

Bakalářská práce, Vojtěch Zeisek, Katedra botaniky, Přf UK, Praha, 2007

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Bakalářská práce

**Fylogeografie a možnosti šíření vodních klonálních
rostlin**

(Phylogeography and dispersal of water clonal plants)

Vojtěch Zeisek

Školitel: Mgr. Tomáš Fér

Praha, 2007

Obsah

1	Prohlášení	3
2	Poděkování	4
3	Abstrakt	6
4	Klíčová slova	6
5	Abstract (English)	7
6	Keywords	7
7	Úvod	8
	7.1 Biogeografie	8
	7.2 Vodní rostliny	9
8	Literární rešerše	10
	8.1 Biogeografie & vodní rostliny	11
	8.2 Klonalita u rostlin	12
	8.2.1 Klonální rostliny a vodní prostředí	12
	8.3 Fylogeografie & vodní rostliny	13
	8.3.1 Fylogeografie	14
	8.3.2 Fylogeografie vodních rostlin	15
	8.3.3 Fylogeografie na malé škále	15
	8.3.3.1 Říční systémy	16
	8.4 Molekulární markery, klonalita & vodní rostliny	18
	8.4.1 Mikrosatelity	20
	8.4.2 Chloroplastová DNA	21
	8.5 Šíření v říčních systémech	21
	8.6 <i>Nuphar lutea</i>	24
9	Praktická část	27
	9.1 Metodika	28
	9.1.1 Sběr materiálu v terénu	28
	9.1.2 Laboratorní zpracování vzorků	29
	9.1.3 Vyhodnocení primárních dat	35
	9.2 Výsledky	36
	9.3 Diskuze	41
	9.4 Závěr	42

10 Plánované téma magisterské diplomové práce	42
10.1 Otázky	43
10.2 Způsob řešení	44
11 Seznam literatury	46
12 Přílohy	53



Obrázek 1: Stulík žlutý (*Nuphar lutea* (L.) Sm.); převzato z <http://www.edenkert.hu/pics/kertapolas/nuphar.jpg> [10. 4. 2007]

1. Prohlášení

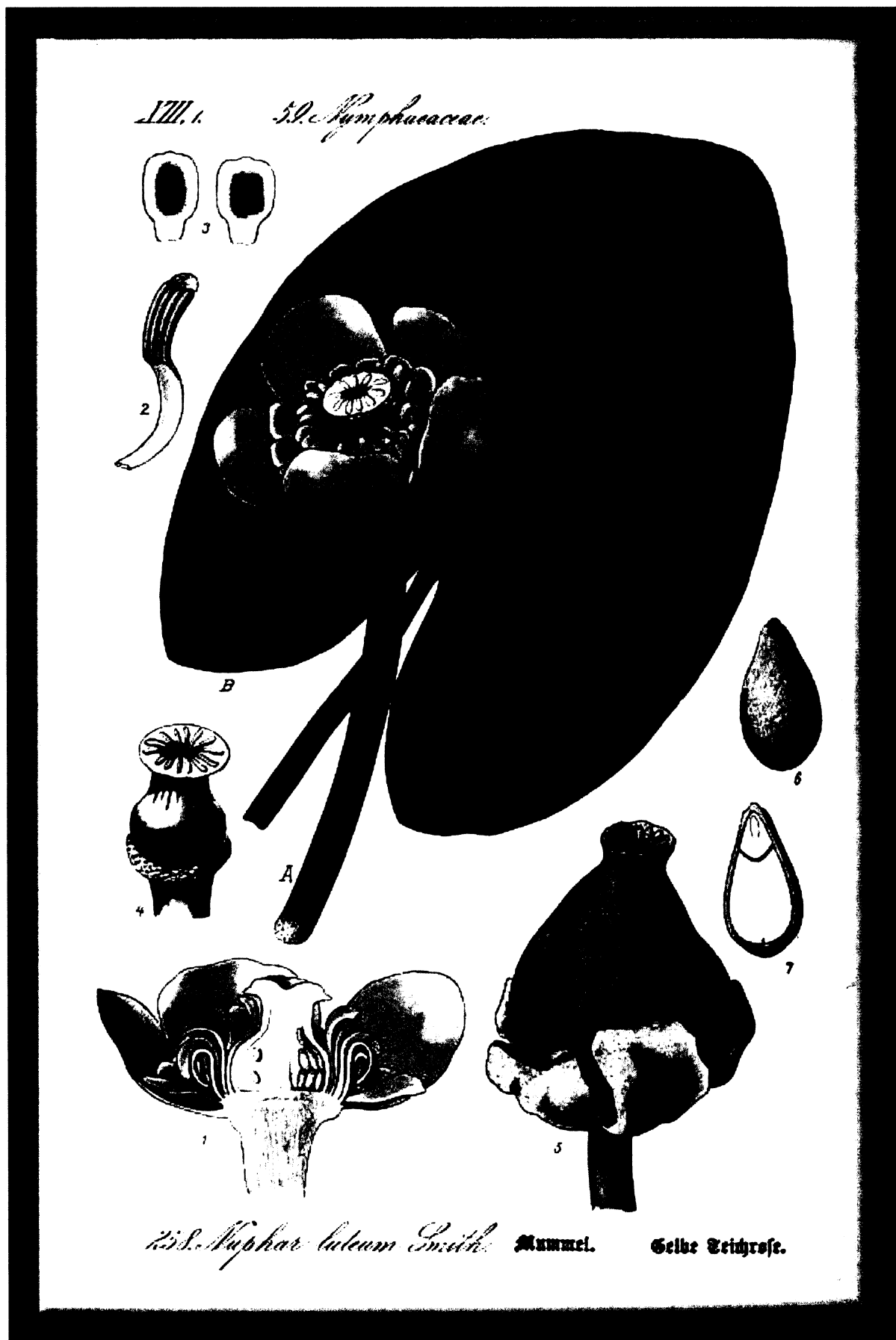
Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně. Všechny použité prameny jsou uvedeny v závěru, v seznamu literatury.

v *Praze* dne *3.5.2007* podpis *Zeisek*

2. Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mi nejen při psaní této práce poskytli cenné rady i ještě cennější kritiku.

- Na prvním místě bych chtěl uvést svého školitele, Mgr. Tomáše Féra, jehož kritické připomínky a všestranné znalosti pomohly posunout práci kým směřem.
- Moc děkuji všem z laboratoře DNA katedry botaniky, zvláště pak Veronice Máchalové a Mgr. Evě Rejzkové, které mě zasvětily do tajů laboratorní práce a projevíly při tom nezměrnou trpělivost.
- Mgr. Haně Dvořákové bych rád vyjádřil své díky za pečlivé přečtení a připomínkování první verze rukopisu.
- Všem svým učitelům bych rád poděkoval za to, že mě obdařili potřebnými znalostmi a hlavně mě naučili jak nad problémy přemýšlet.
- A v neposlední řadě děkuji mým přátelům a spolužákům, kteří to se mnou v době intenzivního tvoření této práce vydrželi.



Obrázek 2: *Nuphar luteum* (L.) Sm.; převzato z Thomé (1885).

3. Abstrakt

V předkládané bakalářské práci nejprve představuji současné poznatky týkající se fyto geografie, zvláště molekulární fylogeografie vodních klonálních cévnatých rostlin a možnosti jejich šíření. Bez molekulárních technik nelze řadu otázek o historii, šíření, příbuznosti a populační struktuře rostlin vůbec vyřešit. Dalšími významnými prvky ovlivňujícími život, šíření a rozšíření rostlin a živočichů jsou jejich ekologie a fyziologie.

Vodní rostliny jsou v biogeografii relativně opomíjenou skupinou. Často mají velmi rozsáhlé areály, z evolučního hlediska jde spíše o bazální linie cévnatých rostlin a je mezi nimi, napříč skupinami, silná tendence ke klonálnímu rozmnožování, snad jako důsledek tlaku vodního prostředí. Vodní prostředí do značné míry určuje i schéma jejich šíření. S jejich studiem jsou také spojeny některé metodologické a technické obtíže.

Moje bakalářská práce obsahuje 3 hlavní součásti. Literární rešerši týkající se především fylogeografie vodních cévnatých rostlin, výsledky terénních výzkumů klonální struktury populací stulíku žlutého (*Nuphar lutea* (L.) Sm.) a rozpracování tématu magisterské diplomové práce, která bude na mojí dosavadní činnost plynule navazovat.

Poznání mechanismů a logiky šíření a rozšíření rostlin v krajině má i veliký praktický význam. Od pochopení obecných mechanismů šíření vodních rostlin (pak víme, kam povedou naše – i nechtěné – zásahy do životního prostředí) přes ochranu vzácných druhů po potlačování těch invazních.

4. Klíčová slova

biogeografie, botanika, disperze, ekologie, fylogeografie, fylogenetika, fyto geografie, hydrobiologie, klonalita, migrace, mikrosatelity, molekulární biologie, molekulární ekologie, *Nuphar lutea*, populační genetika, říční systémy, stulík žlutý, vodní rostliny

5. Abstract (English)

In my bachelor thesis I present temporal pieces of knowledge on phytogeography, and especially molecular phylogeography of water clonal plants and possibilities of their dispersion. Plenty of questions about history, dispersal, relationship and population structure we can not answer without molecular technologies at all. Another very important components influencing dispersal of plants and animals are their ecology and physiology.

Water plants are relatively neglected group in biogeography. Very often they have large areals. Water plants are, from evolutionary point of view, basal lines of vascular plants. There are, in plenty of taxa from various lineages, strong tendencies for clonal reproduction. Probably as a result of pressure of their environment. Because of their water environment there are some technical problems with their study.

My bachelor thesis consists of three main parts. Literature search mostly about phylogeography of water clonal vascular plants, results of my field studies about clonal structure of populations of yellow waterlily (*Nuphar lutea* (L.) Sm.) and subject matter of my master degree thesis which will concur fluently to my current work.

Understanding of mechanism and logic of plant disperse in landscape is very important for society development. From understanding general patterns of disperse of water plants (then we will know where our intervention into environment will point to) through protection of endangered species to extinguishment of invasion ones.

6. Keywords

biogeography, botany, clonality, disperse, ecology, hydrobiology, phylogenetics, phylogeography, phytogeography, microsatellites, migration, molecular biology, molecular ecology, *Nuphar lutea*, population genetics, river systems, water plants, yellow waterlily

7. Úvod

Zákonitosti toho, jak jsou organismy na dnešní Zemi rozšířeny zajímá vědce už dlouho. Již Linné (pol. 18. st.) si všiml, že v okolí Upsaly a Göteborgu rostou jiné rostliny. Jednoduchý boží plán stvoření na místě na místě (kladistický „anglický trávník“ místo dnešního statného a větveného stromu s mnoha spojenými větvemi)¹ se rozpadl s nástupem evoluční teorie (Darwin 1859) a poznáním, že i živé organismy mají svoji historii a nebyly prostě stvořeny na místě, kde jsou teď. Jednotlivé druhy vznikají a zanikají a jejich příslušníci migrují. Evoluce druhů se tak do jisté míry odráží v jejich rozšíření (Wallace 1876).

Evoluční teorie v podstatě nebyla vědou v úzkém karteziánském (fyzikálním) smyslu, jen „historickým vyprávěním“. Fenomén vývoje byl do té doby v biologii, a ve vědě obecně, naprosto neznámý. Vzorem vědy byla fyzika, která se zabývala jevy, které můžeme kdykoliv ve stejných podmínkách snadno zopakovat. Např. pokusy s pohyby těles nebo termodynamikou jsou libovolněkrát opakovatelné, Darwinovy pěnkavy na Galapágách a římská říše však vznikly pouze a právě jednou a tato událost je principiálně neopakovatelná (Komárek 1997).

Následně se začala rozvíjet ekologie (Haeckel 1866), věda o vztazích v živé přírodě. A s ní se vynořila jen těžko řešitelná otázka: jsou živé organismy rozšířeny tak, jak jsou díky svým ekologickým vztahům, konkurenci, přírodním překážkám a fyziologickým nárokům (ekologická interpretace biogeografie), nebo díky historii (evoluční interpretace biogeografie): zatím prostě neměli čas tam dorazit, byli tam, ale vyhynuli, nebo jen nejsou „vyvolenou“ linií a mají svoje vývojové centrum někde hodně daleko? Jsou důležitější příčiny historické nebo ekologické a fyziologické?

7.1. Biogeografie

Postupně vznikala biogeografie (Buffon 1778, de Candolle 1821, Wallace 1876). Ekologický přístup nám může dát odpověď na otázku, jak tam dnes naše druhy mohou spolu přežít, koexistovat a jaké jsou mezi nimi vztahy. Oproti historickému přístupu je toto relativně jednoduché. Stačí „jen“ pečlivě pozorovat, měřit správné věci a provádět manipulativní experimenty k ověření hypotéz. Historický přístup nám řekne proč tam dané druhy jsou či nejsou. Ale jeho principiální nevýhodou je, že operuje se společnými předky a jejich následným šířením.

Historické hypotézy postavené zpravidla na kladistice (Hennig 1999) a fylogenetice (Avice

¹ V představě, kde živé organismy byly stvořeny na místě nemá jakákoliv genealogie smysl, nelze tedy ani kreslit fylogenetické stromy v dnešním slova smyslu: šlo by jen v krátké rovnoběžné čárky odpovídající stáří Země.

2000) v podstatě nelze, nebo jen v omezené míře, testovat (Popper 1959, 1972, 1979). Je nasnadě, že společný (velmi často vyhynulý) předek a jeho různými peripetemi se šířící potomci se dokazují jen velice obtížně. Nemluvě o tom, že prakticky nelze – používáme-li molekulární techniky – vzít do úvahy vyhynulé linie. To do našich hypotéz vnáší velkou míru nejistoty a nutnost korelovat výsledky molekulárních studií s palynologií, nálezy makrozbytků, paleontologií, geologií, geografii a dalšími disciplínami.

Situaci nekomplikují jen pohyby kontinentů (Wegener 1915, Les et al. 2003) působící v rádech evoluce celých vývojových linií, ale i ledové doby a holocenní historie (Ložek 1973), která působí na úrovni evoluce rodů a druhů. A zvláště v posledních staletích čím dál tím více vliv člověka (Sádlo et al. 2005, Burkart 2001), který je schopen transportovat velké množství organismů na velké vzdálenosti ve velmi krátkém čase. Zde již není čas na evoluci, procesy způsobené člověkem jsou příliš rychlé.

Pochopitelně je nutné zohlednit jak ekologický, tak historický přístup. V současné době se z historických metod silně rozvíjí zejména fylogenetika a z ní odvozená kladistická biogeografie (zohledňující i vikarianční události a proměnlivosti areálů; Platnick et Nelson 1978, 1981); postavené především na molekulárních datech. Stále však zůstává problém s nedokazatelností vyhynulých linií.

7.2. Vodní rostliny

Ve své práci se zaměřím na možnosti šíření a fylogeografii (Hennig 1999) vodních cévnatých rostlin s důrazem na klonální druhy (Les et al. 2003). A to mj. proto, že jejich studiu doposud nebyla věnována náležitá pozornost. Vodní rostliny mají silnou ekologickou vazbu na své prostředí. Musí se tedy buď šířit hydrochorně, vodou, pasivně unášeny proudy (což samo o sobě vyžaduje řadu speciálních adaptací, zvláště co se týče semen a diaspor obecně; Smits et al. 1989, Boedeltje et al. 2003, Danvind et Nilsson 1997), nebo musí mít zvláštní přizpůsobení pro dálkový transport (např. za pomoci ptáků; Green et al. 2002).

Vodní rostliny jsou vhodnou modelovou skupinou pro pochopení migrace a rozšíření i jiných vodních organismů a vypovídají obecně o populační dynamice na krajinné úrovni (Johansson et al. 1996, Nilsson et al. 1991, Pollux et al. 2005). Vodní prostředí představuje silný vektor jejich šíření (Les et al. 2003, Santamaría 2002, Burkart 2001). Máme dostatek různých údajů o tom, že vegetativní i generativní diaspory se mohou šířit např. prostřednictvím vodních ptáků nebo jako vedlejší produkt lidské činnosti (např. Thiébaud 2007). Co ale chybí je důkaz míry takového šíření. Je pouze jediná cesta jak ověřit v jaké míře se rostliny šíří ptactvem na velké

vzdálenosti: Provést rozsáhlou fylogeografickou studii s využitím vhodného molekulárního markeru na úrovni celé Evropy: v hnízdištích, zimovištích i na velkých zastávkách podél ptačích tahů.

Mader et al. 1998 zkoumali genetickou diverzitu 19 populací *Potamogeton pectinatus* z celé Evropy a severní Afriky a v jaderných ani plastidových sekvencích pomocí RFLP nenalezli žádné shodné jedince. Nutno však podotknout, že sběr vzorků byl, vzhledem k rozlehlosti oblasti, poměrně řídký. Genetická variabilita rostla se vzdáleností, situaci nejlépe popisoval stepping stone anebo isolation by distance model. Podle autorů je zjevně viditelný vliv ptačích tahů. Je škoda, že práce měla tak řídký sampling, jinak by jistě přinesla mnohem více unikátních výsledků. Nicméně, pokud je mi známo, žádná práce obdobného rozsahu nebyla publikována.

Poznání mechanismů a logiky šíření a rozšíření rostlin v krajině má i veliký praktický význam. Pro naši civilizaci je nezbytné, aby rozuměla vlastnímu vlivu na přírodu. Faktorům podmiňujícím migrace a rozšíření rostlin musíme rozumět ze dvou základních důvodů: za prvé kvůli ochraně přírody. Když už něco chráníme, musíme o tom vědět co nejvíce, jinak naše snaha může být bezúspěšná.

A za druhé protože žijeme v globalizované době. Zmenšený svět mj. zjednodušuje rostlinám šíření, což zvyšuje riziko biologické invaze. Opět musíme znát logiku šíření, populační biologii a životní cyklus, abychom mohli proti invazní rostlině účinně zasáhnout. A v neposlední řadě je pro nás důležitá syntéza takovýchto znalostí: umožní nám porozumět logice a mechanismům šíření nejen vodních rostlin. Budeme tak více rozumět vlastní krajině a naší roli v ní a dopadu na ní.

8. Literární rešerše

Rostliny jsou sesilní organismy, zpravidla tedy postrádají možnosti aktivního pohybu (vyjma některých případů autochorie). Rostliny jsou při svém šíření závislé na okolním prostředí a na živočiších (van der Pijl 1982). Samy rozšiřují svá semena zvláště pomocí různých vystřelovacích mechanismů (autochorie). Tato strategie je rozšířenější mezi bezcévnými rostlinami, mezi cévnatými není příliš obvyklá. Bez účasti živočichů se rostliny šíří prostřednictvím větru (anemochorie), což je běžné mezi dřevinami a travinami, nebo vodou (hydrochorie; Johansson et Nilsson 1993, Danvind et Nilsson 1993, Hart et Cox 1995). Zbývá možnost šíření za pomoci živočichů (zoochorie). Semena mohou buď projít zaživačím traktem živočicha (endozoochorie; např. sežraná semena; Green et al. 2002, Pollux et al. 2005, Clausen et al. 2002) nebo se zachytit

na povrchu těla živočicha (exozoochorie; např. semena zachycená na peří či srsti).

Mnoho vodních rostlin má, patrně mj. díky schopnosti klonálního rozmnožování, velice široké až (sub)kosmopolitní areály. Takový široký výskyt je častější na severní polokouli (cirkumboreální druhy), ale některé invazní druhy (např. rodu *Elodea*) jsou široce rozšířené i na jižní polokouli. Jde např. o zástupce rodů *Elodea*, *Lemna*, *Myriophyllum* nebo *Sagittaria* (Thiébaud 2007).

Nezdá se být pravda, že by na široké rozšíření rostlin měla vliv údajná uniformita vodního prostředí. Většina vodních rostlin je stínomilná a limitována spíše dostupností CO₂. Mají poměrně vysoké teplotní optimum. Voda sice chrání před denními výkyvy teplot, ale sezónní extrémů jsou obdobné jako na souši. Často jsou limitovány dostupností zdrojů a anoxií v bahně, která může způsobit problémy (Santamaría 2002, Clausen et al. 2002, Lamote 2002).

Na rozšíření vodních rostlin mají zjevný vliv lidské aktivity, zvláště vodní doprava, úpravy toků a budování přehrad, eutrofizace vod a změny chemismu (Burkart 2001). Dále pak nepřímý vliv prostřednictvím ovlivnění početnosti a chování ptáků (a teoreticky i ryb).

8.1. Biogeografie & vodní rostliny

Poté, co si lidé povšimli rozdílnosti mezi flórami jednotlivých částí světa, začali pátrat po příčinách. Od počátku bylo zřejmé, že svou roli hrají jak faktory ekofyziologické, tak historické, ale ke škodě věci se oba přístupy vyvíjely odděleně. Historický přístup vycházel z teorie evoluce, kontinentálního driftu a paleontologicky doložených pozůstatků vývojových linií ukazující jednak jejich stáří a jednak vývojová centra.

Za hlavní prvek formující kvartérní flóry považovali biologové střídání dob ledových (glaciálů) a meziledových (interglaciálů) a s tím spojené vynucené migrace rostlin (Hewitt 2000). Jako doklad slouží kromě současného rozšíření rostlin převážně paleontologické a paleoekologické studie a palynologie. Stále není zcela vyřešená otázka přežití rostlin v malých refugiích obklopených nepříznivým prostředím (např. Tribsch et al. 2002). Tyto otázky se řeší až poslední dobou pomocí molekulárních technik, které nám umožní odhalit příbuzné populace v rámci celé Evropy a stanovit tak (s ohledem na geografii, geologickou historii, ekologii atd.) pravděpodobné migrační trasy. Naproti tomu ekologové se zaměřili na autoekologii a individuální preference každé rostliny, které měly samy o sobě vysvětlit prezenci či absenci druhu na daném místě.

V tomto „individualistickém“ přístupu jsme sice získali detailní znalosti o možnostech jednotlivých druhů, ztratil se však „globální“ pohled na větší časoprostorové škále. Z pohledu

fyto geografie tak vidíme detail, avšak nikoli celek. V „historickém“ přístupu naopak vidíme „velké“ změny flór a dlouhodobé události, ale máme jen omezenou představu o reálných možnostech rostlin – o tom, jaké podmínky jsou schopné a ochotné tolerovat a co je donutilo k migracím. Jaké podmínky snesou a jaké ne, jak reagují na změny klimatu. Oba přístupy se stále dávají dohromady jen poměrně zřídka.

8.2. Klonalita u rostlin

Klonální rozmnožování je ve fylogenetickém stromě cévnatých rostlin rozmístěno nerovnoměrně. U nahosemenných je velice vzácné, u krytosemenných se vyskytuje s různou intenzitou napříč liniemi. Obecně se předpokládá, že klonální rozmnožování je evolučně původnější a pomáhá rostlinám vyrovnat se se stresujícími podmínkami vnějšího prostředí (Klekowski 2003, Loxdale et Lushai 2003). Důležitý je rozdíl mezi genetou a rametou. Geneta je jeden genetický jedinec (klon), který se může např. pomocí oddenků šířit na velké vzdálenosti (ale fyzicky jde pořád o jeden celek), zatímco rameta je část genety, jeden její výběžek, který na pohled vypadá a chová se jako samostatný jedinec. Jednotlivé ramety jsou spolu v genetě více či méně propojené.

8.2.1. Klonální rostliny a vodní prostředí

Mezi vodními rostlinami je velké množství druhů, které se rozmnožují z větší části klonálně (Les et al. 2003). Zastoupení klonálního rozmnožování je mezi vodními rostlinami vyšší než mezi suchozemskými. To, že jsou vodní rostliny klonální jim umožňuje snadné šíření a rozšíření na velkém území. Zdá se, že jejich rozšíření není příliš limitované klimatem (Santamaría 2002). Rozšíření a invazibilitu nejvíce limituje nedostatek živin, toxiny a vysoké teploty narušující metabolismus (Thiébaud 2007). Zpravidla jde o stresu odolné taxony s širokou ekologickou tolerancí. Mají vysokou fenotypovou plasticitu v uhlíkovém metabolismu umožňující se vyrovnat s rozdílnými formami dostupného uhlíku (Santamaría 2002).

Jejich taxonomické bohatství je omezené (Les et al. 2003). Možnou příčinou však je, že vodní rostliny jsou často morfologicky redukovány, což taxonomické hodnocení ztěžuje. Crow (1993) ukázal, že, překvapivě, v mírném pásmu je větší diverzita vodních rostlin než v tropech, avšak přiznává, že z tropických oblastí máme nedostatek taxonomických údajů. A obecně vzato, taxonomické znaky vodních rostlin jsou mnohdy značně redukovány a v dohledné době bude potřeba jejich taxonomii zrevidovat.

Genetická variabilita uvnitř populace bývá nízká, ale mezi populacemi vysoká (Santamaría 2002). Pravděpodobně je to díky dlouhodobě žijícím klonům. Je potřeba revidovat taxonomii vodních rostlin s ohledem na genetické *pattern* mezi jejich populacemi a případnou reprodukční izolaci mezi jednotlivými subareály. Tendence ke klonalitě zlepšuje možnosti přežití populace. Pohlavně vzniklé diaspory se mohou šířit na velké vzdálenosti, zatímco lokálně se množí spíše klonálním růstem (Clausen et al. 2002, Santamaría 2002). Vodní klonální rostliny žijí v mikrohabitatu, v prostředí, ve kterém je na omezené ploše mozaika různých habitatů, které se vyplatí obsadit klonálním růstem (protože daný klon je pro daný mikrohabitat nejlépe přizpůsoben). Naopak na větší vzdálenosti je výhodnější šířit se variabilnějšími generativními diasporami, u kterých je větší šance, že jejich různé genotypy budou odpovídat i jiným prostředím (Clausen et al. 2002).

Druhy, které jsou schopné se rozmnožovat klonálně, a zvláště pomocí vegetativních úlomků (*Elodea*, *Myriophyllum*), bývají široce rozšířené až (sub)kosmopolitní a mají značný invazní potenciál (Thiébaud 2007). Šíření také usnadňují různá semena, turiony a jiné orgány určené k přežití nepříznivých období. Tyto klidové orgány umožňují nejen dálkový transport, ale také obnovení populace po velké disturbanci (Thiébaud 2007). Rozšíření a invazi druhů rodu *Elodea* ve Francii popisují Greulich et Trémolières (2006). Johansson et Nilsson (1993) ukázali na příkladu *Ranunculus lingua* ve Švédsku, že u vodních rostlin není selekční tlak na plovatelnost semen, protože se velmi snadno – v porovnání se suchozemskými – fragmentují a šíří vegetativně. Je to odpověď na zdánlivý paradox, že vodní rostliny s dobrou schopností klonálního rozmnožování nemívají příliš plovatelná semena (např. Johansson et al 1996).

Pohlavní rozmnožování je často omežováno stresujícími podmínkami vodního prostředí, které je prostorově velmi heterogenní. Jde např. o zaplavení a následnou anoxii nebo naopak o pokles hladiny vody a hrozící vyschnutí, o rozmnožení sinic a řas.

8.3. Fylogeografie & vodní rostliny

Studium genetické variability populací se v ekologii objevuje s narůstající intenzitou několik posledních desetiletí. Mnoho autorů se zabývá studiem genetické diverzity populací, identifikací klonů a prostorovými vztahy mezi jedinci a populacemi u nejrůznějších rostlinných druhů pomocí molekulárních markerů. Na základě takovýchto údajů následně usuzují na historii rostlinného rozšíření, na migrace, speciace a další události. Mezi dnes nejčastěji používané metody využívající polymorfismus v sekvenci nukleotidů v DNA patří PCR-RFLP, AFLP a mikrosatelity (např. Ouborg 1999).

8.3.1. Fylogeografie

Fylogeografie (Hennig 1999) využívá tzv. molekulárních markerů k nalezení genové variability na širší časoprostorové škále. Pro účely studie si nejprve definuje fylum (*phyllum*), monofyletický soubor studovaných jedinců, a následně pomocí molekulárně-genetických metod určujeme příbuzenské vztahy mezi těmito jedinci. Nalezením geneticky podobných jedinců (genových linií), tvorbou tzv. fylogenetických stromů zobrazujících příbuzenské vztahy a porovnáním s jejich geografickým rozšířením se tak můžeme pokusit rekonstruovat historickou migraci, odlišit jednotlivé migrační proudy a zjistit, které lokality spolu migračně souvisí (Avice 2000). Jednotlivé migrační proudy lze pravděpodobně nejlépe zjistit sledováním takových částí DNA, které se dědí pouze po mateřské linii a nerekombinují se, jako je u krytosemenných rostlin plastidová DNA.

Klasickým fylogeografickým problémem je postglaciální historie. Evropa byla nejvíce zaledněna před 18 000 – 20 000 lety (Ložek 1973) a obecně se soudí, že většina rostlin a živočichů se stáhla do refugií na jihu. Zpět na sever se rostliny začaly vracet před asi 13 000 lety, ale vrátila se jen malá část alelické a taxonomické variability.²

Příklady ilustrující tuto představu jsou např. Petit et al. (1997), kteří se zabývali strukturou haplotypů cpDNA dubu letního a zimního v severozápadní Francii. Palmé et Vendramin (2002) zkoumali postglaciální historii lísky. Studovaly se převážně lesní dřeviny, pro které se zavedl koncept 3 hlavních refugií (na Iberském poloostrově, v Apeninách a na Balkáně). Uvažuje se také o refugiích ve střední Evropě a v Karpatech (např. Sádlo et al. 2005, Willis et al. 2000). O vodních rostlinách se z tohoto pohledu neví téměř nic (viz. Dorken et Barrett 2004).

Závažným problémem může být, že tyto analýzy nejsou schopny zachytit vyhynulé linie. Fylogeografické metody nejsou příliš vhodné k zodpovídání otázek, ve kterých pracujeme s větším počtem vymřelých linií, protože vymírání nás připraví o alely vymřelých jedinců a my se jich už nikdy nedopátráme a v analýzách nám pak budou chybět. Díky tomu můžeme celkem dobře zkoumat návrat rostlin po ústupu ledovců poslední doby ledové (včetně populací, které přežily v refugiích obklopených nehostinnou krajinou), ale zeptáme-li se na migrace během posledního interglaciálu, genetická informace na (meta)populační úrovni již je „přemazána“ pozdějšími procesy a my jsme odkázáni jen na paleontologické a palynologické záznamy. Zde už molekulární biologie na takto jemné úrovni nefunguje.

Xiang et al. (2000) korelovali molekulární data s geologickými údaji k vysvětlení floristické disjunkce mezi východní Asií a Severní Amerikou. Pomocí kvalitního

² Evropa tak byla ochuzena o mnoho třetihorních druhů a linií, které dnes rostou ve východní Asii, severní Americe a případně na Kavkaze (*Pterocarya*, *Ginkgo*, ...)

paleontologického záznamu zkalibrovali molekulární hodiny a nakonec dospěli k závěru, že divergence většiny druhů je starší než zmizení jednoho z posledních kontinentálních mostů na konci terciéru, ale souvisí s o něco starším rozpadem souvislého listnatého lesa, čímž došlo k rozpadu původně souvislých areálů. Jde o ukázkou ideálního přístupu k problematice šíření rostlin a obdobné mechanismy jsou představitelné i pro rozšíření vodních rostlin.

8.3.2. Fylogeografie vodních rostlin

Speciálně o fylogeografii vodních klonálních cévnatých rostlin na větší časoprostorové úrovni se toho ví poměrně málo. Les et al. (2003) srovnali dostupné geologické údaje s molekulárními a ukázali, že v případě široce rozšířených vodních makrofyt jde spíše o bazální linie cévnatých rostlin. Většina molekulárních divergencí vyšla signifikantně mladší než geologický rozchod kontinentů, což si autoři vysvětlují tím, že voda chrání před účinky UV a rychlost molekulární evoluce tak může být systematicky podhodnocena. Je také možné, že vliv má i nižší teplota vody, čehož důsledkem je i nižší úroveň metabolismu. Stále zůstává otevřená otázka možnosti přirozeného transportu rostlinných propagulí přes oceán.

Dorken et Barrett (2004) zkoumali pomocí PCR-RFLP postglaciální historie jedno- a dvoudomých populací *Sagittaria sagittifolia* ve východní části Severní Ameriky. Genetická diverzita byla více než 6 x větší mezi jednodomými populacemi. Glaciální refugia byla pravděpodobně na jihovýchodě (jen tam se vyskytovaly všechny haplotypy). Ve dvoudomých populacích byly nalezeny jen 4 haplotypy a 94 % individuí mělo jen 1 haplotyp.

Přínosnou práci publikovali Nies et Reusch (2005). Zkoumali baltské a jezerní populace *Potamogeton pectinatus*. Severní Evropu rekolonizoval z většího množství refugií před cca 12 000 lety a roste jak v prakticky brakickém Baltu tak v přímořských jezerech. Genetická příbuznost populací nevykazuje žádné geografické *pattern*. Baltské populace jsou geneticky méně diferencované a je mezi nimi 2,5 x větší genový tok. V každé jednotlivé populaci dochází k silné adaptaci k lokálním podmínkám. Asi pozorujeme prvopočátek speciace mezi baltskými a jezerními populacemi, nicméně sekvence rRNA jsou u obou skupin populací identické. Je to ukázkou úspěšného použití poměrně variabilního markeru na velké časoprostorové škále.

8.3.3. Fylogeografie na malé škále

Fylogeografické problémy nemusíme nutně studovat na kontinentální úrovni. Pokud si jako námi

zvolené fyllum vybereme jen jedince v Alpách, na území ČR, v povodí Dunaje, anebo v rámci okresu Příbram, můžeme stejné metody použít i na takto malé časoprostorové úrovni.

Tribsch et al. (2002) zkoumali pomocí AFLP glaciální historii *Saponaria pumila* ve východních Alpách a rumunských Karpatech. Glaciál přežila ve 3 refugiích charakterizovaných unikátní sadou markerů. Populace jsou geneticky značně diferenciované. Některé okrajové populace mají hodně vzácných markerů naznačujících dlouhodobou izolaci. Některé současné lokality byly rekolonizovány transportem na dlouhé vzdálenosti. Je patrných i několik průchodů bottleneckem. Oddělily se 4 dobře rozeznatelné geografické skupiny. Není jasné proč nemigrovala západněji.

Tarayre et al. (1997) zkoumali prostorovou genetickou strukturu *Thymus vulgaris* v jižní Francii. Porovnávali relativní genový tok pylem a semeny s prostorovou strukturou. Autoři nezaznamenali žádnou signifikantní korelaci mezi rozmnožovacím systémem a chloroplasty ani mezi diverzitou cpDNA a frekvencí samic. Podle autorů je cpDNA dobrý marker i na populační úrovni. Viz. též práce Fischer et al. (2000), kteří zkoumali genetickou variabilitu *Ranunculus reptans* ve dvou švýcarských jezerech a zjistili, že větší populace jsou geneticky variabilnější, avšak variabilita závisí na historii (např. na míře fragmentace) a že genetický drift je selekčně neutrální.

8.3.3.1. Říční systémy

Velice zajímavým modelovým prostředím pro studium transportu genů je systém, který je určitým způsobem polarizovaný a strukturovaný. (Johansson et al. 1996) Říční sítí neustále proudí voda jen jedním směrem, přesto se rostliny šíří i proti proudu. (Nilsson et al. 1991) V takovém prostředí vyvstává řada otázek. Kde je větší genetická variabilita? Na horním nebo dolním toku? Jaké abiotické a lidské zásahy mají vliv na rozšíření vodních rostlin? (Burkart 2001) Šíří se rostliny výhradně říční sítí nebo i mezi jednotlivými řekami? Jsou od sebe povodí ostře geneticky oddělené nebo mezi nimi dochází k výměně diaspor? (Danvind et Nilsson 1997, Johansson et al. 1996, Fischer et al. 2000) Podílí se na transportu semen vodní ptáci? (Pollux et al. 2005, Green et al. 2002, Mueller et van der Valk 2002, Figuerola et al. 2005). Pokud jde o bezobratlé nebo třeba i savce, nejsou mi známy žádné studie, které by se těmito možnostmi zabývaly. Ale možnost zachycení vegetativních fragmentů v srsti zvířat je logicky očekávatelná.

Nyní představím některé ze základní úvah, na kterých stojí většina nulových hypotéz používaných ve fylogeografických studiích vodních rostlin. Logicky bychom předpokládali, že jednotlivá povodí budou geneticky izolovaná, protože míra transportu, např. pomocí vodních

ptáků, mezi povodími je řádově menší než šíření rostlin v rámci jednotlivých povodí. Naproti tomu genetická variabilita v rámci jednoho uzavřeného systému se díky klonálnímu rozmnožování očekává velice nízká. V otázce, zda bude vyšší alelické bohatství dole po proudu nebo na horním toku se obvykle předpokládá, že větší bude na horním toku, kde se v jednotlivých přítocích druh vyvíjí už dlouhou dobu a dolu po proudu se dostane jen část variability. A naopak: v oblastech, kde je nejvyšší genetická diverzita mezi jedinci druh pravděpodobně přečkal nedávná nepříznivá období (např. doby ledové). Z těchto center se pak druh rozšířil. Z podobných úvah vychází i většina dále uvedených studií. Viz. např. Johansson et Nilsson (1993), Boedeltje et al. (2003), Danvind et Nilsson (1997), Johansson et al. (1996), Nilsson et al. (1991).

Lamote et al. (2002) studovali pomocí AFLP dvě populace *Iris pseudacorus* ve 2 hydrologicky oddělených povodích v severní Belgii. Mezi povodími autoři odhalili velkou genetickou odlišnost, kterou vysvětlují, kromě (reprodukční) izolace, silným genetickým driftem. I přes převážně klonální rozmnožování rostliny je vysoká genetická variabilita i na vnitropopulační úrovni, což autoři opět přičítají genetickému driftu mezi jednotlivými oblastmi (přítoky apod.). Slabinu studie vidím v tom, že autoři nediskutují ekologické možnosti šíření rostliny.

Keller (2000) zjistila závislost genetické odlišnosti na geografické vzdálenosti podél řeky u *Phragmites australis*. Nejvíce rozdílů bylo mezi populacemi v hlavním toku a na přítoku, což naznačuje odlišný zdroj propagulí pro tyto dvě oblasti. Populace, které si byly prostorově blíž, si byly podobnější i geneticky.

Genetická diverzita v dolních částech údolí může být vyšší než v horních částech toků (Gornall et al. et al. 1998). Topologie říčního systému tak ovlivňuje genetickou diverzitu a její rozložení. Kudoh et Whigham 1997 zjistili, že populace *Hibiscus moscheutos*, které těsně souvisí s vodním tokem, a jsou tudíž často a snadno zásobovány semeny z populací ležících proti proudu, se geneticky příliš neliší. Geneticky více odlišné byly populace od toku vzdálenější, bez tak častého přísunu nového genetického materiálu – diaspor z jiných populací. Russell et al. (1999) zkoumali populace hydrochorně se šířícího amazonského stromu a vliv hydrochorie neprokázali.

Říční koridory hostí mnoho ohrožených druhů rostlin. Teplejší postglaciální perioda³ umožnila říčním rostlinám, aby se mohutně rozšířily; od té doby jsou, s ohledem na ochlazení a od neolitu s ohledem na vliv člověka, spíše na ústupu. Invazní druhy často začínají v říčních nížinách a pak se šíří do okolních oblastí. V šíření rostlin je zjevná velká role ptáků a hydrochorie (Burkart 2001). Údolí jsou kontinentálnější, vysoké letní teploty jsou pravděpodobně limitující faktor

3 Atlantik, ve střední Evropě byla před asi 7000 – 5000 lety, v průměru bylo o asi 3 – 4 °C tepleji, než dnes. Od té doby se ochlazuje (až do současného globálního oteplování; Ložek 1973, Sádlo et al. 2005).

šíření. Přínos živin probíhá převážně prostřednictvím záplav (Burkart 2001).

Jako modelový druh jsem si vybral stulík žlutý (*Nuphar lutea* (L.) Sm.), protože jde o vodní rostlinu (a můžeme tak využít výhod strukturovaného a polarizovaného vodního prostředí), která se rozmnožuje jak klonálním růstem, tak pohlavně (Arber 1920, Heslop-Harrison 1955, Barrat-Segretain 1996) a je na našem území poměrně široce rozšířená (Slavík 1991). Navíc jsou pro tento druh k dispozici polymorfní mikrosatelitové primery (Ouborg et al. 2000), díky kterým máme pro naše studie k dispozici pravděpodobně nejvariabilnější molekulární marker (Ouborg et al. 1999).

8.4. Molekulární markery, klonalita & vodní rostliny

V posledních letech tak můžeme získat přehled o příbuznosti rostlin na zvolené časoprostorové škále (díky tzv. molekulárním markerům; Ouborg et al. 1999) a tu pak s pomocí dalších (geografických, geologických, paleontologických, ekologických, genetických, cytologických...) dat interpretovat. Bez analýz DNA (nejen s použitím molekulárních markerů, ale i s pomocí karyologie a cytologie) nemůžeme rozhodnout o příbuznosti rostlin a tím pádem nám jsou nedostupné otázky na odpovědi po populační struktuře na lokální (Kudoh et Whigham 2001, Sun et Wong 2001), krajinné i kontinentální (Dorken et Barrett 2004) úrovni. Analýzy DNA s využitím molekulárních markerů změnily náš pohled na fylogenetiku a rostlinné migrace. Podrobně se historii biogeografie od prvopočátků po dnešní dny věnují Brown et Lomolino (1998).

DNA je velká a složitá molekula obsahující řadu funkčně odlišných úseků. Úseky kódující proteiny či přímo se podílející na regulaci genové exprese podléhají selekčnímu tlaku a postupně hromadí změny (mutace). Srovnání dvou takovýchto odpovídajících si kódujících úseků může být zavádějící, závisí to na tom, jak příslušná mutace ovlivní *fitness* daného jedince. Detekovaná variabilita tak nutně nemusí přímo vypovídat o míře příbuznosti, ale spíše o stejné míře odpovědi na stejný selekční tlak. Navíc jde o konzervativní úseky, což je při srovnávání blízké příbuzných populací či druhů nevýhodné, neboť mnohdy nemáme k našim analýzám k dispozici dostatečnou variabilitu. Úseky kódujících oblastí tedy obvykle nejsou pro příbuzenské analýzy na malé časoprostorové škále příliš vhodné (Baker 2000, Avise 1994), což ale neplatí vždy (viz. např. Tarayre et al. 1997, Kudoh et Whigham 1997, Sun et Won 2001).

Pro fylogeografické studie je vhodnější použití tzv. nekódujících úseků DNA, které nejsou přímo přepisovány do proteinů. Zvláště výhodné je použití tzv. neutrální DNA, která, podle současné úrovně poznání, není pod selekčním tlakem a mohou se tam hromadit mutace, které obvykle nemají negativní dopad na *fitness*. Pro fylogenetické (a fylogeografické) analýzy se

většinou používají introny (úseky DNA vmezežené mezi exony kódující části proteinů), které nejsou přepisovány do mRNA.

Naproti tomu podle Li et al. (2004) mají mutace mikrosatelitů značný vliv na strukturu DNA, čímž ovlivňují transkribci proteinu mezi jehož exony jsou mikrosatelitové alely vmezeženy. Mikrosatelitové mutace by tedy byly pod silným selekčním tlakem. Sami autoři však přiznávají, že je potřeba celý problém dále zkoumat. Zatím není k dispozici dostatek údajů, nicméně je nutné být připraven na to, že některé studie se možná budou muset přehodnotit.

V současnosti se zdá nejpravděpodobnější, že velká část těchto nekódujících úseků je původem tzv. parazitická DNA – různé transpozony, replikony, pozůstatky retrovirů. Jejich funkce v organismu je stále nejasná. Tyto úseky vykazují vysokou mutabilitu a v určitých částech genomu se šíří. Obsah takovéto „neužitečné“ DNA během evoluce roste (Sherratt 1995). Mikrosatelity jsou velice variabilní a s růstem jejich množství během fylogeneze roste i variabilita, kterou my s výhodou využíváme pro naše studie.

Na DNA můžeme nahlížet tzv. markery, značky, znaky, z našeho pohledu jednotky informace; úsek DNA či proteinu vypovídající o (genetické) příbuznosti jedinců, populací nebo druhů. Molekulární markery na úrovni DNA můžeme rozdělit na markery založené na

- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; např. Baker 2000) a na
- PCR (Polymerase Chain Reaction; např. Wolfe et Liston 1998).

Při technikách založených na RFLP využíváme enzymů restričních endonukleáz⁴, které rozštěpí veškerou DNA na přesně definovaných úsecích na různě dlouhé fragmenty, které následně vizualizujeme pomocí elektroforézy a hybridizací DNA se značenou sondou. Metoda je to jednoduchá a poskytuje informaci z celého genomu a vysoce reprodukovatelné *pattern*. Variabilita je dána mutací (nejčastěji inzercí nebo delecí) v sekvenci, kterou rozeznávají restriční endonukleázy.

Druhá velká skupina technik je postavena na metodě PCR⁵, která nám s pomocí dvojice primerů umožňuje namnožit vybraný úsek DNA geometrickou řadou. Nejbližší předchozí metodě je PCR-RFLP, při které se nejdříve pomocí PCR namnožíme zvolený lokus a pak jej pomocí několika restričních endonukleáz rozštěpíme na krátké fragmenty, které pak rozdělíme a

4 Jde o enzymy štěpící DNA v přesně definované sekvenci uvnitř molekuly. Tato sekvence může být různě dlouhá. Dnes máme k dispozici minimálně stovky různých restričních endonukleáz štěpících molekulu DNA v různých sekvencích (restričních místech).

5 Zjednodušené schéma PCR je toto: molekuly DNA zahřejeme (denaturujeme, čímž se dvoušroubovice DNA rozplete), ochladíme, necháme nasadnout primery a umožníme aktivitu termostabilní DNA-dependentní-DNA-polymerázy (přežije denuraci). Potřebujeme tedy primery, studovanou DNA, termostabilní DNA-polymerázu, pufr, dNTP a vodu. Tím namnožíme zvolený úsek. Celý cyklus opakujeme třeba 30 x, máme pak $2^{30} \approx 1,06 \cdot 10^{13}$ kopií původního úseku.

vizualizujeme na elektroforetickém gelu. Metoda je to univerzální, použitelná téměř u všech druhů. Drobnou nevýhodou je nižší variabilita při studiu chloroplastové DNA (cpDNA; Palmer 1986, McCauley 1995). Nevýhodou také je, že jde o dominantní marker, takže nemůže rozeznat dominantního homozygota a heterozygota.

Další metody jsou RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), jejíž výsledky jsou jen obtížně reprodukovatelné; poměrně drahé a komplikované AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al. 1995), jehož *pattern* je vysoce reprodukovatelné, poměrně variabilní, ale jde o dominantní marker; a mikrosatelity (Jarne et Lagoda 1996), které jsou vysoce variabilní, reprodukovatelné, kodominantní a levnější než AFLP.

8.4.1. Mikrosatelity

Mikrosatelity (SSRs, Simple Sequence Repeats; Balloux et Lugon-Moulin 2002) jsou variabilní kodominantní marker, který umožňuje studovat variabilitu ve vybrané části genomu. Dávají nám dostatek variability i pro populační studie na menší časoprostorové úrovni a díky jejich kodominanci můžeme rozlišit heterozygoty od dominantních homozygotů. Jde o krátké (pod 6 bp) tandemové repetice, které se za sebou mnohonásobně opakují. Jejich nevýhodou je, na rozdíl od např. AFLP (kde nepotřebujeme žádnou předchozí znalost o studovaném genomu), nutnost připravit pro každý studovaný druh sadu specifických primerů, jejichž izolace a příprava je poměrně náročná (Provan et al. 1999).

Jednotlivé alely jsou pak dány délkovým polymorfismem (počtem opakování dané repetice v rámci alely), který odhalíme oddělením alel pomocí elektroforézy a vizualizace proužků. Rozeznáváme 3 typy mikrosatelitů:

- 1) jednoduché (*simple*, ...GAGAGAGAGAGA...),
- 2) složené (*compound*, ...GAGAGAGAGAGATCTCTCTCTC...) a
- 3) přerušované (*interrupted*, ...GAGAGACCGAGAGACCGAGAGA...).

Podle délky mikrosatelitu rozeznáváme 3 nejběžnější druhy repetitivních sekvencí:

- 1) dinukleotidy (u rostlin je nejběžnější AT, vyskytuje se cca každých 30 – 50 kb, počet opakování bývá do 30),
- 2) trinukleotidy (protože neporušují čtecí rámeček, mohou se vyskytovat i v exonech) a
- 3) tetranukleotidy.

Mikrosatelity jsou vysoce specifické, polymorfní a vyskytují se v celém genomu (spíše v nekódujících oblastech). V případě rostlin se používají buď jaderné nebo plastidové mikrosatelity (Provan et al. 2001). Vykazují velkou mutační rychlost (10^{-3} – 10^{-5} na lokus za generaci) a vznikají

převážně „sklouznutím“ DNA polymerázy při kopírování DNA.

Pro stulík (*Nuphar*, Nymphaeaceae). Ouborg et al. (2000) izolovali polymorfní mikrosatelitové lokusy. Tím jsme pro populační a fylogeografické studie získali asi nejlepší možný marker. Jsou amplifikovány nejen ve druhu *Nuphar lutea*, ale i v dalších zástupcích rodu.

8.4.2. Chloroplastová DNA

U fylogeografických studií zaměřených na studium migrace rostlin se velmi často používá plastidová DNA (cpDNA, plastom; Palmer 1986). Hlavní výhody jejího použití pro tyto účely spočívají v tom, že:

- 1) u většiny krytosemenných rostlin je děděna pouze po mateřské linii (uniparentálně), tedy semeny (Corriveau et Coleman 1988, Blouin 2003), a nedochází tak k rekombinacím při meióze a hlavně lze sledovat generační (migrační) linie; a
- 2) je relativně konzervativní, tj. jen omezeně variabilní (Comes et Kadereit 1998). Přesto však vykazuje variabilitu i na vnitrodruhové úrovni (což ovšem neplatí vždy).

Takto o plastomu běžně uvažujeme. Některé současné studie však ukazují, že plastom je změť lineárních molekul (několika vlastních kopií) mezi kterými dochází k různým vazbám a rekombinacím. Může také docházet (v rámci kruhové molekuly) k rekombinacím protilehlých invertovaných opakováních (Oldenburg et Bendich 2004, Bendich 2004). Výsledky však zdaleka nejsou jisté a velké množství studií provedených s využitím cpDNA (z nichž mnohé byly korelovány s využitím jiné techniky) naznačuje, že tento jev nemusí být v obecné rovině příliš významný. Je však nutné s tímto nebezpečím počítat a nepřijímat všechny výsledky fylogeografických studií nekriticky.

Zdrojem variability jsou v plastomu (plastidové DNA) většinou bodové mutace, případně kratší inserce / delece. Právě kombinace těchto jejich vlastností nám umožní detekovat jednotlivé haplotypy, korelovat je s jejich geografickým rozšířením a vysledovat jednotlivé migrační linie (Schaal et Olsen 2000), protože informace obsažená v cpDNA se v jen málo změněné podobě předává od původních zakladatelů populace až k dnes žijícím organismům.

8.5. Šíření vodních rostlin

Šíření vodou (Johansson et al. 1996, van der Pijl 1982) není tak úzce vázané na nějaký taxon, ale vyskytuje se široce napříč skupinami: je podmíněno životní strategií (Sjöström et Gross 2006),

biotopem a habitatem rostliny: její vazbou na vodní, bažinné či pobřežní prostředí. Komplexní analýzu důvodů širokého rozšíření vodních rostlin a jejich nízké taxonomické diferenciaci podává Santamaría (2002). Vlivem lidské činnosti na rozšíření se zabývá Burkart (2001). Boedeltje et al. (2003) zjistili, že druhové složení zachycených semen nejlépe vysvětlí druhové složení rostlin ve společenstvu, méně produkce semen a jejich plovatelnost.

Hydrochorii se podrobně věnuje van der Pijl (1982). Prakticky se nevyskytuje u nahosemenných (mimo cykasů), vyvinula se mnohokrát nezávisle, sekundárně. Jen velmi málo rostlin je vodou opylováno (mnohokrát méně, než kolik se jich vodou šíří). Nejzákladnější dělení hydrochorie je na

- splach deštěm (ombrohydrochorie; týká se spíše malých vzdáleností a lehčích diaspor; např. *Caltha*, *Veronica*, *Thlaspi*) nebo
- pomocí vodního proudu (nautohydrochorie), který může probíhat
 - submersně (ponořeně; semena mohou po určitou dobu plavat a postupně se ponořit, např. *Hydrocharis*, *Nymphoides*, *Nuphar*, *Butomus*) nebo
 - emersně (na hladině; bez speciálních adaptací plavou – jen díky fyzikálním zákonům – malá semena; např. *Nelumbo*, *Glyceria*, *Sonchus*, *Cocos*). Plovoucí semena mohou, ale nemusí mít speciální přizpůsobení k plování. Ve vodním toku je velké množství diaspor, ale většina z nich nevyklíčí, dostala se do vody „omylem“.

Nilsson et al. (1991) prováděli pokusy s dřevěnými kostkami napodobujícími semena uvolněná do proudu a zkoumali jejich depozici (odpovídala rozložení pobřežní vegetace). Podle výsledků je hydrochorie neefektivní pro krátce plovatelná semena. Depozice kostek nebyla ovlivněna vlastnostmi proudu. Podle autorů může hydrochorie hrát roli i na úrovni společenstva.

Je zřejmé, že každý ze zmíněných mechanismů vyžaduje od rostlin jiné adaptace. Přestože existuje celá řada studií o šíření vodních rostlin (Barrat-Segretain 1996, Smits et al. 1989, Boedeltje et al. 2003, Pollux et al. 2005) stále není jasné, jak se rostliny mohou poměrně rychle šířit na velké vzdálenosti a proti proudu. Figuerola et Green (2002) konstatovali, že transport rostlinných propagulí je sice z terénních studií dobře dokumentovaný, chybí však podrobnější informace o vlastnostech transportovaných propagulích i o ptácích, kteří je transportují a jak tyto jejich vlastnosti ovlivňují celý proces. Stále probíhají debaty např. v souvislosti s kolonizací oceánských ostrovů, postglaciální rekolonizací a jinými velkými migracemi včetně invazí. (např. Valido et al. 2004, Palmé et Vendramin 2002, Tribsch et al. 2003, Nies 2005, Petit 1997)

O endozoochorii se často uvažuje jako o velice důležitém mechanismu šíření vodních rostlin. Vodní rostliny jsou důležitou složkou potravy mnoha zvířat. Clausen et al. (2002) se k

možnosti šíření vodních rostlin v ptačích žaludcích na velké vzdálenosti staví velice skepticky a uvádějí 4 hlavní důvody:

- 1) ptáci žerou semena mimo dobu z hlediska rostlin nejvhodnější pro rozmnožování (což ale nevylučuje možnost transportu vegetativních diaspor),
- 2) dálkový transport by logicky připadal v úvahu jen na podzim ze severu na jih (průsečík generační doby rostlin a času ptačího tahu),
- 3) většina ptačího žaludku se vyprázdí do asi 300 km letu (stejně tak nevíme nic o tom, jak dlouho mohou generativní diaspory vydržet zachyceny na ptačím těle: mnohdy k tomu mají přizpůsobení, ale ptáci se často čistí) a
- 4) ptáci mnohdy cestují mezi velmi odlišnými habitaty (Rostliny se tak mohou snadno dostat z prostředí, pro které jsou přizpůsobené do prostředí o poznání méně vhodného. Na druhou stranu mají obvykle širokou ekologickou amplitudu a jsou poměrně přizpůsobivé.).

Sice máme k dispozici studie (Figuerola et al. 2005, Mueller et van der Valk 2002), které dokládají, že vodní ptáci žerou semena vodních rostlin, ale mnohdy jde o laboratorní experimenty a nemáme k dispozici dostatek údajů z přírody. Troufám si tvrdit, že i přes výše uvedené námítky je množství zkonzumované (a na ptačím těle zachycené) rostlinné biomasy (a speciálně semen) tak obrovské, že by to – vzhledem k rozmnožovacím schopnostem rostlin a množství táhnoucích ptáků – mělo k jejich zdárnému šíření dostačovat.

Velice detailně se tomuto problému věnuje Figuerola (2002). Práce jednoznačně ukazuje, že dálkový transport vodním ptactvem je možný, nepřináší však žádný stejně nezvratný důkaz o jeho síle a významnosti. Ukazuje řadu krmných pokusů (kdy ptáci byli někdy krmeni i násilím nebo neměli na výběr jinou potravu). Takové pokusy – i když ukazují, že semena si uchovávají klíčivost i po průchodu ptačím žaludkem – dle mého soudu musíme brát s velkou rezervou. Nevypovídají totiž nic o potravních preferencích ptáků v přírodě. Sběr semen z exkrementů prováděli např. Green et al. (2002), kteří v ptačích žaludcích identifikovali přes 120 druhů semen.

O šíření rybami neexistují prakticky žádné relevantní zprávy Chick et al. (2003) publikovali pozorování ze Severní Ameriky jak za zvýšeného stavu vody ryby žerou plody rostlin. Jde však pouze o zprávu o pozorování. Nic víc. Co se týče jejich role, nejsou dostupné prakticky žádné informace.

Riis et Sand-Jensen (2001) srovnávali dánské nížinné vody na konci 19. a 20. století.⁶ Ke konci 19. století byl stulík žlutý zaznamenán v mnoha jezerech, po 100 letech jen v řekách dolu po proudu a jeho populační stavy celkově poklesly. Proti proudu (do řek přitékajících do jezer) se

⁶ Za tu dobu se dramaticky zvýšilo množství živin v krajině, přes 90 % toků bylo meliorováno a prudce pokleslo druhové bohatství. Takovýto scénář můžeme nalézt ve většině Evropy a Severní Ameriky.

vůbec nerozšířil. Toto zjištění příliš nezapadá do výsledků jiných studií, které šíření proti proudu považují za běžné. Autoři však tento parciální výsledek blíže nediskutují, neboť práce byla zaměřena na rod *Potamogeton*.

Z výše uvedeného je zřejmé, že biogeografické úvahy týkající se vodních rostlin jsou velmi obtížné, neboť doposud nepanuje obecná shoda o principech a logice jejich šíření. Výsledky různých studií si často odporují. Většina autorů je schopna se shodnout na velké roli hydrochorie (a to jak prostřednictvím semen, tak zvláště prostřednictvím různých vegetativních diaspor) a ornitochorie, kde už je nejasností o poznání více. Autoři se ve většině případů shodnou na tom, že endoornitochorie a exozoochorie jsou možné, názory na jejich význam se však velmi různí.

Vhodným modelovým druhem je, vzhledem ke své ekologii a rozšíření, právě stulík žlutý. U na něm získaných výsledků lze očekávat širší obecnou platnost.

8.6. *Nuphar lutea*

Stulík žlutý (*Nuphar lutea* (L.) Sm., Nymphaeaceae; obrázek 1, obrázek 2) je vodní rostlina (hydrofyt) s listy na hladině plovoucími (emersními) nebo ponořenými (submersními). Koření v bahnitém nebo pískovém substrátu (Arber 1920, Heslop-Harrison 1955).

Stulík má houževnaté oddenky nepatrně zploštělé a seshora nazelenalé, dole sinale žluté, pokryté jizvami po odpadlých listech (Arber 1920). S každým listovým základem jsou obvykle asociovány 3 kořeny. Oddenky mohou být tlusté až jako mužská paže. Submersní listy bez průduchů jsou produkovány převážně zjara a v nezamrzající vodě i během zimy. Listová čepel má kožovitou texturu a je nesmáčivá, velká až asi 30 x 40 cm (Heslop-Harrison 1955). Za silného deště trpí plovoucí listy údery kapek více než u přizpůsobených suchozemských rostlin (stulík vystavuje dešti celou listovou plochu a nemá k dispozici žádný mechanismus, který by tomu bránil). Průduchy jsou na horní straně plovoucích listů, u submersních chybí. Střed listu, který je mechanicky nejnamáhanější, je speciálně vyztužen. Ohebnost a délka řapíku zajišťuje možnost změny polohy listu a tím i reakci na změny hladiny či osvětlení. Vzhledem ke kompetici o světlo se listy na hladině široce rozprostírají do plochy. Květy voní po brandy, otevírají se na večer a zavírají ráno když vzrůstá teplota vzduchu (Heslop-Harrison 1955). Květy lákají noční hmyz. Otevřené květy uvolňují silnou vůni a mohou se zahřát až o 10 °C oproti okolí. Květ se po opylení ponoří a plod ve vodě dozraje po asi 6 týdnech (Arber 1920).

Mnoho semen zůstává dormantních po několik let, řádově týdny mohou přežít i mráz (Arber 1920), klíčí i ve tmě, ale mnohem lépe na světle. Semenáčky produkují množství kopinatých submersních listů. Hlavní kořen záhy zaniká. Zdá se, že etiolované listy může produkovat až asi 4 – 5 m pod hladinou. Tento údaj však nebyl ověřen z jiného zdroje.

Rozmnožuje se jak semeny tak (a to převážně) klonálním růstem. Podle Barrat-Segretain (1996) je kolonizace holých

habitatů extrémně pomalá a stulík se ve studovaném úseku Rhony šíří prakticky jen vegetativně. Jeho semena mají téměř stejnou měrnou hmotnost jako sediment. Plod (bobule) má dužnatou stěnu, která časem zeslizovatí a rozpadne se. Hamblin et Cox (1995) provedli studii, ve které ukázali, že semena se ve vodě šíří buď v plovoucích plodech nebo jako součást mucilaginózní



Obrázek 3: Plod stulíku žlutého, bobule, zpočátku plave, pak zeslizovatí a rozpadne se na velké množství semen. Ta plavou dokud jsou pospojována slizem, pak se rychle potápějí. Převzato z http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Web_Frutos/images/Frutos%20complejos/Nuphar_lutea.jpg [10. 4. 2007]

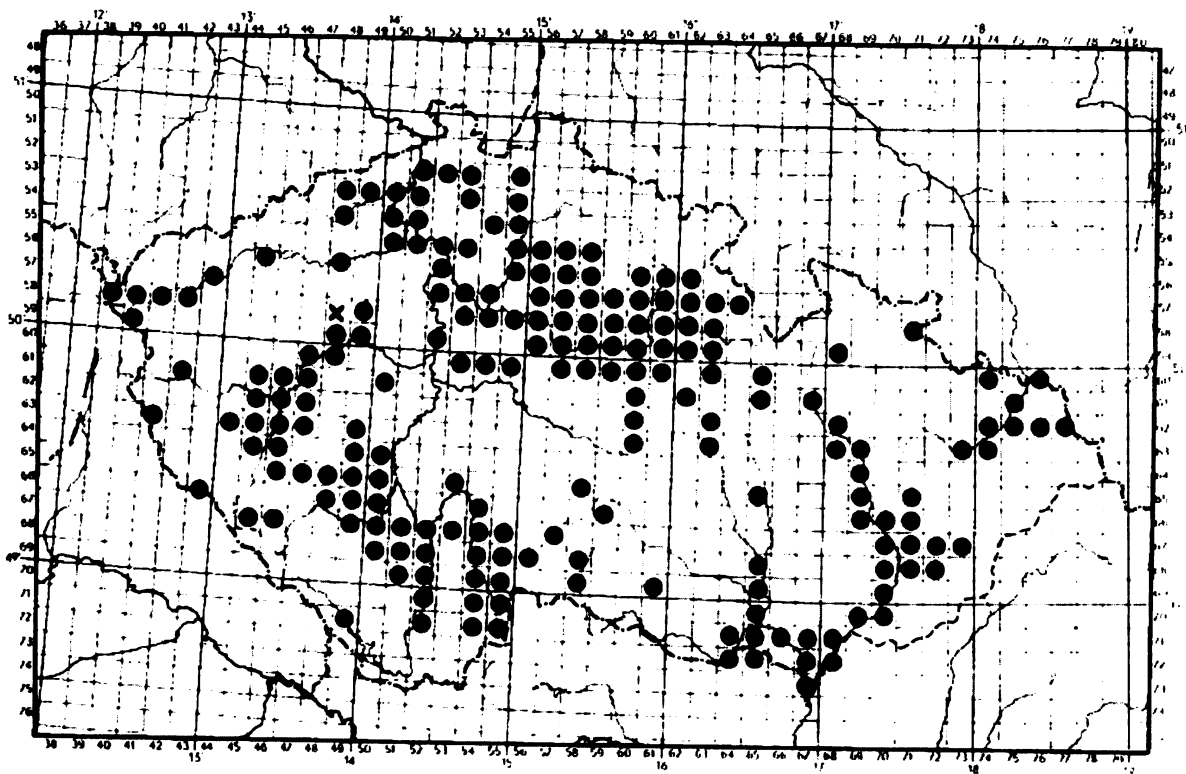
hmoty vzniklé z rozpadajícího se plodu (perikarp se na bázi rozpadá) a samotná plavou jen kolem 72 hodin. Volná semena se spíše potápí a plod se rozpadá během několika dnů. To souhlasí i s údaji Arber (1920). Plovatelností a klíčivostí semen se v povodí Cidliny zabýval i Fér (2000). Semena stratifikovaná na vzduchu (na vlhkém filtračním papíru) neklíčila,



Obrázek 4: Stulík žlutý často vytváří souvislé porosty, ve kterých se ostatní rostliny prosazují jen s obtížemi. Převzato z <http://www.poodri.ochranaprirody.cz/res/data/066/009601.jpg> [10. 4. 2007]

ta stratifikovaná ve vodě klíčila ve vodě, na vzduchu ne. Klíčilo asi 20 % semen. Semena téměř neplavala. I podle Smits et al. (1989) semena téměř neplavou a nepřežijí vyschnutí. Kořeni ve dně, listy jsou široké, submerzní nebo vzplývavé. Reprodukční orgány jsou nad hladinou. Podle Féra (2000) je v plodu průměrně téměř 200 semen, podle Barrat-Segretain (1996) 285, ale považuje to za podhodnocené. V přírodě semena klíčí v anaerobním bahně a mladé semenáčky rychle rostou ke světlu. Úspěšnost semenáčků je limitována hlavně světlem (Heslop-Harrison 1955).

Semena (obrázek 3) mohou klíčit v bahně i pod vodou. Např. Green et al. (2002) ukazují potenciálně významnou roli vodního ptactva při disperzi vodních organismů od bezobratlých po nejrůznější generativní diaspory vodních rostlin. Arber (1920) uvádí i pozorování, že vodní ptáci občas klovou plovoucí plody. Nezmiňuje však bližší podrobnosti. Podle Heslop-Harrison (1955) vodní ptáci občas vytrhávají stulík z kořenů a používají jako materiál na stavbu hnízda.



Obrázek 5: Rozšíření stulíku žlutého (*Nuphar lutea* (L.) Sm.) na území ČR podle Slavíka (1991).

Stulík žlutý je široce rozšířený v celé Evropě a limitován je hlavně geograficky a klimaticky. Toleruje salinitu až 1 ‰ (Heslop-Harrison 1955). U nás je stulík žlutý poměrně rozšířený. Vyskytuje se zvláště v Polabí, v jihočeských pánvích, na Jižní Moravě a na mnoha

dalších lokalitách (Slavík 1991). Roste ve vegetační třídě Potametea, řádu Potametalia a svazu *Nymphaeion albae*, kde se vyskytuje zejména spolu s rody *Nympha*, *Nymphoides* a *Trapa* (Heslop-Harrison 1955; obrázek 4).

Stulík je častým terčem herbivorů, proti jejich tlaku je do určité míry odolný (Otto et Wallace 1989). Herbivorie zjevně nemá na rozšíření stulíku žádný dopad. Bolser et Hay (1998) zjistili, že spásání specializovaným herbivorem *Galerucella nymphaeae* (Coleoptera) bude u stulíku indukovat zvýšenou odolnost proti herbivorii.

9. Praktická část

Pro úspěšné provedení fylogeografické studie je nutné mít co nejdetailnější znalosti o studovaném druhu. Nejen ekologické a fyziologické, ale také znalosti genetické. Potřebujeme mít představu o úrovni pylového (genového) toku uvnitř populace i mezi populacemi (Je populace outbrední či imbrední?), jaká je míra a struktura klonality rostliny. Takové znalosti jsou nutné nejen pro správnou interpretaci fylogeografické studie, ale i pro aplikovanou ekologii.

Pokud by např. rostlina byla velmi silně klonální a my bychom na velké škále pomocí zvoleného markeru odhalili jen velmi malou variabilitu, nemůže z toho automaticky usuzovat, že mezi jedinci je vysoký genový tok semen a (nebo) pylem. Rostlina tam prostě mohla časem narůst bez účasti semen, jen vegetativně (např. různými úlomky, oddenky či šlahouny).

Pro praktickou ochranu vzácných nebo naopak potlačování invazních druhů je nutné vědět jak moc je rostlina klonální a jaký je genový tok uvnitř (meta)populace. To nám, spolu s praktickými pěstebními a manipulativními experimenty, dá odpověď na otázku jak geneticky heterogenní skupinu jedinců a na jak velké ploše musíme chránit, aby populace byla životaschopná. S tím souvisí i problematika ochrany vzácných druhů ve fragmenotvané krajině (Tomimatsu et Ohara, 2003) Naopak pokud se invazní rostlina velmi dobře šíří vegetativními úlomky, nemá moc smysl pokoušet se jí potlačit fyzickou likvidací jednotlivých jedinců (např. *Reynoutria x bohemica* nebo *Heracleum mantegazzianum*, Pyšek et Prach 2003).

Na suchozemských cévnatých rostlinách bylo provedeno mnoho takovýchto studií (Lamote et al. 2002, Sun et Wong 2001, Tarayre et al. 1997, Kameyama et al. 2001), na vodních jen velmi málo. Kudoh et Whigham (1997, 2001) zkoumali mokřadní druh *Hibiscus moscheutos*. Fischer et al. (2000) zkoumali pomocí RAPD populace vzácného vodního *Ranunculus reptans* ve 2 švýcarských jezerech. Russell et al. (1999) zkoumali vliv hydrochorního šíření semen amazonského stromu na jeho genetickou strukturu: hydrochorie semen, pravděpodobně vzhledem

k allogamii a hmyzosprašnosti, neměla prokazatelný vliv na genetickou strukturu populací.

Nemáme k dispozici dostatek literárních zdrojů, abychom si mohli udělat směřodatnou představu o klonální a genetické struktuře *Nuphar lutea* a vodních cévnatých rostlin obecně. Praktická část mé bakalářské práce (a navazující činnost na magisterské diplomové práci) by měla pomoci alespoň část těchto otázek zodpovědět. Mnou získané výsledky by mohly mít i obecnější platnost pro vodní cévnaté rostliny s podobnou mírou klonality a charakteristikou šíření.

Touto prací bych chtěl zodpovědět následující otázky:

- Jaká je klonální struktura populací stulíku žlutého? Jsou populace tvořeny jedním nebo více klony? Jak jsou klony rozsáhlé? Jaká je jejich prostorová struktura?
- Jaké je alelické bohatství v populacích? Liší se míra heterozygosity mezi jednotlivými populacemi?
- Jak jsou si populace molekulárně-geneticky podobné?

9.1. Metodika

9.1.1. Sběr materiálu v terénu

Prováděl jsem celkem dvě terénní studie na čtyřech vybraných populacích (obrázek 6) *Nuphar lutea*. Všechny populace byly vybrány s ohledem na bohatství porostu stulíku a snadnou přístupnost pro odběr vzorků ze břehu. V první studii (vzorky sbírány v září 2005) šlo o tyto populace:

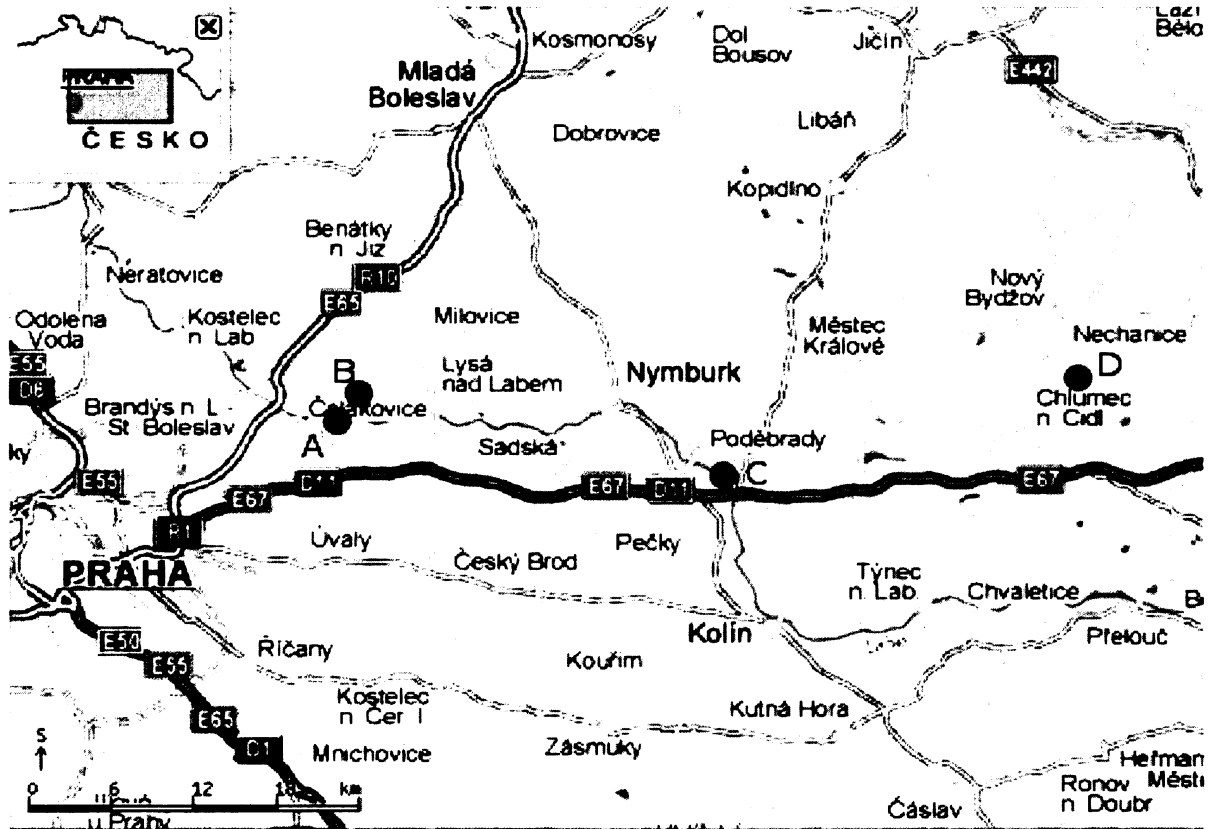
- dolní konec kanálu Grado u Čelákovic (50° 10' 9.59" N, 14° 44' 49.02" E; obrázek 8),
- tůň Václavka u Čelákovic (50° 10' 47.17" N, 14° 46' 20.36" E; obrázek 9) a
- Bystřice u Kosiček, proti proudu od mostu (50° 10' 34.68"N, 15° 32' 48.89"E; obrázek 10).

Ve druhé studii (vzorky sbírány v září 2006) šlo o populaci u Libice nad Cidlinou (50° 7' 20.66" N, 15° 9' 42.27" E; obrázek 7 a obrázek 11).

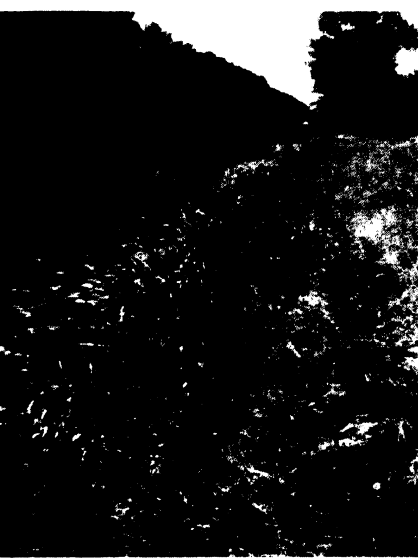
Znalosti o genetické variabilitě na velmi malé prostorové škále nám poskytnou vhodné srovnání s množstvím variability, které získám v plánované magisterské práci, jejíž podstatou je fylogeografická studie stulíku žlutého na území celé ČR.

Sběry byly provedeny formou transektu podél břehu a byly sbírány malé části listů o ploše asi 10 cm², které byly ukládány do označených pytlíků se silikagelem. Protože stulík má dlouhé řapíky se vzplývavými listy, byl z každého trsu odebrán jen jeden vzorek, aby se tak, pokud možno, předešlo odběru materiálu z téže ramety. Bohužel se nedá jinak než pomocí molekulární

analýzy nedá poznat jak velká je gameta. Poloha odebraných vzorků byla zaznamenána do jednoduchého orientačního plánu. Na místě nebyly prováděny žádné další analýzy nebo odběry.



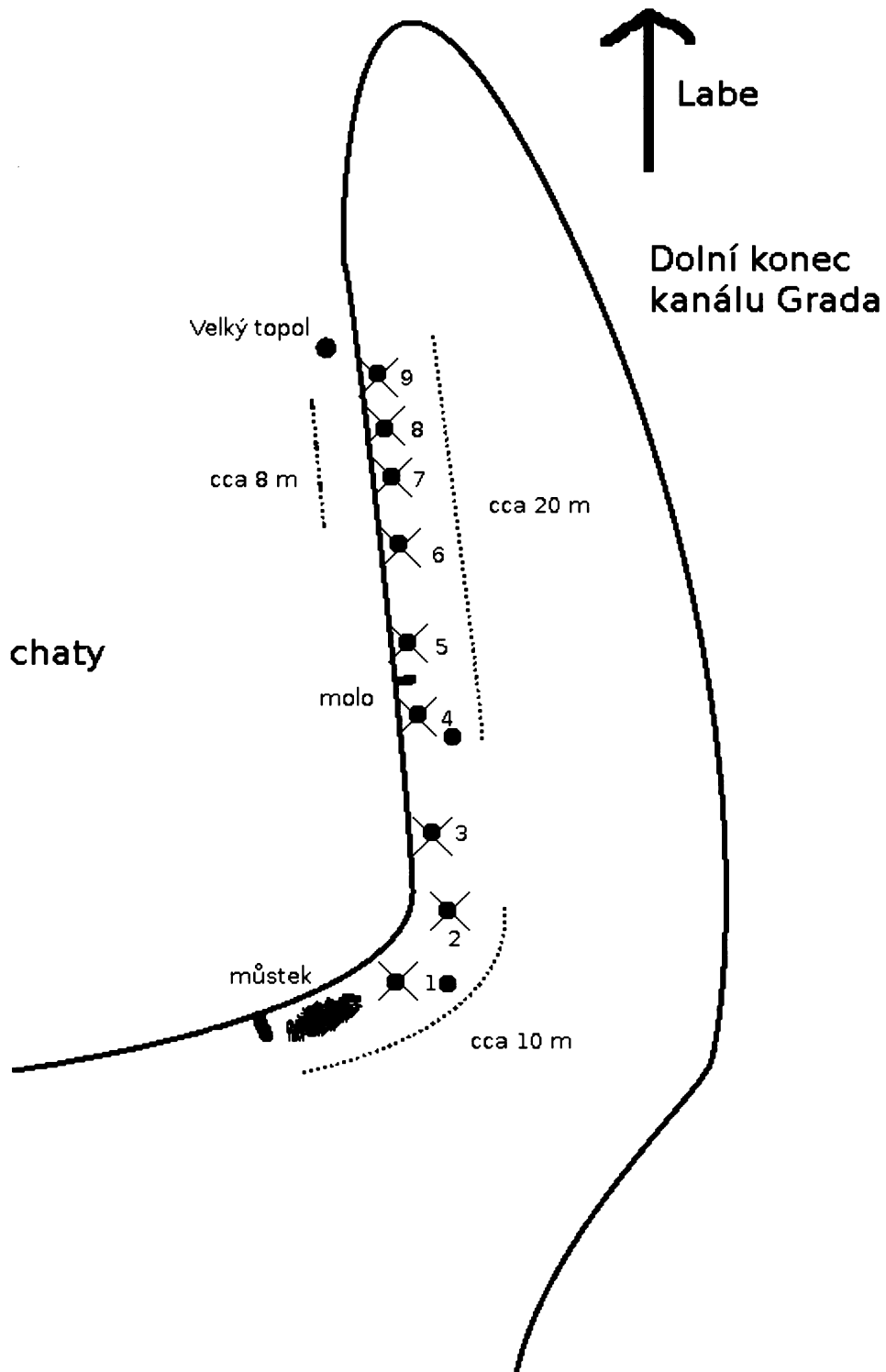
Obrázek 6: Mapka oblasti východně od Prahy ukazující studované lokality stulíku žlutého. A: dolní konec kanálu Grada u Čelákovice ($50^{\circ} 10' 9.59'' N$, $14^{\circ} 44' 49.02'' E$), B: tůň Václavka u Čelákovice ($50^{\circ} 10' 47.17'' N$, $14^{\circ} 46' 20.36'' E$), C: Bystrice u Kosiček, proti proudu, u mostu ($50^{\circ} 10' 34.68'' N$, $15^{\circ} 32' 48.89'' E$) a D: Cidlina mezi soutokem Cidlinou s Labem a Libicí nad Cidlinou ($50^{\circ} 7' 20.66'' N$, $15^{\circ} 9' 42.27'' E$).



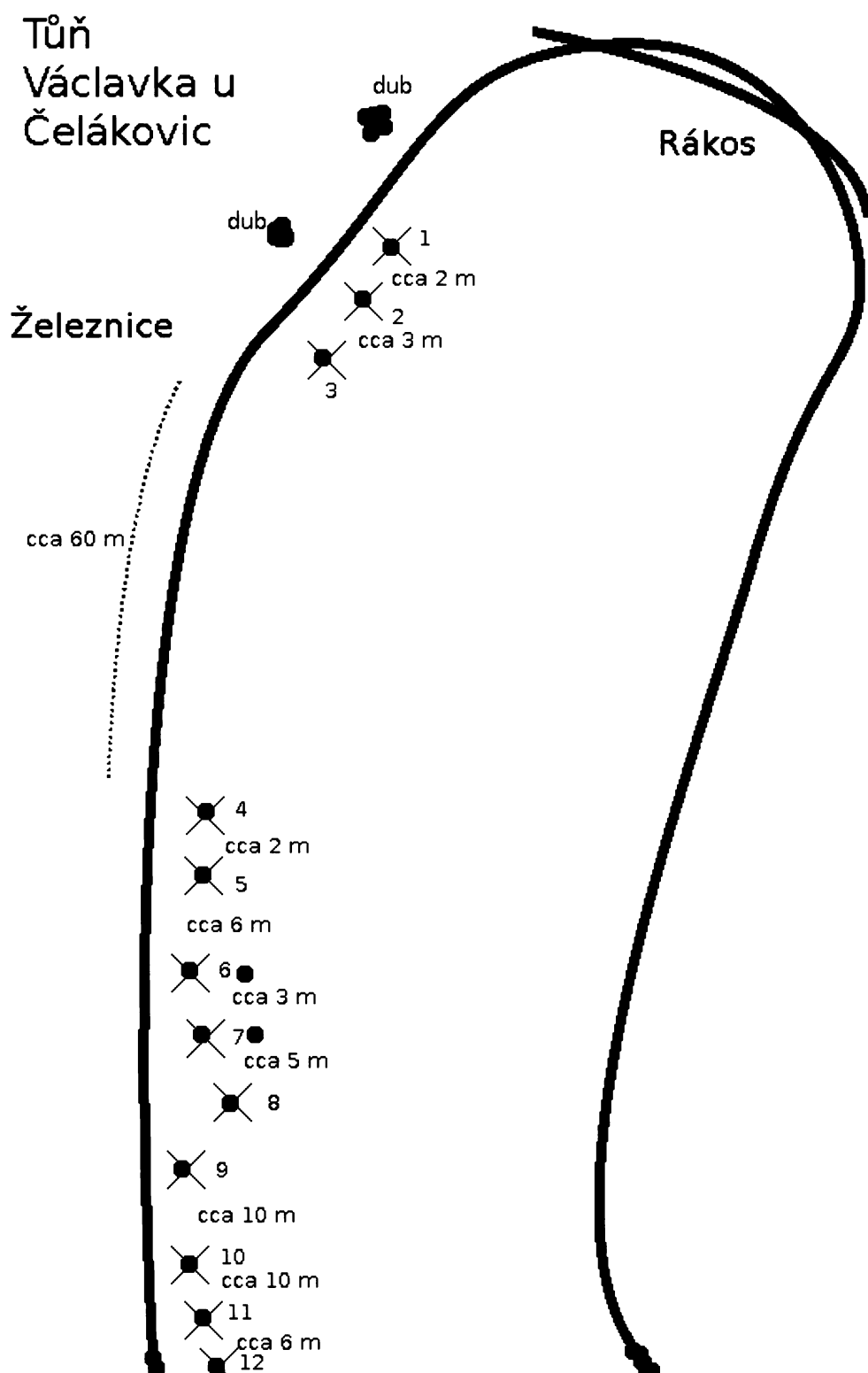
Obrázek 7: Studovaná populace stulíku žlutého na Cidlině mezi soutokem Cidliny s Labem a Libicí nad Cidlinou. Září 2007.

9.1.2. Laboratorní zpracování vzorků

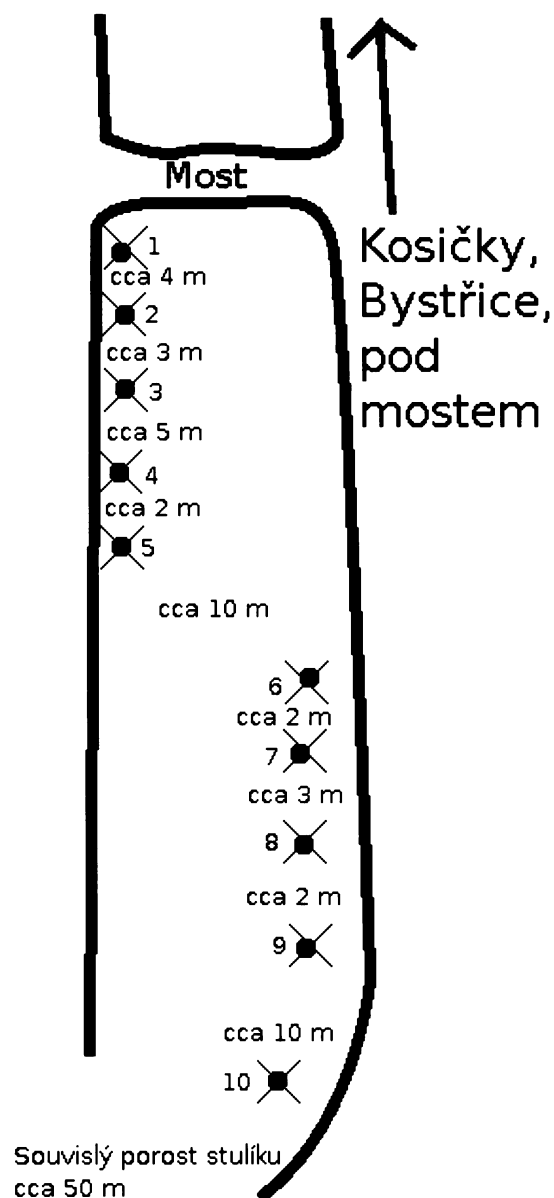
Vzorky byly zpracovávány v laboratoři DNA Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (<http://botany.natur.cuni.cz/dna>). Po vysušení v silikagelu byly malé části listů použity k extrakci DNA metodou CTAB (Doyle et Doyle 1987). Následně byla změřena koncentrace získané DNA na spektrofotometru BioPhotometer firmy Eppendorf a DNA byla naředěna na koncentraci $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Tato naředěná DNA byla následně použita k PCR.



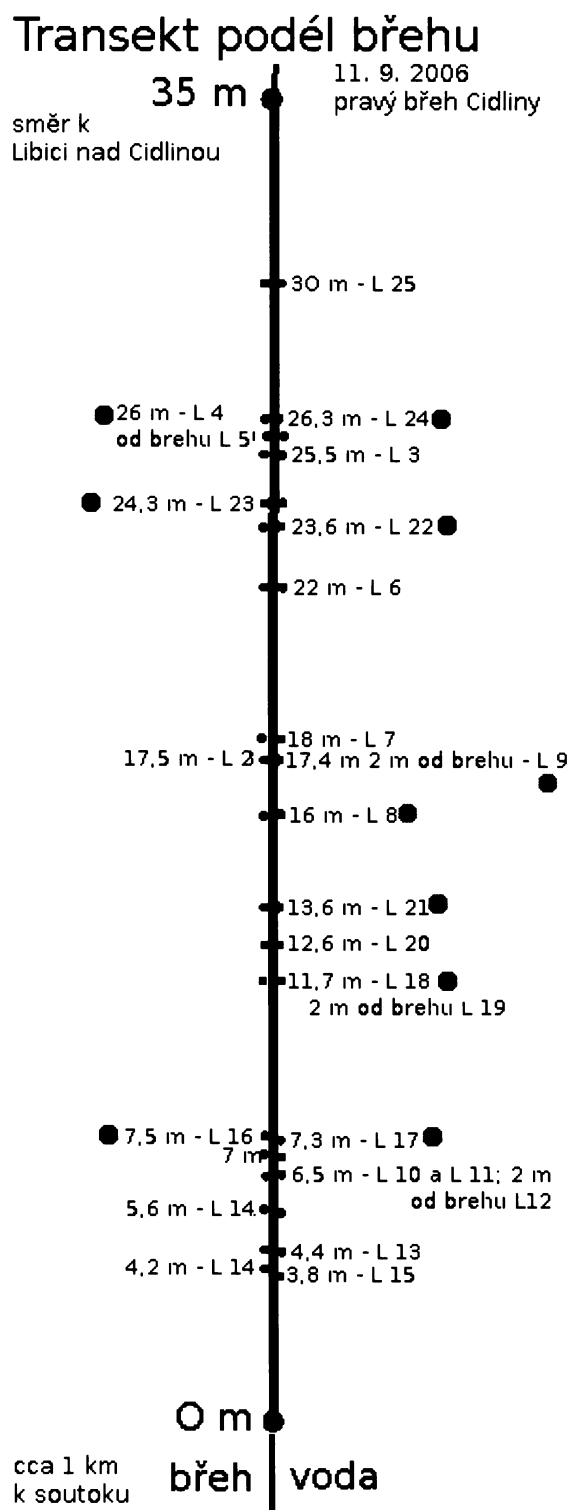
Obrázek 8: Studovaná lokalita stulíku žlutého, kanál Grada u Čelákovice ($50^{\circ} 10' 9.59'' N$, $14^{\circ} 44' 49.02'' E$). Červeně jsou vyznačeny klony. Velice blízký je jim vzorek 2. Podobné jsou i vzorky 3, 5 a 6 a vzorky 8 a 9. Celkově jsou vzorkům z této lokality nejpříbuznější vzorky z lokality tůň Václavka, která je vzdálená jen několik km. Viz. dendrogram na grafu 4.



Obrázek 9: Studovaná lokalita stulíku žlutého tůň Václavka u Čelákovic ($50^{\circ} 10' 47.17'' N$, $14^{\circ} 46' 20.36'' E$). Červeně jsou vyznačeny klony. všechny vzorky mimo vzorku 4 si jsou blízce příbuzné. Celkově jsou vzorkům z této lokality nejpříbuznější vzorky z lokality kanál Grada, která je vzdálena jen několik km. Viz. dendrogram na grafu 4.



Obrázek 10: Studovaná lokalita stulíku žlutého, říčka Bystřice u obce Kosičky, pod mostem směrem po proudu (50° 10' 34.68" N, 15° 32' 48.89" E). Při odběru na této lokalitě nebyly zaznamenány žádné klony. Všechny vzorky si jsou blízce příbuzné a nejpříbuznější jsou vzorkům z populace kanál Grada u Čelákovic. V dendrogramu na grafu 4 se nachází mezi populacemi z kanálu Grada a populacemi od Libice nad Cidlinou. Bystřice se vlévá do Cidliny.



Obrázek 11: Studovaná populace stulíku žlutého, řeka Cidlina mezi soutokem s Labe a Libicí nad Cidlinou (50° 7' 20.66" N, 15° 9' 42.27" E). Jednotlivé barvy ukazují 3 identifikované klony. Modrému klonu jsou velice blízké zvláště vzorky 19, 12 a 13. Zelenému klonu jsou velice blízké vzorky 7 a 3 a červenému klonu je velice blízký vzorek 20. Tato populace byla nejhomogennější a nejizolovanější. Viz. dendrogram na grafu 4.

barva	█	NED	█	█	NED	█	█	NED	█	█
lokus	NLGA 1	NLGA 2	NLGA 3	NLGA 4	NLGA 5	NLGA 6	NLGA 7	NLGA 8	NLCA1	NLTG/ GA1
repeat motif	(GA)32	(GA)37	(GA)23	(GA)23	(GA)12	(GA)11	(GA)24	(GA)23	(CA)27	(GT)8(TG)14(GA)9
forward primer	CTGA ATATT AACC GATTA GCTC C	CTTTA GGAG GGTC TTTAG C	GTTG TAAC GTAAA TGCC GTC	GCTT CTCT CAGA ACAAT GGG	CCCG CCATA TCTG ATGA C	GACG ACGG AGTC AGTT CC	ATTTA TTCC CAGC ACTTT GG	CATCT CAAAT TCAC ATTCA GC	CTCA GAAA CGAG GCTC TATG	AAGC AGCA GCAA AATTT GTA
reverse primer	GCTT AGTG ACTC AACC AGGT C	CCAA TCTCT AGTA GGAG GAGC	CTTG CCGA TGAA ACCC AT	CCCT AGTT TGGA AGGG TTG	AAGT GGAG GGGA CGAA AG	GTTG AACA ATTTG GGTG TTG	CTTG ACAT GATTT CTCT GAAC C	GACT TGATA AGGT TGTT GAGG	TTTG GTTG GAAG ACAA GAAG	TGTG CAAG TTACC TGTTT CC
velikost	140– 170	85– 127	140– 172	180– 202	81– 103	255– 270	80–106	184– 228	214– 225	115– 125

Tabulka 1: Přehled selektivních jaderných polymorfních primerů pro zástupce rodu *Nuphar* (Ouborg et al. 2000). Primery jsou značeny třemi fluorescenčními barvami, 4. slouží pro standard. Dále je uvedeno jméno lokusu a příslušný opakující se motiv (tandemová repetice na DNA). Forward a reverse primer ukazují sekvence selektivních primerů. Velikost udává délkový rozsah alel podle práce Ouborg et al. (2000).

Mikrosatelitová analýza byla provedena s využitím multiplex PCR s fluorescenčně značenými primery (Ouborg et al. 2000). Primery přehledně ukazuje tabulka 1. Protože máme k dispozici 3 různé barvičky pro značení primerů (4. červená je pro standart) a jednotlivé lokusy jsou různě dlouhé, můžeme některé primery seskupit do 4 tzv. multiplexů (I A, II A, I B a II B), což mj, ušetří značné finanční obnosy. Do PCR vstupuje každý multiplex zvlášť. Pro potřeby fragmentační reakce na sekvenátoru je možné dát dohromady multiplexy I A s II A a I B s II B. Použité multiplexy, které byly následně použity pro přípravu master mixů⁷ ukazuje tabulka 2.

Pro PCR byl použit program podle tabulky 3. Reakce byla provedena v termocykleru Eppendorf Mastercycler Gradient.

⁷ Při analýze většího množství vzorků naráz se objem komponent příslušného multiplexu vynásobí počtem vzorků + 1 a do PCR stripů se následně rozpipetuje hotová směs, do které se jen přidá DNA.

multiplex I A		multiplex I B	
primery	GA1, GA3, GA5	primer	GA6
sterilní voda	12,6 μ l	sterilní voda	13,6 μ l
pufř	2 μ l	pufř	2 μ l
dNTP	0,4 μ l	dNTP	0,4 μ l
forward primer	3 x 0,25 μ l	forward primer	3 x 0,25 μ l
reverse primer	3 x 0,25 μ l	reverse primer	3 x 0,25 μ l
Taq polymeráza	0,5 μ l	Taq polymeráza	0,5 μ l
DNA	3 μ l	DNA	3 μ l
multiplex II A		multiplex II B	
primery	TG/CA, GA2, CA1	primery	GA4, GA7, GA8
sterilní voda	12,6 μ l	sterilní voda	12,6 μ l
pufř	2 μ l	pufř	2 μ l
dNTP	0,4 μ l	dNTP	0,4 μ l
forward primer	3 x 0,25 μ l	forward primer	3 x 0,25 μ l
reverse primer	3 x 0,25 μ l	reverse primer	3 x 0,25 μ l
Taq polymeráza	0,5 μ l	Taq polymeráza	0,5 μ l
DNA	3 μ l	DNA	3 μ l

Tabulka 2: 10 specifických PCR primerů bylo rozděleno do 4 multiplexů, které podstupovaly PCR samostatně každý zvlášť. Pro účely fragmentační reakce byly dohromady zpipetovány multiplexy I A s II A a I B s II B. Každý multiplex obsahuje vodu, primery, pufř, dNTP a polymerázu. Poté se rozpipetuje do jednotlivých stripů a přidá se DNA.

teplota [°C]	čas	
94	1 min	iniciální
94	30 sek	35 cyklů
50	30 sek	
72	35 sek	
72	15 min	terminační
10	hold	

Tabulka 3: Program pro PCR, který byl použit pro amplifikaci mikrosatelitových alel. Program začíná d jednominutovou denaturací dsDNA při 94 °C. Každý z 35 cyklů se skládá z třicetisekundové denaturace při 94 °C, třicetisekundového nasedání selektivních primerů při 50 °C a třiceti pětisekundové elongace při 72 °C. Po všech cyklech následuje patnáctiminutový terminační prostor při 72 °C pro dokončení elongací a celý program končí teplotou 10 °C, která umožní uchovávat výsledky PCR i po dobu delší než 12 hodin.

Po PCR byly alely pro kontrolu vizualizovány pomocí agarózové elektroforézy s použitím ethidium bromidu ke zviditelnění DNA v UV světle speciální kamery Kodak Gel Logic 100. Pokud byly proužky viditelné a byly v pozici odpovídající délkovému rozsahu alel (viz. tab.), PCR fragmenty byly vizualizovány s využitím automatického sekvenátoru ABI 3100 Avant v sekvenační laboratoři biologické sekce PŘF UK a automatického sekvenátoru ABI 3130 Avant v laboratoři molekulární biologie Výzkumného ústavu rostlinné výroby Praha. Analýza na sekvenátoru nám umožňuje dosáhnout mnohem kvalitnějších a spolehlivějších výsledků než běžná elektroforéza.

9.1.3. Vyhodnocení primárních dat

Primární data ze sekvenátoru byla analyzována pomocí demo verze programu GeneMarker (<http://www.softgenetics.com/genemarker.html>) a údaje o velikosti alel v jednotlivých lokusech byly zapsány do tabulky. Tato tabulka byla upravena a sloužila jako zdroj dat pro program MicroSatellite Analyser (MSA; Dieringer et Schlötterer 2003). všechny 4 populace z obou studií byly analyzovány dohromady. Pomocí MSA jsem počítal a testoval následující údaje:

- Genetické vzdálenosti:
 - $(\Delta\mu)^2$ (Goldstein 1995) a
 - Nei's chord distance (Nei et al. 1983).
 - Tyto vzdálenosti byly testovány permutačním testem o 1 000 permutacích.
- Nakonec byl vytvořen zdrojový soubor pro program Arlequin v 3.1 (Excofier 2006).

Pomocí programu Arlequin byla analyzována molekulární variance (AMOVA). Pomocí AMOVy byla rozdělena variabilita na vnitropopulační a mezipopulační. Pro analýzu metodou AMOVA byly nejprve odstraněny klony (byl z nich zachován pouze jeden jedinec), aby se tak odstranily pseudoreplikace, které by narušily správnost výpočtů molekulárně-genetických parametrů. Pomocí programu SYNTAX 2000 (Podani 2001) byly na základě matic genetických vzdáleností vypočítaných programem MSA zkonstruovány dendrogramy a provedena analýza hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis; PCoA). Výsledek AMOVy byl testován pomocí 1000 permutací. AMOVA byla počítána na základě frekvence alel (F_{ST} analog) i na základě čtverců vzdáleností mezi alelami (R_{ST} analog využívající step-wise mutační model).

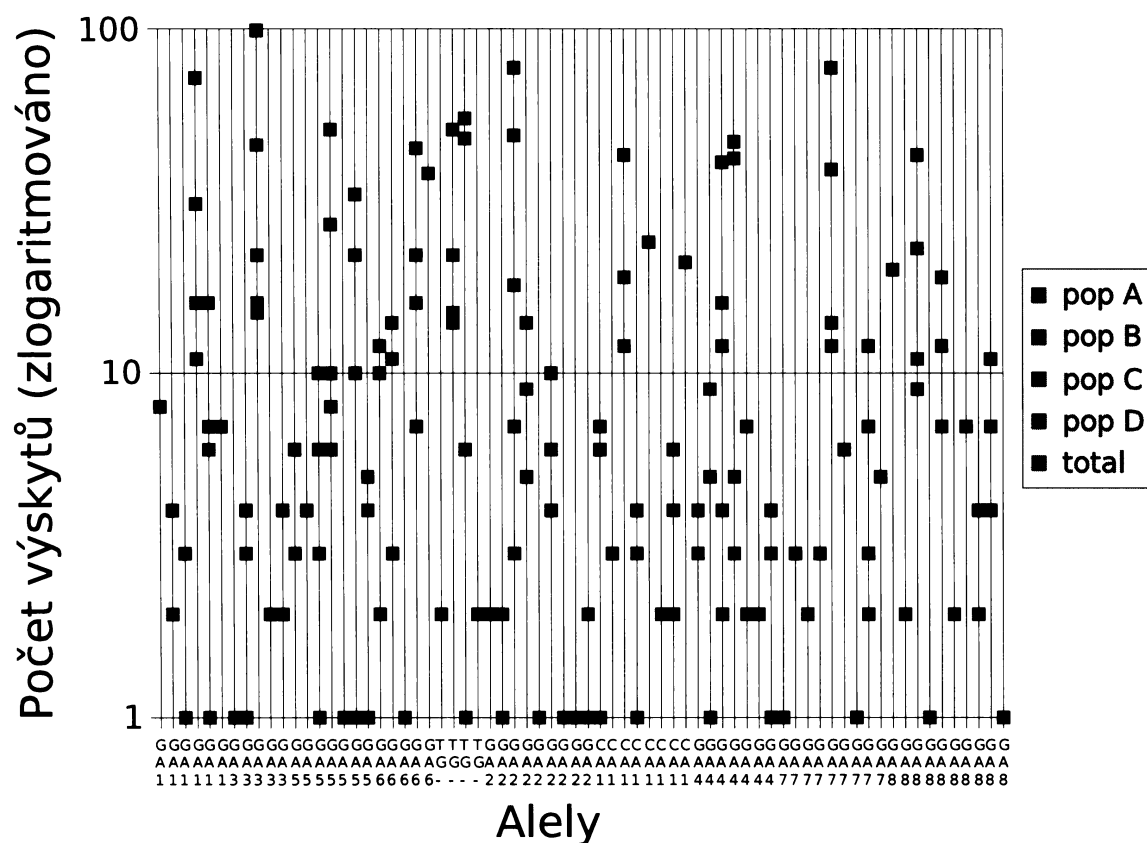
PCoA byla provedena na základě matice $(\Delta\mu)^2$ genetických vzdáleností (Goldstein 1995) spočítané programem MSA. $(\Delta\mu)^2$ je podobnost na základě čtverce rozdílů v délkách alel, zatímco Nei's chord distance (Nei et al. 1983) je počítána na základě frekvence alel. Dendrogramy byly kresleny na základě jak $(\Delta\mu)^2$ tak Nei's chord distance. K jejich vytvoření byla použita clusterová

metoda UPGMA (Unweighted Per Group Mean Average; Sneath et Sokal 1973), která spojuje nejpodobnější objekty na základě matice párových podobností a takto vzniklé clustery potom spojuje na základě neváženého průměru skupiny.

9.2. Výsledky

Celkem bylo analyzováno 55 jedinců ze 4 populací. Z populace A (kanál Grada u Čelákovice) bylo analyzováno 9 jedinců, z populace B (bystřice u Kosiček) 10 jedinců, z populace C (tůň Václavka) 11 jedinců a z populace D (Libice nad Cidlinou) 25 jedinců. Alelilcké složení studovaných jedinců

Počty jednotlivých alel po populacích



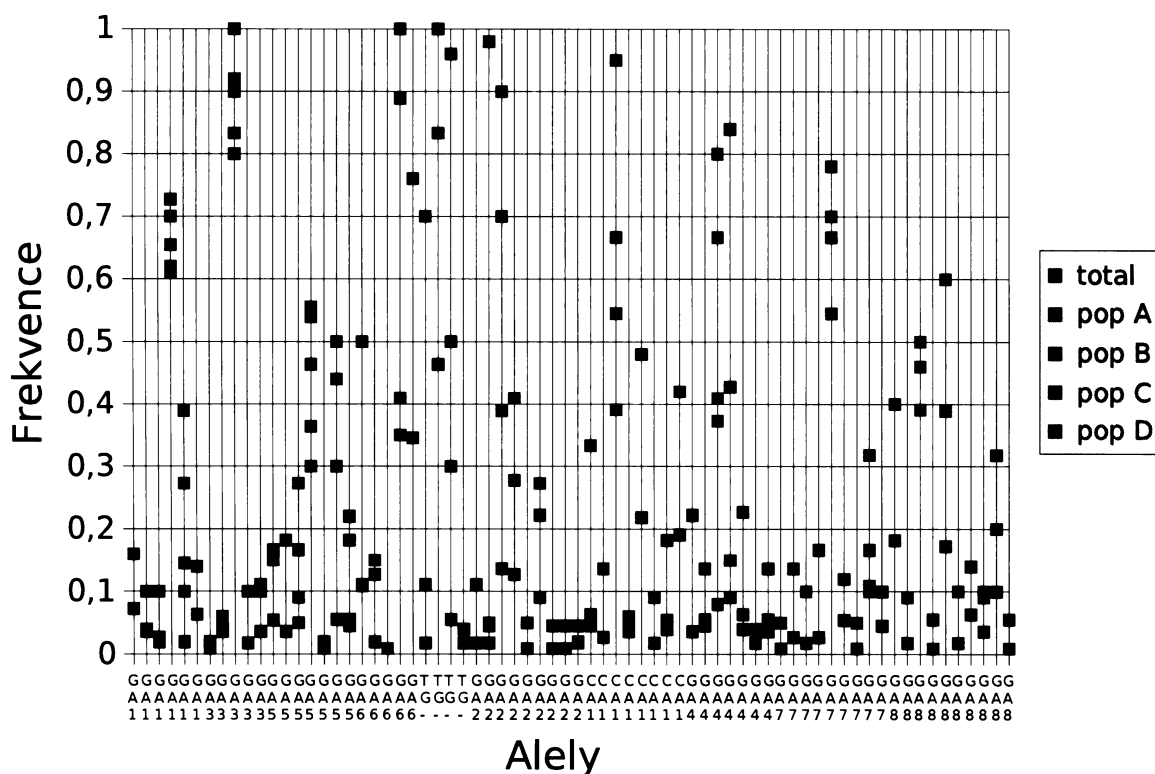
Graf 1: Graf ukazuje počty jednotlivých alel (v logaritmickém měřítku) v populacích (A - kanál Grada, B - Bystřice u Kosiček, C - tůň Václavka a D - u Libice nad Cidlinou). Jednotlivé lokusy a jejich alely jsou po řadě: GA1 (151, 152, 155), GA3 (148, 150, 152, 154, 156), GA5 (86, 90, 92, 94, 98, 100, 102), GA6 (260, 262, 264, 268, 270), TG-CA1 (115, 119, 121, 123), GA2 (86, 90, 92, 94, 96, 100, 102, 106, 108), CA1 (216, 218, 222, 224, 226, 230, 232, 234), GA4 (190, 192, 194, 196, 198, 200, 204), GA7 (87, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105) a GA8 (198, 202, 204, 210, 214, 216, 218, 220, 222, 224). U většiny lokusů je většina alel vzácná a jen jedna nebo několik jich je relativně rozšířených. Takovéto pattern je velice podobné ve všech populacích.

pro všech 10 lokusů je uvedeno v příloze 1.

lokusy	GA1	GA3	GA5	GA6	TG/CA1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8	průměr
populace A	2	3	5	2	3	4	2	4	3	4	3,2
populace B	4	3	4	3	2	3	2	3	5	4	3,3
populace C	2	1	4	1	1	7	5	5	3	4	3,3
populace D	6	3	3	3	2	2	4	4	3	3	3,3

Tabulka 4: Počty alel pro jednotlivé lokusy a populace. Pro populace jsou zobrazeny i průměrné počty alel. Jednotlivé populace jsou A - kanál Grada, B - Bystřice u Kosiček, C - tůň Václavka a D - u Libice nad Cidlinou).

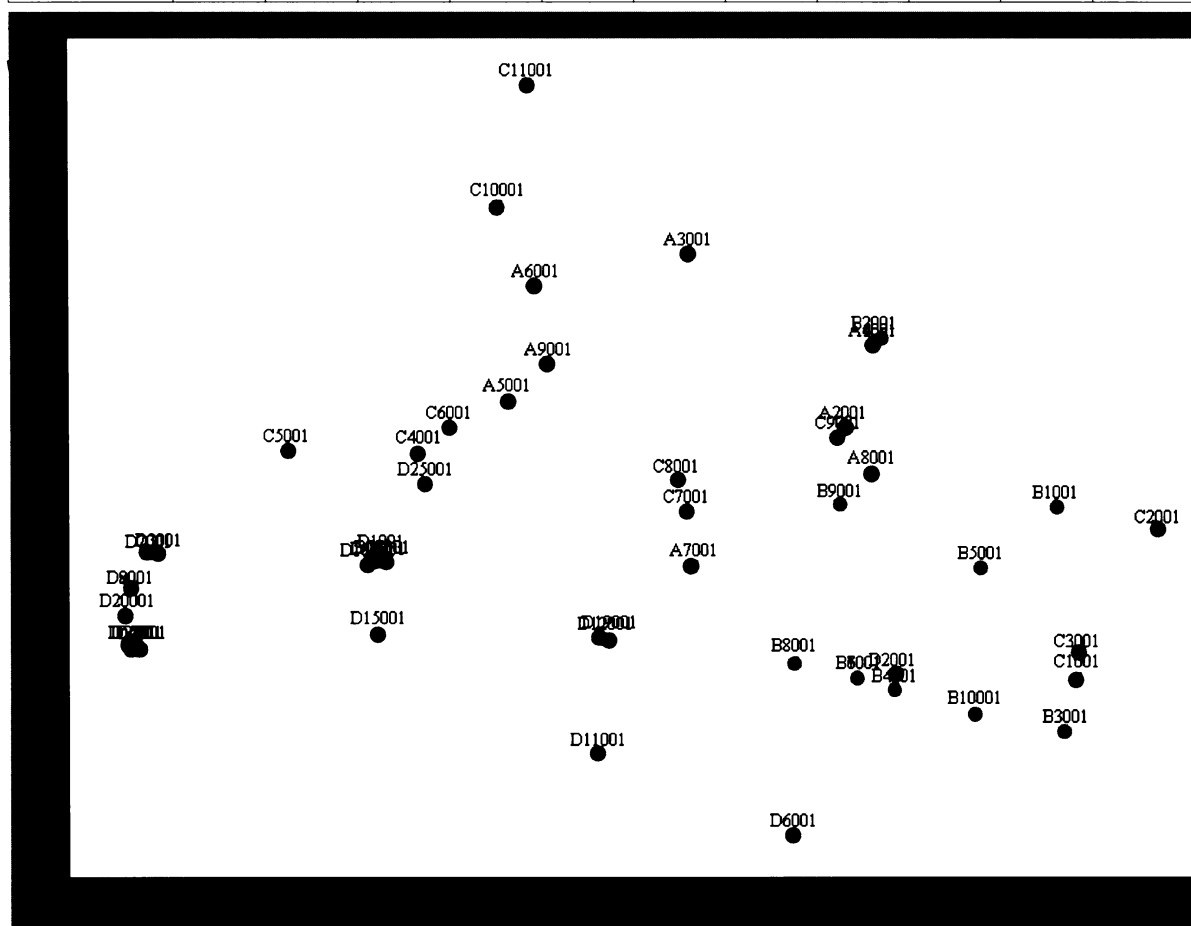
Frekvence jednotlivých alel po populacích



Graf 2: Graf ukazuje frekvence zastoupení jednotlivých alel v populacích (A - kanál Grada, B - Bystřice u Kosiček, C - tůň Václavka a D - u Libice nad Cidlinou). Jednotlivé lokusy a jejich alely jsou po řadě: GA1 (151, 152, 155), GA3 (148, 150, 152, 154, 156), GA5 (86, 90, 92, 94, 98, 100, 102), GA6 (260, 262, 264, 268, 270), TG-CA1 (115, 119, 121, 123), GA2 (86, 90, 92, 94, 96, 100, 102, 106, 108), CA1 (216, 218, 222, 224, 226, 230, 232, 234), GA4 (190, 192, 194, 196, 198, 200, 204), GA7 (87, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105) a GA8 (198, 202, 204, 210, 214, 216, 218, 220, 222, 224). U většiny lokusů je většina alel vzácná a jen jedna nebo několik jich je relativně rozšířených. Takovéto pattern je velice podobné ve všech populacích.

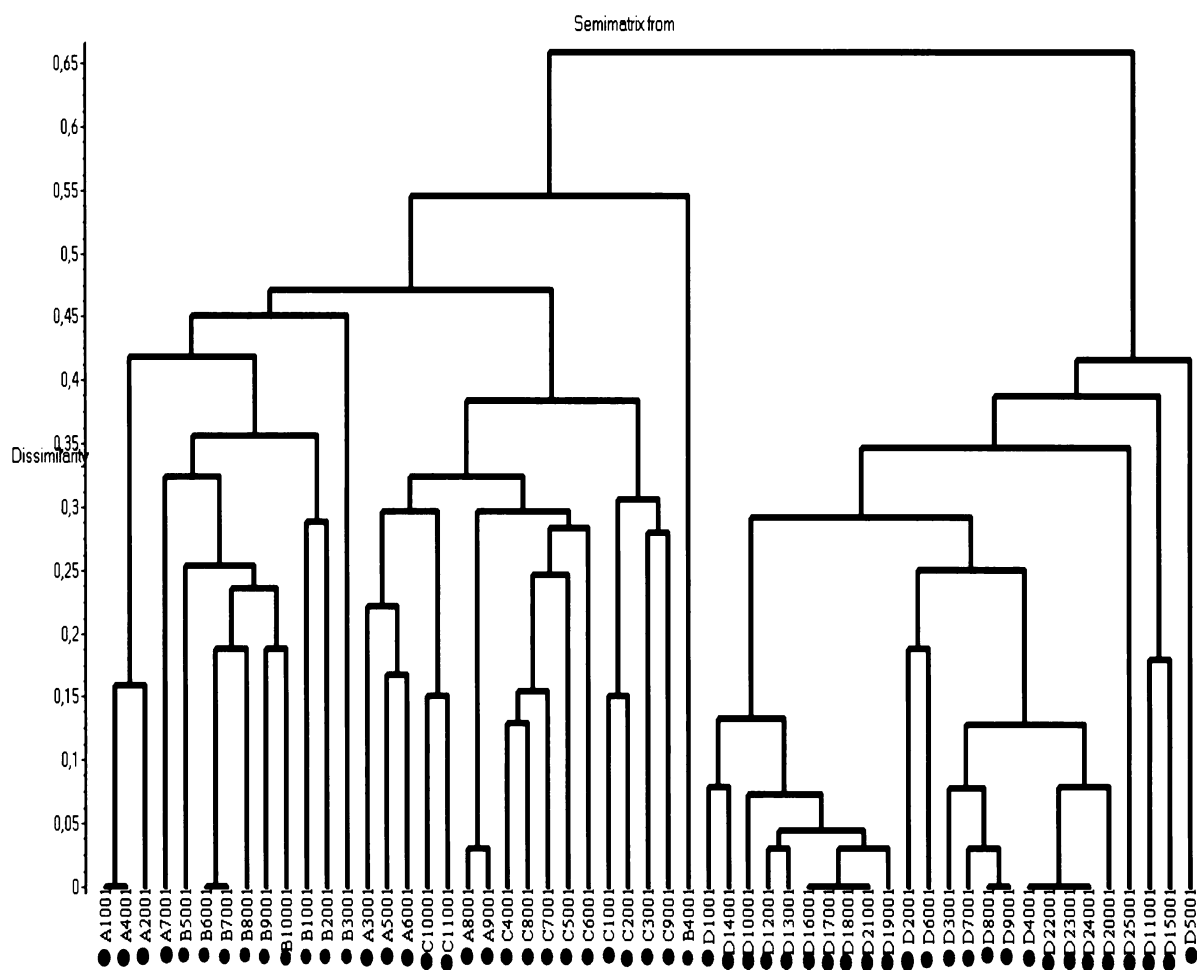
Frekvence a počty jednotlivých alel ve studovaných populacích a celkově ukazují grafy 1 a 2. Velice běžným rysem je, že v populaci je jedna alela z každého lokusu široce rozšířená, zatímco ostatní jsou relativně vzácné. Vnitropopulační alelická variabilita byla počítána s využitím MSA jako očekávaná heterozygosita (tabulka 5). Počty alel po populacích ukazuje tabulka 4.

	GA1	GA3	GA5	GA6	TG/C A1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8	průměr
populace A	0,5	0,3	0,66	0,2	0,3	0,75	0,47	0,52	0,52	0,62	0,49
populace B	0,5	0,35	0,66	0,63	0,44	0,19	0,1	0,35	0,51	0,61	0,44
populace C	0,41	0	0,76	0	0	0,76	0,67	0,77	0,61	0,66	0,47
populace D	0,57	0,15	0,52	0,38	0,07	0,04	0,6	0,29	0,37	0,62	0,36



Graf 3: PCoA spočítaná programem SYNTAX 2000 na základě matice $(\Delta\mu)^2$ vzdáleností vypočítané programem MSA. Jednotlivé barvy odlišují studované populace. A (černá): dolní konec kanálu Grada u Čelákovic ($50^{\circ} 10' 9.59''$ N, $14^{\circ} 44' 49.02''$ E), B (zelená): tůň Václavka u Čelákovic ($50^{\circ} 10' 47.17''$ N, $14^{\circ} 46' 20.36''$ E), C (červená): Bystřice u Kosiček, proti proudu, u mostu ($50^{\circ} 10' 34.68''$ N, $15^{\circ} 32' 48.89''$ E) a D (modrá): Cidlina mezi soutokem Cidlinou s Labem a Libicí nad Cidlinou ($50^{\circ} 7' 20.66''$ N, $15^{\circ} 9' 42.27''$ E). Žádná ze studovaných populací netvoří jasně oddělenou skupinu. První osa vysvětlila 58,71 %, druhá 14 % pozorované variability.

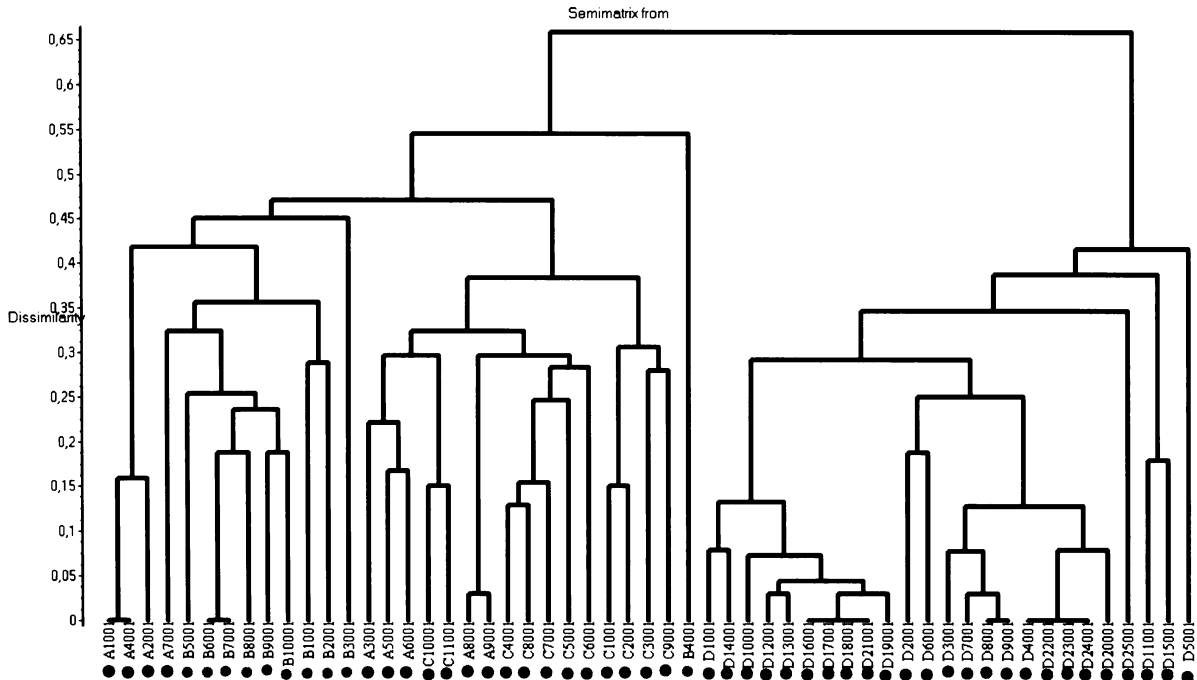
Pomocí programu SYNTAX 2000 byly vytvořeny dva dendrogramy a analýza hlavních komponent (PCoA; Graf 3). PCoA byla počítána na základě genetické vzdálenosti $(\Delta\mu)^2$ vypočítané programem MSA. První osa vysvětlila 58,71 % variability, druhá 14 %, třetí 9,04 %, čtvrtá 6,65 % a pátá 3,73 % pozorované variability. Dendrogramy byly vytvořeny na základě výpočtů genetických vzdáleností $(\Delta\mu)^2$ a Nei's chord distance (Nei et al. 1983). Oba stromy byly vytvořeny metodou UPGMA.



Graf 4: Dendrogram vytvořený programem SYNTAX 2000 na základě $(\Delta\mu)^2$ spočítané programem MSA. Jednotlivé barvy odlišují studované populace. A (černá): dolní konec kanálu Grada u Čelákovic ($50^{\circ} 10' 9.59''$ N, $14^{\circ} 44' 49.02''$ E), B (zelená): tůň Václavka u Čelákovic ($50^{\circ} 10' 47.17''$ N, $14^{\circ} 46' 20.36''$ E), C (červená): Bystřice u Kosiček, proti proudu, u mostu ($50^{\circ} 10' 34.68''$ N, $15^{\circ} 32' 48.89''$ E) a D (modrá): Cidlina mezi soutokem Cidlinou s Labem a Libicí nad Cidlinou ($50^{\circ} 7' 20.66''$ N, $15^{\circ} 9' 42.27''$ E). Populace D je jediná, která tvoří výlučný klad.

Pomocí programu Arlequin v 3.1 (Excofier 2006) byla na základě zdrojového souboru vygenerovaného programem MSA spočítána AMOVA na základě počtu odlišných alel (tabulka 6).

Výsledek byl testován pomocí 1000 permutací. AMOVA na základě čtverců vzdáleností (R_{ST} analog využívající step-wise mutační model) vyšla prakticky stejně, a proto zde není uvedena. Mezipopulační variabilita vysvětlila 32,49 % pozorované variability a vnitropopulační variabilita vysvětlila 67,51 % pozorované variability. Rozdíl mezi populacemi vyšel průkazně na hladině významnosti $p < 0,0001$.



Graf 5: Dendrogram vytvořený programem SYNTAX 2000 na základě Nei's chrod distance spočítaném programem MSA. Jednotlivé barvy odlišují studované populace. A (černá): dolní konec kanálu Grada u Čelákovic (50° 10' 9.59" N, 14° 44' 49.02" E), B (zelená): tůň Václavka u Čelákovic (50° 10' 47.17" N, 14° 46' 20.36" E), C (červená): Bystřice u Kosiček, proti proudu, u mostu (50° 10' 34.68" N, 15° 32' 48.89" E) a D (modrá): Cidlina mezi soutokem Cidlinou s Labem a Libicí nad Cidlinou (50° 7' 20.66" N, 15° 9' 42.27" E). Populace D je jediná, která tvoří výlučný klad.

Zdroj variability	Stupně volnosti	Součet čtverců	Variance komponent	Variance [%]
mezi populacemi	3	76,815	1,0683	32,49
mezi jedinci v rámci populací	88	193,555	2,19949	67,51
Celkem	91	270,37	3,25779	

Tabulka 6: Výsledky AMOVy spočítané na základě datového souboru vygenerovaného programem MSA a po odstranění klonů (kvůli pseudoreplikacím). Variabilita mezi populacemi ukazuje podíl genetické variability na mezipopulační úrovni a variabilita mezi jedinci v rámci populací ukazuje podíl genetické variability mezi jedinci v rámci populací. Mezipopulační variabilita vysvětlila 32,49 % pozorované variability a vnitropopulační variabilita vysvětlila 67,51 % pozorované variability. Rozdíl mezi populacemi vyšel průkazně na hladině významnosti $p < 0,0001$.

9.3. Diskuze

Z tabulky 4 vyjadřující alelické bohatství je zřejmé, že pro většinu lokusů existuje jedna, popřípadě několik, velmi rozšířená alela a řada méně běžných alel. To si vysvětlují tak, že původní zakladatelé populací měli, patrně díky průchodu hrdlem láhve (bottleneck effect), jen velmi omezené alelické bohatství. Následně vznikaly mutacemi další alely, které se však doposud nestihly dostatečně rozšířit. Názorně je tato situace vidět na grafu 1 a grafu 2.

Grafy 3, 4 a 5 ukazují příbuzenské vztahy mezi jedinci ze všech populací. Z grafů je vidět, jednotlivé populace spíše netvoří oddělené shluky (jedinou výjimku tvoří některé skupiny náležející do populace D, Cidlina u Libice nad Cidlinou). Zvláště populace A (kanál Grada u Čelákovic) a B (tůň Václavka u Čelákovic) jsou si velice blízce příbuzné, což si lze vysvětlit jejich velkou prostorovou blízkostí. Slabé příbuzenské vztahy lze vysledovat i mezi populacemi C (Bystřice u Kosiček) a D (Libice nad Cidlinou), neboť Bystřice se vlévá do Cidliny a lze tedy, alespoň teoreticky, uvažovat postupný transport diaspor dolu po proudu. Pro ověření této hypotézy by však bylo nutné provést podrobný odběr vzorků podél celého toku. Relativně nejizolovanější se zdá být populace D, Libice nad Cidlinou, což si vysvětlují jednak její prostorovou vzdáleností od ostatních (což by ale nevysvětlovalo blízkost populace C, Bystřice u Kosiček s A, kanál Grada, a zvláště s B, tůň Václavka; v tomto případě lze uvažovat buď o dálkovém transportu diaspor, anebo, dle mého soudu pravděpodobněji, o konvergenci) a zvláště silnou klonální strukturovaností této populace.

Grafy 4 a 5 počítané různými metodami se mezi sebou liší. Za více odpovídající realitě považují graf 4 počítaný na základě $(\Delta\mu)^2$, kde se matice podobnosti tvoří na základě čtverce rozdílů v délkách alel, zatímco při použití Nei's chord distance na základě frekvence alel. To souhlasí s předpokladem mutací v mikrosatelitových alelách díky malých chybám při kopírování DNA a změnám o jednotku opakování.

V populaci z Cidliny u Libice nad Cidlinou bylo identifikováno několik výrazných klonů a u několika dalších jedinců, kteří se liší jen v několika lokusech, lze uvažovat o somatických mutacích (a tedy jejich původu z okolních klonů). Tato hypotéza by šla ověřit tak, že bychom po malých krocích (řádově desítky centimetrů) odebírali vzorky z jedné genety a zkoumali, zda všechny genotypy budou identické. Pokud ne, prokázali bychom somatické mutace.

Výsledky AMOVy (tabulka 5) si vysvětlují tak, že na vnitropopulační úrovni je mezi jedinci vysoká příbuznost (a tedy nízká míra diferenciací) a, v souladu s grafy 1 a 2 a tabulkou 4, převahou několika rozšířených alel na úkor ostatních, nepoměrně vzácných. Toto dosahuje extrémní situace v populaci C (Bystřice u Kosiček), kde je v několika lokusech jen jediná alela a v populaci D (Libice nad Cidlinou), kde bylo nalezeno největší množství klonů.

Obecně se dá říci, že populace stulíku žlutého jsou silně strukturované a při podrobnějším samplingu na delším transektu lze odhalit celé klony. Omezené heterozygosita alel je pravděpodobně dána tím, že zakladatelští jedinci měli jen omezené alelické bohatství a alely vzniklé mutacemi se nestihly dostatečně rozšířit. U některých jedinců, kteří jsou velice blízcí nedalekým klonům (je mezi nimi jen drobný rozdíl v několika lokusech) existuje podezření na somatické mutace, které tuto drobnou diferenciaci zapříčinily. O tomto tématu však není, pro naprostý nedostatek relevantních informací, říci nic bližšího. Je potřeba podrobný výzkum.

9.4. Závěr

Z výsledků je zřejmé, že populace stulíku žlutého jsou tvořeny více spíše menšími klony a skupinami příbuzných jedinců. V místech, kde se stulík může snadno šířit klonálním růstem, jsou klony patrné. Podle výsledků se na malé prostorové škále dají očekávat klony o velikosti jednotek jedinců. Prostorová struktura je silně podmíněna jednak klonalitou a jednak blízkou příbuzností členů populace, která se projevuje především omezeným alelickým bohatstvím.

Alelické bohatství většiny populací ve většině lokusů je silně omezeno ve prospěch několika široce rozšířených alel. Lze očekávat, že k fixaci nových alel dochází zvláště genetickým driftem a šířením příslušných klonů. Celková míra heterozygosity se mezi populacemi příliš neliší, velice rozdílná je naopak mezi jednotlivými alelami.

Je zřejmé, že v molekulárně-genetické podobnosti mezi populacemi i jedinci hraje zásadní roli prostorová blízkost jedinců a snadnost transportu mezi jednotlivými místy. Samotná prostorová blízkost však nemůže vysvětlit veškeré pozorované patter. Je nutné uvažovat další vlivy (možný dálkový transport a mutace).

10. Plánované téma magisterské diplomové práce

Ve své budoucí magisterské diplomové práci bych rád navázal na svou dosavadní práci a kladu si za cíl prozkoumat genetickou diverzitu stulíku žlutého (*Nuphar lutea*) v rámci celé České republiky. Bude studována genetická diverzita na úrovni populací (klonální struktura), vodních toků (šíření na krátké i dlouhé vzdálenosti) i celých povodí (zda a jak často dochází k šíření mezi jednotlivými toky, nádržemi i povodími). Ke studiu genetické variability bude použita technika studia mikrosatelitové DNA (Ouborg et al. 1999, 2000), která umožní identifikaci jednotlivých genotypů a definování jejich vzájemné příbuznosti. Studie umožní udělat si představu o možnostech šíření tohoto druhu v krajině, dozvíme se, zda se šíří generativně nebo vegetativně, v rámci říčních koridorů nebo i mezi nimi a na jak velké vzdálenosti.

Práce bude obsahovat i dva dílčí problémy, a sice analýzu rodičovství ze vzorků sesbíraných u Libice nad Cidlinou září 2006 a pokud získané výsledky budou smysluplné, bude analýza zopakována i na dalších populacích. Nasbíraná semena chci skladovat po více let a zjistit jejich klíčivost i v dalších letech a otestovat tak potenciální možnosti semenné banky. Bude také odebráno několik vzorků sedimentů ze dna a vyhledána semena stulíku (a případně dalších vodních rostlin) a vyzkoušena jejich klíčivost (pokud možno tak po několik sezón).

Cílem analýzy rodičovství je určit pylový tok v rámci populace. Známe genotyp matky i potomků a zajímá nás, z jaké průměrné vzdálenosti pochází pyl otce. Dále nás zajímá jaké bude rozložení genetické variability a klonální struktura v rámci populace. Tuto analýzu chceme provést ve 3 různých prostředích (stojatá, pomalu a rychleji tekoucí voda), abychom tak určili vliv hydrologie na populační strukturu a možnosti šíření stulíku.

Stulík tvoří dlouhé oddenky, které prorůstají bahnem a z nich vyrůstají dlouhé řapíky listů. (Arber 1920) Tyto oddenky jsou lámavé (např. pokud na ně ve vodě stoupneme) načež velice dobře plavou. Cílem studie bude otestovat v podmínkách umělé experimentální nádržky plovatelnost a klíčivost těchto úlomků. Úlomky stulíku velice dobře plavou, takže se o nich dá uvažovat jako o potenciálním vektoru vegetativního rozmnožování. Na druhou stranu však plavou možná až příliš dobře a není jasné, jak by se mohly uchytit na příhodném místě. Tento experiment by se měl pokusit na tuto otázku odpovědět.

10.1. Otázky

Cíle magisterské diplomové práce je tedy prozkoumáním genetické variability vodní rostliny stulíku žlutého (*Nuphar lutea*) a zodpovědět následující otázky:

1. Liší se geneticky populace stulíku žlutého v jednotlivých oblastech (povodí Labe, jižní Čechy, povodí Moravy)?
2. Dochází k transportu diaspor mezi povodími, nebo jsou striktně oddělené?
3. Jaké je klonální struktura a genový tok ve vybraných populacích?
4. Na jak velkou vzdálenost je šířen pyl?
5. Je v dolních částech toků větší genetická variabilita? Dochází tedy k převážnému šíření diaspor po proudu?
6. Šíří se stulík pouze generativně (semeny) nebo také vegetativně? Lze nalézt identické genotypy (klony) v různých populacích?
7. Jaká je plovatelnost a klíčivost úlomků dnových oddenků stulíku?
8. Jaká je semenná banka? Jak přibližně dlouho mohou být semena klíčivá? Jaká bude

klíčivost semen ze sedimentu?

U všech odpovědí lze předpokládat jejich obecnější platnost. Konečným ideálem – ke kterému je tato studie jen malým dílčím počinem – je porozumění dynamiky rostlin na krajinné úrovni a krajně samé a naší roli v ní.

10.2. Způsob řešení

Vzorky pro fylogeografickou studii budou odebrány ze 30 lokalit (10 v povodí Labe, 10 v povodí Vltavy a 10 v povodí Moravy). Na každé lokalitě bude odebráno 10 vzorků podél transektu s pravidelnými odstupy. Také budou pomocí GPS zaznamenány přesné geografické souřadnice jednotlivých odběrů a další údaje o lokalitě (velikost populace, proudící / stojatá voda, charakter dna, společenstvo, ...). Lokality budou vybrány tak, aby dobře reprezentovaly rozšíření stulíku na území republiky (Slavík 1991). Pokud se v jednotlivých oblastech podaří vytipovat více vhodných (dostatečně velkých a prostorově vzdálených) lokalit, bude mezi nimi rozhodnuto náhodně.

DNA bude extrahována metodou CTAB (Doyle et Doyle 1987), mikrosatelitové analýzy budou provedeny s využitím multiplex PCR s fluorescenčně značenými primery (Ouborg et al. 2000). Tyto analýzy budou provedeny v DNA laboratoři Katedry botaniky PřF UK (<http://botany.natur.cuni.cz/dna>). Vizualizace PCR fragmentů bude provedena s využitím automatického sekvenátoru ABI 3100 Avant v sekvenační laboratoři biologické sekce PřF UK. Postup bude stejný jako v případě vyhodnocování vzorků během bakalářské práce.

Primární data budou analyzována pomocí demoverze programu GeneMarker (<http://www.softgenetics.com/genemarker.html>) a údaje o velikosti alel v jednotlivých lokusech budou zapsány do tabulky.

Data budou vyhodnocena pomocí speciálního softwaru. Pro základní orientaci v datovém souboru (výpočet populačně-genetických parametrů pro jednotlivé populace a geografické oblasti) a pro přípravu datových matic pro další programy poslouží program MicroSatelliteAnalyser (MSA; Dieringer et Schlötterer 2003). Analýza molekulární variance (AMOVA) pro zjištění rozdělení genetické variability mezi populacemi bude spočtena v programu Arlequin (Excoffier et al. 2006). Mnohorozměrná analýzy pomocí techniky PCoA (principal coordinate analysis) a znázornění hierarchických vztahů mezi jedinci a populacemi budou provedeny v programu SYNTAX 2000 (Podani 2001). Vztah mezi prostorovými a genetickými vzdálenostmi pro zjištění míry prostorové autokorelace bude počítán pomocí programu SPAGeDi (Hardy & Vekemans 2002). Prostorové vztahy a další geografické údaje budou zobrazeny pomocí programového balíku Esri ArcGIS, který poslouží i při hledání a zobrazování možných migračních cest.

Pro analýzu rodičovství budou použity 3 různé populace (po jedné z povodí Vltavy, Labe a Moravy). Každá populace bude z jiného prostředí (rybník nebo jiná nádrž, velká řeka a menší přítok). V každé populaci bude sesbíráno alespoň 25 vzorků listů a alespoň 8 semen. Budou použity populace, které jsou zahrnuty do fylogeografické studie. Protože pro fylogeografickou studii budeme sbírat jen 10 jedinců z každé populace, i z analýzy rodičovství použijeme pro fylogeografii jen 10 vzorků, jejich *sampling* bude odpovídat *samplingu* ostatních populací.

Pro analýzu semenné banky bude v povodí Labe odebráno 5 vzorků sedimentů a v nich (podle možností) identifikována semena vodních rostlin, která budou přes zimu stratifikována a na jaře vyklíčena. Toto bude se stejným materiálem zopakováno po alespoň dvě sezóny, abychom si udělali představu o klíčivosti semen vodních rostlin (a zvláště stulíku) a o množství semen v sedimentu.

Pro analýzu potenciální role oddenkových úlomků jako dispersního agens budou úlomky získány simulací přírodní disturbance (chozením ve vodě), posbírány a ve vodě (aby nevyschly) dopraveny na místo experimentu do malého umělého jezírka, kde bude testována jejich plovatelnost a klíčivost.

11. Seznam literatury

- Arber, A. (1920): Water plants: a study of aquatic angiosperms. – Cambridge University Press.
- Avise, J.C. (1994): Molecular markers, natural history and evolution. – Sinauer Associates; 2nd edition.
- Baker, A.J. (2000): Molecular methods in ecology. – Blackwell Publishing, Inc.
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. (2002): The estimation of population differentiation with microsatellite markers. – Molecular Ecology: 11, 2 155 – 165.
- Barrat-Segretain, M.-H. (1996): Germination and colonisation dynamics of *Nuphar lutea* (L.) Sm. in a former river channel. – Aquatic Botany: (55) 31 – 38.
- Boedeltje, G., Bakker, J. P., Bekker, R. M., van Groenendael, J. M. & Soesbergen, M. (2003): Plant dispersal in a lowland stream in relation to occurrence and three specific life-history traits of the species in the species pool. – Journal of Ecology: 91, 855 – 866.
- Bendich, A. J. (2004): Circular Chloroplast Chromosomes: The Grand Illusion. – The Plant Cell: Vol. 16, 1661–1666.
- Blouin, M. S. (2003): DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. – Trends in Ecology and Evolution.
- Bolser, R. C. & Hay, M. E. (1998): A Field test of inducible resistance to specialist and generalist herbivores using the water lily *Nuphar luteum*. – Oecologia: 116: 143 – 153.
- Brown, H. H. & Lomolino, M. V. (1998): Biogeography, 2nd Edition. – Sinauer Associates.
- Buffon, G.-L. L. (1778): Les époques de la nature. – Paris.
- Burkart, M. (2001): River Corridors Plants (Stromtpflanzen) in Central European lowland: a review of a poorly understood plant distribution pattern. – Global Ecology and Biogeography: 10, 449 – 468.
- de Candolle, A. P. (1821): Regni vegetabilis systema naturale.
- Clausen, P., Nolet, B. A., Fox, A.D. & Klaassen, M. (2002): Long-distance endozoochorous dispersal of submerged macrophyte seeds by migratory waterbirds in northern Europe — a critical review of possibilities and limitations. – Acta Oecologica: 23: 191 – 203.
- Comes H. P. & Kadereit J. W. (1998): The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. – Trends in Plant Science: Volume 3, Number 11, pp. 432-438(7).
- Corriveau, J. L. & Coleman, A. W. (1988): Rapid Screening Method to Detect Potential Biparental Inheritance of Plastid DNA and Results for Over 200 Angiosperm Species. – American Journal of Botany: 75,10,1443—1458.

- Crow, G. E. (1993): Species diversity in aquatic angiosperms: Latitudinal patterns. – *Aquatic Botany*: Vol. 44, no. 2-3, pp. 229-258.
- Danvind, M. & Nilsson, Ch. (1997): Seed floating ability and distribution of alpine plants along a northern Swedish river. – *Journal of Vegetation Science*: 8: 271 – 276.
- Darwin, Ch. R. (1859): *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. – London.
- Dieringer D. & Schlötterer C. (2003): Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. – *Molecular Ecology Notes*: 3: 167-169.
- Dorken, M. E. & Barrett, S. C. H. (2004): Chloroplast haplotype variation among monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae) in eastern North America. – *Molecular ecology*: 13, 2699 – 2707.
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. – *Phytochemical Bulletin*: 19: 11-15.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2006): ARLEQUIN Version 3.01 An integrated software package for population genetics. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.
- Figuerola, J. (2002): The role of waterfowl in the passive transport of aquatic organisms: from local processes to long-distance dispersal. – Tesis doctoral, Universidad autónoma de Madrid, Facultad de ciencias, Departamento de ecología.
- Figuerola, J. & Green, A. J. (2002): Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. – *Freshwater Biology*: 47, 483–494.
- Figuerola, J., Santamaría, L., Green, A. J., Luque, I., Alvarez, R. & Charalambidou, I. (2005): Endozoochorous dispersal of aquatic plants: Does seed gut passage affect plant performance? – *American Journal of Botany*: 92(4): 696 – 699.
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., van Kleunen, M. & Schmid, B. (2000): RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). – *American Journal of Botany*: 87 (8): 1128 – 1137.
- Fér, T. (2000): Vztah parametrů generativního šíření vodních rostlin k jejich skutečnému rozšíření podle vodního toku. – Diplomová práce, depon in knihovna Katedry botaniky PřF UK v Praze.
- Goldstein, D.B., Ruiz Linares, A., Cavalli-Sforza, L.L. & Feldman, M.W. (1995): Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 92: 6723-6727.
- Gornall R.J., Hollingsworth, P. M. & Preston, C. D. (1998): Evidence for spatial structure and directional gene flow in population of an aquatic plant, *Potamogeton coloratus*. – *Heredity*:

80 :414 - 421.

- Green, A. J., Figuerola, J., & Sánchez, M. I. (2002): Implications of waterbird ecology for the dispersal of aquatic organisms. – *Acta Oecologica*: 23: 177 – 189.
- Greulich, S. & Trémolières, M. (2006): Present distribution of the genus *Elodea* the Alsatian Upper Rhine floodplain (France) with a special focus on the expansion of *Elodea nuttallii* St. John during recent decades. – *Hydrobiologia*: 570: 249–255.
- Hardy O.J. & Vekemans X. (2002): SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. – *Molecular Ecology Notes*: 2: 618-620.
- Hart, K. H. & Cox, P. A. (1995): Dispersal ecology of *Nuphar luteum* (L.) Sibthorp & Smith: abiotic seed dispersal mechanism. – *Botanical Journal of the Linnean Society*: 119: 87 – 100.
- Hennig, W. (1999): *Phylogenetic Systematics*. – University of Illinois Press.
- Heslop-Harrison, Y. (1955): Biological flora of the British Isles, *Nuphar lutea* (L.) Sm. (*Nuphar lutea* L.). – *J. Ecol.* 43, 344 – 355.
- Hewitt, G. (2000): The genetic legacy of the Quaternary ice ages. – *NATURE*: VOL 405, 22.
- Chick, J. H., Cosgriff, R. J. & Gittinger, L. S. (2003): Fish as potential dispersal agents for floodplain plants: first evidence in North America. – *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*: 60: 1437 – 1439.
- Jarne P. & Lagoda P.J.L. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. – *Trends in Ecology & Evolution*: 11(10):424-429.
- Johansson, M. E. & Nilsson, Ch. (1993): Hydrochory, population dynamics and distribution of the clonal aquatic plant *Ranunculus lingua*. – *Journal of Ecology*: 81, 81 – 91.
- Johansson, M. E., Nilsson, Ch. & Nilsson, E. (1996): Do rivers function as corridors for plant dispersal? – *Journal of Vegetation Science*: 7: 593 – 598.
- Kameyama, Y., Isagi, Y. & Nakagoshi, N. (2001): Patterns and levels of gene flow in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* revealed by microsatellite analysis. – *Molecular ecology*: 10, 205 – 216.
- Keller, B. E. M. (2000): Plant diversity in *Lythrum*, *Phragmites*, and *Typha* marshes, Massachusetts, U.S.A. – *Wetland Ecology and Management*: 8, 6.
- Klekowski, E. J. (2003): Plant clonality, mutation, diplontic selection and mutational meltdown. – *Biological Journal of the Linnean Society*: 79, 61–67.
- Li, Y.-Ch., Korol, A. B., Fahima, T., & Nevo, E. (2004): Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. – *Mol. Biol. Evol.*: 21(6): 991–1007.

- Loxdale, H. D. & Lushai, G. (2003): Rapid changes in clonal lines: the death of a 'sacred cow'. – *Biological Journal of the Linnean Society*: 79, 3–16.
- Kudoh, H. & Whigham, D. F. (1997): Microgeographic genetic structure and gene flow in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae) populations. – *American Journal of Botany*: 84 (9): 1285 – 1293.
- Kudoh, H. & Whigham, D. F. (2002): A genetic analysis of hydrologically dispersed seeds of *Hybischus moscheutos* (Malvaceae). – *American Journal of Botany*: 88 (4): 588 – 593.
- Lamote, V., Roldán-Ruiz, I., Coart, E., De Loose, M. & Van Bockstaele, E. (2002): A study of genetic variation i *Iris pseudacorus* populations using amplified length polymorphism (AFLPs). – *Aquatic Botany*: 73 19 – 31.
- Komárek, S. (1997): Dějiny biologického myšlení. – *Vesmír*, edice Medúza.
- Les, D. H., Crawford, D. J., Kimball, R. T., Moody, M. L. & Landolt, E. (2003): Biogeography of Discontinuously Distributed Hydrophytes: A Molecular Appraisal of Intercontinental Disjunction. – *International Journal of Plant Sciences*: 164, 6; 917 – 932.
- Ložek, V. (1973): Příroda ve čtvrtohorách. – *Academia*, Praha.
- Mader, E., van Vierssen, W., Schwenk, K (1998): Clonal diversity in the submerged macrophyte *Potamogeton pectinatus* L. inferred from nuclear and cytoplasmic variation. – *Aquatic Botany*: (62) 147 160.
- McCauley, D.E. (1995): The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. – *Trends in Ecology & Evolution*: 10(5): 198-202.
- Mueller, M. H. & van der Valk, A. G. (2002): The potential role of ducks in wetland dispersal. – *Wetlands*: vol. 22, No. 1. pp. 170 – 178.
- Nei, M., Tajima, F. & Tatenno, Y. (1983): Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. – *J. Mol. Evol.*: 19: 153-170.
- Nies, G. & Reusch, T. B. H. (2005): Evolutionary divergence and possible incipient speciation in post-glacial populations of a cosmopolitan aquatic plant. – *J. EVOL. BIOL.*: 18, 19–26.
- Nilsson, Ch., Gardfjell, M. & Grelsson, G. (1991): Importance of hydrochory in structuring plant communities along rivers. – *Can. J. Bot.*: vol. 69, 2631 – 2633.
- Oldenburg, D. J. & Bendich, A. J. (2004): Changes in the Structure of DNA Molecules and the Amount of DNA Per Plastid During Chloroplast Development in Maize. – *J. Mol. Biol.*: 344, 1311–1330.
- Otto, Ch. & Wallace, J. B. (1989): Life cycle variation and habitat longevity in waterlily leaf beetles. – *Holarctic ecology*: 12: 144 – 151.
- Ouborg N.J., Goodall-Copestake W.P., Saumitou-Laprade P. et al. (2000): Novel polymorphic

- microsatellite loci isolated from the yellow waterlily, *Nuphar lutea*. – *Molecular Ecology*: 9: 497-498.
- Ouborg N.J., Piquot Y. & van Groenendael (1999): Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. – *Journal of Ecology*: 87: 551-568.
- Palmé, A. E. & Vendramin, G. G. (2002): Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. – *Molecular Ecology*: 11, 1769–1779.
- Palmer J.D. (1986): Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. – *Methods in Enzymology*: 118:167-186.
- Petit, R. J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducouso, A. & Kremer, A. (1997): Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. – *Population Biology*: Vol. 94, pp. 9996 – 10001.
- van der Pijl, L. (1982): *Principles of Dispersal in Higher Plants*, Third Revised and Expanded Edition. – Springer-Verlag.
- Platnick, N. I. & Nelson, G. (1978): *A Method for Analysis for Historical Biogeography*. – *JSTOR*: 27, 1 – 16.
- Platnick, N. I. & Nelson, G. (1981): *Systematics and Biogeography: Cladistics and Vicariance*. – Columbia University Press.
- Podani J. (2001): *SYNTAX 2000, Computer programs for data analysis in ecology and systematics. User's manual*. – Budapest: Scientia.
- Popper, K. (1959): *The Logic of Scientific Discovery*.
- Popper, K. (1972): *Objective Knowledge: An Evolutionary Approach*, rev. ed. 1979.
- Provan, J., Russell, J. R., Booth, A. & Powell, W. (1999): Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systemic and population studies in the genus *Hordeum*. – *Molecular ecology*: 8, 505 – 511.
- Provan, J., Powell, W. & Hollingsworth, P. M. (2001): Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. – *TRENDS in Ecology & Evolution*: Vol.16 No.3.
- Pyšek, P. & Prach, K. (2003): Research into plant invasions in a crossroads region: history and focus. – *Biological Invasions*: 5: 337–348.
- Russell, J. R., Weber, J. C., Booth, A., Powell, W., Sotelo-Montes, C. & Dawson, I. K. (1999): Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peuvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. – *Molecular ecology*: Vol. 8 Issue 2 p. 199.
- Sádlo, J., Pokorný, P., Hájek, P., Dreslerová, D. & Cílek, V. (2005): *Krajina a revoluce: významné přelomy ve vývoji kulturní krajiny českých zemí*. – Malá skála, Praha.

- Santamaría, L. (2002): Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. – *Acta Oecologica*: 23: 137 – 154.
- Schaal, B. A. & Olsen. K. M. (2000): Gene genealogies and population variation in plant. – *PNAS*: vol. 97, no. 13, 7024 – 7029.
- Sherratt, D. J. (1995): Mobile Genetic Elements. – *Frontiers in molecular biology*.
- Sjöström, A. & Gross, C. L. (2006): Life-history characters and phylogeny are correlated with extinction risk in the Australian angiosperms. – *Journal of Biogeography*: 33, 271–290.
- Slavík B. (1990): Fytokartografické syntézy ČR / Phytocartographical syntheses of the ČR. – Botanický ústav ČSAV, Průhonice.
- Smits, A. J. M., van Ruremonde, R. & van der Velde, G. (1989): Seed dispersal of three nymphaeid macrophytes. – *Aquatic Botany*: 167 – 180.
- Sneath, P. H. A., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy*. San Francisco: W. H. Freeman & Co.
- Sun, M. & Wong, K. C. (2001): Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. – *American Journal of Botany*: 88(12): 2180 – 2188.
- Tarayre, M., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J., Couvet, D. & Thompson, J. D. (1997): The spatial genetic structure of cytoplasmic (cpDNA) and nuclear (allozyme) markers within and among populations of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France. – *American Journal of Botany*: 84 (12): 1675 – 1684.
- Thiébaud, G. (2007): Invasion success of non-indigenous aquatic and semi-aquatic plants in their introduced ranges. A comparison between their invasiveness in North America and in France. – *Biological Invasions*: 9: 1–12.
- Thomé, O. W. (1885): *Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz*. – Gera, Germany.
- Tomimatsu, H. & Ohara, M. (2003): Genetic diversity and local population structure of fragmented populations of *Trillium camschatcense* (Trilliaceae). – *Biological Conservation*: 109, 249 – 258.
- Tribsch, A., Schonswetter, P. & Stuessy, T. F. (2002): *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the Ice Age in the European Alps. – *American Journal of Botany*: 89 (12): 2024 – 2033.
- Valido, A., Dupont, Y. L. & Olesen, J. M. (2004): Bird–flower interactions in the islands. – *Journal of Biogeography*: 31, 1945 – 1953.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acids Research*: Vol. 23, No. 21 4407 – 4414.

- Wallace, A. R. (1876): *The Geographical Distribution of Animals*.
- Wegener, A. (1915): *Die Entstehung der Kontinente und Ozeane*.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C., 1984.
- Willis K. J., Rudner E. & Sümegi P. (2000): The full-glacial forests of central and southeastern Europe. – *Quatern. Res.*: 53: 203-213.
- Wolfe, A. D. & Liston, A. (1998): Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis D.E. & al. [eds.]: *Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing*, pp. 43-86.
- Xiang, Q.-Y., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Manchester, R. & Crawford, D. J. (2000): Timing the Eastern Asian–Eastern North American Floristic Disjunction: Molecular Clock Corroborates Paleontological Estimates. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*: Vol. 15, No. 3, June, pp. 462–472.

12. Přílohy

Příloha I:

populace	vzorky	lokusy																			
		GA1	GA3	GA5	GA6	TGCA1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8										
A	1	163	163	152	152	86	94	260	268	119	119	94	100	222	222	194	194	95	97	214	214
A	2	163	163	156	156	94	94	268	268	119	119	94	100	222	222	194	194	95	97	214	214
A	3	161	161	152	152	86	94	268	268	119	119	92	92	216	216	194	194	97	103	204	210
A	4	163	163	152	152	86	94	260	268	119	119	94	100	222	222	194	194	95	97	214	214
A	5	161	161	152	152	94	94	268	268	115	119	92	92	222	222	192	194	97	97	204	204
A	6	161	161	152	152	92	94	268	268	119	119	92	100	216	222	194	204	97	97	204	204
A	7	161	163	150	152	100	102	268	268	115	121	92	92	216	222	194	194	97	97	204	214
A	8	161	161	152	152	92	94	268	268	119	119	86	94	216	222	190	190	97	103	204	224
A	9	161	161	152	152	92	94	268	268	119	119	86	94	216	222	190	190	97	103	204	204
B	1	161	161	152	152	86	94	260	268	119	121	92	92	222	222	194	194	93	93	220	220
B	2	161	163	152	152	86	86	260	268	119	119	92	92	222	222	194	194	87	101	214	214
B	3	155	155	152	154	94	100	260	268	119	121	92	92	222	222	194	194	103	103	222	222
B	4	153	161	152	154	94	100	260	260	119	119	90	92	222	224	196	196	97	97	216	216
B	5	161	163	152	152	94	94	260	268	119	121	92	92	222	222	192	194	97	97	214	222
B	6	161	161	152	156	100	100	260	260	119	121	92	92	222	222	194	194	97	97	214	214
B	7	161	161	152	156	100	100	260	260	119	121	92	92	222	222	194	194	97	97	214	214
B	8	153	161	152	152	100	100	268	268	119	121	92	96	222	222	194	194	97	97	214	214
B	9	161	161	152	152	92	94	262	268	119	119	92	92	222	222	194	196	97	97	214	214
B	10	161	161	152	152	100	100	262	262	119	119	92	92	222	222	194	194	97	97	214	222
C	1	161	163	152	152	94	102	268	268	119	119	92	94	222	222	192	196	97	97	222	222
C	2	161	163	152	152	94	102	268	268	119	119	94	100	216	218	192	196	97	97	222	222
C	3	161	161	152	152	94	102	268	268	119	119	90	100	222	222	194	198	91	97	222	222
C	4	161	163	152	152	92	94	268	268	119	119	92	94	222	232	194	198	97	103	204	204
C	5	161	163	152	152	92	94	268	268	119	119	94	100	232	232	194	198	97	103	202	202
C	6	161	161	152	152	92	94	268	268	119	119	94	94	222	230	194	198	91	91	204	204
C	7	161	163	152	152	92	94	268	268	119	119	94	94	222	230	194	204	97	103	204	220
C	8	161	163	152	152	92	94	268	268	119	119	92	102	222	232	194	204	97	103	204	220
C	9	161	161	152	152	92	102	268	268	119	119	94	100	218	218	194	198	97	103	204	222
C	10	161	161	152	152	90	90	268	268	119	119	100	100	222	222	194	204	97	103	204	204
C	11	161	161	152	152	90	90	268	268	119	119	106	108	222	222	192	194	97	103	204	204
D	1	161	161	152	152	94	94	264	270	121	121	92	92	226	234	194	194	97	97	204	204
D	2	161	161	152	152	94	100	270	270	121	121	92	92	224	224	196	196	97	97	218	218
D	3	161	161	152	152	94	100	270	270	121	121	92	92	226	234	194	196	97	97	198	198
D	4	151	165	152	152	100	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	198	198
D	5	151	165	148	150	100	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	99	99	198	198
D	6	161	163	152	152	100	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	105	218	218
D	7	161	161	152	152	94	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	105	198	198
D	8	151	161	152	152	94	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	105	198	198
D	9	151	161	152	152	94	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	105	198	198
D	10	161	161	152	152	94	94	262	270	121	121	92	92	226	234	196	200	97	105	204	204
D	11	153	165	150	152	98	100	262	270	121	123	92	92	226	232	196	196	99	99	204	218
D	12	161	161	152	152	94	94	262	270	121	121	92	92	226	234	196	198	97	97	204	218
D	13	161	161	152	152	94	94	262	270	121	121	92	92	226	234	196	198	97	97	204	204
D	14	161	161	152	152	94	94	262	270	121	121	92	92	226	234	194	200	97	97	204	204
D	15	153	165	150	152	94	100	262	270	121	123	92	92	226	232	196	196	97	97	204	204
D	16	161	161	152	152	94	94	262	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	204	204
D	17	161	161	152	152	94	94	262	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	204	204
D	18	161	161	152	152	94	94	262	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	204	204
D	19	161	161	152	152	94	94	262	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	204	218
D	20	151	155	152	152	94	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	198	198
D	21	161	161	152	152	94	94	262	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	204	204
D	22	151	165	152	152	100	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	198	198
D	23	151	165	152	152	100	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	198	198
D	24	151	165	152	152	100	100	270	270	121	121	92	92	226	234	196	196	97	97	198	198
D	25	161	161	152	152	100	100	270	270	121	121	92	108	224	226	196	196	99	99	204	204