

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Variabilita druhu *Calamagrostis varia*

Diplomová práce

Bc. Jana Nakládalová

Školitel: doc. Ing. Milan Štech, Ph. D.

České Budějovice 2020

Nakládalová, J. (2020): Variabilita druhu *Calamagrostis varia*. [On the variability of the species *Calamagrostis varia*. Mgr. Thesis, in Czech] – 52 pp. + 16 pp. Appendix, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czechia.

Anotace

Calamagrostis varia is a critically endangered species in Czechia. It has an interesting distribution range comprising the main area in calcareous parts of Alps and Carpathians and several isolated distribution areas on the northern edge of its range. The ecology of these sites is very heterogeneous. We therefore decided to explore this species' variability. In this study DNA ploidy level by FCM, morphometric characters and 2 genetic markers of 50 populations across the distribution range of *C. varia* were studied.

This study was supported by grant SGA PŘF JU in 2017.

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

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

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

V Nýřanech dne 9. 12. 2020

.....

podpis studenta

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli, Milanovi Štechovi, za jeho trpělivost a smysl pro detail, za konstruktivní poznámky i za ochotu se mnou konzultovat na poslední chvíli i v pozdních nočních hodinách. V jeho nabitém programu to jistě nebyla malá oběť a já jsem mu za ni moc vděčná.

Moc děkuji Bety Manukjanové, bez jejíž pomoci v laboratoři by tato práce vůbec nevznikla. Děkuji i dalším lidem z fakulty, Petru Kouteckému, Liboru Ekrtovi, Majdě Lučanové, Honzovi Kučerovi a dalším, kteří přispěli sběrem materiálu nebo pomocí v procesu analýzy jakýchkoli dat.

Velký dík patří mému manželovi, který je se mnou na cestě za úspěšně odevzdanou diplomkou již od samého začátku. Ještě jako svobodní a bezdětní jsme si z výpravy za sběrem materiálu v Alpách udělali naši poslední dovolenou ve dvou a já na ni moc ráda vzpomínám. Obrovskou pomocí s domácností a hlídáním našeho trpaslíčka přispěl ke vzniku této práce skoro stejnou měrou jako já.

Také bych chtěla poděkovat svým dětem. Petrušce za to, že snesla moje pracovní zapálení i ve dny, kdy bych s ní určitě měla být spíš jako maminka. A tomu malému Marťánkovi za to, že mě alespoň na posledních pár týdnů před termínem odevzdání propustil ze spárů celodenních nevolností.

Mnoho díky bych ráda směřovala celé své široké rodině, která se ochotně podělila o dny, kdy jsem potřebovala hlídání. Také mi vždy všichni věřili a dodávali odvalu, čehož si moc vážím.

Do veliké dálky posílám svůj dík Viki Brožové, která mi byla oporou až z dalekých Špicberků. Moc děkuji nejen za pomoc s finálními úpravami, ale hlavně za podporu a přátelství po celou dobu mého studia.

Děkuji i svým ostatním kamarádkám, že vydržely moje bědování ve chvílích největšího zoufalství a vždy mi dodaly odvalu, že tenhle projekt zvládnou dokončit. Měly jste pravdu, zvládla jsem to!

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	<i>Calamagrostis varia</i>	6
2.4.1	Rozšíření a ekologie	6
2.4.2	Cenologie.....	7
2.4.3	Ochrana.....	7
2.4.4	Popis	7
2.4.5	Determinace druhu	8
2.4.6	Původ	9
2.4.7	Kříženci	9
2.5	Vegetace Evropy v holocénu	9
2.5.1	Fylogeografie.....	10
3	Cíle práce.....	11
4	Materiál a metody.....	11
4.1	Sběr materiálu	11
4.2	Průtoková cytometrie	13
4.3	Morfologická analýza	14
4.3.1	Výběr znaků a populací	14
4.3.2	Měření.....	14
4.3.3	Analýza morfometrických dat	15
4.4	Molekulární metody.....	16
4.4.1	Izolace DNA	17
4.4.2	PCR.....	19
4.4.3	Sekvenace	19
5	Výsledky.....	22
5.1	Průtoková cytometrie	22
5.2	Morfologická analýza	24
5.2.1	Popisné statistiky	24
5.2.2	Shluková analýza.....	25

5.2.3	Analýza hlavních komponent (PCA).....	26
5.2.4	Kanonická diskriminační analýza (CDA).....	31
5.2.5	Klasifikační analýza	32
5.3	Molekulární analýza.....	33
6	Diskuze	36
6.1	Průtoková cytometrie	36
6.2	Morfologická analýza	38
6.3	Molekulární metody.....	39
7	Závěr.....	41
8	Literatura	42

1 Úvod

Trávy jsou člověkem rozlišovány jako morfologická skupina rostlin už stovky let ve většině kultur. Téměř každý jazyk má pro tuto skupinu jednoděložných rostlin speciální označení (Soreng et al., 2015). Jejich společný původ byl předpokládán už ve starém Řecku, u samého zrodu botaniky. Vnitřní vztahy této morfologicky dobře rozpoznatelné skupiny jsou ovšem velmi komplikované.

Jedním z nejkomplicovanějších rodů trav, tedy čeledi *Poaceae*, co se fylogenetických vztahů a taxonomických nejasností týká, je rod *Calamagrostis*. Jeho problematice se věnuje první část literární rešerše této práce. Experimentální část jsem věnovala jednomu z druhů tohoto rodu již ve své bakalářské práci, pro tu diplomovou jsem si vybrala další, tentokrát s větším areálem – jedná se o endemita širší střední Evropy.

Calamagrostis varia, třtina pestrá, je jedním z devíti druhů třtin rostoucích na území Česka. Spolu s *Calamagrostis stricta* a *Calamagrostis pseudophragmites* navíc patří do kategorie kriticky ohrožených druhů Červeného seznamu ohrožených druhů ČR (Grulich & Chobot, 2017). V současné době má na našem území pouze šest potvrzených lokalit.

Hlavní areál *C. varia* tvoří vápencové oblasti Alp, Karpat a dalších pohoří v jižní části Evropy. České lokality patří mezi izolovanou arelu výskytu mimo hlavní rozšíření druhu. Další takové arely se nachází v pohoří Harz v Německu, na švédském ostrově Gotland, recentně byla objevena izolovaná lokalita na ostrově Saaremaa v Estonsku. Tento nespojitý areál vypovídá o reliktní povaze okrajových arel, stejně jako charakter jejich stanovišť. Jedná se o lokality na místech obohacených o bazické substráty, v mnohých dalších aspektech se ale liší. Daly by se rozdělit na dva základní typy, kterými jsou slatinné louky a skalní výchozy. Vzhledem k rozdílnostem v charakteru stanovišť nejen na českém území jsme se rozhodli studovat variabilitu tohoto druhu napříč jeho areálem.

Pro studium variability jsme zvolili morfologickou analýzu znaků v kláscích, měření relativní velikosti genomu metodou průtokové cytometrie a molekulární analýzu vybraných úseků chloroplastové DNA.

2 Literární rešerše

2.1 Taxonomická problematika rodu *Calamagrostis*

Rod *Calamagrostis* je v současnosti zařazován do čeledi *Poaceae*, podčeledi *Pooidae*, tribu *Poeae* (Soreng et al., 2017). Jeho zařazení do nižších taxonomických kategorií je ovšem i přes pokračující studie využívající i moderní molekulární metody nejisté (Saarela et al., 2010; Soreng et al., 2015, 2017).

Taxonomie rodu *Calamagrostis* je už od počátků komplikována jeho vymezením. Jméno *Calamagrostis* poprvé použil Adanson v roce 1763 jako označení trav s jednokvětými klásky a pluchou bez osiny (Adanson, 1763; Wasiljev, 1960). Později (1789) Roth rozlišil tři rody, *Arundo*, *Agrostis* a *Calamagrostis*, přičemž poslední z nich odlišoval na základě znaků: plucha s osinou, jednokvěté klásky a kalusové chlupy. Ve své pozdější práci (1827) ale sám Roth přerazuje již popsané druhy do rodu *Arundo*. Tyto nejasnosti chtěl vyřešit Clarion, jenž ustanovil nový rod *Deyeuxia* (Clarion, 1812), který se podle něj odlišuje od rodů *Arundo* a *Calamagrostis* přítomností pastopečky, oděním květních částí, vlastnostmi obilky atd. Někteří autoři ovšem nepřijali jméno *Deyeuxia* na rodové úrovni, ale označovali jím poddruh, sekci nebo podsekcí v rámci rodu *Calamagrostis*. To ještě zvětšilo nejasnosti ve vymezení a chápání rodu. Podrobněji se problematikou systematických pojetí rodu zabýval Wasiljev (1960), který ve své práci uvádí jejich přehled.

V nejnovějších pracích rozlišují samostatný rod *Deyeuxia* především asijscí autoři, a to na základě délky pluchy a kalusových chlupů a přítomnosti pastopečky (Phillips et Chen, 2003). Autoři Flora of China ale zároveň dodávají, že rody *Agrostis*, *Deyeuxia* a *Calamagrostis* tvoří komplex nedostatečně odlišných linií, jejichž determinační znaky jsou nejasné (Lu et al., 2006; Lu et Phillips, 2006). Rodová problematika je tedy i v současnosti značně komplikovaná. Podrobně se tribem *Poeae* a rody *Calamagrostis* a *Deyeuxia* zabýval Saarela et al. (2010, 2017). Výsledky studií ukazují, že pokud do rodu *Calamagrostis* s. l. řadíme i zástupce ze střední a jižní Ameriky, je rod polyfyletický. Zástupci severní polokoule včetně typových druhů obou rodů (*Calamagrostis canescens* pro rod *Calamagrostis* a *Calamagrostis arundinacea* pro rod *Deyeuxia*) se seskupili v jediné větvi fylogenetického stromu. Autoři na základě relativně blízké fylogenetické příbuznosti obou druhů v rámci širokého samplingu druhů napříč severní polokoulí uvádějí, že rozlišení těchto dvou rodů je tedy neopodstatněné a *Deyeuxia* je synonymem *Calamagrostis*. Rozřešení fylogenetických vztahů pak vyžaduje další výzkum s větším množstvím zastoupených druhů a využitím nových molekulárních

markerů, např. low-copy genů (Saarela et al., 2017). Teprve potom budeme blíže k rozkrytí síťovité struktury linií způsobené několika speciálními mechanismy důležitými ve speciaci rodu, mezi něž bezesporu patří polyploidizace a hybridizace (Stebbins, 1956).

2.2 Polyploidizace

Multiplikace genomu, jinak označovaná také jako polyploidizace, by se dala označit za jeden z hnacích motorů evoluce obecně (Madlung, 2013; Soltis et al., 2014). Jedná se o proces, při kterém se zvýší počet chromozomových sádek. Stupeň ploidie se pak označuje násobkem základního chromozomového čísla x . Toto číslo odpovídá haploidnímu počtu chromozomů diploidní rostliny ($2n = 2x$) (Ramsey and Schemske, 1998). Polyploidizace není proces pozorovaný výlučně u rostlin, byl pozorován a stále častěji je předmětem výzkumu i u hub (Kellis et al., 2004) a živočichů (shrnutí v Gregory and Mable, 2005).

Odhaduje se, že až 15 % speciálních událostí v rámci krytosemenných rostlin je spojeno s polyploidizací (Wood et al., 2009). Jedním z důvodů je častá asociace se vznikem reprodukční bariéry a morfologickou diferenciací (Wood et al., 2009). Dalším důvodem je pravděpodobně možnost vzniku klíčových inovací následkem zdvojení genomu. Jako příklady těchto klíčových inovací uvádí Soltis a Soltis (2016) vznik květu, pětičetnost květu, několik morfologických znaků jednoděložných rostlin, nebo syntézu glukosinolátů v řádu *Brassicales*. Zároveň se ukazuje korelace historických duplikací celého genomu s globálními změnami prostředí a s hromadnými vymíráními (Wu et al., 2020).

Některé recentní vědecké práce již odhalují detaily paleoploidizačních událostí předcházejících vzniku krytosemenných rostlin. Dvě duplikace celého genomu jsou společné pro všechny krytosemenné rostliny a jejich datování vychází před diverzifikací linie semenných a linie krytosemenných rostlin. Dvě celogenomové duplikace nejspíš předcházely i vzniku čeledi *Poaceae* (Jiao et al., 2011; Wu et al., 2020). I proto je základní chromozomové číslo trav vyšší než u jiných čeledí (Stebbins, 1985; Hilu, 2004).

Ancestrální základní chromozomové číslo podčeledi *Pooideae*, kam je rod *Calamagrostis* řazen, je $x = 11$. Následná chromozomová diverzita recentních druhů podčeledi ($x = 2-13$) je výsledkem speciálních událostí, při kterých proběhly různé kombinace následujících procesů: polyploidizace, hybridizace, aneuploidie a diploidizace (Hilu, 2004). Molekulární podstata diploidizace zatím není plně známa, jde ale o proces, kdy se z tetraploidního druhu tvořícího při meióze kvadrivalenty stane diploidní druh se stejným počtem chromozomů tvořící bivalenty (Wolfe, 2001).

Základní chromozomové číslo v rodě *Calamagrostis* je $x = 7$ (Frey and Paszko, 1999). Diploidní druhy nejsou známy, tetraploidní úroveň je považována za nejčastější, následována hexa- a oktoploidními úrovněmi (Frey and Paszko, 1999). Vyšší ploidní úrovně se vyskytují zřídka, ale byly zaznamenány chromozomové počty až do $2n = 140$ (*C. crassiglumis*, Darlington & Wylie, 1956), které by odpovídaly ploidní úrovni $20x$. S ploidní úrovní úzce souvisí i způsob rozmnožování, tetraploidní druhy se zpravidla rozmnožují sexuálně, hexa- a oktoploidní druhy mohou mít sexuální i apomiktický způsob rozmnožování a vyšší ploidie jsou nejčastěji zcela apomiktické (Greene, 1984). I u těch ale existují výjimky, např. sexuálně se rozmnožující vysoký polyploid nejasné ploidní úrovně ($2n = 88-100$), *Calamagrostis porteri* subsp. *porteri* (Greene, 1984).

Podle mechanismu vzniku polyploidního jedince se polyploidizace tradičně dělí na auto- a allopolyploidizaci (Kihara and Ono, 1926; Briggs and Walters, 1997). Ovšem definice těchto pojmů je celkem problematickou záležitostí. Jak ve své práci uvádí Soltis et al. (2010), existují dvě hlavní třídy definic: genetická a taxonomická. V prvním případě se druh polyploidizace rozlišuje na základě cytologie, tedy způsobu segregace chromozomů. V druhém případě je kritériem taxonomická příslušnost rodičovských genomů, autopolyploidizace probíhá v rámci jednoho druhu, allopolyploidizace probíhá s přispěním genomu dvou druhů (hybridizací). Každá z definic má svá omezení a určitou míru zjednodušení, velmi proto záleží i na přístupu výzkumníka, resp. tématu jeho výzkumu, jakou z definic se rozhodne aplikovat (Soltis et al., 2010). Už průkopník ve výzkumu polyploidizace, George Ledyard Stebbins, Jr., vnímal problematiku jako velmi komplexní a snahy o striktní dělení polyploidů do dvou zmíněných kategorií považoval za přístup spíše matoucí než vysvětlující (Stebbins, 1971).

2.3 Hybridizace

Za další velmi výkonný motor evoluce je považována hybridizace (Anderson and Stebbins, 1954; Soltis and Soltis, 2009). Potenciál přírodní hybridizace z hlediska vzniku nových druhů závisí především na schopnosti produkovat křížence, kteří překonají fitness svých rodičů alespoň v některých biotopech (Arnold, 1997). Hybridizace je pro skupinu trav velmi podstatným evolučním procesem nejen na úrovni druhů, ale i na úrovni rodů. Některé druhy i celé rody trav vznikly mezirodovým křížením, např. \times *Festulolium*, \times *Puccinhippsia*, \times *Agropogon*, \times *Ammocalamagrostis*. Poslední zmíněný rod vznikl křížením druhů *Ammophila arenaria* a *Calamagrostis epigejos*, ve Švédsku byla v minulosti zaznamenána i jedna lokalita křížence *Ammophila arenaria* \times *Calamagrostis arundinacea* (Tutin, 1980).

Rozlišují se dva základní typy hybridní speciace, homoploidní a polyploidní. Při homoploidní speciaci vzniká hybridní linie beze změny počtu chromozomů, při polyploidní speciaci dochází ke zdvojení hybridního genomu (proces již výše zmíněný, allopolyploidizace) (Rieseberg and Willis, 2007).

Homoploidní speciace je z těchto dvou typů méně častá především ze dvou důvodů: snížená fitness prvních generací kříženců a slabá reprodukční bariéra s rodičovskými druhy, která umožňuje zpětné křížení a genovou introgresi (Rieseberg and Willis, 2007). K těmto biologickým faktorům se přidává i technická náročnost odhalení takto vzniklých druhů, kterým často chybí diagnostické znaky (Rieseberg and Willis, 2007). Nicméně přesto, že genová introgrese nemusí vést přímo ke vzniku nového druhu, slouží jako zdroj adaptivních genových variant (Burke and Arnold, 2001).

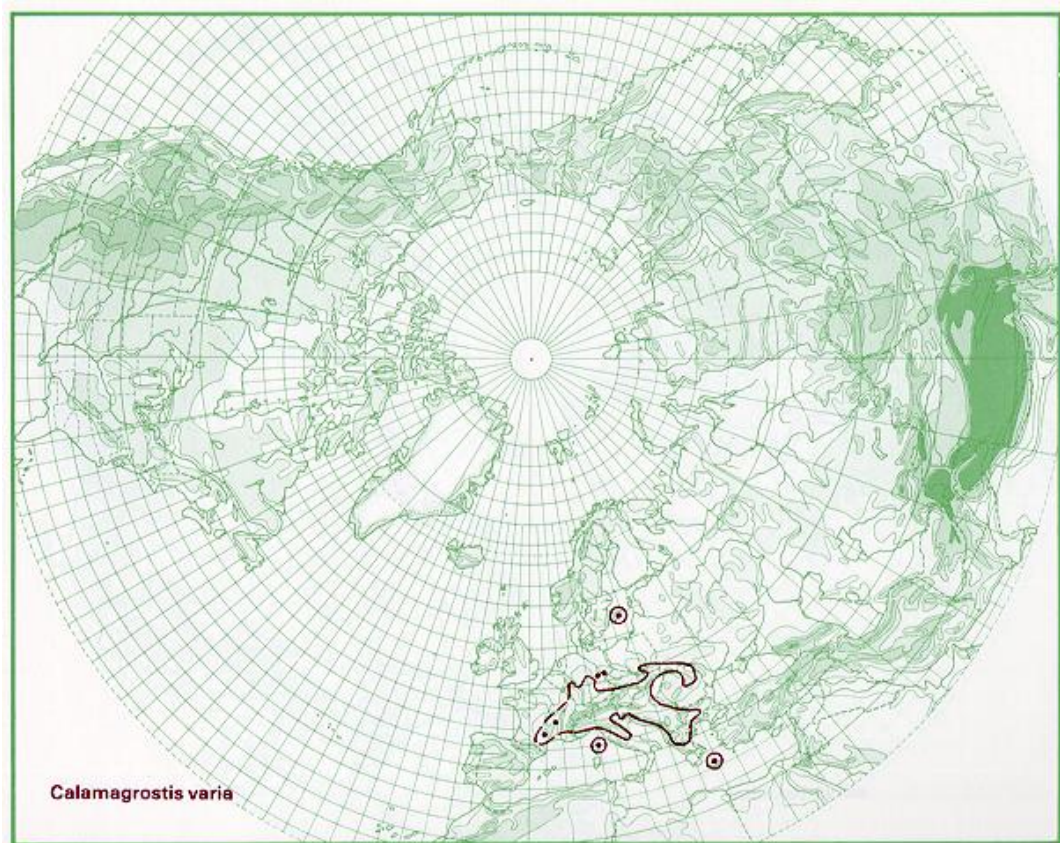
Na druhé straně allopolyploidní druhy vznikají často v jediném kroku, jde tedy o příklad tzv. saltační speciace (Grant, 1981). Znásobení genomu a s ním spojená reprodukční bariéra navíc zajistí genetickou integritu nově vzniklého taxonu. Allopolyploidie jsou často vysoce fertillní už v prvních generacích potomstva, zároveň jsou také více fenotypově odlišitelné od svých rodičovských druhů. (Rieseberg & Willis, 2007). Spolu se změnou chromozomového počtu jsou tyto skutečnosti často důvodem k vytvoření definované taxonomické jednotky (druhu, poddruhu atd.) (Rieseberg and Willis, 2007). Evoluční výhodu allopolyploidům poskytuje fixní heterozygosit, kdy druh stále obsahuje alely obou rodičovských druhů (Soltis et al., 2003), což souvisí i s větší adaptivitou a ekologickou amplitudou křížence (Stebbins, 1971). Další velmi výraznou výhodou duplikace genů je prostor pro evoluční novinky např. syntéza heterodimerních proteinů (Soltis et al., 2003).

Hybridizace je mezi sexuálně se rozmnožujícími druhy (především mezi druhy tetraploidní úrovně) rodu *Calamagrostis* běžnou záležitostí. Podle morfologických znaků byla rozeznána většina teoreticky možných kříženců. (Clarke, 1980). Největší zásluhu na výzkumu křížení třtin (přirozeného i řízeného) má A. Nygren, který prováděl důkladná pozorování i hybridizační experimenty. Jeho zásadním zjištěním bylo, že všechny druhy s počtem chromozomů $2n = 28$ se rozmnožují sexuálně (Nygren, 1946, 1948). Druhy s vyšším počtem chromozomů jsou striktně nebo fakultativně apomiktické. Právě kombinace apomiktického rozmnožování s občasným sexuálním reprodukčním cyklem je pro celý rod *Calamagrostis* velmi výhodná, protože kombinuje výhody obou strategií (Nygren, 1951). Velkou měrou ale přispívá k síťovité struktuře fylogenetických vztahů a velmi komplikuje následné analýzy.

2.4 *Calamagrostis varia*

2.4.1 Rozšíření a ekologie

Třtina pestrá je endemitem širší střední Evropy s velmi zajímavým nespojitým areálem (Obr. 1). Podobné rozšíření mají i další u nás ohrožené druhy rostlin, např. *Tofieldia calyculata* a *Phyteuma orbicularis*. Těžištěm výskytu jsou vápencové oblasti Alp, Karpat, Apenin a Dinárských pohoří, především na severním okraji areálu se pak nacházejí lokality, které mají zřetelně reliktní charakter. Reliktní povaha stanovišť je dána těžšími bazickými substráty vázanými na bezlesí nebo světlé lesy. Takové podmínky odpovídají ranému postglaciálu, kdy na většině území převládaly bazické půdy a světlé lesy (Chytrý, 2012).



Obr. 1: Rozšíření druhu *Calamagrostis varia*. (Hultén & Fries, 1986).

Typickým příkladem reliktního stanoviště jsou slatinné louky, které tvoří většinu lokalit *C. varia* v Česku (Příloha I). Podobnou charakteristiku má i naleziště na ostrově Saaremaa v Estonsku, kde byl druh objeven až v roce 2005 (Lindell, 2006). Dalším typem reliktních lokalit jsou skály obohacené bazickými horninami – na našem území jde o skalní terasy v Ralsko-Bezděžské tabuli obohacené bazickými vulkanity, v Německu odpovídá těmto

podmínkám pohoří Švábská Alba s výskytem jurských vápenců (Jooss, 2013). Ekologicky velmi specifické podmínky poskytují lokality na sádrovci (Escudero et. al., 2014), které se vyskytují v pohoří Harz v Německu (Příloha I). Do objevu lokality v Estonsku byl nejsevernější arelou výskytu *C. varia* švédský ostrov Gotland, nejjihnější lokalita je uváděna na Krétě. Na Korsice se vyskytuje poddruh *C. varia* subsp. *corsica* (Clarke, 1980).

Lokality na území našeho státu jsou koncentrovány v Polabí, kde druh recentně roste na Mělnické Vrutici, u Loučeně a Českého Meziříčí, a dále ve Džbáně, kde se vyskytuje u Bílichova. V těchto oblastech se druh vyskytuje na slatinných loukách. Na vrších Ralsko-Bezdězské tabule a na Milešovce v Českém středohoří roste druh v poněkud ekologicky odlišných podmínkách, na skalnatých terasách. Ne zcela jisté, ale doložené údaje pocházejí z Podkrušnohoří a Středního Povltaví (Štech, in prep.).

2.4.2 Cenologie

C. varia je diagnostickým druhem borů svazu *Erico-Pinion*. Především na okrajích svého areálu roste ale i v některých typech zvláště mokřadního bezlesí, např. svazy *Caricion davallianae*, *Molinion* atd. (Grulich, 1986; Štech, in prep.).

2.4.3 Ochrana

Na území ČR je považován za kriticky ohrožený druh v kategorii ochrany C1 (Grulich & Chobot, 2017). Je chráněn vyhláškou 395/1992 Sb., kde je zařazen do kategorie silně ohrožené druhy.

2.4.4 Popis

Calamagrostis varia je vytrvalá, volně trsnatě porosty tvořící bylina. Tvoří krátké výběžky dvojího typu, vnitropochevní a vněpochevní. Stébla jsou žlutozelená, přímá, cca 60–100 cm vysoká, oblá, podélně rýhovaná a hladká, zpravidla se 3–4 kolénky, která jsou hnědavá, občas až nafialovělá. Čepel listů je šikmo vzhůru směřující až rozestálá, až 25 cm dlouhá a 3–8 mm široká, sivozelená, na podzim se na okrajích a konci objevuje charakteristická cihlová barva (Příloha II). Na líci i rubu je čepel ± matná, žebra jsou drsná, jazýček je uťatý a až 4 mm dlouhý. Pochva je hladká, ± sivozelená a lysá. Přímá lata je 6–18 cm dlouhá, před odkvětem a po něm stažená, za květu se kopinatě rozevívá (Příloha III). Větve latic vyrůstají po 2–5, tvoří se i krátké přiosní větévky. Stopky jednokvětých klásků jsou 1–4 mm dlouhé, samotné klásky pak 4–5 mm dlouhé (Příloha III). Plevy jsou ± stejné, kožovité, zelené až nafialovělé, z boku kopinaté. Pastopečka je vyvinutá, až 1,5 mm dlouhá, hustě chlupatá 1,5–2,5 mm dlouhými chlupy. Husté chlupy na bázi květu dosahují do cca 3/4 délky pluchy. Plucha je dlouhá 3–4,5

mm, ± kožovitá, na špičce zubatá až dvoucípá. Z její spodní 1/3 vyrůstá zřetelně kolénkatá osina, která je ve spodní části spirálně stočená a v horní části rovná. Je 3–5 mm dlouhá, z klásku příliš nevyčnívá. Pluška je jemně kožovitá, ± průsvitná a cca 3 mm dlouhá. Prašníky jsou 1,5–2 mm dlouhé, hladká obilka je dlouze vejčitá a cca 2 mm dlouhá (Conert, 1989; Štech, in prep.).

Druh *C. varia* je znám pouze v tetraploidní úrovni, počet chromozomů $2n = 28$ (Nygren, 1946; Strid & Franzen, 1981; Krahulcová, 2003). Stejně jako všechny tetraploidní druhy rodu *Calamagrostis* se rozmnožuje sexuálně (Nygren, 1946, 1948).

Tento druh se ve většině areálu vyskytuje ve formě málo variabilního poddruhu *Calamagrostis varia* subsp. *varia*. Na ostrově Korsika se vyskytuje poddruh *Calamagrostis varia* subsp. *corsica* lišící se většími klásky a kratšími bazálními chlupy dosahujícími jen poloviny délky pluchy (Conert, 1989; Clarke, 1980).

2.4.5 Determinace druhu

Určení druhu je i přes jeho relativně malou variabilitu (Paszko, 2008) problematickou záležitostí, a to především z důvodu častých záměn, ať už s ostatními druhy rodu *Calamagrostis*, nebo jejich kříženci.

Nejlepší podmínky pro určení jsou přímo na lokalitě sběru, kdy je k dispozici dostatek materiálu, je vidět charakter porostu a dají se odhadnout ekologické podmínky stanoviště. Při nejistotě určení taxonu je ideální zkontrolovat znaky v kláscích binokulární lupou. Záměny při určování druhu jsou totiž způsobeny především tím, že kritické determinační znaky jsou z větší části minuciézní, což značně ztěžuje určování v terénu. Největší problém je však s určováním herbářových položek, které jsou často nedostatečné, navíc u nich chybí informace o charakteru porostu, barvě listů v živém stavu apod. (Grulich, 1986; Štech, in prep.).

Z ostatních druhů je nejčastější záměna s *C. arundinacea* (Grulich, 1986). Takové záměny byly prokázány u některých herbářových položek i v Česku (např. Velký Javorník) (Štech, in prep.). Mezdruhovní kříženci třtin mají často intermediární znaky rodičovských taxonů, mohou ale připomínat i třetí taxon (Conert, 1989). Takovým případem je kříženec *C. ×acutiflora* (= *C. epigejos* × *C. arundinacea*), který je nejpodobnější právě druhu *C. varia* (Nygren, 1948; Clarke, 1980) a větší část chybných údajů o výskytu *C. varia* je založena na tomto kříženci. Má ale špičatější plevy, nepříliš dobře vyvinutou pastopečku a rostliny bývají drsné, podobně jako u rodičovského druhu *C. epigejos*. Dalším důvodem mylných údajů o výskytu *C. varia*

může být i nesprávná nomenklatorická interpretace jmen *C. sylvatica* a *C. montana* (Štech, in prep.).

2.4.6 Původ

U druhu *Calamagrostis varia* byla Nygrenem vyslovena hypotéza o jeho hybridogenním původu. Jako rodičovské taxony označil *C. epigejos* a *C. arundinacea* (Nygren, 1962). V jeho hybridizačních experimentech byl hybrid *C. varia* a *C. epigejos* oproti ostatním tetraploidním hybridům třtin vysoce fertilní, což připisoval právě úzkému příbuzenskému vztahu těchto dvou druhů.

2.4.7 Kříženci

Calamagrostis varia se jako pohlavně se rozmnožující druh kříží velmi snadno. Conert (1989) uvádí čtyři druhy, se kterými byla doložena přirozená hybridizace: *C. arundinacea*, *C. epigejos*, *C. pseudophragmites* a *C. villosa*. Tito kříženci se označují jako *C. × haussknechtiana*, *C. × bihariensis*, *C. × torgesiana* a *C. × prahlia*. Většinou jsou intermediárního vzhledu a vznikají na lokalitách, kde se vyskytují oba rodičovské taxony (Conert, 1989). Mezi kříženci a rodičovskými druhy může docházet ke zpětnému křížení a je tedy velmi obtížné rozhodnout, jestli jedince považovat za křížence, nebo jako krajní projev variability rodičovského druhu (Štech, in prep.). Na území Česka dosud nebyl žádný z uvedených kříženců s jistotou doložen (Štech, in prep.).

2.5 Vegetace Evropy v holocénu

Současné rozšíření evropských druhů bylo velkou měrou formováno výraznými klimatickými změnami na konci glaciálu a následnou rekolonizací Evropy po ústupu kontinentálního zalednění poslední doby ledové. Poslední zalednění dosáhlo maxima před přibližně 18 000 lety, kdy jižní okraj kontinentálního ledovce dosahoval úrovně dnešního severního Německa a Polska a horský ledovec pokrýval masiv Alp (Taberlet et al., 1998). Pás mezi těmito zaledněnými oblastmi tvořil permafrost a bezlesní biomy stepotundra nebo tundra (Hewitt, 1996, 1999). Alpské a arktické druhy tedy v tomto období prošly expanzí svého areálu a po následném oteplení se vrátily zpět do vyšších zeměpisných šířek nebo do horských poloh (Birks, 2008). Druhy nepřizpůsobené těmto extrémním podmínkám buď vymřely, nebo musely přežít na místech s vhodnými podmínkami. Tradiční představa byla spojená především s teplomilnými druhy a jejich ústupem na jih Evropy, kde se rozlišují tři hlavní refugia, Iberský a Apeninský poloostrov a oblast Balkánu (Taberlet et al., 1998). Následná rekolonizace

Evropy probíhala dle této představy podle scénářů migračních cest z jižních refugií pojmenovaných podle jejich modelových druhů (Hewitt, 1999). V dalších letech ovšem začalo přibývat prací, které tuto teorii zpochybnily a na základě fosilních nálezů (rostlinné makrozbytky, schránky měkkýšů, pylové diagramy) navrhly možnost výskytu kryptických refugií lesních společenstev a mezofilních temperátních druhů i v centrální Evropě (např. Willis et al, 2000; Stewart & Lister, 2001; Tribsch & Schönswetter, 2003; Birks & Willis, 2008; Juříčková et al., 2014; Mráz & Ronikier, 2016). Rozvoj molekulárních metod vedl ke studiím historie rozšíření na úrovni jednotlivých druhů, tzv. fylogeografie.

2.5.1 Fylogeografie

Fylogeografie se zabývá aktuálním prostorovým uspořádáním genetických linií a rozkrývá tak historii rozšíření jednotlivých druhů i vegetačních typů (Avice, 2000). Počáteční studie zabývající se fylogeografií na evropském území se týkaly hlavně dřevin (Taberlet et al. 1995, Jaarola et al. 1999) a savců (Breitenbach et al. 1997, King & Ferris 1998). V současnosti vzniká stále větší množství fylogenetických studií na velkém spektru evropských druhů rostlin včetně řas (*Batrachospermum gelatinosum*, Keil et al., 2015) a mechů (*Rhytidium rugosum*, Hedenäs, 2017). Nejvíce prací se ale věnuje krytosemenným rostlinám, např. druhům *Melica nutans* (Tyler, 2002), *Saxifraga oppositifolia* (Holderegger & Abbott, 2003), *Festuca pratensis* (Fjellheim et al., 2006), *Rosa pendulina* (Fér et al., 2007), *Eryngium alpinum* (Naciri & Gaudeul, 2007), *Carex pilosa* (Rejzková et al., 2008), *Pulsatilla vernalis* (Ronikier et al., 2008), *Hordelymus europaeus* (Dvořáková et al., 2009), *Lonicera nigra* (Daneck et al. 2011), *Ranunculus platanifolius* (Stachurska-Swakoń et al., 2013), *Helianthemum nummularium* (Volkova et al., 2016) nebo *Hordeum murinum* (Bieniek, 2018).

Pro skupinu trav je prakticky nemožné získat podrobnější informace o historickém rozšíření druhů z paleobotanických dat. U rostlin často využívaná pylová zrna jsou ve skupině trav velmi morfologicky podobná a je téměř nemožné rozlišit příslušnost k jednotlivým druhům (Beug, 2004), především pak ve fosilním materiálu (Dvořáková et al., 2009). Zřetelně reliktní výskyty mimo hlavní areál druhu *C. varia* ale poskytují vhodné výchozí podmínky pro jeho fylogenetickou analýzu. Potenciálně zjištěná genetická struktura populací v jednotlivých částech současného areálu by mohla vnést nový pohled na časový průběh migrace a historické rozšíření druhu během postglaciálu a přinést tak nové informace k probíhající diskusi o vegetaci širší střední Evropy v tomto období.

3 Cíle práce

1. zjištění morfologické a genetické variability
2. srovnání variability v hlavní části areálu a v izolovaných areálech
3. nalezení potenciálních rozdílů mezi rostlinami z odlišných biotopů
4. srovnání analyzovaných znaků s *C. arundinacea*

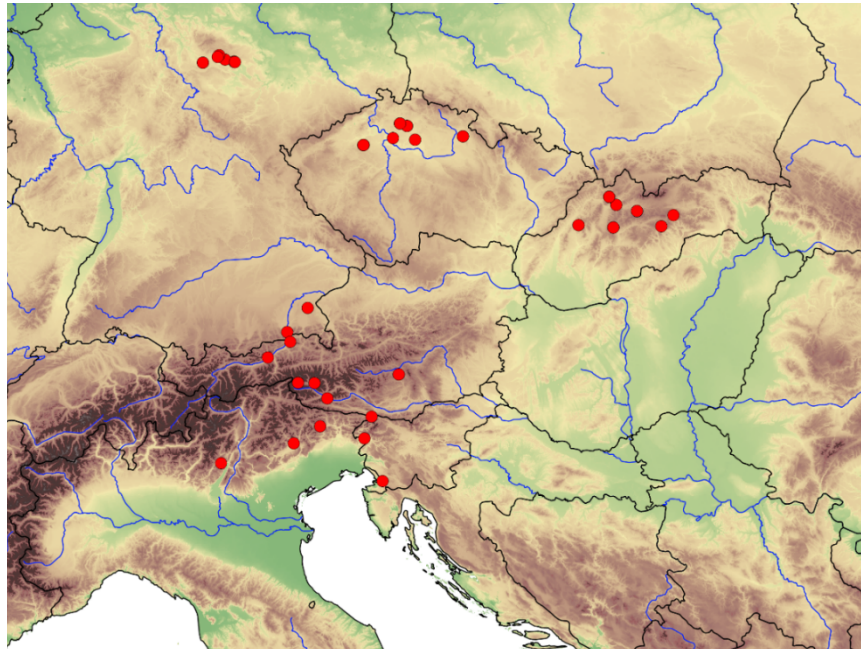
4 Materiál a metody

4.1 Sběr materiálu

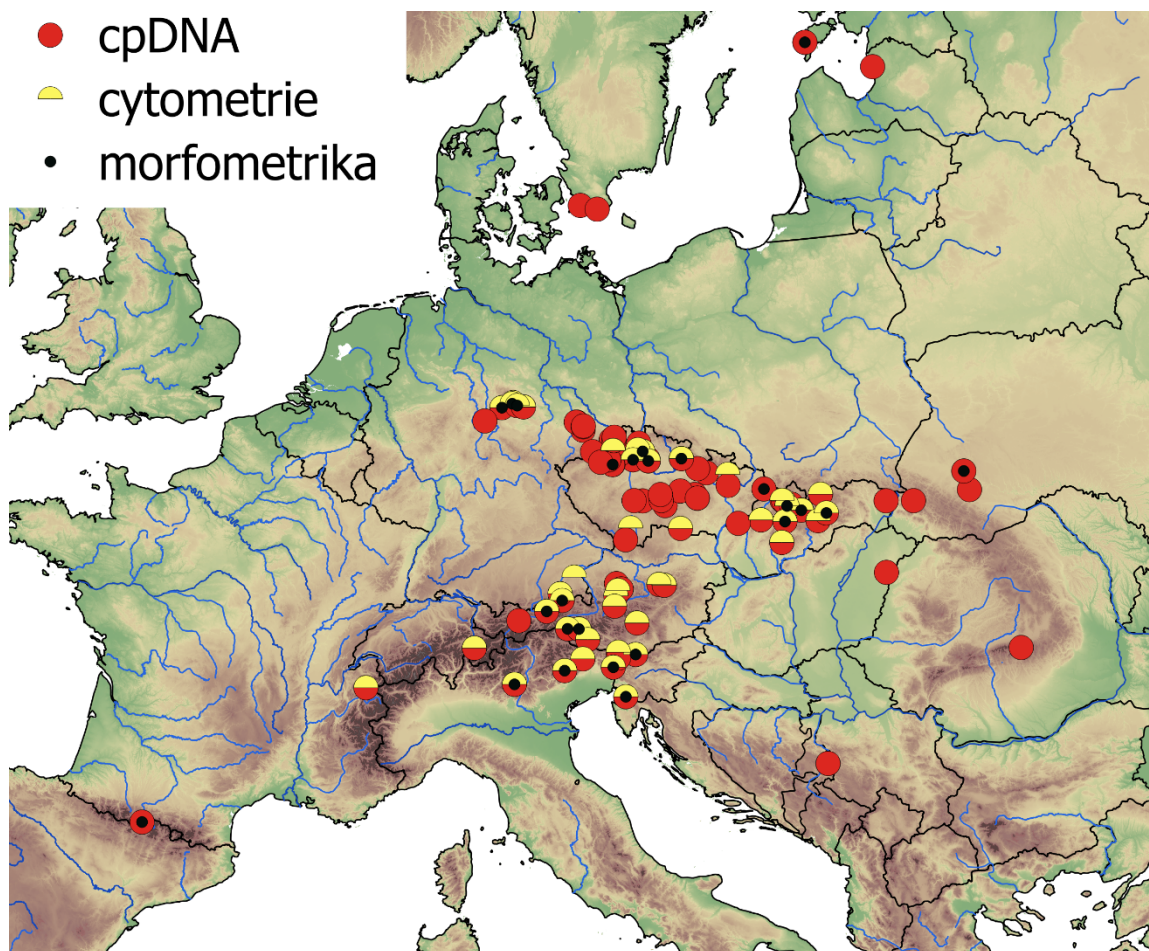
Byly vybrány čtyři geografické celky s doloženým výskytem druhu *Calamagrostis varia*, a to střední Německo, severní část Česka, střed Slovenska a východní část Alp. V každé oblasti byly v dostupných databázích vybrány výskyty druhu s uvedenými GPS souřadnicemi a podle nich naplánována cesta. V Česku patří taxon mezi kriticky ohrožené a vyhláškou 395/1992 Sb. chráněné (silně ohrožené) druhy, proto jsme nejprve získali od příslušných úřadů povolení ke sběru.

Sběr hlavní části vzorků probíhal v době květu a plodu, v červnu až září 2017. Na každé lokalitě bylo odebráno 10 fertálních lodyh vzdálených nejméně 3 metry od sebe, u menších populací byl počet rostlin úměrně snížen. Z každého jedince byl odebrán sterilní výhon na průtokovou cytometrii, pro izolaci DNA byla do silikagelu vložena čepel listu. Fertální lodyhy byly herbářovány, laty byly následně použity pro morfometrickou analýzu klásků.

Při průzkumu vybraných lokalit byly na několika místech odebrány i vzorky druhů *C. arundinacea* a *C. epigejos*. Celkem byl nasbírán materiál z 31 populací *C. varia*, 9 populací *C. arundinacea* a 11 populací *C. epigejos*. (Příloha V). Dokladové položky jsou uloženy v herbáři Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity (CBFS). Lokality byly zobrazeny na mapě v programu QGIS Desktop 2.18.11 (OSGeo, Beaverton, OR, USA) (Obr. 2). Další vzorky všech tří studovaných druhů a po jedné lokalitě druhů *C. brachytricha* a *C. purpurea* pocházely z dřívějších let nebo byly dodány jinými sběrateli, celkem ze 74 populací (Příloha VI). Celkové rozmístění všech populací s vyznačením metod použitých k jejich analýze je zobrazeno na Obr. 3.



Obr. 2: Lokality druhů *C. varia*, *C. arundinacea* a *C. epigejos* nasbírané v roce 2017.

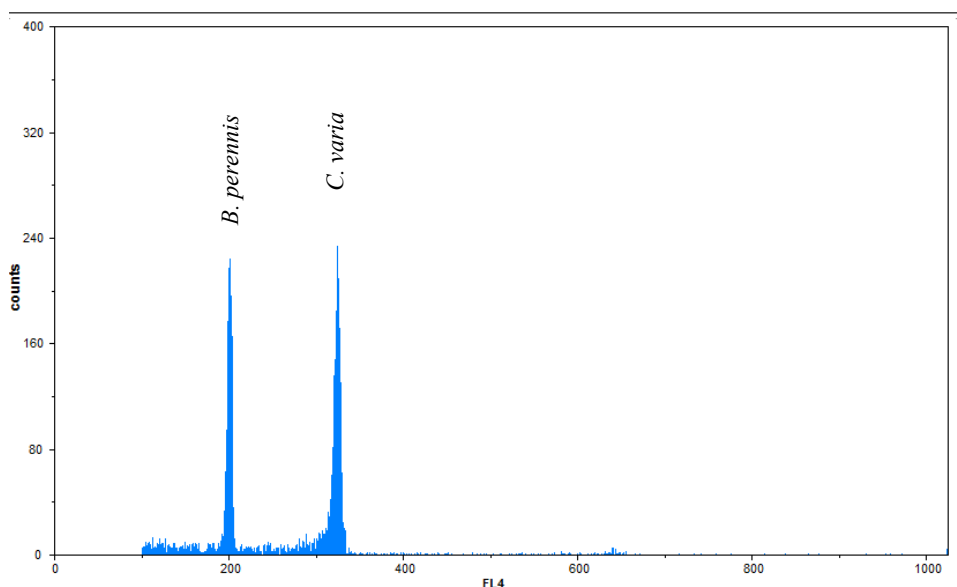


Obr. 3: Všechny studované lokality a na nich využívané metody.

4.2 Průtoková cytometrie

Ke studiu velikosti genomu byla měřena jeho relativní velikost pomocí barvení A-T specifickým barvivem DAPI na průtokovém cytometru Partec PA II (Partec GmbH, Germany). Příprava vzorku probíhala dvoustupňovou metodikou bez centrifugace s použitím „Otto pufrů“ (Otto, 1990; Doležel et al., 2007). Jako interní standard byl použit druh *Bellis perennis*, jehož velikost genomu $2C=3,62$ pg (Koutecký, unpubl.). Tato velikost byla zjištěna měřeními s barvením PI proti *Pisum sativum* „Ctirad“ o velikosti genomu $2C=9,09$ pg (Doležel et al., 1998) získanému z Laboratoře experimentální botaniky AVČR v Olomouci.

Příprava vzorku probíhala rozsekáním rostlinného materiálu žiletkou v Petriho misce s 400 μ l pufru Otto I (0,1 M kyselina citronová, 0,5% Tween 20) vychlazeného na ledu. Použito bylo cca 0,5 cm^2 listové čepele vzorku a cca čtvrtinové množství standardu. Suspenze byla několikrát promíchána pipetou se seříznutou špičkou a přefiltrována přes 42 μm filtr (textilie Uhelon 130T) do cytometrické zkumavky. Po ověření čistoty roztoku bylo přidáno 800 μ l barvicího roztoku, připraveného ze směsi pufru Otto II (0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 2-merkptoethanolu a A-T specifického fluorochromu DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ve výsledné koncentraci 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tento fluorochrom má excitační maximum při $\lambda = 358$ nm, byl proto využit cytometr Partec PA II (Partec GmbH, Germany) se rtuťovou výbojkou HBO 100. Standard byl nastaven na kanál 200 na 1024kanálové škále, měřeno bylo minimálně 3000 jader. Příklad histogramu cytometrické analýzy relativní velikosti genomu *C. varia* je zobrazen na Obr. 4.



Obr. 4: Histogram analýzy relativní velikosti genomu *C. varia* (vzorek Kals am Grossglockner 6).

Analýzy byly zpracovány v programu FlowJo (TreeStar, Inc., Oregon, USA), byl proveden gating částic a ručně vymezen rozsah fluorescenčních píků. Byly zjištěny hodnoty koeficientů variance (CV) píků standardů i vzorků a z dalších analýz vyloučena měření s $CV > 3$. Pro každý vzorek byl zjištěn poměr fluorescence vzorek/standard. Pro jednotlivé skupiny (zjištěné ploidní úrovně studovaných druhů) byly zjištěny minimální, průměrné a maximální hodnoty poměru fluorescence vzorek/standard, ze kterých byla vypočtena variabilita jako rozdíl maximální a minimální hodnoty vyjádřený jako procento minima. Obrazové výstupy byly vytvořeny pomocí uživatelské funkce (Koutecký, pers. comm.) v programu R (R Core Team, 2013) s využitím softwaru RStudio (verze 1.2.5019; RStudio, Inc.). Celkem bylo změřeno 267 vzorků ze 65 lokalit.

4.3 Morfologická analýza

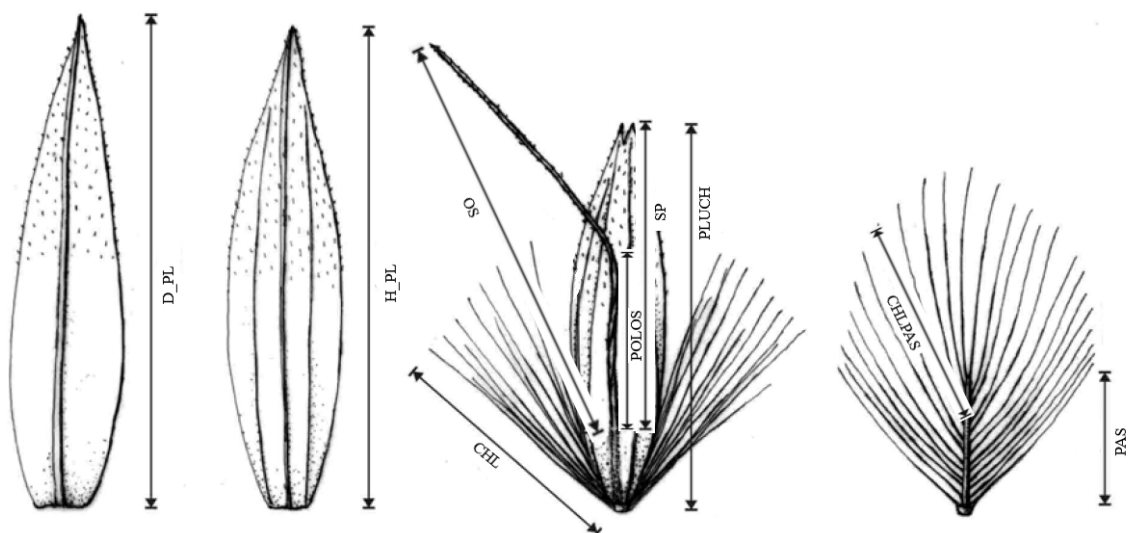
4.3.1 Výběr znaků a populací

K měření morfologických charakteristik bylo vybráno několik minuciézních znaků v kláscích (Tab. I). Vybrané znaky jsou považovány za determinaçní v urçovací literatuře (Conert, 1989; Fischer et al., 2008; Jäger, 2017; Kaplan et al., 2019). Vegetativní znaky byly záměrně vynechány z důvodu zásadního vlivu prostředí a velké fenotypové plasticity druhů. Sběry probíhaly v různých měsících, zeměpisných šířkách, nadmořských výškách, a tedy i různých fázích vegetaçní sezóny. Zároveň se velmi lišily podmínky na stanovištích, především vlhkost a zastínění. Proto by srovnávání populací na základě proměnlivých vegetativních znaků nebylo relevantní.

Byl proveden reprezentativní výběr 20 populací napříč areálem *Calamagrostis varia*. Pro srovnání byly naměřeny ještě rostliny z 5 populací druhu *C. arundinacea*. Z každé populace byly náhodně vybrány 3 rostliny, celkem bylo změřeno 74 rostlin z 25 populací (Obr. 3).

4.3.2 Měření

Z každé měřené rostliny byly odebrány 3 větve laty, a to z jejího nejspodnějšího a prostředního patra a z koncové části květenství. Z každé větve byl náhodně vybrán jeden klásek a měřen pod stereomikroskop při osminásobném zvětšení. Klásek byl vypreparován tak, aby na fotografii zachycené kamerou Lumenera® INFINITY (Roper Technologies, Inc.) bylo možné změřit vybrané znaky (Obr. 5). Samotné měření probíhalo v programu QuickPHOTO CAMERA (Promicra, s r.o.), jednotkou byly mikrometry (Příloha IV). Z jednotlivých měření byla vypočtena průměrná hodnota znaku pro celou rostlinu.



Obr. 5: Morfologické znaky vybrané pro analýzu. Převzato z práce Paszko (2008), upraveno.

Tab. I: Morfologické znaky měřené na rostlinách *Calamagrostis varia* a *C. arundinacea*.

Zkratka	popis znaku
D_PL	délka dolní plevy klásku
H_PL	délka horní plevy klásku
PLUCH	délka pluchy od báze po špičku
OS	délka osiny od místa nasednutí k pluše po špičku
POLOS	délka osiny od místa nasednutí k pluše po kolénko
SP	délka pluchy od místa nasednutí osiny ke špičce
CHL	délka nejdelších kalusových chlupů
PAS	délka pastopečky
CHLPAS	délka nejdelších chlupů na pastopečce

4.3.3 Analýza morfometrických dat

Analýza dat proběhla v programu R (R Core Team, 2013) s využitím softwaru RStudio (verze 1.2.5019; RStudio, Inc.). Při práci byl použit balíček funkcí pro analýzu morfometrických dat MorphoTools (Koutecký, 2015). Byly vypočteny základní popisné statistiky a testováno normální rozdělení dat, použit byl Shapiro-Wilkův test. U znaků, které se nejvíce odchylovaly od normálního rozdělení, byla provedena transformace dat dekadickým logaritmem. Transformace proběhla u pěti znaků: PLUCH, OS, POLOS, SP a CHLPAS.

Pro zjištění korelace znaků byly vypočteny Pearsonovy korelační koeficienty. V samostatné analýze zástupců *C. varia* měly všechny znaky korelační koeficient $< 0,95$, proto byly všechny

použity i v dalších statistických metodách. Ve společné analýze obou studovaných druhů, *C. varia* a *C. arundinacea*, byl vyřazen znak HPL z důvodu silné korelace se znakem DPL (korelační koeficient = 0,96) (Tab. II).

Tab. II: Pearsonovy korelační koeficienty morfologických znaků druhů *C. arundinacea* a *C. varia*. Znak s koeficientem > 0,95 je vyznačen tučně.

Pearson	dpl	hpl	log_uch	log_os	log_polos	log_sp	chl	pas	log_chlpas
dpl	1	0,960	0,868	0,771	0,758	0,796	-0,390	0,168	-0,356
hpl	0,960	1	0,887	0,763	0,760	0,806	-0,374	0,183	-0,375
log_uch	0,868	0,887	1	0,728	0,772	0,913	-0,289	0,213	-0,231
log_os	0,771	0,763	0,728	1	0,885	0,793	-0,652	-0,072	-0,640
log_polos	0,758	0,760	0,772	0,885	1	0,863	-0,475	0,051	-0,491
log_sp	0,796	0,806	0,913	0,793	0,863	1	-0,344	0,135	-0,322
chl	-0,390	-0,374	-0,289	-0,652	-0,475	-0,344	1	0,331	0,860
pas	0,168	0,183	0,213	-0,072	0,051	0,135	0,331	1	0,389
log_chlpas	-0,356	-0,375	-0,231	-0,640	-0,491	-0,322	0,860	0,389	1

Byla provedena shluková analýza Wardovou metodou pro všechny naměřené rostliny obou studovaných druhů. Analýzy byly provedeny i pro oba studované druhy jednotlivě, žádná struktura však zjištěna nebyla, proto nejsou zahrnuty ve výsledcích. Stejným způsobem byla provedena analýza hlavních komponent, PCA. Ordinační diagramy společné analýzy zobrazují příslušnost vzorků k druhu, diagramy analýz jednotlivých druhů zobrazují příslušnost ke geografickým celkům podle místa sběru.

Pomocí kanonické diskriminační analýzy byly zjištěny nejvýznamnější znaky odlišující druhy *C. arundinacea* a *C. varia*. Byl nastaven postupný výběr (forward selection) jednotlivých znaků, počet permutací byl nastaven na 1000. Byl vytvořen histogram znázorňující kanonické skóre obou analyzovaných druhů. Byla provedena klasifikační diskriminační analýza na základě příslušnosti k druhu a připraven odpovídající grafický výstup.

4.4 Molekulární metody

Ke studiu molekulárních markerů byla zvolena metoda sekvenace úseků chloroplastové DNA (cpDNA). Vybrány byly dva nekódující úseky, psbA-trnH^{GUG} a psbK-trnS^{GCU}, které byly úspěšně využity při několika dřívějších studiích provedených na třtinách (Schaabová, 2013,

2015; Piherová, 2016). Počet vzorků na populaci byl 1–5, celkem bylo zanalyzováno 167 rostlin z 95 populací (Obr. 3).

Při průběžných analýzách jevíly sekvence relativně nízkou míru variability, proto byly na základě studií o variabilitě jednotlivých úseků cpDNA a jejich vhodnosti při studiích blíže příbuzných taxonů z různých systematických skupin vybrány další tři úseky cpDNA, rpl32F-trnL^{UAG}, ndhC-trnV^{UAC} (Shaw et al., 2007) a ndhF-rpl32 (Shaw et al., 2014). Sekvence ze sedmi lokalit napříč areálem *C. varia* však vykazovaly spíše nižší míru variability než již osekvenované úseky, proto nebyly aplikovány na všechny analyzované vzorky a nejsou zahrnuty ve výsledcích. Tabulka III zobrazuje sekvence primerů a citace původní publikace.

Tab. III: Primery analyzovaných úseků cpDNA a jejich literární zdroje.

primer	sekvence primeru 5'-3'	zdroj
psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang et al., 1997
trnH ^{GUG}	CGCGCATGGTGGATTACACAATCC	
psbK	TGTTTGGCAAGCTGCTGTAA	Ebert et Peakall, 2009
trnS ^{GCU}	GGGTTCGAATCCCTCTCTTT	
rpl32F	CAGTTCCAAAAAACGTAATTC	Shaw et al., 2007
trnL ^{UAG}	CTGCTTCTTAAGAGCAGCGT	
ndhC	TATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCTATTC	Shaw et al., 2007
trnV ^{UAC}	GTCTACGGTTCGARTCCGTA	
ndhF	AAGAGGGATTACCCATGCATATT	Shaw et al., 2014
rpl32	AAAATAAGTCTTTTTCTTCCAA	

4.4.1 Izolace DNA

K izolaci DNA byly využity celkem tři metody, všechny úspěšně.

Izolace s využitím NaOH

Časově nejméně náročná a zároveň nejlevnější z použitých metod je izolace DNA s využitím NaOH. Výsledkem je denaturovaná DNA, proto tato metoda není vhodná pro složitější genetické metody jako AFLP. Pro účely PCR se ale ukázala zcela dostatečná. Do zkumavky byl vložen cca 0,5 cm² velký kousek listové čepele vysušené v silikagelu spolu s malým

množstvím sterilního písku. Bylo přidáno 20 μl 0,5M NaOH a homogenizačním tloučkem byl materiál rozmělněn. Byl přidán stejný objem 0,5M NaOH a pokračovalo se v homogenizaci materiálu. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 2 minut při 13 000 rpm. Do PCR stripu bylo napipetováno 20 μl 100mM Tris-HCl, pH 8,3 a přidáno 2 μl supernatantu ze zkumavky se vzorkem. Takto připravené izoláty byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Izolace metodou CTAB

Z listových čepelí vysušených v silikagelu bylo odebráno ca 0,5 cm^2 a spolu se čtyřmi wolframkarbidovými kuličkami byl materiál vložen do mikrozukavky typu Eppendorf o objemu 2 ml. Rozdrcení rostlinného materiálu bylo provedeno v mlýnku Retsch MM400 (frekvence 30 s^{-1} , po dobu 5–10 minut). V digestoři bylo k materiálu přidáno 700 μl CTAB pufru a 10 μl 2-mercaptoethanolu. Promíchané vzorky byly umístěny do třepačky a inkubovány při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 1 minuty ve stolní centrifuze. Supernatant byl přenesen do čistých mikrozukavek a v digestoři k němu bylo přidáno 500 μl směsi chloroform : isoamyl alkohol (24:1). Po inkubaci v pokojové teplotě po dobu 5 minut byl vzorek centrifugován po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Horní vodní fáze byla přenesena do čistých 1,5 ml mikrozukavek a bylo přidáno 500 μl ledově vychlazeného isopropanolu. Zkumavky byly několikrát převráceny a inkubovány po dobu 30 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly centrifugovány po dobu 5 minut při 13 000 rpm. V digestoři byl odsán veškerý supernatant, v mikrozukavce zůstal jen DNA pelet. Bylo přidáno 400 μl ledově vychlazeného 96% ethanolu. Proběhla další inkubace po dobu 15 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, po ní centrifugace po dobu 5 minut při 13 000 rpm. Byl odsán supernatant, v mikrozukavce zůstal jen DNA pelet. Bylo přidáno 200 μl ledově vychlazeného 70% ethanolu a protřepáním byl uvolněn pelet ze dna mikrozukavky. Po inkubaci po dobu 5 minut při pokojové teplotě byl vzorek centrifugován po dobu 5 minut při 13 000 rpm. Byl odsán supernatant a otevřené mikrozukavky s DNA peletem se nechaly vysychat 15 minut při pokojové teplotě. Bylo přidáno 30 μl TE pufru a DNA pelet se nechal rozpustit přes noc v lednici. Takto získaný izolát byl uložen do mrazáku a skladován při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Izolace komerčním kitem

Jako poslední metoda izolace byl využit komerční kit Macherey Nagel NucleoSpin Plant II Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co). Do zkumavky s rozdrceným rostlinným materiálem (viz Izolace metodou CTAB) byl přidán lyzační pufr PL1 v objemu 400 μl a obsah byl inkubován po dobu 10 minut při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzniklý lyzát byl přefiltrován přes NucleoSpin

Filter centrifugací při 12 000 rpm po dobu 2 minut. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky, kde byl smíchán se 450 μ l PC pufru. Vzniklý vzorek byl po 600 μ l krocích přenesen na NucleoSpin Plant II kolonku, kde se při centrifugaci po dobu 1 minuty zachytila DNA na membránu. Následovalo přečištění promývacími pufrů, 400 μ l PW1, 650 μ l a 200 μ l PW2, vždy s centrifugací po dobu 1 minuty s vylitím obsahu zkumavky mezi jednotlivými kroky. Kolonka byla přenesena do čisté safe-lock zkumavky a na membránu bylo nanášeno 50 μ l elučního pufru PE předeřátého na 65 °C. Proběhla inkubace po dobu 5 minut při 65 °C a následná centrifugace při 12 000 rpm po dobu 1 minuty. Získaný izolát byl uložen do mrazáku a skladován při teplotě -20 °C.

4.4.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce byla připravována v objemu 10 μ l. Obsahovala 5 μ l Plain PP Master Mixu (Top-Bio, ČR), forward a reverse primer ve finální koncentraci 0,3 μ M a 0,4 μ l DNA vzorku. Zbývající objem byl doplněn PCR vodou. Každý probíhající PCR cyklus obsahoval i kontrolní vzorek bez DNA. Amplifikace probíhala v termocycleru 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 IV.

Úspěšnost reakce a kvalita PCR produktů byly zkontrolovány metodou elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu v TBE pufru. Byly smíchány 2 μ l produktu s 0,8 μ l nanášecího pufru obsahujícího fluorescenční barvivo GEL RED na mikrotitrační destičce. Vzniklá směs byla pipetou nanášena do jamek gelu, jako velikostní standard byl použit 100bp ladder (5 μ l). Elektroforéza probíhala při 140 V, výsledek byl ověřen vložím gelu do komory UV transiluminátoru a vyhodnocen v programu Scion VisiCapture (Scion Corporation, USA). Byla zkontrolována čistota kontrolního vzorku.

4.4.3 Sekvenace

K přečištění PCR produktů byla použita dvojice enzymů, tzv. Exo-AP. Exonukleáza I štěpí jednovláknovou DNA (nepřisedlé primery), AP (Fast Alkaline Phosphatase) odstraňuje neinkorporované dNTP. Směs ve složení 1 μ l produktu a 0,5 μ l Exo-AP byla promíchána v mikrozkušavce a stočena na stolní centrifuze. Aktivace a následná degradace enzymů proběhla v termocycleru, 15 minut při teplotě 37 °C a 15 minut při teplotě 85 °C.

Tab. IV: Reakční podmínky pro PCR analyzovaných úseků cpDNA.

úsek DNA	teplota (°C)	doba trvání (s)	počet cyklů
psbA-trnH ^{GUG}	94	300	-
	94	30	40
	57	30	
	72	60	
	72	600	-
psbK-trnS ^{GCU}	94	180	-
	94	30	12
	66 (1,5)*	30	
	72	45	
	94	30	30
	47	30	
	72	45	
	72	600	-
rpl32F- trnL ^{UAG}	95	180	-
	95	45	35
	54	60	
	65	120	
	72	600	-
ndhC-trnV ^{UAC} ndhF-rpl32	80	300	-
	95	60	30
	50 (0,3 °C/s)**	60	
	65	240	
	65	300	-

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

**tzv. ramp rate, udává rychlost snižování teploty

Sekvenační reakce byly míchány podle požadavků společnosti, která sekvenování provedla. Využity byly dvě společnosti, SEQme s.r.o. (Seq & QPCR Company, CZ) a GATC Biotech (GATC Biotech AG, Germany). Požadovaná finální koncentrace primeru je 25 pmol, optimální množství DNA zhruba 100 ng. Objem přidaného vzorku tedy závisel na koncentraci DNA v produktu, která byla odhadnuta na základě intenzity fluorescence proužku na gelu elektroforézy. Zbývající objem požadované 10 µl reakce byl doplněn PCR vodou a vzorek odeslán ke zpracování.

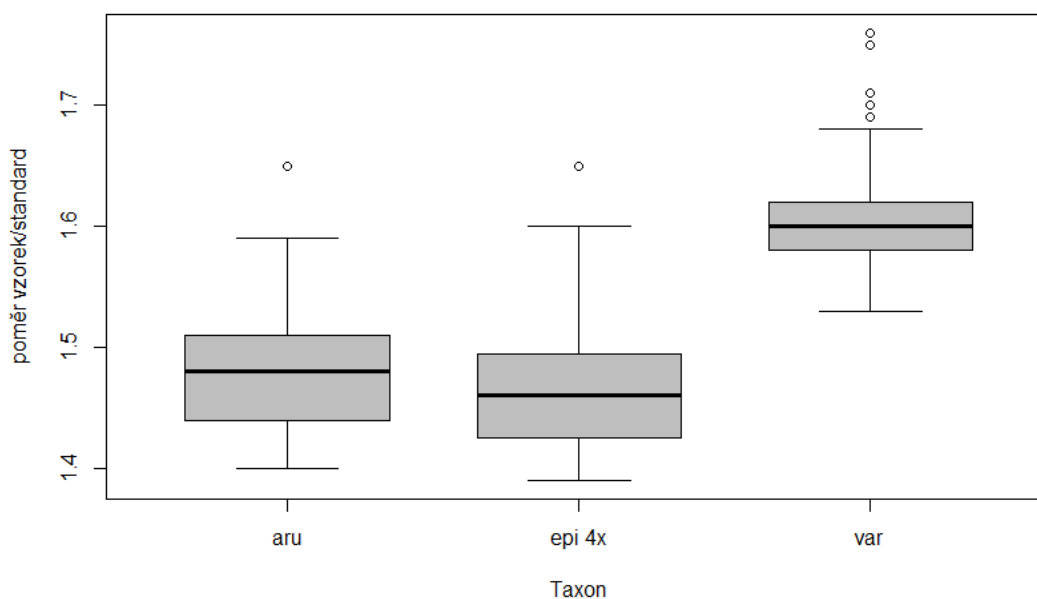
Získané sekvence byly editovány v programu Geneious Prime 2020.0.4 (Biomatters Ltd.). Alignment sekvencí byl proveden ve stejném programu, trimming a další úpravy v programu BioEdit version 7.2.5. (Hall, 1999). Pro účely vytvoření haplotypů byl jediný odhalený inverzní úsek kódován jako jedna substituce a inserce a delece nebyly zohledněny. Soubory z formátu fasta do formátu nexus byly převedeny pomocí Sequence conversion (www.bugaco.com). Haplotypové sítě byly vytvořeny v programu PopART version 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) metodou TCS network (Clement et al., 2002), mapy výskytu zjištěných haplotypů v programu QGIS Desktop 2.18.11 (OSGeo, Beaverton, OR, USA).

Veškerá primární data (morfometrická měření, cytometrické analýzy, sekvence studovaných úseků) jsou k dispozici u autorky práce, na dotaz na e-mailové adrese j.pihherka@gmail.com.

5 Výsledky

5.1 Průtoková cytometrie

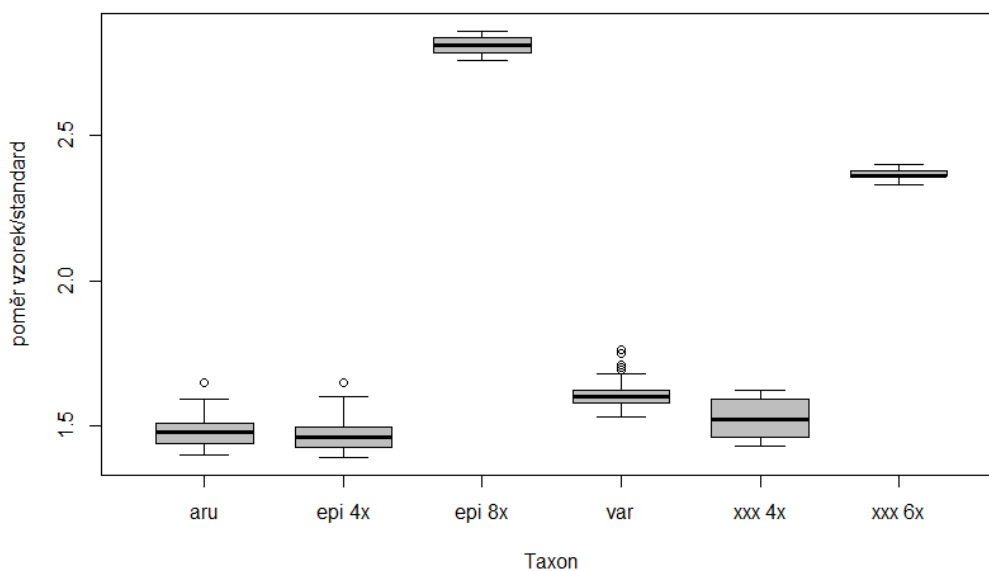
Analýza DNA ploidní úrovně 267 vzorků potvrdila tetraploidní úroveň studovaného druhu *C. varia*. Pouze tetraploidní úroveň vykazoval i další analyzovaný druh, *C. arundinacea*. Většina jedinců třetího druhu, *C. epigejos*, byla také tetraploidní, 4 jedinci ze 2 populací odpovídali oktaploidní úrovni. Velikost genomu jedinců tří studovaných druhů s tetraploidní úrovní jsou znázorněny v box a whisker plotu na Obrázku 6. Bylo zjištěno, že relativní velikost genomu *C. arundinacea* a *C. epigejos* se neliší ($df = 50$, $p = 0,36$). Relativní velikost genomu *C. varia* je větší než relativní velikost genomu *C. arundinacea* a *C. epigejos* ($df = 212$, $p = 9 \times 10^{-12}$, resp. $df = 209$, $p = 5 \times 10^{-11}$).



Obr. 6: Relativní velikost genomu tetraploidní úrovně tří studovaných druhů.

Neočekávanou variabilitu měly analýzy populace na Milešovce v Českém středohoří. Jedinci sbíraní na této lokalitě v pozdní fázi vegetační sezóny se podobali druhu *C. varia*, někteří ale byli morfologicky odlišní. Cytometrická analýza u nich odhalila dvě DNA ploidní úrovně, tetraploidní a hexaploidní. Proto jsou ve výsledcích označeny jako xxx 4x, resp. xxx 6x. Tetraploidní úroveň vykazovala nižší hodnoty velikosti genomu než ostatní populace *C. varia*, ale zároveň vyšší hodnoty než u *C. arundinacea* a *C. epigejos*. Hexaploidní úroveň u *C. varia*

není známa, na území Česka se tato DNA ploidní úroveň objevuje pouze u jediného druhu, *C. rivalis* (Piherová, 2016). Graficky je relativní velikost genomu studovaných skupin znázorněna v box and whisker plotu na Obrázku 7.



Obr. 7: Relativní velikost genomu všech měřených vzorků.

Výsledky měření relativní velikosti genomu včetně variability a průměru koeficientů variance (CV) jsou zaznamenány v Tabulce V.

Tab. V: Analýza relativní velikosti genomu všech měřených vzorků.

DAPI	aru	epi 4x	epi 8x	var	xxx 4x	xxx 6x
Poměr průměr	1,48	1,47	2,81	1,61	1,53	2,37
Poměr min	1,40	1,39	2,76	1,53	1,43	2,33
Poměr max	1,65	1,65	2,86	1,76	1,62	2,40
Variabilita (%)	17,86	18,71	3,62	15,03	13,29	3,00
Vzorek - CV mean	2,27	2,08	1,88	2,15	1,87	1,68
Standard - CV mean	2,35	2,17	2,37	2,08	2,12	2,26
Počet měření	27	24	4	186	13	13

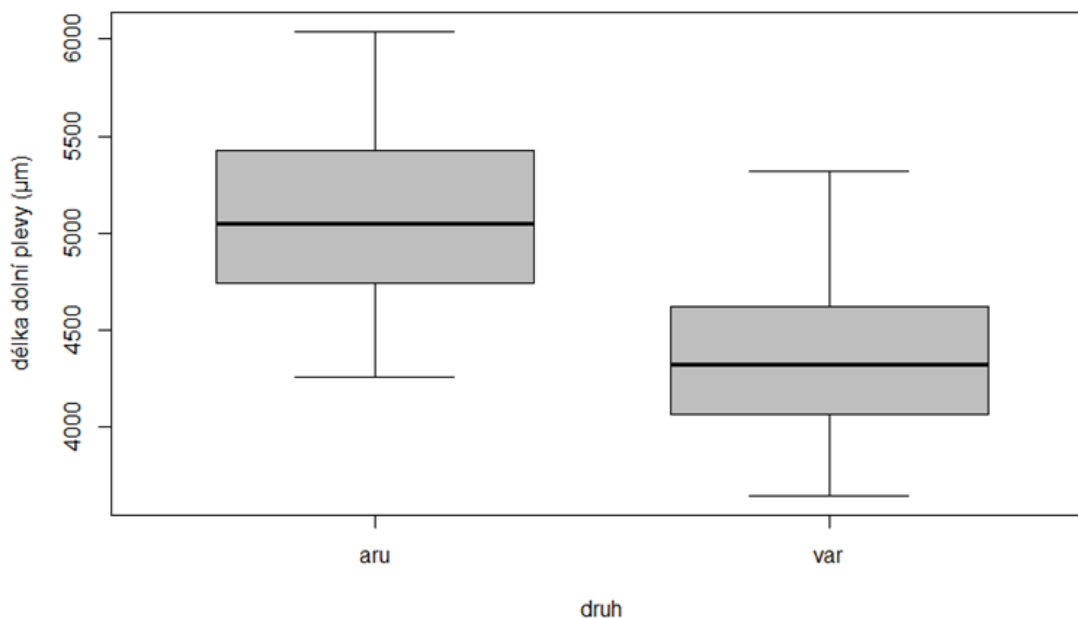
5.2 Morfologická analýza

5.2.1 Popisné statistiky

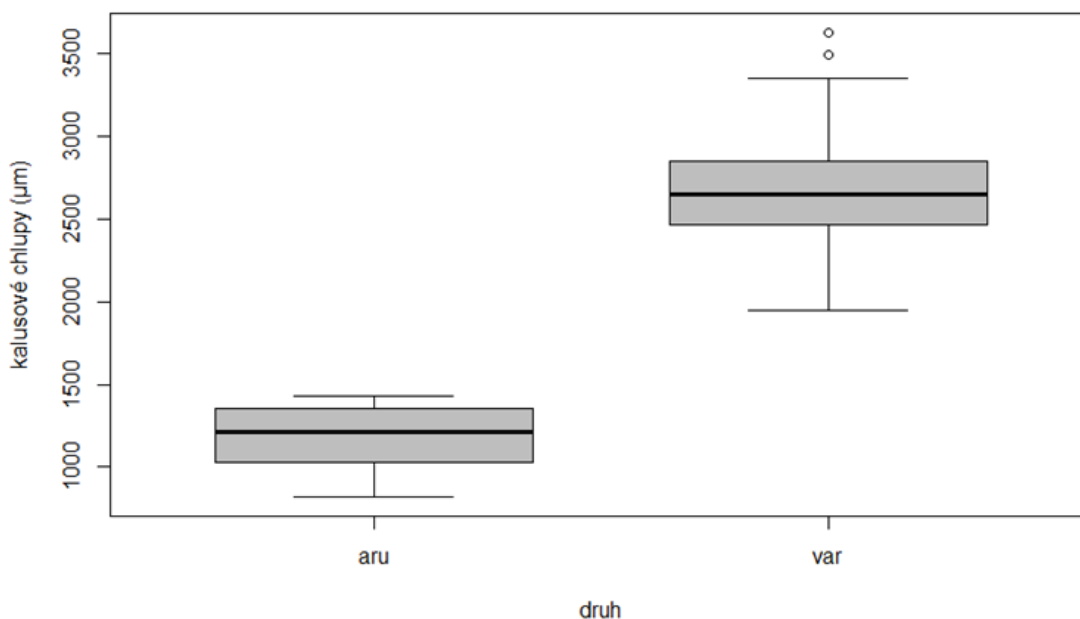
Průměrné hodnoty naměřených znaků na 14 rostlinách *C. arundinacea* a 60 rostlinách *C. varia* jsou zobrazeny v Tabulce VI. Všechny měřené znaky byly mezi druhy signifikantně rozdílné. Ve výsledcích byly pozorovány dva trendy. Části klásku související s jeho celkovou velikostí (délka dolní i horní plevy a pluchy) byly větší u druhu *C. arundinacea* (Obr. 8). Podobně to bylo s délkou osiny, délkou osiny od báze ke kolénku a délkou pluchy od místa nasednutí osiny ke špičce. Druhým trendem byly delší chlupy u druhu *C. varia*, a to jak chlupy kalusové, tak chlupy pastopečky (Obr. 9). I samotná pastopečka byla delší u druhu *C. varia*, rozdíl ovšem nebyl tak výrazný jako u ostatních dvou znaků v této skupině.

Tab. VI: Průměrné hodnoty morfologických znaků pro *C. arundinacea* a *C. varia* (μm).

znak	D_PL	H_PL	PLUCH	OS	POLOS	SP	CHL	PAS	CHLPAS
aru	5087	4853	3928	5997	2314	3275	1174	1027	1286
var	4357	4160	3438	3746	1560	2746	2692	1215	2263



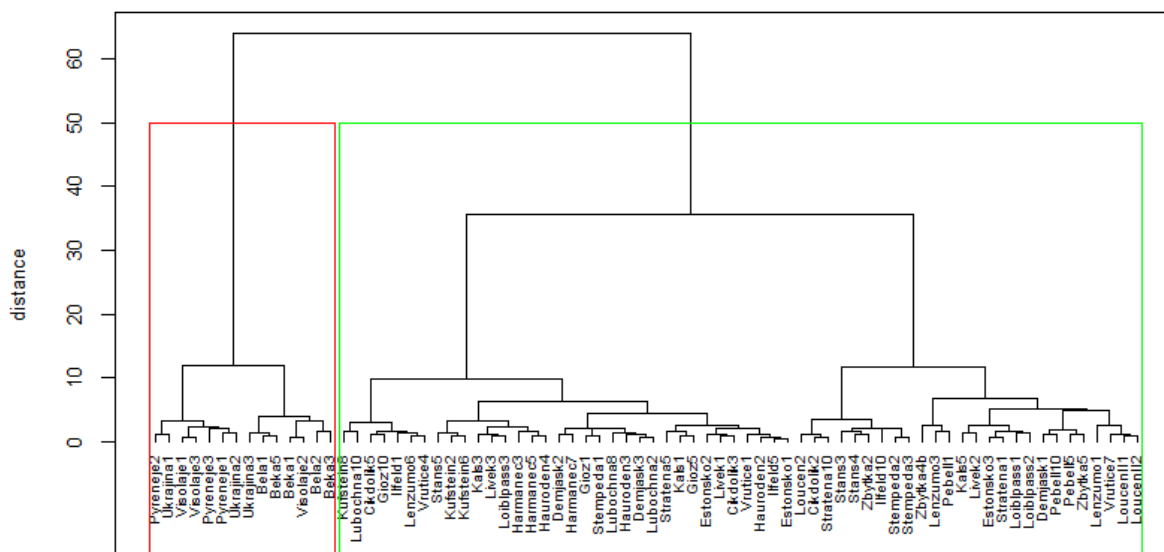
Obr. 8: Délka dolní plevy u druhů *C. arundinacea* a *C. varia*.



Obr. 9: Délka kalusových chlupů u druhů *C. arundinacea* a *C. varia*.

5.2.2 Shluková analýza

Shluková analýza Wardovou metodou byla provedena na všech měřených rostlinách i na zástupcích obou měřených druhů zvlášť. V celkové analýze se oddělili zástupci druhů do jednoznačně oddělených klastrů (Obr. 10). V rámci druhu *C. varia* se vytvořily další clustery, jedinci z jednotlivých populací se ale rozdělili do obou větví. Struktura na úrovni druhu tedy nemá smysluplnou interpretaci.

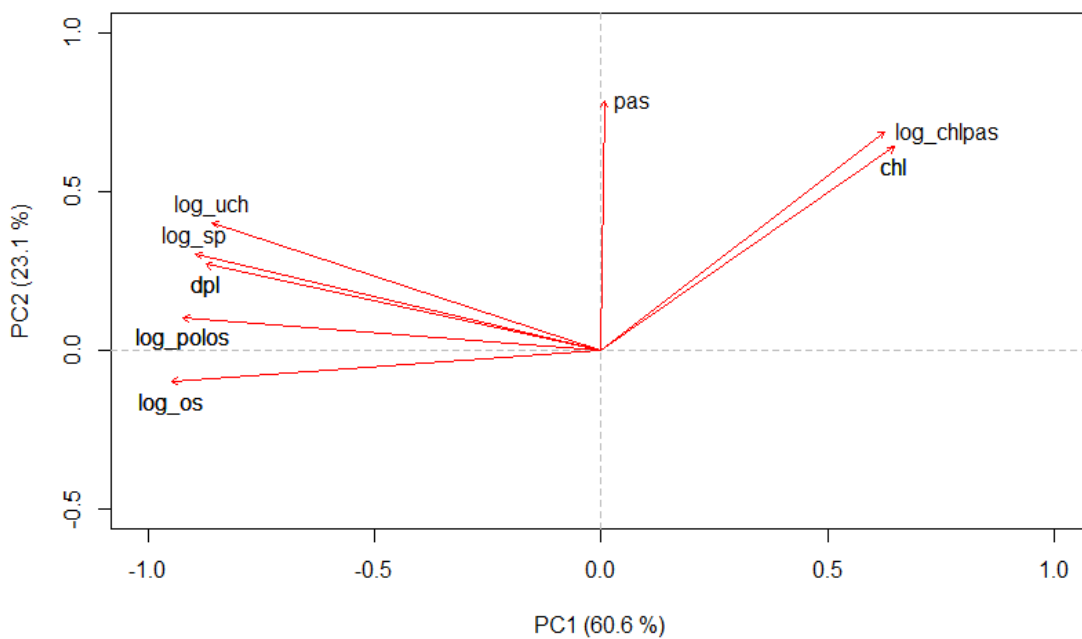
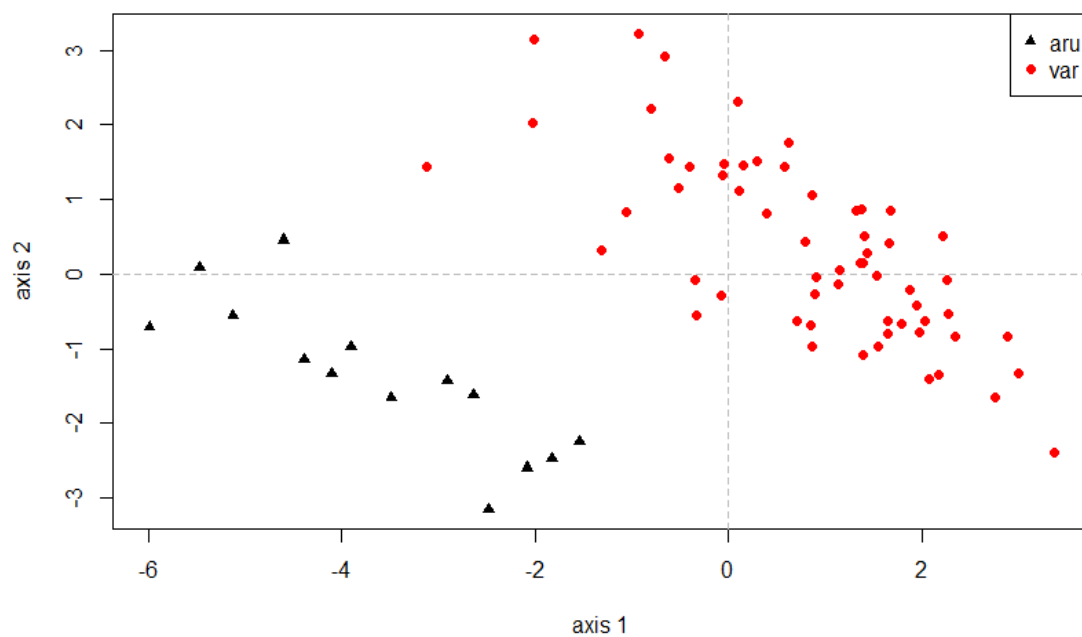


Obr. 10: Shluková analýza Wardovou metodou všech studovaných rostlin. Červeně je označen klastř jedinců *C. arundinacea*, zeleně klastř jedinců *C. varia*.

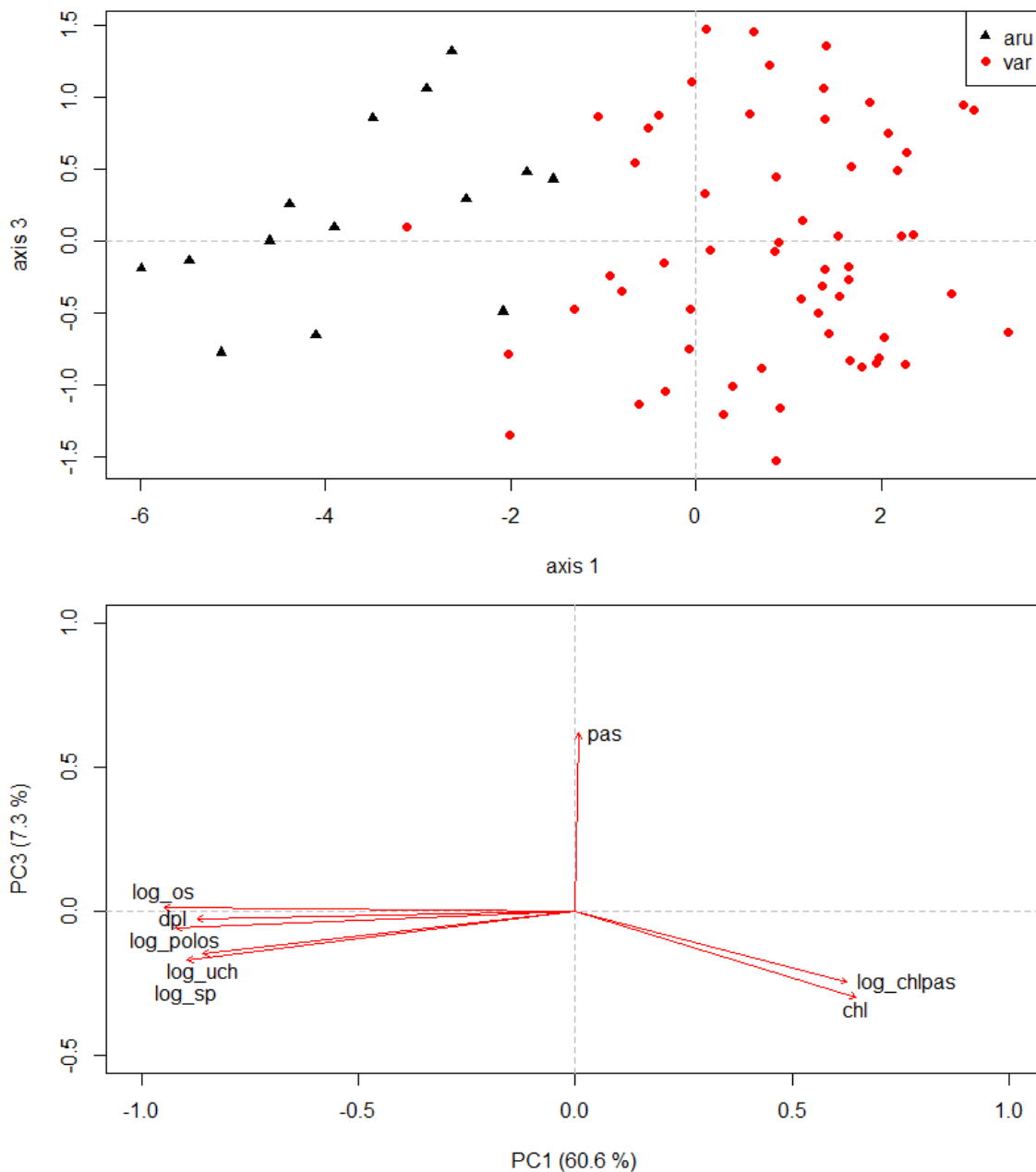
5.2.3 Analýza hlavních komponent (PCA)

Pro analýzu hlavních komponent byla nejprve provedena transformace znaků, které měly největší odchylku od normálního rozdělení podle Shapiro-Wilkova testu. Byla zvolena transformace dekadickým logaritmem. Transformované znaky jsou v následujících PCA diagramech označeny jako log_uch, log_os, log_polos, log_sp a log_chlpas.

Byla provedena PCA na datasetu všech 74 naměřených rostlin, příslušnost k druhu *C. arundinacea* nebo *C. varia* byla ve výsledné analýze zobrazena odlišným symbolem. Obě skupiny se oddělily na diagramu ordinačních os 1 a 2 (Obr. 11) i na diagramu ordinačních os 1 a 3 (Obr. 12). První osa vysvětlila 60,6 % variability, druhá osa 23,1 % a třetí osa 7,3 % variability (celkem 91 % variability). S první osou negativně korelovaly znaky související především s celkovou velikostí klásku a délkou osiny, tedy D_PL, PLUCH, OS, POLOS a SP. Z této analýzy byl vyřazen znak H_PL (viz Metody). Naopak pozitivně byly s první osou korelovány znaky CHL a CHLPAS. S druhou a třetí osou pozitivně koreloval znak PAS. Tato skutečnost odpovídá dvěma zmiňovaným trendům ve výsledcích popisných statistik.

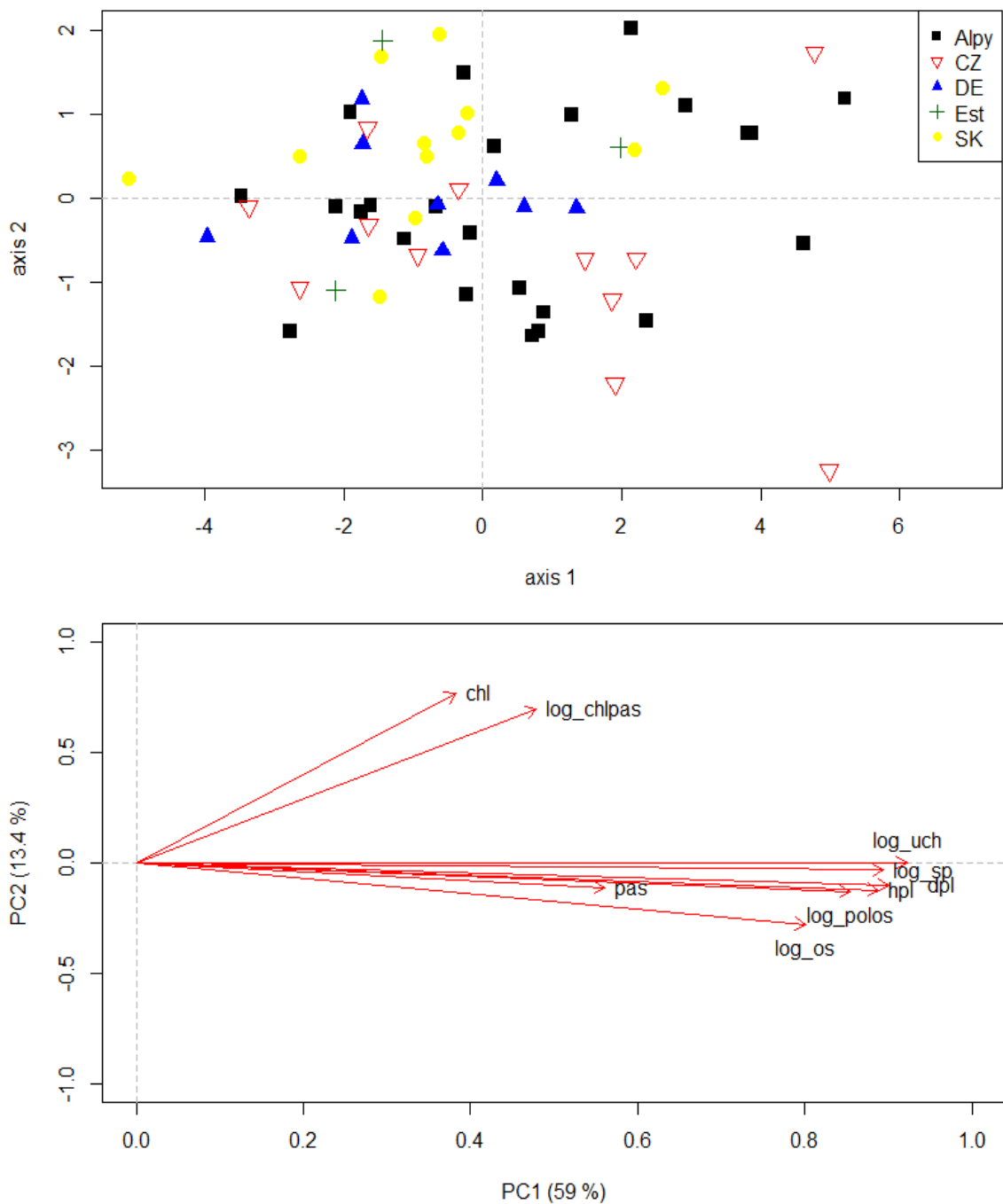


Obr. 11: Ordinační diagram PCA osy 1 a 2, označení jedinců podle příslušnosti k druhu. Korelace znaků s osami, procento variability vysvětlené příslušnou ordinační osou.

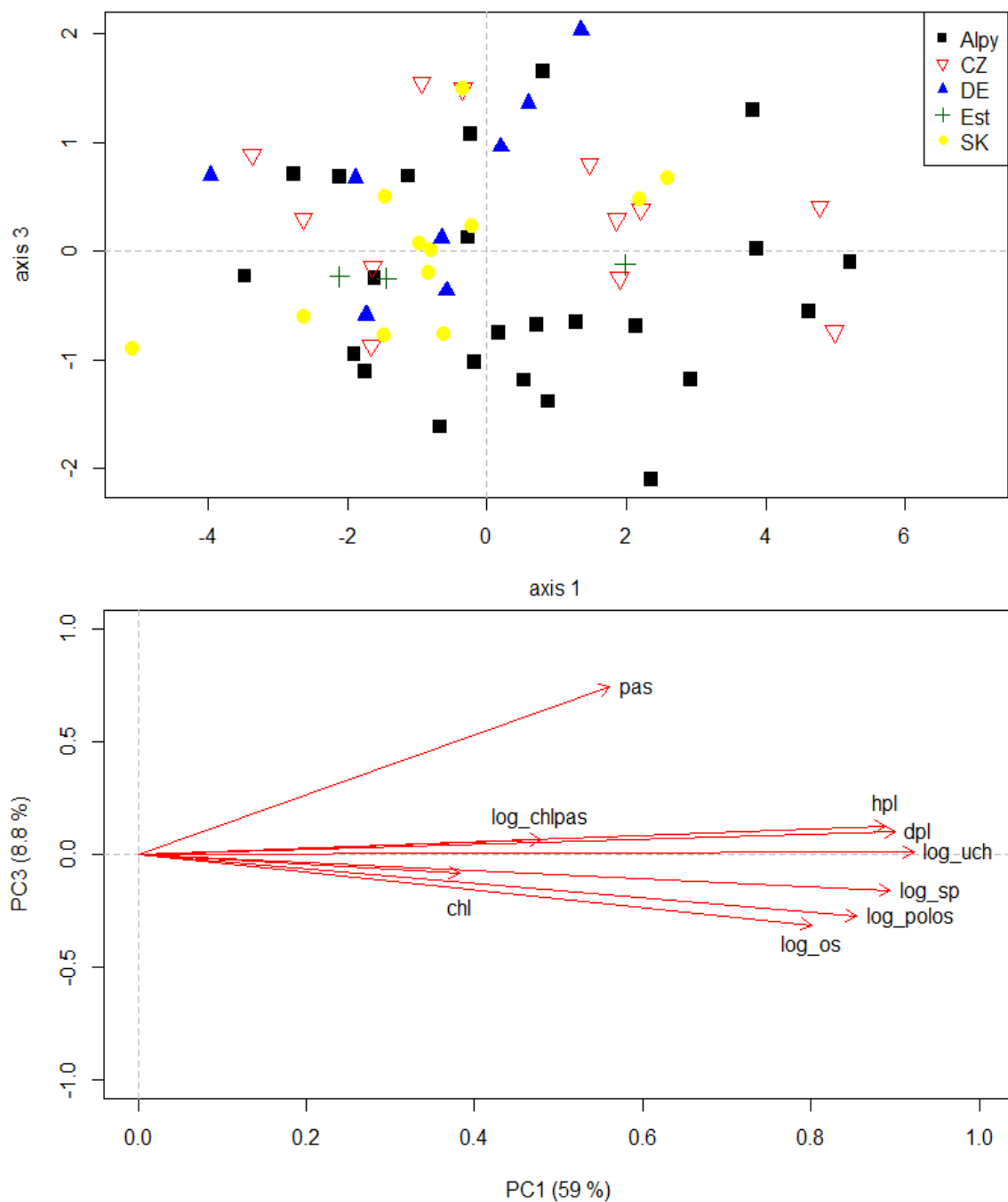


Obr. 12: Ordinační diagram PCA osy 1 a 3, označení jedinců podle příslušnosti k druhu. Korelace znaků s osami, procento variability vysvětlené příslušnou ordinační osou.

Analýza PCA provedená jen na 60 rostlinách druhu *C. varia* neukázala žádnou strukturu podle geografické oblasti místa sběru (Obr. 13 a 14). První ordinační osa vysvětlila 59 %, druhá osa 13,4 % a třetí osa 8,8 % variability (celkem 81,2 % variability). Jedinci se rozdělili hlavně podle gradientu velikosti klásku, čemuž odpovídá i silná pozitivní korelace většiny znaků s první ordinační osou. Částečně s druhou osou korelovaly znaky CHL a CHLPAS, částečně s třetí osou koreloval znak PAS (všechny pozitivně).



Obr. 13: Ordinační diagram PCA osy 1 a 2, označení jedinců *C. varia* podle geografické oblasti místa sběru. Korelace znaků s osami, procento variability vysvětlené příslušnou ordinační osou.

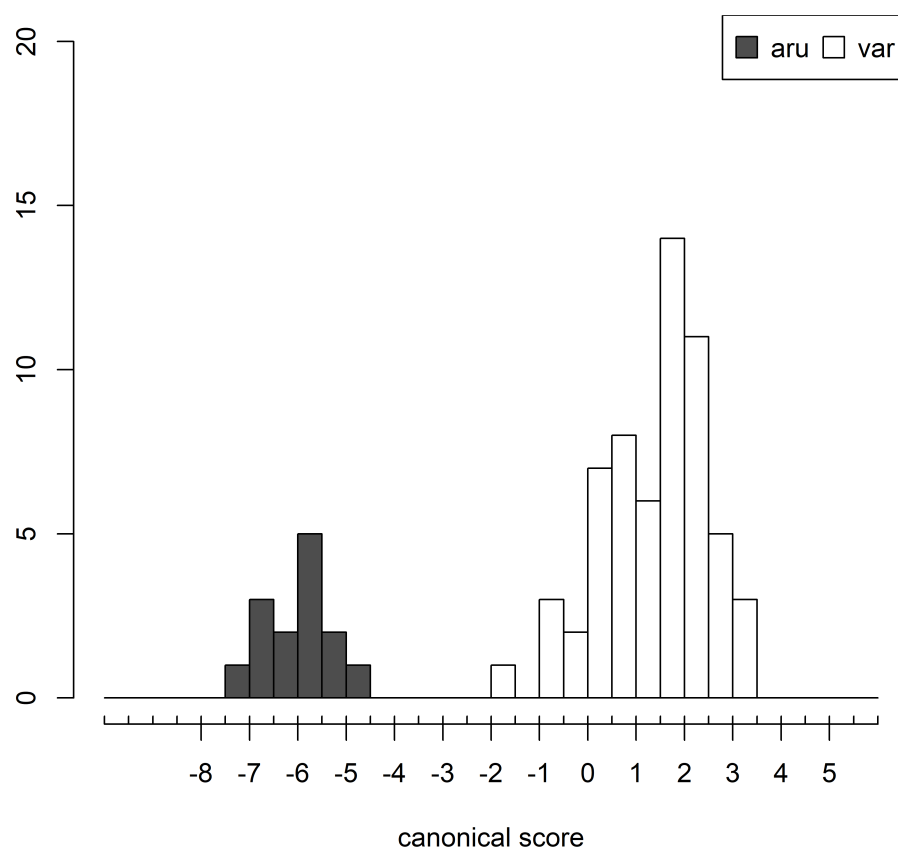


Obr. 14: Ordinační diagram PCA osy 1 a 3, označení jedinců *C. varia* podle geografické oblasti místa sběru. Korelace znaků s osami, procento variability vysvětlené příslušnou ordinační osou.

Analýza PCA provedená pouze na 14 rostlinách druhu *C. arundinacea* také neukázala žádnou strukturu, korelace znaků s osami měla velmi podobné rozložení jako u druhu *C. varia*. Výsledky zde nejsou prezentovány, jelikož nejsou pro téma týkající se druhu *C. varia* podstatné a počet vzorků není pro relevantní samostatnou analýzu tohoto druhu dostatečný.

5.2.4 Kanonická diskriminační analýza (CDA)

Výsledek kanonické diskriminační analýzy jedinců je na obrázku 15. Jedinci obou druhů se oddělily do dvou zřetelných skupin bez jakéhokoliv překryvu. Kanonický korelační koeficient první ordinační osy je 0,881, druhá mocnina má hodnotu 0,776. Tato hodnota bývá považována za podíl variability hodnot diskriminační funkce vysvětlený rozdělením objektů do skupin (Koutecký, 2008). Analýza CDA také odhalila znaky, které přispívají na 5% hladině významnosti k odlišení druhu *C. arundinacea* od druhu *C. varia*. Tyto znaky vybrané s nastavením postupného výběru (forward selection) jsou CHL, OS a PAS. Nestandardizované a standardizované koeficienty pro jednotlivé znaky jsou uvedeny v Tabulce VII.



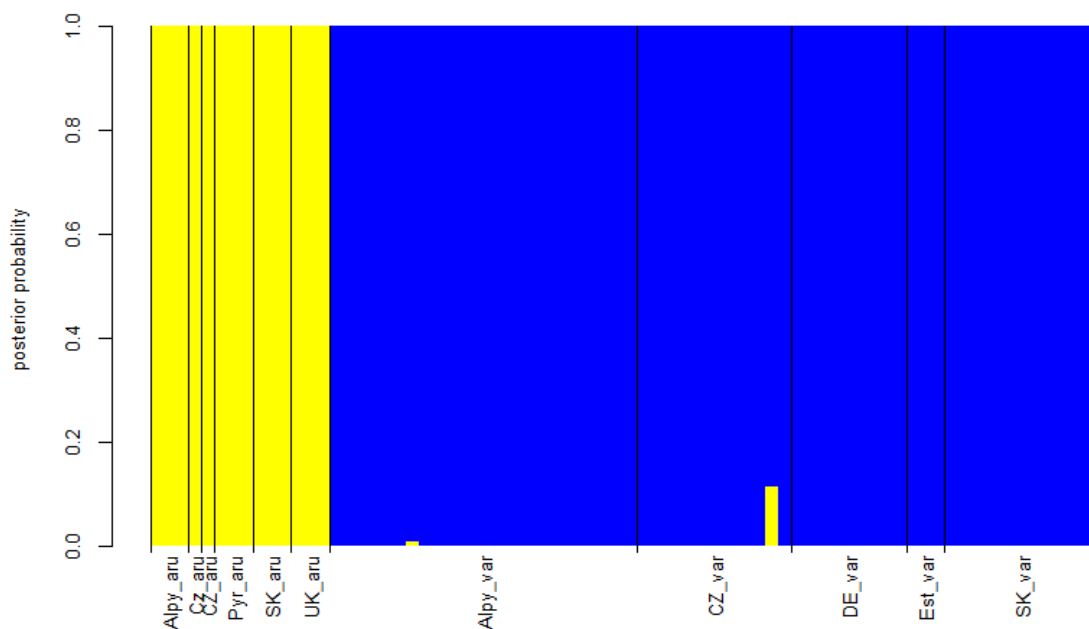
Obr. 15: Kanonická diskriminační analýza jedinců *C. arundinacea* a *C. varia*.

Tab. VII: Kanonická diskriminační analýza jedinců *C. arundinacea* a *C. varia*. Koeficienty diskriminační funkce.

Znak	nestandardizované koeficienty	standardizované koeficienty
D_PL	34,85	0,854
H_PL	32,72	0,235
UCH	22,68	0,535
OS	160,18	3,760
POLOS	65,36	0,569
SP	30,87	0,197
CHL	249,85	28,509
PAS	8,55	4,766
CHLPAS	134,17	4,037

5.2.5 Klasifikační analýza

Při klasifikační diskriminační analýze se všemi znaky bylo správně klasifikováno celkem 100 % jedinců. Grafický výstup (barplot) klasifikační analýzy s posteriorními pravděpodobnostmi klasifikace každého jedince do obou skupin je zobrazen na Obrázku 16.



Obr. 16: Klasifikační diskriminační analýza jedinců *C. arundinacea* a *C. varia*.

5.3 Molekulární analýza

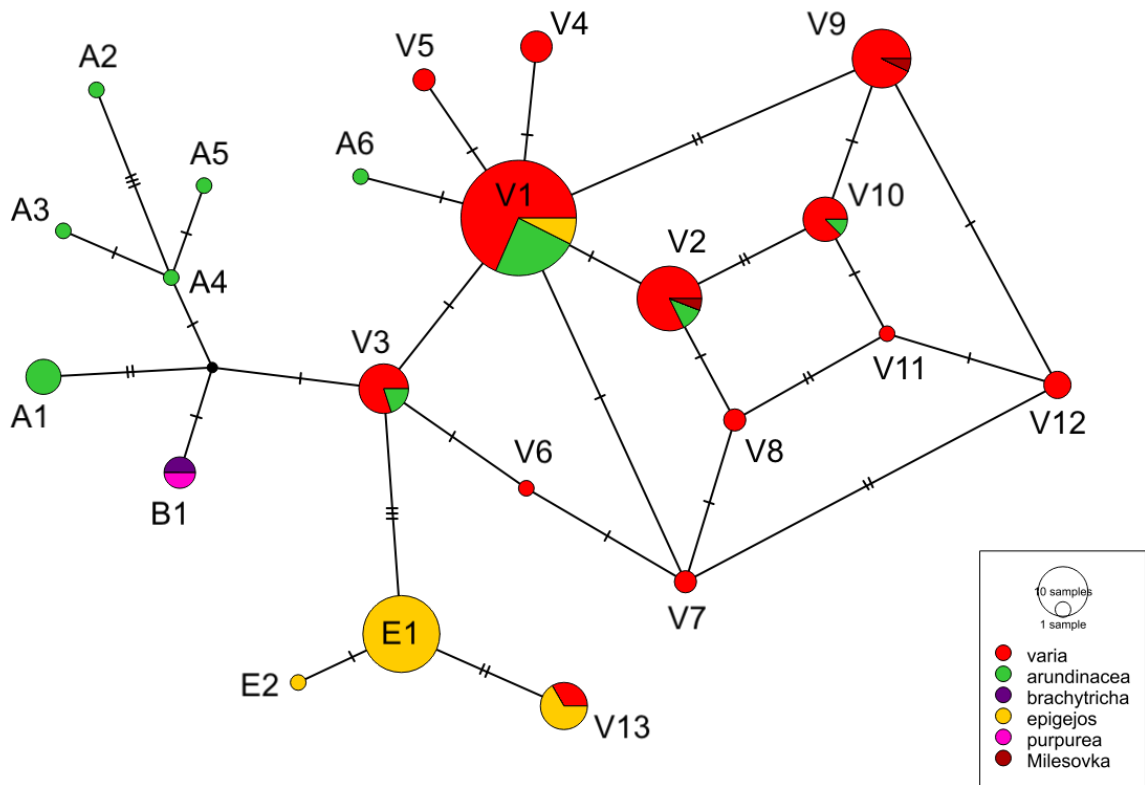
Získané zalignované sekvence chloroplastových úseků *psbA-trnH^{GUG}* a *psbK-trnS^{GCU}* ze 167 jedinců 5 druhů měly délku 469 bp, resp. 515 bp. Ty byly spojeny do jednoho alignmentu (984 bp), u kterého bylo zjištěno 22 haplotypů, ze kterých byla vytvořena haplotypová síť (Obr. 17). Zastoupení jednotlivých druhů v jednotlivých haplotypech je znázorněno barevně.

Žádný z druhů nevytvořil plně izolovanou skupinu haplotypů. Nejčtenější haplotyp V1 (55 jedinců) se vyskytl u všech tří studovaných druhů, u *C. varia*, *C. arundinacea* i *C. epigejos*. Další tři haplotypy (V2, V3 a V10) sdílí *C. varia* s *C. arundinacea*, jeden další haplotyp (V13) sdílí *C. varia* s *C. epigejos*. Bylo odhaleno 6 haplotypů unikátních pro *C. arundinacea*, haplotyp A1 o pěti jedincích ze 4 populací, ostatních 5 haplotypů (A2, A3, A4, A5 a A6) o jediném jedinci. Haplotyp A6 byl geneticky velmi příbuzný dominantnímu haplotypu V1, ostatní unikátní haplotypy *C. arundinacea* tvořily samostatnou větev haplotypové sítě. I přes větší genetickou vzdálenost byl zaznamenán výskyt haplotypů V1 a A1 v jediné populaci *C. arundinacea* (VISAA). Geografické rozmístění haplotypů zástupců *C. arundinacea* je zobrazeno na mapě (Obr. 18).

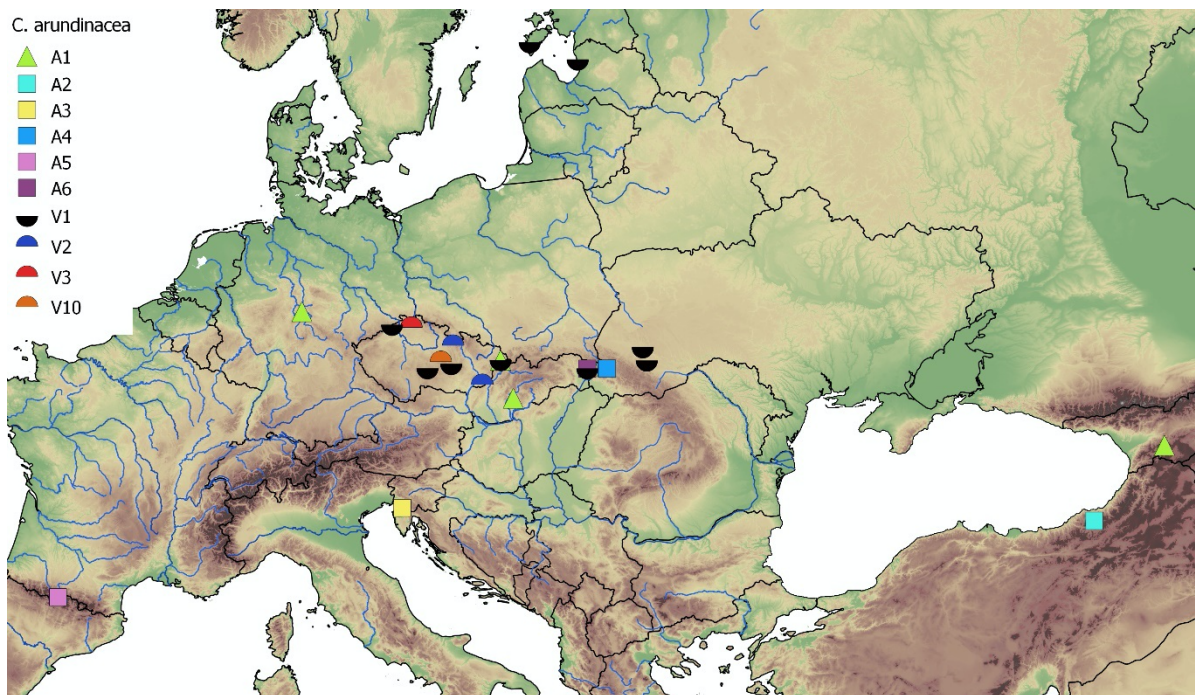
Na bázi větve haplotypů unikátních pro *C. arundinacea* se odděluje haplotyp B1, který sdílí zástupci druhů *C. purpurea* a *C. brachytricha* (každý druh po dvou jedincích v jediné populaci). Další větev sítě tvoří tři haplotypy se zástupci *C. epigejos*, dva unikátní haplotypy (E1, E2) a jeden haplotyp se zástupci *C. varia* (V13). Dva jedinci pocházejí z lokality VIDUV v Estonsku, jeden jedinec z lokality HARMV, jejíž druhý studovaný jedinec má geneticky poměrně vzdálený haplotyp V2.

Pro druh *C. varia* byla vytvořena samostatná haplotypová mapa s 13 haplotypy, na níž byl použit jiný barevný kód označující geografickou oblast sběru (Obr. 19). Stejné kódování je použito na mapě zobrazující rozmístění jednotlivých haplotypů (Obr. 20). Pouze dva nejmenší geografické celky obsahovaly jediný haplotyp, a to Srbsko (V5) (po jednom jedinci ze 2 lokalit) a Estonsko (V13) (2 jedinci z jediné lokality). Největší množství haplotypů bylo odhaleno v hlavním masivu Alp, a to 8 (V1, V2, V3, V4, V7, V9, V10, V11). Tato oblast je ale zároveň největším geografickým celkem s největším počtem lokalit (15).

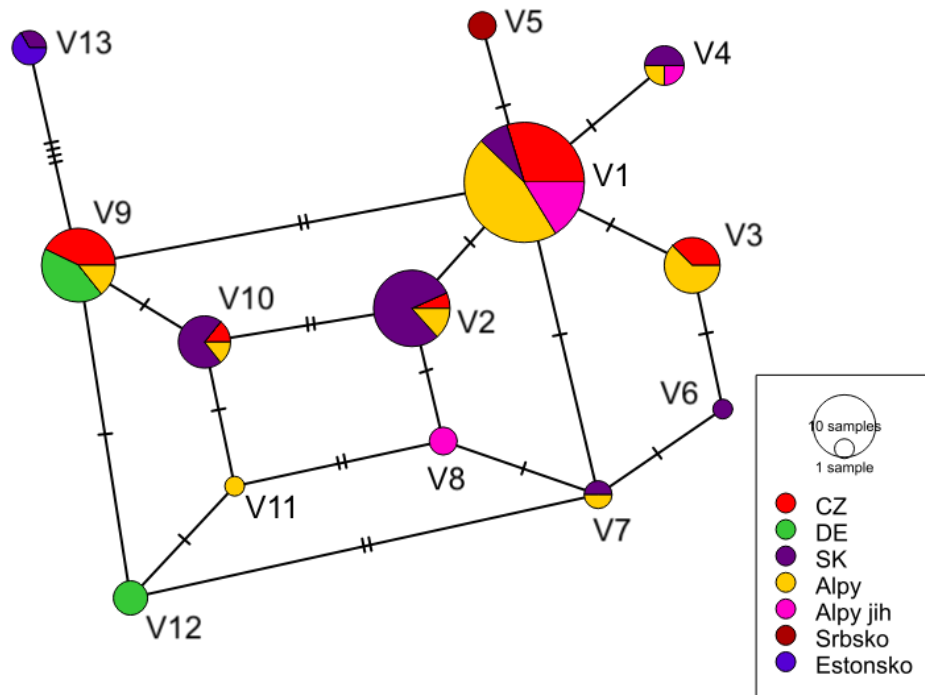
Dominantní haplotyp V1 (37 jedinců) se vyskytl ve čtyřech ze sedmi geografických celků, po třech oblastech mají haplotypy V2, V4, V9 a V10. Ve dvou zeměpisných celcích se vyskytly haplotypy V3, V7 a V13, ostatní haplotypy byly unikátní pro jednotlivé geografické oblasti (V5, V6, V8, V11 a V12).



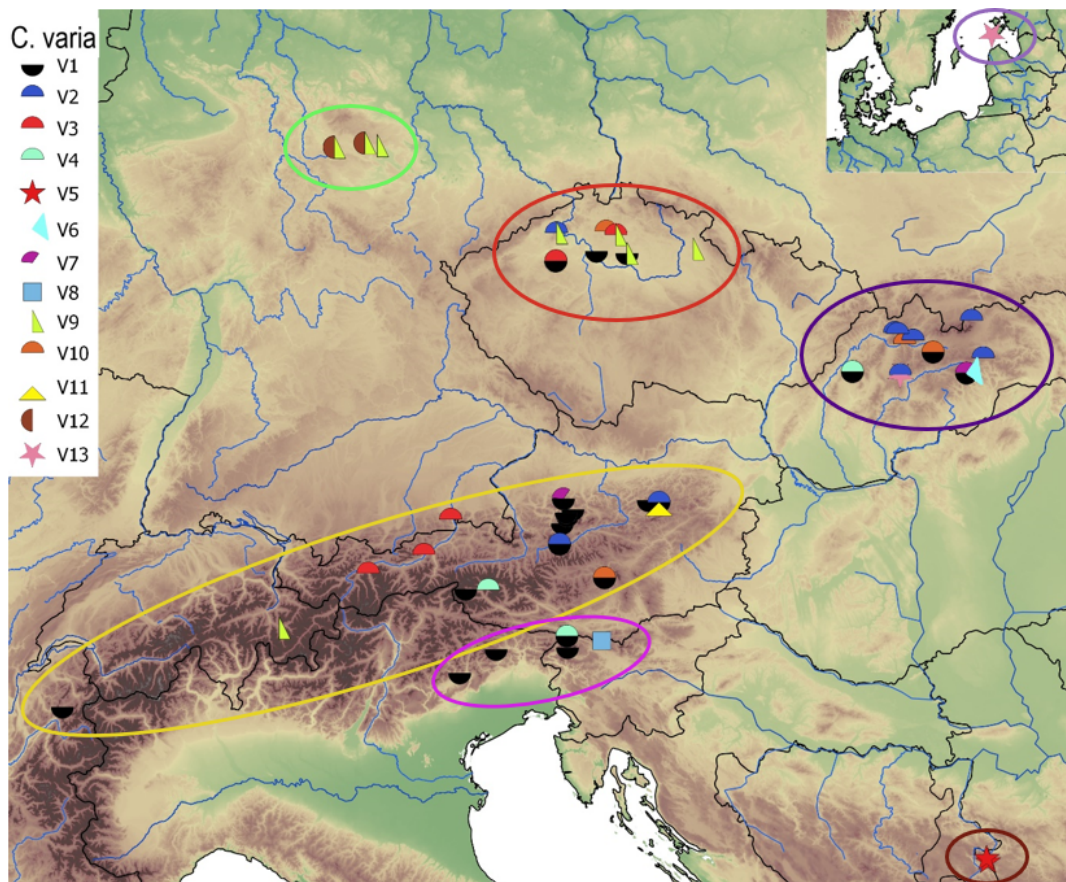
Obr. 17: Haplotypová síť chloroplastových úseků *psbA-trnH^{GUG}* a *psbK-trnS^{GCU}* všech zpracovaných sekvencí (167 jedinců).



Obr. 18: Rozmístění zjištěných haplotypů druhu *Calamagrostis arundinacea*.



Obr. 19: Haplotypová síť chloroplastových úseků $psbA-trnH^{GUG}$ a $psbK-trnS^{GCU}$ druhu *Calamagrostis varia* (97 jedinců).



Obr. 20: Rozmístění zjištěných haplotypů druhu *Calamagrostis varia*.

6 Diskuze

6.1 Průtoková cytometrie

Analýza relativní velikosti genomu na průtokovém cytometru potvrdila tetraploidní úroveň druhu *Calamagrostis varia* uváděnou v literatuře (Nygren, 1946; Strid & Franzen, 1981; Krahulcová, 2003). Zároveň ukázala, že je relativní velikost genomu větší než u dalších dvou studovaných druhů – *C. arundinacea* a *C. epigejos*. Tyto dva druhy byly v minulosti označovány jako potenciální rodičovské taxony druhu *C. varia* (Nygren, 1962). Tato hypotéza ovšem byla vytvořena na základě umělého křížení druhů a pouze na morfologické podobnosti vzniklého křížence s divoce rostoucími zástupci druhu *C. varia*. Tento jev se ukazuje i v současnosti, kdy i přirozeně vzniklí kříženci druhů *C. arundinacea* a *C. epigejos*, označovaní jako *C. ×acutiflora*, velmi nápadně připomínají druh *C. varia* a dochází tak k jejich častým záměnám (Štech, in prep.). Velikost genomu je ideálním znakem k rozlišení homoploidních druhů (Loureiro et al., 2010). Může se totiž dramaticky lišit i mezi blízce příbuznými druhy (Bennett & Leitch, 2005), ve většině případů je ale konzistentní v rámci jedné evoluční jednotky (Greilhuber 1998, 2005, Bennett et al. 2000, Murray 2005). Některé studie cytometrickou analýzou velikosti genomu odhalily například hybridní jedince mezi dvěma druhy rodu *Elytrigia* (Mahelka et al., 2005), dvě variety druhu *Koeleria macrantha* (Pecinka et al., 2006) nebo křížence mezi několika druhy sect. *Batrachium* rodu *Ranunculus* (Prančl et al., 2018). V této studii zjištěná velikost genomu druhu *C. varia* nepodporuje hypotézu o jeho hybridogenním původu s rodičovskými druhy *C. arundinacea* a *C. epigejos*. Jeho velikost genomu je ve srovnání s těmito potenciálními rodičovskými druhy větší. Větší velikost genomu u taxonu vzniklého křížením dvou druhů s menší relativní velikostí genomu není příliš pravděpodobná.

Dalším zajímavým výsledkem je zjištění nezvyklých hodnot velikosti genomu u rostlin na Milešovce v Českém středohoří. Už při sběru byly tyto rostliny morfologicky nezvyklé, jejich morfologická analýza ale nebyla vzhledem k pokročilé vegetační sezóně možná. Část rostlin vykazovala tetraploidní hodnoty, které ale byly nižší než u rostlin bezpečně určených jako *C. varia*, ale zároveň vyšší než u rostlin *C. arundinacea*, které jsou morfologicky nejpodobnější. Jednou z hypotéz je hybridogenní původ jedinců křížením právě *C. varia* a *C. arundinacea*, které tato cytometrická analýza odpovídá. V analýze cpDNA byla lokalita na Milešovce zastoupena dvěma jedinci. Jedinec, jehož velikost genomu odpovídala tetraploidní úrovni, měl haplotyp V9, který byl jinak výhradně zjištěn u jedinců druhu *C. varia*. Druhý

analyzovaný jedinec měl haplotyp V2, který byl sdílený rostlinami druhů *C. varia* a *C. arundinacea*. I tento výsledek tedy odpovídá hypotéze, že by tetraploidní jedinci s intermediární velikostí genomu mohli vzniknout křížením těchto dvou druhů. Pro potvrzení hypotézy o rodičovských druzích je potřeba další analýza, ideálně sekvence biparentálně děděné jaderné DNA.

Dalším zajímavým výsledkem cytometrických analýz lokality na Milešovce byly rostliny, u nichž analýza velikosti genomu odhalila hodnoty odpovídající hexaploidní úrovni. Tato ploidní úroveň je u třtin s výskytem na území Česka známa jen u taxonu *C. rivalis* (Piherová, 2016). Tento druh má ale velmi odlišné ekologické nároky, jeho populace jsou známy jen ze štěrkových náplavů řeky Ohře a stejného biotopu řek v německém Sasku. Jednou z možností vzniku hexaploida je křížení jedinců různých ploidních úrovní. Pokud by byl jedním z rodičovských taxonů druh *C. varia*, který je tetraploidní, nabízí se možnost oktoploidní *C. epigejos*. Tento druh ale nebyl při sběru hexaploidů na lokalitě nalezen. Analýza cpDNA ukazuje, že již dříve zmíněný osekvenovaný hexaploidní jedinec má haplotyp V2, který byl zjištěn u druhů *C. varia* a *C. arundinacea*. Oba druhy se v okolí lokality s nalezenými hexaploidními jedinci vyskytují, oba jsou ale tetraploidní úrovně. Možným mechanismem vzniku hexaploida by tedy byla hypotéza splynutí redukované (2x) a neredukované (4x) gamety. Neredukovaná gameta je nejčastěji výsledkem meiotického defektu (Brownfield & Köhler, 2011). Tento defekt může být způsoben vynecháním prvního nebo druhého meiotického dělení, morfologickou abnormalitou dělicího vřeténka nebo narušením cytokineze (Bretagnolle & Thompson, 1995; Ramanna & Jacobsen, 2003). Mechanismus vzniku hexaploidní úrovně pomocí neredukované gamety byl prokázán např. v rámci druhů *Centaurea jacea* (Koutecký et al., 2011) nebo *Achillea borealis* (Ramsey, 2006). Pro testování jakékoli z hypotéz vzniku zjištěného hexaploida bude potřeba analýza biparentálně děděné jaderné DNA.

Vzniklý hexaploidní hybrid může mít z důvodu nerovnoměrně zastoupených chromozomů dvou rodičovských druhů problémy s párováním chromozomů při meióze. To může vést k rozmnožování pomocí apomixie, případně vegetativnímu šíření. Této teorii by mohla odpovídat také velmi nízká variabilita ve velikosti genomu (3 %).

Dalším výsledkem je vysoká intraspecifická variabilita relativní velikosti genomu. Všechny zjištěné tetraploidní skupiny (včetně jediné lokality na Milešovce nejistého taxonomického zařazení) měly variabilitu v intervalu 13–19 %. V rámci druhu *C. arundinacea* měly dvě

rostliny odlehlé hodnoty, po jejich vyřazení z výpočtu je variabilita 9,5 %. V rámci měření *C. varia*, kde bylo téměř 7x více měřených vzorků bylo nalezeno 5 rostlin s odlehlými hodnotami, po jejichž vyřazení byla variabilita 9,3 %. Podobnou strukturu měla data v rámci tetraploidní *C. epigejos*, po vyřazení dvou rostlin s odlehlými hodnotami vychází variabilita 9,6 %. Lokalita na Milešovce má potenciál výskytu hybridů *C. varia* x *C. arundinacea*, tam by se tedy větší variabilita dala vysvětlit tímto mechanismem.

I při vyřazení odlehlých hodnot měření byla zjištěna vyšší variabilita než u tetraploidního druhu *C. canescens* (7,05 %) a u tetraploidních zástupců skupiny *C. purpurea* agg. (4,67 %) (Schaabová, 2015). Několik dalších příkladů taxonů z čeledi *Poaceae*, které mají vysokou intraspecifickou i vnitropopulační variabilitu, jsou např. druhy *Festuca pallens*, *Hordeum spontaneum* a hybridy mezi druhy rodu *Lolium*. Potenciální faktory ovlivňující tuto variabilitu uvádí Šmarda a Bureš (2010).

6.2 Morfologická analýza

Zjištěné hodnoty měřených morfologických znaků u druhů *C. varia* a *C. arundinacea* odpovídají údajům uváděným v určovací literatuře (Conert, 1989; Fischer et al., 2008; Jäger, 2017; Kaplan et al., 2019). Oba taxony se oddělily bez plynulých přechodů, jediným částečně sporným jedincem byla rostlina s kódem Zbytká 4b, která se v ordinačním diagramu os 1 a 3 zobrazila mezi body označujícími rostliny druhu *C. arundinacea* (Obr. 12). Měření tohoto jedince vykazovala vyšší hodnoty znaků souvisejících s celkovou velikostí klásku než ostatní rostliny *C. varia*, hodnoty znaků CHL, PAS a CHLPAS ale odpovídaly rozsahům hodnot naměřeným v rámci druhu. Jako nejdůležitější určovací znaky studovaných taxonů se ukázaly délka kalusových chlupů, délka osiny a délka pastopečky. Především první dva znaky lze relativně spolehlivě pozorovat pomocí botanické lupy i v terénu, s jejich determinací by tedy neměly být problémy.

Poměrně překvapivým výsledkem je morfologická jednotnost druhu *C. varia*. I přes získání vzorků z lokalit reprezentujících větší část areálu druhu a měření jedinců i z izolovaných lokalit na okrajích areálu a reliktních typech stanovišť nebyla objevena morfologická struktura v rámci druhu. Morfologická jednotnost druhu byla zjištěna již v menší studii Pazko (2008), která analyzovala rostliny z 9 populací v polské části areálu. Průměrné hodnoty znaků odpovídají námi zjištěným hodnotám.

6.3 Molekulární metody

Opačným výsledkem skončily molekulární analýzy. Byla zjištěna relativně vysoká genetická variabilita na úrovni druhů, geografických celků i populací. U druhu *C. arundinacea* bylo zjištěno 10 haplotypů u 29 jedinců z 20 populací, u *C. varia* 13 haplotypů u 97 jedinců ze 45 populací. V práci Schaabové (2015) byly ve stejném alignmentu chloroplastových úseků (psbA-trnH^{GUG} a psbK-trnS^{GCU}) u 25 rostlin *C. canescens* objeveny pouze 4 haplotypy, u 80 rostlin *C. purpurea* agg. dokonce jen 2 haplotypy. V práci Dvořákové et al. (2009) na druhu *Hordelymus europaeus* bylo při analýze společného alignmentu tří úseků cpDNA, z nichž jeden se shodoval s touto prací (psbA-trnH^{GUG}), objeveno 6 haplotypů u 51 rostlin ze 43 populací. Dvě skupiny po dvou haplotypech přitom byly rozdílné jen délkou poly-C úseku, tedy inzercí/deleci, které v naší práci nejsou z důvodu problémů s určením homologie délky repetitivních sekvencí do analýzy zahrnuty (Kelchner, 2000).

Velká variabilita spojená se síťovitou strukturou vztahů mezi haplotypy lišícími se nejčastěji o 1–2 substituce neumožňuje odhalení genetické struktury v rámci areálu druhu *C. varia*. Ze stejného důvodu nebylo možné zjistit rozdíly mezi jednotlivými biotopy. Populace nezřídka obsahovaly jedince s rozdílnými haplotypy, v některých případech navíc geneticky vzdálenými. Takovým příkladem jsou populace MURAV (haplotypy V1, V6 a V7), MARIV (haplotypy V1, V2 a V11) nebo HARMV (haplotypy V2 a V13). Některé haplotypy se objevily v populacích geograficky velmi vzdálených, např. haplotyp V13 v populaci VIDUV a HARMV, tedy v Estonsku a na Slovensku. Malá část haplotypů se objevila pouze v jediném geografickém celku, výjimkou nebylo ani rozšíření ve třech a více geografických celcích.

Sdílení některých haplotypů všemi třemi primárně studovanými druhy (*C. varia*, *C. arundinacea* a *C. epigejos*) naznačuje jejich společnou historii. Nevylučuje tedy ani hypotézu hybridogenního původu *C. varia* právě s *C. arundinacea* a *C. epigejos* jako rodičovskými taxony. Pro potvrzení této hypotézy je ale potřeba rozšířit analýzu o další molekulární markery, ideální by v tomto případě byly úseky jaderné DNA, která je na rozdíl od maternálně děděné cpDNA děděná biparentálně (Blattner, 2015). Často využívané úseky ITS ale nejsou v případě polyploidních druhů vhodné, protože odhalení všech ribotypů v rámci jednoho jedince komplikuje jejich vysoký počet. Dalším problémem úseku ITS je fenomén zvaný concerted evolution, kdy má jedinec tendenci homogenizovat zděděné různorodé kopie na jedinou sekvenci (Álvarez & Wendel, 2003). Ideální pro analýzu jaderné DNA na druhové úrovni se ukazují single-copy geny, na čeledi *Poaceae* již byl v několika analýzách úspěšně použit lokus topo6 (Blattner, 2015; Hochbach et al., 2015; Wölk et al., 2015).

Geografická struktura rozmístění haplotypů dává prostor alespoň volné interpretaci historie rozšíření druhu *C. varia*. Velká variabilita haplotypů v Alpách a Karpatech by odpovídala teorii o refugiích v okrajových částech těchto pohoří v době maxima posledního zalednění (Tribsch & Schönswetter, 2003; Mráz & Ronikier, 2016) a plošnému výskytu druhu v současnosti. V době konce glaciálu a začátku holocénu byly zřejmě podmínky na mnohých biotopech i v nižších polohách střední Evropy blízké ekologickým nárokům druhu, tedy převažující bazické půdy a otevřená stanoviště, později světlé lesy (Chytrý, 2012). Proto je možné, že druh byl rozšířen především v podhůří mezi horským a kontinentálním ledovcem. Po ústupu ledovce a postupném odvápnění půd se těžiště výskytu druhu opět přesunulo do vápencových oblastí vyšších pohoří a mimo ně zůstal druh jen na lokalitách s vhodnými podmínkami. Po ústupu severského ledovce se druh rozšířil také do severní Evropy.

Této teorii by odpovídalo rozmístění hned několika haplotypů. Dva nejčtenější haplotypy se vyskytují v Alpách a Karpatech, V1 dominuje v Alpách, V2 dominuje v Karpatech, oba haplotypy se ale vyskytují v obou pohořích. Podobné rozmístění jako haplotyp V2, tedy východní část Alp a Karpaty, mají haplotypy V4, V7 a V10. V západní části Alp se objevuje haplotyp V9, který je dominantní v oblasti Harzu v Německu. Spolu s ním se na dvou ze tří analyzovaných lokalit *C. varia* v Harzu objevuje i pro toto území unikátní haplotyp V12. Relativní genetická jednotnost by mohla souviset se specifickými ekologickými podmínkami lokalit tvořených sádrovcovými skalami. Z hlediska variability je velmi zajímavé území Česka, kde se setkávají haplotypy z Alpsko-Karpatské části areálu (V1, V2, V10) spolu s haplotypy ze severozápadní části Alp (V3, V9), z nichž jeden je i na území Harzu. Variabilita na území Česka tedy spojuje haplotypy ze všech sousedních geografických celků.

Bez zajímavosti určitě nejsou ani haplotypy v odlehlých areálech výskytu, v Estonsku byl objeven haplotyp V13, který se vyskytuje ještě na jedné slovenské lokalitě a je sdílený se zástupci druhu *C. epigejos*. Jeho původ je tedy velmi nejasný. Typickým výsledkem fylogeografické studie evropského druhu se zdá být unikátní haplotyp v Srbsku, které je jako součást Balkánu považováno za jedno ze tří tradičně rozlišovaných jihoevropských refugií (Taberlet et al., 1998).

7 Závěr

U druhu *Calamagrostis varia* byla analyzována morfologická a genetická variabilita. Morfometrická analýza neprokázala žádnou strukturu variability napříč areálem druhu. Analýza relativní velikosti genomu potvrdila tetraploidní úroveň druhu. Relativní velikost genomu je větší než u dalších tetraploidních jedinců dvou studovaných druhů *C. arundinacea* a *C. epigejos*. Byla objevena lokalita s jedinci hexaploidní úrovně, u nichž je možný vznik splynutím redukované a neredukované gamety potenciálních rodičů *C. varia* a *C. arundinacea*. K potvrzení této hypotézy jsou nutné analýzy úseků jaderné DNA.

Variabilita studovaných úseků chloroplastové DNA byla relativně vysoká ve všech větších studovaných geografických oblastech. Byly zjištěny haplotypy sdílené s druhem *C. arundinacea* a *C. epigejos*, což odpovídá dřívějším hypotézám o jejich blízkých příbuzenských vztazích.

Byla srovnána variabilita v hlavní části areálu a odlehlých izolovaných areálech. Morfologicky nebyly měřené rostliny ze vzdálených lokalit odlišné. V nejbližších areálech byly objeveny zřídka se vyskytující haplotypy, v Harzu byla variabilita nižší než v Česku, kde byla variabilita zjištěných haplotypů vysoká.

Nebyly nalezeny rozdíly mezi rostlinami z odlišných biotopů. Jediným náznakem odlišení jednoho z typů stanovišť je nižší genetická variabilita lokalit v Harzu, kde převažují lokality na sádrovci. Tento jev ale může být vysvětlen relativně malými populacemi a jejich malou geografickou vzdáleností.

Studované znaky byly srovnány s druhem *C. arundinacea*. Morfologická analýza ukázala, že se oba studované druhy morfologicky liší. Nejdůležitějšími determinačními znaky jsou délka kalusových chlupů, délka osiny a délka pastopečky. Velikost genomu se mezi studovanými druhy liší, na jedné lokalitě ale intermediární velikost genomu naznačuje možnost jejich hybridizace. Stejný výsledek ukazuje i analýza cpDNA, ve které oba studované druhy sdílí několik haplotypů.

8 Literatura

- Adanson M. (1763): Familles des plantes. Chez Vincent, Paris.
- Álvarez I & Wendel J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29(3): 417–434.
- Anderson E. & Stebbins G. L. Jr. (1954). Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8: 378–388.
- Arnold M. L. (1997). Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press, New York, USA.
- Avice J. C. (2000). Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Bennett, M., Bhandol P. & Leitch I. J. (2000). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses—807 New Estimates. *Annals of Botany* 86(4): 859–909.
- Bennett M. D. & Leitch I. J. (2005). Genome Size Evolution in Plants. The Evolution of the Genome, 89–162.
- Beug H. J. (2004). Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete (Guide to the Pollen Analysis for Central Europe and the Adjacent Areas). Pfeil, München.
- Bieniek, W. (2018). Phylogeographic investigation of *Hordeum murinum* L. in Europe based on DNA markers. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 60(1): 7–23.
- Birks H. H. (2008). The Late-Quaternary history of arctic and alpine plants, *Plant Ecology & Diversity*, 1,2: 135–146
- Birks H. J. B. & Willis K. J. (2008). Alpines, trees, and refugia in Europe. *Plant Ecology & Diversity* 1,2: 147–160.
- Blattner F. R. (2015). TOPO6: a nuclear single-copy gene for plant phylogenetic inference. *Plant Systematics and Evolution* 302(2): 239–244.
- Briggs D. & Walters S. M. (1997). Plant Variation and Evolution, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Burke J. M. & Arnold M. L. (2001). Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics* 35: 31–52.
- Bretagnolle F. & Thompson J. D. (1995). Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* 129: 1–22.
- Breitenbach D. M., Konnert M., Pinsker W., Starlinger F. & Geburek T. (1997). The contact zone between two migration routes of silver fir, *Abies alba* (Pinaceae), revealed by allozyme studies. *Plant Systematics and Evolution* 206: 259–272.
- Brownfield L. & Köhler C. (2010). Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *Journal of Experimental Botany* 62(5): 1659–1668.
- 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.
- Clarke G. C. S. (1980): *Calamagrostis* Adanson. In Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H. & Walters S. M. (Eds.): *Flora Europaea* 5: 236–239. Cambridge University Press, Cambridge.
- Clement M., Snell Q., Walker P., Posada D. & Crandall K. (2002). TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*, 2, 184.
- Conert H. J. (1989). *Calamagrostis*. In *Ilustrierte Flora von Mitteleuropa*, 357–380, Hegi G. (ed.). Paul Parey, Hamburg.
- Daneck H., Abraham V., Fér T. & Marhold K. (2011). Phylogeography of *Lonicera nigra* in Central Europe inferred from molecular and pollen evidence. *Preslia* 83: 237–257.
- Darlington C. D. & Wylie A. P. (1956). *Chromosome atlas of flowering plants*. George Allen and Unwin Ltd., London, UK.
- 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.

- Dvořáková H., Fér T. & Marhold K. (2009). Phylogeographic pattern of the European forest grass species *Hordelymus europaeus*: cpDNA evidence. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 205(6): 418–423.
- 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.
- Escudero A., Palacio S., Maestre F. T. & Luzuriaga A. L. (2014). Plant life on gypsum: a review of its multiple facets. *Biological Reviews*, 90(1): 1–18.
- Fér T., Vašák P., Vojta J. & Marhold K. (2007). Out of the Alps or Carpathians? Origin of Central European populations of *Rosa pendulina*. *Preslia* 79: 367–376.
- Fischer M. A., Oswald K. & Adler W. (2008). Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol, 3. Auflage. Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, Linz.
- Fjellheim S., Rognli O. G., Fosnes K. & Brochmann C. (2006). Phylogeographical history of the widespread meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) inferred from chloroplast DNA sequences. *Journal of Biogeography* 33: 1470–1478.
- Frey L. & Paszko B. (1999). Remarks on distribution, taxonomy and karyology of *Calamagrostis* species (*Poaceae*) with special reference to their representatives in Poland. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Suppl.* 7: 33–45.
- Grant V. (1981). Plant speciation, 2nd edition. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Greene C. W. (1984). Sexual and apomictic reproduction in *Calamagrostis* (*Gramineae*) from Eastern North America. *American Journal of Botany* 71: 285–293.
- Gregory T. R. & Mable B. K. (2005). Polyploidy in Animals. In *The Evolution of the Genome*, 428–517, Gregory T. R. (Ed.). Elsevier Academic Press, London.
- Greilhuber J. (1998). Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Annals of Botany* 82(Suppl. A): 27–35.
- Greilhuber J. (2005). Intraspecific Variation in Genome Size in Angiosperms: Identifying its Existence. *Annals of Botany* 95(1): 91–98.

- Grulich V. (1986). Klíč k určování československých druhů rodu *Calamagrostis*. Muzeum a současnost, řada přírodovědná edition, Roztoky u Prahy.
- Grulich V. & Chobot K. [eds.] (2017): Červený seznam ohrožených druhů České republiky. *Cévnaté rostliny – Příroda* 35: 1–178.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hedenäs L. (2017). Phylogeography of Alpine populations of *Rhytidium rugosum* (Bryophyta) in a European context. *Alpine Botany* 127(2): 197–209.
- Hewitt G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- Hewitt G. M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68(1-2), 87–112.
- Hilu K. W. (2004). Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). *Australian Journal of Botany* 52 (1): 13–22.
- Hochbach A., Schneider J. & Röser M. (2015). A multi-locus analysis of phylogenetic relationships within grass subfamily *Pooideae* (*Poaceae*) inferred from sequences of nuclear single copy gene regions compared with plastid DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 87: 14–27.
- Holderegger R. & Abbott R. J. (2003). Phylogeography of the Arctic-Alpine *Saxifraga oppositifolia* (*Saxifragaceae*) and some related taxa based on cpDNA and ITS sequence variation. *American Journal of Botany* 90(6): 931–936.
- Hultén E. & Fries M. (1986) Atlas of North European Vascular Plant, North of the Tropic of Cancer, vol. 1–3. Königstein, Koeltz.
- Chytrý M. (2012). Vegetation of the Czech Republic: diversity, ecology, history and dynamics. *Preslia* 84: 427–504.
- Jäger E. J. (2017). Rothmaler Exkursionsflora von Deutschland. Gefäßpflanzen: Grundband. 21. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Jiao Y., Wickett N., Ayyampalayam S. et al. (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473: 97–100.

- Jaarola M., Tegelström H. & Fredga K. (1999). Colonization history in Fennoscandian rodents. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 113–127.
- Jooss, R. (2013). Schwabische Alb (Swabian Alb) Biosphere Reserve. *Eco Mont – Journal of Protected Mountain Areas Research* 5: 43–48.
- Juříčková L., Horáčková J. & Ložek V. (2014). Direct evidence of central European forest refugia during the last glacial period based on mollusc fossils. *Quaternary Research* 82(01): 222–228.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtěk J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds) (2019): Klíč ke květeně České republiky. Ed. 2. Academia, Praha.
- Keil E. J., Macy T. R., Kwandrans J., Eloranta P., Tomás P., Aboal M. & Vis M. L. (2015). Phylogeography of *Batrachospermum gelatinosum* (*Batrachospermales*, *Rhodophyta*) shows postglacial expansion in Europe. *Phycologia*, 54(2): 176–182.
- Kelchner S. A. (2000). The Evolution of Non-Coding Chloroplast DNA and Its Application in Plant Systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 87(4): 482–498.
- Kellis M., Birren B. W. & Lander E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428: 617–624.
- Kihara H. & Ono T. (1926). Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der *Rumex*-Arten. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 4: 475–481.
- King R. A. & Ferris C. (1998). Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology* 7: 1151–1162.
- Koutecký P. (unpubl.). FCM, velikost genomu *Bellis perennis*.
- Koutecký P. (2008): Taxonomická studie střeoevropských zástupců *Centaurea* sect. *Jacea*. –Doktorská disertační práce. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Koutecký P., Baďurová T., Štech M., Košnar J. & Karásek J. (2011). Hybridization between diploid *Centaurea pseudophrygia* and tetraploid *C. jacea* (*Asteraceae*): the role of mixed pollination, unreduced gametes, and mentor effects. *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 93–106.

- 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.
- Leigh J. W. & Bryant D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9):1 110–1116.
- Lindell T. (2006). Piggrör funnet i Baltikum. [*Calamagrostis varia* found in Estonia.] *Svensk Botanisk Tidskrift* 100: 201–202.
- Loureiro J., Trávníček P., Rauchová J., Urfus T., Vít P., Štech M., Castro S. & Suda J. (2010). The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* 82: 3–21.
- 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.
- Madlung A. (2013). Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity* 110: 99–104.
- Mahelka V., Suda J., Jarolímová V., Trávníček P. & Krahulec F. (2005). Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (*Poaceae: Triticeae*) and their hybrid. *Folia Geobotanica* 40(4): 367–384.
- Mráz P. & Ronikier M. (2016). Biogeography of the Carpathians: evolutionary and spatial facets of biodiversity. *Biological Journal of the Linnean Society* 119(3): 528–559.
- Murray B. G. (2005). When does Intraspecific C-value Variation become Taxonomically Significant? *Annals of Botany* 95(1): 119–125.
- Naciri & Gaudeul M. (2007). Phylogeography of the endangered *Eryngium alpinum* L. (*Apiaceae*) in the European Alps. *Molecular Ecology* 16(13): 2721–2733.

- Nygren A. (1946). The Genesis of Some Scandinavian Species of *Calamagrostis*. *Hereditas* 32: 131–261.
- Nygren A. (1948). Some Interspecific Crosses in *Calamagrostis* and Their Evolutionary Consequences. *Hereditas* 34: 387–413.
- Nygren, A. (1951). Form and biotype formation in *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas* 37: 519–532.
- Nygren A. (1962). Artificial and natural hybridization in European *Calamagrostis*. *Symbolae Botanicae Upsalienses*. 17: 1–105.
- Otto, F. (1990). Chapter 11: DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA. *Methods in Cell Biology*. 105–110.
- Paszko B. (2008). Zmienność morfologiczna trzcinnika pstrego [*Calamagrostis varia*]. In *Zastosowania metod statystycznych w badaniach naukowych III*, StatSoft Polska, Kraków.
- Pecinka A., Suchánková P., Lysak M. A., Trávníček B. & Doležel J. (2006). Nuclear DNA Content Variation among Central European *Koeleria* Taxa. *Annals of Botany* 98(1): 117–122.
- 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.
- Piherová J. (2016). Srovnání endemické třtiny Saska *Calamagrostis rivalis* s rostlinami z ČR. Bc. Thesis, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Prančl J., Koutecký P., Trávníček P., Jarolímová V., Lučanová M., Koutecká E. & Kaplan Z (2018). Cytotype variation, cryptic diversity and hybridization in *Ranunculus* sect. *Batrachium* revealed by flow cytometry and chromosome numbers. *Preslia* 90: 195–223.
- Ramanna M. S. & Jacobsen E. (2003). Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – A review. *Euphytica* 133(1): 3–8.
- Ramsey J. (2006). Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (*Asteraceae*). *Heredity* 98(3): 143–150.

- 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.
- Rejzková E., Fér T., Vojta J. & Marhold K. (2008). Phylogeography of the forest herb (*Cyperaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 158(1): 115–130.
- Rieseberg L. H. & Willis J. H. (2007). Plant Speciation. *Science* 317: 910–914.
- Ronikier M., Costa A., Aguilar J. F., Feliner G. N., Küpfer P. & Mirek Z. (2008). Phylogeography of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (*Ranunculaceae*): chloroplast DNA reveals two evolutionary lineages across central Europe and Scandinavia. *Journal of Biogeography* 35(9): 1650–1664.
- 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.
- 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.
- Saarela J. M., Bull R. D., Paradis M. J., Ebata S. N., Peterson P. M., Soreng R. J. & Paszko B. (2017). Molecular phylogenetics of cool-season grasses in the subtribes *Agrostidinae*, *Anthoxanthinae*, *Aveninae*, *Brizinae*, *Calothecinae*, *Koeleriinae* and *Phalaridinae* (*Poaceae, Pooideae, Poeae, Poeae* chloroplast group 1). *PhytoKeys* 87: 1–139.
- 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.
- Shaw J., Lickey E. B., Schilling E. E. & Small R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94(3): 275–288.
- Shaw J., Shafer H. L., Leonard O. R., Kovach M. J., Schorr, M. & Morris A. B. (2014). Chloroplast DNA sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in angiosperms: The tortoise and the hare IV. *American Journal of Botany*, 101(11): 1987–2004.
- Soltis D. E., Soltis P. S. & Tate J. A. (2003). Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* 161(1): 173–191.
- Soltis P. S. & Soltis D. E. (2009). The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology* 60: 561–588.
- Soltis P. S. & Soltis D. E. (2016). Ancient WGD events as drivers of key innovations in Angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology* 30: 159–165.
- Soltis D. E., Buggs R. J. A., Doyle J. J. & Soltis P. S. (2010). What we still don't know about polyploidy. *Taxon* 59 (5): 1387–1403.
- Soltis D. E., Visger C. J. & Soltis P. S. (2014). The polyploidy revolution then...and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany* 101 (7): 1057–1078.
- 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. J., Peterson P. M., Romaschenko K., Davidse G., Teisher J. K., Clark L. G., Barberá P., Gillespie L. J. & Zuloaga F. O. (2017). A worldwide phylogenetic classification of the *Poaceae* (*Gramineae*) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. *Journal of Systematics and Evolution* 55 (4): 259–290.

- Stachurska-Swakoń A., Cieślak E. & Ronikier M. (2013). Phylogeography of a subalpine tall-herb *Ranunculus platanifolius* (*Ranunculaceae*) reveals two main genetic lineages in the European mountains. *Botanical Journal of the Linnean Society* 171(2): 413–428.
- Stebbins G. L. (1956). Cytogenetics and evolution of the grass family. *American Journal of Botany* 43: 890–905.
- Stebbins G. L. Jr. (1971). Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold, London.
- Stebbins G. L. Jr. (1985). Polyploidy, Hybridization, and the Invasion of New Habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72: 824–832.
- Stewart J. R. & Lister A. M. (2001). Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution* 16(11): 608–613.
- Strid A. & Franzen R. (1981). In Chromosome number reports LXXIII. *Taxon* 30: 829–842.
- Šmarda P. & Bureš P. (2010) Understanding intraspecific variation in genome size in plants. *Preslia* 82: 41–61.
- Štech M. (in prep.). *Calamagrostis* Adans. – trtina.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G. & Cossons J.-F. (1998). Comparative phylogeography and post-glacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453–464.
- Taberlet P., Swenson J. E., Sandegren F. & Bjärvall A. (1995). Localization of a contact zone between two highly divergent mitochondrial DNA lineages of the brown bear (*Ursus arctos*) in Scandinavia. *Conservation Biology* 9: 1255–1261.
- Tribisch A. & Schönswetter P. (2003). Patterns of Endemism and Comparative Phylogeography Confirm Palaeoenvironmental Evidence for Pleistocene Refugia in the Eastern Alps. *Taxon* 52(3): 477–497.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A. (eds.) (1980). *Flora Europaea*. Vol. 5. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tyler T. (2002). Large-scale geographic patterns of genetic variation in *Melica nutans*, a widespread Eurasian woodland grass. *Plant Systematics and Evolution* 236(1): 73–87.

- Volkova P. A., Schanzer I. A., Soubani E., Meschersky I. G. & Widén B. (2016). Phylogeography of the European rock rose *Helianthemum nummularium* s.l. (Cistaceae): western richness and eastern poverty. *Plant Systematics and Evolution*, 302(7): 781–794.
- Wasiljev W. N. (1960). Das System der Gattung *Calamagrostis*. *Feddes Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 63: 229–251.
- Willis K. J., Rudner E. & Sümegi P. (2000). The Full-Glacial Forests of Central and Southeastern Europe. *Quaternary Research* 53(02): 203–213.
- Wolfe K. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics* (2): 333–341.
- Wölk A., Winterfeld G. & Röser M. (2015). Genome evolution in a Mediterranean species complex: phylogeny and cytogenetics of *Helictotrichon* (Poaceae) allopolyploids based on nuclear DNA sequences (rDNA, topoisomerase gene) and FISH. *Systematics and Biodiversity* 13(4): 326–345.
- Wood T. E., Takebayashi N., Barker M. S., Mayrose I., Greenspoon P. B. & Rieseberg L. H. (2009). The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (33): 13875–13879.
- Wu S., Han B. & Jiao Y. (2020). Genetic Contribution of Paleopolyploidy to Adaptive Evolution in Angiosperms. *Molecular Plant* 13: 59–71.

9 Přílohy

Příloha I

Charakter porostu na slatinné louce, lokalita Mělnická Vrutice (VRUTV).



© Milan Štech

Charakter porostu na sádrovci v pohoří Harz, lokalita Stempeda (STEMV).



© Milan Štech

Příloha II

Charakteristické cihlové zbarvení listů druhu *C. varia* na konci vegetační sezóny.



© Milan Štech

Příloha III

Lata druhu *C. varia*, kopinatě rozevřená před dobou květu.



© Milan Štech

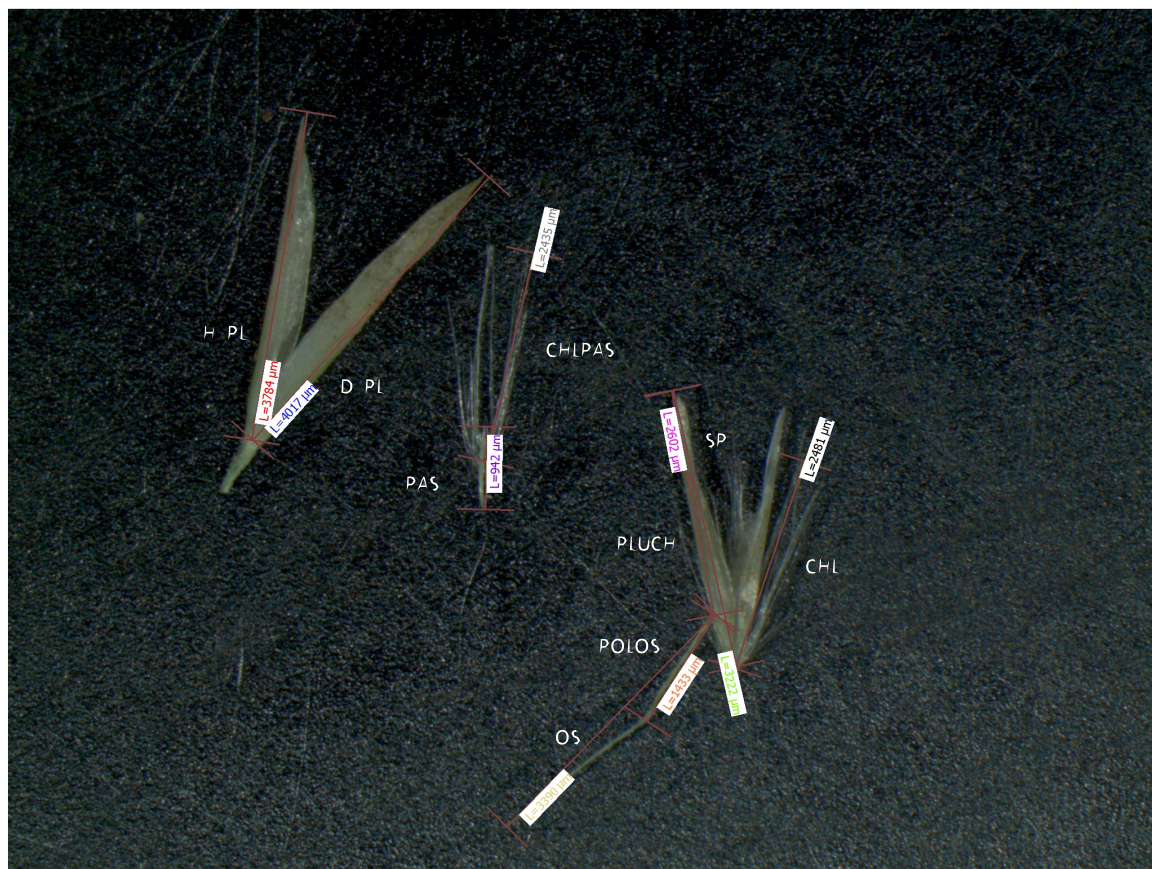
Klásek jedince druhu *C. varia* z herbářového materiálu sebraného v době květu.



© Milan Štech

Příloha IV

Vybrané morfologické znaky měřené v programu QuickPHOTO CAMERA, vypreparovaný klásek pochází z rostliny Niedersachswerfen-5, druh *C. varia*.



Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Datum	Nadm. výška	Zem. šířka	Zem. délka	Popis lokality
<i>C. epigejos</i>	OBERE	X			2017-07-31	512	48° 02' 034.93"N	12° 33' 39.85"E	Německo, Bavorsko, Trostberg, Oberwimm: při vjezdu do lomu cca 1 km JV od kostela v obci Tinning
<i>C. epigejos</i>	ZEUTE	X			2017-08-08	1060	47° 03' 040.81"N	14° 21' 24.14"E	Rakousko, Neumarkt in Steiermark, Zeutschach: v lesním porostu kolem asfaltové silničky 1400 m od kostela v obci Zeutschach
<i>C. epigejos</i>	ZBYTE	X			2017-06-22	260	50° 17' 40.7"N	16° 03' 026.82"E	Česko, České Meziříčí: okraj lesa na okraji PR Zbytka ca 1,3 km SV od kostela v obci
<i>C. epigejos</i>	BELAE	X			2017-06-23	270	50° 29' 51.97"N	14° 51' 50.69"E	Česko, Bělá pod Bezdězem: les nad silnicí ca 400 m JZ od železniční zastávky Bělá pod Bezdězem zastávka
<i>C. epigejos</i>	OSSME				2017-07-18	230	50° 52' 7.39"N	11° 33' 13.82"E	Německo, Durynsko, Oßmaritz: okraj lesa ca 1,3 km JJV od kostela v obci
<i>C. epigejos</i>	QUEME				2017-07-18	210	51° 29' 9.67"N	11° 08' 016.51"E	Německo, Sasko-Anhaltsko, Questenberg: mez u cesty ca 1,66 km JV od kostela v obci
<i>C. epigejos</i>	QUESE				2017-07-18	250	51° 29' 34.01"N	11° 07' 07.72"E	Německo, Sasko-Anhaltsko, Questenberg: SV strmé svahy (sádrovec) ca 180 m J od centra obce
<i>C. epigejos</i>	HOMOE	X			2017-09-16	820	48° 54' 22.61"N	18° 19' 27.88"E	Slovensko, Dolná Poruba: JV svah kóty 907 (Homôľka) ca 2,1 km V od kostela v obci
<i>C. epigejos</i>	TERCE	X			2017-09-16	580	49° 14' 43.76"N	19° 02' 019.86"E	Slovensko, Terchová: skalnatý svah na pravém břehu Varínky u parkoviště ca 1,5 km JJV od kostela v obci
<i>C. epigejos</i>	LUBOE				2017-09-17	480	49° 07' 020.03"N	19° 09' 058.43"E	Slovensko, Ľubochňa: podél červené turistické značky ca 130 m S od kostela sv. Cyrila a Metoděje
<i>C. epigejos</i>	HARME	X			2017-09-19	560	48° 48' 58.79"N	19° 02' 038.72"E	Slovensko, Dolný Harmanec: podél silnice ca 400 m SV od Harmanecké jeskyně

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Datum	Nadm. výška	Zem. šířka	Zem. délka	Popis lokality
<i>C. arundinacea</i>	BEKAA	X	X	X	2017-08-06	490	45° 35' 56.87"N	13° 54' 38.65"E	Slovensko, Beka: v lesním porostu podél silnice, 300 m SZ od kóty 503 (Mežecí vrh)
<i>C. arundinacea</i>	LOUCA	X			2017-06-23	240	50° 17' 59.46"N	15° 00' 049"E	Česko, Loučeň: lesní loučka ca 600 m SZ od Loučenské myslivny S od obce
<i>C. arundinacea</i>	BELAA	X	X		2017-06-23	270	50° 29' 51.97"N	14° 51' 50.69"E	Česko, Bělá pod Bezdězem: les nad silnicí ca 400 m JZ od železniční zastávky Bělá pod Bezdězem zastávka
<i>C. arundinacea</i>	CIKDA				2017-06-23	400	50° 16' 11.64"N	13° 53' 37.9"E	Česko, Bílichov: podél lesní cesty u Samotínského potoka, ca 100 m Z od louky Cikánský dolík
<i>C. arundinacea</i>	QUEJA	X			2017-07-18	270	51° 29' 9.67"N	11° 08' 016.51"E	Německo, Sasko-Anhaltsko, Questenberg: JZ svahy nad obcí ca 470 m JV od kostela v obci
<i>C. arundinacea</i>	QUESA	X			2017-07-18	250	51° 29' 34.01"N	11° 07' 07.72"E	Německo, Sasko-Anhaltsko, Questenberg: SV strmé svahy (sádrovec) ca 180 m J od centra obce
<i>C. arundinacea</i>	ILFEA	X			2017-07-19	280	51° 35' 4.92"N	10° 47' 17.99"E	Německo, Durynsko, Iffeld: okraj lesní cesty nad železniční zastávkou Iffeld Neanderklinik
<i>C. arundinacea</i>	HAURA	X			2017-07-19	530	51° 29' 0.2"N	10° 25' 32.92"E	Německo, Durynsko, Hauröden: světlý les podél hřebenové cesty ca 1,2 km Z od kostela v obci
<i>C. arundinacea</i>	DEMAA	X			2017-09-18	840	49° 00' 02.38"N	19° 34' 59.2"E	Slovensko, Demänovská dolina: u mostku na parkovišti na pravém břehu Demänovky ca 250 m SZ od Demänovské jeskyně svobody

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Datum	Nadm. výška	Zem. šířka	Zem. délka	Popis lokality
<i>C. varia</i>	FLINV	X		X	2017-07-31	560	47° 43' 3.23"N	12° 07' 026.44"E	Německo, Bavorsko, Flintsbach am Inn: na úpatí skal cca 570 m ZSZ od zříceniny hradu Unter-Falkenstein
<i>C. varia</i>	KUFSV	X	X	X	2017-07-31	550	47° 34' 52.8"N	12° 10' 45.94"E	Rakousko, Kufstein: podél červené turistické značky na úpatí JZ svahu kóty 641 (Kienberg), V okraj města
<i>C. varia</i>	STANV	X	X	X	2017-08-01	586	47° 22' 19.92"N	11° 42' 49.19"E	Rakousko, Stans: skály podél cesty k soutěsce Wolfsklamm, 330 m SZ od kostela Laurentiuskirche
<i>C. varia</i>	PEBEV	X	X	X	2017-08-02	1412	47° 00' 037.28"N	12° 18' 46.37"E	Rakousko, Hinterbichl, Ströden: stráň ve svahu nad cestou podél řeky Isej, 900 m V od vodopádu Grossbachfall
<i>C. varia</i>	KALSV	X	X	X	2017-08-02	1362	46° 59' 53.95"N	12° 38' 40.52"E	Rakousko, Kals am Grossglockner: nad zídtkou u odpočívadla před obcí, 280 m J od kostela v obci
<i>C. varia</i>	NIKOV	X			2017-08-02	655	46° 46' 46.55"N	12° 53' 29.65"E	Rakousko, Nikolsdorf: podél prašné cesty na pravém břehu řeky Drau, 270 m Z od železniční zastávky
<i>C. varia</i>	FORNV	X		X	2017-08-03	810	46° 23' 48.73"N	12° 43' 32.6"E	Itálie, Forni di Sotto: svah nad pramenem u silnice, 850 V od ústí tunelu Galleria di Passo della Morte
<i>C. varia</i>	GIOZV	X	X	X	2017-08-03	490	46° 10' 25.56"N	12° 11' 21.12"E	Itálie, Bolzano Bellunese, Gioz: podél pěšiny vedoucí od silnice k domu na J svahu, 540 m J od kóty 657 (Col Castei)
<i>C. varia</i>	LENZV	X	X	X	2017-08-04	950-1000	45° 55' 9.54"N	10° 44' 19.8"E	Itálie, Lenzumo: na skalách kolem serpentín cyklostezky, 800-1000 m JZ od kóty 1474 (La Rocca)

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Datum	Nadm. výška	Zem. šířka	Zem. délka	Popis lokality
C. varia	LIVEV	X	X	X	2017-08-07	720-780	46° 12' 11.43"N	13° 35' 47.29"E	Slovinsko, Livek: ve svahu podél pěšiny místní turistické značky do vsi Perati, 300 m SZ od kostela v obci Livek
C. varia	PODKV	X		X	2017-08-07	930	46° 29' 54.36"N	13° 45' 41.3"E	Slovinsko, Podkoren: ve svahu nad serpentinou na hlavní silnici na S okraji obce
C. varia	ZEUTV	X		X	2017-08-08	1060	47° 03' 040.81"N	14° 21' 24.14"E	Rakousko, Neumarkt in Steiermark, Zeutschach: v lesním porostu kolem asfaltové silničky 1,4 km JZ od kostela v obci Zeutschach
C. varia	ZBYTV		X	X	2017-06-22	260	50° 17' 43.33"N	16° 03' 028.98"E	Česko, České Meziříčí: okolí příkopu ve vlhké louce v PR Zbytka ca 1,4 km SV od kostela v obci
C. varia	LOUCVZ			X	2017-06-23	220	50° 18' 5.4"N	15° 01' 04.8"E	Česko, Loučeň: podmáčená zarostlá loučka na SV břehu rybníčka Olšový, ca 500 m (S)SZ od Loučenské myslivny S od obce
C. varia	LOUCV	X	X	X	2017-06-23	220	50° 17' 58.2"N	15° 01' 08.11"E	Česko, Loučeň: podmáčená loučka na JV břehu rybníčka Dubový ca 300 m SZ od Loučenské myslivny S od obce
C. varia	BELAV			X	2017-06-23	270	50° 29' 52.76"N	14° 51' 49.28"E	Česko, Bělá pod Bezdězem: okraj hřebínku v lese nad silnicí ca 400 m JZ od železniční zastávky Bělá pod Bezdězem zastávka
C. varia	MABEV	X		X	2017-06-23	490	50° 32' 19.28"N	14° 42' 53.86"E	Česko, Bezděz: JV svahy kóty 577 (Malý Bezděz)
C. varia	VRUTV	X	X	X	2017-06-23	190	50° 20' 33.22"N	14° 32' 31.38"E	Česko, Mělnická vrutice: slatinná louka ca 200 m JZ od železniční zastávky
C. varia	GIKDV		X	X	2017-06-23	390	50° 16' 15.38"N	13° 53' 53.59"E	Česko, Bílichov: slatinná louka Cikánský dolík ca 1,6 km SZ od obce
C. varia	CIKDVZ			X	2017-06-23	400	50° 16' 10.42"N	13° 53' 25.55"E	Česko, Bílichov: lesní loučka ca 300 m Z od louky Cikánský dolík

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Datum	Nadm. výška	Zem. šířka	Zem. délka	Popis lokality
C. varia	QUESV	X		X	2017-07-18	250	51° 29' 34.01"N	11° 07' 07.72"E	Německo, Sasko-Anhaltsko, Questenberg: SV strmé svahy (sádrovec) ca 180 m J od centra obce
C. varia	STEMV	X	X	X	2017-07-19	230	51° 31' 21.86"N	10° 55' 10.96"E	Německo, Durynsko, Stempeda: úpatí skal na JZ okraji obce
C. varia	HARZV	X	X	X	2017-07-19	250	51° 33' 40.61"N	10° 45' 24.19"E	Německo, Durynsko, Niedersachswerfen: úpatí sádrovcových skal u rybníka Tanzteich ca 1,1 km od kostela v obci
C. varia	HAURV	X	X	X	2017-07-19	530	51° 29' 0.02"N	10° 25' 32.56"E	Německo, Durynsko, Hauröden: světlý les podél hřebenové cesty ca 1,2 km Z od kostela v obci
C. varia	HOMOV	X		X	2017-09-16	820	48° 54' 22.61"N	18° 19' 27.88"E	Slovensko, Dolná Poruba: JV svah kóty 907 (Homôľka) ca 2,1 km V od kostela v obci
C. varia	TERCV	X		X	2017-09-16	580	49° 14' 43.76"N	19° 02' 019.86"E	Slovensko, Terchová: skalnatý svah na pravém břehu Varinky u parkoviště ca 1,5 km JJV od kostela v obci
C. varia	LUBOV	X	X	X	2017-09-17	480	49° 07' 020.03"N	19° 09' 058.43"E	Slovensko, Ľubochňa: podél červené turistické značky ca 130 m S od kostela sv. Cyrila a Metoděje
C. varia	DEMAV	X	X	X	2017-09-18	840	48° 59' 58.63"N	19° 35' 0.38"E	Slovensko, Demänovská dolina: podél parkoviště na pravém břehu Demänovky ca 250 m SZ od Demänovské jeskyně svobody
C. varia	STRAV	X	X	X	2017-09-19	820	48° 52' 27.08"N	20° 19' 48.97"E	Slovensko, Stratená: skály naproti parkovišti před tunelem Stratená ca 750 m SZ od kostela v obci
C. varia	MURAV	X		X	2017-09-19	450	48° 44' 40.56"N	20° 02' 044.41"E	Slovensko, Muraň: JV svah nad hřbitovem na S okraji obce
C. varia	HARMV	X	X	X	2017-09-19	560	48° 48' 58.79"N	19° 02' 038.72"E	Slovensko, Dolný Harmanec: podél silnice ca 400 m SV od Harmanecké jeskyně

Příloha VI

Lokality druhů *C. varia*, *C. arundinacea*, *C. epigejos*, *C. brachytricha* a nejistého taxonomického zařazení dodané jinými sběrateli nebo sebrané v předchozích letech.

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Zem. šířka	Zem. délka	Sběratel	Popis lokality
<i>C. arundinacea</i>	DUBNA	X			48° 58' 35.29"N	14° 20' 10.54"E	Štech M.	Česko, jižní Čechy, Dubné: les J od silnice Dubné-Čakov, ca 800 m JJV od kóty vrcholu hřebenu Vráže Z(S)Z od obce
<i>C. arundinacea</i>	LEDOA	X		X	48° 53' 41.75"N	15° 51' 18.54"E	Štech M.	Česko, Podýjí, Lesná: les u lesní cesty k Ledovým slujím ca 1,67 km JZ od kostela v obci
<i>C. arundinacea</i>	ROZSA	X			49° 12' 30.16"N	19° 02' 01.87"E	Ekr L.	Slovensko, Malá Fatra, Terchová: vápencový lesní svah v lese nad zeleně značenou turistickou cestou ca 630 m Z od Chaty Vrátna-výchoziště lanovky ca 5,5 km J od kostela v centru obce
<i>C. arundinacea</i>	MILEA	X			50° 33' 10.66"N	13° 55' 50.42"E	Štech M. et Štechová T.	Česko, České středohoří, světlá doubrava na J svahu Milešovsky
<i>C. arundinacea</i>	NIZKA	X			49° 53' 22.99"N	17° 27' 30"E	Koutecký P.	Česko, Nizký Jeseník, Lomnice: travnatý příkop lesní cesty v kulturní smřčině ca 1,5 km JV od kóty 693 (Chlum)
<i>C. arundinacea</i>	STIAA	X		X	48° 24' 19.3"N	18° 52' 12.7"E	Ekr L.	Slovensko, Štiavnické vrchy, Sítro: svahová vlhká nekosená louka
<i>C. arundinacea</i>	LUCHA		X	X	42° 43' 16.64"N	0° 37' 16.97"E	Štech M.	Francie, Bagnères-de-Luchon: svah nad údolím potoka Ruisseau de la Giere ca 8,1 km JJV od kostela v obci
<i>C. arundinacea</i>	VISAA		X	X	49° 31' 3.65"N	18° 31' 31.58"E	Štech M. et Štechová T.	Česko, Beskydy, Visalaje: les 200 m Z od parkoviště na J okraji areálu Visalaje
<i>C. arundinacea</i>	KASOA		X	X	49° 13' 40.76"N	24° 41' 40.2"E	Štech M.	Ukrajina, Bovshiv: stepní porosty na kótě Kasova Gora ca 2,8 km S od kostela v obci
<i>C. arundinacea</i>	MARUA			X	45° 31' 22.08"N	25° 16' 29.07"E	Lučanová M.	Rumunsko, Piatra Craiului, Măgura: skalky kolem turistické cesty ca 1,6 km Z od obce
<i>C. arundinacea</i>	IVANA			X	45° 31' 22.08"N	25° 16' 29.07"E	Štech M.	Ukrajina, Ivano-Frankivsk: doubrava J od silnice H-10 ca 9,4 km JJ(V) od nádraží ve městě
<i>C. arundinacea</i>	SNINA			X	48° 55' 45.48"N	22° 11' 17.16"E	Štech M.	Slovensko, Sninský Kameň, Zemplínské Hamre: okolí vrchu Sninský Kameň ca 3,4 km JV od kostela v obci

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Zem. šířka	Zem. délka	Sběratel	Popis lokality
<i>C. arundinacea</i>	PORAA			X	48° 53' 20.08"N	17° 37' 21"E	Štech M.	Česko, Porážky, Vápenky: NPR Vápenky ca 1,8 km SZ od kaple v obci
<i>C. arundinacea</i>	PIKUA			X	48° 50' 9.6"N	23° 00' 038.88"E	Štech M.	Ukrajina, Bilasovytsia: lesy na SV svahu hory Pikui ca 4,3 km Z od obce
<i>C. arundinacea</i>	OLESA			X	49° 33' 5.4"N	16° 22' 52.32"E	Štech M.	Česko, Lhota u Olešnice: okraj lesní silničky na levém břehu Tresenského potoka ca 1 km SZ od kaple v obci
<i>C. arundinacea</i>	FRAUA			X	51° 13' 0.26"N	9° 52' 31.73"E	Štech M.	Německo, Hesensko, Vockerode: SV svah vrchu Kalbe u turistické značky k Frau-Holle Teich ca 2,2 km SZ od obce
<i>C. arundinacea</i>	VIDUA			X	58° 17' 47.44"N	22° 05' 016.66"E	Štech M.	Estonsko, ostrov Saaremaa, Viidu: les u cesty k rašelinšti Viddu Soo ca 2,7 km ZSZ od obce
<i>C. arundinacea</i>	BORJA			X	41° 45' 51.95"N	43° 11' 4.26"E	Štech M.	Gruzie, Borjomi, Atskuri: les u turistické cesty ca 4 km SSV od obce Atskuri
<i>C. arundinacea</i>	SUMEA			X	40° 41' 22.2"N	39° 39' 29.98"E	Štech M.	Turecko, Trabzon, Maçka: zalesněné svahy J od kláštera Sümela Monastiri
<i>C. arundinacea</i>	JULIA			X	50° 40' 6.51"N	14° 45' 24.11"E	Štech M. et Štechová T.	Česko, Českolipsko, Vranov: Juliina vyhlídka na JZ úpatí vrchu Ralsko ca 340 m SV od obce
<i>C. arundinacea</i>	KRHRA			X	50° 46' 18.52"N	13° 53' 41.32"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Krušné hory, Krásný Les: prameniště u staré cesty přes pravostranný přítok Hraničního potoka ca 3,1 km Z od zámku v obci
<i>C. arundinacea</i>	MLBRA			X	49° 29' 5.27"N	15° 20' 2.34"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Mladé Bříště: lesnatý svah nad silničkou na levém břehu Kladinského potoka ca 620 m J od kostela v obci
<i>C. arundinacea</i>	NEKOA			X	50° 03' 053.4"N	16° 32' 26.19"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, východní Čechy, Nekoř: levý břeh Divoké Orlice V od mostu v obci
<i>C. arundinacea</i>	KURMA			X	57° 34' 2.82"N	24° 25' 31.01"E	Štech M. et Štechová T.	Lotyšsko, Ķurmraigs: zalesněný svah nad pravým břehem potůčku u samoty Ķirulji ca 4,4 km SV od středu obce
<i>C. arundinacea</i>	CIKHA			X	49° 38' 48.36"N	15° 56' 34.41"E	Štech M.	Česko, Cikháj: les při silničce s modrou turistickou značkou ca 1,6 km Z od středu obce

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Zem. šířka	Zem. délka	Sběratel	Popis lokality
C. epigejos	MARIE	X			47° 46' 53.62"N	15° 14' 10.09"E	Štech M., Pachschwöll C.	Rakousko, Štýrsko, Mariazelli: okraj lesní cesty J od spolkové silnice B71, ca 6,2 km Z(S)Z od poutního místa
C. epigejos	OBLZE	X			47° 48' 22.82"N	15° 04' 045.18"E	Štech M., Pachschwöll C.	Rakousko (Dolní Rakousko), Ybbstalské Alpy: okraj lesní silničky nad jezerem Obersee ca. 7 km JV od obce Lunz am See
C. epigejos	BEDRE			X	49° 28' 17.24"N	16° 27' 1"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Českomoravská vrchovina, Bedřichov: údolí Bedřichovského potoka ca 1 km SSZ od obce
C. epigejos	BRNAE			X	50° 28' 44.72"N	14° 08' 054.92"E	Piherová J. et Štech M.	Česko, Pooohří, Brňany: levý břeh Ohře ca 200 m VJV od záměčku v obci
C. epigejos	CERIE			X	49° 22' 39.72"N	15° 26' 27.49"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Českomoravská vrchovina, Hojkov: okraj lesní cesty ca 360 m VSV od vrcholu vrchu Čeřínek JV od obce
C. epigejos	CIKAE			X	50° 16' 15.82"N	13° 53' 51.29"E	Štech M.	Česko, Džbán, Bílichov: slatinná louka Cikánský dolík ca 1,6 km SZ od obce
C. epigejos	DEBRE			X	47° 30' 34.7"N	21° 50' 27.2"E	Štech M. et Drahník P.	Maďarsko, Debrecen, Haláp: paseka ca 2,3 km JJV od obce
C. epigejos	ERLLE			X	51° 09' 025.49"N	12° 49' 26.69"E	Piherová J. et Štech M.	Německo, Sasko, Erlin: pravý břeh řeky Freiburger Mulde ca 70 m od železničního přejezdu na V okraji obce
C. epigejos	DOBRE			X	50° 22' 10.56"N	13° 46' 56.71"E	Piherová J. et Štech M.	Česko, Pooohří, Dobroměřice: levý břeh Ohře, ca 50 m SZ od mostu JZ od obce
C. epigejos	HERTE			X	49° 28' 24.74"N	16° 26' 57.26"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Českomoravská vrchovina, Bedřichov: chráněné území Hersica cca 1,7 km SSZ od obce
C. epigejos	HLASE			X	49° 30' 14.44"N	14° 45' 27.79"E	Štech M.	Česko, Táboarsko, Hlasivo: degradované louky v údolí potoka Mindlovka ca 830 m SSV od kostela v obci
C. epigejos	HOSTE			X	48° 44' 39.09"N	14° 09' 042.89"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Šumava, Hostimova Lhota: prameniště Z od silničky ca 150 m V od osady
C. epigejos	HRUBE			X	49° 40' 8.62"N	17° 26' 7.18"E	Štech M. et Štechová T.	Česko, Olomoucko, Hrubá Voda: okraj cesty ca 230 m ZJZ od železniční zastávky

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Zem. šířka	Zem. délka	Sběratel	Popis lokality
C. epigejos	HSTUE			X	49° 57' 52.6"N	16° 48' 16.2"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Hanušovická pahorkatina, Horní Studénky: prameniště na JV břehu rybníka Sychrov ca 850 m S od kostela v obci
C. epigejos	JABKE			X	50° 20' 19.84"N	15° 00' 030.55"E	Štech M. et Štechová T.	Česko, Střední Čechy, Jabkenice: zbytek louky na J břehu rybníka Zachkov ca 1,5 km SSZ od obce
C. epigejos	MITTE			X	50° 59' 23.64"N	13° 00' 032.65"E	Piherová J. et Štech M.	Německo, Sasko, Mittweida: pravý břeh řeky Zschopau ca 300 m SV od parkoviště u vodní elektrárny
C. epigejos	NAKLE			X	50° 45' 4.68"N	13° 58' 21.93"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Krušné hory, Nakléřov: degradované louky 940 m SSZ od křižovatky v obci
C. epigejos	NOVOE			X	50° 32' 58.63"N	13° 16' 56.96"E	Štech M.	Česko, Krušné hory, Načetín, Novodomské rašeliniště: okraj cesty ca 2,8 km J od obce
C. epigejos	PAREE			X	49° 36' 22.8"N	15° 19' 10.34"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Českomoravská vrchovina, Proseč: V okraj rybníka Pařez ca 900 m SZ od obce
C. epigejos	PETRE			X	50° 49' 7.46"N	13° 59' 25.58"E	Schaabová V. et Štech M.	Česko, Petrovice: louky v nivě Petrovického potoka ca 740 m SV od hraničního přechodu Petrovice
C. epigejos	SERME			X	51° 09' 028.51"N	12° 48' 9.79"E	Piherová J. et Štech M.	Německo, Sasko, Sermuth: Na V rohu parkoviště u restaurace "Zur Eintracht" V od obce
C. epigejos	SCHOE			X	51° 03' 036.9"N	13° 01' 014.2"E	Piherová J. et Štech M.	Německo, Sasko, Schönberg: pravý břeh řeky Zschopau ca 580 m JZ od obce
C. epigejos	SVEDE			X	55° 30' 56.12"N	13° 14' 50.24"E	Štech M.	Švédsko, Svedala, ruderální plochy u čerpací stanice na SV okraji obce
C. epigejos	WALDE			X	51° 04' 030.43"N	13° 01' 028.45"E	Piherová J. et Štech M.	Německo, Sasko, Waldheim: levý břeh řeky Zschopau ca 240 m SSV od mostu v centru města
C. epigejos	YSTAE			X	55° 25' 22.15"N	13° 50' 10.18"E	Štech M.	Švédsko, Ystad: ruderální plochy JV od přístavu
C. epigejos	ZATEE			X	50° 19' 47.42"N	13° 31' 9.8"E	Štech M.	Česko, Žatecko, Žatec: pravý břeh Ohře ca 150 JV od železničního mostu přes Ohři na SZ okraji města
C. epigejos	ZEMAE			X	49° 31' 15.06"N	14° 29' 38.36"E	Štech M.	Česko, Pohořelice: litorální porosty rybníka v PP Zeman, ca 450 m JV od obce

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Zem. šířka	Zem. délka	Sběratel	Popis lokality
C. varia	ALTAV	X		X	47° 38' 51.85"N	13° 47' 31"E	Ekrat L.	Rakousko, Alpy, Altaussee, na vápenci při S okraji jezera Altausseeer See
C. varia	DACHV	X		X	47° 25' 26"N	13° 43' 24"E	Koutecký P.	Rakousko, Dachstein, Schladming: řídký bor na vápenci a suťovitý svah u silnice na Z svahu hory Rössingkogel ca 720 m JJV od obce Rössing SV od Schladmingu
C. varia	LOIBV	X	X	X	46° 25' 59.02"N	14° 15' 41"E	Koutecký P.	Slovensko, Tržič: sedlo Ljubelj (Loibpass), les na J svahu nad parkovištěm u ústí silničního tunelu
C. varia	MARIV	X		X	47° 46' 53.62"N	15° 14' 10.09"E	Štech M., Pachschwöll C.	Rakousko, Štýrsko, Mariazell: okraj lesní cesty J od spolkové silnice B71, ca 6,2 km Z(S)Z od poutního místa
C. varia	OBERV	X		X	47° 48' 22.82"N	15° 04' 04.18"E	Štech M., Pachschwöll C.	Rakousko (Dolní Rakousko), Ybbstalské Alpy: okraj lesní silničky nad jezerem Obersee ca. 7 km JV od obce Lunz am See (okres Scheibbs)
C. varia	OFFEV	X		X	47° 44' 10.07"N	13° 50' 45.45"E	Lučanová M.	Rakousko, Ebensee am Traunsee, Offensee: podél cesty při výstupu na Rinnerhütte, u skalky se svatým obrázkem a pramenem
C. varia	TIEFV	X		X	46° 38' 49.31"N	9° 34' 52.5"E	Ekrat L., Krejčí J., Vejvodová K.	Švýcarsko, Tiefencastel: okraj silnice č. 3 ca 1,6 km J od obce
C. varia	CRESV	X		X	45° 47' 39.7"N	6° 29' 2.3"E	Ekrat L., Krejčí J., Vejvodová K.	Francie, Crest-Voland: okraj silnice Route d'Héry ca 1,33 km Z od obce
C. varia	BELTV	X		X	49° 15' 51.7"N	20° 14' 3.4"E	Ekrat L.	Slovensko, Belianské Tatry, Ždiar: teráska na vápenci nad říčkou Biela
C. varia	VIDUV		X	X	58° 17' 45.92"N	22° 04' 05.12"E	Štech M.	Estonsko, ostrov Saaremaa, Viidu: JV okraj rašelinisté Viidu soo ca 3,1 km ZSZ od obce
C. varia	TRAUV			X	47° 52' 33"N	13° 48' 56"E	Koutecký P.	Rakousko, Traunstein: lesy kolem turistické cesty Klettersteig Hans Hernler Steig ca 340 m V od jezera
C. varia	WILDV			X	47° 42' 11.84"N	13° 51' 40.67"E	Lučanová M.	Rakousko, Altaussee, Wildenseetal: 330 m SSV od rozcestí Wildenseetal, vápencové škrapy

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Zem. šířka	Zem. délka	Sběratelel	Popis lokality
C. varia	ALMSV			X	47° 45' 46.66"N	13° 56' 51.85"E	Štech M.	Rakusko, Homorakouské Alpy, Grünau im Almtal, Habernau: světlé lesy na pravém břehu potoka Weißeneggbach ca 2 km JJZ od obce Habernau
C. varia	PIBUV			X	47° 11' 41.17"N	10° 53' 11.25"E	Štech M. et Štechová T.	Rakusko, Ötztal, Piburg: skalky nad jezerem Piburger See JV od obce
C. varia	TARAV			X	43° 51' 47.34"N	19° 24' 3.82"E	Štech M.	Srbsko, distr. Zlatibor: Lazici: sutě podél turistické cesty na okraj lesní silničky po břehu přehrady Zaovinsko jezero ca 970 m Z od obce
C. varia	ROZSV			X	49° 13' 54.44"N	19° 04' 050.8"E	Štech M. et Štechová T.	Slovensko, Malá Fatra, Štefanová: sutě při turistické cestě do sedla Medziholie ca 1,24 km V(J)V od centra obce
C. varia	TARJV			X	43° 53' 52.8"N	19° 23' 9.6"E	Štech M.	Srbsko, distr. Zlatibor: Kruscica: okraj lesní silničky po břehu přehrady Zaovinsko jezero ca 360 m VJV od obce
C. varia	TRENV			X	46° 22' 57.65"N	13° 45' 37.79"E	Štech M.	Slovensko, Julské Alpy, Trenta: okraj lesa v údolí říčky Zadnjica ca 660 m VSV od středu obce
C. varia	VADUV			X	49° 08' 044.37"N	19° 18' 17.49"E	Štech M.	Slovensko, Chočské vrchy, Valašská Dubová: lesní světliny nad turistickou cestou na Velký Choč ca 1,2 km SV od kostela v obci

Druh	Kód lokality	cytometrie	morfometrika	cpDNA	Zem. šířka	Zem. délka	Sběratel	Popis lokality
<i>C. brachytricha</i>	DALNB			X	44° 34' 38.9"N	135° 33' 20"E	Kučera J.	Rusko, Dalnegorsk: u cesty poblíž lomu Verkhnyi Rudnik, vápenec
xxx	MI7025HEX	X		X	50° 33' 10.87"N	13° 55' 45.88"E	Štech M.	Česko, České středohoří, Milešov: dolní část JZ svahu Milešovky ca 1,53 km SSZ od zámku v obci
xxx	MI723TETR	X		X	50° 33' 7.13"N	13° 55' 50.38"E	Štech M.	Česko, České středohoří, Milešov: dolní část JZ svahu Milešovky ca 1,4 km SSZ od zámku v obci