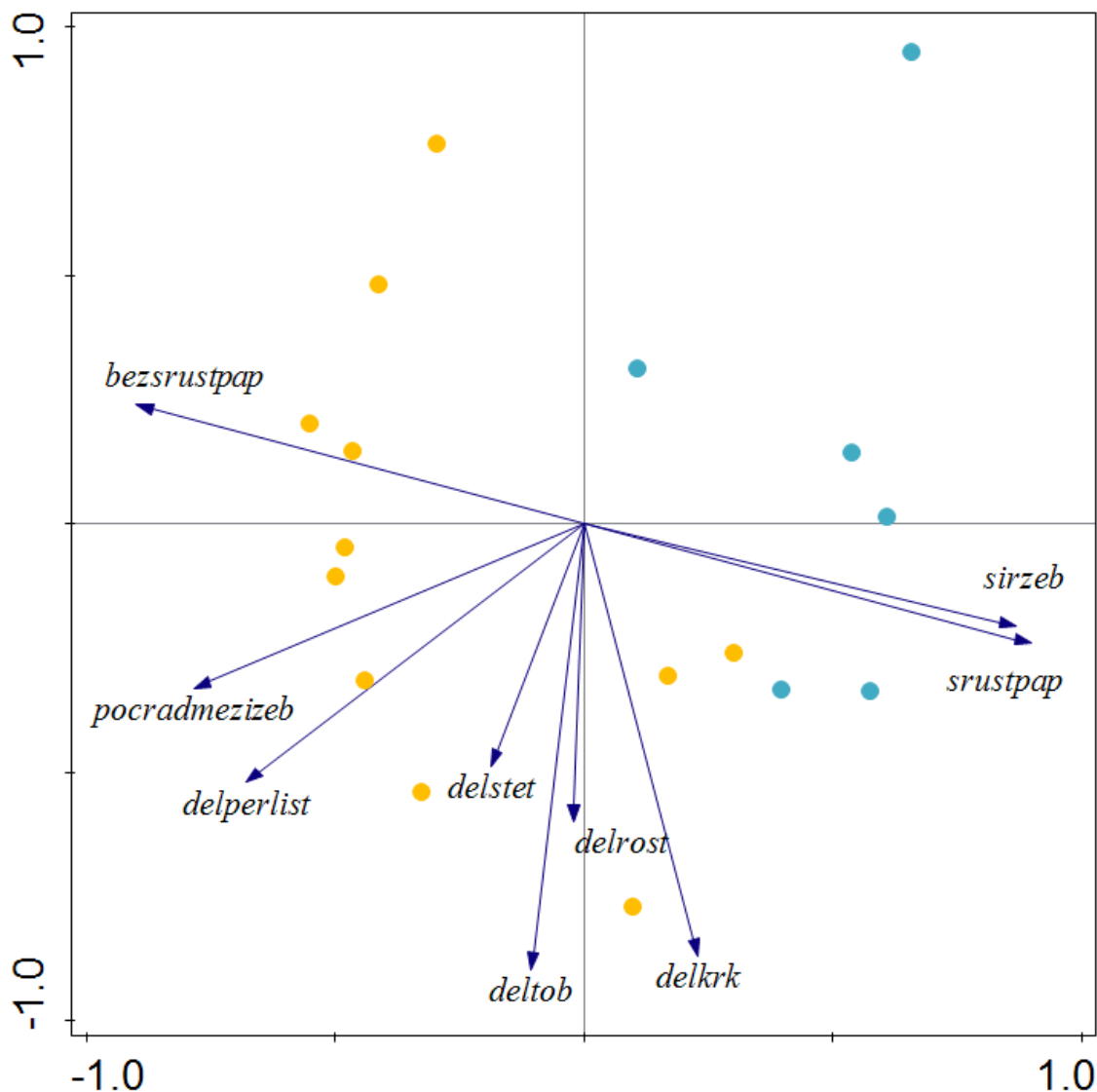
Obrázek 21: Žebra exothecia tobolky. Vlevo *L. fastigiata*, vpravo *L. affinis*.



Obrázek 22: Ornamentace spor. Vlevo *L. fastigiata*, vpravo *L. affinis*.

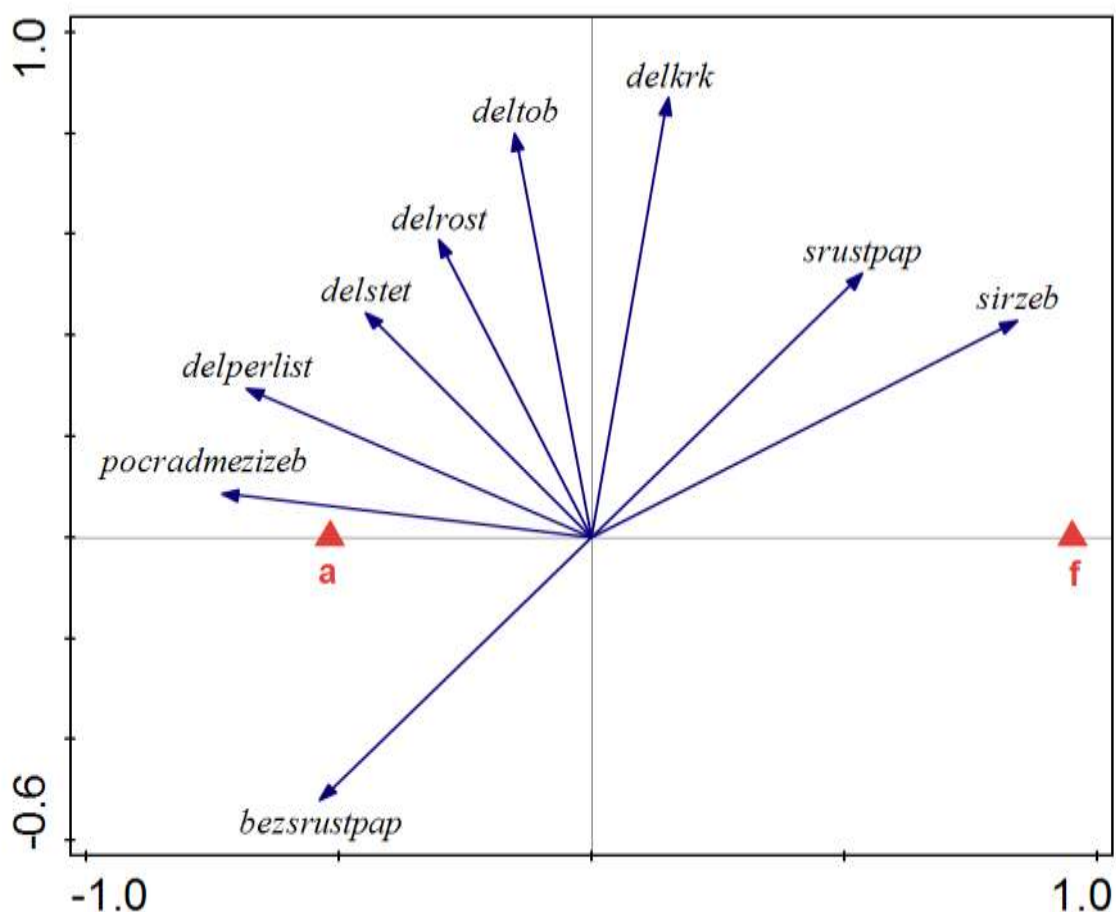
3.2.2 Vyhodnocení morfologických odlišností obou druhů podle molekulárně ověřených položek

V analýze hlavních komponent (PCA) položek určených sekvenací se druhy poměrně dobře oddělily podle vodorovné osy. Znaky, které toto rozdělení nejvíce vysvětlují jsou tedy šířka žebra, počet řad buněk mezi žebry, typ ornamentace spor, případně délka perichaetiálních lístků. Naopak znaky korelující se svislou osou jako je délka štětu, tobolky a krku rozdělují druhy nevysvětlují (Obrázek 23).



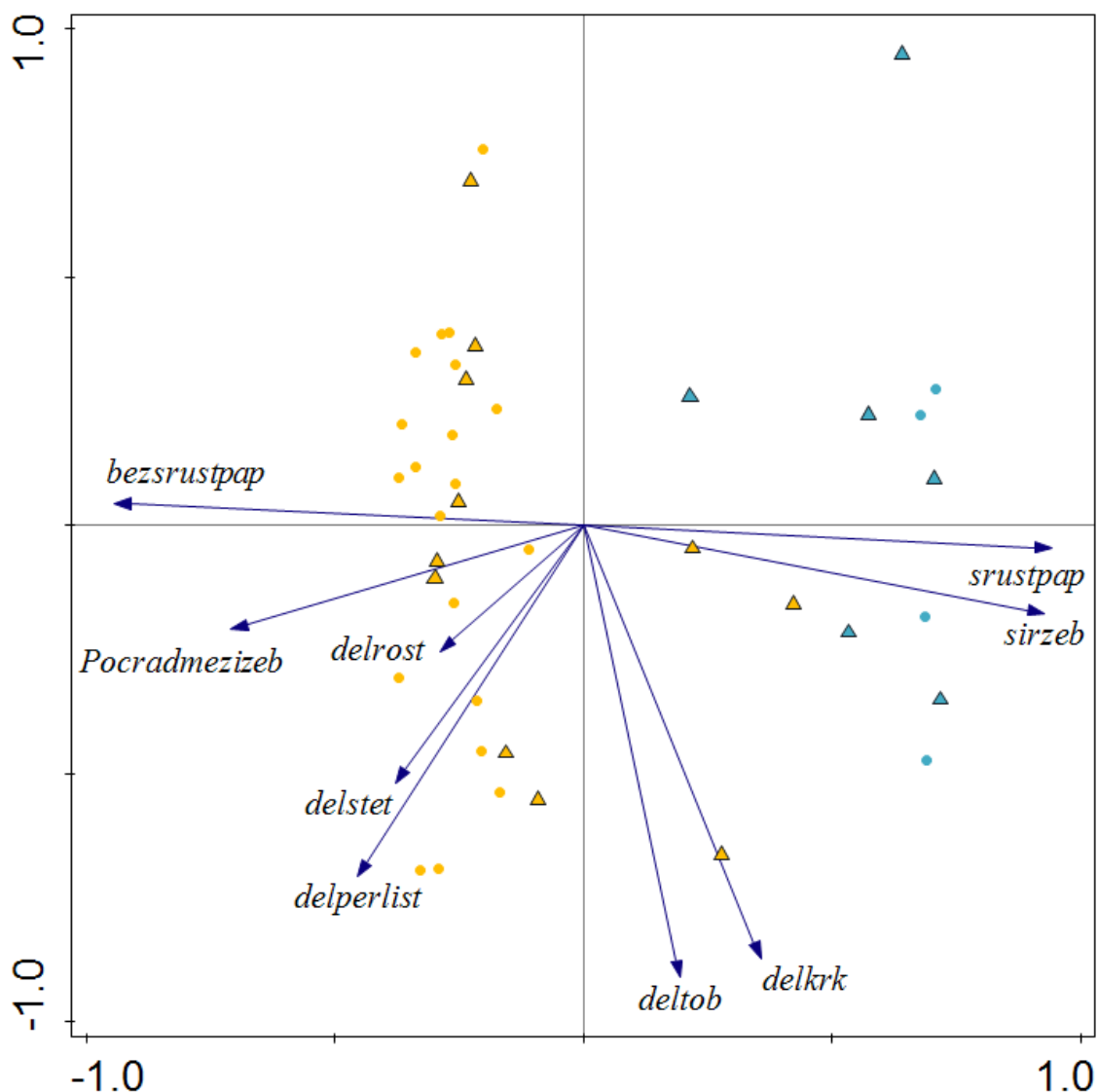
Obrázek 23: Analýza hlavních komponent (PCA) pro sekvenované položky vysvětluje 92,4 % variability v měřených znacích. Z toho první osa vysvětluje 39,5 %, druhá osa 30 %. žlutě – *Lewinskyia affinis*, modře – *L. fastigiata*,

Následující graf RDA pro sekvenované položky (Obrázek 24) pomocí omezené ordinace ukazuje, které znaky nejlépe oddělují druhy s molekulárně ověřeným určením, a jsou tak použitelné pro determinaci. Podobně jako v neomezené analýze jsou to hlavně šířka žebra, počet řad buněk mezi žebry, typ ornamentice spor a délka perichaetiálních lístků. Naopak nedůležité jsou délka rostlinek, tobolky a krku tobolky a štětu.



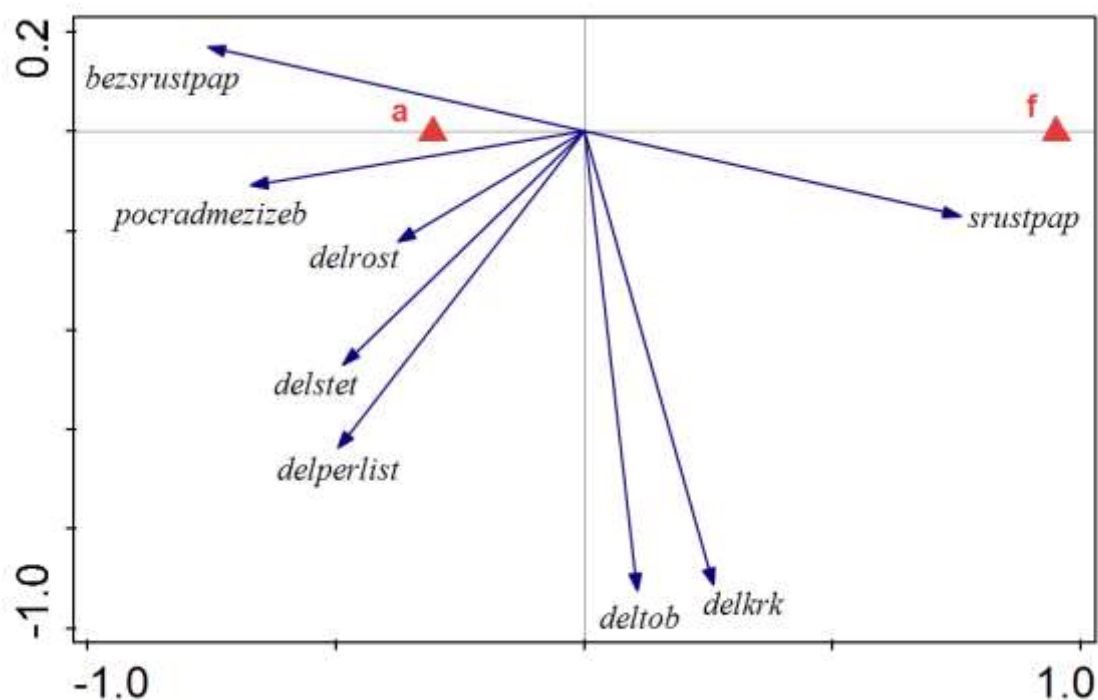
Obrázek 24: Redundanční diskriminační analýza (RDA)-pro sekvenované položky. První osa vysvětlila 29,2 % a druhá 30,6 % variability.

V PCA všech měřených položek (Obrázek 25) se dobrými rozlišovacími znaky ukazují počet řad buněk mezi žebry tobolky, typ ornamentace spor a délka lístku. Naopak délka krku a tobolky druhy neoddělují. Oproti PCA, kde byly jen molekulárně ověřené položky se vektory příliš neliší, jen se trochu zvýšila korelace délky štětu s rozdělením druhů v ordinačním prostoru. První osa vysvětluje více variability, naproti tomu celková vysvětlovaná variabilita se snížila.



Obrázek 25: PCA všech měřených položek. První osa se podílí na vysvětlené variabilitě 41,6 %, druhá osa 27,8 %. Žlutě – *L. affinis*, modře – *L. fastigiata*, trojúhelníčky – sekvenované položky.

Z analýzy RDA všech měřených položek (Obrázek 26) byl kromě počtu řad buněk v žebro tobolky vyrazen i znak šířka žebra tobolky, aby nedocházelo k důkazu kruhem. Pomocí tohoto znaku byly totiž určovány neosekvenované položky. Jako nejspolehlivější znaky (po šířce žebrov tobolky) se ukazují počet řad buněk mezi žebry tobolky a typ ornamentace spor. Oproti předchozí RDA se snížilo množství vysvětlované variability, nejspíše kvůli celkově většímu množství variability, která vyplývá z většího počtu analyzovaných položek.

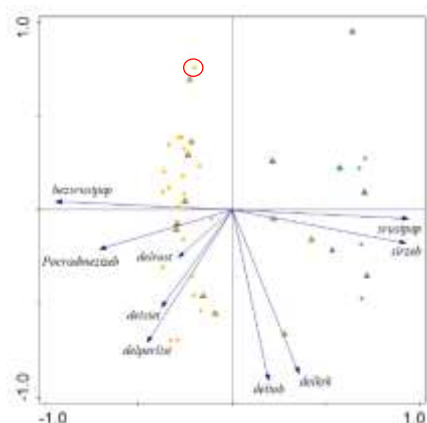


Obrázek 26: RDA všech měřených položek. První osa vysvětlila 28,8 % a druhá 30,5 % variability.

Dvakrát byla provedena klasifikační diskriminační analýza (CDA). V první analýze byly neosekvenované položky přiřazené k druhům podle sekvenovaných položek (Tabulka 6). Klasifikační diskriminační analýza zde vyhodnotila jednu položku jako špatně určenou (Obrázek 27). To bylo nejspíš způsobeno celkově nízkými hodnotami měřených znaků u této položky (hlavně délky perichaetiálních lístků a tobolky). Tato abnormalita mohla být také způsobena tím, že od této položky byla měřena jen jedna lodyžka.

Tabulka 6. Klasifikační diskriminační analýza (CDA), určující nesekvenované položky k jednomu z druhů *Lewinskya affinis* nebo *L. fastigiata* podle znaků sekvenovaných položek. a – *L. affinis*, f – *L. fastigiata*.

Taxon	Klasif. jako		N	správně určeno [%]
	a	f		
a	19	1	20	95
f	0	4	4	100
celkem	19	5	24	95,83333

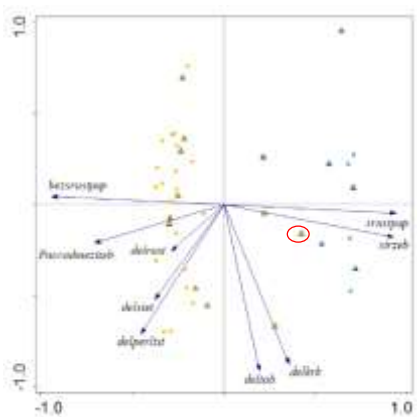


Obrázek 27: Kroužkem označená položka v grafu PCA, která byla podle CDA zohledňující pouze znaky sekvenačně ověřených rostlin označena jako neprávne určená

V druhé analýze byly vyhodnoceny všechny položky bez ohledu na to, jestli byly sekvenované (Tabulka 7). Zde vyšel pro změnu jiný vzorek jako špatně určený i přes to, že se jednalo o sekvenovanou položku (Obrázek 28). Od ostatních položek svého druhu se lišila hlavně přítomností linií na sporách u některých jedinců, šířkou žebér tobolek, která se pohyboval na hranici mezi druhy podobně i počet řad buněk v žebrech i mezi nimi. Všech 6 měřených lodyžek této položky vykazuje přechodné hodnoty alespoň u některých z klíčových znaků.

Tabulka 7: Klasifikační diskriminační analýza (CDA), určující měřené položky podle morfologických znaků s vyřazením znaku použitého pro přiřazení druhu.

Taxon	Klasif. jako		N	správně určeno [%]
	a	f		
a	30	1	31	96,77419
f	0	10	10	100
celkem	30	11	41	97,56098



Obrázek 28: Kroužkem označená položka v grafu PCA, která byla podle CDA kde byly srovnány všechny položky (bez ohledu na to, jestli byly sekvenovány, nebo určeny podle morfologie), označena jako neprávne určená

Pro mnohorozměrné analýzy byly použity průměry z celých položek, tedy většinou ze 3 lodyžek. Při takto uspořádaných datech je šířka žebek absolutním znakem, kdežto, když vyneseme do grafů jen hodnoty pro jednotlivé lodyžky, je vidět překryv. Proto je pro správné určení důležité pozorovat více rostlin z polštáře.

3.3 Rozšíření a relativní zastoupení druhů na lokalitách

Na vybraných lokalitách bylo posbíráno. 292 položek z komplexu *L. affinis*. Z nich 256 bylo určeno jako *L. affinis* s. str., 18 jako *L. fastigiata* a 18 položek bylo nejistých *L. fastigiata* je na těchto lokalitách 7 – 15krát vzácnější než *L. affinis*. Dále bylo pozorováno asi 30 dalších položek z různých míst.

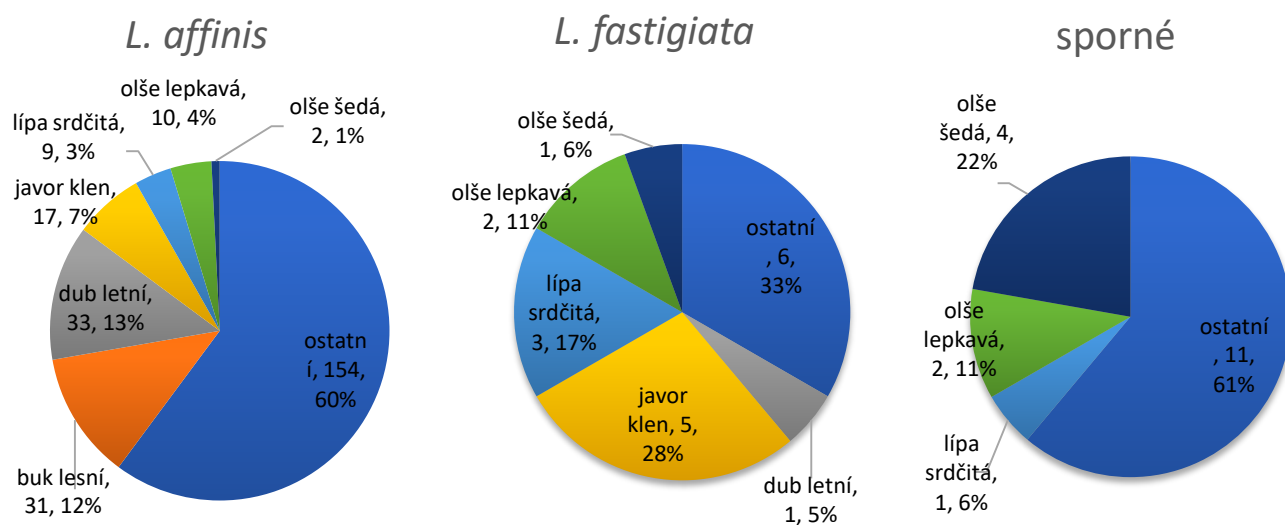
Na všech zkoumaných lokalitách se vyskytovala *L. affinis*. *L. fastigiata* v 10 z 19 lokalit a byla zastoupena ve všech 4 oblastech.

3.4 Ekologické znaky

Tato data nemohla být statisticky vyhodnocena z důvodu velkého nepoměru v počtech nalezených druhů. I přes to můžou naznačit různé trendy, které by v dalších pracích mohly být podpořeny.

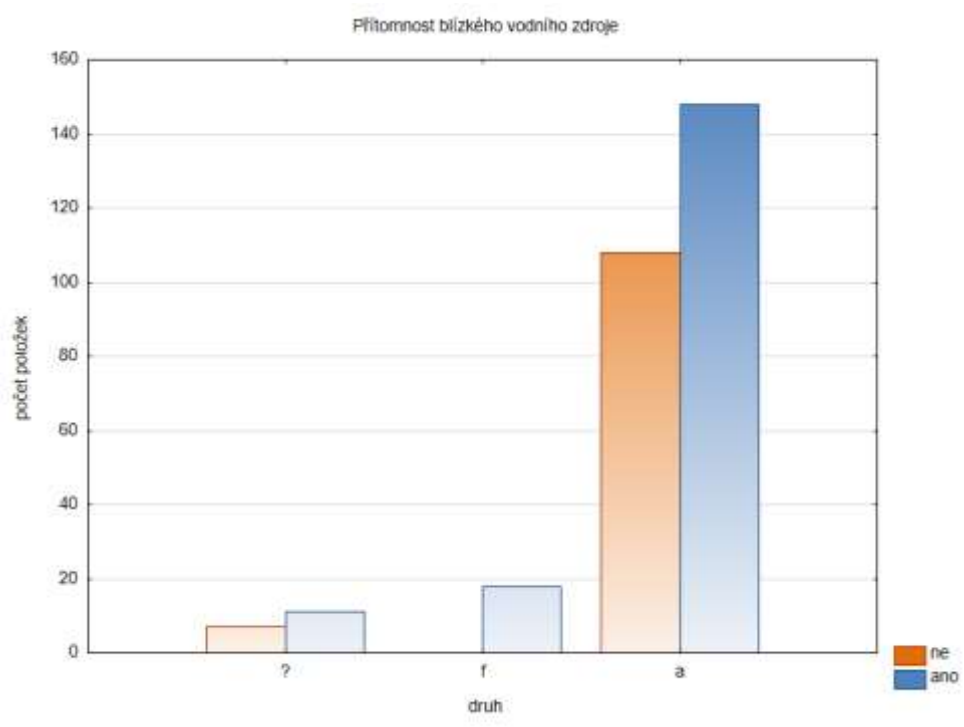
Jednou z takových proměnných je druh forofytu (Obrázek 29). Zatímco pro *L. affinis* je nejběžnější osidlovanou dřevinou dub letní (13 %) a buk lesní (12 %), u *L. fastigiata* je to javor klen (28 %), lípa srdčitá (17 %) a olše lepkavá (11 %). Otázkou je, jak by to vypadalo

po přiřazení nejistých položek, pro které je nejčastější olše šedá (22 %), třešeň (17 %) a olše lepkavá (11 %).



Obrázek 29: Zastoupení druhů forofytu pro jednotlivé druhy a sporné položky. Názvem ostatní jsou označeny druhy stromů, které byly u všech tří kategorií zastoupeny v méně jak 10%

Na všech lokalitách výskytu *L. fastigiata* se nacházel blízký zdroj vody (Obrázek 30). U *L. affinis* v necelých dvou třetinách a podobně tomu tak bylo u sporných položek.



Obrázek 30: Přítomnost blízkého vodního zdroje pro jednotlivé druhy a sporné položky

4 Diskuse

4.1 Molekulární variabilita druhů *Lewinskya affinis* a *L. fastigiata* a jejich odlišení

Pro zjištění míry variability studovaných druhů v širším areálu byly nově získané sekvence porovnávány se sekvencemi uloženými v databázi Genbank. Pro úsek *rps4* bylo nalezeno 27 sekvencí druhu *Lewinskya affinis* a 10 druhu *L. fastigiata* (jeden z nich je ještě v Genbank označen *Orthotrichum affine*), pro úsek *atpB-rbcL* byly k dispozici pro porovnání tři sekvence, jedna druhu *L. fastigiata* a dvě druhu *L. affinis*. Na úseku *rps4* se rozdíly v sekvencích obou druhů shodují mezi výsledky mé práce a publikované práce Vigalondo et al. (2019) a odlišnosti byly pozorovány u jedné publikované sekvence druhu *L. affinis* z Řecka u jedné sekvence druhu *L. fastigiata* z Maroka, kde je u každé z těchto sekvencí po jedné substituci na různých místech. Může se jednat o ojedinělé mutace místních populací, sekvenační chyby nebo chyby v odečtení, avšak bez většího množství sekvencí ke srovnání není možné vyvozovat přesnější závěry. Na úseku *atpB-rbcL* byly porovnávány mé 5 sekvencí s šesti sekvencemi z Genbank. Všechny 3 sekvence druhu *L. fastigiata* z České republiky a jedna ze španělské rostliny mají 2 delece oproti 4 vzorkům druhu *L. affinis* z České republiky, od kterých se liší 4 delecemi jeden vzorek druhu *L. affinis* ze Španělska a stejně tak jeden vzorek druhu *L. fastigiata* z Turecka. Z těchto údajů o vnitrodruhové variabilitě studovaných druhů na sekvenovaných úsecích vyplývá, že rozlišení těchto druhů na základě sekvenace úseků *atpB-rbcL* a *rps4* funguje u rostlin z České republiky, ale že by bylo třeba molekulární variabilitu obou druhů studovat na širším areálu.

4.2 Variabilita druhů *Lewinskya affinis* a *L. fastigiata* v morfologických znacích a jejich odlišení

V následujících odstavcích jsou naměřené hodnoty a některé pozorované znaky srovnávány s údaji v literatuře, které jsou shrnuty v úvodu práce (Tabulka 1). Je třeba brát ohled na to, že měřených položek bylo poměrně málo, to může znamenat nedostatečně zachycenou variabilitu znaků v širším areálu.

Podle starších autorů (Hooker 1845, Limpricht 1895) má *L. fastigiata* lístky za sucha rovné, těsně přitisknuté k lodyžce, kdežto *L. affinis* má lístky za sucha volně přiléhající k lodyžce až pokroucené a vyčnívající do různých směrů. V mých pozorováních měly všechny

pozorované polštáře *L. fastigiata* lístky přitisklé. U *L. affinis* byly výjimečně také přitisklé k lodyžce, nebo více méně pokroucené.

Ve shodě s literárními údaji (Limpricht 1895, Pilous & Duda 1960, Vigalondo et al. 2020) je podle mých měření druh *L. affinis* větší než *L. fastigiata*. Zatímco ve starších pracích se udávané velikosti rostlinek u obou druhů nepřekrývají (Limpricht (1895) uvádí pro *L. fastigiata* výšku do 1 cm, pro *L. affinis* 2–3 cm, podobně Pilous & Duda (1960) uvádí pro *L. fastigiata* 1–1,5 cm a pro *L. affinis* 2–4 cm), v práci Vigalondo et al. (2020), podobně jako v té mojí, již vidíme poměrně velký překryv (*L. affinis*: 0,4–2,2(-4,0) cm; *L. fastigiata*: 0,6–1,8 (-2,5) cm). Ve většině prací je velikost rostlin větší než u mých měření (*L. affinis*: 6–17 mm; *L. fastigiata*: 4–10 mm), kdežto největší rostlinky *L. affinis* v mém souboru nedosahují ani 2 cm. To může souviset s výběrem studovaného materiálu například z oblastí s nižší vzdušnou vlhkostí a menším úhrnem srážek. I zde je však štět delší u *L. affinis* než u *L. fastigiata*.

Perichaetiální lístky měly v mé práci oproti práci Vigalondo et al. (2020) posunuté hodnoty délek směrem k nižším číslům u obou druhů, ale stejně jako v mojí práci má *L. affinis* delší perichaetiální lístky.

Délky štětu se v literatuře různí. Je to nejspíš způsobeno i tím, že není snadné definovat, kde přesně štět začíná a končí. Nicméně je patrné, že autoři se shodnou na tom, že *L. fastigiata* má obecně kratší štět ((Hooker 1845, Limpricht 1895, Vondráček 1993, Vigalondo et al. 2020) než *L. affinis*. V práci Vigalondo et al. (2020) byly naměřeny větší hodnoty délky ve srovnání s mými hodnotami štětu: pro *L. fastigiata* 0,3–0,8 mm a pro *L. affinis* 0,5–1,3 mm. Tento rozdíl může být způsoben jinak stanovenými hranicemi štětu; stanovení hranic bylo totiž v obou případech individuální, podle úvahy autora. Limpricht (1895) uvádí tento znak tak, že ochrea (která je u obou druhů dlouhá asi 0,5 mm) u *L. fastigiata* zakrývá celý štět (0,3 mm), kdežto *L. affinis* má delší štět (0,6 mm), takže vyčnívá. To je pozorovatelné i na mých směsných položkách (Obrázek 15 a 20)). V mojí práci vycházela délka štětu u *L. fastigiata* 0,1–0,4 mm a u *L. affinis* 0,1–0,7 mm. I přes to, že v délce štětu se druhy v mojí práci průkazně liší, nevychází tento znak jako významný pro odlišení v mnohorozměrných analýzách. Mohlo by to být způsobeno tím, že překryv ve variabilitě znaku je značný, a tak znemožňuje praktické odlišení obou druhů.

Délka krku a celé tobolky se v mojí práci ukázaly jako nedůležité znaky. Limpricht (1895) uvádí, že krk u *L. affinis* zasahuje téměř do poloviny tobolky, kdežto u *L. fastigiata* do dvou třetin. Výsledky Vigalondo et al. (2019) naopak neukazují žádné výrazné rozdíly, což

odpovídá mým výsledkům. Podobně jako měření délky štětu, není měření těchto znaků jednoduché, protože jednotlivé části do sebe poměrně plynule přecházejí a je obtížné určit hranici mezi nimi.

Délka perichaetiálních lístků, tobolky a štětu, ale i míra odstávání lístků od lodyžky, mohou mít vliv na další, v literatuře často zmiňovaný znak, kterým je zanořenost tobolek. Ta nebyla v mé práci přímo hodnocena. Podle literatury jsou tobolky u *L. fastigiata* více zanořené mezi listy než u *L. affinis* (Blytt et al. 1842, Limpricht 1895), Smith 2004, Vigalondo et al. 2020). Z mých měření má *L. affinis* sice delší štět, ale zároveň i delší perichaetiální lístky, a to do té míry, že by to měl být právě tento druh, který má tobolky více zanořené. Možným vysvětlením je, že lístky bývají u *L. affinis* více odstálé, a proto je tobolka na pohled více odhalená než u *L. fastigiata*.

Jako nejvýznamnější znak se ukazuje šířka žebor tobolky a s ní vysoce korelovaný znak počet řad buněk v nich. Ve všech zdrojích, které tyto druhy rozlišují, je znak zmíněn a vždy je udávána šířka žebor *L. fastigiata* větší, žebra jsou tvořena z více řad buněk. Například Limpricht (1895) uvádí, že *L. fastigiata* má žebra u ústí tobolky 4 řady buněk široké, postupně přechází v 5-6 řad, *L. affinis* má žebra u ústí tvořena 2–3 řadami buněk, dále 3–4 řadami. To byl důvod, proč jsem i rostlinky s relativně úzkými žebry řadila ještě k *L. fastigiata*. Vigalondo (2020) uvádí větší počty řad (u *L. fastigiata* v distální části 4 řady buněk, dále 6–8, oproti *L. affinis* se 2–3 (–4) řadami buněk v distální části, 4–6 níže), což mnohem lépe odpovídá mým molekulárně určeným položkám. Podle mých měření jsou šířky žebor menší než v práci Vigalondo et al. (2019). To může souviset s měřením v trochu jiné části tobolky (Vigalondo měřila žebra u ústí tobolky, Vigalondo in litt.), zatímco já je měřila v horní pětině tobolky (viz Obrázek 7).

Počet řad buněk mezi žebry nebýval v literatuře příliš zmiňován, přesto se ukazuje, že tento znak je poměrně významný. Je ale používán například v příbuzném rodě *Ulova* (Caparrós et al. 2016). Limpricht (1895) zmiňuje, že u *L. fastigiata* bývají prostory mezi žebry bývají jen o trochu širší než žebra, zatímco u *L. affinis* je prostor mezi žebry široký (většinou 10 řad buněk).

Silně okénkaté špičky zubů exostomu v literatuře (Limpricht 1895, Pilous & Duda 1960, Vigalondo et al. 2020) uváděné jako typické pro *L. fastigiata*, se podle mých zjištění nachází i u *L. affinis*. Stejně tak paprscité linie na bázi exostomu (Limpricht 1895, Vondráček 1993, Vigalondo et al. 2020), se podle mých pozorování mohou vyskytovat u obou druhů a u *L. fastigiata* se nemusí nutně vyskytovat.

Stejně tak ornamentace spor, o které Vigalondo et al. (2019) ve své práci uvádí, že je absolutním znakem, odlišujícím oba druhy, není na materiálu z České republiky konstantní. Já jsem pozorovala výjimky u obou druhů, kdy papily na sporách mohou tvořit linie i u *L. affinis* (pozorováno u 3 sekvenovaných položek z 31 měřených). Naopak u některých jedinců *L. fastigiata* linie nebyly nalezeny (pozorováno u 1 sekvenované a jedné nesekvenované položky z 10 měřených). Podle práce Limpricht (1895) má *L. fastigiata* spory bradavčité a *L. affinis* hustě papilnaté. Tento znak se ale zdá nejasně definovaný, protože i velká část položek *L. affinis* obsahovala spory s velkými papilami. Otázkou zůstává, v čem přesně se spory těchto druhů liší. V mé práci bylo použito jako znak splývání papil v linie, ale dalšími potenciálními znaky by mohla být přítomnost malých, respektive velkých papil, nebo ornamentace papil, kterou uvádějí v práci Medina et al. (2009).

Jedním z často uváděných znaků je velikost spor. Ta se ale mezi autory velice liší. To může být způsobeno i pozorováním v různém stupni vývoje spor, protože ty začínají klíčit už v tobole, s postupem klíčení se zvětšují, a tak jejich velikost může být velmi variabilní (Frahm 2011). Uváděné velikosti jsou: pro *L. affinis* 14–18 μm a pro *L. fastigiata* 16–20 μm (Limpricht 1895) nebo *L. affinis* 20–24 μm a *L. fastigiata* 18–20 μm (Nyholm 1954–1969) nebo *L. affinis* 18–24 μm a *L. fastigiata* 16–18 μm (Vondráček 1993). V mé práci nebyla velikost spor reprezentativně měřena, protože po několika prvních měřeních byla zjištěna velká variabilita velikostí spor v rámci jednotlivých tobolek. Průměry velikostí spor se naopak mezi tobočkami různých druhů téměř nelišily, což potvrzují i novější práce jiných autorů (Frahm, 2010), (Vigalondo et al. 2019), Frahm (2011).

4.3 Ekologické znaky

Morfologicky jasné položky *L. fastigiata* rostly vždy v prostředí s blízkým zdrojem vody, kdežto *L. affinis* jen ve dvou třetinách případů. To naznačuje, že *L. fastigiata* se vyskytuje spíše ve vlhčím prostředí, avšak průkaznost tohoto zjištění může být snížena relativně nízkým počtem pozorování tohoto druhu.

Podle publikace (Vondráček 1993) jsou u nás nejčastějšími forofyty pro tyto druhy vrba a topol, dále jasan ztepilý, javor klen, což se mezi druhy *L. affinis* a *L. fastigiata* téměř neliší. Moje pozorování naopak ukazují poměrně velké rozdíly v preferovaných dřevinách, přičemž podle Vondráčka (Vondráček (1993) nejčastější forofyt druhu, vrba, není podle mých pozorování nejčastější osidlovanou dřevinou ani jednoho druhu; vyskytuje se u obou druhů asi v 6 % případů. To je nejspíš způsobeno jiným výběrem lokalit.

5 Závěr

Druhy *Lewinskya affinis* a *L. fastigiata* se od sebe liší na úsecích *atpB-rbcL* a *rps4* jedinou delecí, resp. substitucí bez vnitrodruhové variability na území České republiky. Ve srovnání se sekvencemi, publikovanými z jiných zemí byly pozorovány rozdíly.

Relativně spolehlivým morfologickým rozlišovacím znakem je šířka žeber tobolky, popřípadě s ní silně korelovaný počet řad buněk v žebrech. Je to také nejčastější znak uváděný literaturou. I v tomto znaku jsou však překryvy, které lze částečně eliminovat změřením a zprůměrováním více tobolek z trsu. Dalším důležitým znakem se ukázala být ornamentace spor, kdy u *L. fastigiata* papily alespoň na některých sporách splývají v linie. Tento znak však u položek z ČR není na rozdíl od literárních údajů absolutní. Znakem, který se ukázal důležitým a kterým se v literatuře nikdo nezabýval, je počet řad buněk mezi žebry tobolky. Naopak délka tobolky a krku nemají při určování druhů význam.

L. fastigiata je u nás mnohem méně častý druh než *L. affinis*, a to asi 7 – 15 krát ve sledovaných oblastech. Ekologické preference nemohly být statisticky vyhodnoceny kvůli velkému nepoměru počtů položek mezi druhy *L. affinis* a *L. fastigiata*. Nejčastějšími osidlovanými dřevinami pro *L. affinis* byly buk a dub a pro *L. fastigiata* javor a lípa.

6 Literatura

- Bączkiewicz A., Szczecińska M., Sawicki J., Stebel A., & Buczkowska K. (2017): DNA barcoding, ecology and geography of the cryptic species of *Aneura pinguis* and their relationships with *Aneura maxima* and *Aneura mirabilis* (Metzgeriales, Marchantiophyta). – PLoS One 12:.
- Blytt, Fries, Hartman, Holmstrom, Lagernhim, Lindberg, Lindgren, Nyman, & Sjögren. (1842): Botaniska Notiser.
- Bridel-Brideri S.-E. de. (1827): *Bryologia universa seu systematica ad novam methodum dispositio: historia et descriptio omnium muscorum frondosorum hucusque cognitorum cum synonymia ex auctoribus probatissimis.*
- Caparrós R., Lara F., Draper I., Mazimpaka V., & Garilleti R. (2016): Integrative taxonomy sheds light on an old problem: The *Ulota crispa* complex (Orthotrichaceae, Musci). – Bot. J. Linn. Soc. 180: 427–451.
- Chiang T. Y., Schaal B. A., & Peng C. I. (1998): Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcl* genes of chloroplast DNA. – Bot. Bull. Acad. Sin. 39: 245–250.
- Eckstein J., Garilleti R., & Lara F. (2017): *Lewinskya transcaucasica* (Orthotrichaceae, Bryopsida) sp. nov. A contribution to the bryophyte flora of Georgia. – J. Bryol. 40: 31–38.
- Eckstein J. & Zündorf H. J. (2017): Orthotrichaceous Mosses (Orthotricheae, Orthotrichaceae) of the Genera *Lewinskya*, *Nyholmiella*, *Orthotrichum*, *Pulviger* and *Ulota* Contributions to the Bryophyte Flora of Georgia 1. – Cryptogam. Bryol. 38: 365–382.
- Frahm J.-P. (2011): The taxonomic status of *Orthotrichum fastigiatum*. – Achieve Bryol.
- Goffinet B., Bayer R. J., & Vitt D. H. (1998): Circumscription and phylogeny of the Orthotrichales (Bryopsida) inferred from *rbcl* sequence analyses. – Am. J. Bot. 85: 1324–1337.
- Goffinet B., Shaw A. J., Cox C. J., Wickett N. J., & Boles S. B. (2004): Phylogenetic inferences in the Orthotrichoideae (Orthotrichaceae, Bryophyta) based on variation in four loci from all genomes. – Monogr. Syst. Bot. from Missouri Bot. Gard. 98: 270–289.
- Guerra J., Cano M. J., & Brugués M. (Eds). (2014): *Flora Briofítica Ibérica.* – Sociedad Espanola de Briologia.
- Hall T. A. (1999): A user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT. – Nucleic Acids Symp. Ser.
- Hedenäs L. & Eldenäs P. (2007): Cryptic speciation, habitat differentiation, and geography in *Hamatocaulis vernicosus* (Calliergonaceae, Bryophyta). – Plant Syst. Evol. 268: 131–145.
- Heinrichs J., Kreier H. P., Feldberg K., Schmidt A. R., Zhu R. L., Shaw B., Jonathan Shaw A., & Wissemann V. (2011): Formalizing morphologically cryptic biological entities: New insights from DNA taxonomy, hybridization, and biogeography in the leafy liverwort *Porella platyphylla* (Jungermanniopsida, Porellales). – Am. J. Bot. 98: 1252–1262.
- Hodgetts N. G., Söderström L., Blockeel T. L., Caspari S., Ignatov M. S., Konstantinova N. A., Lockhart N., Papp B., Schröck C., Sim-Sim M., Bell D., Bell N. E., Blom H. H., Bruggeman-Nannenga M. A., Brugués M., Enroth J., Flatberg K. I., Garilleti R., Hedenäs L., Holyoak D. T., Hugonnot V., Kariyawasam I., Köckinger H., Kučera J., Lara F., & Porley R. D.

- (2020): An annotated checklist of bryophytes of Europe, Macaronesia and Cyprus. – *J. Bryol.* 42: 1–116.
- Hooker W. J. (1845): *The London journal of botany : containing figures and descriptions of such plants as recommend themselves by their novelty, rarity, history, or uses : together with botanical notices and information and occasional portraits and memoirs of eminent botanists.*
- Ignatov M. S. & Ignatova E. A. (2018): Moss flora of Russia.
- Jensen N. (1952): *Die Moosflora von Schleswig-Holstein.*
- Koutecký P., Košnar J., & Herbstová M. (2012): *Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a systematice.*
- Lara F., Garilleti R., Draper I., & Mazimpaka V. (2018): *Lewinskya lamyana* sp. nov. (Orthotrichaceae, Bryopsida), a Distinct Moss from an Exceptional Habitat in the Southern Iberian Peninsula. – *Cryptogam. Bryol.* 39: 259–270.
- Lara F., Garilleti R., Goffinet B., Draper I., Medina R., Vigalondo B., & Mazimpaka V. (2016): *Lewinskya*, a New Genus to Accommodate the Phaneroporous and Monoicous Taxa of *Orthotrichum* (Bryophyta, Orthotrichaceae). – *Cryptogam. Bryol.* 37: 361–382.
- Limpricht K. G. (1895): *Die Laubmoose Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz.* (E. Kummer, Ed.).
- Medina N. G., Estébanez B., Lara F., & Mazimpaka V. (2009): On the presence of dimorphic spores in *Orthotrichum affine* (Bryopsida, Orthotrichaceae). – *J. Bryol.* 31: 124–126.
- Medina R., Lara F., Goffinet B., Garilleti R., & Mazimpaka V. (2012): Integrative taxonomy successfully resolves the pseudo-cryptic complex of the disjunct epiphytic moss *Orthotrichum consimile* s.l. (Orthotrichaceae). – *Taxon* 61: 1180–1198.
- Missouri Botanical Garden. (2020): *Tropicos.org. Tropicos.org.*
- Mizia P., Myszczyński K., Ślipiko M., Krawczyk K., Plášek V., Szczecińska M., & Sawicki J. (2019): Comparative plastomes analysis reveals the first infrageneric evolutionary hotspots of *orthotrichum* s.l. (Orthotrichaceae, Bryophyta). – *Turk. J. Botany* 43: 444–457.
- Nadot S., Bajon R., & Lejeune B. (1994): The chloroplast gene *rps 4* as a tool for the study of Poaceae phylogeny. – *Plant Syst. Evol.* 191: 27–38.
- Nyholm E. (1954): *Illustrated Moss Flora of Fennoscandia.*
- Nyholm E. (1998): *Illustrated flora of Nordic mosses. Fasc. 4., Aulacomniaceae, Meesiaceae, Catosciaceae, Bartramiaceae, Timmiaceae, Encalyptaceae, Grimmiaceae, Ptychomitraceae, Hedwigiaceae, Orthotrichaceae.* – Nordic Bryological Society, Copenhagen.
- Odrzykoski I. J. & Szweykowski J. (1991): Genetic differentiation without concordant morphological divergence in the thallose liverwort *Conocephalum conicum*. – *Plant Syst. Evol.*
- Pilous Z. & Duda J. (1960): *Klíč k určování mechorostů ČSR.*
- Plášek V., Sawicki J., Marková I., & Wierzcholska S. (2011): *Orthotrichum affine* var. *bohemicum* (Orthotrichaceae), a new variety of epiphytic moss from the Czech Republic. – *Acta Soc. Bot. Pol.* 80: 335–340.
- Plášek V., Sawicki J., Ochyra R., Szczecińska M., & Kulik T. (2015): New taxonomical arrangement of the traditionally conceived genera *Orthotrichum* and *Ulota* (Orthotrichaceae, Bryophyta). – *Acta Musei Silesiae, Sci. Nat.* 64: 169–174.
- Sawicki J., Plášek V., Ochyra R., Szczecińska M., Ślipiko M., Myszczyński K., & Kulik T. (2017): Mitogenomic analyses support the recent division of the genus *Orthotrichum*

- (Orthotrichaceae, Bryophyta). – Sci. Rep. 7:.
- Sawicki J., Plášek V., & Szczecińska M. (2009): Preliminary studies on the phylogeny of *Orthotrichum* (Bryophyta) inferred from nuclear ITS sequences. – Ann. Bot. Fenn. 46: 507–515.
- Sawicki J., Plášek V., & Szczecińska M. (2010): Molecular studies resolve *Nyholmiella* (Orthotrichaceae) as a separate genus. – J. Syst. Evol. 48: 83–194.
- Sawicki J., Plášek V., & Szczecińska M. (2012): Molecular data do not support the current division of *Orthotrichum* (Bryophyta) species with immersed stomata. – J. Syst. Evol. 50: 12–24.
- Smith A. J. E. (2004): The moss flora of Britain and Ireland.
- Stech M. & Quandt D. (2010): 20,000 species and five key markers: The status of molecular bryophyte phylogenetics. – Phytotaxa 9: 196–228.
- Váňa J. (2006): Obecná Bryologie. – Nakladatelsví Karolinum, Praha.
- Váňa J. (2007): Speciální bryologie II/2.
- Vigalondo B., Draper I., Mazimpaka V., Calleja J. A., Lara F., & Garilleti R. (2020): The *Lewinskya affinis* complex (Orthotrichaceae) revisited: species description and differentiation. – Bryologist 123: 454–481.
- Vigalondo B., Garilleti R., Vanderpoorten A., Patiño J., Draper I., Calleja J. A., Mazimpaka V., & Lara F. (2019): Do mosses really exhibit so large distribution ranges? Insights from the integrative taxonomic study of the *Lewinskya affinis* complex (Orthotrichaceae, Bryopsida). – Mol. Phylogenet. Evol.
- Vondráček M. (1993): Revize a rozšíření druhů rodu *Orthotrichum* Hedw. v České a Slovenské republice (Musci). – Sborník Západočeského Muz. v Plzni.
- Wilhelm J. & Hübener P. (1833): *Muscologia Germanica: oder Beschreibung der deutschen Laubmoose. Im erweiterten Umfange nach dem jetzigen Stande der Wissenschaft, nebst Erörterung der Standörter und ihrer Entdecker, der Synonyme seit Hoffmann und Roth, mit erläuternden Anmerkungen.*
- Yan L., Ge X.-J., & Tong C. (2011): The *rps4* locus as an alternative marker for barcoding bryo-phytes: evaluation based on data mining from GenBank. – Biodivers. Sci. 19: 311–318.

Přílohy

Příloha 1

Tabulka 8: Položky studované pomocí morfometrických a molekulárních analýz. Podle čísla je lze vyhledat v herbáři CBFS. Určení: f- *Lewinskya fastigiata*, a – *L. affinis*; sekvenování – u molekulárně určených položek je uveden sekvenovaný úsek; měřené – 1- položky, které byly měřeny pro morfometrii; pozorované znaky – 1 -položky u kterých byly zaznamenány některé znaky, které nebyly použity v analýzách; systematicky sbírané – 1 - položky sbírané na popisovaných lokalitách postupem popisovaným v metodice.

číslo	určení	sekvence	měřené	pozorované znaky	systematicky sbírané
38f-kp	f	<i>atpB-rbcL</i>			
45a-kp	a	<i>atpB-rbcL</i>			
169-kp	a		1	1	1
172-kp	a		1	1	1
173-kp	a		1	1	1
175-kp	f		1	1	1
176-kp	f	<i>rps4</i>	1	1	1
181-kp	a		1	1	1
191-kp	a		1	1	1
201-kp	f		1		1
204-kp	a		1		1
209-kp	a		1		1
214-kp	a		1		1
263a-kp	a		1	1	1
266-kp	a		1	1	1
307-kp	a	<i>rps4</i>	1	1	1
309a-kp	a	<i>rps4</i>	1	1	1
311fa? - kp	a		1	1	1
311a-kp	a		1	1	1
312-kp	f		1		1
313-kp	a	<i>rps4</i>	1	1	1
316-kp	a		1		1
317-kp	a		1	1	1
318-kp	a		1		1
319-kp	a	<i>rps4</i>	1		1
320-kp	a		1	1	1
321-kp	a		1		1
322fa? - kp	a	<i>rps4</i>	1	1	1
440-kp	a		1	1	1

446a-kp	a	<i>rps4</i>	1	1	1
451-kp	f	<i>rps4</i>	1	1	1
452-kp	a		1	1	1
453-kp	a		1	1	1
456-kp	a	<i>rps4</i>	1	1	1
504-kp	a	<i>rps4</i>	1	1	1
507-kp	a	<i>rps4</i>	1	1	1
309fa? - kp	a	<i>rps4</i>	1	1	1
446-kp f	f	<i>rps4</i>	1	1	1
263f-kp	f	<i>rps4</i>	1	1	1
322f-kp	f		1	1	1
14201	f	<i>atpB-rbcL</i>	1		
20051	a	<i>atpB-rbcL</i>	1		
20051	f	<i>atpB-rbcL</i>	1		

Příloha 2

Elektronický dokument přiložený k bakalářské práci: Měřené znaky