

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Mariana Černá

**Genetická diverzita a struktura populací *Campanula glomerata* na regionální škále
v Bílých Karpatech**

Genetic diversity and structure of populations of *Campanula glomerata* on regional scale in
White Carpathians

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Zuzana Münzbergová, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 3. 8. 2020

Podpis.....

Poděkování

Je mou milou povinností poděkovat v první řadě mé školitelce Zuzaně Münzbergové za její trpělivost a ochotu vždy pohotově poradit a pomoci s jakýmkoliv problémem, který se při zpracování této práce vyskytl, za veškerý její drahocenný čas, který mi věnovala a za její pozitivní a energický přístup, který mě dokázal vždy inspirovat k vyšší efektivitě. Velice ráda bych poděkovala Márii Šurinové, která mě velice podpořila nejen při intenzivní práci v laboratoři, kdy se mnou konzultovala veškeré náročné kroky při vývoji metodiky, ale i svou empatií a neutuchajícím humorem, který se skrýval za každým jejím slovem a který mě dokázal povzbudit i v těch nejtíživějších momentech. Děkuji také Adree Jarošové, která byla součástí všech konzultací při mé cestě v laboratoři a která mě od začátku provázela vždy s trpělivostí, vedla mě k samostatnosti a naučila mě všechny techniky potřebné pro úspěšné dokončení této etapy. Ráda bych poděkovala Gabriele Šrámkové za velmi potřebnou pomoc při zpracování dat na poslední chvíli, kdy objevila spoustu nedostatků, které jsem já vidět nedokázala a ušetřila mi tak spoustu nervů, energie a času na úkor jejího vlastního času. Dále bych ráda poděkovala dalším lidem, kteří mi pomohli svými radami se zpracováním dat, jmenovitě Matěji Manovi, Zdeňkovi Janovskému, Tomáši Vlastovi a všem ostatním z Katedry botaniky, kteří byli vždy laskaví a v průběhu mého studia mi vždy s čímkoliv poradili. Děkuji také všem lidem ze správy CHKO Bílé Karpaty, Ivaně Jongepierové, Janu W. Jongepierovi a Karlu Fajmonovi za jejich přátelský přístup, za jejich požehnání, cenné rady a materiály. Za poskytnutý materiál pro prvotní analýzy děkuji i Magdaleně Chytré. Za veškerou podporu také děkuji všem svým přátelům. Ze všeho nejvíce však děkuji své rodině, která mě nepřetržitě podporovala po celou dobu mého studia a tvorby této práce, jak hmotně, tak mentálně. Zejména děkuji své mamince, která mě mimo jiné několikrát pomohla i v terénu při sběru dat a manželovi, který měl možnost nahlédnout i do dalších tajů této práce a neoblomně mě motivoval k jejímu dokončení.

Také děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy za finanční podporu při zpracování této práce v rámci projektu, jehož je tato práce velkou částí.

Abstrakt

Fragmentace stanovišť může negativně ovlivnit populace druhů kvůli snížené genetické diverzitě a zvýšené diferenciaci populací v důsledku izolace stanovišť, snížené velikosti populací a narušení genového toku. Řada druhů trpí fragmentací stanovišť a izolovaností a *Campanula glomerata* je dobrým příkladem druhu, který je na mnoha místech znatelně na ústupu kvůli změnám v obhospodařování krajiny. Otázkou je, jak modelový druh *C. glomerata* reaguje na tyto změny a jestli se tyto změny projeví v genetické diverzitě a struktuře populací. Cílem této práce je tedy zjistit míru genetické diverzity a odkrýt genetickou strukturu populací modelového druhu *C. glomerata* na malé regionální škále v Bílých Karpatech. Tento systém nám umožní srovnat populace ze dvou odlišných regionů, které byly různou mírou zasaženy zemědělskou intenzifikací a fragmentací v minulém století. Jde o jihozápadní a severovýchodní část regionu, které se od sebe liší historií managementu v krajině, kontinuitou lučních porostů, druhovým složením a přírodními podmínkami. Pro tento účel jsem vyvinula a optimalizovala celkem 16 použitelných mikrosatelitových markerů, z nichž 4 pochází od příbuzných druhů rodu *Campanula* a 12 bylo pro druh *C. glomerata* vyvinuto nově. Výsledky naznačují, že nedávná fragmentace stanovišť nevedla k významné ztrátě genetické diverzity. Druh má pravděpodobně dostatečné disperzní schopnosti k udržení genového toku a populační konektivity v krajině, která byla v nedávné historii postižena fragmentací. Přesto však byl nalezen určitý rozdíl mezi jihozápadním a severovýchodním regionem, kde byla genetická diverzita o něco nižší, vyskytovalo se zde menší množství vzácných alel a populace zde byly více méně diferencovány. Vysvětlením může být právě vyšší izolovanost populací v důsledku intenzivnější fragmentace v této oblasti. Silami, které determinovaly formování populací *C. glomerata* ve studovaném regionu, však mohly být spíše dávné historické procesy. Několika způsoby byl také testován vliv environmentálních faktorů na genetickou diverzitu. Jako nejvýznamnější se jeví poloha populací v regionu a míra dopadajícího slunečního záření. *C. glomerata* je příkladem druhu, který je vázán spíše na louky s dlouhou dobou kontinuity, jak se ukázalo během sběru dat v severovýchodním regionu. Zde se nachází množství obnovených luk, ve kterých se však *C. glomerata* prakticky nevyskytuje. Je proto důležité udržovat vhodným managementem i původní louky, protože řada z nich se vyskytuje na hůře přístupných místech, kde hrozí jejich zarůstání.

Klíčová slova: *Campanula glomerata*, genetická diverzita, mikrosatelity, fragmentace stanoviště, kontinuita travních porostů, genový tok, environmentální faktory.

Abstract

Habitat fragmentation can adversely affect species populations due to reduced genetic diversity and increased population differentiation due to habitat isolation, reduced population size, and disruption of gene flow. Many species suffer from habitat fragmentation and isolation, and *Campanula glomerata* is a good example of a species that is noticeably declining in many places due to changes in landscape management. The question is how the model species responds to these changes and whether the changes are reflected in genetic diversity and population structure. The aim of this work is to determine the degree of genetic diversity and to reveal the genetic structure of populations of the model species *C. glomerata* on a small regional scale in the White Carpathians. This system will allow us to compare populations from two different regions that have been affected to varying degrees by agricultural intensification and fragmentation in the last century. It is a southwestern and northeastern part of the region, which differs from each other in the history of management in the landscape, but also in the continuity of meadows, species composition and environmental conditions. For this purpose, I developed and optimized a total of 16 usable microsatellite markers, 4 of which come from related species of the genus *Campanula* and 12 are newly developed for the species *C. glomerata*. The results suggest that recent habitat fragmentation has not led to a significant loss of genetic diversity. The species probably has sufficient dispersive capabilities to maintain gene flow and population connectivity in a landscape that has been affected by fragmentation in recent history. Nevertheless, some difference was found between the southwestern and northeastern regions, where genetic diversity was slightly lower, there were fewer rare alleles, and populations were more or less differentiated. The explanation may be the higher isolation of populations due to more intense fragmentation in this area. However, the forces that determined the formation of *C. glomerata* populations in the studied region may have been rather ancient historical processes. The effect of environmental factors on genetic diversity has also been tested in several ways. The most important were the location of the populations in the region and the degree of incident sunlight. *C. glomerata* is an example of a species that is more associated with grasslands with a long period of continuity, as demonstrated during data collection in the northeastern region. There are a number of restored meadows, in which, however, *C. glomerata* practically did not occur. It is therefore important to maintain the original meadows with appropriate management, as many of them occur in less accessible places where there is a risk of overgrowth.

Key words: *Campanula glomerata*, genetic diversity, microsatellites, habitat fragmentation, continuity of grasslands, gene flow, environmental factors.

Obsah

ÚVOD.....	7
1 METODIKA.....	11
1.1 CHARAKTERISTIKA DRUHU	11
1.1.1 Morfologie	11
1.1.2 Rozšíření a ekologie.....	12
1.2 STUDOVANÉ ÚZEMÍ BÍLÉ KARPATY	13
1.2.1 Bílé Karpaty jihozápadní.....	15
1.2.2 Bílé Karpaty severovýchodní	17
1.3 SBĚR MATERIÁLU	19
1.4 VEGETAČNÍ SNÍMKY	20
1.5 LETECKÉ SNÍMKY	20
1.6 GIS	21
1.7 LABORATORNÍ ZPRACOVÁNÍ ROSTLINNÉHO MATERIÁLU.....	22
1.8 VÝVOJ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ	22
1.9 OPTIMALIZACE MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ.....	25
1.10 GENOTYPOVÁNÍ JEDINCŮ	26
1.11 ANALÝZA GENETICKÝCH DAT	27
1.12 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT	29
1.12.1 Základní charakteristika jednotlivých datasetů a proměnných.....	29
1.12.2 Výběr vysvětlujících proměnných.....	30
1.12.3 Postupný výběr proměnných, PCA a samostatné testování prediktorů	31
2 VÝSLEDKY	33
2.1 VÝSKYT POPULACÍ	33
2.2 MIKROSATELITOVÉ MARKERY	33
2.3 ROZLIŠENÍ SKUPIN NA ZÁKLADĚ ANALÝZY HLAVNÍCH KOORDINÁT (PCoA)	35
2.4 ROZDĚLENÍ DO SKUPIN DLE PROGRAMU STRUCTURE.....	37
2.5 ANALÝZA MOLEKULÁRNÍ VARIANCE (AMOVA).....	41
2.6 GENETICKÉ VLASTNOSTI POPULACÍ	43
2.7 VLIV VYBRANÝCH PREDIKTORŮ NA GENETICKOU DIVERZITU	44
2.7.1 Charakteristika proměnných	44
2.7.2 Postupný výběr.....	45
2.7.3 PCA analýza.....	49
2.7.4 Testování prediktorů samostatně.....	52
3 DISKUZE.....	55
3.1 MIKROSATELITOVÉ MARKERY	55
3.2 GENETICKÁ DIVERZITA A STRUKTURA POPULACÍ	56

3.2.1	Rozbor a interpretace výsledků	56
3.2.2	Teorie možných vysvětlení	62
3.3	VÝSKYT DRUHU NA PŮVODNÍCH LOUKÁCH	66
3.4	VLIV VLASTNOSTÍ POPULACÍ A STANOVIŠTNÍCH PODMÍNEK	67
3.4.1	Vliv polohy v regionu	67
3.4.2	Vliv vlastností populací.....	67
3.4.3	Vliv stanovištních podmínek.....	70
3.4.4	Shrnutí všech testování.....	71
ZÁVĚR.....		73
LITERATURA		76
PŘÍLOHY		87

Úvod

Studium genetické diverzity, která je důležitým ukazatelem celkové biologické rozmanitosti, je zásadní pro pochopení struktury a dynamiky populací ve společenstvech. Celková genetická struktura populací se skládá z vnitropopulační variability, která nám umožní blíže porozumět vlastnostem a historii jednotlivých populací, a mezipopulační variability, která vykresluje vztahy mezi populacemi, umožňuje nám zjistit příbuznost a unikátnost jednotlivých populací, genový tok a diferenciaci mezi populacemi.

Genetická diverzita populací je formována několika činiteli, mezi něž patří biologie druhu (např. systém rozmnožování, délka života, disperzní schopnosti druhu, běžnost/vzácnost), historie událostí, které formovaly populace v minulosti a také nynější struktura krajiny, která jednak zrcadlí tyto minulé procesy, jednak ovlivňuje genetickou strukturu populací v současnosti a bude ji nepochybně determinovat i v budoucnosti. Fragmentace krajiny je proces, při němž dochází k redukci celkové plochy stanovišť a vytvoření nových izolovaných ploch z dříve souvislého prostoru. Může mít negativní důsledky na životaschopnost populací, jelikož dochází k redukci velikosti populací a izolaci jednotlivých fragmentů (Frankham et al., 2002). To může mít za následek snížení fitness (Leimu et al., 2006; Reed & Frankham, 2003). Změny v populacích, které jsou spojeny s fragmentací stanoviště, mohou vést k erozi genetické diverzity a ke zvýšené genetické divergenci mezi populacemi vlivem redukovaného genového toku mezi fragmenty, náhodného genetického driftu a zvýšeného inbreedingu – zvláště pokud velikost populace a její izolovanost klesnou pod kritickou úroveň. Tyto změny postihují životaschopnost populací i v dlouhodobém měřítku, kdy je u populací očekávaná snížená schopnost odpovídat měnícím se selekčním tlakům (Young et al., 1996). Jedním z klíčových procesů, který může zmírnit ztrátu genetické rozmanitosti a napomáhat dlouhodobé životaschopnosti populací na fragmentovaném stanovišti je dostatečný tok genů (Lowe et al., 2005).

Změny ve využívání půdy, intenzivní rozorávání a zúrodňování přirozených stanovišť ve druhé polovině minulého století přetvořily krajinu na mozaiku rozptýlených ploch přirozené vegetace, které jsou zakomponovány do zemědělské matrice (Lipský, 1995). V posledních několika dekádách byly pozorovány dva opačné trendy v zemědělství – obhospodařování vysoce produktivních oblastí se zintenzivnilo, zatímco málo produktivní oblasti nebo místa obtížně dostupné jsou čím dál více opouštěna (Bachmann et al., 2005; Futák et al., 2008).

V důsledku toho se změnil charakter stanovišť, populace mnoha rostlinných druhů se stále více zmenšovaly a byly od sebe navzájem více izolovány než v minulosti (Bachmann & Hensen, 2007). Fragmentovaná krajinná struktura může znesnadnit genový tok mezi populacemi vzhledem k omezenému šíření semen (Primack & Miao, 1992) a omezenému šíření pylu, poněvadž i krátká vzdálenost mezi populacemi může pro opylovače působit jako silná bariéra (Kwak et al., 1998). Důsledky fragmentace stanoviště proto můžeme zkoumat i na malé škále (Müller et al., 2020). Hlavním tématem této práce je studium genetické diverzity modelového druhu *Campanula glomerata* na malé – regionální škále v Bílých Karpatech. Fragmentace v minulém století postihla i krajinu této oblasti, byť v různé míře.

Hlavním předmětem této práce je porovnat genetickou diverzitu populací mezi severovýchodní a jihozápadní oblastí Bílých Karpat, které se od sebe liší charakterem krajiny, přírodními podmínkami, druhovým složením, historií managementu a holocenní historií. Severovýchodní oblast (Štítná nad Vláří, Jestřabí) tvoří travní porosty, jež se vyvíjely pravděpodobně někdy od středověku (Hájek et al., 2016) a jsou zřejmě v důsledku toho druhově mnohem chudší (Otýpková et al., 2011). Obhospodařování této oblasti bylo v minulém století patrně intenzivnější než na jihozápadě. Původní louky představují často menší plochy, které jsou od sebe odděleny ornou půdou, lesem nebo novými, obnovenými loukami (v 80. a 90. letech jetelotravní směsí), na nichž v současnosti probíhá spontánní kolonizace druhů. Jihozápadní oblast (Čertoryje, Zahrady pod hájem, Búrová) tvoří převážně louky bělokarpatského typu, které patří mezi druhově nejbohatší vůbec (Chytrý et al., 2015) a jejich kořeny mohou sahát až k dávné minulosti raného holocénu (Hájková et al., 2011). Srovnání těchto regionů nám může pomoci blíže pochopit, jak může odlišná historie krajiny a přírodní podmínky ovlivnit genetickou variabilitu a prostorovou genetickou strukturu studovaného systému.

Jedním z cílů je také zjistit míru genetické diverzity a odhalit strukturu populací druhu ve studovaném území v severovýchodní oblasti Bílých Karpat na původních loukách a na loukách nově vzniklých v 80. a 90. letech. Kolonizace nových stanovišť může být doprovázena redukcí genetické diverzity v důsledku omezeného počtu jedinců zakládajících novou populaci (Allendorf & Luikart, 2009). Pouze část alel, které pochází ze zdrojové populace, bude fixována v nové populaci a genetická diverzita tak může být snížena. Pokud však genový tok proudí z více zdrojových populací a nové populace mají rychlý růst, nemusí nutně dojít ke snížení genetické diverzity v nových populacích – ty pak mohou být stejně životaschopné jako populace původní (Helsen et al., 2013; Slatkin, 1977).

Dalším cílem práce je testování vlivu vlastností populací a environmentálních podmínek na genetickou diverzitu. Existuje mnoho studií o efektu velikosti a izolovanosti populace na genetickou diverzitu (Ellstrand & Elam, 1993; Leimu et al., 2006). Vliv stanovištních podmínek na genetickou diverzitu je již méně studovaným tématem, ekologické faktory však mohou hrát při určování pattern genetické struktury v populacích také důležitou roli (Huang et al., 2019).

Jako modelový druh pro studium genetické diverzity v zájmové oblasti jsem zvolila zvonek klubkatý (*Campanula glomerata*). Je to polykarpická vytrvalá a neklonální bylina (Dřevojan, 2020), je diploidní (Kaplan et al., 2019; Šmarda, 2018) a ne zcela běžná. Ve zvolených lokalitách se vyskytuje roztroušeně v ne příliš početných populacích, jak v severovýchodní oblasti, tak v jihozápadní oblasti Bílých Karpat (také dle vlastního terénního průzkumu v letní sezóně 2018), současně nebyla v území nikdy komerčně šířena a má proto vhodné předpoklady pro studium člověkem nijak neovlivněné genetické variability a struktury populací ve vybrané oblasti.

Hodnocení genetické diverzity bude provedeno pomocí mikrosatelitových markerů (SSRs). Mikrosatelitové markery stále zůstávají jedním z klíčových nástrojů v populační genetice rostlin (Vieira et al., 2016). Mikrosatelity vykazují vlastnosti, díky nimž jsou velmi vhodné pro studium genetické struktury populací – mají kodominantní charakter, jsou vysoce polymorfní a hypervariabilní, mají vysokou mutační rychlost a jsou hojně zastoupeny v celém genomu (Abdul-Muneer, 2014). Pro druh *C. glomerata* sice nejsou známy žádné literární zdroje, které by poskytovaly informaci o sekvencích repetitivních oblastí představující vhodné mikrosatelitové markery, avšak pro příbuzné druhy rodu *Campanula* (*Campanula pyramidalis*, *Campanula scheuchzeri* a *Campanula thyrsoides*) již byly vyvinuty mikrosatelitové markery, které by mohly být potenciálně využity i na hodnocení genetické diverzity druhu *C. glomerata*. Cílem této práce bude tedy i otestovat vhodnost těchto mikrosatelitových markerů pro druh *C. glomerata*. V případě, že jich nebude dostatečný počet pro genetické analýzy, bude mým záměrem vyvinout mikrosatelitové markery nové, druhově specifické.

Kladené otázky:

1. Jak vysokou genetickou diverzitu vykazuje modelový druh *C. glomerata* ve studovaném území, jaká je příbuznost a unikátnost jednotlivých populací? Liší se populace ze severovýchodní a jihozápadní oblasti Bílých Karpat?
2. Jaký je vliv stáří lokality, na genetickou diverzitu druhu *C. glomerata*? Liší se genetická diverzita na lokalitách kontinuálních a na lokalitách nově vzniklých?

3. Je genetická diverzita závislá na vlastnostech populací – jako jsou velikost populace a izolovanost – a/nebo stanovištních podmínkách – jako jsou sklon, nadmořská výška, Diurnal anisotropic heating index (DAHI), Topographic wetness index (TWI), Topographic position index (TPI), Elenbergových indikačních hodnotách (světlo, teplota, vlhkost, půdní reakce, živiny) a/nebo počtu druhů?
4. Lze aplikovat vyvinuté mikrosatelitové markery pro příbuzné druhy rodu *Campanula* na druh *C. glomerata*?

1 Metodika

1.1 Charakteristika druhu

1.1.1 Morfologie

Campanula glomerata (zvonek klubkatý; Obr. 1.1) je vytrvalá trsnatá bylina z čeledi Campanulaceae. Její lodyha je přímá, nevětvená, zřídka chudě větvená, jemně hranatá, nafialovělá či načervenalá, chlupatá nebo lysá a může dosahovat výšky od 10 až 70 cm (Kovanda, 2000).

Listy mají většinou tuhou čepel, která je specificky drsná s jemně a nepravidelně zoubkovaným okrajem. Přízemní listy mohou tvořit hustou přízemní růžici, mají dlouhé řapíky a vejčité kopinatou nebo vejčité podlouhlou, při bázi srdčitou nebo zaokrouhlenou čepel. Listy vyrůstající výše na lodyze mají kratší řapík nebo jsou přisedlé až poloobjímavé, elipsovitého až kopinatého tvaru. Nejvýše rostené listy přecházejí v listeny (Kovanda, 2000).

Květy jsou oboupohlavné, nahloučené ve vrcholové hlávce (lichoklas hlávek připomínající klubičko) na apikálním konci stonku a často jsou doprovázeny jednotlivými květy či menšími shluky květů (maximálně čtyři) vyrůstající z úžlabí listů podél lodyhy. Jsou nejčastěji modrofialové, zřídka bílé, nálevkovitého až zvonkovitého tvaru, 25–35 mm dlouhé, do třetiny až poloviny dělené na pět tupě špičatých korunních cípů. Kališní cípy jsou protáhle trojúhelníkovité a někdy nazpět zahnuté. Čnělka nikdy nepřesahuje korunní lístky, je stejně dlouhá nebo kratší. Blizna je trojramenná, tyčinek je pět. Druh je však vzhledově velice variabilní, především ve tvaru a odění listů, tvaru květenství a velikosti květů (Kovanda, 2000).

Plodem je tobolka, na bázi se třemi otvory, které propouští asi 1 mm velká podlouhlá semena (Kovanda, 2000). Každá kvetoucí lodyha má 1–150 tobolek (průměr je 23,5; $n = 1133$, data z 20 populací v Německu 2002) přičemž každá tobolka může obsahovat až 100 semen (Bachmann & Hensen, 2007).

Zvonek klubkatý kvete od června do září (Kaplan et al., 2019). Kvetení začíná obvykle ve druhém roce po vyklíčení, ale dosažení reprodukční zralosti někdy trvá až 6 let. Sterilní listové růžice lze nalézt v mladém stádiu před reprodukcí, ale také ve stádiu klidu nebo stárnutí (Piskovackova 1980, cit. dle Bachmann & Hensen, 2007). Květy jsou silně proteandrické (Strzałkowska-Abramek et al., 2018) a tedy cizosprašné (Gadella, 1963). Opylení je zajištěno entomogamií (včelami; Klotz et al. 2002; čmeláky, samotářskými včelami, pestřenkami, popřípadě brouky; Janovský 2020). Zvonek klubkatý se však dokáže rozmnožovat i vegetativně

pomocí válcovitých oddenků (pleiokorm podobný oddenku) (Krumbiegel 2002). Délka života jedince je odhadována na 25–30 let (Piskovackova, 1980, cit. dle Bachmann & Hensen, 2007).



Obr. 1.1 *Campanula glomerata*, foceno v září 2019, Štítná nad Vláří – Popov.

1.1.2 Rozšíření a ekologie

Zvonek klubkatý se vyskytuje napříč kontinentální Eurasií, od submeridionální, přes jižní temperátní, severní temperátní až boreální floristickou zónu evropské a sibiřské floristické oblasti a zasahuje až do Japonska (Kovanda, 2000; Kühn & Klotz, 2002). Sekundárně se rozšířil do východní části severoamerického kontinentu, kde zdomácněl. V České republice se vyskytuje roztroušeně po celém území, nejvíce však v teplejších oblastech, ale může zasahovat i do vyšších poloh (Kovanda, 2000).

Nalezneme ho nejčastěji v lesostepích, na kamenitých stráních, křovinatých stráních, travnatých svazích, lesních okrajích, v houštinách i otevřených loukách (Kovanda, 2000). Je to druh částečně světlých míst, většinou rostoucí na plném světle, ale také ve stínu (do 30 % rozptýleného záření dopadajícího na volnou plochu). Je to indikátor mírně kyselých až bazických podmínek, ale nikdy se nevyskytuje v silně kyselých podmínkách (Chytrý et al.,

2018). Preferuje půdy čerstvé až vysychavé, výhřevné (Kovanda, 2000). V některých místech, včetně České republiky, se považuje *C. glomerata* za ustupující nebo dokonce ohroženou (Bachmann & Hensen, 2006, 2007; Frank & Neumann, 1999; Godefroid et al., 2016; Kovanda, 2000). Může se však vyskytovat i v zahradách, kde je pěstován v podobě nejrůznějších kultivarů.

Bylo popsáno několik poddruhů, z nichž u nás se vyskytují bezpečně dva, které mají plynulou řadu přechodných forem a za současného stavu poznání je možné je hodnotit i jako variety. Obě subspecie jsou na našem území na znatelném ústupu (Kovanda, 2000).

1.2 Studované území Bílé Karpaty

CHKO Bílé Karpaty je území, které se rozkládá podél J a JV hranice Moravy se Slovenskem (Culek, 1995). Má tedy moravskou část – CHKO Bílé Karpaty, která vznikla v roce 1980 a slovenskou část – CHKO Biele Karpaty, která vznikla v roce 1981 (Pechanec & Jongepierová, 2008). Centrem tohoto území, podél hranice, prochází pohoří Bílé Karpaty, jež je součástí rozsáhlého pásmového pohoří Karpaty (Kuča et al., 1992). Celé pohoří se táhne asi 1500 km dlouhým zahnutým obloukem východně a jihovýchodně od Bílých Karpat přes Slovensko a Polsko, Ukrajinu, Rumunsko až do Srbska. Pohoří vznikalo horotvorným procesy (vrásněním) v průběhu mladších třetihor (Kuča et al., 1992).

Podloží pohoří Bílé Karpaty je flyšové a je tvořeno mořskými sedimenty křídly a starších třetihor. Flyš se obecně vyznačuje střídáním různě širokých vrstev usazených hornin, v Bílých Karpatech jde převážně o pískovce a jílovce, někdy i slínovce a vápence. Zejména rozdílná odolnost jednotlivých vrstev vůči zvětrávání a silná vodní eroze jsou hlavními činiteli, které utváří členitý reliéf této krajiny. Typické jsou zde časté sesuvy půdy, jež jsou rovněž důsledkem vlastností flyše. Tento jev umožňuje vznik četných pramenišť, výskyt disturbancí, tvoří se mozaika míst s odlišnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi a odlišným vodním režimem (Kuča et al., 1992). Heterogenita prostředí, která ovlivňuje složení vegetace, je vysoká a tím se přirozeně zvyšuje i potenciál druhové rozmanitosti území.

Po posledním glaciálu, v preboreálu a boreálu, zde měla krajina otevřený charakter a umožňovala tak šíření rostlin a organismů bezlesí. V pozdějším období, v atlantiku, se vlivem změny klimatu začala krajina postupně zalesňovat, což muselo nutně znamenat ústup druhů bezlesí. Paleomalakologická data však ukazují, že některé druhy bezlesí zde i v kritickém období rozvoje lesa přeživaly a naznačují přetrvávání otevřených stanovišť v celém holocénu (Ložek, 2008). Na bělokarpatských loukách se nadto vyskytuje množství heliofytních

rostlinných druhů a řada z nich zde má izolovaná stanoviště, značně vzdálená od souvislých areálů, což ukazuje na jejich reliktní charakter (Grulich, 2008; Hájková et al., 2011; Roleček et al., 2015). Existuje hypotéza, že tyto druhy mohly přežívat v tzv. „toulavém“ bezlesí, které vznikalo a zanikalo právě periodickými sesuvy půdy v některých místech a následným vznikem pramenišť, která poté opět zarůstala (Grulich, 2008). Dalším možným vysvětlením mohla být pastva velkých divokých býložravců (turů, zubrů, divokých koní), kteří se na našem území přirozeně vyskytovali (Ložek, 2007, 2011). Je také možné, že tato stáda velkých zvířat byla přitahována do okolí pramenišť a bránila tak sukcesi periodickými disturbancemi v těchto místech (Grulich, 2008). Dalším faktorem udržujícím bezlesí však mohla být pastva hospodářských zvířat spjatá s pravěkým osídlením (Ložek, 2011) a další lidské činnosti vázané na zemědělství. Tuto teorii podporují i novější výzkumy, které vysvětlují extrémní druhovou bohatost bělokarpatských luk na základě fyto geografických, archeologických a paleoekologických poznatků pravěkým původem travních porostů v Bílých Karpatech a tedy jejich kontinuálním výskytem v holocénu (Hájek et al., 2016; Hájková et al., 2011, 2018; Novák et al., 2019; Roleček et al., 2014, 2015).

Od neolitické revoluce (později v atlantiku) se na přetváření krajiny začal poprvé výrazně podílet člověk. S rozvojem zemědělství započalo velké odlesňování, které přineslo i vznik luk a pastvin (Bredenkamp et al., 2002; Hejman et al., 2013; Ložek, 2007, 2011). Rozvoj obchodu, přesuny obyvatelstva včetně hospodářských zvířat podporovaly šíření lučních a stepních druhů z teplejších oblastí. I když v průběhu času travní porosty neustále zanikaly, louky a pastviny se rozorávaly nebo zarůstaly opět lesem, současně vznikaly další bezlesé plošky na sousedních místech (Klimeš, 2008). Ve starším období byly hlavními příčinami udržujícími bezlesí pravděpodobně pasení a pálení, zatímco sečení luk kosou se stalo důležitější až od 17. století (Hájková et al., 2018). Nepřetržité hospodaření na tomto území po celá staletí bylo jedním z hlavních činitelů, které umožnily vznik této krajiny s výjimečnou druhovou bohatostí (Jongepierová, 2008).¹

Velké změny v obhospodařování krajiny přineslo zemědělství v období socialismu. Docházelo k vysokému úbytku trvalých travních porostů, které byly i na černo rozorávány. V 70. letech započaly také mechanické úpravy porostů (odstraňování stařiny, odmechování,

¹ Příkladem zajímavého způsobu hospodaření je košárování na Jižním Valašsku. Je to způsob pasení dobytka (ovcí). Ovce jsou přes noc a po ranní pastvě zavírány do „košáru“. Jde o dřevěnou ohrádku, která se po dvou až třech dnech přenesla o kus dál (Štika, 1958). Exkrementy zvířat nebyly tak díky košárování koncentrovány na jednom místě, ale byly nerovnoměrně roztroušeny po pastvinách, což podporovalo prostorovou heterogenitu a tím i biodiverzitu (Futák et al., 2008).

vláčení, smykování, válení) a začala se používat umělá hnojiva. Sečení luk probíhalo často již v květnu a na lehce přístupných místech pro těžkou techniku probíhalo dvakrát. Nepřístupná místa (např. svahy s velkým sklonem) se naopak přestala kosit a zarůstala náletovými dřevinami. Naproti tomu v dřívějších dobách se tyto plochy kosily ručně. Seč probíhala jen jedenkrát, také mnohem později v létě (Futák et al., 2008). Výsledek nebyl pravděpodobně nikdy tolik uniformní, nýbrž mnohem více mozaikovitý, a tím zvýhodňoval na různých plochách, různé druhy, a tak vznikala pestrá druhová mozaika.

Již v 80. letech byly některé původní rozorané travní porosty rekultivovány (rozorání a setí komerčních směsí trav a jetelovin) kvůli špatným výnosům plodin. Od devadesátých let 20. století docházelo k opouštění půdy, které ohrožovalo udržení místních trvalých travních porostů (Futák et al., 2008). Zatrávňování na některých místech však pokračovalo.

Území CHKO Bílé Karpaty je dnes tvořeno z 53 % lesy, z nichž na moravské části tvoří 54 % listnaté lesy a 30 % smrčiny. Charakteristickým rysem této krajiny jsou ovocné sady roztroušené po území, zejména v okolí obcí a samot, ale někdy i samostatně. Rozptýlená zeleň a křoviny představují celkem 4,81 % území. Zemědělsky využívané plochy zabírají celkem 37 % území a z toho 6,5 % připadá na trvalé travní porosty (louky a pastviny) (Pechanec & Jongepierová, 2008).

1.2.1 Bílé Karpaty jihozápadní

Floristicky nejvýznačnější, nejbohatší a také nejznámější a nejvíce prostudované je západní moravské předhůří Bílých Karpat. Je zde nejteplejší a nejsušší klima, bohaté půdy na živiny a kořeny osídlení zde sahají hluboko do historie (Grulich, 2008). Právě v této oblasti můžeme nalézt slavné bělokarpatské louky. Převládá zde jeden typ vegetace, který je však neobyčejně druhově pestrý (Chytrý et al., 2015). Nachází se zde mnoho reliktních prvků, které jsou pozůstatkem raných holocenních lesostepních společenstev (Hájková et al., 2011; Roleček et al., 2015). V současnosti přibývá stále více dokladů o tom, že od posledního glaciálu zde neexistovala žádná hustá lesní fáze. Krajina v jihozápadní části byla trvale využívána člověkem a existence bezlesých ploch zde měla kontinuální vývoj (Hájková et al., 2018). Stáří některých zdejších luk proto může být teoreticky i tisíce let (až 10 000 let). I přes intenzifikaci zemědělství si díky značné vzdálenosti od zemědělských družstev (a díky tomu relativně extenzivnímu obhospodařování) bělokarpatské louky zachovaly svůj reliktní charakter (Roleček et al., 2015).

V této části Bílých Karpat byla vybrána první skupina studovaných oblastí (Obr. 1.2, Tab. 1.1). Jde o NPR Čertoryje náležící do fytochorionu Bílé Karpaty stepní, které jsou součástí

fytogeografického obvodu Panonské termofytikum a do fytochorionu Bílé Karpaty lesní, jež jsou součástí fytogeografického obvodu Karpatské mezofytikum. Dalšími zájmovými oblastmi jsou NPR Zahrady pod hájem a sousedící NPP Búrová náležící do fytochorionu Bílé Karpaty stepní (Skalický, 1988). Louky jsou nyní obhospodařovány pravidelným kosením jednou ročně, mozaikovitým způsobem od června do září. Tento způsob obhospodařování je pro zdejší typ luk nejvhodnější (Klimeš, 2008).



Obr. 1.2 Výskyt populací v jihozápadním regionu Bílých Karpat.

NPR Čertoryje

Zde se nachází největší a asi nejcennější soubor květnatých bělokarpatských luk s rozptýlenou zelení, solitéry dubů, lip, břeků a dalších stromů, které společně vytváří typický parkovitý a rozlehlý charakter území (Kuča et al., 1992). Na plochu rezervace v minulosti navazovaly původní kavylové stepi. Ty byly však postupně zničeny hnojením a rozoráním, podobně jako část Vojtišských luk, které se nachází v ochranném pásmu. Většina významných druhů byla nucena přežít v místech nedostupných pro zemědělskou techniku. V roce 1986 se zde začaly vysekávat opuštěné a málo přístupné svahy zarostlé zejména hlohem a jinými náletovými dřevinami a nově vzniklá plocha je dnes již každoročně kosena. Převažujícím typem

vegetace jsou v současnosti teplomilné louky svazu *Cirsio-Brachipodion pinnati*, které střídají na vlhkých místech bezkolencové louky svazu *Molinion* (Mackovčín & Jatiová, 2002).

NPR Zahrady pod hájem

Jedná se o květnaté louky a extenzivní staré sady tvořící svislé pruhy, které jsou odděleny pásy keřů a lesíků s četným výskytem teplomilných a ohrožených druhů. Opět zde nalezneme luční vegetaci svazu *Cirsio-Brachypodion pinnati* a místy se objevuje i vlhčí vegetace svazu *Molinion*. Významná je však teplomilná vegetace s kostřavou žlábkatou (*Festuca rupicola*), omanem mečolistým (*Inula ensifolia*) a ostřicí chabou (*Carex flacca*) (Mackovčín & Jatiová, 2002). Část tohoto území byla v minulosti poškozena intenzivní pastvou. Obnova však probíhá rychle díky pravidelnému kosení a skutečnosti, že plochy nebyly hnojeny (Kuča et al., 1992; Mackovčín & Jatiová, 2002).

NPP Búrová

Toto menší území představuje rozsáhlá louka s teplomilnou vegetací a výskyt solitérních starých dubů. Je význačná také kvůli hojnému výskytu vzácné (C1) kýchavice černé (*Veratrum nigrum*) (Grulich & Chobot, 2017). Od 80. let zde bylo provozováno intenzivní obhospodařování, které bylo provázeno minerálním hnojením a vyséváním kulturních trav. Zdejší druhová diverzita tak byla snížena, avšak stav tohoto území se opět zlepšuje díky každoročnímu kosení (Kuča et al., 1992; Mackovčín & Jatiová, 2002).

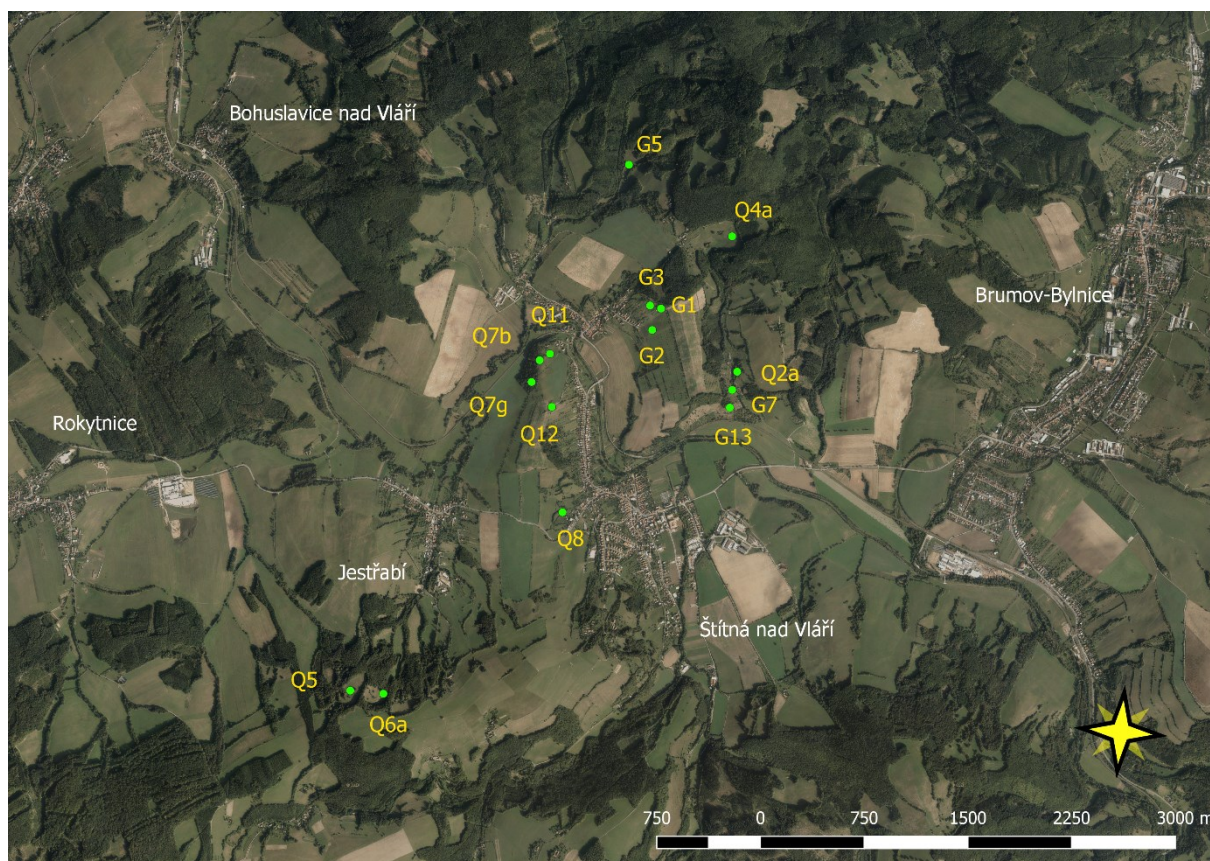
Název území	Vyhlášeno	Katastrální území	Výměra	Nadmořská výška
NPP Búrová	1987	Suchov, okres Hodonín	18,80 ha	442–532 m
NPR Čertoryje	1987	Hrubá Vrbka, Kněždub, Tvarožná lhota, okres Hodonín	325,58 ha	350–445 m
NPR Zahrady pod hájem	1987	Velká nad Veličkou, okres Hodonín	162,30 ha	300–480 m

Tab. 1.1 Vybraná zájmová území v jihozápadní části Bílých Karpat.

1.2.2 Bílé Karpaty severovýchodní

Severovýchodní předhůří Bílých Karpat je obecně méně výrazné než jihozápadní část, místy floristicky nevýrazné a je mu věnována menší pozornost. Klima je zde chladnější a vlhčí, půdy jsou méně úživné, reliéf je méně členitý (dříve zde pravděpodobně nebyly tak rozsáhlé bezlesé sesuvy). Flóra se podobá nevýrazné oblasti mezi Vsetínem a Zlínem a chybí zde většina náročnějších teplomilných druhů. Bezlesé lokality v tomto území obecně nejsou v příliš dobrém stavu (Grulich, 2008). Od jihozápadní oblasti se toto území liší odlišnými přírodními podmínkami a zejména druhovým složením, které tyto dvě oblasti jasně odděluje (Otýpková et al., 2011). Ochuzená flóra severovýchodní oblasti může být vysvětlena kontrastní holocenní

historií, kdy zde v období zvlhčení klimatu (6800 př. n. l.) chyběly otevřené plochy bezlesí a převládal zde hustý les po dobu asi 2000 let, který způsobil zánik světlomilných druhů. V pozdním neolitu (4600 př. n. l.) se charakter krajiny sice mírně otevřel, avšak stále zde dominovaly lesy a až cca před 600 lety zde započalo nové odlesňování spojené s kolonizačními událostmi, které však nebylo dostatečně dlouhé, aby umožnilo rekolonizaci severovýchodní části některými vzácnými druhy z jihozápadu (Hájek et al., 2016).

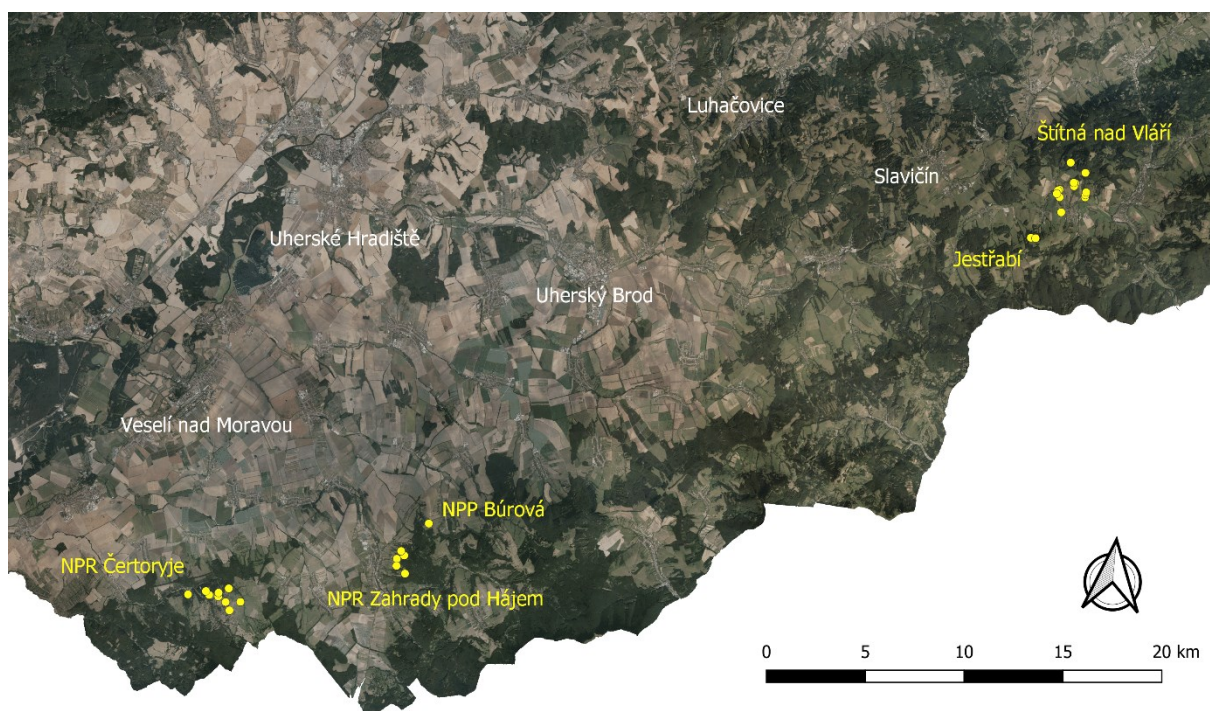


Obr. 1.3 Výskyt populací v severovýchodním regionu Bílých Karpat.

Zde se nachází druhá skupina vybraných zájmových oblastí, a to v blízkosti obcí Štítné nad Vláří – Popov a Jestřabí (Obr. 1.3). Travní porosty se od sebe liší stářím a lze je rozdělit na dvě skupiny. První skupinou jsou původní travnaté porosty, na kterých většinou probíhá pastva dobytka, nebo jsou obhospodařovány sečí. Druhou skupinou nově obnovené louky – bývalá pole, jež byla v průběhu 80. a 90. let 20. století zatravněna komerční jetelotravní směsí a v současnosti na nich probíhají krajinářské úpravy, jsou využívány jako pastviny nebo jsou koseny.

1.3 Sběr materiálu

V terénní části projektu jsem v letech 2018 a 2019 pátrala po populacích *C. glomerata* v zájmovém území (Obr. 1.4). Bohužel velká část travních porostů byla kosena již před vykvetením *C. glomerata*. Nalezení těchto populací, a především jednotlivých rostlin, bylo proto velice obtížné, neboť některé rostliny znovu obrážely až na konci sezóny, některé neobrážely vůbec nebo byly znovu pokoseny. Stav populací se přitom nedal předvídat, neboť travní porosty byly koseny mozaikovitě v různých obdobích sezóny, každá lokalita v jiném čase. Rostliny jsem proto hledala i ve vegetativním stádiu, podle listových růžic. Přesto se mi při tomto nesnadném úkolu podařilo uskutečnit jeden ze záměrů a nalézt celkem 30 populací, z toho 15 populací vyskytujících se na severovýchodě, 15 na jihozápadě Bílých Karpat a nasbírat při tom více než 500 vzorků (k analýzám však bylo použito celkem 456 jedinců, zbytek vzorků sloužilo jako rezerva).²



Obr. 1.4 Mapa Bílých Karpat. Oblast sběru na severovýchodě Bílých Karpat: Štítná nad Vláří, Jestřabí; oblast sběru na jihozápadě Bílých Karpat: NPR Čertoryje, NPR Zahrady pod Hájem, NPP Búrová.

Pro vývoj mikrosatelitových markerů pro daný systém je potřeba DNA z několika jedinců, u kterých je předpokládána velká genetická odlišnost. To zaručí, že získané markery budou použitelné pro veškerý studovaný materiál. Pro tyto účely jsem proto mimo jedinců z Bílých Karpat použila vzorky ze Slovenského ráje, které jsem nasbírala v létě 2019. Dalšími

² Terénní práce v NPR i NPP byly prováděny pod dohledem pracovníka správy CHKO Bílé Karpaty.

vzorky, které byly využity na testy variability mikrosatelitových markerů bylo několik jedinců z okolí Brna a z Botanické zahrady Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně získané v roce 2018.

Materiálem ke genetickým analýzám byly listy odebrané po 2–3 z každé vybrané rostliny. Rostliny jsem vybírala v každé populaci náhodně, avšak rovnoměrně ve všech částech lokality. Vzdálenost jednotlivých populací byla minimálně 200 m na otevřených loukách (například v Čertoryjích) a minimálně 100 m na lokalitách, kde populace oddělovaly prostorové bariéry (např. křoviny). Z každé populace bylo odebráno přes 20 vzorků, z populací o menším počtu jedinců než 20 byly odebrány vzorky od všech přítomných rostlin. Odebrané listy jsem vysušila na silikagelu a připravila je na laboratorní zpracování v laboratoři Botanického ústavu AV ČR v Průhoncích. Z vysušených vzorků jsem izolovala DNA, která sloužila jako materiál k analýze genetické variability za použití mikrosatelitů.

1.4 Vegetační snímky

Na každé lokalitě, kde se vyskytovala populace větší než 10 jedinců (plus populace C14, která měla 8 jedinců), jsem vybrala plochu o velikosti 3×3 m tak, aby tato plocha zahrnovala maximální možné množství jedinců *C. glomerata* v dané populaci. Plochu o dané velikosti jsem vybrala proto, aby splňovala následující dva předpoklady – aby byla schopna dostatečně obsáhnout druhového složení stanoviště, ve kterém se nachází největší část populace *C. glomerata* a dostatečně ho charakterizovat, zároveň však, aby byla po splnění těchto podmínek, co nejmenší a odečet druhů byl tak co nejjednodušší a nejpřesnější. V těchto plochách jsem určovala druhové složení vegetace. V každém snímku jsem zaznamenala výskyt druhu a jeho četnost pomocí zjednodušené stupnice (1 – jeden či více jedinců ve snímku, celková pokryvnost maximálně do 5 %; 2 – více jedinců ve snímku, pokryvnost 5-15 %; 3 – druhy s vysokým zastoupením jedinců ve snímku, dominanty, pokryvnost nad 15 %). Vegetační snímky jsem provedla v srpnu 2019. Z vegetačních snímků jsem odvodila Elenbergovy indikační hodnoty (pro světlo, teplotu, vlhkost, půdní reakci a živiny) k charakterizaci stanoviště s využitím upravených Elenbergových hodnot pro českou flóru (Chytrý et al., 2018) – viz kapitola 1.12.1 a Tab. P.4 v příloze.

1.5 Letecké snímky

Pro všechny studované louky v obou zájmových územích jsem studovala staré letecké fotografie z Národního archivu leteckých měřičských snímků (Český úřad zeměměřický

a katastrální) z 50. let minulého století (z let 1949, 1950, 1953, 1961) a porovnávala je se současnými leteckými snímky. Pokoušela jsem se zjistit, které plochy byly v minulosti loukami a které plochy byly v minulosti ornou půdou a zda výskyt *C. glomerata* je vázán spíše na původní louky nebo dokázal kolonizovat i nově vzniklá stanoviště.

1.6 GIS

V programu QGIS (QGIS 3.4.14; QGIS Development Team, 2016) jsem dle souřadnic vyznačila body označující výskyty jednotlivých populací. Některé populace byly původně rozděleny na menší subpopulace, ty byly však později sloučeny z důvodu nízké geografické vzdálenosti (desítky metrů) a vysoké homogenity stanovišť. Body byly zakresleny ve čtverci, kde se cílový druh vyskytoval v nejvyšší hustotě a kde jsem současně zapsala vegetační snímek (Obr. 1.2 a 1.3). Z těchto bodů jsem dále odečítala všechny terénní charakteristiky pomocí nástrojů v programu QGIS. Pro výpočty jsem použila SRTM DEM (Shuttle Radar Topography Mission Digital Elevation Model) – digitální model terénu o velikosti buňky 100 m (Data poskytl a zpracoval © GISAT (2007)).

Informace o nadmořské výšce je obsažena v samotném DEMu (Elevation). Pro výpočet sklonu (Slope) a orientace (Aspect) jsem použila nástroj SAGA GIS (Conrad et al., 2015). Pro obé jsem zvolila defaultně nastavenou metodu výpočtu (Zevenbergen & Thorne, 1987) a jednotky ve stupních. Orientaci a sklon jsem dále využila k výpočtu Diurnal Anisotropic Heating Index (DAHI), která je funkcí sklonu a orientace a představuje míru dopadajícího slunečního záření na plochu. Pro výpočet jsem použila opět nástroj SAGA GIS s defaultně nastavenými hodnotami (Boehner & Antonic, 2009). Dále jsem pomocí SAGA GIS vypočítala Topografic Wetness Index (TWI) pomocí nástroje SAGA Wetness Index (Böhner & Selige, 2006) pomocí defaultně nastavených parametrů a Topografic Position Index (TPI) také defaultně nastavený (Wilson & Gallant, 2000).

Pro všechny populace jsem vytvořila polygony, pro které jsem vypočítala plochu, na které se daná populace vyskytovala (pomocí funkce \$area v atributové tabulce). Pro informaci o izolovanosti populací jsem pro každou populaci vytvořila buffer o poloměru 500 m. Ve výsledných plochách jsem spočítala celkový počet jedinců a odečetla počet jedinců populace, k níž příslušela daná plocha – buffer (v každém bufferu jsem tedy spočítala jedince, kteří nepatřili k dané populaci). Čím vyšší je hodnota proměnné *buffer*, tím je populace méně izolovaná od okolních populací. Pro celou práci v QGIS jsem používala Křovákovo zobrazení v rámci souřadnicového systému S-JTSK.

1.7 Laboratorní zpracování rostlinného materiálu

Z vysušených vzorků jsem izolovala DNA cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) metodou (Lodhi et al., 1994) (Protokol izolace DNA v příloze). Kvalitu a obsah izolované DNA jsem hodnotila u každého vzorku spektrofotometricky pomocí NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Získanou DNA jsem naředila na koncentraci $20 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$ (množství izolované DNA v Tab. P.10 v příloze).

1.8 Vývoj mikrosatelitových markerů

Nejsou nám známy žádné literární zdroje, které by poskytovaly informaci o sekvencích repetitivních oblastí *C. glomerata* představující vhodné mikrosatelitové markery. Proto bylo jedním z cílů této práce vyvinout a optimalizovat mikrosatelitové markery pro hodnocení genetické variability. Před identifikací druhově specifických mikrosatelitů firmou Genoscreen (Lile, France) jsem však nejdříve testovala mikrosatelitové markery, které byly již vyvinuty pro příbuzné druhy. Tento krok a následná práce byly prováděny ve spolupráci s pracovníky laboratoře populační genetiky Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích. Nejprve jsem testovala 29 mikrosatelitových primerů, které byly vyvinuty pro blízké příbuzné druhy rodu *Campanula*. Byly to druhy *C. scheuchzeri* – 10 primerů (Tab. 1.2; Armbruster & Stoecklin, 2015), *C. thyrsoides* – 8 primerů (Tab. 1.3; Aegisdottir et al., 2007) *C. pyramidalis* – 11 primerů (Tab. 1.4; Radosavljevic et al., 2015).

Lokus	Sekvence forward (F) a reverse (R) primeru (5'-3')	Motiv	Délkové rozmezí (bp)
Scheuch1	F: AAAGTGCATTATACCTAAATTGCTG R: GTTGGCAAATGGGTTGACTTTC	(TACA)8	123–147
Scheuch2	F: TTAGGCTCAAACTTACCACAC R: CGTTCTCAGATCCGTTACTGTTTC	(ATAC)8	139–166
Scheuch3	F: AGCAATCTTGGCCCCCTAAC R: TACTCGAACATGGCTTCACC	(TGTA)7	138–184
Scheuch4	F: TGCATCATAAGTGAGCACATCG R: CGAATCGCTGGGAGAAAAGG	(TATG)7	84–130
Scheuch5	F: TGGGGTGGTTTACTCTACTCG R: TGGAAACCCCGTGATGAGATG	(CTAT)11	145–193
Scheuch6	F: TTATGTTTTGGGGGCGTGG R: TCATGGGCTGATTATCTAGGGG	(ATGT)7	119–199
Scheuch7	F: GCAACTTAACTGGGACAGAGG R: ACTTTACACATTTAAAGGCATTGAGG	(ATAC)7	127–220
Scheuch8	F: TCAAATAGAGTGCCACCTTAGC R: TGGGGTATACAGTTGAAGAGG	(CATA)7	127–168
Scheuch9	F: TGACCAATGTTCTGACTTGAC R: ACTAAAACATCATTATTTTGAACGC	(ATAC)9	107–170
Scheuch10	F: CTCTCTCTATAACACACCGC R: GTTGGAGGAGTGACACAAGC	(ATAC)7	83–122
Scheuch11	F: GTGACCTTTCTTATTATTGCCC R: GCTTTGGAGAGGCTTGACATAC	(TATC)10	153–226
Scheuch12	F: TCTAGTCATCCCTAGGCCCG R: TGCGCAGTTCACCTGGTTTG	(AGAT)7	103–199
Scheuch13	F: TGTGACTCGCTCGACTTC R: ACAAGTCCTCCTAGTTCCTAC	(ATGT)8	153–195
Scheuch14	F: ATTACACGAGACGGAGGGAG R: TGGCCTTGCAAAACGCTTC	(GTAT)7	164–294
Scheuch15	F: ATGCCCTAATTTCCACTTGC R: GTGAATTTTTAGCACATTTAGTAGCAC	(ATGT)7	143–220

Tab. 1.2 Mikrosatelitové primery ze studie *C. scheuchzeri* (Armbruster & Stoecklin, 2015).

Lokus	Sekvence forward (F) a reverse (R) primeru (5'-3')	Motiv	Délkové rozmezí (bp)
Camphy 1	F: CTGCTAGGCTATGCGAGTGTTT R: TCTGAATTTGTTGAGAATCTTTTG	(CA)16	153–176
Camphy 3	F: AAAGTTTGATTCCAAGGTGCTC R: AAAATAATTCCAGGGACGGAGT	(CA)13	130–155
Camphy 5	F: CCAGCGACGCTTTAGTTATTGT R: CAAATATAAAGGGGAAGTTACTTATCA	(GT)20	93–127
Camphy 6	F: ACAACCTCGAACCAATTTTCAG R: CAATTGGGGTCTAACCATTAC	(CA)17	151–164
Camphy 9	F: AATGTCCATGGTGTGGTGAAC R: CCATTCAAAGCCGAGTATTAG	(CA)24	162–192
Camphy 12	F: TTAATCAAATCGGCGATAATGG R: CTCTCTAAGTTTTAATTGAACTGGTG	(GA)18	131–174
Camphy 13	F: TCGTGTTAGTTGCCTGATTTG R: GAGGTTTGAAAAGTTGTCTGG	(GA)30	166–203
Camphy 15	F: TTCTCCGATATATTCGCCTACC R: GAGCGAAAAGATATGAAGAAATTAAG	(CT)21	158–190

Tab. 1.3 Mikrosatelitové primery ze studie *C. thyrsoides* (Aegisdottir et al., 2007).

Lokus	Sekvence forward (F) a reverse (R) primeru (5'-3')	Motiv	Délkové rozmezí (bp)
CpUZ001	F: AAGTATTGGACCCCGAGCTT R: ATCACCCCTAGCCATGCAATC	(ACT)8	130–163
CpUZ002	F: CCGAATGCACCGTATACTCA R: AGCAGTAAATTGGACGGTCTG	(AGA)9	155–167
CpUZ003	F: CCTCTCCGAATGACGCTTA R: CACTCTTGCTTACACCTTGTC	(GA)12	167–259
CpUZ004	F: GCGAGACTTCTGTGATGTGG R: TGTGGAGAAATGGACGTTCT	(AGA)12	133–181
CpUZ005	F: ATGTTTGCCTTTTCACTGC R: TTGGGATGTTGGAACACAAA	(GT)12	146–160
CpUZ006	F: CAGCAATGCAGAAATCGAAA R: AAACCCCTTCCTCAAATCA	(GT)14	212–228
CpUZ007	F: TGTGGGAGGTTCAATGGTTT R: ACTGCATGCGACAAGATCAA	(GT)16	200–248
CpUZ008	F: ATGCAGGGAGCATTGAAGAT R: CCCCAGGAGTCTTCTCTCC	(GT)15	196–204
CpUZ009	F: CAAATTTGAACGGGTTTTCG R: ACTCTCCCTCCACATTCC	(GA)19	181–207
CpUZ010	F: TCCACCCACCAATAATCTCC R: ATCCAGAACCCGAAAATTCC	(ATC)10	163–199
CpUZ011	F: ACACTGCCGATATGTGCGTA R: CCATGTTGTTGTAATCATCA	(GT)16	220–246

Tab. 1.4 Mikrosatelitové primery ze studie *C. pyramidalis* (Radosavljevic et al., 2015).

V prvním kroku jsem testovala, zda dochází k amplifikaci jednotlivých PCR (polymerase chain reaction) produktů na gradientu annealingových teplot. Mikrosatelitové primery jsem ředila 10×. PCR reakční směs o objemu 10 µl obsahovala: 5 µl 2 × MM, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer, 1 µl DNA, 2 µl ddH₂O. PCR směs jsem nechala amplifikovat v termocycleru Mastercycler pro S (Eppendorf) a nastavila jsem počáteční minutový (60/60/60) program: denaturace – 95 °C 10 minut; elongace – 35× 95 °C 60 sekund, gradient teplot 48–60 °C 60 sekund, 72 °C 60 sekund; terminace – 72 °C 10 minut. PCR produkty jsem detekovala pomocí 1% agarózového gelu v TAE pufru s použitím EtBr (ethidium bromid) na horizontální elektroforéze Wide gel system D2 (Owl) podle dokumentačního systému pro gely – Ingenius LHR (Syngene). Jako velikostní marker jsem použila GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Pro vizualizaci DNA v UV světle program GeneSnap v 7.08 (Syngene). Porovnáním intenzity jednotlivých bandů (proužků) jsem zjistila, která teplota annealingu je nejlepší pro amplifikaci PCR produktu.

V dalším kroku jsem připravila PCR s fluorescenčním značením pro vizualizaci fragmentační analýzy na sekvenátoru ABI 3130 Genetic Analyzer. Tento krok vyžadoval do PCR směsi přidat fluorescenčně značený forward primer M13 (Schuelke, 2000). Složení 10 µl reakční směsi: 5 µl 2× MM, 1 µl forward primer, 0,5 µl reverse primer, 0,5 µl M13, 1 µl DNA, 2 µl ddH₂O. Program na termocycleru byl opět 1 min., teplota annealingu byla nastavena (po

vyhodnocení elektroforézy v předcházejícím kroku) na 52 °C. PCR produkty jsem připravila na denaturaci následovně: 12 µl formamidu, 0,1 µl GeneScan 500 LIZ (Thermo Fisher Scientific), 1 µl PCR produktu. Před denaturací byla použita Centrifuge 5430 (Eppendorf), pro denaturaci byl použit Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Denaturovaný PCR produkt byl tímto krokem připraven k fragmentační analýze. Fragmentační analýzu jsem vyhodnocovala pomocí programu GeneMapper 4.0. Vše jsem testovala na jednom jedinci.

Dále jsem testovala variabilitu jednotlivých amplifikujících se lokusů pomocí fragmentační analýzy (PCR směs i program termocycleru stejný jako v předchozím kroku) – na 8 jedincích z geograficky vzdálených populací (severovýchod a jihozápad Bílých Karpat, Brno, Slovenský ráj). Podařilo se mi identifikovat celkem 7 variabilních mikrosatelitových lokusů.

Sedm variabilních lokusů není považováno za dostačující pro mezipopulační analýzy (Reiner et al., 2019), proto ve spolupráci s firmou Genoscreen byly pomocí NGS sekvenování identifikovány druhově specifické mikrosatelitové lokusy. Bylo identifikováno celkem 430 mikrosatelitových lokusů. Z tohoto souboru bylo vybráno 50 mikrosatelitových primerů (Tab. P.11 v příloze), které amplifikují heterogenní repetice se 3–4 nukleotidovými opakováními. Při výběru primerů jsme se vyhýbali dinukleotidovému opakování kvůli jednoznačnosti genotypování a brali jsme do úvahy velikost PCR produktu (vyhýbali jsme se velikostním překryvům a snažili jsme se pokrýt celé délkové rozmezí 90–300 bp).

Testování těchto 50 primerů probíhalo podobně jako u předchozího souboru primerů, avšak pro amplifikaci produktu byla teplota annealingu nastavena na 56°. Prvními experimenty jsem selektovala 32 stabilně amplifikujících se lokusů. V dalším kroku jsem testovala mezipopulační variabilitu těchto lokusů na 8 jedincích. Bylo vybráno 15 variabilních lokusů.

1.9 Optimalizace mikrosatelitových markerů

V předcházejícím kroku bylo vybráno dohromady 22 mikrosatelitových primerů vhodných k charakterizaci polymorfních lokusů zkoumaného druhu *C. glomerata*. Pomocí programu Multiplex Manager v 1.2 byly primery rozděleny do 3 multiplexů. Fluorescenčně značené primery jsem opět naředila 10× a zjišťovala jsem, zda dochází ke specifické amplifikaci primerů v multiplexu bez crossamplifikací.

Provedla jsem mnoho kroků optimalizace, než bylo docíleno přijatelného výsledku a bylo tak možné skórovat elektroforetogramy celého datasetu (viz Tab. 1.5). Bylo potřeba postupně měnit koncentraci primerů v PCR směsi podle výsledných elektroforetogramů k dosažení

stabilní intenzity píků (vrcholů). 4 primery byly přeřazeny do jiných multiplexů (Campthy1, Campthy3, Cgm33, Cgm45), 3 byly nakonec vyřazeny úplně (Campthy12, Scheuch 6, Scheuch 12). Program v termocyclexu byl ponechán u multiplexu I na minutový u všech kroků PCR, teplota annealingu 52 °C, u multiplexu II a III se podařilo čas zkrátit (denaturace 30 sekund, annealing 40 sekund, elongace 30 sekund), teplota annealingu 56 °C. Aktivační denaturace a finální elongace byly ponechány jako ve výše uvedených předpisech. Při přípravě na fragmentační analýzy byl multiplex II ředěn 10× a multiplex III 5×. Výsledné multiplexy jsou uvedeny v Tab. 2.1 ve výsledcích.

Multiplex	Lokus	Objem (μl)
MM I	CpUZ001	0,05
	Campthy1	0,1
	Cgm33	0,2
	Cgm45	0,075
MM II	Campthy5	0,1
	Cgm2	0,0375
	Campthy3	0,075
	Campthy6	0,075
	Cgm16	0,1
	Cgm23	0,075
	Cgm35	0,075
	Cgm42	0,05
MM III	Cgm7	0,0375
	Cgm12	0,0375
	Cgm17	0,05
	Cgm27	0,075
	Cgm38	0,075
	Cgm39	0,05
	Cgm41	0,075

Tab. 1.5 Objem jednotlivých primerů v multiplexové PCR. Do 5μl reakce bylo pro každý multiplex PCR přidáno vždy 2,5 μl 2× MM (2× QUIAGEN Multiplex PCR Master Mix), 1 μl DNA, množství forward primeru a stejné množství reverse primeru uvedené v tabulce a odpovídající množství ddH₂O. Pro genotypování jedinců bylo provedeno více než 1400 reakcí.

1.10 Genotypování jedinců

Následně jsem provedla genotypování jedinců, tak aby pro každou populaci nad 20 jedinců bylo použito maximálně 20 vzorků a v případě populací, kde bylo méně než 20 jedinců, byly použity všechny vzorky. Celkem jsem genotypovala 456 takto vybraných jedinců. U některých vzorků PCR neproběhla správně (elektroforetogramy nic neukazovaly, píky byly nízké nebo se objevovaly tři píky), proto jsem tyto jedince genotypovala opětovně v nové PCR. U některých jedinců však tento krok nebyl úspěšný, proto jsem z části z nich znovu izolovala DNA (zejména u těch, které měly nízkou koncentraci izolované DNA nebo u malých

populací, kde nebyly k dispozici rezervní vzorky) nebo jsem izolovala DNA z jedinců rezervních, abych je doplnila do plného počtu vzorků dané populace. Celkem 31 vzorků se přesto neamplifikovalo stabilně ani po opakovaném pokusu – výsledný počet úspěšně genotypovaných jedinců byl tedy 425.

Na analýzu celého datasetu jsem použila celkem 19 primerů rozdělených do 3 multiplexových PCR. Skórování jsem provedla manuálně celkem u 16 primerů. Primery Cgm33 (multiplex I), Campthy5 (multiplex II) a Cgm38 (multiplex III) nebylo možné skórovat – velikost píků neodpovídala danému nukleotidovému opakování, u některých vzorků se objevovaly tři alely nebo se neobjevila žádná – jednalo se o nestabilní amplifikaci v rámci multiplex PCR.

1.11 Analýza genetických dat

Pomocí programu MSA verze 4.05 (Dieringer & Schlötterer, 2003) jsem nejprve zjistila chyby ve skórování, které jsem opravila na základě nového skórování jednotlivých vzorků, u kterých byla hlášena chyba a také u všech vzorků, kde se vyskytovala jediná unikátní alela, abych ověřila, že se jedná opravdu o unikátní alelu. Dále byl program MSA připraven vstupní soubor do programu Arlequin verze 3.5.2.2. (Excoffier & Lischer, 2010). Primární matici vyhodnocených délek jednotlivých fragmentů pro všechny lokusy jsem převedla do binární matice jako vstupní soubory pro program PAST a skript AFLPdat (Ehrich, 2006) pro program R verze 3.4.4 (R Core Team, 2017). Pomocí skriptu AFLPdat jsem zjistila přítomnost klonů (viz Graf P.2 v příloze) a odstranila je pro vstupní soubor do programu STRUCTURE. Pomocí AFLPdat jsem také vykreslila histogram frekvence alel ve všech lokusech (Graf P.3 v příloze). V programu MSA jsem zjistila délkové rozmezí jednotlivých lokusů, spočítala jsem počet alel pro jednotlivé lokusy, jejich frekvenci v lokusech (Tab. P.9 a Graf P.4) a G'_{ST} – zobecněnou a standardizovanou míru genetické vzdálenosti (Hedrick, 2005; Meirmans & Hedrick, 2011).

Pro odlišení jednotlivých genetických skupin a zjištění prostorové struktury populací a jedinců jsem použila mnohorozměrnou analýzu hlavních koordinát PCoA (Principal Coordinate Analysis) v programu PAST verze 4.02 (Hammer et al., 2001). Index podobnosti jsem použila Jaccardův. Nejprve jsem PCoA provedla pro celý dataset a sledovala jsem rozdělení jedinců do dvou skupin na základě příslušnosti populací k jihozápadu či severovýchodu Bílých Karpat. Následně jsem provedla PCoA zvlášť pro tyto skupiny – sledovala jsem rozlišení populací v rámci severovýchodní oblasti a jihozápadní oblasti Bílých Karpat.

K odvození genetické struktury populací jsem použila také program Structure verze 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), který na základě genetické podobnosti rozdělí jedince do jednotlivých klastrů (shluků; K). V modelu, ve kterém je K skupin a kde každá skupina je charakterizována sadou frekvence alel v každém lokusu, jsou jedinci přiřazováni k jednotlivým skupinám nebo, vzhledem k jejich „smíšeným“ genotypům, k současně dvěma či více skupinám (Pritchard et al., 2000). Algoritmus odhaduje frekvence alel v každém klastu a příslušnost každého jedince ke klastu, za předpokladu daného K , Hardyho-Weinbergovy rovnováhy a linkage ekvilibrium mezi jednotlivými klastry (rovnováha v zastoupení alel) (Hubisz et al., 2009). *Length of Burnin Period*, tj. počet kroků MCMC (Markov chain Monte Carlo) řetězců, než budou výsledky dosahovat rovnováhy, byl nastaven na 100 000. Počet běhů byl nastaven na 1 000 000. Počet klastrů byl $K = 1, K = 2, \dots, K = 10$. Pro každé K , bylo nastaveno 10 opakování. Výpočet byl proveden ve výpočetním centru Žilinské Univerzity HPC Uniza. Ke zjištění nejlepšího možného modelu (optimálního K) jsem použila Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012), kde jsem porovnávala likelihood, ΔK (Evanno et al., 2005) a Nordborgův koeficient podobnosti (Nordborg et al., 2005) pro všechny K . Grafické výstupy jsem zpracovala pomocí skriptu Structure-sum-2009 (Ehrich et al., 2007) v programu R. Výsledný grafický výstup z programu STRUCTURE pro daný počet skupin jsem vykreslila pomocí online aplikace Structure Plot V2.0 (Ramasamy et al. 2014).

V programu Arlequin jsem provedla analýzu molekulární variance (AMOVA) ke zjištění genetické variability mezi jedinci v rámci populací, mezi populacemi v rámci daných skupin a mezi skupinami populací. AMOVA byla počítána pro všechny populace rozdělené do dvou skupin – podle příslušnosti k severovýchodu nebo jihozápadu Bílých Karpat. Dále byla AMOVA počítána zvláště pro skupiny populací z těchto dvou regionů. Výpočet byl proveden na základě podílu sdílených alel. Výpočty byly testovány 1023 permutacemi.

Pro každou populaci jsem spočítala počet polymorfních lokusů a počet unikátních alel. V programu SPAGeDi jsem provedla výpočty několika ukazatelů genetické diverzity pro populace – efektivní počet alel (NAe; number of effective alleles; Nielsen et al. 2003), očekávaný počet alel mezi k genovými kopiemi (AR ($k = x$); allelic richness), očekávaná heterozygotnost – genová diverzita s korekcí na velikost vzorku (He; expected heterozygosity; Nei 1978), pozorovaná heterozygotnost (Ho; observed heterozygosity), koeficient inbreedingu (Fi; individual inbreeding coefficient); počet permutací pro výpočet průkaznosti byl 10 000. Pomocí skriptu AFLPdat jsem spočítala DW index vzácnosti (down-weighted rarity index; Schönswetter & Tribsch 2005) pro všechny populace, který udává míru vzácných alel

v populaci (alely s nízkou frekvencí v celkovém datovém souboru). Pro hlavní skupiny populací ze severovýchodu a jihozápadu Bílých Karpat jsem spočítala tyto statistiky zvlášť a doplnila jsem navíc globální F_{ST} počítané v programu MSA (F_{ST} počítané také programem Arlequin). Ukazatele genetické diverzity pro populace – AR , Nae , He , Ho , Fi , DW index a *Unikátní alely* jsem použila jako vysvětlované proměnné, které budou vstupovat do dalších statistických analýz. Počet polymorfních lokusů, kvůli vysokému ovlivnění této potenciální proměnné počtem analyzovaných vzorků na populaci a – pokud tyto malé populace odebereme – nízké variabilitě proměnné, nebyl zahrnut jako další proměnná do těchto analýz. V programu SPAGeDi jsem také spočítala matici párových genetických vzdáleností F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) (Tab. P.1 v příloze).

1.12 Statistická analýza dat

1.12.1 Základní charakteristika jednotlivých datasetů a proměnných

V programu R verze 3.4.4 (R Core Team, 2017) jsem vytvořila několik modelů lineární regrese z několika podsouborů dat (s různým počtem pozorování n , tj. populací). Otázka totiž byla, zda do analýz zahrnovat i malé populace, zejména populace, které obsahovaly pouze jednoho jedince. Jejich ponechání v souboru může mít velký vliv na výsledek. Na druhou stranu, původní soubor, který zahrnoval všechny populace, obsahoval celkem 30 populací ($n = 30$), což není příliš velký počet pozorování pro statistické analýzy. Se snižujícím se počtem pozorování se snižuje i důvěryhodnost výsledků, obzvlášť při $n = 30$, kdy každé další odňaté pozorování může být pro důvěryhodnost výsledků klíčové. Proto je potřeba vyloučení malých populací pečlivě zvážit. Populace obsahující 1 jedince byly celkem tři – C9, C13, G2. Dalšími malými populacemi byly dvě populace o 3 jedincích – C4, G5 a jedna populace o 4 jedincích – C8. Populace C9 byla rovnou vyloučena, neboť obsahovala nulovou alelu, takže pro ni program SPAGeDi nedokázal spočítat statistiku (hodnoty vysvětlovaných proměnných u této populace nejsou k dispozici). Výchozí soubor tedy obsahoval 29 pozorování ($n = 29$). Pro tento soubor byly k dispozici vysvětlující proměnné: *Bilé Karpaty* (příslušnost populací k jihozápadní nebo severovýchodní oblasti Bílých Karpat), *Velikost vzorku* (počet jedinců v populaci použitý pro genetické analýzy), *Velikost populace* (počet jedinců v populaci) a proměnné spočítané pomocí GIS: *Buffer*, *Nadmořská výška*, *Sklon*, *TWI*, *TPI*, *DAHI*. Vytvořila jsem však i podsoubory, kde jsem postupně vyloučila ostatní populace o 1 jedinci ($n = 27$), o 3 jedincích ($n = 25$) a o 4 jedincích ($n = 24$), abych zjistila vliv těchto populací na výsledky.

Z vegetačních snímků jsem odvodila (neváženým průměrem) Elenbergovy indikační hodnoty upravené pro Českou republiku (Chytrý et al., 2018) a získala jsem tak vysvětlující proměnné: *Světlo*, *Teplota*, *Vlhkost*, *Půdní reakce*, *Živiny*. Vegetační snímky jsem však prováděla pouze pro některé populace (populace, které nejsou příliš malé a ty, u nichž jsem měla jistotu, že nebudou sloučeny, kvůli vzájemné vzdálenosti). Výsledný soubor, pro který jsem tedy měla k dispozici všechny vysvětlující proměnné (*Bílé Karpaty*, *Velikost vzorku*, *Velikost populace*, *Buffer*, *Nadmořská výška*, *Sklon*, *TWI*, *TPI*, *DAHI*, *Světlo*, *Teplota*, *Vlhkost*, *Půdní reakce*, *Živiny*) obsahoval celkem 22 populací ($n = 22$).

Pro každý z těchto souborů jsem nejprve provedla základní explorační analýzu dat. Všechny vysvětlující proměnné mají kontinuální charakter, kromě proměnné *Bílé Karpaty*, jež je faktorem o dvou hladinách. Provedla jsem transformaci vysvětlujících proměnných, které měly výrazně šikmé rozdělení. U všech podsouborů měly výrazně negativně šikmé rozdělení proměnné *Velikost populace* a *Buffer*. Byly proto vzhledem k jejich povaze logaritmičtě transformovány (k proměnné *Buffer* byla před logaritmičtější transformací přičtena jednička ke každé hodnotě kvůli výskytu nulových hodnot). Jiné transformace vysvětlujících proměnných nebyly potřeba. Dále jsem sledovala rozdělení všech vysvětlovaných proměnných, pro vhodný výběr metody analýzy dat. Vysvětlované proměnné *Nae*, *AR*, *Ho*, *He*, *Fi*, *DW index* měly normální Gaussovské rozdělení, vytvářela jsem tedy pro ně modely lineární regrese. Pro proměnnou *Počet unikátních alel*, která měla Poissonovské rozdělení jsem použila zobecněné lineární modely. Proměnná *AR* a *DW index* se číselně měnily v závislosti na daném podsouboru dat (je v nich obsažena informace, která zahrnuje výskyt alel v populacích, jejichž proporce se s odebíráním populací v celkovém datovém souboru mění), proto byly počítány zvlášť v programu SPAGeDi pro každý podsoubor pozorování (Tab. P.7 v příloze). Pro všechny vysvětlované proměnné jsem vytvořila korelační matici (Graf P.1 v příloze) a zjistila jsem, že spolu většinou poměrně hodně korelují ($> 0,8$). I přes toto zjištění jsem však zkoušela vytvořit pro každou z nich samostatný model. I když si byly modely většinou podobné signifikancí vysvětlujících proměnných, objevovaly se zde určité rozdíly, proto jsem se rozhodla použít modely se všemi vysvětlovanými proměnnými.

1.12.2 Výběr vysvětlujících proměnných

Před vytvořením modelu je nutné zamyslet se nad tím, které vysvětlující proměnné do něj mají vstupovat. Model obsahující prediktory, které mají v zásadě podobný charakter nebo se vyvíjí podobným směrem, může být zatížen tzv. multikolinearitou. Odhady koeficientů pak mohou být velmi citlivé na malé změny v modelu. Mohou se vychylovat na základě toho, jaké

další nezávislé proměnné jsou v modelu. Multikolinearita snižuje přesnost odhadovaných koeficientů, což oslabuje statistickou sílu regresního modelu. Projevuje se také na p -hodnotách, které jsou nedůvěryhodné a identifikace nezávislých proměnných, které jsou statisticky významné, je obtížná. Čím více jsou spolu vzájemně prediktory korelovány, tím vyšší je kolinearita (Hušek, 2007).

Ke zjištění vzájemných korelací prediktorů jsem vytvořila korelační matice. Pro zjištění síly multikolinearity (míry škodlivosti) jsem použila VIF (Variance inflation factor) pomocí funkce *vifstep*, balíček *usdm* (Naimi et al., 2014) pro každý soubor pozorování zvlášť (Tab. P.5 v příloze). Odstranění multikolinearity jsem provedla na základě VIF postupným odstraňováním vysvětlujících proměnných (opět pro každý soubor pozorování zvlášť) v několika krocích. Odstraněna byla vždy proměnná s nejvyšší hodnotou VIF, následně jsem tento krok opakovala znovu se zbývajících proměnnými, dokud nebyly všechny VIF hodnoty < 3 . Prediktory s hodnotami > 3 se považují za vysoce korelované (Zuur et al., 2010), proto jsem je do modelu nezahrnovala.

Jelikož u datasetu, kde vstupovaly jako prediktory i Elenbergovy indikační hodnoty ($n = 22$) na základě VIF nebyla automaticky vybrána proměnná *Bílé Karpaty* (je korelována s některými EIV), vytvořila jsem model, kde jsou *Bílé Karpaty* zahrnuty. Protože proměnná *Bílé Karpaty* nese informaci o příslušnosti populací k jihozápadnímu nebo k severovýchodnímu regionu Bílých Karpat, jde o hlavní komponentu struktury dat. Ostatní vysvětlující proměnné jsou variabilní uvnitř těchto regionů. I přesto však bylo třeba vypořádat se se škodlivou multikolinearitou. Při výběru prediktorů jsem postupovala stejným způsobem – odstraňovala jsem postupně proměnné s nejvyšším VIF. *Bílé Karpaty* jsem však ponechávala (i přes vyšší hodnoty VIF) tak dlouho s ostatními prediktory, dokud nevznikl soubor vysvětlovaných proměnných obsahující *Bílé Karpaty* s $VIF < 3$.

1.12.3 Postupný výběr proměnných, PCA a samostatné testování prediktorů

V dalším kroku jsem pomocí metody postupného výběru (*Stepwise*) hledala nejlepší možný model lineární regrese. Postupovala jsem metodou zpětnou (*Backward*), kdy jsem vytvořila nejprve model obsahující všechny testované prediktory ($VIF < 3$) a na základě nejnižší hodnoty AIC (*Akaike Information Criterion*) (Akaike, 1974) pomocí funkce *step* byl automaticky vybrán nejlepší možný model. Jde o nejjednodušší (nejúspornější) možný model s nejlepší schopností predikovat hodnoty vysvětlované proměnné (nejpřesnější). Splnění předpokladů modelů jsem zjišťovala pomocí diagnostických grafů. Tento postup jsem

opakovala pro všechny vysvětlované proměnné (*AR, Nae, He, Ho, Fi, DW index, Unikátní alely*), pro všechny podsoubory pozorování. Výsledné modely byly testovány *F*-testem.

Postupným výběrem proměnných však byly do modelů většinou zahrnuty více než 2–3 prediktory. Vzhledem k nízkému počtu pozorování ($n = 22\text{--}29$) proto model může být tzv. „overfitovaný“ (nedá se věřit *p*-hodnotám). Provedla jsem proto PCA (Principal Component Analysis) všech používaných prediktorů (na datasetu s 22 pozorováními) a sestavila jsem modely, do nichž vstupují jako prediktory skóry prvních dvou os (PC1 a PC2) vzniklé PCA. Výsledné modely jsem testovala *F*-testem. Interpretovatelnost výsledků je sice trochu obtížnější, výhodou však je, že PCA umožní porovnat v podstatě všechny experimentálně vybrané prediktory najednou, aniž by se v modelu musely řešit jejich korelace.

Nakonec jsem provedla testování každého prediktoru samostatně (*F*-testem) pro každou vysvětlovanou proměnnou zvlášť (pro soubor s 22 pozorováními). I když je tento postup nesprávný, protože dochází k opakovanému testování, umožní to porovnávat jednotlivé prediktory mezi sebou.

2 Výsledky

2.1 Výskyt populací

Převážná většina ploch v severovýchodní oblasti Bílých Karpat s výskytem *C. glomerata* se objevovala spíše na loukách, které byly loukami i před 60–70 lety. Provést srovnání genetické diverzity populací *C. glomerata* na starých a nových loukách a studovat jejich genetickou strukturu ve spojení s kolonizací tedy nebylo možné. Z dostupných starých leteckých snímků bylo u některých ploch obtížné s jistotou rozhodnout, zda se v minulosti jednalo o louku či pole (Obr. P.1 – P.5 v příloze). Na snímcích se totiž vyskytují plochy s různým stupněm šedi. Například u některých ploch bychom podle stupně šedi a struktury usuzovali, že by daná plocha mohla být polem, u jiné plochy ale vidíme stejný odstín a strukturu, avšak zároveň hustě vysazený sad, takže bychom naopak řekli, že tato plocha byla loukou. Nicméně díky informacím od místních obyvatel a firmy Javorník s.r.o., která obhospodařuje velkou část ploch v severovýchodní zájmové oblasti, bylo možné nedávnou historii managementu těchto ploch ověřit.

V severovýchodním regionu v okolí Štítné nad Vláří a Jestřabí, jak lze vidět i na snímcích z minulosti (z padesátých let), byla krajina intenzivně hospodářsky využívána (Obr. P.1 – P.5 v příloze). Jednotlivé plochy obhospodařovali různí majitelé a krajina byla složena převážně z úzkých dlouhých fragmentů jednotlivých políček či luk, které se vzájemně střídaly. Populace se zde tedy vyskytovaly převážně na loukách, které se v minulosti příliš nezměnily. Často se jednalo o louky hůře přístupné (louka s vysokým sklonem svahu, mýtinka obklopená stromy). *C. glomerata* se však také často vyskytovala na okraji luk a polí, na jejich rozhraní blízko křoví nebo v lemu lesa (ekologicky však na výslunných stanovištích). V jihozápadním regionu se tento trend také objevoval, avšak charakter luk v místě výskytu populací (Čertoryje, Zahrady pod Hájem) je a v minulosti byl mnohem více otevřený, louky byly větší nebo navzájem propojené. Dle seznamu potenciálně se vyskytujících druhů v daných oblastech i podle provedených vegetačních snímků (seznam druhů z obou oblastí v Tab. P.3 v příloze) byla jihozápadní oblast druhově bohatší než severovýchodní, jak je ostatně známo (Otýpková et al., 2011).

2.2 Mikrosatelitové markery

Výsledkem testování 50 nově vyvinutých mikrosatelitových markerů pro druh *C. glomerata* (značené Cgm) a 34 mikrosatelitových markerů, které byly vyvinuty a použity ve

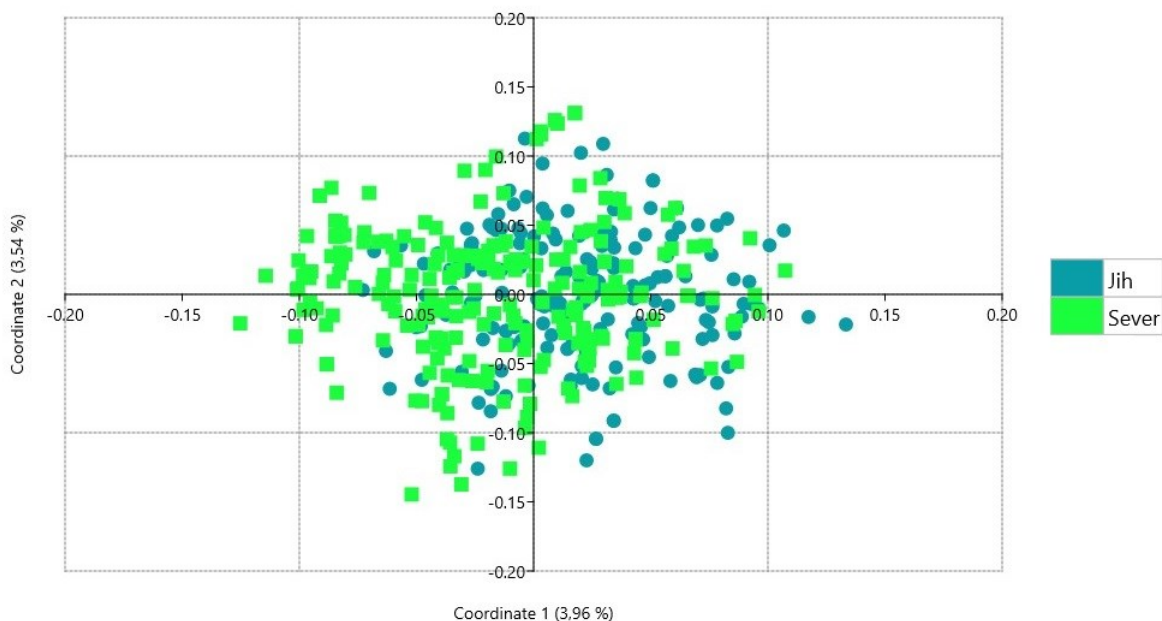
studiích příbuzných druhů rodu *Campanula* (8 primerů ze studie *C. thyrsoides*, značené Camphy; 15 primerů ze studie *C. scheuchzeri*, značené Scheuch; 11 primerů ze studie *C. pyramidalis*, značené CpUZ) jsou 3 multiplexové PCR (MM I, MM II, MM III) obsahující celkem 19 mikrosatelitových markerů. Z toho dohromady 14 markerů pochází z nově vyvinutých pro *C. glomerata* (Cgm2, Cgm7, Cgm12, Cgm16, Cgm17, Cgm23, Cgm27, Cgm33, Cgm35, Cgm38, Cgm39, Cgm41, Cgm42, Cgm45), celkem 4 markery pochází ze studie *C. thyrsoides* (Camphy1, Camphy3, Camphy5, Camphy6) a pouze 1 marker ze studie *C. pyramidalis* (CpUZ001). Z celkového počtu 19 markerů jsem použila 16 markerů pro genetické analýzy výsledných 425 vzorků *C. glomerata*. Lokusy Cgm33, Camphy5 a Cgm38 vzhledem k nestabilním amplifikacím nebylo možné skórovat, byly však součástí multiplexů. Délkový rozsah jednotlivých lokusů byl v rozmezí 113 bp – 213 bp, počet alel u jednotlivých lokusů byl 3–29, G'_{ST} počítaný pro jednotlivé lokusy byl v rozmezí od 0,05 do 0,71.

Multiplex	Lokus	Fluorescenční značení	Motiv	Sekvence forward (F) a reverse (R) primeru	Délkové rozmezí (bp)	Počet alel	G'_{ST}
MM I	CpUZ001	PET	(ACT)8	F: AAGTATTGGACCCCGAGCTT R: ATCACCTAGCCATGCAATC	133 - 142	3	0,05
	Camphy1	VIC	(CA)16	F: CTGCTAGGCTATGCGAGTGTTT R: TCTGAATTTGTTGAGAATCTTTTTG	132 - 154	12	0,52
	Cgm33*	PET	(AAAT)6	F: TGTGTCATTTCTTATCAAGCTTCAA R: TGTACAATGAGGTCATGGGCT	-	-	-
	Cgm45	PET	(ATC)5	F: GCAACTGGATTCTGCTATCGG R: TGTTTCATGTCTTACCATTCTCCA	294 - 312	7	0,07
MM II	Camphy5*	PET	(GT)20	F: CCAGCGACGCTTAGTATTATTGT R: CAAATATAAGGGGAAGTTACTTATCA	-	-	-
	Cgm2	6FAM	(AAC)6	F: CGGTAGCCTGTTTCATCAGCA R: AGTTTAGTTAGGCTTAGAAGATCAGC	115 - 127	5	0,24
	Camphy3	VIC	(CA)13	F: AAAGTTTGATTCCAAGGTGCTC R: AAAATAATCCAGGGACGGAGT	113 - 135	12	0,27
	Camphy6	PET	(CA)17	F: ACAACCTCGAACCAATTTTTCAG R: CAATTGGGGTCTAACCAATTCAC	135 - 175	20	0,67
	Cgm16	NED	(AAAT)5	F: ACAGTAGTTTATTGTTCCAATCCG R: CTTTCGATTCATGTGGAGCGC	169 - 181	5	0,06
	Cgm23	6FAM	(AAG)21	F: CGATCTCGCTATTTCAAACATGG R: CCACGACCTTGAGGCCTAAT	151 - 235	29	0,81
	Cgm35	6FAM	(AAG)5	F: TCAATCACACCAAGCCAGGT R: AGGAGTTTCGGAATCATGAAATTTGT	241 - 259	7	0,26
	Cgm42	VIC	(AAC)7	F: AACGGCGAGGTTGTAGAGAAA R: CGTCGTTAGGCCACTGAGTT	269 - 296	10	0,33
MM III	Cgm7	6FAM	(AAG)6	F: AGATGGTTGAGCGAGGGTTT R: GCTGCTGCAATGGTAACCTG	124 - 136	5	0,23
	Cgm12	VIC	(AAG)5	F: TCGATTCTTGATTTGGGTGACG R: TGGCTGATCTTTCCAAGAAGGT	156 - 165	4	0,13
	Cgm17	6FAM	(AAAG)11	F: TCCTCTGTCCCATGTTTGGA R: TGGACATTCGTTTAGAGATGGATG	155 - 231	20	0,71
	Cgm27	PET	(ACC)6	F: GTAGCTTCCACTTAAACGCGG R: AGTGTAACCTAGAGGACCACATTT	216 - 243	10	0,29
	Cgm38*	VIC	(AGG)6	F: TGCTCGCTCTTGAACCTCGAA R: CCATGCATGCATCCTCACCA	-	-	-
	Cgm39	NED	(AAAC)6	F: CAGCATCCAAGCAAGTGGC R: AGACCCATGGTTGGCAATGA	244 - 272	9	0,28
	Cgm41	6FAM	(ACTG)6	F: ACTTACGACCATCTTTCATGACA R: TCCTAAGACGCTTTGCACCA	259 - 291	9	0,41

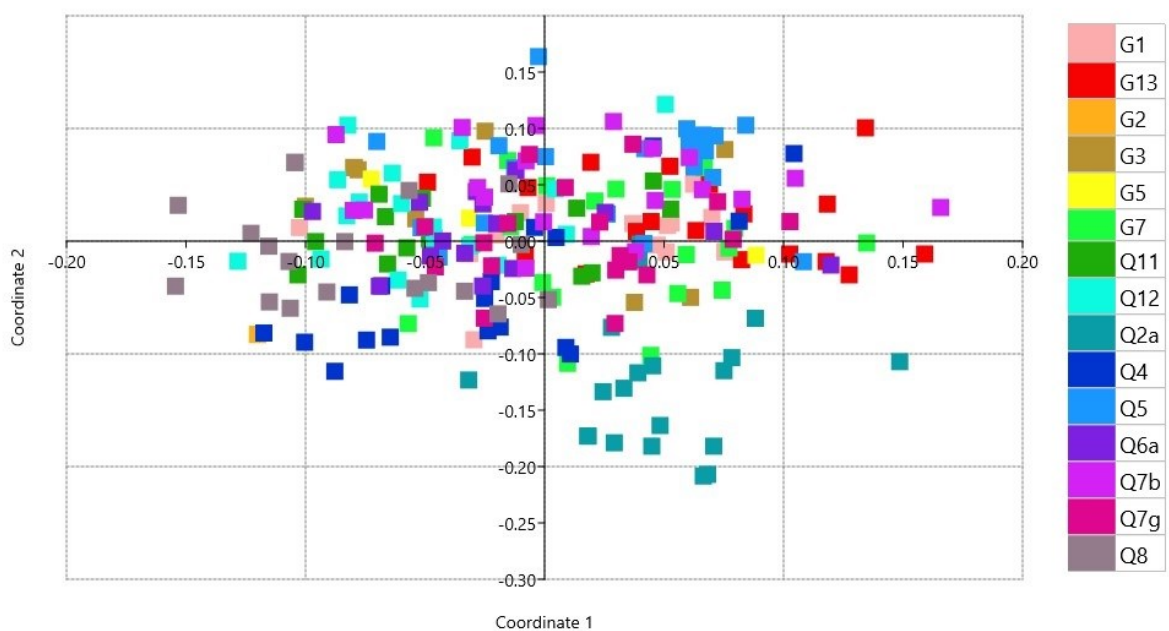
Tab. 2.1 Mikrosatelitové markery rozdělené do jednotlivých multiplexů (MM I, MM II a MM III). V tabulce jsou uvedeny zleva: názvy jednotlivých lokusů, fluorescenční barvy použité pro fragmentační analýzy, motiv repetitivní sekvence, sekvence forward (F) a reverse (R) primerů ohraničující repetitivní sekvence, délkové rozmezí markerů v datasetu, počet nalezených alel pro každý lokus a G'_{ST} . Lokusy označené * – Cgm33, Camphy5 a Cgm38 byly součástí multiplexů, nebyly však skórovány.

2.3 Rozlišení skupin na základě analýzy hlavních koordinát (PCoA)

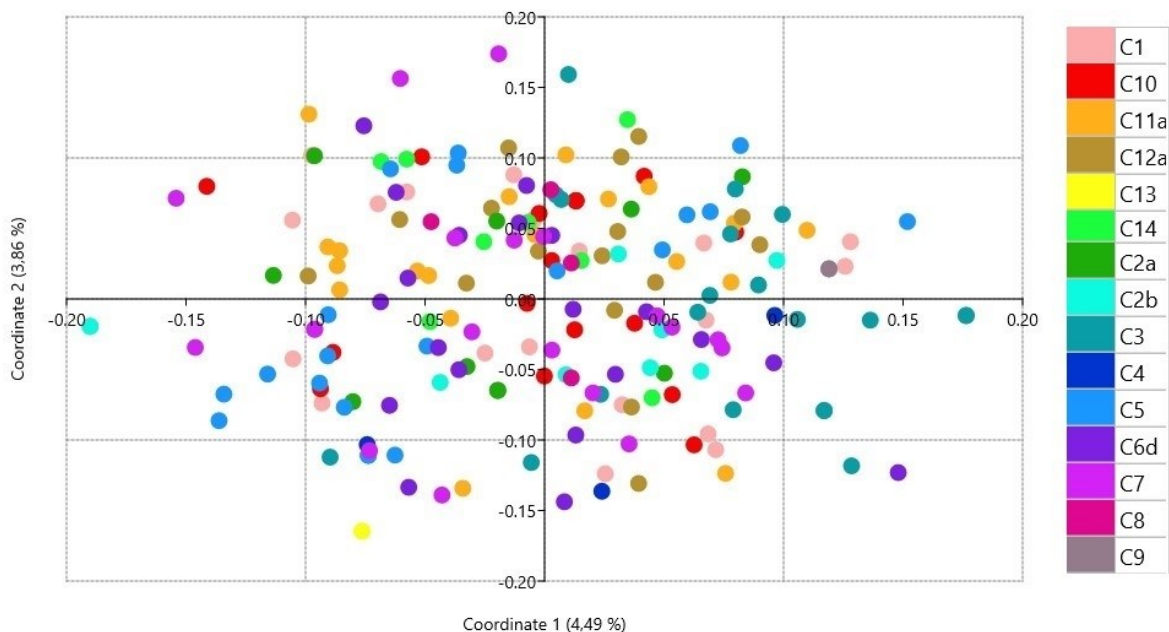
Analýza hlavních koordinát (PCoA) neukázala silné odlišení dvou hlavních skupin populací – ze severovýchodu a jihozápadu Bílých Karpat. Rozlišení těchto skupin je pouze mírně naznačené. Variabilita vysvětlená osami (3,96 % a 3,54 %) je však mizivá (Graf 2.1). Analýza jednotlivých oblastí odděleně (severovýchodu a jihozápadu zvlášť) neukázala ani jasné odlišení jednotlivých populací. Variabilita vysvětlená osami je sice v obou případech o něco vyšší, stále však velice nízká. Mezi skupinami populací ze severovýchodu a jihozápadu však nalezneme nepatrný rozdíl. Zatímco u populací z jihozápadu (Graf 2.3) vskutku nevidíme žádné oddělené shluky v ordinačním diagramu a populace jsou zde přibližně rovnoměrně rozprostřeny (variabilita vysvětlená osami je 4,49 % a 3,86 %), u populací ze severovýchodu (Graf 2.2) vidíme zřetelné oddělení jediné populace Q2a od ostatních poměrně pravidelně rozložených populací v prostoru, a kromě toho lze postřehnout, utvoření jednotlivých slabě oddělených shluků populace Q12 a Q8 (variabilita vysvětlená osami je 4,80 % a 4,43 %).



Graf 2.1 Analýza PCoA jedinců ze dvou hlavních oblastí – severovýchodu (světle zelené čtverce) a jihozápadu (tmavě zelené body) Bílých Karpat. První osa vysvětluje 3,96 % variability, druhá osa vysvětluje 3,54 % variability. Populace ze severovýchodu a jihozápadu se oddělují jen velmi nepatrně.



Graf 2.2 Analýza PCoA všech populací ze severovýchodu Bílých Karpat. První osa vysvětluje 4,80 % variability, druhá osa vysvětluje 4,43 % variability. Z analýzy je patrné oddělení populace Q2a podél první i druhé osy a nepatrné oddělení populace Q8 a Q12 podél první osy.

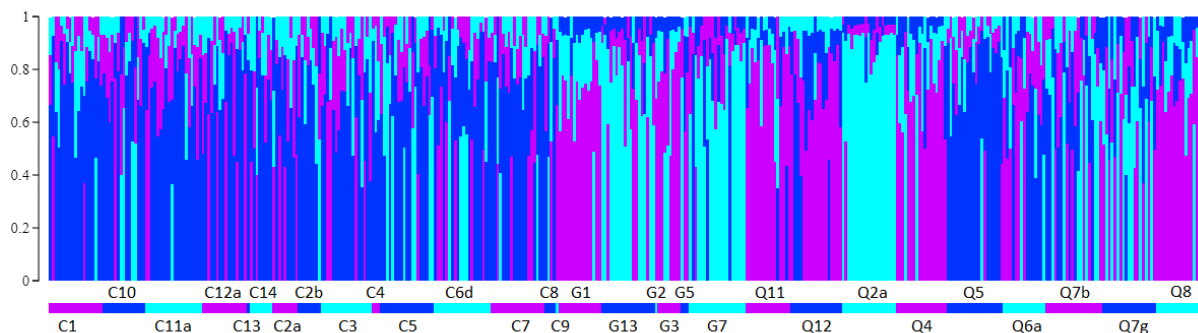


Graf 2.3 Analýza PCoA všech populací z jihozápadu Bílých Karpat. První osa vysvětluje 4,49 % variability, druhá osa vysvětluje 3,86 % variability. Z analýzy není patrné odlišení žádné z populací.

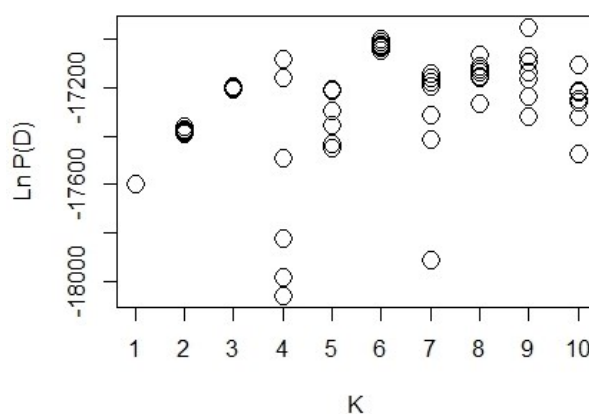
2.4 Rozdělení do skupin dle programu STRUCTURE

Analýza v programu STRUCTURE ukázala jako nejlepší rozdělení jedinců do tří genetických skupin. Optimální počet skupin (K) jsem zvolila na základě tří výstupů, které jsem získala pomocí skriptu STRUCTURE-sum-2009 v programu R. Prvním výstupem je logaritmus věrohodnosti modelu LnP (D) pro daná K (Graf 2.5), kde se nejlepší K volí na základě nejvyšší hodnoty věrohodnosti a současně míry podobnosti mezi jednotlivými výpočty běhů programu (typicky v bodě, kde se křivka láme do vodorovné polohy). Čím vyšší je podobnost mezi jednotlivými výpočty programu, tím stabilnější je výsledek a vyšší pravděpodobnost rozdělení do daného počtu skupin. Takové K nalezneme u rozdělení jedinců do tří skupin ($K = 3$). Druhým výstupem je koeficient podobnosti (similarity koeficient) jednotlivých párů běhů pro dané K (Graf 2.6). Zde se nejlepší K vybírá na základě nejvyššího koeficientu podobnosti a současně nejmenší směrodatné odchylky. Pro tento výstup se jeví jako nejlepší rozdělení jedinců do dvou a tří skupin, tj. pro $K = 2$ a $K = 3$. V posledním výstupu je nejdůležitější sledovat rozdělení do skupin na základě nejvyššího ΔK (Graf 2.7 – Graf D), kde se ukazuje jako nejlepší opět rozdělení do tří skupin ($K = 3$).

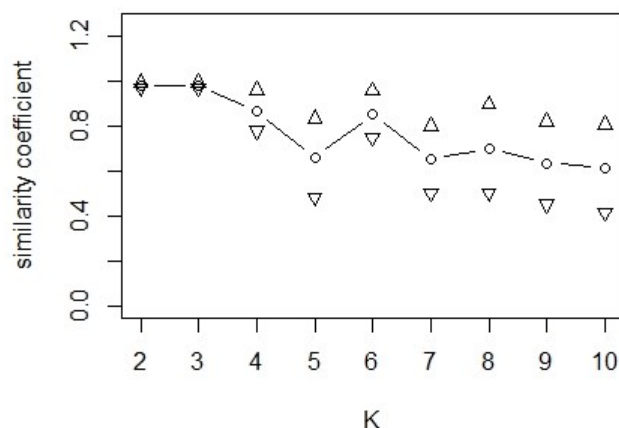
Rozdělení jedinců do genetických skupin však není jednoznačné, jak ukazuje graf vykreslený na základě pravděpodobnosti příslušnosti jedinců do tří genetických skupin (Graf 2.4). Asi 80 % pravděpodobnosti příslušnosti k dané barvě se dá považovat za skutečnou příslušnost k existující genetické skupině. Z grafu je viditelné, že část jedinců sdílí barvy více skupin a někteří se vymykají barvě převažující v dané populaci. Odlišení jednotlivých populací proto není zřetelné. Přesto však, lze vidět tendenci všech populací z jihozápadu Bílých Karpat – C1, C10, C11a, C12a, C13, C14, C2a, C2b, C3, C4, C5, C6d, C7, C8, C9 – sdílení převažující tmavě modré barvy, což značí příslušnost k jedné genetické skupině. Mnoho jedinců však této skupině neodpovídá. Naproti tomu u populací ze severovýchodu Bílých Karpat – G1, G13, G2, G3, G5, G7, Q11, Q12, Q2a, Q4, Q5, Q6a, Q7b, Q7g, Q8 – převažují v populacích různé barvy. Populace G13, G7 a Q2a sdílí převážně světle modrou barvu, zatímco populace G1, Q11, Q12, Q4 a Q8 mají převažující barvu fialovou. U populace Q5 převažuje opět tmavě modrá barva. Sousední populace Q6a je barevně promíchaná, podíl tmavě modré zde však má také vysoké zastoupení. Populace Q7b a Q7g nejsou nijak odlišeny, barvy jsou zde rovnoměrněji zastoupeny. Populace G2, G3 a G5 u kterých je k dispozici nižší počet jedinců, převažuje spíše fialová barva. Tyto pravděpodobnosti v podobě zastoupení jednotlivých barev u všech populací si můžeme lépe prohlédnout na koláčových grafech níže v mapách vytvořených zvlášť pro severovýchodní a jihozápadní oblast Bílých Karpat (Obr. 2.1 a Obr. 2.2).



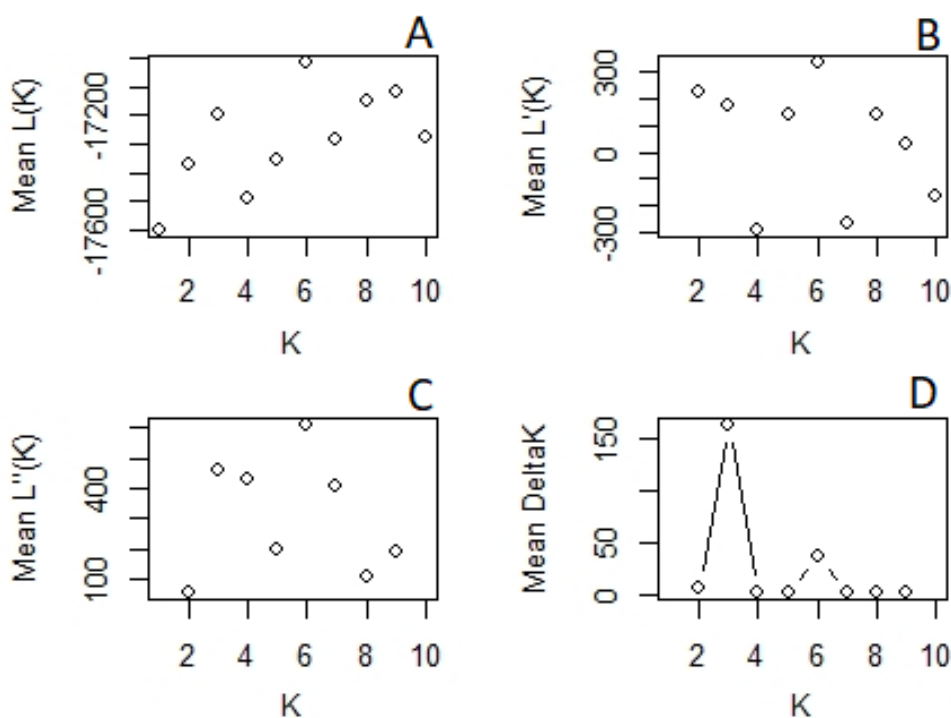
Graf 2.4 Grafický výstup z programu STRUCTURE vytvořený pomocí Structure Plot v 2.0. ukazuje vymezení jedinců do tří skupin na základě genetické podobnosti. Jednotlivé populace jsou vyčleněny legendou pod grafem. Každá populace je tvořena úzkými sloupečky, které představují její jedince. Poměr barev ve sloupečku podél svislé osy odpovídá pravděpodobnostem příslušnosti jedince do daných barevně odlišených genetických skupin. Populace první poloviny grafu (zleva) označeny písmenem C jsou populace náležící k jihozápadnímu regionu Bílých Karpat, populace druhé poloviny grafu označeny písmeny G a Q náležejí k severovýchodnímu regionu Bílých Karpat.



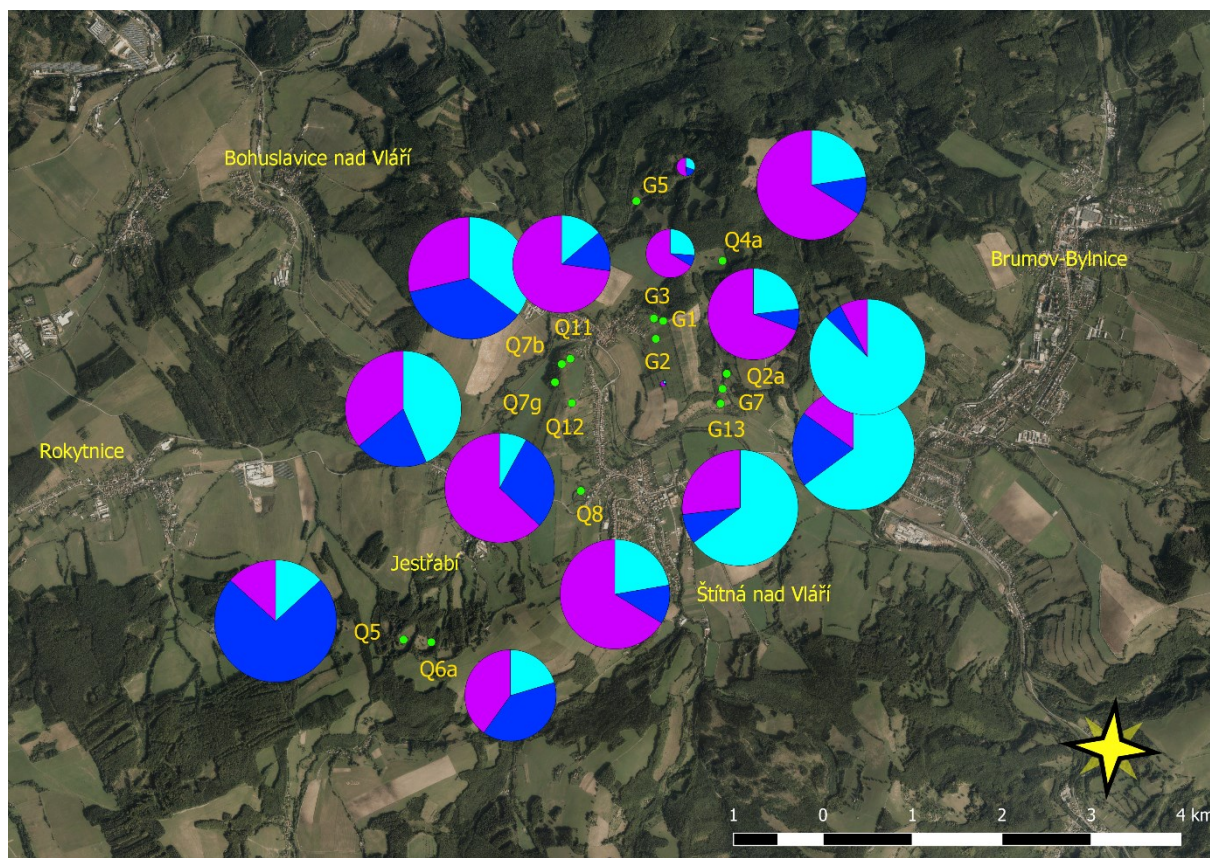
Graf 2.5 Podobnost jednotlivých běhů programu STRUCTURE vytvořené pomocí skriptu STRUCTURE-sum-2009 v programu R pro jednotlivé počty shluků K . Algoritmus s určeným počtem shluků K , běžel pro každé K 10×. Byla použita datová matice s odstraněnými klony. Graf ukazuje logaritmus pravděpodobnosti modelu (svislá osa) a optimálního rozdělení do daného počtu skupin K (vodorovná osa). Nejstabilnější výstup je pro $K = 3$, tj. rozdělení do tří skupin.



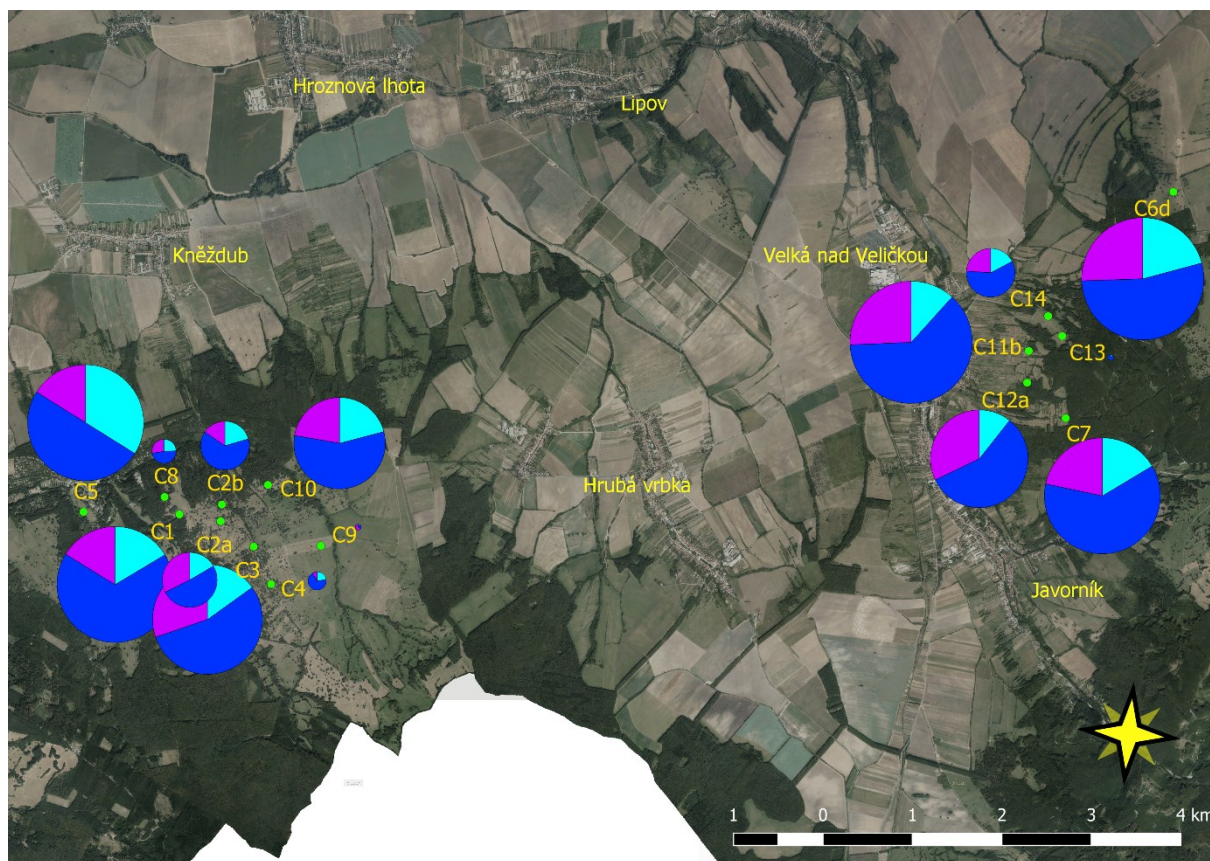
Graf 2.6 Koeficient podobnosti mezi jednotlivými páry běhů programu STRUCTURE vytvořené pomocí skriptu STRUCTURE-sum-2009 v programu R pro jednotlivé počty shluků K . Algoritmus s určeným počtem shluků K , běžel pro každé K $10\times$. Byla použita datová matice s odstraněnými klony. Graf ukazuje průměrný koeficient podobnosti se směrodatnou odchylkou (svislá osa) mezi jednotlivými páry běhů programu pro jednotlivé počty shluků K (vodorovná osa). Nejlépe vychází $K = 2$, $K = 3$, tj. rozdělení do dvou a tří shluků.



Graf 2.7 Výstupy programu STRUCTURE vytvořené pomocí skriptu STRUCTURE-sum v programu R pro jednotlivé počty shluků (K). Algoritmus s určeným počtem shluků K , běžel pro každé K $10\times$. Byla použita datová matice s odstraněnými klony. **Graf A** ukazuje průměrné hodnoty (pro 10 běhů výpočtu) logaritmu pravděpodobnosti modelu optimálního rozdělení (svislá osa) do daného počtu skupin K (vodorovná osa). **Graf B** ukazuje průměrnou míru změny pravděpodobnosti mezi výpočty se dvěma různými počty skupin K . **Graf C** ukazuje míru změny mezi dvěma páry běhů programu (tzn. mezi dvěma body grafu B). **Graf D** ukazuje ΔK vypočítané jako průměr absolutních hodnot z grafu C pro všechny běhy programu pro dané K . Nejlepší se jeví rozdělení jedinců do tří skupin, $K = 3$, zejména dle nejvyšší hodnoty ΔK .



Obr. 2.1 Mapa severovýchodní oblasti Bílých Karpat, která představuje pravděpodobnosti genetických skupin (daná podílem jednotlivých barev) u všech populací. Velikost grafů reprezentuje počet jedinců odebraných pro genetické analýzy. Z grafů je patrné, že sdílení jednotlivých barev je u různých populací odlišné i přes poměrně nízkou geografickou vzdálenost. Nejlépe se vylišuje populace Q2a, která je blízká populacím G7 a G13 jak vzdáleností, tak sdílením převažující světle modré barvy. Poměrně dobře se odděluje také populace Q5, která je od ostatních nejvzdálenější a podle majoritního zastoupení tmavě modré barvy by měla být více příbuzná populacím z jihozápadu, ke kterým má i vzdáleností nejbližší ze všech populací na severovýchodě. Tato vzdálenost je však řádově větší než její vzdálenost k sousedním severovýchodním populacím, zejména k její nejbližší populaci Q6a, která je barevně odlišná a nepřevládá zde důvěryhodně žádná z barev (stejně jako u populací Q7b a Q7g). U ostatních populací je převažující fialová barva.



Ob. 2.2 Mapa jihozápadní oblasti Bílých Karpat, která představuje pravděpodobnosti genetických skupin (daná podílem jednotlivých barev) u všech populací. Velikost grafů reprezentuje počet jedinců odebraných pro genetické analýzy. Z grafů je patrné převládání jediné barvy (tmavě modré) pro všechny populace z jihozápadu, což představuje příslušnost do jediné genetické skupiny i přes poměrně značnou vzdálenost populací pocházejících z Čertoryjí (vlevo) a populací pocházejících ze Zahrad pod Hájem a Búrové (vpravo).

2.5 Analýza molekulární variance (AMOVA)

Analýza molekulární variance (AMOVA) byla počítána metodou F_{ST} -like (podílem shodných alel) pomocí programu Arlequin. AMOVA byla počítána nejprve pro všechny populace v rámci dvou hlavních skupin – severovýchodu a jihozápadu Bílých Karpat (Tab. 2.2). Na všech hierarchických úrovních se ukázala signifikantní genetická diferenciace, avšak pouze necelé 1 % variability vysvětluje příslušnost jedinců do jedné ze dvou hlavních skupin a 5,3 % variability vysvětluje příslušnost jedinců k dané populaci. Naprostá většina vysvětlené variability – 93,8 % spadá na rozdíl mezi jedinci. Nízký stupeň fixačního indexu $F_{ST} = 0,06$, znamená slabé fixování alel a celkově nízkou míru genetické diferenciace.

AMOVA byla počítána také pro každou skupinu populací ze severovýchodní a jihozápadní oblasti Bílých Karpat zvlášť. V severovýchodní oblasti vysvětluje rozdíl mezi populacemi 8,2 % variability a rozdíl jedinců v rámci populací 91,8 % variability (Tab. 2.3), zatímco v jihozápadní oblasti vysvětluje rozdíl mezi populacemi jen 1,8 % variability

a odlišnost jedinců v rámci populací zbývajících 98,2 % (Tab. 2.4). Genetická diference populací na severovýchodě je dle vyššího fixačního indexu o něco vyšší ($F_{ST} = 0,08$) než na jihozápadě ($F_{ST} = 0,02$).

Zdroj variability	d. f.	Suma čtverců	Variabilita komponent	% variability
Mezi skupinami	1	30,58	0,04 Va	0,93
Mezi populacemi	28	307,47	0,24 Vb	5,28
Mezi jedinci	820	3504,06	4,27 Vc	93,78
Celkem	849	3842,11	4,56	

Tab. 2.2 Tříúrovňová AMOVA celého datasetu obsahující všechny populace rozdělené do dvou skupin počítaná programem Arlequin ver 3.5.2.2. Tabulka udává % vysvětlené variability mezi skupinami (0,93 %), mezi populacemi v rámci celého datasetu (5,28 %) a mezi jedinci v rámci populace (93,78 %). F -statistiky pro jednotlivé hierarchické úrovně: $F_{CT} = 0,01$, $p < 0,001$; $F_{SC} = 0,02$, $p < 0,001$; $F_{ST} = 0,06$, $p < 0,001$; počet permutací pro výpočty signifikancí na všech úrovních = 1023.

Zdroj variability	d. f.	Suma čtverců	Variabilita komponent	% variability
Mezi populacemi	14	214,97	0,36 Va	8,20
Mezi jedinci	455	1852,87	4,07 Vb	91,80
Celkem	469	2067,84	4,44	

Tab. 2.3 Dvouúrovňová AMOVA datasetu obsahující všechny populace ze severovýchodní oblasti Bílých Karpat počítaná programem Arlequin ver 3.5.2.2. Tabulka udává % vysvětlené variability mezi populacemi (8,20 %) a mezi jedinci v rámci populace (91,80 %). $F_{ST} = 0,08$, $p < 0,001$, počet permutací pro výpočet signifikance = 1023.

Zdroj variability	d. f.	Suma čtverců	Variabilita komponent	% variability
Mezi populacemi	14	92,50	0,08 Va	1,83
Mezi jedinci	365	1651,20	4,52 Vb	98,17
Celkem	379	1743,70	4,61	

Tab. 2.4 Dvouúrovňová AMOVA datasetu obsahující všechny populace z jihozápadní oblasti Bílých Karpat počítaná programem Arlequin ver 3.5.2.2. Tabulka udává % vysvětlené variability mezi populacemi (1,83 %) a mezi jedinci v rámci populace (98,17 %). $F_{ST} = 0,02$, $p < 0,001$, počet permutací pro výpočet signifikance = 1023.

2.6 Genetické vlastnosti populací

Populace	Počet jedinců	NAe	AR(k=2)	He	Ho	Fi	DW index	Počet unikátních alel	Počet polymorfních lokusů
C1	20	4,62	1,57	0,57	0,60	-0,05	0,51	3	16
C10	17	4,16	1,58	0,58	0,60	-0,02	0,48	0	16
C11a	20	3,78	1,57	0,57	0,53	0,06	0,53	0	16
C12a	16	4,20	1,57	0,57	0,54	0,06	0,44	1	16
C13	1	1,00	1,56	0,56	0,56	-	0,25	0	9
C14	8	4,60	1,59	0,59	0,58	0,03	0,51	0	16
C2a	10	4,39	1,58	0,58	0,55	0,05	0,36	0	16
C2b	10	3,68	1,54	0,54	0,53	0,01	0,40	1	14
C3	20	3,59	1,52	0,52	0,52	0,00	0,35	0	14
C4	3	3,05	1,57	0,57	0,54	0,06	0,35	0	14
C5	20	3,97	1,57	0,57	0,54	0,07	0,45	0	16
C6d	20	5,16	1,59	0,59	0,56	0,06	0,51	0	16
C7	20	4,21	1,56	0,56	0,53	0,05	0,49	2	16
C8	4	4,06	1,57	0,57	0,64	-0,13	0,27	2	13
C9	1	-	-	-	-	-	0,29	0	7
G1	18	2,63	1,44	0,44	0,46	-0,05	0,24	0	12
G13	19	3,02	1,49	0,49	0,48	0,02	0,35	1	15
G2	1	1,00	1,69	0,69	0,69	-	0,36	0	11
G3	9	2,50	1,48	0,48	0,49	-0,02	0,30	0	14
G5	3	2,56	1,56	0,56	0,58	-0,06	0,35	0	16
G7	20	2,96	1,52	0,52	0,53	-0,01	0,28	0	14
Q11	16	3,45	1,52	0,52	0,55	-0,05	0,30	0	14
Q12	18	3,43	1,52	0,52	0,50	0,03	0,32	0	14
Q2a	20	2,02	1,39	0,39	0,35	0,11	0,18	0	13
Q4	18	3,27	1,51	0,51	0,50	0,02	0,37	0	16
Q5	20	3,77	1,58	0,58	0,56	0,04	0,38	2	16
Q6a	15	3,97	1,56	0,56	0,56	0,00	0,40	2	15
Q7b	20	4,34	1,53	0,53	0,55	-0,03	0,45	1	16
Q7g	19	3,51	1,53	0,53	0,48	0,10	0,37	1	14
Q8	19	3,09	1,53	0,53	0,54	0,00	0,45	2	14

Tab. 2.5 Genetické charakteristiky všech 30 populací. Populace označeny písmenem C jsou z jihozápadní části, populace označeny písmeny G a Q jsou ze severovýchodní části Bílých Karpat. Tabulka udává počet jedinců odebraných pro genetické analýzy (velikost vzorku) z jednotlivých populací, počet efektivních alel (NAe), očekávaný počet alel mezi dvěma genovými kopiemi ($AR(k=2)$), očekávanou heterozygotitu (He), pozorovanou heterozygotitu (Ho), individuální koeficient inbreedingu (Fi), DW index, počet unikátních alel pro danou populaci a počet polymorfních lokusů. Pro populace obsahující jediného jedince (C13, C9, G3) nebyl spočítán Fi, pro populaci C9 nebyly spočítány ani ostatní statistiky kvůli výskytu nulové alely.

Pro všechny populace samostatně (Tab. 2.5) a pro skupiny populací ze dvou hlavních regionů studované oblasti (severovýchod a jihozápad Bílých Karpat; Tab. 2.6) jsem spočítala několik ukazatelů genetické diverzity jako je počet efektivních alel (NAe), očekávaný počet alel mezi dvěma genovými kopiemi ($AR(k=2)$), očekávanou heterozygotitu (He), pozorovanou heterozygotitu (Ho), individuální koeficient inbreedingu (Fi), DW index, počet unikátních alel a pro oba regiony zvlášť navíc globální F_{ST} (viz kapitola 2.5). Z Tab. 2.6 vidíme, že hodnoty alelické i genetické diverzity (NAe, $AR(k=2)$, He, Ho) populací ze

severovýchodního regionu jsou nižší než v jihozápadním regionu. Vyskytuje se zde i nižší počet unikátních alel, což odráží nižší hodnoty DW indexu. Tyto rozdíly jsou průkazné, zatímco koeficient inbreedingu se mezi regiony průkazně neliší.

Bílé karpáty	Počet jedinců	NAe	AR (k=2)	He	Ho	Fi	DW index	Unikátní alely	Fst
Severovýchod	235	4,32	1,55	0,55	0,50	0,09	0,58	11	0,08
Jihozápad	190	4,69	1,58	0,58	0,55	0,04	0,75	24	0,02

Tab. 2.6 Genetické charakteristiky severovýchodní a jihozápadní oblasti Bílých Karpat. Tabulka udává počet jedinců odebraných pro genetické analýzy (velikost vzorku) z dané oblasti, počet efektivních alel (NAe), očekávaný počet alel mezi dvěma genovými kopiemi (AR ($k = 2$)), očekávanou heterozygotitu (He), pozorovanou heterozygotitu (Ho), individuální koeficient inbreedingu (Fi), DW index, počet unikátních alel pro celou oblast, globální F_{ST} .

2.7 Vliv vybraných prediktorů na genetickou diverzitu

2.7.1 Charakteristika proměnných

V zájmovém území bylo nalezeno celkem 30 populací *Campanula glomerata*, z toho 15 populací v jihozápadním regionu a 15 populací v severovýchodním regionu Bílých Karpat. Největší populace obsahovala 340 jedinců, nejmenší 1 jedince. Počet vzorků odebraných z populace kolísá podle velikosti populace – v malých populacích byly odebrány vzorky od všech jedinců, ve velkých populacích bylo odebráno 20–30 vzorků, z nichž 20 bylo použito pro genetické analýzy, zbylé vzorky sloužily jako rezerva. Z některých vzorků však nebylo možné izolovat dostatečné množství DNA (i při opakovaném pokusu) nebo byly z analýz vyřazeny z jiných důvodů (nebylo možné odečítat alely – např. PCR produkt se neamplifikoval – i po opakovaných pokusech) a byly nahrazeny vzorky rezervními. U malých populací však rezervní vzorky nebyly k dispozici, takže velikost vzorku vždy neodpovídá přesně velikosti populace, stejně jako u větších populací, kde se nepodařilo vždy nahradit všechny chybějící jedince. Počet jedinců v bufferu 500 m (bez jedinců dané populace) byl od 0 do 505. Populace se nacházely v nadmořské výšce od 300 m do 504 m. Sklon se pohyboval v rozmezí od 0,81 ° do 14,85 °. Topografic wetness index (TWI) byl v rozmezí hodnot od 9,99 do 15,83, Topografic position index (TPI) byl od -1,3 do 1,74, Diurnal anisotropic heating index (DAHI) od -0,16 do 0,23 (viz Tab. P.2 v příloze).

Pro celkem 22 populací byly odvozeny Elenbergovy indikační hodnoty z vegetačních snímků o rozměrech 3 × 3 m. Počet druhů ve vegetačních snímcích byl od 28 do 52, průměr byl 38. Průměrně 4 druhy jsem neurčila do druhu (například druhy ve vegetativním stádiu rodu

Festuca nebo *Carex*), takže průměrný počet druhů, z něhož byly odvozeny Elenbergovy indikační hodnoty byl 34 (seznam druhů ve vegetačních snímcích v Tab. P.3 v příloze). Rozsah hodnot pro světlo byl od 6,48 do 7,21, pro teplotu od 5,29 do 5,91, pro vlhkost od 4,05 do 4,78, pro půdní reakci od 6,37 do 7,13 a pro živiny od 3,85 do 5,46. Pro většinu z nich tedy hodnoty nebyly větší než rozsah jednotky, ale pro živiny byl rozsah hodnot přes jednotku (viz Tab. P.4 v příloze).

2.7.2 Postupný výběr

U některých prediktorů byly přítomny vysoké korelace – zejména mezi některými Elenbergovými indikačními hodnotami, ale také mezi proměnnými odvozenými z GIS a ostatními charakteristikami populací, jak ukazuje korelační matice v příloze (Tab. P.6). Abych předešla nechtěné multikolinearitě, vysvětlované proměnné vstupující do modelů byly nejprve vybrány na základě postupného výběru podle VIF. Vybrané prediktory na základě VIF byly pro jednotlivé datasey téměř shodné (Tab. P.5 v příloze).

Z modelů, kde vstupovaly vysvětlující proměnné bez EIV (datasey $n = 29$, $n = 27$, $n = 25$, $n = 24$), jsem vybírala ten nejvhodnější na základě výsledků p -hodnot F testem pomocí analýzy variance regresního modelu (Tab. P.8 v příloze). V původním souboru v případě $n = 29$ vycházela výrazně u všech vysvětlovaných proměnných signifikantní proměnná *Velikost populace*. Směr jejího vlivu byl však negativní – to znamená, že s rostoucí populací by měla podle těchto modelů genetická diverzita klesat. Může to značit, že výsledek je ovlivněn velikostí vzorku, proto jsem testovala i jeho vliv zahrnutím proměnné *Velikost vzorku* do modelu namísto *Velikosti populace*. Protože jsou proměnné *Velikost populace* a *Velikost vzorku* korelovány je potřeba v postupném výběru proměnných na základě VIF vybrat jen jednu z nich. Proměnná *Velikost vzorku* však slouží jen pro jakési ověření vhodnosti datasetu (testování vlivu malých populací na výsledek) pro analýzy a vzhledem k tomu, že výsledky po jejím zahrnutí do modelů byly velice podobné jako výsledky s *Velikostí populace*, jsou zde ukázány (v příloze) pouze výsledky s dále používanou proměnnou *Velikost populace*. Po vyloučení dalších malých populací (datasey $n = 27$ a $n = 25$) se vliv proměnné *Velikost populace* (i *Velikost vzorku*) pomalu vytrácel (vytrvával pouze u některých vysvětlovaných proměnných) a v datasetu $n = 24$ již neměl vliv u žádné vysvětlované proměnné. V modelech, kde již nebyla signifikantní *Velikost populace*, se objevila vždy signifikantní proměnná *Bílé Karpaty* a téměř u všech výše popsaných modelů se také objevovala signifikantní proměnná *DAHI*.

Žádný z vyzkoušených modelů však není ideální, po odfiltrování vlivu malých populací se dostaneme na 24 pozorování, čímž se sníží i důvěryhodnost modelu. Dataset s 24 pozorováními je však velice blízko dalšímu testovanému datasetu s 22 pozorováními, a proto se budu dále zabývat výsledky tohoto datasetu ($n = 22$), pro něj jsem odvodila i Elenbergovy indikační hodnoty (Tab. 2.8). Výhodou tohoto datasetu je spolehlivěji spočítaná vysvětlovaná proměnná allelic richness – $AR(k=12)$. Vyrovnanější počet jedinců v populaci totiž činí odhad allelic richness důvěryhodnější (Leberg, 2002). Na základě VIF byly pro dataset $n = 22$ vybrány prediktory *Bílé Karpaty*, *Velikost populace*, *Buffer*, *Sklon*, *TPI*, *DAHI*, *Vlhkost*, *Počet druhů* (Tab. 2.7).

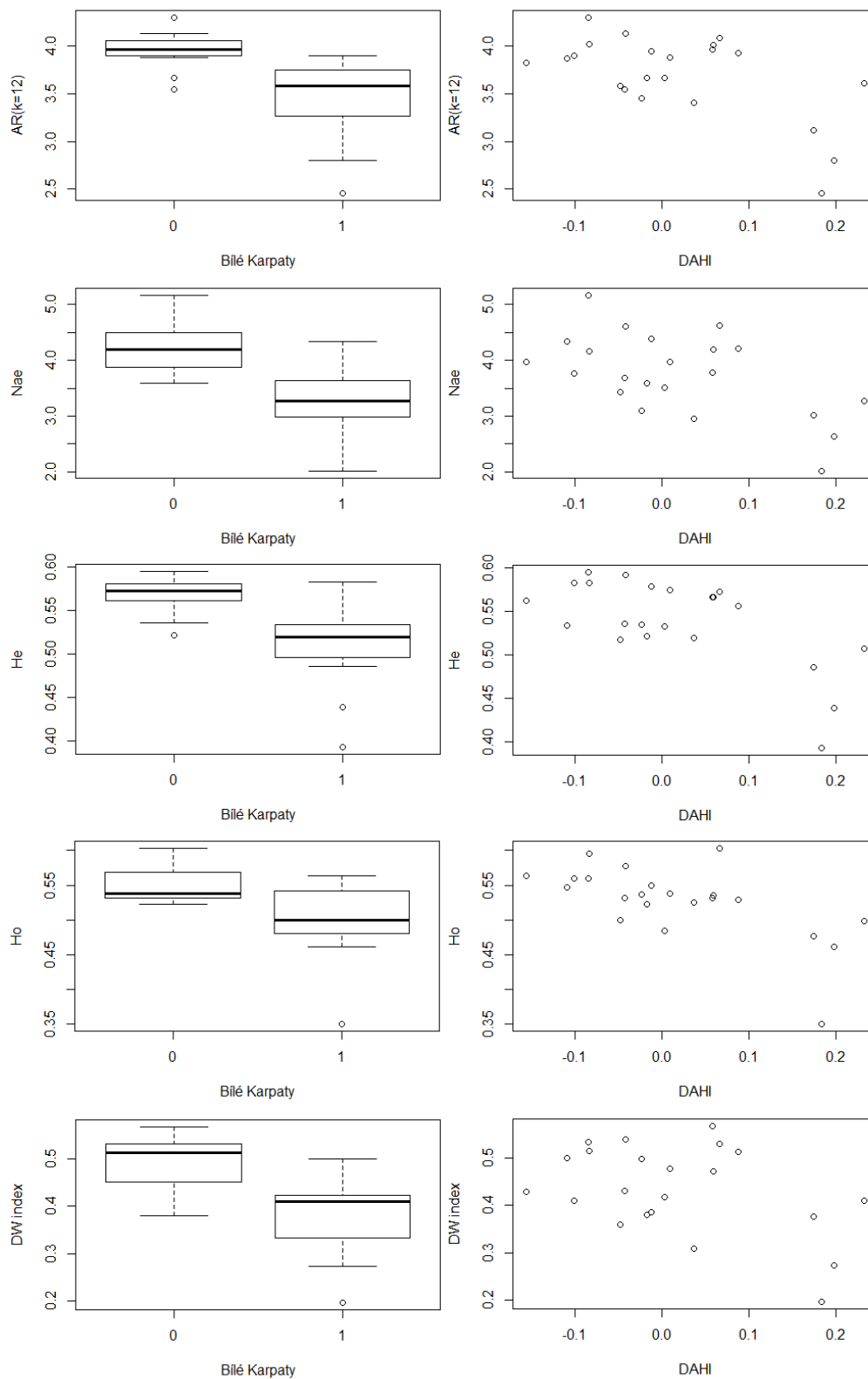
Prediktor	VIF (n=22)
Bílé Karpaty	2,63
Velikost populace	1,83
Buffer	1,45
Sklon	2,38
TPI	1,19
DAHI	2,14
Vlhkost	1,98
Počet druhů	1,54

Tab. 2.7 VIF (Variance inflation factor) jednotlivých prediktorů, které dále vstupují do modelu s 22 pozorováními.

V modelech, kde vysvětlovanými proměnnými byly $AR(k=12)$, Nae , He , Ho , DW index ukázaly výsledky F -testu největší vliv proměnné *Bílé Karpaty* a *DAHI* (Tab. 2.8, Graf 2.8). V modelu s vysvětlovanou proměnnou DW index se ukázal i vliv proměnné *Vlhkost*, *Buffer* a *TPI*. U modelů s vysvětlovanými proměnnými Fi a *Unikátní alely* nevyšel žádný ze zkoumaných prediktorů na 5% hladině významnosti signifikantní. Adjustovaný koeficient determinace, který informuje o těsnosti závislosti, u modelů s vysvětlovanými proměnnými $AR(k=2)$, Nae , He , Ho , DW index, vysvětluje 72 %, 73 %, 71 %, 54 %, 84 % variability těchto závislých proměnných.

Závislá proměnná	Prediktor	Df	F-test	p-hodnota	AIC (nul.)	AIC (MAM)	R ²	Adj. R ²
AR (k=12)	* Bílé Karpaty	1	28,47	< 0,001	-54,74	-59,33	0,79	0,72
	Buffer	1	2,29	0,150				
	Sklon	1	2,00	0,176				
	* DAHI	1	22,95	< 0,001				
	Vlhkost	1	4,21	0,057				
	Residuály	16						
Nae	* Bílé Karpaty	1	33,46	< 0,001	-32,27	-37,41	0,79	0,73
	Buffer	1	0,64	0,437				
	Sklon	1	1,62	0,221				
	* DAHI	1	19,74	< 0,001				
	* Vlhkost	1	5,27	0,036				
	Residuály	16						
He	* Bílé Karpaty	1	25,69	< 0,001	-150,96	-154,33	0,78	0,71
	Buffer	1	2,15	0,162				
	TPI	1	0,04	0,844				
	* DAHI	1	26,19	< 0,001				
	Počet druhů	1	3,32	0,087				
	Residuály	16						
Ho	* Bílé Karpaty	1	11,32	0,003	-137,15	-142,46	0,60	0,54
	Buffer	1	0,87	0,365				
	* DAHI	1	15,18	0,001				
	Residuály	18						
DW index	* Bílé Karpaty	1	43,28	< 0,001	-136,41	-137,98	0,89	0,84
	* Buffer	1	11,51	0,004				
	Sklon	1	< 0,01	0,970				
	* TPI	1	4,81	0,046				
	* DAHI	1	33,40	< 0,001				
	* Vlhkost	1	20,82	< 0,001				
	Počet druhů	1	2,32	0,150				
Residuály	14							

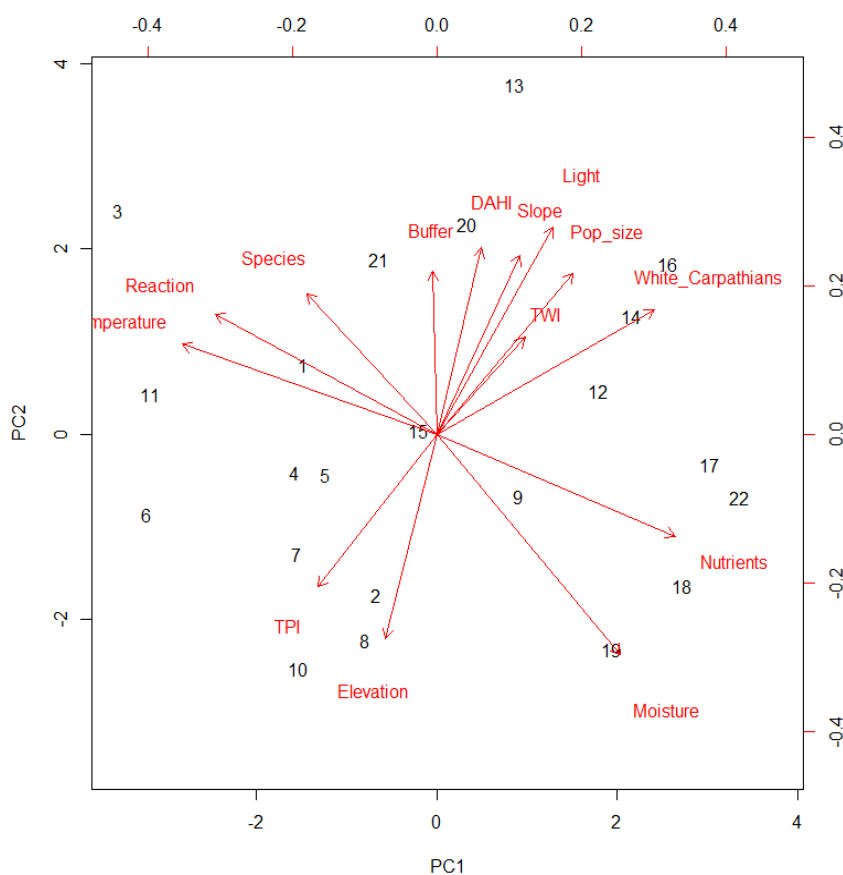
Tab. 2.8 Shrnutí minimálních adekvátních modelů lineární regrese vytvořené pro vysvětlované proměnné $AR(k=2)$, Nae , He , Ho , $DW\ index$ postupným výběrem pro soubor dat s 22 pozorováními. Zleva: testovaná závislá proměnná, prediktory vybrány postupným výběrem, počet stupňů volnosti, hodnoty F -testu, p -hodnoty signifikance, AIC nulového modelu vstupující do postupného výběru, AIC minimálního adekvátního modelu vybraného postupným výběrem, mnohonásobný koeficient determinace, adjustovaný koeficient determinace. Hvězdičky * označují prediktory, které byly v daném modelu signifikantní.



Graf 2.8 Vlevo: Vliv příslušnosti populací do jihozápadního – 0 nebo severovýchodního – 1 regionu *Bílých Karpat* na parametry genetické diverzity ($AR(k=2)$, Nae , He , Ho). Vpravo: Závislost parametrů genetické diverzity ($AR(k=2)$, Nae , He , Ho) na $DAHI$.

2.7.3 PCA analýza

Provedla jsem analýzu hlavních komponent (PCA) všech měřených vysvětlujících proměnných (Graf 2.9). První dvě osy vysvětlují společně 52,5 % variability. Skóry dvou hlavních os takto vzniklé PCA jsem použila jako prediktory v nových modelech lineární regrese, kde jako vysvětlované proměnné opět vstupovaly $AR(k=2)$, Nae , He , Ho , Fi , $DW index$, $Unikátní alely$ (s datasetem obsahujícím 22 pozorování). F -test ukázal jako signifikantní hlavní osu PC1 v modelech s $AR(k=2)$, Nae , He a $DW index$. Osa PC2 se ukázala jako signifikantní v modelech s $AR(k=2)$, Nae , He , Ho (Tab. 2.10). V modelech s Fi a $Unikátní alely$ se neukázala žádná z os signifikantní.



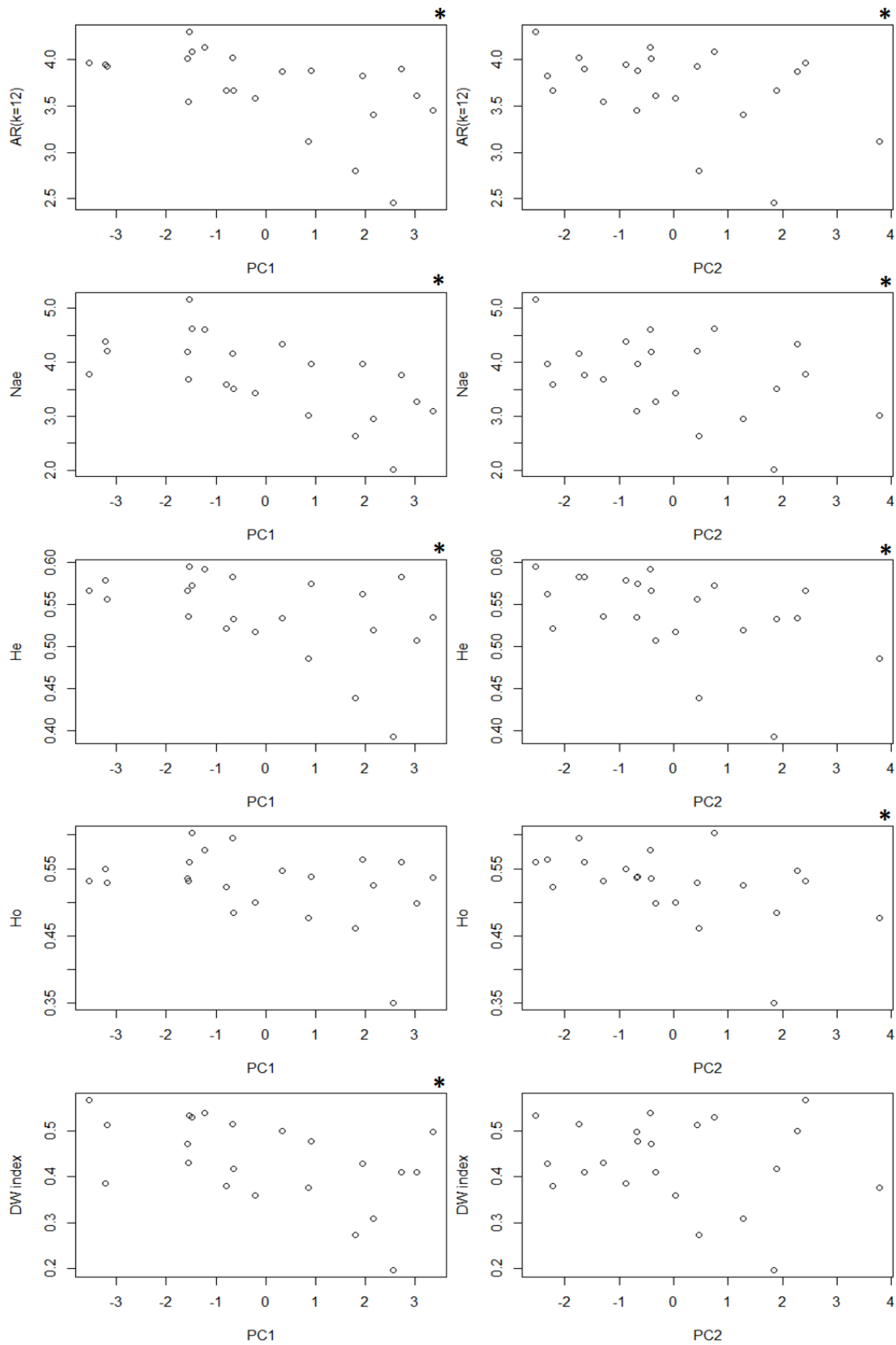
Graf 2.9 Principal component analysis (PCA) všech použitých prediktorů v datasetu se 22 pozorováními. Čísla v grafu označují jednotlivá pozorování, tj. populace (1–22). První osa vysvětluje 31,7 % variability, druhá osa vysvětluje 20,8 % variability. Prediktory (ve směru hodinových ručiček): Temperature = *Teplota*; Reaction = *Půdní reakce*; Species = *Počet druhů*; Buffer = *Buffer*; DAHI = *DAHI*; Slope = *Sklon*; Light = *Světlo*; Pop_size = *Velikost populace*; TWI = *TWI*; White_Carpathians = *Bílé Karpaty*; Nutrients = *Živiny*; Moisture = *Vlhkost*; Elevation = *Nadmořská výška*; TPI = *TPI*.

Prediktor	PC1	PC2
Bílé Karpaty	0,79	0,36
Velikost populace	0,50	0,46
Buffer	-0,01	0,47
Nadmořská výška	-0,19	-0,59
Sklon	0,30	0,51
TWI	0,32	0,28
TPI	-0,43	-0,44
DAHI	0,16	0,54
Světlo	0,42	0,59
Teplota	-0,93	0,26
Vlhkost	0,67	-0,63
Půdní reakce	-0,81	0,35
Živiny	0,87	-0,29
Počet druhů	-0,47	0,40

Tab. 2.9 Korelace jednotlivých prediktorů s osami PC1 a PC2.

Závislá proměnná	Prediktor	Df	F-test	p-hodnota	R ²	Adj. R ²
AR (k=12)	* PC1	1	11,93	0,003	0,50	0,45
	* PC2	1	7,02	0,016		
	Residuály	19				
Nae	* PC1	1	16,99	< 0,001	0,56	0,51
	* PC2	1	7,27	0,014		
	Residuály	19				
He	* PC1	1	8,52	0,009	0,46	0,41
	* PC2	1	7,98	0,011		
	Residuály	19				
Ho	PC1	1	3,80	0,066	0,35	0,28
	* PC2	1	6,55	0,019		
	Residuály	19				
DW index	* PC1	1	7,02	0,016	0,30	0,22
	PC2	1	1,00	0,330		
	Residuály	19				

Tab. 2.10 Jednotlivé modely lineární regrese vytvořené pro vysvětlované proměnné *AR(k=12)*, *Nae*, *He*, *Ho*, *DW index* vytvořené ze skóre os PC1 a PC2 z vytvořené PCA. Hvězdičky * označují prediktory, které byly v daném modelu signifikantní.



Graf 2.10 Grafy závislosti PC1 a PC2 na parametrech genetické diverzity. Hvězdičky * označují signifikantní závislosti.

Směr vlivu PC1 i PC2 na vysvětlované proměnné je negativní, jak ukazuje Graf 2.10. S hlavní osou PC1 nejvíce pozitivně koreluje proměnná *Živiny* (0,87), jak ukazuje korelační matice – Tab. 2.9, popřípadě graf znázorňující PCA (Graf 2.9). Další vysoká pozitivní korelace s osou PC1 se ukázala u proměnné *Bílé Karpaty* (0,79), a naopak vysoká negativní korelace s osou PC1 se vyskytla u proměnné *Teplota* (-0,93) a *Půdní reakce* (-0,81).

Na základě korelace jednotlivých prediktorů s osami *PC1*, *PC2* a směru vlivu *PC1* a *PC2* na vysvětlované proměnné lze posoudit vliv prediktorů na vysvětlované proměnné. Vzhledem ke korelacím některých prediktorů mezi sebou a poměrně vysoké korelaci všech prediktorů s oběma osami je však vhodnější uvažovat spíše společný vliv těchto prediktorů podle jednotlivých kvadrátů (Graf 2.9). Graf PCA spolu s nejvyššími hodnotami korelace prediktorů s osami (Tab. 2.9) ukazují, že teplejší stanoviště (můžeme říct i s vyšší půdní reakcí a spíše druhově bohatší) mají pozitivní vliv na parametry genetické diverzity, které představují vysvětlované proměnné *AR(k=2)*, *Nae*, *He*, *Ho*, *DW index*. Na živiny bohatší (a také vlhčí) stanoviště mají naopak negativní vliv na genetickou diverzitu. Poloha Bílých Karpat na obrázku ukazuje negativní vliv, to znamená, že populace v severovýchodním regionu Bílých Karpat (proměnná nabývá hodnoty 1) mají nižší genetickou diverzitu oproti jihozápadnímu regionu (proměnná nabývá hodnoty 0), kde je genetická diverzita vyšší.

2.7.4 Testování prediktorů samostatně

Nakonec jsem testovala každý prediktor samostatně s každým parametrem pro genetickou diverzitu pomocí jednocestné ANOVY (Tab. 2.11), což nyní umožní jednotlivé prediktory porovnávat (Tab. 2.12). U všech vysvětlovaných proměnných se ukázal vliv proměnné *Bílé Karpaty* a *DAHI*, což koresponduje s testováním pomocí postupného výběru. Tyto proměnné vysvětlují také téměř vždy nejvíce variability (viz koeficienty determinace Tab. 2.11). Signifikantní vyšel také vliv proměnné *Velikost populace*, která byla signifikantní při testování datasetů postupným výběrem obsahující malé populace. Dalšími proměnnými, které se při testování ukázaly signifikantní téměř u všech vysvětlovaných proměnných (kromě *DW index*) byly *Sklon* a *Světlo*. *Sklon* se nikdy nejevil signifikantně, zatímco *Světlo* nebylo nikdy do postupného výběru vybráno na základě VIF (pravděpodobně kvůli korelaci s *Bílými Karpaty*). Proměnná *Teplota* byla signifikantní u vysvětlovaných proměnných *AR(k=12)*, *Nae* a *DW index*, zatímco proměnná *Živiny* byla signifikantní u *Nae* a *DW indexu*. Tyto proměnné se jevily jako významné při testování prediktorů na základě PCA. Proměnná *Buffer* byla signifikantní jen u *DW indexu* stejně jako u postupného výběru.

Závislá proměnná	Prediktor	p -hodnota	R^2	Adj. R^2
AR (k=12)	* Bílé Karpaty	0,002	0,38	0,34
	* Velikost populace	0,034	0,20	0,17
	Buffer	0,101	-	-
	Elevation	0,114	-	-
	* Sklon	0,049	0,18	0,14
	TWI	0,668	-	-
	TPI	0,281	-	-
	* DAHI	0,003	0,36	0,33
	* Světlo	0,025	0,23	0,19
	* Teplota	0,043	0,19	0,15
	Vlhkost	0,519	-	-
	Půdní reakce	0,199	-	-
	Živiny	0,097	-	-
	Počet druhů	0,299	-	-
	Nae	* Bílé Karpaty	0,001	0,44
* Velikost populace		0,010	0,29	0,25
Buffer		0,182	-	-
Elevation		0,104	-	-
* Sklon		0,042	0,19	0,15
TWI		0,671	-	-
TPI		0,222	-	-
* DAHI		0,005	0,33	0,30
* Světlo		0,030	0,21	0,18
* Teplota		0,029	0,22	0,18
Vlhkost		0,326	-	-
Půdní reakce		0,108	-	-
* Živiny		0,028	0,22	0,18
Počet druhů		0,401	-	-
He		* Bílé Karpaty	0,004	0,35
	* Velikost populace	0,024	0,23	0,19
	Buffer	0,111	-	-
	Elevation	0,223	-	-
	* Sklon	0,022	0,24	0,20
	TWI	0,886	-	-
	TPI	0,543	-	-
	* DAHI	0,001	0,43	0,40
	* Světlo	0,015	0,26	0,23
	Teplota	0,102	-	-
	Vlhkost	0,885	-	-
	Půdní reakce	0,311	-	-
	Živiny	0,182	-	-
	Počet druhů	0,412	-	-
	Ho	* Bílé Karpaty	0,018	0,25
* Velikost populace		0,021	0,24	0,20
Buffer		0,192	-	-
Elevation		0,390	-	-
* Sklon		0,041	0,19	0,15
TWI		0,900	-	-
TPI		0,821	-	-
* DAHI		0,001	0,41	0,38
* Světlo		0,032	0,21	0,17
Teplota		0,318	-	-
Vlhkost		0,738	-	-
Půdní reakce		0,803	-	-
Živiny		0,285	-	-
Počet druhů		0,592	-	-
DW index		* Bílé Karpaty	0,005	0,33
	* Velikost populace	0,041	0,19	0,15
	* Buffer	0,029	0,22	0,18
	Elevation	0,537	-	-
	Sklon	0,242	-	-
	TWI	0,875	-	-
	TPI	0,933	-	-
	* DAHI	0,043	0,19	0,15
	Světlo	0,383	-	-
	* Teplota	0,047	0,18	0,14
	Vlhkost	0,326	-	-
	Půdní reakce	0,099	-	-
	* Živiny	0,034	0,21	0,17
	Počet druhů	0,238	-	-

Tab. 2.11 Výsledky testování jednotlivých prediktorů zvlášť (dataset $n = 22$). Zleva: vysvětlovaná proměnná, testované prediktory, p -hodnota, mnohonásobný koeficient determinace a adjustovaný koeficient determinace. Hvězdičky * označují prediktory, které byly při testování signifikantní.

Prediktor	AR (k=12)		Nae		He		Ho		DW index	
	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S
Bílé Karpaty	VIF ✓ *	*	✓ *	*	✓ *	*	✓ *	*	✓ *	*
DAHI	VIF ✓ *	*	✓ *	*	✓ *	*	✓ *	*	✓ *	*
Vlhkost	VIF ✓		✓ *						✓ *	
Buffer	VIF ✓		✓		✓		✓		✓ *	*
TPI	VIF				✓				✓ *	
Sklon	VIF ✓	*	✓	*		*		*	✓	
Velikost populace	VIF	*		*		*		*		*
Počet druhů	VIF				✓				✓	
Světlo		*		*		*		*		
Teplota		*		*						*
Živiny				*						*
Elevation										
TWI										
Půdní reakce										

Tab. 2.12 Srovnání testování jednotlivých prediktorů pro všechny závislé proměnné – $AR(k=12)$, Nae , He , Ho , $DW index$ – postupným výběrem (P) a samostatně (S). Označení „VIF“ u prediktorů znamená, že tyto prediktory byly vybrány k testování do postupného výběru na základě VIF. Značka ✓ znamená, že byl prediktor vybrán postupným výběrem na základě nejnižšího AIC do modelu. Hvězdičky * znamenají statistickou významnost testovaných prediktorů.

3 Diskuze

3.1 Mikrosatelitové markery

Pro zjištění genetické diverzity a struktury populací ve studované oblasti jsem použila mikrosatelitové markery (SSRs). Nejprve jsem zjišťovala, zda je možné využít již publikované mikrosatelitové markery, použité pro příbuzné druhy rodu *Campanula*, které byly využity ve studiích *C. thyrsoides* (Aegisdottir et al., 2007), *C. scheuchzeri* (Armbruster & Stoecklin, 2015) a *C. pyramidalis* (Radosavljevic et al., 2015). Z celkem testovaných 34 lokusů se mi podařilo prvními testy identifikovat celkem 7 variabilních stabilně se amplifikujících lokusů. Počet mikrosatelitových lokusů vhodný ke genetickým analýzám sice není nijak pevně stanoven, ale 7 lokusů se nepovažuje za dostatečný počet. Reiner et al. (2019) provedli analýzu počtu používaných mikrosatelitů a počtu genotypovaných jedinců na populaci v publikovaných studiích a zjistili, že medián je 25 jedinců na populaci s užitím 11 mikrosatelitových markerů. Předpokládali, že výsledky genetických parametrů mohou být významně ovlivněny rozdíly ve velikosti vzorku na populaci a počtem markerů, což by mohlo snižovat porovnatelnost výsledků mezi studii. Srovnáním různých setů mikrosatelitových markerů (různý počet a kombinace) na populacích *Cervus elaphus* zjistili, že pokud je počet genotypovaných jedinců na populaci méně než 30, při 6 až 8 použitých mikrosatelitových markerech, výsledky testování populačně genetických charakteristik a genetické struktury při použití jiného setu se stejným počtem markerů mají významné odchylky.

Proto bylo navrženo 430 nových, druhově specifických mikrosatelitových markerů pro *C. glomerata*. Z vybraných 50 lokusů se mi podařilo vyselektovat celkem 15 stabilně se amplifikujících a variabilních lokusů. Součástí výsledných 3 multiplexů však bylo pouze 5 optimalizovaných lokusů publikovaných ve studiích Aegisdottir et al. (2007) a Radosavljevic et al. (2015) a 14 lokusů nově vyvinutých a optimalizovaných v rámci této práce. Vyřazené lokusy v rámci multiplexů nepodléhaly stabilním amplifikacím, stejně jako 3 další lokusy, které sice byly součástí výsledných multiplexů, ale skórování u nich neproběhlo. Celkově tedy bylo použito 19 mikrosatelitových markerů v rámci 3 multiplexů na genotypování 425 jedinců *C. glomerata* a u 16 z nich jsem provedla analýzu délek jednotlivých fragmentů. Ta se pohybovala od 113 do 213 bp. Délky fragmentů mikrosatelitových lokusů *Camphy1*, *Camphy3* a *Camphy6* z práce Aegisdottir et al. (2007) neodpovídaly publikovaným údajům, délka lokusu *CpUZ001* z práce Radosavljevic et al. (2015) byla v rámci publikovaného rozsahu.

Ačkoliv bylo finálně vyvinuto a použito 16 mikrosatelitových markerů, při testování celého datasetu se nakonec ukázalo, že míra jejich variability se liší a u některých z nich se může zdát relativně nízká. V několika případech jsou lokusy zastoupeny převážně jednou nebo dvěma alelami a zbytek nalezených alel v daném lokusu se vyskytuje jen vzácně (Tab. P.9 a Graf P.4 v příloze). Tento fakt odráží i hodnoty G'_{ST} (Tab. 2.1), které udávají míru diferenciací ve frekvenci alel pro jednotlivé lokusy. Hodnoty G'_{ST} u použitých markerů kolísaly od nízkých (0,05) po relativně vysoké (0,81). Vyšší hodnoty G'_{ST} tedy značí marker, který lépe rozlišuje jedince v datasetu na základě alelových frekvencí. Nízké hodnoty G'_{ST} se objevily často u lokusů, kde byl i nízký počet nalezených alel v datasetu. Například lokus CpUZ001 s objevenými třemi alelami v datasetu (tj. nejnižší objevený počet alel), měl i nejnižší hodnotu $G'_{ST} = 0,05$ a současně výrazně nerovnoměrné zastoupení jednotlivých alel (Tab. P.9 a Graf P.4 v příloze). Odlišná variabilita mikrosatelitových markerů, je běžným jevem, který se objevuje ve studiích, každá studie však předkládá variabilitu a vlastnosti markerů jiným způsobem – například Ony et al., (2020) počítají pro vyvinuté mikrosatelity (pro *Cercis canadensis*) F'_{ST} , které je také v širokém rozpětí – od 0,03 do 0,61. Počet nalezených alel u jednotlivých lokusů se zde pohyboval od 4 do 12, zatímco u *C. glomerata* v našem datasetu byl počet nalezených alel od 3 do 29.

3.2 Genetická diverzita a struktura populací

3.2.1 Rozbor a interpretace výsledků

Základní statistiky genetické a alelické diverzity, které byly spočítány pro jednotlivé oblasti severovýchodu a jihozápadu Bílých Karpat (viz Tab. 2.5 a Tab. 2.6) ukazují jen malý, avšak průkazný rozdíl v diverzitě mezi těmito oblastmi. Téměř všechny měřené parametry ukazují na průkazně vyšší diverzitu v jihozápadní oblasti. Nicméně celkově populace vykazují poměrně vysoký stupeň diverzity na všech úrovních.

Alelická diverzita

Efektivní počet alel (NAe) byl u populací z jihozápadu 4,69, což je průkazně více než 4,32 u populací ze severovýchodu. Hodnoty Allelic richness (AR), byly u populací z jihozápadu 1,58 a u populací ze severovýchodu jen nepatrně (avšak průkazně) menší – 1,55. Allelic richness je zde však počítána včetně malých populací, což může značně vychylovat výsledek – podle Leberg (2002) by populace měly mít co nejvyrovnanější počet jedinců, abychom mohli allelic richness důvěřovat. Proto byla allelic richness počítána i bez těchto malých populací (Tab. P.7 v příloze). U datasetu, kde jsou vyloučeny všechny malé populace (např. $n = 24$) lze

vidět již větší rozdíl v AR u jihozápadních a severovýchodních populací. Vzhledem k odlišnému počtu minimálních jedinců pro výpočet AR se tento ukazatel jen těžko porovnává s hodnotami v jiných studiích. Nejlépe srovnatelná je AR počítaná pro celý dataset bez malých populací – např. dataset s 24 populacemi, kde nejmenší populace obsahuje 8 jedinců (Tab. P.7 v příloze) – protože většina studií nepočítá AR pro malé populace. Hodnoty se pohybují v rozmezí 2,46 – 4,30. Podobné rozmezí 2,56 – 5,50 nalezneme například u *Cephalanthera rubra* ve fragmentované krajině (Kotlínek et al., 2020).

Heterozygozita

Očekávaná heterozygozita (H_e), také nazývána genovou diverzitou (D) (Nei, 1973), která udává (očekávanou) pravděpodobnost, že bude jedinec heterozygotní přes všechny testované lokusy za předpokladu Hardyho-Weinbergovy rovnováhy, byla v jihozápadní oblasti 0,58, zatímco na severovýchodě byla 0,55 – průkazně méně. To znamená, že pokud se jedinec vyskytuje na jihozápadě, je 58% pravděpodobnost, že bude heterozygot, zatímco, jedinec vyskytující se na severovýchodě bude mít tuto pravděpodobnost 55 %. Je to celkově méně, než by se dalo očekávat pro druh se stejnými životními strategiemi ve všech ohledech. Podle Nybom (2004) je pro dlouhověké vytrvalé byliny H_e průměrně 0,68, pro cizosprašné druhy 0,65, pro rostliny středního sukcesního stádia 0,63, pro rostliny, jejichž semena roznáší vítr 0,61, což neodpovídá stávajícím výsledkům. Výsledky by odpovídaly více jinému typu životní strategie, např. krátkověkým bylinám (H_e průměrně 0,55) – *C. glomerata* je nicméně poměrně dlouhověká. Tento rozpor však není tolik dramatický, aby mu byla věnována příliš velká pozornost. Ač může být přičten negativním důsledkům fragmentace nebo také dalším činitelům (diskutováno v kapitole 3.2.2), je také možné, že předložené průměrné hodnoty pro rostliny se stejnými životními strategiemi nejsou tak docela směrodatné. Tato studie shromažďuje výsledky z výzkumů založených na různých molekulárních markrech, z nichž asi jen třetina je postavená na mikrosatelitech – a právě to může vysvětlovat pozorovaný rozdíl, jenž může být pouhou odchylkou.

Inbreeding

Stupeň pozorované a očekávané heterozygozity lze porovnávat mezi sebou. Pokud je pozorovaná heterozygozita vyšší než očekávaná, můžeme usoudit, že v populacích nedochází k inbreedingu ($F_i < 0$). Pokud je pozorovaná heterozygozita nižší než očekávaná, přičítáme tento nesoulad silám jako je inbreeding ($F_i > 0$) (Van Dyke, 2008). Pozorovaná heterozygozita (H_o) byla pro genotypované jedince z populací jihozápadní oblasti 0,55, zatímco pro jedince z populací ze severovýchodu 0,50. V obou oblastech tedy vidíme, že k inbreedingu dochází, je

ale poměrně slabý, jak ukazuje také individuální koeficient inbreedingu (F_i) s hodnotami 0,04 pro jihozápadní populace a 0,09 pro severovýchodní populace. Tento rozdíl mezi regiony však není statisticky průkazný.

Pokud se na populace podíváme jemnější optikou, můžeme vidět, že koeficient inbreedingu (F_i) u jednotlivých severovýchodních i jihozápadních populací se pohybuje často okolo nulových hodnot (Tab. 2.5), což značí, že inbreeding v těchto populacích není přítomen. U některých populací se objevují dokonce záporné hodnoty, což značí, že v dané populaci se vyskytuje více heterozygotů, než je předpokládáno podle Hardyho-Weinbergovy rovnováhy (tj. pozorovaná heterozygotita je vyšší, než očekávaná). Nejvyšší hodnoty nalezneme v severovýchodních populacích Q2a ($F_i = 0,11$) a Q7g ($F_i = 0,10$) relativně izolovaných od okolních populací (Obr. 2.1) – populace Q2a se nachází na okraji sadu, který je od nejbližších populací oddělen lesem, potokem, křovinami a cestou, populace Q7b se naproti tomu nachází na malé mýtině uprostřed hustých křovin a stromů, které ji oddělují od okolních nejbližších populací. Ač je izolovanost populace jedním z hlavních předpokladů vysoké pravděpodobnosti výskytu inbreedingu, dalším předpokladem je velikost populace. V malých a izolovaných populacích z empirie může k inbreedingu docházet (Ellstrand & Elam, 1993; Leimu et al., 2006). Tyto populace však čítají poměrně vysoký počet jedinců (populace Q2a obsahuje 165 jedinců, populace Q7g obsahuje 151 jedinců) ve srovnání s ostatními nalezenými populacemi. Nicméně, výsledky na základě F-testu nepotvrdily žádný vliv velikosti ani izolovanosti populace (zástupná proměnná *Buffer*) na koeficient inbreedingu (F_i) (viz kapitola 3.4.2). Teorie, že tyto populace jsou izolované a pravděpodobně v důsledku toho u nich dochází k nejvyššímu inbreedingu, je založena na pozorování v terénu a prohlížení map.

Vzácné alely

Genetickou divergenci lze vyjádřit pomocí indexu vzácnosti DW (frequency-down-weighted marker values), který podle Paun et al. (2008) je lepším ukazatelem historických procesů než pattern genetické diverzity, který odráží spíše současné procesy jako je propojenost populací a velikost populací. DW index je očekávan vyšší v populacích, které mají vysoký počet vzácných alel, což znamená alely s nízkou frekvencí v celkovém datovém souboru (Paun et al., 2008). Předpokládá se, že vysoká hodnota DW svědčí o dlouhodobé historii populace (proto je také používána i k rozlišení mezi potenciálním glaciálním refugiem a novějšími místy výskytu) (Paun et al., 2008; Schönswetter & Tribsch, 2005). Hodnota DW indexu je průkazně nižší v severovýchodních populacích – 0,58, oproti jihozápadním populacím – 0,75. Tuto skutečnost odráží i počet unikátních alel, jichž je v severovýchodních populacích celkem 11,

naproti tomu v jihozápadních populacích se jich vyskytuje více než $2\times$ víc, tj. dohromady 24. Tyto indicie by mohly svědčit o delší historii jihozápadních populací oproti severovýchodním, které mohou být mladší a přetrvávají zde kratší dobu. Teoreticky by se však mohlo jednat i o ochuzení vzácných alel severovýchodních populací, které byly v nedávné době pod tlakem fragmentace stanoviště. Tento závěr je nicméně spekulativní (a je diskutován níže), hodnoty DW indexu jsou v obou oblastech poměrně nízké, ve srovnání například s populacemi *Ranunculus alpestris* (Paun et al., 2008) v Alpách a Karpatech, kde byly hodnoty DW indexu v rozmezí od 0,47 do 3,63. Nicméně tyto populace zahrnují celé fyloskupiny z Alp a Karpat, které jsou od sebe vzdáleny stovky kilometrů (fyloskupiny *R. alpestris*, *R. bilobus*, *R. traunfellneri*). V porovnání například pouze s Karpatskými populacemi *R. alpestris*, kde je DW index populací z východních Karpat 0,79 a populací z jižních Karpat 0,56 (které jsou z hlediska glaciální historie považovány za mladé), tedy naše populace jsou srovnatelné. I když by bylo zajímavé zasazení našich populací do evropského kontextu, tato práce se zaměřuje pouze na studium genetické diverzity na menší škále a historie těchto populací z hlediska poměrně nedávné fragmentace stanoviště, tzn. měřítko je mnohem jemnější. Například ve studii recentní kolonizace *Orchis militaris* v Estonsku, kde vzdálenost populací se pohybuje v rámci desítek kilometrů (naše dvě oblasti populací jsou vzdáleny o něco méně, cca 35 km) se DW index pohybuje v rozmezí od 0,4 do 1,2 (Ilves et al., 2015).

Genetická struktura

Prvotní analýza, která měla odhalit strukturu v datech, byla analýza hlavních koordinát (PCoA). PCoA celého datasetu neukázala zřetelné odlišení dvou hlavních skupin populací ze severovýchodní a jihozápadní oblasti Bílých Karpat. Odlišení těchto dvou skupin lze vidět pouze v náznaku a variabilita vysvětlená osami je velice nízká (3,96 % a 3,54 %), tudíž nemůžeme říct, že by se skupiny vzájemně významně lišily. Analýza severovýchodních populací odděleně však ukázala jistý skrovný pattern v oddělování jednotlivých populací mezi sebou – barevné shluky se sice vzájemně překrývají, lze však pozorovat, že jednotlivé populace tvoří jakési skupiny v rámci tohoto chumlu (zejména populace Q2a, která se jako jediná zřetelně odděluje podél obou os – Obr. 3.2.1). Tyto skupiny jsou však velice nepatrně viditelné – přece jen tvoří dohromady jediný shluk (kromě populace Q2a). Navíc variabilita vysvětlená osami je sice vyšší než pro analýzu celého datasetu, stále však velmi nízká (4,80 % a 4,43 %). Analýza jihozápadních populací odděleně neukázala naopak žádný pattern v oddělování jednotlivých populací. Populace jsou vzájemně promíchány a netvoří žádné shluky, variabilita vysvětlená osami je nižší než u severovýchodních populací (4,49 % a 3,86 %).

Struktura v datech byla ukázána i Bayesovským shlukováním programem STRUCTURE, podle něhož byli jedinci rozděleni do tří odlišných genetických skupin. Jak se ukázalo, tyto tři genetické skupiny nebyly vymezeny zcela jednoznačně. Objevovalo se zde mnoho jedinců, kteří měli „smíšené“ genotypy a jejich příslušnost do jedné ze tří skupin byla nejasná. Výsledkem pak byly populace, které měly více méně převažující pravděpodobnost příslušnosti k dané skupině. U všech populací z jihozápadní části Bílých Karpat převažovala příslušnost k jediné skupině, zatímco u populací ze severovýchodní části se populace vyčleňovaly do celkem tří skupin – od ostatních se zejména odlišovaly populace Q2a, G7 a G13, které tvořily samostatnou skupinu a nejvzdálenější populace Q5, která byla, což je zajímavé, podobnější populacím z jihozápadu. Zbylé populace tvořily samostatnou skupinu, některé z nich však měly dosti smíšené pravděpodobnosti (viz Obr. 2.1 a Obr. 2.2).

S výsledky PCoA a STRUCTURE korespondují i výsledky analýz molekulární variance (AMOVA), kdy nejvyšší procento variability spadá vždy na rozdíl mezi jedinci v rámci populací a jednotlivé populace se odlišují jen málo. AMOVA celého datasetu neukazuje v podstatě žádné rozlišení hlavních skupin populací ze severovýchodu a jihozápadu Bílých Karpat (vysvětlená variabilita 0,9 %). Rozdíl mezi populacemi se zdá být také velice malý (vysvětlená variabilita 5,3 %). Analýza jihozápadní oblasti separátně neukazuje téměř žádný rozdíl mezi populacemi (vysvětlená variabilita 1,8 %), ale naopak v severovýchodní oblasti se malý rozdíl mezi populacemi objevuje (vysvětlená variabilita 8,2 %). Tuto jemnou strukturu na severovýchodě ukazují i výsledky PCoA a STRUCTURE.

Tyto výsledky – vysoká variabilita v rámci populací a nízká mezi populacemi – jsou v souladu s výsledky studií genetické diverzity a struktury rostlinných druhů, které jsou založeny na molekulárních markrech. Ukazuje se, že dlouhověké, cizosprašné a pozdně sukcesní druhy si zachovávají většinu své genetické variability v rámci populací (mezi jedinci), naproti tomu jednoleté, samosprašné a/nebo časně sukcesní taxony alokují nejvíce genetické variability mezi populacemi (Nybom, 2004). Výsledky studie genetické diverzity populací *C. glomerata* postavené na RAPD markrech studované na řádově větší geografické škále v Německu (tři hlavní skupiny populací od sebe byly vzdáleny cca 300 km) také neukázaly výraznou genetickou diferenciaci. Rozdíl mezi skupinami populací vysvětloval 7,78 % variability, rozdíl mezi populacemi 12,12 % variability (Bachmann & Hensen, 2007).

Výsledky se však mohou lišit v závislosti na užití různých molekulárních markerů. Pro srovnání s druhem *C. glomerata* tedy uvedu také výsledky několika studií cizosprašných vytrvalých druhů s obdobnou geografickou škálou, které byly analyzovány pomocí

mikrosatelitových markerů. U populací druhu *Hedyotis chrysotricha* se ukázalo 2,6 % variability mezi skupinami (vytvořené podle skupin dle STRUCTURE, které si odpovídají víceméně geograficky), 8,76 % mezi populacemi a 88,64 % v rámci populací (Yuan et al., 2012); u *Menyanthes trifoliata* byla variabilita mezi regiony 3 % (cca 60 km vzdálené), mezi populacemi 11 % variability (Raabová et al. 2015); u *Cercis canadensis* byla variabilita mezi skupinami 14,88 % variability (cca 100 km vzdálené severní a jižní populace), mezi populacemi 14,33 % a v rámci populací 70,79 % (Ony et al., 2020). Každá studie má však další odlišné aspekty – biologie těchto druhů je v jiných ohledech odlišná (například klonalita, životní forma, disperzní schopnosti) a historie populací i environmentální podmínky jsou odlišné. Proto není mým primárním záměrem porovnávat ostatní studie s výsledky této práce, ale zaměřit se i na možná vysvětlení plynoucí z výsledků a potenciální důsledky ve vztahu k jiným studiím (viz kapitola 3.2.2).

Genetická diferenciace

Pomocí fixačního indexu F_{ST} , který představuje genetickou vzdálenost populací, můžeme odhadnout genetickou diferenciaci mezi populacemi (Weir & Cockerham, 1984; Wright, 1951). F_{ST} může nabývat hodnot 0–1, při čemž mezi populacemi není rozdíl, pokud je $F_{ST} = 0$ a populace jsou 100% odlišné, pokud je $F_{ST} = 1$. Balloux a Lugon-Moulin (2002) prohlašují, že pro středně strukturované populace je F_{ST} odhadnuté z alelových frekvencí mikrosatelitových markerů jedním z nejcennějších nástrojů, jak odhadnout diferenciaci mezi populacemi. Sporné však je, jak informativní je F_{ST} pro vysoce odlišné populace za použití mikrosatelitů, které mají vysokou mutační rychlost – nelze ji rozlišit od migrace a tak může být diferenciace v takových populacích podceněna (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Naše hodnoty F_{ST} jsou však relativně nízké.

Pro skupinu populací ze severovýchodu je fixační index $F_{ST} = 0,08$ a pro populace z jihozápadu $F_{ST} = 0,02$, což by značilo vyšší diferenciaci mezi populacemi na severovýchodě ve srovnání s populacemi na jihozápadě. Hodnoty F_{ST} jsou však celkově nízké a znamenají spíše, že populace z jihozápadu, u nichž se fixační index v podstatě blíží nule, jsou si všechny vzájemně podobné a mezi populacemi ze severovýchodu, kde se hodnota fixačního indexu blíží jedné desetinné, je nějaký mírný rozdíl. Neexistuje oficiální konsensus, který by zhodnotil míru populační diferenciace na základě F_{ST} . V literatuře nalezneme pouze stupnice, které se nicméně mohou jevit jako subjektivní. Frankham et al. (2002) hodnotu $F_{ST} > 0,15$ klasifikuje jako významnou diferenciaci. Podle Hartl a Clark (1997, cit. dle Balloux a Lugon-Moulin, 2002) hodnota ležící v rozmezí 0–0,05 označuje nízkou genetickou diferenciaci; hodnota mezi 0,05

a 0,15 střední diferenciaci; hodnota mezi 0,15 a 0,25 vysokou diferenciaci; a hodnoty nad 0,25 velmi vysokou genetickou diferenciaci. Na základě výše zmíněné stupnice bychom hodnotili jihozápadní populace jako málo diferencované a severovýchodní populace jako středně diferencované. To by odpovídalo rozpačitým závěrům z předešlých analýz – v severovýchodních populacích se objevuje jakási struktura a populace se vzájemně liší, kdežto v jihozápadních populacích žádná struktura není viditelná a populace se vzájemně neliší.

Celkové F_{ST} pro všechny populace je $F_{ST} = 0,06$. Pro srovnání můžeme uvést, že pro dlouhověké vytrvalé druhy jsou dle ostatních výzkumů průměrné hodnoty $F_{ST} = 0,19$, pro cizosprašné druhy $F_{ST} = 0,22$, pro druhy, jejichž semena rozšiřuje vítr $F_{ST} = 0,13$ a pro druhy středního sukcesního stádia $F_{ST} = 0,22$ (Nybohm, 2004). V porovnání s těmito daty tedy *C. glomerata* ve studovaném území celkově nepodléhá vysoké diferenciaci. Podobné výsledky populační genetické diferenciaci nalezneme například ve studii genetické struktury 14 populací dlouhověké vytrvalé byliny *Primula elatior* ve fragmentovaném lesním stanovišti. Mezi fragmenty lesa nebyla objevena genetická diferenciaci, což vzhledem k malému regionálnímu rozsahu studie autoři nepovažují za překvapivé (vzdálenost mezi lesními fragmenty od 1,89 km do 14,48 km). Ukázalo se však, že existuje lokální genetická diferenciaci mezi populacemi uvnitř fragmentů, i přes krátkou geografickou vzdálenost < 3,30 km (Van Rossum, 2008).

3.2.2 Teorie možných vysvětlení

Celková genetická diferenciaci mezi populacemi je tedy navzdory fragmentaci nízká, genetická diverzita poměrně vysoká. Tato skutečnost být vysvětlena několika faktory, které mohou působit i společně: (1) Genový tok mezi populacemi je dostatečně vysoký, aby omezil nepříznivé účinky nedávné fragmentace. (2) Důsledky fragmentace jsou zmírněny životními strategiemi druhu – fragmentace netrvala dostatečně dlouhou dobu, aby se její důsledky zřetelně ukázaly v diferenciaci, nebo se účinky fragmentace mohou dostavit se zpožděním (to znamená, že se ještě mohou v budoucnu projevit). (3) Výsledek objevených genetických pattern je záležitostí dávné historie, kdy se postupně formovala krajinná struktura.

(1) Závislost na míře genového toku

Fragmentace stanovišť ovlivňuje genetickou diverzitu a populační strukturu druhu různými způsoby v závislosti na ekologii a biologii druhu. Specifická (genetická) odpověď druhů na fragmentaci stanoviště může tedy záviset na jejich životních strategiích (Aguilar et al., 2008; Hamrick & Godt, 1996). Jednou z těchto důležitých strategií je schopnost disperze druhu (Wilcock & Neiland, 2002), která je přímo spojena s tokem genů. U rostlinných druhů je

genetická struktura v neutrálních lokusech (zejména v jemném prostorovém měřítku) nejčastěji vytvářena omezeným tokem genů (Loveless & Hamrick, 1984). Narušení disperzních procesů, které následně vyústí v omezený genový tok, obvykle vede ke snížené genetické diverzitě, ke zvýšené diferenciaci mezi populacemi a inbreedingu v populacích (Van Geert et al., 2008; Young et al., 1996).

Disperse je u rostlin zajištěna klonálním růstem, semeny a přenosem pylu (Starfinger & Stöcklin, 1996). Zásadní vliv na genový tok u zkoumaných populací *C. glomerata* má nejspíše právě přenos pylu. *C. glomerata* se nerozšiřuje klonálním růstem (Klimešová, 2018). Dokáže se sice rozmnožovat i vegetativně (Krumbiegel, 2002), to však umožňuje pravděpodobně jen mírné rozrůstání se na stanovišti. Produkce semen *C. glomerata* je poměrně vysoká (Bachmann & Hensen, 2007). Semena jsou roznášena větrem, disperzní účinnost je ale nízká – 152 cm při rychlosti větru 10 m/s. (Emig a Leins 1994 cit. dle Bachmann & Hensen, 2007). Hlavním vektorem toku genů mezi populacemi jsou tedy patrně opylovači. *C. glomerata* je opylována včelami (Klotz et al., 2002), čmeláky, samotářskými včelami, popřípadě pestřenkami a brouky (Janovský, 2020). Na fragmentovaném stanovišti však může být zdroj pylu pro opylovače poměrně obtížné získat, obzvláště pokud jsou vzdálenosti mezi izolovanými plochami příliš vysoké, a proto disperse pylem v těchto fragmentovaných plochách může být omezená (Kwak et al., 1998). Tuto skutečnost může umocňovat navíc přítomnost fyzických překážek v krajině. Čím jsou bariéry pro opylovače větší (vyšší, méně prostupné), tím je pro opylovače těžší je překonat (Wratten et al., 2003). Navíc, průměrná, běžná vzdálenost, kterou opylovači podnikají při jednotlivých přeletech při hledání potravy je řádově mnohem nižší (jednotky až stovky metrů) než maximální vzdálenost na kterou mohou někteří opylovači doletět v rámci jednoho přeletu (až několik kilometrů – např. čmeláci). (Greenleaf et al., 2007; Herrera, 1987; Walther-Hellwig & Frankl, 2000; Westphal et al., 2006; Zurbuchen et al., 2010). Cizosprašné a zejména hmyzosprašné druhy rostlin jsou zvláště citlivé na narušení opylení (zejména pokud jsou populace malé) (Aguilar et al., 2006; Wilcock & Neiland, 2002). Avšak i nízká úroveň genového toku může postačovat k udržení rozmanitosti v populacích (Ellstrand, 2014; Slatkin, 1987). Proto jsou zřejmě delší přelety – i přes to, že třeba nejsou tak obvyklé – pro genový tok ve fragmentované krajině mezi izolovanými populacemi klíčové a mohou být hlavním faktorem udržujícím populační konektivitu ve studovaných populacích *C. glomerata*.

Zdá se, že mezi jihozápadními populacemi *C. glomerata*, které nejsou tolik diferencované, probíhá vysoký pylem zprostředkovaný genový tok, a to i přes poměrně velkou vzdálenost mezi skupinami populací z Čertoryjí a ze Zahrad pod Hájem (a Búrovou, která je

izolována lesem), které jsou navíc izolovány obdělávanou zemědělskou půdou a zástavbou. Naproti tomu v severovýchodní oblasti se objevuje velice mírná genetická diferenciace mezi populacemi, a to i přes to, že jednotlivé vzdálenosti mezi populacemi, u nichž se projevuje mírná genetická odlišnost, jsou mnohem menší. Je možné, že v jihozápadních populacích díky vysoké druhové bohatosti v celém regionu, která je dána dlouhou kontinuitou travních porostů a nepřetržitým managementem, existuje i větší bohatství a množství opylovačů, kteří zde mají dostatek zdrojů a jsou schopni překonávat zdejší překážky. Naproti tomu na severovýchodě může být složení a chování opylovačů jiné, jejich rozmanitost a hojnost může být menší, což změní i rozmanitost a dostupnost pylu. To by bylo v souladu s chováním opylovačů ve fragmentované krajině (Aguilar et al., 2008; Breed et al., 2015; Honnay & Jacquemyn, 2007; Sork et al., 1999). Navíc překonání místních bariér u izolovanějších populací bude vzácnější, a proto by zde mohlo docházet k jemnému rozrůznění na malé škále, a tedy genetickému odlišení těchto populací.

(2) Závislost na biologii druhu a míře fragmentace

Již bylo řečeno, že genetická diverzita a struktura populací často odráží rysy životní strategie druhu a souvisí tedy s disperzními schopnostmi (viz výše). Souvisí ale i s jejich růstovou formou a délkou života, systémem rozmnožování a běžností/vzácností druhu (Aguilar et al., 2008; Breed et al., 2015; Hamrick & Godt, 1996; Honnay & Jacquemyn, 2007; Vranckx et al., 2012). Tyto životní strategie mohou mít společný účinek a v narušených oblastech určovat rozdílnou citlivost na genetickou erozi (González et al., 2020).

Stupeň genetické diverzity může být silně ovlivněn rozmnožovací strategií druhu – obecně bývá vyšší u cizosprašných druhů než u samosprašných (Hamrick & Godt, 1996; Nybom, 2004; Reisch & Bernhardt-Römermann, 2014). Relativně vysoké úrovně genetické diverzity u cizosprašných druhů byly nalezeny například u populací druhu *Lychnis viscaria* (Berge et al., 1998), *Festuca ovina* (Berge et al., 1998), *Nymphoides peltata* (Nishihiro et al., 2009), *Pulmonaria officinalis* (Meeus et al., 2012), *Menyanthes trifoliata* (Raabová et al., 2015). Je však nutné podotknout, že současně právě cizosprašné rostliny jsou více náchylné ke ztrátě genetické diverzity než samosprašné rostliny (Aguilar et al., 2008) a jejich zranitelnost je zesílena, pokud jsou to druhy hmyzosprašné, neboť ty jsou závislé na mutualistických interakcích s opylovači (Aguilar et al., 2006) (viz výše). Proto je na zvážení, zda objevená mírně nižší heterozygotnost (než by se dalo předpokládat vzhledem k tomu, že druh je cizosprašný), kterou vykazují studované populace, signalizuje určitou sensitivitu *C. glomerata* na

fragmentaci krajiny nebo jde jen o odchylku. Nicméně jak bylo naznačeno, velkou roli ve spojení s tím mohou hrát jiné procesy.

Ač se zdá, že růstová forma druhu může být podstatným faktorem určujícím genetické pattern, ve skutečnosti se může jednat o jiné aspekty biologie druhu, které s životní formou souvisí. Přišlo se například na to, že stromy a keře mohou mít stejnou pravděpodobnost negativních důsledků fragmentace stanovišť jako bylinné druhy. A tato pravděpodobnost je spojena hlavně s tokem genů – hmyzem opylované rostliny ztratí spíše genetickou variabilitu než druhy opylované větrem, u nichž se pyl šíří na velké vzdálenosti (Vranckx et al., 2012). Stejně tak může být růstová forma spojena s délkou života, která je dle mého názoru mnohem lepším proxy genetických pattern. *C. glomerata* je sice bylina, její délka života se však může rovnat délce života některých keřů nebo stromů. Životní strategie druhu by proto měly být posuzovány co nejvíce komplexně.

Délka života rostlin, je tedy pro genetiku populací podstatná. Krátkověké rostlinné druhy jako např. *Gentianella germanica*, u níž byla objevena snížená genetická variabilita (Fischer & Matthies, 1998), mohou rychle reagovat na fragmentaci stanovišť. Negativní účinky se projeví rychle kvůli velkému počtu produkovaných generací po narušení (González et al., 2020). U vytrvalých rostlin, které jsou dlouhověké, jako je např. *Eryngium alpinum*, se naopak nemusí projevit účinky fragmentace stanovišť okamžitě (Gaudeul & Till-Bottraud, 2008). *C. glomerata* je poměrně dlouhověká rostlina, její průměrná délka života se odhaduje na 25–30 let (Piskovackova, 1980, cit. dle Bachmann & Hensen, 2007) a generace se patrně překrývají. Proto distribuce genotypů pravděpodobně odráží spíše historické události než současné rozptylové vzorce (stejně jako u *Eryngium alpinum*; Gaudeul a Till-Bottraud, 2008; nebo u *Succisa pratensis*; Münzbergová et al., 2013).

Navíc se předpokládá, že dlouhodobá vytrvalost u rostlin zpomalí účinky fragmentace stanoviště – právě výskyt starých etablovaných jedinců v malých populacích stále odráží historickou variabilitu (pokud byla fragmentace méně závažná) a umožňuje zachovat vysokou úroveň genetické rozmanitosti (Honnay et al., 2005). Prostorová genetická struktura je však dynamická, v průběhu času se mění a účinky náhodného genetického driftu jako je například ztráta alelické diverzity nebo zvýšený inbreeding se ještě mohou v budoucnu projevit (Gaudeul & Till-Bottraud, 2008).

Dnes uplynulo již 30–40 let od obnovy stanovišť v severovýchodní oblasti Bílých Karpat, od počátku fragmentace i více než 70 let. Otázkou zůstává, zda populace *C. glomerata*, které si

udržely poměrně vysokou genetickou diverzitu (i když pro cizosprašné a dlouhověké druhy je heterozygotita průměrně vyšší, nemůžeme říct, že u *C. glomerata* by byla genetická diverzita dramaticky snížena), zdejší fragmentaci krajiny odolaly bez negativních důsledků, díky zmírňujícím účinkům jejich životních strategií jako je například jejich dlouhověkost a zda se tyto negativní účinky již nedostaví nebo se ukážou se zpožděním. Mírná genetická diferenciaci a nižší genetická diverzita, které se objevují v populacích na severovýchodě, mohou znamenat totiž stejně tak odraz fragmentace z minulosti (která nebyla dostatečně mocná a/nebo byla zmírněna dostatečným genovým tokem) jako teprve začínající destruktivní procesy. Vše závisí na míře současného genového toku mezi populacemi. Nicméně v jihozápadních populacích je genový tok patrně vysoký a díky obnově lučních porostů v severovýchodní oblasti, kde stále více druhů může kolonizovat nová stanoviště, se mohou vytvořit nové možnosti pro opylovače, konektivita krajiny se teoreticky zvýší a potenciálně vzniklé koridory mezi starými populacemi *C. glomerata* umožní i vyšší genový tok.

(3) Závislost na historii utváření krajiny

Je také pravděpodobné, že objevené genetické pattern mohou být výsledkem dávných procesů utváření krajiny v holocénu a populace nedávnou fragmentací stanoviště zasaženy nejsou. Vyšší genetická diverzita, vysoký počet vzácných alel a nízká diferenciaci mezi i relativně vzdálenými oblastmi populací odpovídá dlouhotrvajícímu výskytu populací *C. glomerata* v jihozápadní části regionu, kde se předpokládá, že kontinuita travních porostů trvá tisíce let (Hájková et al., 2011). Travní porosty v severovýchodním regionu, jak je známe dnes, se formovaly mnohem později a jejich kontinuita je neporušená nanejvýš stovky let (Hájek et al., 2016). Proto je možná ze všeho nejpravděpodobnější, že populace *C. glomerata* se do severovýchodního regionu dostaly mnohem později, a proto mají především nižší počet vzácných alel a také mírně nižší genetickou diverzitu.

3.3 Výskyt druhu na původních loukách

Původním záměrem této práce bylo srovnání genetické diverzity populací *C. glomerata* na původních a obnovených loukách v severovýchodní oblasti, v okolí Štítná nad Vláří – Popov a Jestřabí. Nicméně *C. glomerata* se vyskytuje převážně na původních loukách, a proto nebylo možné tento záměr uskutečnit.

Je pravděpodobné, že původní stanoviště na severovýchodě sloužily v minulosti jako refugia pro mnoho zdejších druhů včetně *C. glomerata* a v současnosti z těchto míst druhy migrují na nově vzniklá, obnovená stanoviště. Jak se však ukázalo, druh není příliš dobrým

kolonizátorem obnovených luk – i přes to, že tato místa vznikla již před 30–40 lety. Jedním z vysvětlení, proč se druh na nové louky nešíří, by mohla být relativně nízká schopnost disperze semen. Dalším vysvětlením by mohly být nevhodné abiotické podmínky na nově vzniklých loukách.

C. glomerata je tedy druh, který je vázaný spíše na staré louky s dlouhou dobou kontinuity. Pro srovnání genetické diverzity na starých a nově vzniklých loukách proto *C. glomerata* nebyl vhodně zvoleným druhem. Podle Partzsch (2001) může být *C. glomerata* dokonce indikátorem konstantních environmentálních podmínek. Nicméně fakt, že se tento druh vyskytuje na severovýchodě Bílých Karpat jen na starých loukách, vlastně dokládá zdejší fragmentaci stanoviště a poukazuje na jeho zranitelnost ve srovnání s druhy, které již kolonizovaly obnovené louky. Pokud nedokázala *C. glomerata* migrovat na nově vzniklá stanoviště, genový tok mezi populacemi by mohl být omezený a zbývající refugiální populace by pak mohly být teoreticky ohroženy. Výsledky této práce však neukazují, že by byla *C. glomerata* po genetické stránce nějak ochuzena. Skutečností, která by však mohla tyto populace ohrozit, by mohla být sukcese na lokalitách v severovýchodní oblasti spojená s nedostačujícím managementem na méně přístupných místech, kde se *C. glomerata* často vyskytovala.

3.4 Vliv vlastností populací a stanovištních podmínek

3.4.1 Vliv polohy v regionu

Výsledky postupného výběru, postupného výběru skóru prvních dvou os PCA prediktorů i testování všech prediktorů jednotlivě proti parametrům genetické diverzity ukázalo téměř bezvýhradně významný vliv proměnné *Bílé Karpaty*, která určuje polohu všech populací k jihozápadního nebo severovýchodního regionu Bílých Karpat. V jihozápadním regionu jsou parametry genetické diverzity signifikantně vyšší než v severovýchodním regionu. Tyto výsledky, které ukazují průkazný rozdíl mezi dvěma studovanými regiony pro jednotlivé ukazatele genetické diverzity – alelickou diverzitu (proměnné *Nae*, $AR(k=12)$) heterozygotitu (He , Ho) a výskyt vzácných alel (*DW index*) byly podrobně diskutovány již v kapitole 3.2.1.

3.4.2 Vliv vlastností populací

V této práci byl zkoumán vliv velikosti a izolovanosti populací na ukazatele genetické diverzity. Výsledky však ukazují, že tyto vlastnosti nemají v případě populací *C. glomerata* ve studovaném systému vliv nebo alespoň nebyl tento vliv objeven. Velikost populace

i stupeň izolovanosti jsou často studovány v souvislosti s genetickou diverzitou. Fragmentace stanoviště vede ke snížení velikosti populací a k jejich izolaci, což má za následek redukcii genetické diverzity, zvýšenou diferenciaci mezi populacemi a vlivem inbreedingu a genetického driftu, který se objevuje v takových populacích, může dojít také ke snížení fitness a adaptivního potenciálu (Frankham et al., 2002; Honnay & Jacquemyn, 2007; Leimu et al., 2006; Reed & Frankham, 2003). Důležitým zjištěním pro ochranářskou genetiku také je, že vliv velikosti populace na genetickou diverzitu je u běžných druhů ve srovnání se vzácnými druhy stejně významný nebo dokonce významnější (Honnay & Jacquemyn, 2007). Van Rossum a Triest (2006) navrhuji, že populace běžných druhů musí být velké (a s velkými fragmenty), aby zůstaly životaschopné, protože právě běžné druhy mohou být více citlivé na populačně genetické důsledky klesající velikosti populace. To má významný dopad na management ochrany narušených stanovišť, kde by se měla věnovat pozornost nejen vzácným druhům, ale i běžnějším druhům, které mohou být také ohroženy.

Nicméně ne vždy se vliv velikosti populace projeví. U několika dlouhověkých vytrvalých bylin s relativně nedávnou fragmentací byl zaznamenán malý nebo žádný vliv velikosti populace na genetickou diverzitu. Například u vytrvalé byliny *Gentiana pneumonanthe* L. byla pouze marginální korelace velikosti populace s heterozygotitou a efektivním počtem alel (Raijmann et al., 1994). U druhu *Rutidosis leptorrhynchoides* bylo zjištěno, že heterozygotita nesouvisí s velikostí populace ani s izolovaností, avšak počet polymorfních lokusů a allelic richness byla velikostí populace silně ovlivněna (Young et al., 1999). Pozitivní korelaci mezi velikostí populace a počtem polymorfních lokusů, počtem efektivních alel, očekávanou heterozygotitou byla nalezena u druhu *Arnica montana*. Velikost populace zde pozitivně korelovala i s koeficientem inbreedingu, ne však s pozorovanou heterozygotitou (Luijten et al., 2000). U druhu *Succisa pratensis* nebyla žádná korelace mezi velikostí populace a očekávanou heterozygotitou, bylo však zjištěno, že v menších populacích je vyšší inbreeding (Vergeer et al., 2003). U druhu *Primula vulgaris* nebyla zjištěna žádná významná korelace mezi velikostí populace a genetickou diverzitou (Van Geert et al., 2008). V předchozí studii *C. glomerata* založené na RAPD, také nebyla nalezena spojitost mezi velikostí populace a genetickou diverzitou (Bachmann & Hensen, 2007). Bachmann a Hensen (2007) se domnívají, že malé populace jsou přeživší z původně větších populací s relativně vysokou genetickou diverzitou a že snížení velikosti populace a izolace populací jsou události, které proběhly příliš nedávno, aby měly viditelný efekt na genetickou diverzitu.

V této práci postupný výběr neprokázal významný vliv velikosti populace (logaritmované) na žádný z parametrů genetické diverzity u datasetu s 22 pozorováními (Tab. 2.12). U postupného výběru na základě PCA by se o tom dalo polemizovat, avšak jiné prediktory se zde projevují mnohem výrazněji. Navíc směr závislosti se ukazuje jako negativní (s velikostí populace klesá genetická diverzita), což značí spíše artefakt, který se objevoval i u postupného výběru při testování datasetů, které obsahovaly i malé populace (Tab. P.8 v příloze). Pouze při testování jednotlivých prediktorů samostatně vychází velikost populace signifikantní (u všech vysvětlovaných proměnných), směr závislosti je však také negativní, což je v rozporu s obecnými teoriemi a nepřikládám proto takovým výsledkům příliš velkou váhu. Vysvětlením by mohla být korelace mezi *Velikostí populace* a *Bílými Karpaty*, která je poměrně vysoká (0,59). Několik největších populací se nachází na severovýchodě Bílých Karpat (Tab. P.2 v příloze), kde je genetická diverzita ve všech formách obecně nižší, a právě tato skutečnost by mohla vysvětlovat výše uvedené výsledky.

Je také možné, že *Velikost populace* není úplně spolehlivá proměnná kvůli fluktuaci ve velikosti populací v rámci let. Bachmann a Hensen (2006) objevili, že díky přítomnosti podzemních pupenů, ze kterých *C. glomerata* obráží, výrazně kolísá počet kvetoucích lodyh vs. počet sterilních růžic mezi jednotlivými sezónami. Vzhledem k tomu, že na některých studovaných lokalitách se při sběru vyskytovalo jen málo kvetoucích lodyh nebo téměř žádné a zbytek představovaly právě rostliny ve vegetativním stádiu, snažila jsem se prohledávat lokality a počítat nejen kvetoucí jedince, ale i nekvetoucí. I přesto, že mé prohledávání na lokalitách bylo důkladné, je možné, že jsem mohla část sterilních růžic přehlédnout, což by mohlo ovlivnit výsledky. Nepochybně by bylo bývalo lepší, počítat kvetoucí jedince a sterilní růžice zvlášť a také zohlednit tuto populační dynamiku počítáním jedinců během několika let. Nicméně tyto fluktuace v kvetení mohou být pro genetickou diverzitu populací prospěšné. Každý rok se objevují nové možnosti a kombinace křížení mezi jedinci, což může zajistit vyšší variabilitu potomků (Bachmann & Hensen, 2007).

Izolovanost, kterou představuje (logaritmovaná) proměnná *Buffer* má vliv pouze na DW index, což ukázal postupný výběr i testování prediktorů samostatně (Tab. 2.12). Výsledky ukazují, že v izolovanějších populacích je DW index vzácnosti vyšší než v populacích, které jsou obklopeny mnoha jinými sousedními populacemi, takže mají vyšší konektivitu. Zajímavé ale je, když se podíváme na jednotlivé DW indexy zvlášť pro každou populaci. Například populace Q2a se dle STRUCTURE i PCoA nejvíce vyčleňovala od ostatních, což koresponduje i s její polohou (Obr. 2.3) – je silně izolovaná fyzickými bariérami od sousedních populací.

Tato populace má nejnižší DW index (Tab. 2.5), což vůbec neodpovídá výše uvedené závislosti a má současně jednu z nejvyšších hodnot proměnné *Buffer*, která nám tedy říká, že tato populace izolovaná vůbec není. Pokud se podíváme na další populace (např. G13, G7 nebo Q7b; Tab. 2.5) tento trend se opakuje. Proměnnou *Buffer* tedy hodnotím jako nesprávně koncipovanou – neodráží valně skutečnou izolovanost populací, nehledě na to, že zohledňuje pouze počet jedinců sousedních populací v dosahu půl kilometru od dané populace (což je, jak se ukázalo, zavádějící) a nezohledňuje žádné fyzické překážky v krajině.

3.4.3 Vliv stanovištních podmínek

Environmentální a ekologické faktory jsou považovány za důležité faktory, které formují prostorovou genetickou strukturu (Huang et al., 2019). V této práci byly použity jako prediktory genetické diverzity proměnné environmentálních dat odvozené z GIS, které mají vysoký potenciál pro využití v populačně genetických studiích (např. při studiu genetické divergence; Kozak et al., 2008). Jednalo se o nadmořskou výšku, sklon, Diurnal anisotropic heating index (DAHI), Topographic wetness index (TWI) a Topographic position index (TPI). Dalšími proměnnými byly Elenbergovy indikační hodnoty, široce užívané v ekologii rostlin – pro světlo, teplotu, vlhkost, půdní reakci a živiny (modifikované pro naše území; Chytrý et al., 2018). Význam ekologických faktorů pro utváření genetických pattern studovali například Alvarez et al. (2009) na alpských druzích. Tyto ekologické faktory byly vyjádřeny modifikovanými Landoltovými ukazateli rovněž pro světlo, teplotu, vlhkost, půdní reakci a živiny (Landolt, 1977) a výsledky ukázaly, že genetickou strukturu studovaných populací určuje půdní reakce.

Metodou postupného výběru vycházel signifikantní u všech vysvětlovaných proměnných (kromě koeficientu inbreedingu a unikátních alel, kde žádný z modelů nevyšel nikdy významný) prediktor *DAHI* (dokonce i u všech datasetů s odlišnými počty pozorování). Jako signifikantní se jevílo *DAHI* i při otestování tohoto prediktoru zvlášť proti všem závislým proměnným. Diurnal Anisotropic Heating Index (DAHI) je funkcí sklonu a orientace stanoviště a reprezentuje množství přímého dopadajícího slunečního záření na jednotku plochy. Výsledky nám ukazují zajímavé zjištění – vyšší genetická diverzita se objevovala na stanovištích s průměrně nižším slunečním zářením.

Postupným výběrem vycházela jako signifikantní u vysvětlovaných proměnných *Nae* a *DW index* i proměnná *Vlhkost*, která však při samostatném testování nevycházela nikde signifikantní. Vysvětlením může být rozsah hodnot *Vlhkosti*, který nepokrývá příliš velký

gradient (4,05–4,78). Vlhkost je opětovaně studovaný faktor v populačně genetických studiích. Závislost genetické diverzity na půdní vlhkosti zjišťovali ve své studii na *Atriplex tatarica* a *Sedobassia sedoides* Shuyskaya et al. (2019), nenalezli zde však žádnou spojitost. Je možné, že jejich gradient půdní vlhkosti také nebyl dostatečně široký. Vlhkost měřená z vysušených půdních vzorků nepřekročila 12 %. Vztah mezi velikostí populace a genetickou diverzitou podél srážkového gradientu (průměrné roční srážky od 300 mm do 450 mm) byl studován na malé škále ve studii mikroevolučních změn koexistujících druhů *Catananche lutea*, *Geropogon hybridus*, *Urospermum picroides* na fragmentovaném stanovišti. Výsledky podporovaly tento vztah jen pro druh *C. lutea*, u druhu *U. picroides* byly však nalezeny potenciální genomické signály adaptace na srážkový gradient (Müller et al., 2020). Ve studii *Notopterygium incisum* genetická diverzita pozitivně korelovala s ročními průměrnými srážkami, které ve studovaném území pokrývaly širší gradient – od cca 300 mm do 800 mm. Mezi nejdůležitější environmentálními faktory, které měly vliv na genetickou diverzitu u zkoumaného druhu patřila i nadmořská výška (Lucun et al., 2019), která však v této práci nemá signifikantní vliv. Opět to může být zapříčiněno malým rozsahem hodnot proměnné (300–504 m). To platí i pro ostatní proměnné, kde se neukázal žádný vliv (např. *TWT*) nebo se ukázal jen u některých způsobů testování, například u testování všech prediktorů samostatně.

Pro srovnání bylo provedeno také testování všech prediktorů zvlášť (Tab. 2.12). U všech testovaných prediktorů samostatně byly u všech vysvětlovaných proměnných kromě *DW indexu* signifikantní *Sklon* a *Světlo*. Korelace *Sklonu* a *DAHI* je však poměrně vysoká (0,64), stejně jako korelace *Světla* a *Bílých Karpat* (0,62), což může vysvětlovat jejich signifikanci při samostatném testování. *Teplota* vycházela signifikantní u závislých proměnných *AR(k=12)*, *Nae* a *DW index*. *Živiny* vycházely signifikantní u *Nae* a *DW indexu*. V PCA se jako nejvýraznější ekologické faktory jeví *Teplota*, *Půdní reakce*, *Živiny*. Avšak všechny tyto faktory – *Teplota*, *Půdní reakce* i *Živiny* jsou poměrně výrazně korelovány mezi sebou ($> |0,7|$) a každá z nich i s *Bílými Karpaty* ($> |0,55|$) (Tab. P.6). Proto je potřeba tyto výsledky interpretovat s opatrností.

3.4.4 Shrnutí všech testování

Je třeba poukázat na fakt, že vzhledem k nízkému počtu pozorování bylo vybráno příliš mnoho prediktorů. Ty byly zvoleny v podstatě experimentálně (mnohé z nich se slabou hypotézou), a tak nebylo jednoduché zvolit správný postup testování a patřičný model. Bylo by tedy žádoucí vybrat k testování menší počet prediktorů.

Jako nejvýznamnější faktor, který se objevuje ve všech analýzách se signifikantním vlivem na všechny genetické ukazatele ve studovaných populacích je prediktor *Bilé Karpaty*. Tyto výsledky jen potvrzují rozdíl v genetické diverzitě mezi severovýchodním a jihozápadním regionem, který je dán pravděpodobně právě polohou těchto regionů, což je patrně podstatnější než vliv ostatních prediktorů, které se navíc často svou mírou mezi těmito regiony liší, což může mít zásadní vliv na výsledek. Zajímavým testovaným prediktorem však bylo *DAHI*, kde se ve většině analýz ukazoval významný vliv, který značí, že populace, které se nacházejí na místě s nižší sluneční radiací mají vyšší parametry genetické diverzity. Pozoruhodné je, že tato závislost koresponduje se závislostí parametrů genetické diverzity na *Světlo* (při samostatném testování prediktorů) a ukazuje stejný trend – stanoviště s nižšími průměrnými hodnotami EIV pro světlo mají pozitivní vliv na ukazatele genetické diverzity. To může být vysvětleno častým výskytem populací *C. glomerata* na okraji luk a v těsné blízkosti křovin, kde je částečný stín. Tato chráněná stanoviště mohou být hlavním rezervoárem populací *C. glomerata* – poloha těchto částečně zastíněných okrajových míst může být výhodná, protože jsou méně dostupná a nepodléhají tak intenzivnímu managementu.

Není snadné pochopit co je hnací silou genetické diverzity, protože její kořeny spočívají v kombinaci účinků, které se projevují uvnitř populací i mezi populacemi a jsou tvořeny komplexní směsí klimatických, historických a geologických jevů (Hague & Routman, 2016). Bylo by proto velmi odvážné zobecňovat skrovné výsledky této práce a vyvozovat jakékoliv konečné závěry o příčinách genetické rozmanitosti studovaného systému.

Závěr

V této práci byla zkoumána genetická diverzita a prostorová struktura *C. glomerata* napříč malou geografickou oblastí v Bílých Karpatech, která byla v minulosti postižena fragmentací krajiny. Fragmentace stanoviště je často spojována s redukcí genetické diverzity (Aguilar et al., 2008; DiBattista, 2008). Hlavními důsledky fragmentace je snížení velikosti vhodných stanovišť společně s velikostí populací a také omezený genový tok mezi těmito populacemi. Výsledkem pak může být redukce genetické variability skrze genetický drift, a zvýšené křížení mezi příbuznými jedinci (Frankham et al., 2002). Pro srovnání genetické diverzity jako odpovědi na fragmentaci stanovišť a odlišný přístup managementu v nedávné historii byly vybrány populace ze dvou hlavních oblastí – jihozápadní (oblast NPR Čertoryje, NPR Zahrady pod hájem a NPP Búrová) a severovýchodní oblast (Štítná nad Vlárí a Jestřabí). V průběhu minulého století došlo v severovýchodní oblasti k fragmentaci travních porostů kvůli intenzifikaci zemědělství. Způsob obhospodařování krajiny se změnil, mnoho původních travních porostů bylo rozoráno. Zbývající fragmenty původních luk byly obklopeny silně odlišnou maticí krajiny představující zejména ornou půdu. V 80. a 90. letech se však část těchto zemědělských ploch zatravnila a dala vznik novým, obnoveným loukám. Výsledky však ukázaly, že populace *C. glomerata* v severovýchodní oblasti se vyskytovaly téměř výlučně na starých, původních loukách, a tak nebylo možné studovat genetickou diverzitu a strukturu na loukách obnovených. *C. glomerata* jakožto pomalý kolonizátor a rostlina, která preferuje konstantní podmínky (Partsch, 2001), indikuje spíše původní louky a tím vlastně dokládá fragmentaci krajiny v tomto regionu. Jihozápadní region Bílých Karpat změny v obhospodařování krajiny v minulém století nezasáhly tak výrazně. Zejména vybrané lokality, na nichž se *C. glomerata* vyskytovala v NPR Čertoryje, NPR Zahrady pod hájem a NPP Búrová, nebyly v minulosti rozorány a populace zde proto mohou, vzhledem k vysokému stáří těchto luk, přetrvávat i značně dlouhou dobu.

Navzdory fragmentaci krajiny měly populace *C. glomerata* ve zkoumaných oblastech poměrně vysoký stupeň genetické diverzity. Všechny ukazatele genetické diverzity však byly v průměru o něco nižší v severovýchodní oblasti – počet efektivních alel, allelic richness, očekávaná i pozorovaná heterozygotita, počet unikátních alel i DW index vzácnosti. Nicméně ve studovaných populacích nebyla nalezena silná genetická struktura. Dle AMOVY sice byla genetická diferenciace mezi studovanými regiony signifikantní, ale velice nízká. Většina variability byla vysvětlena rozdíly mezi jedinci v rámci populací. Objevil se zde však opět

rozdíl mezi populacemi jihozápadního a severovýchodního regionu – zatímco na jihozápadě se neukázala téměř žádná diferenciace mezi populacemi, na severovýchodě se mírná genetická diferenciace mezi populacemi ukázala. Přítomnost struktury a mírnou odlišnost mezi některými populacemi na severovýchodě ukázalo i shlukování programem STRUCTURE a PCoA.

Dalším zájmem této práce bylo zkoumat vliv vlastností populací a faktorů prostředí na genetickou diverzitu. Výsledky postupného výběru, testování na základě PCA i všech jednotlivých prediktorů samostatně ukazují signifikantní vliv především dvou vysvětlujících proměnných na ukazatele genetické diverzity – *Bílé Karpaty* a *DAHI*. Proměnná *Bílé Karpaty*, která udává příslušnost populací k severovýchodnímu nebo jihozápadnímu regionu, je silný prediktor, který nám říká, že geografická poloha je důležitým faktorem a že mezi těmito regiony existuje rozdíl v genetické diverzitě. Proměnná *DAHI*, která představuje míru dopadajícího slunečního záření na stanoviště, nám ukazuje, že na stanovištích s nižší *DAHI* je genetická diverzita vyšší a potvrzuje, že existují i ekologické faktory, na kterých může genetická diverzita populací záviset.

Relativně vysoká genetická diverzita a nízká diferenciace mezi populacemi *C. glomerata* může souviset s životními strategiemi druhu, jako je cizosprašnost, vytrvalost, poměrně vysoká délka života a disperzní schopnosti, které jsou na fragmentovaném stanovišti pro přenos genů mezi populacemi klíčové. Také však s kombinací dalších faktorů, jako je síla a délka fragmentace v minulosti a stav stanovišť v současnosti včetně nynějších ekologických podmínek a mezidruhových interakcí. Největším determinujícím faktorem objevených genetických pattern však může být dávná holocenní historie utváření studovaného regionu.

Výsledky značí, že tok genů a populační konektivita mezi stanovišti je dostačující pro udržení relativně vysoké genetické rozmanitosti a nízké diferenciace *C. glomerata* ve studovaném regionu, pravděpodobně díky disperzním schopnostem pylu, který dokáže opylovači přenášet mezi jednotlivými populacemi a poskytují tak odolnost proti fragmentaci stanovišť. Teoreticky je však možné, že vzhledem k poměrně vysoké délce života *C. glomerata* by se důsledky fragmentace ještě mohly v budoucnu projevit. U vytrvalých druhů se totiž očekává, že díky přetrvávání starých etablovaných jedinců, kteří v populacích stále odrážejí historické procesy (tj. dobu před fragmentací) budou negativní důsledky na genetickou diverzitu zpožděny.

Nicméně i kdyby v budoucnu měly populace tendenci ztrácet genetickou diverzitu, dostatečný genový tok v současnosti by měl vyvážit negativní procesy fragmentace v minulosti.

To platí zejména pro jihozápadní region, kde je genetická diverzita o něco vyšší než na severovýchodě. Vyšší druhová diverzita v této oblasti pravděpodobně odráží i hojnost opylovačů, kteří zajišťují potřebný genový tok v poměrně otevřené krajině a zvyšují konektivitu populací. Naproti tomu v severovýchodním regionu, kde jsou původní louky přerušovány řadou jiných obhospodařovaných ploch, může být genový tok o něco nižší, což potvrzuje fakt, že populace jsou zde mírně diferencovány. Avšak výskyt nových, obnovených luk dává šanci mnoha druhům osídlit tato stanoviště a tím postupně rozšiřovat působnost opylovačů, kteří mohou zajistit vyšší tok genů i v této oblasti. Je také důležité – vzhledem k tomu, že výskyt *C. glomerata* značí, že druh kolonizuje nové louky jen velmi pomalu – chránit původní louky v severovýchodním regionu odpovídajícím managementem, kde zarůstání méně přístupných stanovišť (lesostep, strmé svahy) by mohlo ohrozit refugiální populace, které se na nich vyskytují a poskytují genový pool pro nové potenciální populace na obnovených loukách.

Literatura

Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics research international*, 2014.

Ægisdóttir, H. H., Koller, B., Kuss, P., & Stöcklin, J. (2007). Development and characterization of microsatellite DNA markers for the Alpine plant species *Campanula thyrsoidea*. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 996–997.

Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L., & Aizen, M. A. (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology letters*, 9(8), 968–980.

Aguilar, R., Quesada, M., Ashworth, L., Herrerias-Diego, Y., & Lobo, J. (2008). Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular ecology*, 17(24), 5177–5188.

Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control*, 19(6), 716–723.

Allendorf, F. W., & Luikart, G. (2009). *Conservation and the genetics of populations*. John Wiley & Sons.

Alvarez, N., Thiel-Egenter, C., Tribsch, A., Holderegger, R., Manel, S., Schönswetter, P., ... & Gugerli, F. (2009). History or ecology? Substrate type as a major driver of patial genetic structure in Alpine plants. *Ecology Letters*, 12(7), 632–640.

Armbruster, G. F., & Stöcklin, J. (2015). New microsatellite markers for *Campanula scheuchzeri* (*Campanulaceae*), with cross-amplification in *C. rotundifolia*. *Applications in plant sciences*, 3(3), 1400118.

Bachmann, U., Hensen, I., & Partzsch, M. (2005). Is *Campanula glomerata* threatened by competition of expanding grasses? *Plant Ecology*, 180(2), 257–265.

Bachmann, U., & Hensen, I. (2006). Are population sizes of *Campanula glomerata* on the decline following the abandonment of traditional land-use practices? *Feddes Repertorium: Zeitschrift für botanische Taxonomie und Geobotanik*, 117(1–2), 164–171.

Bachmann, U., & Hensen, I. (2007). Is declining *Campanula glomerata* threatened by genetic factors? *Plant Species Biology*, 22(1), 1–10.

Balloux, F., & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular ecology*, 11(2), 155–165.

Berge, G., Nordal, I., & Hestmark, G. (1998). The effect of breeding systems and pollination vectors on the genetic variation of small plant populations within an agricultural landscape. *Oikos*, 81(1), 17–29.

- Böhner, J., & Selige, T. (2006). Spatial prediction of soil attributes using terrain analysis and climate regionalisation. In J. Boehner, K. R. McCloy, & J. Strobl (Eds.), *SAGA – Analysis and Modelling Applications*, 115, 13–28.
- Böhner, J., & Antonić, O. (2009). Land-surface parameters specific to topo-climatology. In T. Hengl & H. Reuter (Eds.), *Geomorphometry – Concepts, Software, Applications. Developments in soil science*, 33, 195–226.
- Bredenkamp, G. J., Spada, F., & Kazmierczak, E. (2002). On the origin of northern and southern hemisphere grasslands. *Plant Ecology*, 163(2), 209–229.
- Breed, M. F., Ottewell, K. M., Gardner, M. G., Marklund, M. H., Dormontt, E. E., & Lowe, A. J. (2015). Mating patterns and pollinator mobility are critical traits in forest fragmentation genetics. *Heredity*, 115(2), 108–114.
- Conrad, O., Bechtel, B., Bock, M., Dietrich, H., Fischer, E., Gerlitz, L., ... & Böhner, J. (2015). System for automated geoscientific analyses (SAGA) v. 2.1.4. *Geoscientific Model Development Discussions*, 8(2).
- Culek, M. (1995). *Biogeografické členění České republiky*. Praha: Enigma.
- Český úřad zeměměřický a katastrální. Archiv leteckých měřičských snímků. *Geoportál ČÚZK*. Revize 1.6.2015 [cit. 29.7.2020].
Dostupné z: https://lms.cuzk.cz/lms/lms_prehl_05.html#
- Danihelka, J., Chrtěk Jun. J., & Kaplan, Z. (2012). Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia*, 84(3), 647–811.
- DiBattista, J. D. (2008). Patterns of genetic variation in anthropogenically impacted populations. *Conservation Genetics*, 9(1), 141–156.
- Dieringer, D., & Schlötterer, C. (2003). Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular ecology notes*, 3(1), 167–169.
- Dřevojan P. (2020). Růstová forma. In: *Pladias – databáze české flóry a vegetace*, www.pladias.cz © 2014–2020 [cit. 29.7.2020]. Dostupné z: <https://pladias.cz/taxon/data/Campanula%20glomerata#10>
- Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359–361.
- Ehrich, D. (2006). AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes*, 6(3), 603–604.
- Ehrich, D., Gaudeul, M., Assefa, A., Koch, M. A., Mummenhoff, K., Nemomissa, S., ... & Brochmann, C. (2007). Genetic consequences of Pleistocene range shifts: contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular ecology*, 16(12), 2542–2559.
- Ellstrand, N. C. (2014). Is gene flow the most important evolutionary force in plants?. *American journal of botany*, 101(5), 737–753.

Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual review of Ecology and Systematics*, 24(1), 217–242.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611–2620.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564–567.

Fischer, M., & Matthies, D. (1998). RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, 85(6), 811–819.

Frank, D., & Neumann, V. (1999). *Bestandssituation der Pflanzen und Tiere Sachsen-Anhalts*. Stuttgart: Ulmer.

Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

Futák, P., Šimša, M., Piro, Z., & Jongepierová, I. (2008). Historie obhospodařování. In I. Jongepierová (Ed.), *Louky Bílých Karpat (Grasslands of the White Carpathian Mountains)* (s. 38–45). Veselí nad Moravou: ZO ČSOP Bílé Karpaty.

Gadella, T. W. J. (1963). Some Cytological observations in the genus *Campanula*. II (a preliminary survey). *Mededelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijksuniversiteit te Utrecht*, 198(1), 1–14.

Gaudeul, M., & Till-Bottraud, I. (2008). Genetic structure of the endangered perennial plant *Eryngium alpinum* (Apiaceae) in an alpine valley. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93(4), 667–677.

GISAT s.r.o. GISAT. © 2007 [cit. 29.7.2020]. Dostupné z: <http://www.gisat.cz/content/cz/produkty/data-ke-stazeni>

Godefroid, S., Le Pajolec, S., & Van Rossum, F. (2016). Rescuing critically endangered species in Belgium – an ambitious reintroduction program of the Botanic Garden Meise. *BGjournal*, 13(2), 24–27.

González, A. V., Gómez-Silva, V., Ramírez, M. J., & Fontúrbel, F. E. (2020). Meta-analysis of the differential effects of habitat fragmentation and degradation on plant genetic diversity. *Conservation Biology*, 34(3), 711–720.

Greenleaf, S. S., Williams, N. M., Winfree, R., & Kremen, C. (2007). Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia*, 153(3), 589–596.

Grulich, V. (2008). Fytogeografie. In I. Jongepierová (Ed.), *Louky Bílých Karpat (Grasslands of the White Carpathian Mountains)* (s. 81–88). Veselí nad Moravou: ZO ČSOP Bílé Karpaty.

Grulich, V., & Chobot, K. (Eds.) (2017). Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Cévnaté rostliny. 35, 1–178. Praha: Příroda.

Hague, M. T. J., & Routman, E. J. (2016). Does population size affect genetic diversity? A test with sympatric lizard species. *Heredity*, 116(1), 92–98.

Hájek, M., Dudová, L., Hájková, P., Roleček, J., Moutelíková, J., Jamrichová, E., & Horsák, M. (2016). Contrasting Holocene environmental histories may explain patterns of species richness and rarity in a Central European landscape. *Quaternary Science Reviews*, 133, 48–61.

Hájková, P., Roleček, J., Hajek, M., Horsák, M., Fajmon, K., Polák, M., & Jamrichova, E. (2011). Prehistoric origin of the extremely species-rich semi-dry grasslands in the Bílé Karpaty Mts (Czech Republic and Slovakia). *Preslia*, 83(2), 185–204.

Hájková, P., Jamrichová, E., Petr, L., Dudová, L., Roleček, J., Gálová, A., ... & Hájek, M. (2018). Persistence of a vegetation mosaic in a peripheral region: could turbulent medieval history disrupt Holocene continuity of extremely species-rich grasslands?. *Vegetation History and Archaeobotany*, 27(4), 591–610.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.

Hamrick, J. L., & Godt, M. J. W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1345), 1291–1298.

Hedrick, P. W. (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59(8), 1633–1638.

Hejcman, M., Hejcmanova, P., Pavlů, V., & Beneš, J. (2013). Origin and history of grasslands in Central Europe – a review. *Grass and Forage Science*, 68(3), 345–363.

Helsen, K., Jacquemyn, H., Hermy, M., Vandepitte, K., & Honnay, O. (2013). Rapid buildup of genetic diversity in founder populations of the gynodioecious plant species *Origanum vulgare* after semi-natural grassland restoration. *PLoS One*, 8(6), e67255.

Herrera, C. M. (1987). Components of pollinator "quality": comparative analysis of a diverse insect assemblage. *Oikos*, 50(1), 79–90.

Honnay, O., Jacquemyn, H., Bossuyt, B., & Hermy, M. (2005). Forest fragmentation effects on patch occupancy and population viability of herbaceous plant species. *New Phytologist*, 166(3), 723–736.

Honnay, O., & Jacquemyn, H. (2007). Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 21(3), 823–831.

Huang, R., Chu, Q. H., Lu, G. H., & Wang, Y. Q. (2019). Comparative studies on population genetic structure of two closely related selfing and outcrossing *Zingiber* species in Hainan Island. *Scientific reports*, 9(1), 1–11.

- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*, 9(5), 1322–1332.
- Hušek, R. (2007). *Ekonometrická analýza*. Praha: Oeconomia.
- Chytrý, M., Dražil, T., Hajek, M., Kalníková, V., Preislerova, Z., Šibík, J., ... & Vymazalová, M. (2015). The most species-rich plant communities in the Czech Republic and Slovakia (with new world records). *Preslia*, 87(3), 217–278.
- Chytrý, M., Tichý, L., Dřevojan, P., Sádlo, J., & Zelený, D. (2018). Ellenbergtype indicator values for the Czech flora. *Preslia*, 90(2), 83–103.
- Ilves, A., Metsare, M., Tali, K., & Kull, T. (2015). The impact of recent colonization on the genetic diversity and fine-scale genetic structure in *Orchis militaris* (L.). *Plant Systematics and Evolution*, 301(7), 1875–1886.
- Janovský Z. (2020). Opylovači. In: *Pladias – databáze české flóry a vegetace*, www.pladias.cz. © 2014–2020 [cit. 29.7.2020]. Dostupné z: <https://pladias.cz/taxon/data/Campanula%20glomerata#10>
- Jongepierová, I. (2008). *Louky Bílých Karpat*. Veselí nad Moravou: Český svaz ochránců přírody (ČSOP) Bílé Karpaty.
- Kaplan, Z., Danihelka, J., Chrtek J. jun., Kirschner, J., Kubát, J., Štech, M., & Štěpánek, J. (Eds.) (2019). *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia.
- Klimeš, L. (2008). Druhové bohatství luk. In I. Jongepierová (Ed.), *Louky Bílých Karpat (Grasslands of the White Carpathian Mountains)* (s. 89–94). Veselí nad Moravou: ZO ČSOP Bílé Karpaty.
- Klimešová, J. (2018). *Temperate herbs: An architectural analysis*. Praha: Academia.
- Klotz, S., Kühn, I., Durka, W., & Briemle, G. (2002). *BIOLFLOR: Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland*. 38. Bonn: Bundesamt für Naturschutz.
- Kotlínek, M., Těšitelová, T., Košnar, J., Fibich, P., Hemrová, L., Koutecký, P., Münzbergová, Z., & Jersáková, J. (2020). Seed dispersal and realized gene flow of two forest orchids in a fragmented landscape. *Plant Biology*, 22(3), 522–532.
- Kovanda, M. (2000). *Campanula L. – zvonek*. In B. Slavík, J. jun. Chrtek, & J. Štěpánková (Eds.), *Květena České republiky 6* (s. 726–748). Praha: Academia.
- Kozak, K. H., Graham, C. H., & Wiens, J. J. (2008). Integrating GIS-based environmental data into evolutionary biology. *Trends in ecology & evolution*, 23(3), 141–148.
- Krumbiegel, A. (2002). Morphologie der vegetativen Organe (außer Blätter). In S. Klotz, I. Kühn, & W. Durka (Eds.), *BIOLFLOR: Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland*. 38. (s. 93–118).
- Kuča, P., Májský, J., Kopeček, F., & Jongepierová, I. (Eds.) (1992). *Chráněná krajinná oblast Biele/Bílé Karpaty*. Bratislava: Ekológia.

Kühn, I., & Klotz, S. (2002). Angaben zu den Arealen. In S. Klotz, I. Kühn, & W. Durka (Eds.), *BIOLFLOR: Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland*. 38 (s. 227–239).

Kwak, M. M., Velterop, O., & van Andel, J. (1998). Pollen and gene flow in fragmented habitats. *Applied Vegetation Science*, 1(1), 37–54.

Landolt, E. (1977). Oekologische Zeigerwerte zur Schweizer Flora. *Veröff. Geobot. Inst. ETH Zürich*, 64, 1–208.

Leberg, P. L. (2002). Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. *Molecular ecology*, 11(11), 2445–2449.

Leimu, R., Mutikainen, P. I. A., Koricheva, J., & Fischer, M. (2006). How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*, 94(5), 942–952.

Lipský, Z. (1995). The changing face of the Czech rural landscape. *Landscape and Urban Planning*, 31(1), 39–45.

Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6–13.

Loveless, M. D., & Hamrick, J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and systematics*, 15(1), 65–95.

Lowe, A. J., Boshier, D., Ward, M., Bacles, C. F. E., & Navarro, C. (2005). Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, 95(4), 255–273.

Ložek, V. (2007). *Zrcadlo minulosti. Česká a slovenská krajina v kvartéru*. Praha: Dokořán.

Ložek, V. (2008). Vývoj v době poledové. In I. Jongepierová (Ed.), *Louky Bílých Karpat (Grasslands of the White Carpathian Mountains)* (s. 24–28). Veselí nad Moravou: ZO ČSOP Bílé Karpaty.

Ložek, V. (2011). *Po stopách pravěkých dějů. O silách, které vytvářely naši krajinu*. Praha: Dokořán.

Lucun, Y., Guangxin, L., Yuhong, Z., & Zhou, G. (2019). Effects of environmental factors on the population genetic diversity in the Chinese endangered and endemic medicinal plant *Notopterygium incisum*. *Pakistan Journal of Botany*, 51(5), 1783–1791.

Luijten, S. H., Dierick, A., Gerard, J., Oostermeijer, B., Raijmann, L. E., & Den Nijs, H. C. (2000). Population size, genetic variation, and reproductive success in a rapidly declining, self-incompatible perennial (*Arnica montana*) in The Netherlands. *Conservation Biology*, 14(6), 1776–1787.

- Mackovčín, P., & Jatiová, M. (Eds.) (2002). Zlínsko. In P. Mackovčín & M. Sedláček, *Chráněná území ČR, svazek II* (s. 376). Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky a Eko Centrum Brno.
- Meeus, S., Honnay, O., Brys, R., & Jacquemyn, H. (2012). Biased morph ratios and skewed mating success contribute to loss of genetic diversity in the distylous *Pulmonaria officinalis*. *Annals of Botany*, *109*(1), 227–235.
- Meirmans, P. G., & Hedrick, P. W. (2011). Assessing population structure: *FST* and related measures. *Molecular ecology resources*, *11*(1), 5–18.
- Müller, C. M., Linke, B., Strickert, M., Ziv, Y., Giladi, I., & Gemeinholzer, B. (2020). Comparative genomic analysis of three co-occurring annual *Asteraceae* along micro-geographic fragmentation scenarios. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *42*, 125486.
- Münzbergová, Z., Cousins, S. A., Herben, T., Plačková, I., Mildén, M., & Ehrlén, J. (2013). Historical habitat connectivity affects current genetic structure in a grassland species. *Plant Biology*, *15*(1), 195–202.
- Naimi, B., Hamm, N. A., Groen, T. A., Skidmore, A. K., & Toxopeus, A. G. (2014). Where is positional uncertainty a problem for species distribution modelling? *Ecography*, *37*(2), 191–203.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, *89*(3), 583–590.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(12), 3321–3323.
- Nielsen, R., Tarpay, D. R., & Reeve, H. K. (2003). Estimating effective paternity number in social insects and the effective number of alleles in a population. *Molecular ecology*, *12*(11), 3157–3164.
- Nishihiro, J., Uesugi, R., Takagawa, S., & Washitani, I. (2009). Toward the restoration of a sustainable population of a threatened aquatic plant, *Nymphoides peltata*: Integrated genetic/demographic studies and practices. *Biological conservation*, *142*(9), 1906–1912.
- Nordborg, M., Hu, T. T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C., Zheng, H., ... & Bergelson J. (2005). The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol*, *3*(7), e196.
- Novák, J., Roleček, J., Dresler, P., & Hájek, M. (2019). Soil charcoal elucidates the role of humans in the development of landscape of extreme biodiversity. *Land Degradation & Development*, *30*(13), 1607–1619.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology*, *13*(5), 1143–1155.
- Ony, M. A., Nowicki, M., Boggess, S. L., Klingeman, W. E., Zobel, J. M., Trigiano, R. N., & Hadziabdic, D. (2020). Habitat fragmentation influences genetic diversity and differentiation: Fine-scale population structure of *Cercis canadensis* (eastern redbud). *Ecology and Evolution*, *10*(8), 3655–3670.

- Otýpková, Z., Chytrý, M., Tichý, L., Pechanec, V., Jongepier, J. W., & Hájek, O. (2011). Floristic diversity patterns in the White Carpathians biosphere reserve, Czech Republic. *Biologia*, 66(2), 266–274.
- Partzsch, M. (2001). Die Porphyrkuppenlandschaft des unteren Saaletals-Vergleich der Vegetation in Abhängigkeit von Flachengroße und Genese der Prophyrkuppen. *Botanische Jahrbucher fur Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 123, 1–45.
- Paun, O., Schönswetter, P., Winkler, M., Consortium, I., & Tribsch, A. (2008). Historical divergence vs. contemporary gene flow: evolutionary history of the calcicole *Ranunculus alpestris* group (*Ranunculaceae*) in the European Alps and the Carpathians. *Molecular Ecology*, 17(19), 4263–4275.
- Pechanec, V., & Jongepierová, I. (2008). Popis území. In I. Jongepierová (Ed.), *Louky Bílých Karpat (Grasslands of the White Carpathian Mountains)* (s. 15–23). Veselí nad Moravou: ZO ČSOP Bílé Karpaty.
- Primack, R. B., & Miao, S. L. (1992). Dispersal can limit local plant distribution. *Conservation Biology*, 6(4), 513–519.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- QGIS Development Team (2016): QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.
- R Core Team. (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Raabová, J., Van Rossum, F., Jacquemart, A. L., & Raspé, O. (2015). Population size affects genetic diversity and fine-scale spatial genetic structure in the clonal distylous herb *Menyanthes trifoliata*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 17(3), 193–200.
- Radosavljević, I., Jakse, J., Satovic, Z., Javornik, B., Janković, I., & Liber, Z. (2015). New microsatellite markers for *Campanula pyramidalis* (*Campanulaceae*) and cross-amplification in closely related species. *Applications in plant sciences*, 3(3), 1400117.
- Raijmann, L. E., Van Leeuwen, N. C., Kersten, R., Oostermeijer, J. G. B., Den Nijs, H. C., & Menken, S. B. (1994). Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology*, 8(4), 1014–1026.
- Ramasamy, R. K., Ramasamy, S., Bindroo, B. B., & Naik, V. G. (2014). STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus*, 3(1), 1–3.
- Reed, D. H., & Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation biology*, 17(1), 230–237.
- Reiner, G., Lang, M., & Willems, H. (2019). Impact of different panels of microsatellite loci, different numbers of loci, sample sizes, and gender ratios on population genetic results in red deer. *European Journal of Wildlife Research*, 65(2), 25.

- Reisch, C., & Bernhardt-Römermann, M. (2014). The impact of study design and life history traits on genetic variation of plants determined with AFLPs. *Plant Ecology*, 215(12), 1493–1511.
- Roleček, J., Čornej, I. I., & Tokarjuk, A. I. (2014). Understanding the extreme species richness of semi-dry grasslands in east-central Europe: a comparative approach. *Preslia*, 86(1), 13–34.
- Roleček, J., Hájek, M., Karlík, P., & Novák, J. (2015). Reliktní vegetace na mezických stanovištích. *Zprávy České botanické společnosti*, (2).
- Shuyskaya, E. V., Rakhmankulova, Z. F., & Suyundukov, Y. T. (2019). Genetic diversity in annual xerohalophytes of the family *Chenopodiaceae* along soil moisture and salinity gradients. *Russian Journal of Ecology*, 50(1), 13–19.
- Schönswetter, P., & Tribsch, A. (2005). Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (*Apiaceae*). *Taxon*, 54(3), 725–732.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, 18(2), 233–234.
- Skalický, V. (1988). Regionálně fytogeografické členění. In S. Hejný & B. Slavík (Ed.), *Květena České socialistické republiky I.* (s. 103–121). Praha: Academia.
- Slatkin, M. (1977). Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theoretical population biology*, 12(3), 253–262.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236(4803), 787–792.
- Sork, V. L., Nason, J., Campbell, D. R., & Fernandez, J. F. (1999). Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(6), 219–224.
- Starfinger, U., & Stöcklin, J. (1996). Seed, pollen, and clonal dispersal and their role in structuring plant populations. In H.-D. Behnke, U. Lüttge, K. Esser, J. W. Kadereit, & M. Runge (Eds.), *Progress in Botany/Fortschritte der Botanik: Structural Botany Physiology Genetics Taxonomy Geobotany/Struktur Physiologie Genetik Systematik Geobotanik* (s. 336–355). Springer.
- Strzałkowska-Abramek, M., Jachuła, J., Wrzesień, M., Božek, M., Dąbrowska, A., & Denisow, B. (2018). Nectar production in several *Campanula* species (*Campanulaceae*). *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 17, 127–136.
- Šmarda P. (2018). Stupeň ploidie (x). In: *Pladias – databáze české flóry a vegetace*, www.pladias.cz. © 2014–2020 [cit. 29.7.2020]. Dostupné z: <https://pladias.cz/taxon/data/Campanula%20glomerata#10>
- Štika, J. (1958). Salašnické ustájování dobytka a košárování na moravskoslovenském pomezí. *Český lid*, 64–74.

- Van Dyke, F. (2008). *Conservation biology: foundations, concepts, applications*. Springer Science & Business Media.
- Van Geert, A., Van Rossum, F., & Triest, L. (2008). Genetic diversity in adult and seedling populations of *Primula vulgaris* in a fragmented agricultural landscape. *Conservation Genetics*, 9(4), 845–853.
- Van Rossum, F., & Triest, L. (2006). Fine-scale genetic structure of the common *Primula elatior* (Primulaceae) at an early stage of population fragmentation. *American Journal of Botany*, 93(9), 1281–1288.
- Van Rossum, F. (2008). Conservation of long-lived perennial forest herbs in an urban context: *Primula elatior* as study case. *Conservation Genetics*, 9(1), 119–128.
- Vergeer, P., Rengelink, R., Copal, A., & Ouborg, N. J. (2003). The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of *Succisa pratensis*. *Journal of Ecology*, 91(1), 18–26.
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. D. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and molecular biology*, 39(3), 312–328.
- Vranckx, G. U. Y., Jacquemyn, H., Muys, B., & Honnay, O. (2012). Meta-analysis of susceptibility of woody plants to loss of genetic diversity through habitat fragmentation. *Conservation biology*, 26(2), 228–237.
- Walther-Hellwig, K., & Frankl, R. (2000). Foraging habitats and foraging distances of bumblebees, *Bombus* spp. (Hym., Apidae), in an agricultural landscape. *Journal of Applied Entomology*, 124(7–8), 299–306.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370.
- Westphal, C., Steffan-Dewenter, I., & Tschardt, T. (2006). Bumblebees experience landscapes at different spatial scales: possible implications for coexistence. *Oecologia*, 149(2), 289–300.
- Wilcock, C., & Neiland, R. (2002). Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in plant science*, 7(6), 270–277.
- Wilson, J. P., & Gallant, J. C. (2000). Primary Topographic Attributes. In J. P. Wilson & J. C. Gallant (Eds.), *Terrain Analysis: Principles and Applications* (s. 51–85). John Wiley & Sons.
- Wratten, S. D., Bowie, M. H., Hickman, J. M., Evans, A. M., Sedcole, J. R., & Tylianakis, J. M. (2003). Field boundaries as barriers to movement of hover flies (*Diptera: Syrphidae*) in cultivated land. *Oecologia*, 134(4), 605–611.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of eugenics*, 15(1), 323–354.

Young, A., Boyle, T., & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in ecology & evolution*, *11*(10), 413–418.

Young, A. G., Brown, A. H. D., & Zich, F. A. (1999). Genetic structure of fragmented populations of the endangered daisy *Rutidosis leptorrhynchoides*. *Conservation Biology*, *13*(2), 256–265.

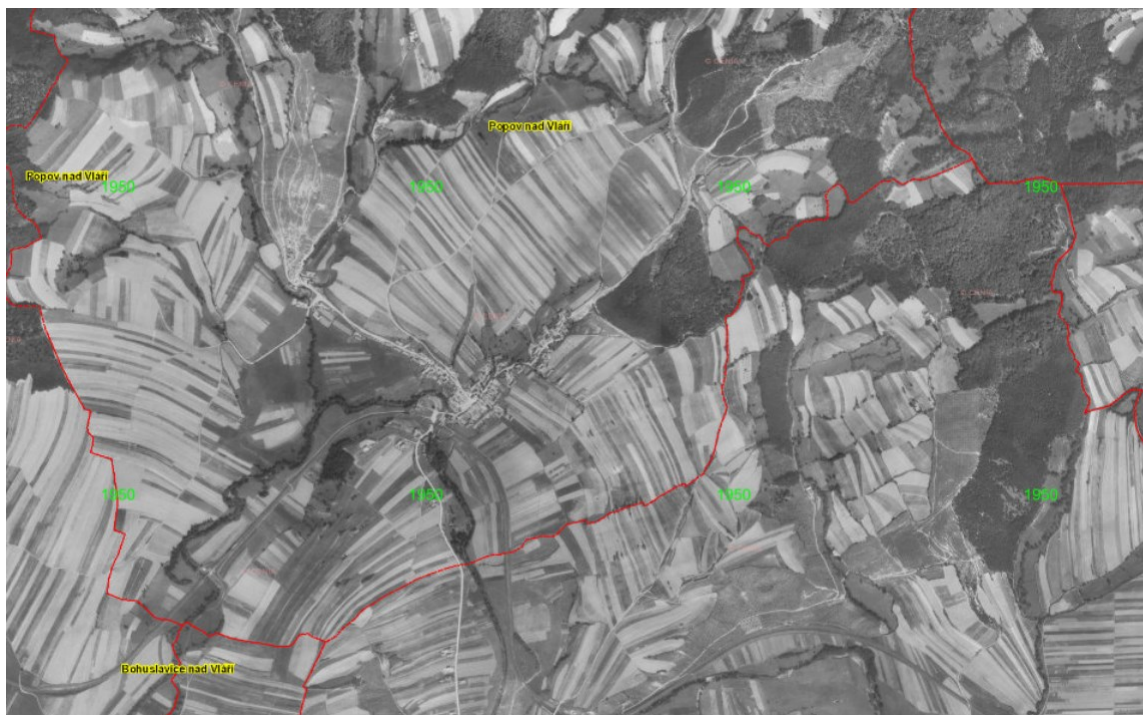
Yuan, N., Comes, H. P., Mao, Y. R., Qi, X. S., & Qiu, Y. X. (2012). Genetic effects of recent habitat fragmentation in the Thousand-Island Lake region of southeast China on the distylous herb *Hedyotis chrysotricha* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, *99*(10), 1715–1725.

Zevenbergen, L. W., & Thorne, C. R. (1987). Quantitative analysis of land surface topography. *Earth surface processes and landforms*, *12*(1), 47–56.

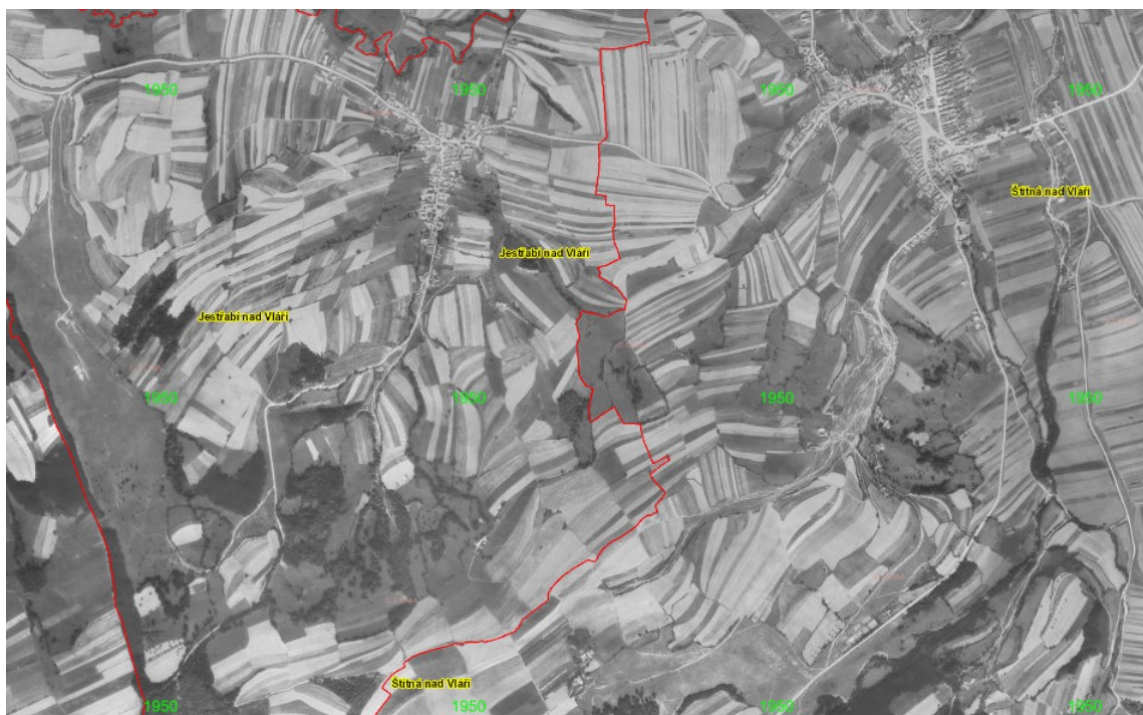
Zurbuchen, A., Landert, L., Klaiber, J., Müller, A., Hein, S., & Dorn, S. (2010). Maximum foraging ranges in solitary bees: only few individuals have the capability to cover long foraging distances. *Biological Conservation*, *143*(3), 669–676.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in ecology and evolution*, *1*(1), 3–14.

Přílohy



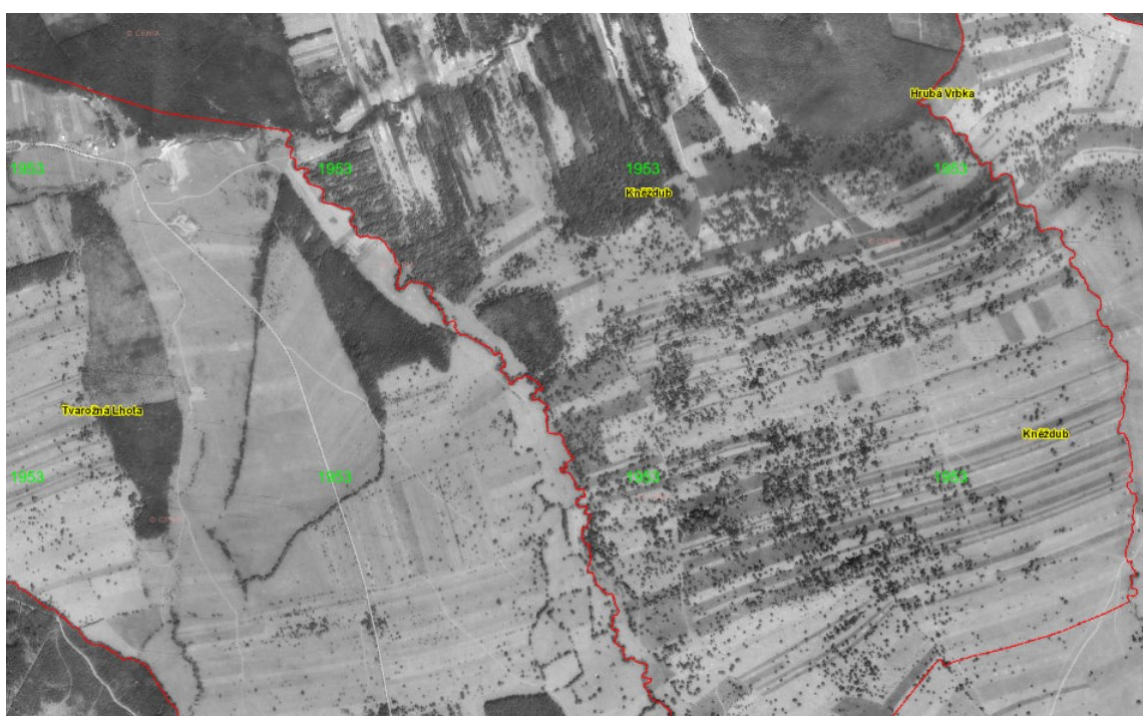
Obr. P.1 Letecký snímek z roku 1950 – Štítná nad Vláří, Popov (Národní archiv leteckých měřičských snímků, printscreen 24. 4. 2020 z https://lms.cuzk.cz/lms/lms_prehl_05.html).



Obr. P.2 Letecký snímek z roku 1950 – Jestřabí, Štítná nad Vláří. (Národní archiv leteckých měřičských snímků, printscreen 24. 4. 2020 z https://lms.cuzk.cz/lms/lms_prehl_05.html).



Obr. P.3 Letecký snímek z roku 1950 – NPR Zahrady pod Hájem (Národní archiv leteckých měřičských snímků, printscreen 24. 4. 2020 z https://lms.cuzk.cz/lms/lms_prehl_05.html).



Obr. P.4 Letecký snímek z roku 1953 – NPR Čertoryje. (Národní archiv leteckých měřičských snímků, printscreen 24. 4. 2020 z https://lms.cuzk.cz/lms/lms_prehl_05.html).



Obr. P.5 Letecký snímek z roku 1950 – NPP Búrová. (Národní archiv leteckých měřičských snímků, printscreen 24. 4. 2020 z https://lms.cuzk.cz/lms/lms_prehl_05.html).

	G7	G5	G1	G13	G3	G2	Q2a	Q4	Q5	Q6a	Q7b	Q7g	Q8	Q11	Q12	C5	C7	C10	C14	C1	C2a	C2b	C3	C4	C6d	C8	C9	C11a	C12a	C13
G7	-	0,046	0,109	0,070	0,065	0,083	0,113	0,089	0,067	0,053	0,065	0,042	0,084	0,064	0,084	0,053	0,066	0,074	0,067	0,061	0,044	0,081	0,078	0,073	0,063	0,057	0,110	0,052	0,053	0,156
G5	0,046	-	0,116	0,033	0,065	0,044	0,172	0,067	0,043	0,034	0,056	-0,001	0,059	0,046	0,036	0,013	0,027	0,021	-0,012	0,033	0,016	0,074	0,075	0,067	0,029	0,055	0,088	0,021	0,028	0,173
G1	0,109	0,116	-	0,088	0,133	0,142	0,196	0,108	0,104	0,086	0,097	0,082	0,141	0,102	0,098	0,075	0,095	0,073	0,096	0,080	0,067	0,101	0,068	0,135	0,089	0,066	0,151	0,100	0,063	0,224
G13	0,070	0,033	0,088	-	0,107	0,143	0,147	0,091	0,058	0,060	0,043	0,037	0,107	0,087	0,073	0,035	0,069	0,046	0,057	0,058	0,040	0,074	0,065	0,086	0,056	0,048	0,073	0,063	0,054	0,121
G3	0,065	0,065	0,133	0,107	-	0,122	0,194	0,109	0,102	0,074	0,082	0,059	0,094	0,088	0,079	0,083	0,094	0,098	0,070	0,092	0,069	0,121	0,121	0,147	0,086	0,097	0,137	0,072	0,073	0,177
G2	0,083	0,044	0,142	0,143	0,122	-	0,123	0,085	0,050	0,025	0,066	0,011	-0,001	0,014	0,035	0,024	0,020	0,021	0,014	0,030	0,035	0,083	0,088	0,042	0,003	0,097	-	0,052	0,032	-
Q2a	0,113	0,172	0,196	0,147	0,194	0,123	-	0,162	0,150	0,131	0,123	0,100	0,149	0,146	0,155	0,111	0,104	0,134	0,113	0,108	0,149	0,147	0,175	0,164	0,107	0,120	0,184	0,135	0,130	0,275
Q4	0,089	0,067	0,108	0,091	0,109	0,085	0,162	-	0,106	0,060	0,103	0,073	0,098	0,068	0,091	0,073	0,083	0,087	0,080	0,087	0,060	0,100	0,095	0,140	0,080	0,068	0,052	0,071	0,060	0,173
Q5	0,067	0,043	0,104	0,058	0,102	0,050	0,150	0,106	-	0,033	0,026	0,027	0,084	0,081	0,052	0,024	0,030	0,019	0,020	0,018	0,023	0,033	0,041	0,033	0,019	0,003	0,010	0,026	0,012	0,024
Q6a	0,053	0,034	0,086	0,060	0,074	0,025	0,131	0,060	0,033	-	0,032	0,020	0,059	0,039	0,036	0,023	0,031	0,041	0,032	0,029	0,014	0,050	0,047	0,045	0,025	0,011	0,044	0,034	0,024	0,072
Q7b	0,065	0,056	0,097	0,043	0,082	0,066	0,123	0,103	0,026	0,032	-	0,026	0,059	0,053	0,034	0,025	0,038	0,028	0,036	0,028	0,028	0,052	0,052	0,066	0,024	0,018	0,050	0,028	0,027	0,075
Q7g	0,042	-0,001	0,082	0,037	0,059	0,011	0,100	0,073	0,027	0,020	0,026	-	0,058	0,042	0,038	0,014	0,019	0,021	0,009	0,018	0,020	0,044	0,047	0,045	0,021	0,005	0,019	0,022	0,022	0,085
Q8	0,084	0,059	0,141	0,107	0,094	-0,001	0,149	0,098	0,084	0,059	0,059	0,058	-	0,068	0,043	0,072	0,076	0,061	0,055	0,071	0,069	0,115	0,100	0,137	0,063	0,064	0,112	0,063	0,057	0,139
Q11	0,064	0,046	0,102	0,087	0,088	0,014	0,146	0,068	0,081	0,039	0,053	0,042	0,068	-	0,034	0,050	0,053	0,064	0,049	0,050	0,038	0,080	0,077	0,102	0,047	0,049	0,085	0,047	0,051	0,165
Q12	0,084	0,036	0,098	0,073	0,079	0,035	0,155	0,091	0,052	0,036	0,034	0,038	0,043	0,034	-	0,051	0,041	0,034	0,034	0,034	0,036	0,066	0,063	0,094	0,039	0,039	0,061	0,033	0,029	0,117
C5	0,053	0,013	0,075	0,035	0,083	0,024	0,111	0,073	0,024	0,023	0,025	0,014	0,072	0,050	0,051	-	0,014	0,013	0,011	0,004	0,000	0,029	0,042	0,015	0,008	-0,016	-0,016	0,017	0,014	0,032
C7	0,066	0,027	0,095	0,069	0,094	0,020	0,104	0,083	0,030	0,031	0,038	0,019	0,076	0,053	0,041	0,014	-	0,021	0,015	-0,003	0,018	0,014	0,052	0,033	0,001	0,006	0,036	0,021	0,019	0,034
C10	0,074	0,021	0,073	0,046	0,098	0,021	0,134	0,087	0,019	0,041	0,028	0,021	0,061	0,064	0,034	0,013	0,021	-	0,009	0,009	0,009	0,029	0,040	0,042	0,008	0,000	0,039	0,023	0,009	0,032
C14	0,067	-0,012	0,096	0,057	0,070	0,014	0,113	0,080	0,020	0,032	0,036	0,009	0,055	0,049	0,034	0,011	0,015	0,009	-	0,004	0,015	0,042	0,056	0,046	0,001	-0,007	0,016	0,022	0,011	0,066
C1	0,061	0,033	0,080	0,058	0,092	0,030	0,108	0,087	0,018	0,029	0,028	0,018	0,071	0,050	0,034	0,004	-0,003	0,009	0,004	-	0,013	0,014	0,029	0,018	-0,001	-0,004	0,041	0,018	0,010	0,056
C2a	0,044	0,016	0,067	0,040	0,069	0,035	0,149	0,060	0,023	0,014	0,028	0,020	0,069	0,038	0,036	0,000	0,018	0,009	0,015	0,013	-	0,023	0,036	0,031	0,011	-0,017	0,021	0,013	0,004	0,045
C2b	0,081	0,074	0,101	0,074	0,121	0,083	0,147	0,100	0,033	0,050	0,052	0,044	0,115	0,080	0,066	0,029	0,014	0,029	0,042	0,014	0,023	-	0,046	0,039	0,020	0,031	0,036	0,035	0,032	0,069
C3	0,078	0,075	0,068	0,065	0,121	0,088	0,175	0,095	0,041	0,047	0,052	0,047	0,100	0,077	0,063	0,042	0,052	0,040	0,056	0,029	0,036	0,046	-	0,061	0,039	0,025	0,030	0,036	0,021	0,103
C4	0,073	0,067	0,135	0,086	0,147	0,042	0,164	0,140	0,033	0,045	0,066	0,045	0,137	0,102	0,094	0,015	0,033	0,042	0,046	0,018	0,031	0,039	0,061	-	0,036	-0,008	0,010	0,060	0,049	-0,028
C6d	0,063	0,029	0,089	0,056	0,086	0,003	0,107	0,080	0,019	0,025	0,024	0,021	0,063	0,047	0,039	0,008	0,001	0,008	0,001	-0,001	0,011	0,020	0,039	0,036	-	-0,010	-0,004	0,019	0,011	-0,009
C8	0,057	0,055	0,066	0,048	0,097	0,097	0,120	0,068	0,003	0,011	0,018	0,005	0,064	0,049	0,039	-0,016	0,006	0,000	-0,007	-0,004	-0,017	0,031	0,025	-0,008	-0,010	-	0,046	-0,003	-0,027	0,045
C9	0,110	0,088	0,151	0,073	0,137	-	0,184	0,052	0,010	0,044	0,050	0,019	0,112	0,085	0,061	-0,016	0,036	0,039	0,016	0,041	0,021	0,036	0,030	0,010	-0,004	0,046	-	-0,021	-0,020	-
C11a	0,052	0,021	0,100	0,063	0,072	0,052	0,135	0,071	0,026	0,034	0,028	0,022	0,063	0,047	0,033	0,017	0,021	0,023	0,022	0,018	0,013	0,035	0,036	0,060	0,019	-0,003	-0,021	-	0,006	0,064
C12a	0,053	0,028	0,063	0,054	0,073	0,032	0,130	0,060	0,012	0,024	0,027	0,022	0,057	0,051	0,029	0,014	0,019	0,009	0,011	0,010	0,004	0,032	0,021	0,049	0,011	-0,027	-0,020	0,006	-	0,033
C13	0,156	0,173	0,224	0,121	0,177	-	0,275	0,173	0,024	0,072	0,075	0,085	0,139	0,165	0,117	0,032	0,034	0,032	0,066	0,056	0,045	0,069	0,103	-0,028	-0,009	0,045	-	0,064	0,033	-

Tab. P.1 F_{ST} matice párových genetických vzdáleností mezi populacemi.

Populace	Bílé Karpaty	Lokalita	X	Y	Počet jedinců	Velikost populace	Buffer	Nadm. Výška	Sklon	TWI	TPI	DAHI
C1	Jih	Čertoryje	17,406972400	48,859764200	20	32	31	359	5,96	11,86	0,00	0,07
C10	Jih	Čertoryje	17,419958300	48,863565600	17	19	27	382	6,38	12,04	-0,07	-0,08
C11a	Jih	Zahrady pod Hájem	17,533382682	48,884322139	20	36	25	390	10,22	10,64	0,12	0,06
C12a	Jih	Zahrady pod Hájem	17,533591131	48,881134950	16	15	36	397	11,07	10,67	0,14	0,06
C13	Jih	Zahrady pod Hájem	17,538235500	48,886136200	1	1	45	447	10,42	10,71	0,44	-0,07
C14	Jih	Zahrady pod Hájem	17,535818573	48,887992349	8	9	37	399	9,31	11,24	-0,24	-0,04
C2a	Jih	Čertoryje	17,413329200	48,859474800	10	15	92	406	4,36	10,73	1,10	-0,01
C2b	Jih	Čertoryje	17,413264900	48,861154800	10	12	66	401	4,52	10,85	0,98	-0,04
C3	Jih	Čertoryje	17,418706869	48,857259060	20	48	19	433	3,04	10,91	1,63	-0,02
C4	Jih	Čertoryje	17,421911100	48,853677400	3	4	48	444	2,45	11,31	1,74	0,03
C5	Jih	Čertoryje	17,392394800	48,859067800	20	22	0	300	2,02	15,83	-0,99	0,01
C6d	Jih	Búrová	17,553020500	48,901638800	20	43	0	504	5,43	10,74	1,60	-0,09
C7	Jih	Zahrady pod Hájem	17,539959900	48,877954100	20	35	0	458	11,34	9,99	1,38	0,09
C8	Jih	Čertoryje	17,404455400	48,861353200	4	4	32	347	0,81	13,86	-0,11	-0,01
C9	Jih	Čertoryje	17,428862500	48,857988700	1	1	0	368	4,47	15,02	-1,04	-0,07
G1	Sever	Štítná	17,976320023	49,082790593	18	29	15	386	13,23	10,12	0,14	0,20
G13	Sever	Štítná	17,983982177	49,076780325	19	70	505	330	12,02	12,81	-0,64	0,18
G2	Sever	Štítná	17,975644400	49,081348600	1	1	43	357	10,78	11,23	-0,44	0,13
G3	Sever	Štítná	17,975212500	49,082923100	9	14	30	382	14,76	10,25	-0,02	0,21
G5	Sever	Štítná	17,971883811	49,091912928	3	3	0	400	10,99	12,54	-1,30	0,16
G7	Sever	Štítná	17,984059875	49,077938148	20	340	235	351	10,60	12,40	-0,11	0,04
Q11	Sever	Štítná	17,965768674	49,079214916	16	29	231	333	9,03	13,46	-0,38	-0,16
Q12	Sever	Štítná	17,966420862	49,075786427	18	18	242	370	5,21	11,04	1,13	-0,05
Q2a	Sever	Štítná	17,984390025	49,079141430	20	165	410	366	11,59	12,33	-0,09	0,18
Q4	Sever	Štítná	17,982693300	49,087876900	18	92	0	460	14,85	10,47	0,56	0,23
Q5	Sever	Jestřabí	17,949066400	49,056248300	20	76	16	454	7,40	10,83	0,49	-0,10
Q6a	Sever	Jestřabí	17,952361635	49,056238875	15	16	76	449	9,03	10,96	0,26	-0,16
Q7b	Sever	Štítná	17,964811886	49,078737992	20	61	199	340	8,92	13,61	-0,12	-0,11
Q7g	Sever	Štítná	17,964207500	49,077281700	19	151	109	357	8,55	11,95	0,60	0,00
Q8	Sever	Štítná	17,968409200	49,069030600	19	56	0	337	7,26	12,75	-0,44	-0,02

Tab. P.2 Další charakteristiky populací. Výskyt populací na severovýchodě a jihozápadě Bílých Karpat, příslušná lokalita, souřadnice výskytu, počet odebraných jedinců z populace, velikost populace, počet jedinců v bufferu, nadmořská výška, sklon, TWI, TPI a DAHI v místě výskytu populace.

Název	JZ	SV	Název	JZ	SV	Název	JZ	SV
<i>Acer campestre</i>		✓	<i>Euphorbia esula</i>	✓		<i>Plantago lanceolata</i>	✓	✓
<i>Aegopodium podagraria</i>		✓	<i>Filipendula vulgaris</i>	✓	✓	<i>Plantago major</i>		✓
<i>Agrostis capillaris</i>	✓	✓	<i>Fraxinus excelsior</i>	✓		<i>Plantago media</i>	✓	✓
<i>Agrimonia eupatoria</i>	✓	✓	<i>Fragaria vesca</i>	✓		<i>Poa pratensis</i>		✓
<i>Agrostis vinealis</i>	✓		<i>Fragaria viridis</i>	✓	✓	<i>Polygala major</i>	✓	
<i>Achillea millefolium</i>	✓	✓	<i>Galium album</i>		✓	<i>Polygala comosa</i>		✓
<i>Allium carinatum</i>	✓		<i>Galium boreale</i>	✓	✓	<i>Potentilla alba</i>	✓	
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	✓		<i>Galium mollugo</i>	✓		<i>Potentilla erecta</i>	✓	✓
<i>Anthriscus sylvestris</i>	✓	✓	<i>Galium intermedium</i>	✓		<i>Potentilla heptaphylla</i>	✓	✓
<i>Arrhenatherum elatius</i>	✓	✓	<i>Galium verum</i>	✓	✓	<i>Potentilla reptans</i>		✓
<i>Asarum europaeum</i>	✓	✓	<i>Genista tinctoria</i>	✓	✓	<i>Primula veris</i>	✓	✓
<i>Asperula tinctoria</i>	✓		<i>Geranium dissectum</i>		✓	<i>Prunella grandiflora</i>	✓	
<i>Asperula cynanchica</i>		✓	<i>Geranium pratense</i>		✓	<i>Prunella vulgaris</i>	✓	✓
<i>Astragalus cicer</i>	✓	✓	<i>Geranium sanguineum</i>	✓		<i>Veronica orchidea</i>	✓	
<i>Astragalus glycyphyllos</i>		✓	<i>Geum urbanum</i>		✓	<i>Pulmonaria mollis</i>	✓	
<i>Astrantia major</i>	✓		<i>Helianthemum grandiflorum</i>	✓	✓	<i>Pulmonaria officinalis</i>		✓
<i>Betonica officinalis</i>	✓	✓	<i>Heracleum sphondylium</i>	✓	✓	<i>Quercus robur</i>	✓	
<i>Brachypodium pinnatum</i>	✓	✓	<i>Pilosella officinarum</i>	✓		<i>Ranunculus acris</i>	✓	✓
<i>Briza media</i>	✓	✓	<i>Holcus lanatus</i>	✓	✓	<i>Ranunculus lanuginosus</i>	✓	
<i>Bromus benekenii</i>	✓		<i>Hypericum perforatum</i>	✓	✓	<i>Ranunculus repens</i>		✓
<i>Bromus erectus</i>	✓	✓	<i>Hypochaeris radicata</i>		✓	<i>Rumex acetosa</i>	✓	
<i>Bromus hordeaceus</i>		✓	<i>Chaerophyllum aromaticum</i>		✓	<i>Rumex crispus</i>		✓
<i>Bupleurum falcatum</i>	✓		<i>Chamaecytisus virescens</i>	✓		<i>Salvia pratensis</i>	✓	✓
<i>Calystegia sepium</i>		✓	<i>Inula ensifolia</i>	✓		<i>Salvia verticillata</i>		✓
<i>Campanula glomerata</i>	✓	✓	<i>Inula hirta</i>	✓		<i>Sanguisorba minor</i>		✓
<i>Campanula persicifolia</i>	✓		<i>Inula salicina</i>	✓		<i>Sanguisorba officinalis</i>	✓	✓
<i>Campanula trachelium</i>	✓		<i>Knautia arvensis</i>	✓	✓	<i>Scabiosa ochroleuca</i>	✓	
<i>Carlina acaulis</i>	✓	✓	<i>Koeleria macrantha</i>		✓	<i>Securigera varia</i>		✓
<i>Carpinus betulus</i>	✓	✓	<i>Koeleria pyramidata</i>	✓		<i>Sedum sexangulare</i>		✓
<i>Carex hirta</i>	✓	✓	<i>Laserpitium latifolium</i>	✓		<i>Serratula tinctoria</i>	✓	
<i>Carlina vulgaris</i>		✓	<i>Lathyrus latifolius</i>	✓		<i>Silene vulgaris</i>	✓	
<i>Centaureum erythraea</i>	✓		<i>Lathyrus niger</i>	✓		<i>Solidago virgaurea</i>	✓	
<i>Centaurea jacea</i>	✓	✓	<i>Lathyrus pratensis</i>	✓	✓	<i>Stellaria graminea</i>	✓	
<i>Centaurea stenolepis</i>	✓		<i>Leontodon hispidus</i>		✓	<i>Tanacetum corymbosum</i>	✓	✓
<i>Centaurea scabiosa</i>	✓	✓	<i>Leontodon hispidus</i>	✓	✓	<i>Lotus maritimus</i>	✓	
<i>Cerastium arvense</i>	✓		<i>Leucanthemum vulgare</i>	✓	✓	<i>Teucrium chamaedrys</i>		✓
<i>Cerastium holosteoides</i>	✓		<i>Ligustrum vulgare</i>	✓	✓	<i>Thesium linophyllum</i>	✓	
<i>Cerinthe minor</i>	✓		<i>Linum catharticum</i>	✓		<i>Thymus pulegioides</i>	✓	✓
<i>Cichorium intybus</i>	✓		<i>Linaria vulgaris</i>		✓	<i>Tragopogon orientalis</i>	✓	✓
<i>Cirsium arvense</i>	✓	✓	<i>Lolium multiflorum</i>		✓	<i>Trifolium alpestre</i>	✓	
<i>Cirsium pannonicum</i>	✓		<i>Lotus corniculatus</i>	✓	✓	<i>Trisetum flavescens</i>	✓	✓
<i>Cirsium acaulon</i>	✓		<i>Lysimachia nummularia</i>	✓	✓	<i>Trifolium medium</i>		✓
<i>Clematis recta</i>	✓		<i>Medicago falcata</i>	✓	✓	<i>Trifolium montanum</i>	✓	✓
<i>Clematis vitalba</i>	✓		<i>Medicago lupulina</i>	✓	✓	<i>Trifolium pratense</i>	✓	✓
<i>Convolvulus arvensis</i>		✓	<i>Melampyrum nemorosum</i>	✓		<i>Trifolium repens</i>		✓
<i>Crepis biennis</i>	✓	✓	<i>Melica nutans</i>		✓	<i>Trifolium rubens</i>	✓	✓
<i>Cruciata verna</i>		✓	<i>Melampyrum pratense</i>	✓		<i>Tussilago farfara</i>	✓	
<i>Cuscuta epithimum</i>		✓	<i>Molinia arundinacea</i>	✓		<i>Urtica dioica</i>		✓
<i>Cynosurus cristatus</i>		✓	<i>Ononis spinosa</i>	✓	✓	<i>Valeriana officinalis</i>	✓	
<i>Dactylis glomerata</i>	✓	✓	<i>Origanum vulgare</i>		✓	<i>Veronica chamaedrys</i>	✓	✓
<i>Daucus carota</i>		✓	<i>Ornithogalum brevistylum</i>	✓		<i>Veronica officinalis</i>	✓	
<i>Dianthus carthusianorum</i>	✓	✓	<i>Pastinaca sativa</i>		✓	<i>Veronica polita</i>		✓
<i>Dorycnium herbaceum</i>	✓		<i>Peucedanum cervaria</i>	✓	✓	<i>Veronica teucrium</i>	✓	
<i>Echium vulgare</i>		✓	<i>Phleum phleoides</i>	✓		<i>Vicia cracca</i>	✓	✓
<i>Elymus hispidus</i>		✓	<i>Phleum pratense</i>		✓	<i>Vicia tenuifolia</i>	✓	✓
<i>Elymus repens</i>	✓	✓	<i>Picris hieracioides</i>	✓		<i>Vincetoxicum hirundinaria</i>	✓	
<i>Equisetum arvense</i>		✓	<i>Pimpinella major</i>		✓			
<i>Euphorbia cyparissias</i>	✓	✓	<i>Pimpinella saxifraga</i>	✓	✓			

Tab. P.3 Seznam druhů z vegetačních snímků z jihozápadní (JZ) a severovýchodní (SV) oblasti. Názvy taxonů jsou sjednoceny podle Danihelka et al. (2012).

Populace	Světlo	Teplota	Vlhkost	Půdní reakce	Živiny	Počet druhů
C1	6,83	5,62	4,29	6,69	3,88	43
C10	6,48	5,67	4,56	6,48	4,19	36
C11b	7,04	5,91	4,13	7,13	3,85	36
C12a	6,51	5,76	4,51	6,76	4,68	36
C14	6,76	5,56	4,35	6,79	4,32	30
C2a	6,56	5,81	4,25	6,88	3,94	36
C2b	6,85	5,59	4,50	6,79	4,26	41
C3	6,70	5,55	4,52	6,52	4,42	31
C5	6,76	5,48	4,62	6,62	4,41	52
C6d	6,78	5,56	4,41	6,75	4,38	45
C7	6,95	5,78	4,05	7,00	3,89	37
G1	6,97	5,41	4,65	6,57	4,89	28
G13	7,21	5,58	4,09	6,64	4,24	40
G7	6,81	5,45	4,52	6,65	4,94	30
Q12	6,95	5,55	4,28	6,48	4,58	35
Q2a	7,07	5,41	4,48	6,63	4,85	40
Q4	7,09	5,35	4,57	6,48	5,22	45
Q5	7,02	5,29	4,78	6,37	5,46	42
Q6a	6,78	5,38	4,78	6,50	5,25	45
Q7b	7,19	5,61	4,22	6,69	4,28	34
Q7g	6,82	5,67	4,13	6,72	4,23	33
Q8	7,04	5,29	4,75	6,39	5,07	44

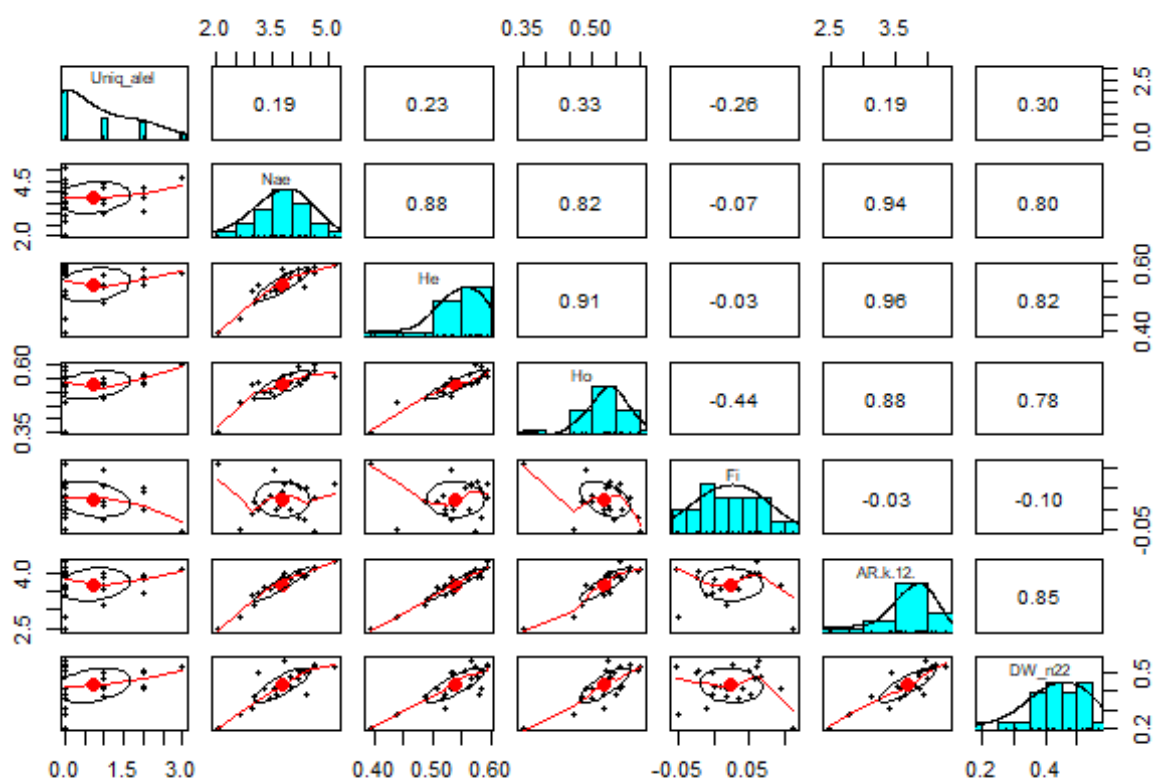
Tab. P.4 Tabulka průměrných Elenbergových indikačních hodnot (Chytrý et al., 2018) a počet druhů pro každou populaci.

Prediktor	VIF (n=29)	VIF (n=27)	VIF (n=25)	VIF (n=24)	VIF (n=22)
Bílé Karpaty	1,88	1,62	2,13	2,13	2,16
Velikost populace	1,13	1,33	1,49	1,44	1,74
Buffer	1,11	1,13	1,18	1,18	1,13
Sklon	2,57	-	2,31	2,50	2,25
TWI	1,37	2,15	-	-	-
TPI	-	2,47	1,13	1,14	1,11
DAHI	1,55	1,34	1,74	2,00	1,98

Tab. P.5 Výsledky postupného výběru prediktorů, pomocí VIF pro každý soubor pozorování (dataset) zvlášť (testování bez Elenbergových indikačních hodnot).

n=22	Bílé Karpáty	Velikost populace	Buffer	Nadm. výška	Sklon	TWI	TPI	DAHI	Světlo	Teplota	Vlhkost	Půdní reakce	Živiny	Počet druhů
Bílé Karpáty	1,00	0,59	0,32	-0,21	0,48	0,13	-0,25	0,17	0,62	-0,64	0,22	-0,56	0,67	-0,05
Velikost populace	0,59	1,00	0,12	-0,15	0,38	0,21	-0,11	0,35	0,47	-0,33	-0,05	-0,20	0,31	-0,06
Buffer	0,32	0,12	1,00	-0,37	0,10	0,06	-0,14	-0,04	0,07	0,16	-0,28	0,03	-0,09	0,26
Nadmořská výška	-0,21	-0,15	-0,37	1,00	0,09	-0,77	0,74	-0,15	-0,16	-0,01	0,14	0,07	0,18	-0,05
Sklon	0,48	0,38	0,10	0,09	1,00	-0,30	-0,23	0,64	0,46	-0,11	-0,10	0,09	0,30	0,08
TWI	0,13	0,21	0,06	-0,77	-0,30	1,00	-0,70	-0,10	0,13	-0,20	0,06	-0,21	-0,04	-0,29
TPI	-0,25	-0,11	-0,14	0,74	-0,23	-0,70	1,00	-0,19	-0,21	0,24	-0,19	0,17	-0,15	0,14
DAHI	0,17	0,35	-0,04	-0,15	0,64	-0,10	-0,19	1,00	0,36	-0,02	-0,20	0,13	0,01	-0,07
Světlo	0,62	0,47	0,07	-0,16	0,46	0,13	-0,21	0,36	1,00	-0,34	-0,18	-0,08	0,21	0,17
Teplota	-0,64	-0,33	0,16	-0,01	-0,11	-0,20	0,24	-0,02	-0,34	1,00	-0,75	0,83	-0,86	0,52
Vlhkost	0,22	-0,05	-0,28	0,14	-0,10	0,06	-0,19	-0,20	-0,18	-0,75	1,00	-0,70	0,80	-0,52
Půdní reakce	-0,56	-0,20	0,03	0,07	0,09	-0,21	0,17	0,13	-0,08	0,83	-0,70	1,00	-0,74	0,43
Živiny	0,67	0,31	-0,09	0,18	0,30	-0,04	-0,15	0,01	0,21	-0,86	0,80	-0,74	1,00	-0,35
Počet druhů	-0,05	-0,06	0,26	-0,05	0,08	-0,29	0,14	-0,07	0,17	0,52	-0,52	0,43	-0,35	1,00

Tab. P.6 Korelační matice všech používaných prediktorů (dataset s 22 pozorováními).



Graf P.1 Korelace vysvětlovaných proměnných (dataset s 22 pozorováními).

Populace	n=29 AR (k=2)	n=27 AR (k=6)	n=24 AR (k=12)	n=29 DW index	n=27 DW index	n=25 DW index	n=24 DW index	n=22 DW index
C1	1,57	2,96	4,09	0,51	0,51	0,51	0,52	0,53
C10	1,58	2,91	4,02	0,48	0,48	0,49	0,49	0,52
C11a	1,57	2,86	3,97	0,53	0,53	0,54	0,55	0,57
C12a	1,57	2,89	4,01	0,44	0,45	0,45	0,46	0,47
C13	1,56	-	-	0,25	-	-	-	-
C14	1,59	3,02	4,13	0,51	0,52	0,52	0,52	0,54
C2a	1,58	2,91	3,95	0,36	0,36	0,36	0,37	0,39
C2b	1,54	2,71	3,55	0,40	0,41	0,41	0,41	0,43
C3	1,52	2,72	3,67	0,35	0,35	0,36	0,36	0,38
C4	1,57	2,81	-	0,35	0,36	-	-	-
C5	1,57	2,86	3,88	0,45	0,45	0,46	0,46	0,48
C6d	1,59	3,05	4,30	0,51	0,51	0,51	0,52	0,53
C7	1,56	2,87	3,93	0,49	0,49	0,50	0,50	0,51
C8	1,57	2,90	-	0,27	0,27	0,27	-	-
C9	-	-	-	-	-	-	-	-
G1	1,44	2,30	2,80	0,24	0,25	0,25	0,25	0,27
G13	1,49	2,47	3,12	0,35	0,36	0,36	0,36	0,38
G2	1,69	-	-	0,36	-	-	-	-
G3	1,48	2,33	2,78	0,31	0,31	0,31	0,32	-
G5	1,56	2,69	-	0,36	0,36	-	-	-
G7	1,52	2,62	3,41	0,28	0,28	0,29	0,29	0,31
Q11	1,52	2,66	3,48	0,30	0,31	0,31	0,31	-
Q12	1,52	2,69	3,58	0,32	0,32	0,32	0,32	0,36
Q2a	1,39	2,07	2,46	0,18	0,18	0,19	0,19	0,20
Q4	1,51	2,66	3,61	0,37	0,38	0,39	0,39	0,41
Q5	1,58	2,90	3,90	0,38	0,39	0,39	0,39	0,41
Q6a	1,56	2,85	3,83	0,40	0,40	0,41	0,41	0,43
Q7b	1,53	2,80	3,87	0,45	0,46	0,46	0,46	0,50
Q7g	1,53	2,75	3,67	0,38	0,38	0,38	0,38	0,42
Q8	1,53	2,65	3,45	0,46	0,46	0,46	0,47	0,50
Všechny	1,57	2,94	4,14	0,38	0,39	0,40	0,40	0,43

Tab. P.7 Allelic richness (AR) počítaná pro každý soubor pozorování (n) zvlášť v programu SPAGeDi. Pro soubor pozorování $n = 27$ byly hodnoty AR pro populace stejné jako pro $n = 25$, pro oba datasey počítal program s $k = 6$ (očekávaný počet alel mezi šesti genovými kopiemi). Pro $n = 24$ byly hodnoty AR stejné jako pro $n = 22$, pro oba datasey počítal program s $k = 12$ (očekávaný počet alel mezi dvanácti genovými kopiemi). Hodnoty DW indexu uvedené v tabulce, počítané pomocí skriptu AFLPdat v programu R, se liší pro každý soubor pozorování n .

	<i>n=29</i>		<i>n=27</i>		<i>n=25</i>		<i>n=24</i>		<i>n=22</i>	
	Prediktor	P-hodnota	Prediktor	P-hodnota	Prediktor	P-hodnota	Prediktor	P-hodnota	Prediktor	P-hodnota
AR (k=2)	Velikost pop	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001
	Buffer	0,172	Buffer	0,185	Buffer	0,286	Buffer	0,275	Buffer	0,183
	DAHI	0,014	DAHI	< 0,001	DAHI	< 0,001	Sklon	0,062	Sklon	0,211
							DAHI	< 0,001	DAHI	< 0,001
	<i>AIC=-182,18</i>		<i>AIC=-107,04</i>		<i>AIC=-97,5</i>		<i>AIC=-59,58</i>		<i>AIC=-56,2</i>	
Nae	Bílé Karpaty	0,003	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001
	Velikost pop	< 0,001	DAHI	< 0,001	Sklon	0,172	Sklon	0,122	Sklon	0,294
	DAHI	0,022			DAHI	< 0,001	DAHI	< 0,001	DAHI	< 0,001
	<i>AIC=-17,56</i>		<i>AIC=-38,63</i>		<i>AIC=-39,59</i>		<i>AIC=-36,79</i>		<i>AIC=-33,6</i>	
He	Velikost pop	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001
	Buffer	0,151	Buffer	0,092	Buffer	0,221	Buffer	0,225	Buffer	0,173
	DAHI	0,008	DAHI	< 0,001	DAHI	< 0,001	DAHI	< 0,001	Sklon	0,058
									DAHI	< 0,001
	<i>AIC=-183,19</i>		<i>AIC=-188,74</i>		<i>AIC=-176,3</i>		<i>AIC=-168,04</i>		<i>AIC=-153,6</i>	
Ho	Velikost pop	< 0,001	Bílé Karpaty	0,002	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	0,003	Bílé Karpaty	0,003
	Buffer	0,271	Velikost pop	0,007	Velikost pop	0,032	Buffer	0,474	Buffer	0,365
	DAHI	0,014	Buffer	0,284	Buffer	0,459	Sklon	0,093	DAHI	< 0,001
			TPI	0,222	TPI	0,442	DAHI	< 0,001		
			DAHI	0,001	DAHI	< 0,001				
	<i>AIC=-178,9</i>		<i>AIC=-175,72</i>		<i>AIC=-160,3</i>		<i>AIC=-157,02</i>		<i>AIC=-142,46</i>	
Fi	Velikost pop	0,088	Velikost pop	0,054	Bílé Karpaty	0,883	Bílé Karpaty	0,382	-	-
	TWI	0,174	TPI	0,052	Velikost pop	0,016	Velikost pop	0,113	-	-
	<i>AIC=-171,44</i>		<i>AIC=-160,55</i>		<i>AIC=-148,16</i>		<i>AIC=-147,24</i>		<i>AIC=-135,23</i>	
DW index	Bílé Karpaty	0,008	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001	Bílé Karpaty	< 0,001
	Velikost pop	0,164	Velikost pop	0,343	Buffer	0,031	Buffer	0,040	Buffer	0,041
	Buffer	0,033	Buffer	0,023	Sklon	0,367	Sklon	0,959	Sklon	0,980
	Sklon	0,766	TWI	0,900	DAHI	0,002	TPI	0,174	TPI	0,169
	DAHI	0,040	TPI	0,153			DAHI	0,005	DAHI	0,002
			DAHI	0,003						
	<i>AIC=-146,07</i>		<i>AIC=-143,96</i>		<i>AIC=-134,34</i>		<i>AIC=-131,61</i>		<i>AIC=-120,51</i>	
Unikátní alely	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>AIC=65,68</i>		<i>AIC=63,11</i>		<i>AIC=60,34</i>		<i>AIC=56,1</i>		<i>AIC=64,2</i>	

Tab. P.8 Srovnání *p*-hodnot prediktorů jednotlivých modelů vybraných pomocí postupného výběru (nejnižší AIC) pro všechny vysvětlované proměnné (AR, Nae, He, Ho, Fi, DW index, Unikátní alely) pro všechny soubory pozorování zvlášť (*n* = 29, *n* = 27, *n* = 25, *n* = 24, *n* = 22).

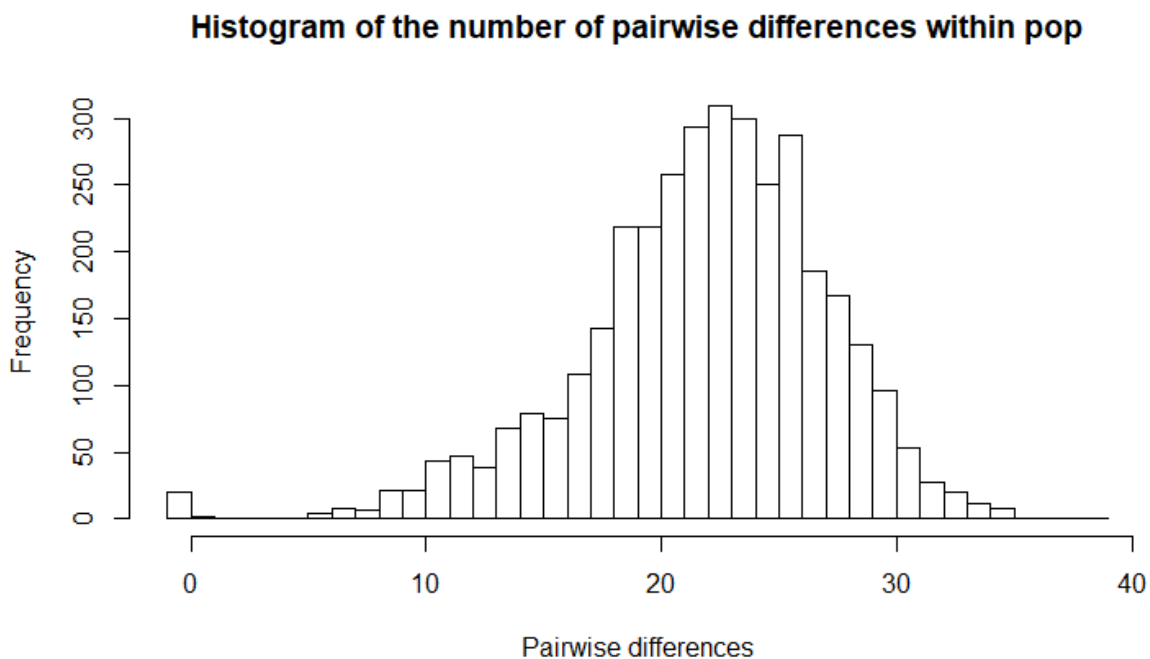
Protokol k izolaci DNA

Chemikálie:

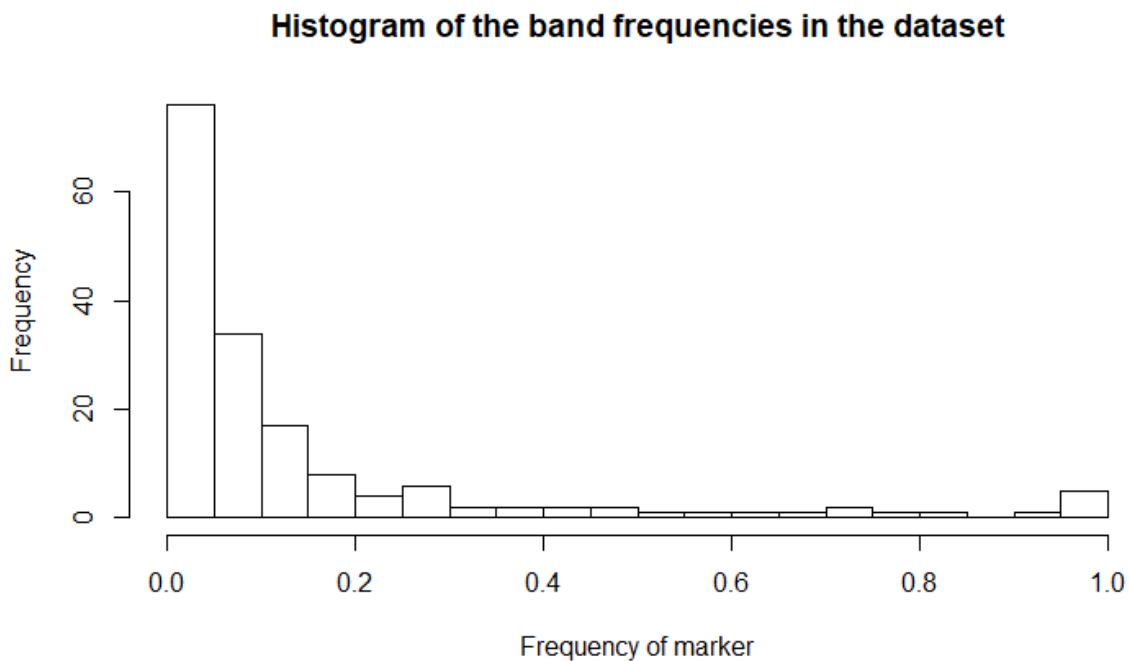
- Extrakční pufr: 20 mM sodium EDTA (pro rozlití B, uvolnění DNA) a 100 mM Tris-HCl, upravit pH na 8,0 s HCl, přidat 1:4 NaCl a 2,0% (w/v) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide; konzervuje DNA). Rozpustit CTAB zahříváním na 60°. Skladovat při 37°. Přidat 0,2% β -mercaptoethanol (vychytává volné radikály) před použitím.
- Chloroform:octanol 24:1 (v/v)
- 5 M NaCl
- RNasa A (Sigma R9009: 10 mg/mL)

Postup:

1. Odebrat listy RA pinzetou do eppendorfky, přidat olověnou kuličkou, dát do TissueLyseru na 30 sekund, frekvence 30
2. Připravit směs pufru – 500 μ l pufru + 1 μ l β -mercaptoethanolu (pro 1 vzorek)
3. Přidat $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$ lžičky PVP (polyvinylpolypyrrolidon; vychytává polyfenolické látky, aby byla DNA čistší) a 500 μ l připravené směsi pufru – promíchat
4. Přidat 2 μ l RNasy A a dát do rozehrátého termoboxu na 60° na 25 minut (každých 5 minut otočit) – pak zchladit na pokojovou teplotu
5. Přidat 500 μ l chloroform:isoamylalkohol, obracet v ruce 20 – 25 \times a dát do centrifugy, program: 6000 rpm, 15 minut, 24°
6. Oddělit vodnou fázi do nové eppendorfky (spočítat objem vodné fáze)
7. Přidat $\frac{1}{2}$ objemu 5M NaCl (vysolení DNA) + 2 \times objem 95 % ethanolu (–20°C) a dát do lednice na 15–20 min (dokud se neobjeví DNA; max 10 hodin)
8. Dát do centrifugy – 3000 rpm, 3 minuty, 24° + 5000 rpm, 3 minuty, 24° (DNA u dna eppendorfky)
9. Vymývání NK (opakovat 2 \times až 3 \times): odlít vršek (zbyde DNA) a vymýt cca 500 μ l 76% ethanolem, centrifugovat na 5000 rpm, 1 minuta, 24°
10. Odstranění ethanolu: dát do termoboxu na 37° na 20–30 minut v otevřené eppendorfce
11. Rozpustit ve 40 μ l ddH₂O



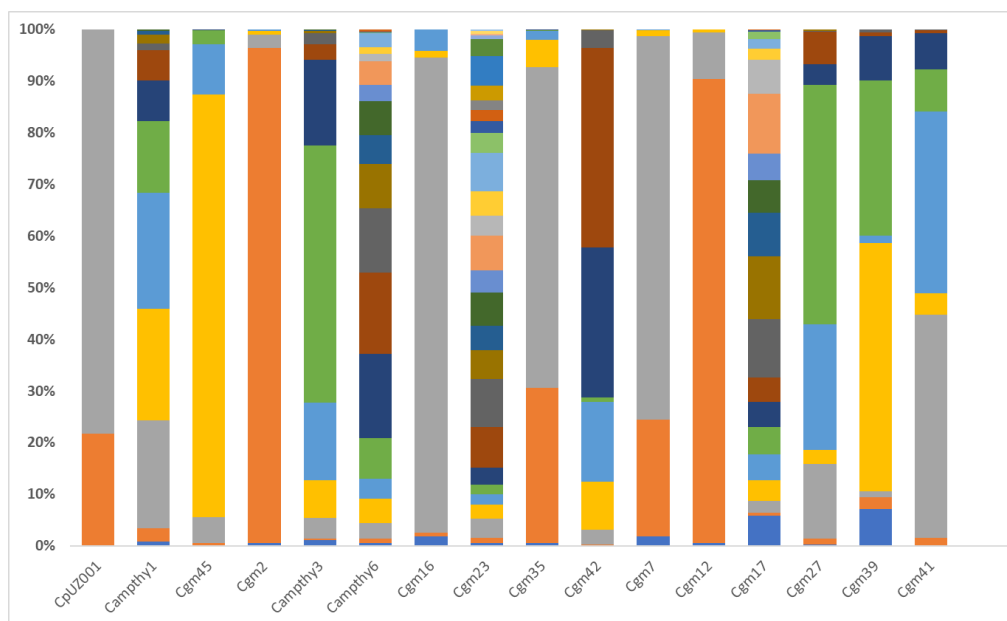
Graf P.2 Histogram četnosti párů všech vzorků, které se od sebe liší o daný počet alel. Histogram sleduje normální rozdělení, kromě hodnot blízké nule, které ukazují přítomnost klonů v datasetu.



Graf P.3 Histogram frekvence alel ve všech lokusech.

Lokus	Alela	Výskyt	Lokus	Alela	Výskyt	Lokus	Alela	Výskyt	Lokus	Alela	Výskyt	Lokus	Alela	Výskyt
MM1			MM2						MM3					
CpUZ001	133	0,1%	Campthy1	135	0,6%	Cgm23	151	0,5%	Cgm17	155	5,8%	Cgm27	216	0,2%
	136	21,6%		139	0,8%		154	1,1%		159	0,7%		219	1,2%
	142	78,3%		141	2,9%		157	3,7%		163	2,2%		222	14,5%
Campthy1	132	0,8%	Campthy6	143	4,8%	Cgm23	160	2,7%	Cgm17	167	4,0%	Cgm27	225	2,7%
	134	2,6%		145	3,8%		163	2,1%		171	4,9%		228	24,2%
	136	20,8%		147	7,9%		166	1,8%		175	5,4%		231	46,4%
	138	21,6%		149	16,4%		169	3,3%		179	4,8%		234	4,1%
	140	22,5%		151	15,8%		172	7,9%		183	4,7%		237	6,2%
	142	13,9%		153	12,4%		175	9,2%		187	11,3%		240	0,1%
	144	7,9%		155	8,6%		178	5,7%		191	12,1%		243	0,4%
	146	5,9%		157	5,6%		181	4,6%		195	8,5%		244	7,2%
	148	1,3%		159	6,6%		184	6,5%		199	6,4%		248	2,2%
	150	1,6%		161	3,2%		187	4,3%		203	5,1%		252	1,2%
152	0,7%	163	4,5%	190	6,7%	207	11,6%	256	48,0%					
Cgm45	154	0,4%	165	1,5%	193	3,9%	211	6,6%	211	6,6%	Cgm39	258	1,4%	
	294	0,1%	167	1,3%	196	4,7%	215	2,1%	215	2,1%		260	30,1%	
	297	0,5%	169	2,7%	199	7,3%	219	1,9%	219	1,9%		264	8,6%	
	300	4,9%	171	0,1%	202	3,9%	223	1,4%	223	1,4%		268	0,7%	
	303	81,9%	173	0,1%	205	2,4%	227	0,2%	227	0,2%		272	0,6%	
	306	9,8%	175	0,5%	208	2,1%	231	0,2%	231	0,2%		259	0,1%	
	309	2,6%	115	0,5%	211	1,8%	269	0,1%	269	0,1%		263	1,4%	
	312	0,2%	118	95,9%	214	3,0%	272	0,1%	272	0,1%		267	43,2%	
	Cgm2	121	2,5%	217	5,7%	220	3,3%	275	2,9%	275		2,9%	271	4,2%
		124	0,7%	220	3,3%	223	0,7%	278	9,2%	278		9,2%	275	35,2%
127		0,4%	223	0,7%	226	0,2%	281	15,5%	281	15,5%	279	8,1%		
Campthy3		113	1,1%	226	0,2%	229	0,1%	284	0,8%	284	0,8%	283	7,1%	
		115	0,4%	229	0,1%	232	0,5%	287	29,1%	287	29,1%	287	0,5%	
		117	4,0%	232	0,5%	235	0,4%	290	38,6%	290	38,6%	291	0,2%	
		119	7,3%	235	0,4%	241	0,5%	293	3,4%	293	3,4%	124	1,8%	
		121	15,1%	241	0,5%	244	30,1%	296	0,2%	296	0,2%	127	22,7%	
		123	49,8%	244	30,1%	247	62,1%	156	0,5%	156	0,5%	130	74,2%	
		125	16,6%	247	62,1%	250	5,3%	159	89,9%	159	89,9%	133	1,1%	
	127	3,1%	250	5,3%	253	1,6%	162	9,1%	162	9,1%	136	0,2%		
	129	2,1%	253	1,6%	256	0,2%	165	0,6%	165	0,6%				
	131	0,4%	256	0,2%	259	0,1%								
Cgm16	133	0,2%	259	0,1%										
	135	0,1%	169	1,9%										
	173	0,6%	173	0,6%										
	177	92,1%	177	92,1%										
	179	1,3%	179	1,3%										
181	4,1%	181	4,1%											

Tab. P.9 Frekvence jednotlivých alel v celém datasetu pro všechny lokusy v multiplexech MM I, MM II a MM III. V prvním sloupci název daného lokusu, ve druhém sloupci délka alely (bp), ve třetím sloupci % výskyt jednotlivých alel pro všechny genotypované vzorky.



Graf P.4 % zastoupení alel v jednotlivých lokusech.

Pop	Cam	DNA	Pop	Cam	DNA	Pop	Cam	DNA	Pop	Cam	DNA	Pop	Cam	DNA	Pop	Cam	DNA
G30	1	175	Q1	84	3	Q5	168	1203	Q8	252	229	C2b	336	198	C7	420	126
G5	2	269	Q1	85	67	Q5	169	526	Q8	253	371	C2b	337	556	C7	421	146
G1	3	486	Q1	86	147	Q5	170	181	Q11	254	286	C2b	338	262	C7	422	129
G30	4	242	Q2b	87	15	Q5	171	126	Q11	255	323	C2b	339	109	C7	423	158
G30	5	278	Q2b	88	71	Q5	172	176	Q11	256	265	C2b	340	271	C7	424	182
G30	6	548	Q2b	89	290	Q5	173	394	Q11	257	437	C2b	341	59	C8	425	147
B	7	297	Q2b	90	236	Q5	174	485	Q11	258	226	C3	342	345	C8	426	131
B	8	1485	Q2b	91	509	Q5	175	150	Q11	259	222	C3	343	284	C8	427	146
B	9	505	Q2c	92	144	Q5	176	187	Q11	260	489	C3	344	200	C8	428	117
B	10	660	Q2c	93	110	Q6a	177	119	Q11	261	240	C3	345	111	C9	429	157
G13	11	444	Q2c	94	43	Q6a	178	182	Q11	262	374	C3	346	148	C10	430	106
G1	12	777	Q2c	95	219	Q6a	179	160	Q11	263	884	C3	347	102	C10	431	111
G3	13	786	Q2c	96	156	Q6a	180	599	Q11	264	588	C3	348	76	C10	432	104
G3	14	1018	Q3	97	193	Q6a	181	168	Q11	265	329	C3	349	187	C10	433	86
G1	15	27	Q2a	98	192	Q6a	182	38	Q11	266	576	C3	350	233	C10	434	89
G1	16	26	Q2a	99	109	Q6a	183	40	Q11	267	860	C3	351	161	C10	435	105
G1	17	82	Q2a	100	108	Q6a	184	56	Q11	268	473	C3	352	115	C10	436	129
G3	18	131	Q2a	101	65	Q6a	185	24	Q11	269	463	C3	353	171	C10	437	154
G3	19	18	Q2a	102	172	Q6b	186	258	Q11	270	617	C3	354	206	C10	438	82
G3	20	21	Q2a	103	55	Q6b	187	132	Q11	271	646	C3	355	101	C10	439	390
G13	21	613	Q2a	104	69	Q6b	188	119	Q11	272	246	C3	356	125	C10	440	18
G13	22	52	Q2a	105	78	Q6b	189	29	Q11	273	315	C3	357	134	C10	441	135
G13	23	412	Q2a	106	122	Q6b	190	247	Q12	274	652	C3	358	21	C10	442	68
G30	24	267	Q2a	107	82	Q6b	191	581	Q12	275	1414	C3	359	104	C10	443	165
G30	25	43	Q2a	108	7	Q6c	192	68	Q12	276	1179	C3	360	173	C10	444	60
G30	26	141	Q2a	109	48	Q10	193	630	Q12	277	638	C3	361	230	C10	445	57
G30	27	32	Q2a	110	23	Q7b	194	37	Q12	278	1403	C4	362	130	C10	446	92
G30	28	13	Q2a	111	51	Q7b	195	229	Q12	279	2278	C4	363	258	C10	447	74
G30	29	26	Q2a	112	32	Q7b	196	23	Q12	280	1133	C4	364	311	C11a	448	153
G13	30	102	Q2a	113	43	Q7b	197	178	Q12	281	1373	C4	365	167	C11a	449	85
G13	31	143	Q2a	114	61	Q7b	198	69	Q12	282	1161	C5	366	228	C11a	450	226
G13	32	110	Q2a	115	35	Q7b	199	84	Q12	283	872	C5	367	210	C11a	451	130
G13	33	181	Q2a	116	30	Q7b	200	98	Q12	284	1173	C5	368	196	C11a	452	108
G13	34	236	Q2a	117	160	Q7b	201	71	Q12	285	1079	C5	369	340	C11a	453	84
G13	35	916	Q2a	118	86	Q7b	202	44	Q12	286	1363	C5	370	227	C11a	454	312
G13	36	554	Q2a	119	105	Q7b	203	88	Q12	287	1799	C5	371	250	C11a	455	85
G13	37a	53	Q2a	120	252	Q7b	204	51	Q12	288	1023	C5	372	141	C11a	456	124
G13	37b	404	Q2a	121	168	Q7b	205	533	Q12	289	768	C5	373	89	C11a	457	89
G13	38	441	Q2a	122	147	Q7b	206	88	C5	290	217	C5	374	93	C11b	458	132
G13	39	1136	Q2a	123	212	Q7b	207	67	C7	291	593	C5	375	34	C11b	459	169
G13	40	921	Q2a	124	157	Q7b	208	49	S6	292	902	C5	376	209	C11b	460	181
G13	41	699	Q2a	125	115	Q7b	209	127	S4	293	287	C5	377	90	C11b	461	196
G13	42	553	Q2a	126	29	Q7b	210	218	C10	294	479	C5	378	112	C11b	462	204
G13	43	428	Q2a	127	133	Q7b	211	375	C14	295	512	C5	379	103	C11b	463	250
G13	44	532	Q2a	128	194	Q7b	212	165	S1	296	135	C5	380	148	C11b	464	93
G30	45	488	Q2a	129	409	Q7b	213	141	S4	297	432	C5	381	123	C11b	465	131
G30	46	362	Q2a	130	345	Q7g	214	138	Q12	298	279	C5	382	114	C11b	466	184
G30	47	570	Q2a	131	172	Q7g	215	464	Q12	299	428	C5	383	115	C11b	467	153
G30	48	556	Q2a	132	122	Q7g	216	133	Q12	300	1150	C5	384	164	C12a	468	156
G30	49	641	Q2a	133	185	Q7g	217	170	Q12	301	279	C6a	385	195	C12a	469	223
G30	50	651	Q2a	134	669	Q7g	218	55	C1	302	57	C6a	386	251	C12a	470	256
G1	51	1265	Q4b	135	601	Q7g	219	82	C1	303	143	C6a	387	160	C12a	471	256
G30	52	289	Q4b	136	871	Q7g	220	192	C1	304	149	C6a	388	203	C12a	472	95
G30	53	178	Q4	137	276	Q7g	221	115	C1	305	388	C6b	389	251	C12a	473	280
G30	54	639	Q4	138	436	Q7g	222	173	C1	306	663	C6c	390	316	C12a	474	229
G30	55	729	Q4	139	144	Q7g	223	263	C1	307	760	C6c	391	238	C12a	475	142
G1	56	474	Q4	140	500	Q7g	224	120	C1	308	297	C6c	392	285	C12a	476	335
G1	57	852	Q4	141	365	Q7g	225	69	C1	309	276	C6c	393	399	C12a	477	431
G1	58	657	Q4	142	243	Q7g	226	93	C1	310	208	C6c	394	57	C12a	478	721
G1	59	974	Q4	143	241	Q7g	227	293	C1	311	299	C6c	395	102	C12b	479	544
G1	60	980	Q4	144	135	Q7g	228	300	C1	312	353	C6c	396	279	C12c	480	226
G1	61	556	Q4	145	437	Q7g	229	493	C1	313	722	C6d	397	242	C12d	481	248
G1	62	1013	Q4	146	641	Q7g	230	271	C1	314	403	C6d	398	336	C12d	482	306
G1	63	926	Q4	147	363	Q7g	231	27	C1	315	308	C6d	399	320	C12d	483	284
G1	64	982	Q4	148	378	Q7g	232	166	C1	316	492	C6d	400	60	C13	484	175
G1	65	978	Q4	149	691	Q7g	233	643	C1	317	156	C6d	401	113	C14	485	129
G1	66	912	Q4	150	423	Q8	234	93	C1	318	41	C6d	402	153	C14	486	1121
G1	67	421	Q4	151	415	Q8	235	74	C1	319	396	C6d	403	336	C14	487	225
G1	68	550	Q4	152	719	Q8	236	154	C1	320	409	C6d	404	402	C14	488	155
G1	69	226	Q4	153	449	Q8	237	129	C1	321	382	C7	405	185	C14	489	106
G2	70	592	Q4	154	648	Q8	238	154	C2a	322	349	C7	406	135	C14	490	67
G3	71	528	Q4	155	627	Q8	239	632	C2a	323	603	C7	407	249	C14	491	84
G3	72	498	Q4	156	588	Q8	240	185	C2a	324	311	C7	408	95	C14	492	20
G3	73	330	Q5	157	510	Q8	241	437	C2a	325	390	C7	409	163	C14	493	74
G3	74	337	Q5	158	437	Q8	242	314	C2a	326	492	C7	410	185	G1	494	199
G3	75	322	Q5	159	607	Q8	243	698	C2a	327	273	C7	411	231	G30	495	61
G3	76	201	Q5	160	456	Q8	244	132	C2a	328	243	C7	412	103	G30	496	71
G3	77	297	Q5	161	481	Q8	245	435	C2a	329	357	C7	413	172	G30	497	48
G3	78	110	Q5	162	474	Q8	246	528	C2a	330	175	C7	414	346	Q1	498	65
G3	79	279	Q5	163	835	Q8	247	884	C2a	331	166	C7	415	107	Q6a	499	128
G5	80	188	Q5	164	799	Q8	248	395	C2b	332	390	C7	416	161	Q6b	500	69
G5	81	242	Q5	165	917	Q8	249	339	C2b	333	301	C7	417	182	Q6c	501	130
Q1	82	150	Q5	166	412	Q8	250	155	C2b	334	208	C7	418	94	C1	502	78
Q1	83	67	Q5	167	1744	Q8	251	391	C2b	335	253	C7	419	65	C14	503	83

Tab. P.10 Koncentrace izolované DNA (ng/μl) ze všech vzorků (Cam) pro dané populace (Pop).

Lokus	Sekvence forward primeru	Sekvence reverse primeru	Motiv	Opakování	Délka PCR produktu (bp)
Cgm1	AGGATTCATGTTAGCCGACCC	TCGAGTGACCACCTTCACCA	AAC	8	111
Cgm2	CGGTAGCCTGTTATCAGCA	AGTTTAGTTAGGCTTAGAAGATCAGC	AAC	6	120
Cgm3	CGACCACCATTATTGTTGCGA	GCCTACATGCTGCCAATTCC	ACC	5	124
Cgm4	CTGAAGGGTGGCTGGTTGT	AGGTCCATTTATATCCTGCCG	ACC	5	125
Cgm5	AGGATTCATGTTAGCCGACCC	TGCTTTGATTAAGTAGCAAGCCA	AAC	11	127
Cgm6	GGTGTCTGTATACAGAAACCG	TCATTCATAACAAGCCAAATCTGGT	AAT	5	131
Cgm7	AGATGGTTGAGCGAGGGTTT	GCTGCTGCAATGGTAACCTG	AAG	6	133
Cgm8	TCCCTCCACTAACGATTTGAGA	TCTATGCTTGGACATATCTCCCT	AAC	6	140
Cgm9	CAAATTGGGCTGCACCATGG	GGGTAAAGAAGTCGGGTGGG	AAG	5	147
Cgm10	ATCCCAAACCCATGCACCTT	GGGTCTGCGAAGAAGAGG	AGG	6	152
Cgm11	TGTTAGACTGCCTAGGAGCG	ACGAGGATTCATGTTAGCCGA	AAC	7	153
Cgm12	TCGATTCTTGATTGGGTGACG	TGGCTGATCTTCCAAGAAGGT	AAG	5	158
Cgm13	GACTCACACCACGTCTCTGT	CCAGATCTGGGTTTGTGAAGT	AAG	13	161
Cgm14	TCTCGTTTCTGAGCAAAGGC	TCGTCGATATCGGTCTTCATGT	AAAC	5	162
Cgm15	TGGGTTTGTACGTGGCTGTT	AGGAACACTGAAGGGAGTACA	AAC	6	169
Cgm16	ACAGTAGTTTATTGTTCCAATCCG	CTTCGATTCATGTGGAGCGC	AAAT	5	176
Cgm17	TCCTCTGTCCCATGTTTGGGA	TGGACATTCGTTTAGAGATGGATG	AAAG	11	181
Cgm18	CTCCTCCACCGCTCACCC	GGTCACCAAGTTTGCTTTATCCA	AATT	5	188
Cgm19	ATCGCAATTCATCATTTCCAAT	TTGTTGAAGATGGGAAGCTCAG	ATC	6	190
Cgm20	ACAAGAGATGAGATGGCAGCA	ATTCGTCCATTGCAGGTCG	AGG	5	194
Cgm21	CGGACTAGTGGTTGAACCTCC	ACCAAATGTCATGCCTTCAGC	ACC	5	196
Cgm22	AGGGAAACATACACGGTTTGT	CCAAGTGTTCACAAAGGAAGCT	AAC	5	197
Cgm23	CGATCTCGTATTCCAAACATGG	CCACGACCTTGAGGCCTAAT	AAG	21	198
Cgm24	TGAGACAAGATAAATAATCCAGA	CGTCATGATTCATCTCAAATTTGGG	AGGG	5	201
Cgm25	ACCGTCTTCCAAGTCGATGAA	ACCTTACCCTCACCAAACCC	ATC	5	206
Cgm26	TGTGGGAAGGAATAGAATCCCT	TCACCAAGTTGTTGAATTGCTG	AAG	5	206
Cgm27	GTAGCTTCCACTTAAACGCGG	AGTGTAAACTAGAGGACCACATT	ACC	6	212
Cgm28	CAGATTGAGGGAGTCGGCAC	GAAGGGAGTCTACCAAGCT	ACC	6	214
Cgm29	AGATTGTGGGATGCTGACGG	CCAGTGGACTGAGGAGAGGT	AGG	5	218
Cgm30	TGTGGTCGAGATGGAAGAGA	GGATTCTTCTCTTCCCATCA	ATC	5	232
Cgm31	GCTCAAGCCGATGCGTTAGA	TCAAGACGTGTGAGGCAAGT	AAT	5	238
Cgm32	ACCCATGTTTGATATCTGTCCCA	ATGCTACCTCCCGTAACTCA	AAC	5	240
Cgm33	TGTGTCAATTTCTATCAAGCTTCAA	TGTACAATGAGGTCATGGGCT	AAAT	6	242
Cgm34	AACATTGCAGCAGCCTCATG	ATGCTGCCGTAGTAGACACC	ATC	5	244
Cgm35	TCAATCACACCAAGCCAGGT	AGGAGTTTCGGAATCATGAAATTTGT	AAG	5	245
Cgm36	CGGCATGTGGTTGCTCATT	TGGTCCACACCCGTTCTACT	ACC	5	249
Cgm37	TGGTCTTCGAGTCGTTGTCG	CGGGTCTTCTAGGTAGGCT	AAG	5	254
Cgm38	TGCTCGCTCTTGAACCTGAA	CCATGCATGCATCCTCACCA	AGG	6	260
Cgm39	CAGCATCCAAGCAAGTGGC	AGACCCATGGTTGGCAATGA	AAAC	6	264
Cgm40	ACAGTAAACAATAAGGGTGAGAAT	GGATCCCAGCTTCTAGCTATT	AAC	5	272
Cgm41	ACTTACGACCATCATTTATGACA	TCCTAAGACGCTTTGCACCA	ACTG	6	274
Cgm42	AACGGCGAGGTTGTAGAGAA	CGTCGTTAGGCCACTGAGTT	AAC	7	283
Cgm43	TCAATTAATTAAGAGTTGTGTTGGGT	GGGTTCTTAGATCATACTTAAATGC	AAAG	5	291
Cgm44	GCATGACACGTGGCCAAATT	TAGTGTGAGGACCTCTGGGC	AAAG	7	294
Cgm45	GCAACTGGATTCTGCTATCGG	TGTTTATGTCTTACCATTCTCCA	ATC	5	296
Cgm46	AGCGGAATGGAACATATGTCT	TGCATCTGTCAGGAATAGCTGG	AAT	7	296
Cgm47	GGCATTGTCAATATTTGGTGGCA	ACCCGACTGTCCTTGAGAAG	AAC	5	296
Cgm48	ATTCTTGCTGCCGCTATG	TCTTGACAGTAAAGGGAAGGT	AAG	5	296
Cgm49	GGGTGGCACCGGAAAGATAA	TCCACCACTGTCCTTAAACC	ACC	5	299
Cgm50	TGCAAGTTCATTCATTAGCAGC	CCTCCCAAATTTCTACAAGCA	AAG	5	300

Tab. P.11 Dataset 50 mikrosatelitových primerů, které jsou vybrány z celkem 430 navržených.