

**Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty
Univerzity Karlovy v Praze**



Diplomová práce

**Morfologická variabilita a ekologická
diferenciace druhů z okruhu *Glyceria fluitans***

**Morphological variability and ecological differentiation
of *Glyceria fluitans* group**

Bc. Hana Chudáčková

Školitelka

RNDr. Zdenka Hroudová, CSc.

Praha 2009

Diplomová práce **Hany Chudáčkové** byla obhájena na katedře botaniky PŘF UK v Praze dne 25.5.2009 a ohodnocena klasifikačním stupněm **v ý b o r n ě**.



Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně s použitím zdrojů, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Alena Černá

Poděkování: Na prvním místě patří poděkování školitelce Zdence Hroudové za laskavé vedení práce.

Dále bych ráda poděkovala Ivaně Plačkové, Marii Albrechtové, Vlastě Jarolímové, celé cytometrické laboratoři v Průhonicích a Martinovi Weiserovi. Dík patří i Petrovi Zákravskému, bez jehož pomoci by mnohá bahnitá strouha zůstala neobjevena a shovívavému šéfovi Otovi Šídovi. Velký dík si zasloužil rychlý hasičský sbor ve složení Petr Vít & Tomáš Urfus, kteří bez ohledu na vlastní pohodlí pomohli v době nejtěžší. Nakonec patří mé díky všem přátelům a rodině, bez jejichž podpory by tato práce nevznikla.

Obsah

Úvod	2
1. Stručná charakteristika rodu <i>Glyceria</i>.	5
1.1 Zařazení v systému cévnatých rostlin	5
1.2 Stručná morfoloická charakteristika.	5
1.3 Celkové rozšíření.	5
1.4 Vnitřní členění	5
1.5 Okruh <i>Glyceria fluitans</i> v českých květenách a klíčích	6
1.6 Rozšíření rodu <i>Glyceria</i> v ČR	7
1.7 Způsoby rozmnožování.....	7
2. Charakteristika jednotlivých druhů okruhu <i>G. fluitans</i>.	9
2.1 <i>G. fluitans</i> (L.) R. Brown	9
2.2 <i>G. notata</i> Chevall.	11
2.3 <i>G. declinata</i> Bréb.	12
2.4 <i>G. nemoralis</i> (Uechtr.) Uechtr. et Körnicke.....	15
3. Ekologická charakteristika druhů.	17
3.1 Metodika.....	17
3.2 Výsledky	20
4. Karyologie a cytometrie	29
4.1 Metodika.....	29
4.2 Výsledky	31
5. Isozymové analýzy	38
5.1 Metodika.....	39
5.2 Výsledky	41
6. Morfometrické analýzy	46
6.1 Metodika.....	46
6.2 Výsledky	49
7. Morfoloická charakteristika jednotlivých druhů	75
8. Diskuse	79
9. Závěr	84
10. Abstract	85
11. Seznam použité literatury	87

Seznam obrázků a tabulek

Přílohy

Úvod do problematiky

Komplexy blízce příbuzných druhů často sdružují morfologicky nepříliš odlišné taxony, které se však mohou vyznačovat výraznou stanovištní diferenciací. Znalosti míry diferenciaci mezi taxony v obou těchto směrech mohou poskytnout důležitou informaci o mikroevolučních procesech v rámci celého komplexu. Důvodem blízkosti blízce příbuzných taxonů bývá často polyploidizace. S polyploidizací souvisí řada významných fenoménů mezi nimiž patří k nejdůležitějším širší ekologická amplituda polyploidních než u jejich diploidních rodičovských (nebo jinak příbuzných) taxonů. Výše uvedený fenomén proto polyploidy může výrazně zvýhodňovat, především s ohledem na jejich kolonizační potenciál (Stebbins 1971). Rozdíly mezi diploidy a polyploidy byly zjištěny v geografickém rozšíření, ve výskytu v různých nadmořských výškách i v osidlování různých typů stanovišť (Lewis 1980, Brochman et Elven 1992). Polyploidní taxony (resp. cytotypy) zvýhodňuje celá řada faktorů (vyšší míra heterozygoty, větší objem buňky, možnost nových interakcí jaderného a plastidového genomu, v rámci funkční diploidizace větší pravděpodobnost generování nových genů; Levin 1983, 2002).

Kolonizační potenciál však nemusí být nutně vázán na vlastnosti genomu, může být způsoben velkou fenotypovou plasticitou. Adaptivní schopnosti rostlin reagovat změnami růstu, vývoje, rozmnožování i jiných projevů na proměnlivost prostředí je hlavním mechanismem umožňujícím přežití v nestálých podmínkách (Bradshaw 1965). Rostliny s velkou fenotypovou plasticitou mohou snáze reagovat na změny prostředí a jsou schopné lépe se vyrovnávat se stresovými faktory (u vodních a mokřadních druhů byla tato problematika poměrně vzácně studovaná; např. Idestam-Almquist et Kautsky 1995, Puijalón et Bornette 2006). Mikroevoluční aspekty fenotypové variability byly sledovány v řadě studií - výrazná adaptabilita se vyskytuje zejména u rostlin s vyvinutou heterofylií (např. *Hippuris vulgaris*, *Proserpinaca palustris*; Wells et Pigliucci 2000, Dorken et Barrett 2004). Otázka fenotypové plasticity byla předmětem zájmu mnoha studií zejména s ohledem na evoluční proces (např. Grant 1991 a řada dalších prací). Méně je znám dopad fenotypové plasticity na ekologické chování rostlin, které může ovlivnit vzájemné biotické interakce ve společenstvu, populační dynamiku apod. (Miner et al. 2005).

Jedním z nejvhodnějších modelů pro srovnávací taxonomicko-ekologickou studii adaptability rostlin (včetně fenotypové plasticity) jsou polyploidní komplexy. Při studiu morfologické variability, diferenciaci a rozšíření polyploidních komplexů nejde pouze o zjištění stavu jednotlivých zkoumaných objektů, tj. jak se jednotlivé taxony či cytotypy od sebe liší, ale i o

objasnění vzájemných vztahů mezi nimi. Podobné studie často vedou k vysvětlení základních mechanismů, které způsobily jejich diverzifikaci. Studium výše uvedené problematiky však umožňuje odpovědět na celou řadu dalších otázek. Lze například odhalit možné korelace s šíří ekologické amplitudy, s frekvencí výskytu druhu, s efektivitou reprodukčních systémů a jejich vztahem k šíření druhu a resistenci populací. Při řešení těchto otázek se již není možné obejít bez vzájemného propojení taxonomického a ekologického studia, a skupina *Glyceria fluitans* je pro toto studium vhodný objekt. Zásadní výhodou je i fakt, že se na území ČR vyskytují společně téměř všechny evropské druhy sekce *Glyceria*: dva druhy diploidní (*G. declinata* Bréb, *G. nemoralis* (Uechtr.) Uechtr. et Körnicke) a dva tetraploidní (*G. fluitans* (L.) R. Brown a *G. notata* Chevall; Borill 1956b, 1958b, Church 1949, Fitzpatrick 1946, Holub 1970).

Diplomová práce navazuje na výsledky prací zabývajících se druhy r. *Glyceria* v České republice (Holub 1960, 1970) a ve Velké Británii (Borrill 1956a, b, 1958a, b). Borrill se v rámci pěstebních experimentů věnoval především morfologickým charakteristikám. Druh *G. nemoralis*, který se ve Velké Británii nevyskytuje (Holub 1980), do jeho studie nebyl zahrnut. Informace o tomto druhu s východoevropským rozšířením jsou tedy stále omezeny na údaje dokládající výskyt v arelech na území jednotlivých států (Holub 1970, 1980, Mirek 1988) Avšak i u ostatních druhů chybí srovnávací ekologická charakteristika, znalost struktury populací a zhodnocení morfologické variability

Glyceria fluitans, *G. notata*, *G. declinata* a *G. nemoralis* jsou zástupci sekce *Glyceria* vyskytující se na území České republiky. Členění na vnitrodruhové úrovni existuje pouze u druhu *G. fluitans*, u něhož kromě nominální subspecie bývá v Evropě uváděna také subsp. *poiformis* Fries, pravděpodobně původní v severní Evropě (Dostál 1989). Tato subspecie byla dříve udávána i z ČR (Kubát 2002), avšak zde šlo zřejmě o záměnu s křížencem *G. × pedicellata* (Kubát 2002). Z Islandu je udávána var. *islandica* (Löve 1951), oprávněnost jejího odlišení je však předmětem dalšího zkoumání v severských zemích. Je pravděpodobné, že u většiny morfologických odchylek, které se u *G. fluitans* vyskytují, jde o ekomorfózy, jejichž případný taxonomický status musí být dobře zváženo (Borill 1958a, b). Do sekce *Glyceria* patří také kříženec *G. × pedicellata* Townsend *G. notata* × *G. fluitans*; v otázce dalších možných kříženců chybí podrobnější údaje a literární zdroje se značně rozcházejí; např. Kubát (2002) uvádí kromě *G. × pedicellata* ještě křížence *G. × digenea* Domin (*G. maxima* × *G. notata*). Z Velké Británie je udáván kříženec *G. fluitans* × *G. declinata* ($2n=30$; Stace

1984). Rozsáhlé hybridizační pokusy Borrilla (1958a) však nevedly při této rodičovské kombinaci ke vzniku semen. O hybridizačním potenciálu *G. nemoralis* není, narozdíl od alespoň dílčích znalostí u druhů *G. fluitans*, *G. notata* a *G. declinata*, dosud nic známo.

Studované druhy se pravděpodobně liší ve způsobu generativního rozmnožování. Při umělém opylování rostlin v kultuře byly u *Glyceria fluitans* zjištěny značné výkyvy v úspěšnosti samoopylení, svědčící o vysokém stupni *autoinkompatibility*, zatímco u *G. declinata* a *G. notata* se produkce semen a jejich životnost nezhoršily ani po třech sezónách samoopylování v kultuře (Borill 1958b). Je proto velmi pravděpodobné, že se mohou vyskytovat klonální populace *G. fluitans* s velmi omezeným generativním rozmnožováním. Opylení cizím pylem naproti tomu často vede ke vzniku větší genetické variability mezi populacemi.

Výše uvedené znalosti problematiky sekce *Glyceria* dávají základ pracovním hypotézám, které se staly osou diplomové práce:

1. Větší růstová a morfologická plasticita umožňuje schopnost větší adaptability vůči změnám životního prostředí, což vede ke schopnosti přežít na nejrůznějších typech stanovišť.
2. Větší schopnost osidlovat nová stanoviště a přežívat na stávajících lokalitách mají druhy s vyšší ploidní úrovní.

K testování uvedených hypotéz je třeba zaměřit se na zodpovězení následujících otázek, které staly cíli diplomové práce:

1. Jaká je intra- a interpopulační variabilita v rámci jednotlivých taxonů? Udržují se morfologické rozdíly zjištěné mezi populacemi i při pěstování rostlin v kultuře? Který z druhů má největší rozsah morfologické variability?
2. Jaký je charakter vybraných populací jednotlivých druhů (velikost, fragmentace)?
3. Jaká je absolutní velikost jaderného genomu jednotlivých druhů a jak tyto druhy diferencuje?
4. Jaké rozdíly mezi druhy existují ve vazbě na stanovištní faktory (půdní chemismus, vodní režim, antropické vlivy) a rostlinná společenstva? Jaká je šíře ekologické amplitudy jednotlivých druhů?
5. Lze šíři ekologické amplitudy a frekvenci výskytu vztáhnout k morfologické variabilitě druhů?
6. Lze šíři ekologické amplitudy a frekvenci výskytu vztáhnout k úrovni ploidie?

1. Stručná charakteristika rodu *Glyceria*

Glyceria R. Brown 1810, Prodr. Fl. Nov. Holl. 1: 179 [nomen conservandum]

České jméno: zblochan

1.1 Zařazení v systému cévnatých rostlin

Glyceria sensu APG II (2003):

Clade: Monocots, Commelinids řád: Poales, čeleď Poaceae,

Rod *Glyceria* sensu Takhtajan (Takhtajan 1996):

Kmen: Magnoliophyta, třída: Liliopsida, podtřída: Commelinidae, řád: Poales, čeleď: Poaceae, podčeleď: Pooideae, tribus: Melicae, rod: *Glyceria*

1.2 Stručná morfologická charakteristika

Rod *Glyceria* zahrnuje vytrvalé byliny rozšířené zejména v mírném pásu severní polokoule. Jsou to rostliny vysoké od 15 do 200 cm, tvořící většinou řídké porosty, s poléhavými až přímými stébly a s podzemními oddenky. Listové čepele bývají špičaté nebo zašpičatělé, z obou stran nebo jen na spodní straně drsné. Jazyčky rodu *Glyceria* mají blanitý okraj. Lata bývá volná nebo stažená, často poněkud nachýlená na stranu. Klásky jsou vícekvěté, oválné nebo úzce protáhlé. Pluchy jsou 5-11ti žilné, bez osin, pluška bývá zhruba zdéli pluchy. Plody jsou obilky s malým embryem (Tzvelev 1976, Holub 1980).

1.3 Celkové rozšíření

Rod *Glyceria* zahrnuje asi 50 druhů, s těžištěm rozšíření rodu v mírném pásu Starého i Nového světa. Některé druhy mohou být nalezeny v subtropích obou polokoulí a částečně i v horských oblastech tropů. Z těchto 50 druhů se jich v Evropě vyskytuje 11 (Tzvelev 1976).

1.4 Vnitřní členění

Rod *Glyceria* se dnes rozděluje do 3 sekcí – *Hydropoa*, *Striatae* a *Glyceria* – morfologicky dobře odlišených. Hitchcock (1935) uvádí rozdělení rodu *Glyceria* na dvě sekce, a to *Euglyceria* pro *G. fluitans* a příbuzné taxony a sekci *Hydropoa* pro ostatní druhy. Vymezení znaků druhů ze sekce *Euglyceria* uvádí Gordon (Grenier & Gordon 1856 viz Church 1949). Jedná se zejména o znaky na kláscích, jako je protáhle kuželovitý tvar klásků před opylením, srostlé plenky a zbytek blizny přetrvávající na obilce. Druhy s víceméně zploštělými klásky a rozložitými latami byly zařazeny do druhé sekce s názvem *Hydropoa*. Tato skupina se však jevila příliš heterogenní a Church (1949) ji tedy rozdělil do dvou sekcí. Nová sekce, s názvem *Striatae*, zahrnuje druhy s pluchou na vrcholu ostrou nebo tupou, pluškou na vrcholu rozřízlou úzkým zářezem, s plevami volnými, oválnými nebo tupými a s obilkami obvykle obvejčitými, velmi vzácně oválnými (Church 1949; podrobný klíč s vymezením sekčních znaků tamtéž).

1.4.1 Sekce *Hydropona* Dumort.

Sekce *Hydropona* se vyznačuje dlouhými, tlustými oddenky, vzpřímeným stéblem, robustním vzhledem a kuželovitými listovými pochvami. Druhy této sekce mají velmi širokou, rozvětvenou latu tvořenou mnoha klásky 4–10 mm dlouhými. Pluška není na kýlu křídlatá, tyčinky jsou v květu 3 (Holub 1980). Do této sekce patří 3 evropské druhy, a to druh *G. triflora*, rozšířený na středním Uralu, ve středním Rusku a dále na severu Asie, dále druh *G. arundinacea*, jehož areál rozšíření zaujímá severovýchodní Evropu od Bulharska po dolní tok Volhy, na sever zasahující až na 51° s.š. v Rusku a druh *G. maxima*, jediného zástupce této sekce v ČR, jehož areál zaujímá většinu Evropy (chybí pouze v nejsevernějších oblastech a také ve většině jihozápadní Evropy) (Holub 1980).

1.4.2 Sekce *Striatae* Church

Tato sekce zahrnuje zástupce rodu *Glyceria* s dlouhými, celkem tlustými oddenky, se vzpřímeným, tenkým stéblem a zploštělými listovými pochvami. Mají široce rozloženou bohatou latu s klásky o velikosti 210 mm. Pluška není na kýlu křídlatá, tyčinky jsou v květu pouze 2 (Holub 1980). Z této sekce je v Evropě pouze druh *G. lithuanica*, vyskytující se ve vlhkých lesích severovýchodní Evropy, který dosahuje na západ Norska a na jih na 53° s. š. v Rusku. Dalšími zástupci v této skupině jsou *G. canadensis*, severoamerický druh zdomácnělý v Německu a *G. striata*, rovněž severoamerický druh, který byl v nedávné době nalezen vzácně se vyskytující i v ČR (Holub 1980, Dančák 2002).

1.4.3 Sekce *Glyceria* (*EuGlyceria* Griseb.)

Sekce je charakterizována krátkým oddenkem, úzkými stébly, často ležatými nebo vystoupavými. Listové pochvy jsou zploštělé, květenstvím je rozložitá nebo úzká lata, někdy pouze s několika klásky dlouhými 8–30 mm. Plušky jsou na kýlu křídlaté, tyčinky jsou v květech 3. Do této sekce patří většina zblochanů vyskytujících se na území ČR. Jediným druhem z této sekce, který se u nás nevyskytuje, je *G. spicata*, rostoucí ve východním a středním Středozeří, velmi podobný *G. fluitans*. Jeho taxonomická hodnota je stále předmětem zkoumání (Holub 1980).

1.5 Okruh *Glyceria fluitans* v českých květenách a klíčích

G. declinata ani *G. striata* není v Dostálově Květeně ČSR (Dostál 1950) ještě uvedena, podobně jako ve flórách sousedních zemí (Mirek et Zaluski 1986). Dostál (1950) uvádí jak sterilního křížence *G. ×pedicellata*, tak několik dalších kříženců – *G. digenea* (*G. maxima* × *G. fluitans*), *G. ×Daňhelkyana* (*G. maxima* × *G. nemoralis*) i s místy vzácných nálezů, ale bez bližšího popisu rostlin. Dále je zmíněn poddruh od *G. fluitans* ssp. *poaeformis* a od *G. maxima* (*G. maxima* ssp. *arundinacea*) Holub publikoval roku 1960 (Holub 1960) práci o

roztrošeném výskytu *G. declinata* v ČSSR. V Dostálově seznamu cévnatých rostlin ČSSR (Dostál 1982) se objevuje *G. ×pedicellata*, *G. digenea* i *G. ×Daňhelkyana*, nově je zmíněna *G. stricta*. V Nové Květeně z roku 1989 (Dostál 1989) je již druh *G. declinata* uváděn jako celkem hojný v západní polovině republiky, na východ výrazně vyznívající. Zmíněni jsou všichni tři shora zmínění kříženci i oba poddruhy. Nejnovější je nález severoamerického druhu *G. striata*, který byl objeven ve východní části republiky, vyskytuje se zde však jen vzácně (Dančák 2002).

1.6 Rozšíření rodu *Glyceria* v ČR

Na území ČR jsou tedy zastoupeny všechny sekce, a to taxony *G. maxima* (sekce *Hydropoa*), *G. striata* (sekce *Striatae*) a druhy *G. fluitans*, *G. notata*, *G. declinata* a *G. nemoralis* (sekce *Glyceria*). Do sekce *Glyceria* patří také kříženec *G. ×pedicellata* (rodiči jsou *G. notata* a *G. fluitans*), který je zcela sterilní, ale může být vzácně nalezen v oblastech výskytu obou rodičovských druhů, protože se šíří vegetativně. O ostatních křížencích však chybí podrobnější údaje, a například Kubát (Kubát et al. 2002) zmiňuje kromě *G. ×pedicellata* pouze *G. digenea*, a to jako křížence *G. maxima* a *G. notata* (podobně Dostál 1989, zde ovšem i *G. ×Daňhelkyana*).

1.7 Způsoby rozmnožování

Způsoby rozmnožování detailně studoval na materiálu z Velké Británie Borrill (Borrill 1958). Z jeho pokusů vyplývá několik důležitých poznatků o chování jednotlivých druhů rodu *Glyceria* v kultuře a při umělé hybridizaci. Bohužel do jeho studie nemohla být zahrnuta *G. nemoralis*, neboť na Britské ostrovy již areál rozšíření tohoto druhu nesahá (Holub 1980). Rostliny druhu *Glyceria declinata* vykazovaly vysokou úspěšnost samoopylení a semena získaná tímto způsobem nevykazovala neměla horší životnost než semena získaná normální cestou. Totéž platí o druhu *G. notata*. U obou nedošlo k pozorovanému zhoršení vlastností semen ani po třech sezónách samoopylování v kultuře. Úplně odlišně se jeví chování rostlin druhu *G. fluitans*, u něhož zřejmě fungují bariéry snižující fertilitu po samoopylení. Zatímco výsledky u předchozích dvou druhů byly ve všech populacích stejné, populace *G. fluitans* dávaly pokaždé jiné výsledky. Je zřejmé, že se *G. fluitans* liší od ostatních dvou studovaných druhů ve stupni *autokompatibility* a také podle průběhu oplození. Je tedy možno považovat druhy *G. notata* a *G. declinata* za inbrední druhy, na rozdíl od druhu *Glyceria fluitans*, přestože i u tohoto druhu se musí s určitým procentem semen vzniklých samoopylením počítat. Výsledky této studie také přinášejí možné vysvětlení vyšší variability u druhu *G. fluitans*, v porovnání s ostatními dvěma druhy, která může být v přímé souvislosti s převažujícím způsobem rozmnožování. Borrill (1958) také prováděl oboustranné hybridizační

pokusy, mezi *G. declinata*, *G. fluitans* a *G. notata* a mezi tetraploidními *G. fluitans* a *G. notata*. Při křížení *G. declinata* s tetraploidními druhy žádná semena nevznikla. Při vzájemném křížení tetraploidních druhů sice nevznikli fertální jedinci, nicméně s různou úspěšností vznikala semena. Zdá se, že existuje vyšší pravděpodobnost vzniku životaschopných semen pokud je donorem pylu druh *G. notata*.

2. Charakteristika jednotlivých druhů okruhu *G. fluitans* na základě literárních údajů

2.1 *G. fluitans* (L.) R. Brown – zblochan vzplývavý

Morfologická charakteristika

Kořenující stébla (40–120 cm vysoká) zblochanu vzplývavého jsou vystoupavá nebo poléhavá, ve vodě vzplývavá. Oddenky tohoto druhu jsou dlouze plazivé. Listy má tmavě až šedě zelené, dlouze zašpičaté a zejména pod vrcholem velmi drsné. Listové pochvy bývají hladké a slabě zploštělé. Lata je ochablá, jednostranná, řídká a nesouvislá. Ve středních nodech květenství je rozvětvená, po odkvětu je stažená. Klásky bývají krátce stopkaté, čárkovitě podlouhlé a špičaté. Pluchy jsou podlouhlé, 5,5–7,5 mm dlouhé, mají 7 vyniklých žilek, na vrcholu bývají špičaté nebo zašpičaté a celokrajné. Prašníky jsou fialové, 2–3 mm dlouhé, obilky téměř třikrát delší než široké, podlouhle obvejčité až elipsoidní (Borrill 1956a, Dostál 1989, Holub 1980).

Taxonomická problematika druhu *G. fluitans*

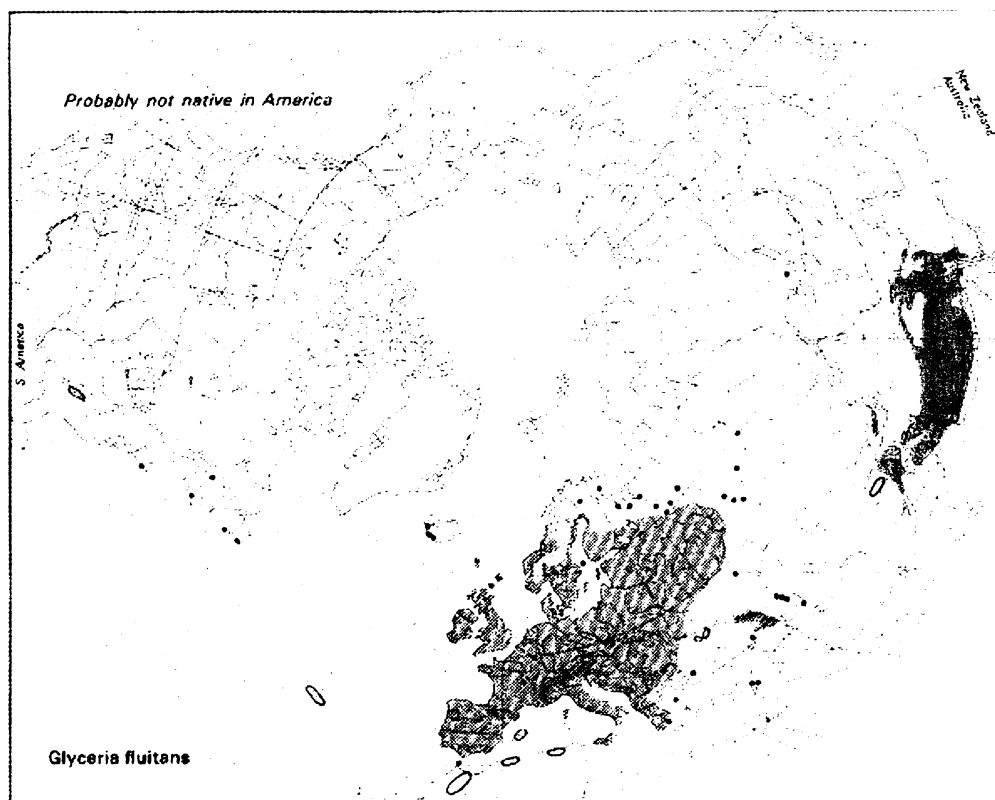
Kromě ssp. *fluitans*, charakterizované jednostrannou úzkou latou se silnými větévkami, zejména v horní části výrazně drsnými listy, pluchou 3x delší než širokou, špičatou a klásky světle zelenými, se v Evropě vyskytuje ssp. *poiformis* Fries (syn. *poaeformis*), se širokou latou s tenkými větévkami, méně drsnými listy, pluchou jen 2x delší než širokou a na konci tupou, s klásky tmavě zelenými (Holub 1980, Dostál 1989). Pravděpodobně je původní v severní Evropě. V minulosti byl tento poddruh chybně udáván z Chřibů, zřejmě díky záměně s *G. × pedicellata*. Nicméně k obtížně rozlišitelnému kříženci *G. × pedicellata* náleží pravděpodobně alespoň část rostlin odlišovaných v zahraničí jako ssp. *poiformis* (Kubát 2002). Z Islandu je udávána varieta *islandica* (Löve 1951), vyznačující se kratšími, zvlněnými až vroubkovanými pluchami; oprávněnost odlišování této variety je předmětem dalších zkoumání v severských zemích (Holub 1980). Ze všech blízce příbuzných druhů našich zblochanů se u *G. fluitans* nejčastěji vyskytují poměrně dobře rozlišitelné ekomorfózy, jejichž taxonomický status musí být dobře zvážen (Borrill 1958a).

Karyologie

Stählin (1929) udává $2n = 28$. Jeho údaj však není podložen herbářovou položkou, a tak jej lze považovat diskutabilní. Všechny práce od roku 1939 se shodují, že *G. fluitans* je tetraploidní ($2n = 40$; Fitzpatrick 1946, Borrill 1956b, Kubát 2002).

Celkové rozšíření

Areál rozšíření druhu *G. fluitans* má boreálně-subatlantský charakter (Dostál 1989, Holub 1980), těžištěm rozšíření je Evropa. Výskyty jsou udávány od severní Afriky po Sibiř a Sýrii. Jeho výskyt na východě USA je zřejmě sekundárního rázu (Church 1949), podobně jako výskyt v Austrálii (Conert 1992).



Obr.1: Mapa celosvětového rozšíření druhu *Glyceria fluitans* (Meusel 1965)

Rozšíření v ČR

Na území ČR je *G. fluitans* nejhojnější z blízkce příbuzných druhů sekce *Glyceria*. Převažuje zejména v kolinním až montánním stupni, naopak v termofytiku se vyskytuje řidče až vzácně (Dostál 1989, Kubát 2002, Hrančík 2005). Výškové minimum výskytu bylo zaznamenáno v Mělníku 150 m n. m., maximum na Kvildské slati, v přibližně 1100 m n. m.

Ekologie a charakter populací

Roste na chladných, bažinatých, mělce zaplavených, v létě občas vysychajících půdách, často chudých na vápník, většinou neutrálních až kyselých (Dostál 1989, Hrančík 2005). Fenologicky odpovídá ostatním evropským zblochanům, tj. kvete několik měsíců od května do října (Holub et al. 1970). Je diagnostickým druhem ve společenstvech svazu *Sparganio-Glycerion fluitantis*, jako dominantní druh se vyskytuje i ve společenstvu *Oenanthion aquaticae* (Chytrý et al. 2001, Chytrý et Tichý 2003).

2.2 *G. notata* Chevall. (syn. *G. plicata* Fries) – zblochan řasnatý

Morfologická charakteristika

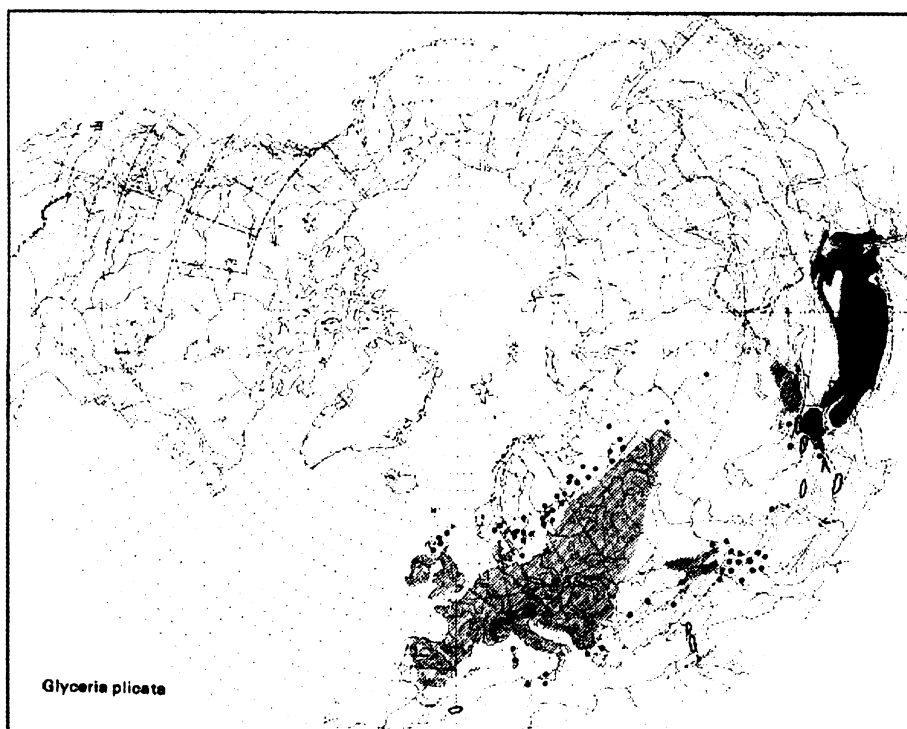
Asi 40–80 cm vysoká, tmavá až modrozelená rostlina s plazivým, výběžkatým oddenkem. Listy jsou v mládí 2x podélně zřasené, v dospělosti ploché, slabě drsné, žebernaté, náhle zašpičatělé. Listové pochvy jsou slabě zploštělé. Žilky listových pochev jsou rovné, nezprohýbané, nejsou nápadně vyniklé. Lata je protáhlá, všestranně bohatě větvená, někdy může být převislá. Klásky jsou šedozelené, někdy slabě nafialovělé, úzce podlouhlé. Plevy jsou nestejně dlouhé, tupé, pluchy jsou široce eliptické, na okraji mělce vroubkované, 3,5–4,5 mm dlouhé, na hřbetě mezi žilkami drsné. Žilky jsou stejně dlouhé, dosahují blanitého okraje pluchy. Pluška obvykle bývá kratší než plucha (Dostál 1989, Kubát 2002, Holub 1980).

Karyologie

Vedle *G. fluitans* je druh *G. notata* naším druhým tetraploidem s $2n = 40$. Podobně jako u *G. fluitans*, i u tohoto druhu udává Stählin (1929) počet $2n = 28$, opět nedoložený herbářovou položkou a pozdějšími autory nepotvrzený (Fitzpatrick 1946).

Celkové rozšíření

Zblochan řasnatý je subatlantsko-submediteránním prvkem, a tak je rozšířený v celé Evropě od severní Afriky po Blízký Východ, na sever až po $62^{\circ}30'$ v severozápadním Rusku (Holub 1980). Sekundárně je rozšířen například v Costa Rice (Conert 1992).



Obr. 2: Mapa celosvětového rozšíření druhu *Glyceria notata*. (Meusel 1965)

Rozšíření v ČR

Vyskytuje se hojně až roztroušeně po celém území České republiky, zejména v Panonském termofytiku a teplejším mezofytiku (střední Čechy, východní Morava). V oreofytiku, především v Českém, je nalézán velmi vzácně. Výškové minimum výskytu bylo zaznamenáno v Litoměřicích 140 m n. m., maximum u Petrovky (Krkonoše) v přibližně 1100 m n. m. Společně s *G. fluitans* se jedná o nejhojnějšího zástupce rodu v ČR (Hrančík 2005, Kubát 2002).

Ekologie

Druh se vyskytuje u potoků nebo v příkopech s pomalu tekoucí vodou, na prameništích, rašeliništích a na lučních mokřadech. Roste na mokřých, bažinatých nebo mělce zaplavovaných půdách, bohatých na živiny, často vápnitých a humózních (Dostál 1989). Často se vyskytuje jako dominantní druh ve společenstvech svazu *Sparganio-Glycerion fluitantis* (Chytrý et al. 2001, Chytrý et Tichý 2003). Jako významný druh se podílí na asociaci *Glycerietum plicatae* a *Glycerietum nemoralis-plicatae*. (Moravec et al 1995)

2.3 *G. declinata* Bréb. - zblochan zoubkatý

Druh *G. declinata* byl popsán na druhové úrovni Brébissonem (Brébbison 1859) ve Francii a dlouho byl považován pouze za lokální typ vyskytující se na západním pobřeží Atlantiku ve Francii a jihovýchodní části Velké Británie. V mnoha případech byl tento taxon chybně přiřazován k druhu *G. fluitans* nebo *G. notata*. Cytologický průzkum v letech 1939–1956 na materiálu z mnoha zemí – Velká Británie (Maude 1939, Fitzpatrick 1946, Borrill 1956), Francie (Stoermer 1951), Korsika (Litardiére 1954), Norska (Stoermer 1951) i USA (Church 1949) (shrnuto in Holub 1960) – dokázal karyologickou odlišnost od obou těchto druhů. Poté se tomuto druhu začala věnovat pozornost a zástupci druhu *G. declinata* byli náhle nalezeni ve všech západo- a středoevropských zemích. I na území ČR byl tento druh dlouhou dobu přehlížen. Paradoxně však byl taxon *G. declinata* poprvé popsán roku 1827 v práci Flora von Schlesien (viz Holub 1960) právě z území ČR (Velké Heraltice u Opavy), a to jako varieta *G. fluitans*. Přesvědčivým důkazem o příslušnosti této rostliny k druhu *G. declinata* je její nízký vzrůst (jenž dal rostlině latinské jméno) a zejména údaj o zubatosti pluchy (Holub 1960). Znovuobjevení druhu *G. declinata* na našem území bylo publikováno v roce 1960 Holubem (1960). V práci Walterse (1959) i Holuba (Holub et al. 1970) se objevují zmínky o vzácném kříženci *G. declinata* a *G. fluitans* ve Velké Británii a Švédsku (Lambert 1949, Hubbard 1954). Borrill (1958b) však nepotvrdil výskyt tohoto hybridu ani jeho vznik při hybridizaci v experimentálních podmínkách. Jako poslední byla publikována zmínka o

nalezení kříženci *G. declinata* a *G. fluitans* v okolí Cambridge ve Velké Británii i s chromozomovým počtem - $2n = 30$ (Stace 1984).

Stručná morfologická charakteristika

G. declinata je vytrvalá, zpravidla volně trsnatá bylina. Je lysá, sivá nebo alespoň nasivělá, často bývá fialově zbarvená. (5-)10–55(-70) cm vysoká, zpravidla s plodnými i kvetoucími stébly v jednom trsu. Oddenek je rozvětvený, krytý bezčepelnými, vláknitě rozpadavými pochvami. Stébla jsou přímá, vzpřímená nebo častěji obloukovitě vystoupavá z poléhavé báze, na bázi často kořenující. Pochvy stébelných listů jsou silně zploštělé, kýlnaté, hladké nebo mírně drsné, s okraji tenkými a blanitými, mnohem delší než články stébelné. Jazyček je 4–8 mm dlouhý, ostrý nebo zaostřený, celistvý, později může být hrubě rozdrípený. Listové čepele jsou čárkovité až široce čárkovité, po délce zhruba stejně široké, nahoře náhle stažené v kápoitou špičku. Květenstvím je úzká lata, v obrysu čárkovitá až kopinatá, přímá nebo zakřivená, zpravidla jednostranná, za plodu stažená. Je jednoduchá, hroznovitá, nebo má naspodu 1–2 odstálé příosní chudokláskové větévky. Větévky latic jsou tuhé. Klásky bývají vzpřímené, krátce stopkaté, válcovité a poněkud smáčklé, s 8–12 zelenými nebo nafialovělými květy (Holub 1960, Kubát 2002).

Hlavními rozlišovacími znaky oproti ostatním druhům ze sekce *Glyceria* jsou: 3(–5) výrazné zuby na vrcholu pluchy. Žilky pluchy probíhají až k blanitému lemu a 3 z nich dosahují téměř okraje pluchy v jim odpovídajících zoubcích. Listy náhle kápořitě stažené a sivé. Prašníky 0,7–1 mm dlouhé, nanejvýš 2x delší než široké (ostatní druhy mívají prašníky delší než 1 mm a 2–5x delší než široké; Holub 1960).

Morfologická variabilita

Variabilita druhu *G. declinata* je zřejmě omezena jen na ekomorfózy, byť na první pohled celkem odlišné. Typ vysychajících lučních cest je představován rostlinami nízkými, často trsnatými (vzrůstem připomínající *Alopecurus aequalis*), se zhruba hroznovitým květenstvím, lodyhami a klásky fialově naběhlými. Protiklad tvoří rostliny statné, zelené, jen mírně nasivělé s větší a rozložitější latou a klásky zelenými, který se vyskytuje poblíž rybníků a potůčků (Holub 1960). Ze zahraničí jsou udávány také vzplývavé formy (Walters 1959), z našeho území dosud nepublikované (pravděpodobně proto, že *G. declinata* na našem území se tak často ve vodě nevyskytuje).

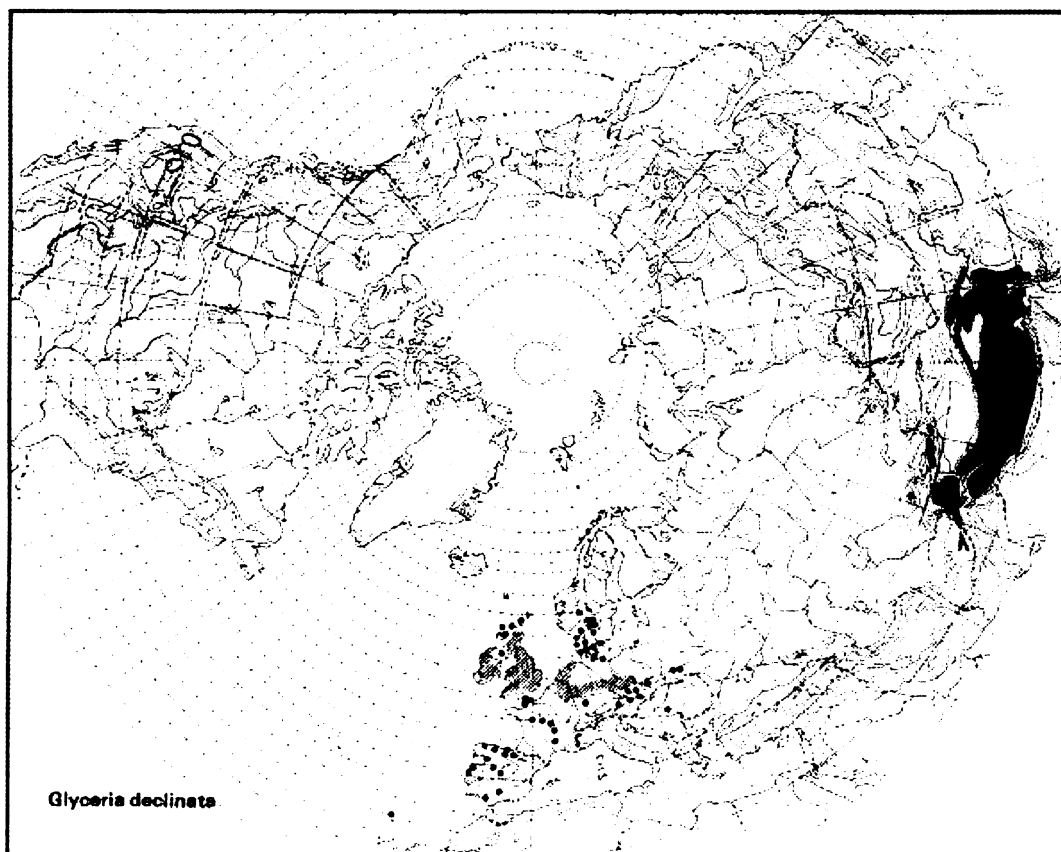
Karyologie

Přehled studií zabývajících se chromozomovými počty u druhu *G. declinata* uvádí Holub (1960). Všechny práce se shodují na tom, že druh *G. declinata* je diploidní, $2n = 20$. Tento počet byl zjištěn na materiálu z Velké Británie (Maude 1939, 1940, Fitzpatrick 1946, Borrill

1956), Francie (Stoermer 1951), Korsiky (Litardiére 1954), Norska (Stoermer 1951) a USA (Church 1949).

Celkové rozšíření

Charakterem svého areálu se *G. declinata* řadí mezi subatlantské prvky, celkový areál druhu zaujímá atlantickou část Evropy od 60° s. š. (jižní Norsko) k 36° s.š. (Algeciras u Gibraltaru na Pyrenejském poloostrově), s hlavním výskytem ve Velké Británii a střední Evropě. Na východ jsou známy jen ojedinělé výskyty na Ukrajině a v rumunské části Banátu. Vedle evropských výskytů je známa z Makaronésie (Madeira; Holub 1960). Je udáván i ze severní Ameriky (Nevada, Kalifornie), kde však není považován za původní taxon (Barkworth 2007) V celém areálu dosahuje *G. declinata* nejvyšší nadmořské výšky v USA v kaňonu řeky Sacramento v 1300 m n.m. Nejvyšších nadmořských výšek v Evropě dosahuje zblochan v horách střední Evropy ve výškách okolo 1000 m n.m.(Holub 1960).



Obr. 3: Mapa celosvětového rozšíření druhu *Glyceria declinata* (Meusel 1965)

Rozšíření v ČR

Vzhledem k oceánickému rozšíření druhu je centrem jeho výskytu západní polovina Čech a to zejména v kolinním až submontánním stupni. V termofytiku je nalézán vzácně, v teplejším mezofytiku je jeho výskyt roztroušený, v oreofytiku (kromě Žďárských vrchů) je také

poměrně vzácný. Nejvíce lokalit bylo zaznamenáno ve fytochorionu Českomoravská vrchovina a Žďárské vrchy. Minimum výskytu Lanžhot, 155 m n. m., maximum Pustevny, 1105 m n. m. (Hrančík 2005. Kubát 2002).

Ekologie

Obvyklým stanovištěm bývají mokré lesní a luční cesty, okraje příkopů, břehy rybníků a tůní; stejně tak je možno jej nalézt ve vlhkých depresích a na pastvinách. Oproti ostatním taxonům sekce se vyznačuje největší tolerancí k suchým stanovištím. Zřídka bývá nalezen v mělké vodě na okraji potůčků a rybníků, ale obvykle nezasahuje hlouběji do vody jako *G. fluitans*. Velmi často roste na místech narušených člověkem nebo dobyt看em, většinou na půdách chudých na vápník, tedy na kyselých písčitéch až hlinito-jílovitých půdách. Oproti ostatním druhům nesnáší zastínění a v zapojených porostech se nalézá jen zřídka (Holub 1960, Kubát 2002). Fenologicky se příliš neliší od předchozích dvou druhů (Holub et al. 1970). Vzhledem k obvykle vtroušenému charakteru populací se jen výjimečně vyskytuje jako dominantní druh ve společenstvech svazu *Sparganio-Glycerion fluitantis* (Chytrý et al 2001, Chytrý et Tichý 2003). V poslední době je druh *G. declinata* sledován v USA, kde jeho populace v některých částech Kalifornie mají až invazivní charakter (Rogers 1998, Witham 2003).

2.4 *G. nemoralis* (Uechtr.) Uechtr. et Körnicke – zblochan hajní

Původní popis z roku 1866 (Uechtritz et Körnicke 1866) nebyl některými pozdějšími autory hodnocen na druhové úrovni např. Stojanov et Stefanov (1948) uvádějí pouze varietu – *G. fluitans* (L.) Br. var. *nemoralis* Uechtr. et Körn. Při revizi skupiny Jensen et Wachter (1931) klasifikovali *G. nemoralis* jako subspecii *G. plicata*, stejně jako Hermann (1938, 1956). V publikacích po roce 1866 přiznávala většina zbývajících autorů flór střední a východní Evropy tomuto taxonu hodnotu druhu. Vzhledem k dobré morfologické, ekologické, fenologické, a karyologické odlišnosti není již druhová hodnota předmětem sporů (Holub et al. 1970).

Stručná morfologická charakteristika

Rostliny jsou bledě až nažloutle zelené, s krátkým, plazivým, výběžkatým oddenkem. Stébla jsou přímá, 40-100 cm dlouhá, hladká, tenká a chabá. Listové pochvy bývají zploštělé, do 2/3 hladké, nahoře slabě drsné. Žilky pochev nejnižších listů jsou nápadně vyniklé a často vlnkovane zprohýbané. Jazyček měří až 5 mm, u horních listů bývá nitkovitě dřipený. Čepele listů jsou ploché, 3–8 (10) mm široké, drsné, znenáhla zúžené a na špičce náhle zašpičatělé. Lata bývá 15–28 cm dlouhá, všestranná, v obrysu široce podlouhlá, dole mnohokvětá. Větévky v květenství jsou hladké, klásky jsou bledě zelené, někdy mohou být nafialovělé,

později žlutohnědé. Pluchy jsou široce obvejčité, celokrajné, 3–3,5 mm dlouhé, na hřbetě mezi žilkami hladké. Žilky na pluchách jsou nestejně dlouhé, jen 3 delší dosahují blanitého okraje pluchy, 4 kratší žilky jsou od poloviny pluchy téměř nezřetelné, pluška bývá často delší než plucha (Holub et al. 1970, Dostál 1989, Kubát 2002).

Karyologie

Na rozdíl od ostatních druhů byly počty chromozomů *G. nemoralis* publikovány relativně nedávno (Holub et al. 1970) - udávají *G. nemoralis* jako druhého diploida ve skupině *G. fluitans* ($2n = 20$).

Celkové rozšíření

Areál rozšíření druhu *G. nemoralis* zaujímá území států východní a zčásti i střední Evropy (včetně Rakouska a Maďarska) po Balkán a Turecko. Jako typický představitel východoevropského floristického subelementu má západní hranici svého rozšíření v České republice (Holub et al 1970).

Rozšíření v ČR

V Čechách se vyskytuje roztroušeně až vzácně, zejména na severním okraji (Lounsko, Litoměřicko, Benecko, Broumovsko), na jihovýchodě republiky (okolí Brna, Bílé Karpaty) je jeho výskyt hojnější. (Hrančík 2005). Minimum výskytu Strážnice, Petrov, cca 170 m n. m., maximum Holý vrch u Broumova, cca 750 m n. m. (Hrančík 2005, Chytrý et Rafajová 2003).

Ekologie

Na rozdíl od našich ostatních zblochanů má *G. nemoralis* jasně vymezené ekologické nároky. Obvykle vytváří rozsáhlé porosty v lesních potocích, prameništích a nebo na krajích rybníků v místě ústí potoka do rybníku. Jednoznačně preferuje polostinné až stinné prostředí a vyhýbá se výrazně synantropním stanovištím. Bývá na mokřích a občas zaplavených půdách bohatých na živiny, zásaditých, humózních, kamenitých nebo častěji jílových (Holub et al. 1970). Od ostatních druhů je rovněž odlišen fenologií. Délka kvetení je omezená přibližně na jeden měsíc v období června a července, v závislosti na stanovištních podmínkách (Holub et al. 1970). Jako dominanta se vyskytuje ve společenstvech svazu *Sparganio-Glycerion fluitantis* (Chytrý et al. 2001). Kopecký (1972) popisuje asociaci *Glycerietum nemoralis-plicatae*, se vzácným výskytem při potocích v moravské části Karpat (Kopecký 1972).

3. Ekologická charakteristika druhů

Ekologické nároky a vazby na abiotické podmínky prostředí patří k základním charakteristikám všech druhů a mnohdy mohou být důležitým podpůrným vodítkem při jejich determinaci. Klasickým příkladem takového jevu může být ekologická diferenciacie dvou morfologicky jen velmi málo rozrůzněných evropských druhů rodu *Rhododendron* – *R. ferrugineum*, který roste na kyselých substrátech a *R. hirsutum*, rostoucím na vápnatých podkladech (Lauber et Wagner 2001). U blízké příbuzných druhů nesou mnohdy tyto charakteristiky více informací než morfologické znaky (Hroudová et al 1999, Debussche et Thompson 2003). Na druhou stranu, zejména u druhů s rozsáhlým areálem existuje velká tolerance k ekologickým podmínkám. Druhy se tak vyskytují v široké amplitudě ekologických podmínek s jedním nebo několika optimy výskytu v určité části tohoto spektra.

Okruh *G. fluitans* je okruhem blízké příbuzných druhů, v němž existují poměrně dobré determinační morfologické znaky, ale o ekologické variabilitě jednotlivých druhů nebylo doposud příliš mnoho známo. Například anglický botanik Borrill (Borrill 1956, 1958) se okruhem *G. fluitans* mnoho let podrobně zabýval, v jeho práci však chybí podrobnější popis stanovištních nároků jednotlivých druhů, který by pomohl objasnit jejich frekvenci výskytu a rozšíření. V mnoha pracích je také uváděno rozdělení výskytu *G. fluitans* a *G. notata* na základě pH půdy (Dostál 1989), nejsou však známy práce založené na potřebných analýzách potvrzující tyto domněnky. Cílem této části práce se tedy stala snaha zaplnit mezery ve znalostech o ekologických nárocích jednotlivých druhů, jejich vazbách na abiotické faktory, šíři ekologické amplitudy a nalezení optimálních podmínek výskytu jednotlivých druhů. Tyto znalosti mohou být významné jak z hlediska snah o vysvětlení vzácnosti resp. hojného výskytu jednotlivých druhů, tak zejména při studiu hybridizace, kdy na základě potenciálního společného výskytu taxonů (dle jejich ekologických nároků) může být usuzováno na možnost jejich vzájemné hybridizace.

3.1 Metodika

Do podrobnějšího zkoumání bylo zařazeno 48 populací. Na každé lokalitě byl zaznamenán soupis druhů, v homogenních porostech i fytocenologický snímek s použitím Braun-Blanquetovy sedmičlenné stupnice pokryvnosti (Moravec 1994). Charakter některých lokalit i populací zamezil ve většině případů řádné snímkování, ale pro účely identifikace hlavních doprovodných druhů byly zařazeny i prosté druhové soupisy. Dále byly

zaznamenány údaje o množství a charakteru vody (tekoucí vs. stojatá), celková pokryvnost i pokryvnost samotných studovaných druhů a nadmořská výška. Za účelem stanovení vazeb jednotlivých druhů k abiotickým podmínkám stanoviště byly u vybraných populací stanoveny základní půdní charakteristiky – pH ve vodě a v 1 mol KCl, výměnné Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ a Na^+ , celkový obsah C, N, P a organického C. Půdní analýzy byly prováděny v laboratoři Botanického ústavu AV ČR, v.v.i. v Průhonicích dle následujících postupů:

Stanovení výměnných fosforečnanů v půdě se provádělo fotometrickou metodou podle Olsena (1982). Stanovení pH v půdách – aktuální a výměnné bylo měřeno při stálém míchání kombinovanou pH elektrodou s teplotní korekcí. Stanovení uhličitánů v půdách bylo zjišťováno volumetrickou metodou. Stanovení Ca, Mg, K bylo provedeno metodou atomové emisní spektrometrie (Ca, K) a atomové absorpční spektrometrie (Mg) na AAS spektrometru 9200X (Unicam) při použití režimu plamene acetylen-vzduch. Provedeny byly i elementární analýzy C, N. Obsah amonných solí byl stanovován fotometrickou analýzou založenou na barevné reakci. Měření absorbance roztoku bylo provedeno UV-VIS spektrometrem UV4-200 (Unicam) při 655nm. Stanovení dusičnanů bylo provedeno ve vodném výluhu (za stejných podmínek jako u NH_4) metodou kapilární izotachoforézy na ITP analyzátoru ZKI-01 (Monar 1972).

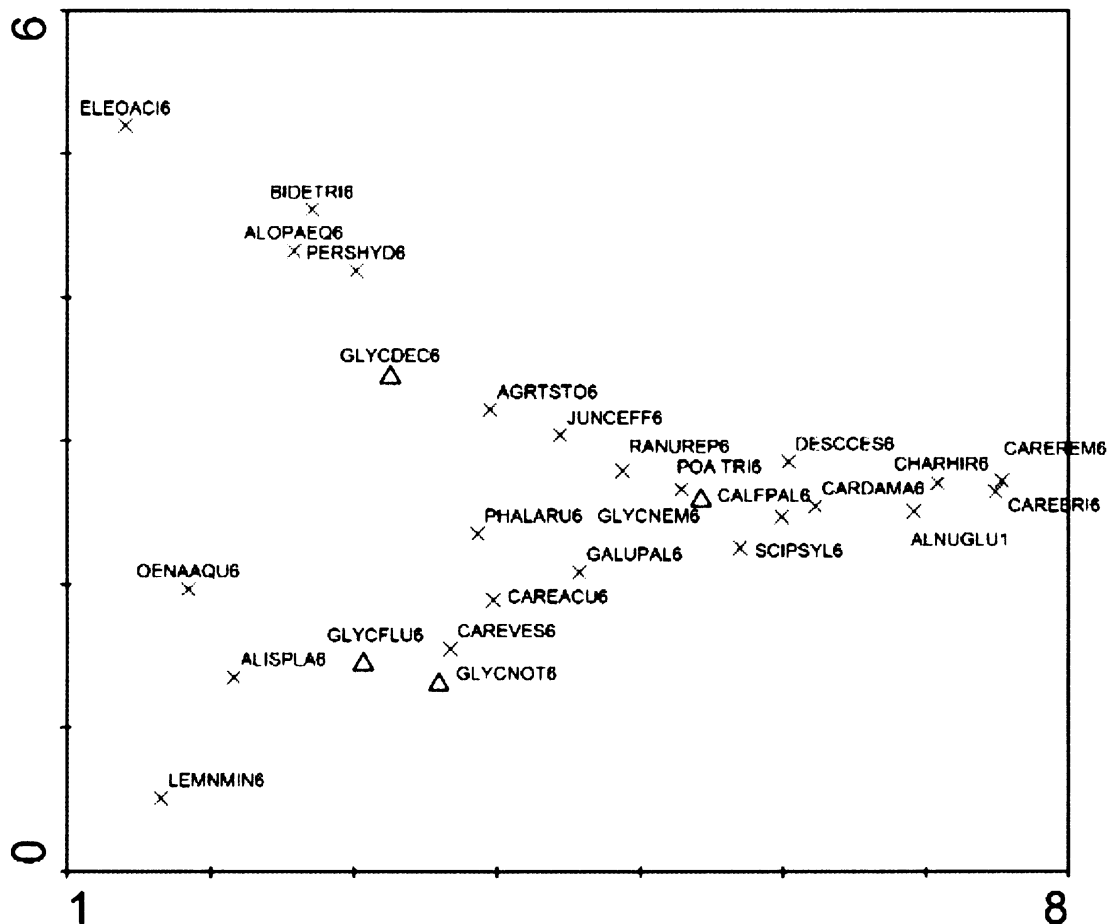
Pro posouzení zda taxony rodu *Glyceria* sledují gradienty prostředí, tj. jsou-li patrné vazby jednotlivých druhů k určitým (odlišným) typům prostředí bylo využito statistického programu Canoco for Windows (ter Braak et Šmilauer 2002). Po zhodnocení vztahu abundance druhů a jednotlivých charakteristik prostředí pomocí tzv. *species-response curves*, generovaných programem Cano Draw (ter Braak et Šmilauer 2002) bylo přistoupeno k použití unimodálních technik. Provedena byla přímá unimodální gradientová analýza (kanonická korespondenční analýza – CCA) s použitím druhů rodu *Glyceria* jako závisle proměnných. Pomocí analýzy PCA (*principal component analysis*) proměnných prostředí v programu Canoco byly identifikovány dvě vysoce korelované dvojice proměnných a z dalších analýz byly tedy vyloučeny proměnné pH (KCl) a celkový obsah uhlíku.

Pro vyhodnocení vazeb konkrétních druhů na společenstva a abiotické podmínky byl na základě 35 druhových soupisů vytvořen ordinační diagram pomocí metody DCA (Detrended Correspondence Analysis; Lepš et Šmilauer 2003). V této analýze dat druhového složení společenstev byly ze souboru vyloučeni zástupci rodu *Glyceria* a jejich vykreslení v ordinačním diagramu bylo učiněno až dodatečně, aby byla zaručena nezávislost analýzy. K vizualizaci výsledků těchto analýz byl využit program CanoDraw (ver. 4.0).

S ohledem na poměrně malé množství vlastních vstupních dat (výsledky nezobrazeny) byla provedena obdobná analýza i na mnohem větším souboru dat exportovaném z České národní fytoecenologické databáze (Chytrý et Rafajová 2003). (obr. 4).

3.2 Výsledky

S jakými druhy rostlin se zástupci rodu *Glyceria* vyskytují?



Obr. č. 4: Charakteristika stanovišť druhů r. *Glyceria* vyjádřená vazbou na výskyt ostatních rostlinných druhů (Ordinační diagram DCA analýzy; druhy rodu *Glyceria* jsou znázorněny symbolem Δ . Zobrazeno je 23 ostatních rostlinných druhů s největším významem pro ordinaci (z dat z České národní fytoocenologické databáze; kódy druhů dle Ehrendorfer 1973).

Z ordinačního diagramu na obr. 4 je patrná dobrá stanovištní diferenciacie jednotlivých zástupců rodu *Glyceria*. Studované taxony jsou zde charakterizovány vazbou na jiné druhy rostlin typických pro příslušná prostředí. Tendence k osidlování spíše sušších stanovišť je u *G. declinata* doložena častým výskytem s *Bidens tripartita* a *Alopecurus aequalis*, tedy druhy často se vyskytujícími na obnažených dnech a březích vodních toků. Přítomnost druhů jako *Lemna minor* a *Alisma plantago - aquatica* naznačuje častý výskyt druhu *Glyceria fluitans* v litorálu. Příslušnost druhu *G. nemoralis* do společenstev bažinných olšin dokládá častý výskyt

s *Alnus glutinosa* a *Scirpus sylvaticus*. *G. notata* je podobně jako *G. fluitans* nalézána ve společenstvech na březích stojatých i tekoucích vod (Chytrý et al. 2001).

Vazby jednotlivých druhů rodu *Glyceria* na faktory prostředí

1) Všechny faktory prostředí

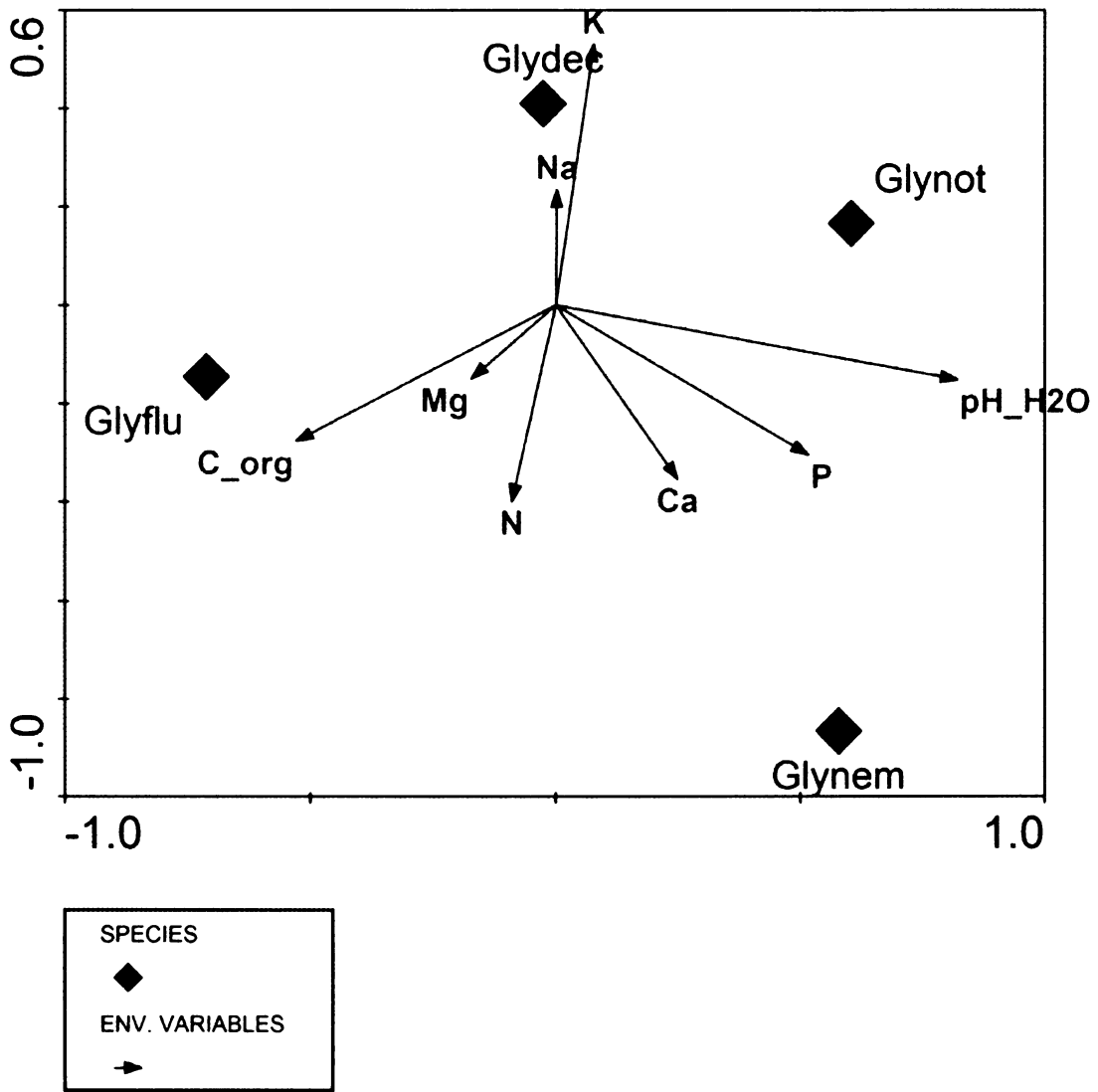
Na souboru 48 vzorků (*G. fluitans* – 22, *G. notata* – 19, *G. declinata* – 17 a *G. nemoralis* – 8) byla provedena CCA všech faktorů prostředí (chemismus půd i stanovištní typy). Všechny faktory prostředí dohromady vysvětlily 61,5 % variability. V testu všech kanonických os (tj. celého modelu) vyšla průkaznost $p \leq 0,002$ (permutační test, 499 permutací), je tedy průkazný. Výsledky analýzy všech faktorů prostředí (nezobrazeny) byly ovlivněny rozdíly v početnosti jednotlivých pozorování i množstvím sledovaných faktorů. Byl proto proveden rozklad variability a CCA byly provedeny na jednotlivých faktorech (stanoviště, chemické složení půd).

2) Chemické složení půdy

Prostřednictvím CCA chemického složení půdy na souboru 48 půdních vzorků (*G. fluitans* – 22, *G. notata* – 19, *G. declinata* – 17 a *G. nemoralis* – 8) bylo vysvětleno 27,9% celkové variability. Z obr. 5 vyplývají preference a rozlišení dvojic taxonů v rámci ploidního stupně – diploidní druhy jsou rozlišeny svými nároky na úživnost stanoviště, tetraploidní druhy jsou rozděleny hodnotou pH. Z dalších analýz (výsledky neuvedeny) vyplývá jistý antagonismus ve vztahu *G. nemoralis* a NH_4 , zatímco druhy *G. declinata* a *G. notata* jsou tolerantní k jakémukoli obsahu NH_4 v půdě a *G. fluitans* má spíše tendence k preferenci lokalit se zvýšeným obsahem NH_4 .

V hodnotách pH se dobře oddělily dvě skupiny – první zahrnuje *G. fluitans* a *G. declinata* s nižší průměrnou hodnotou pH (5,5), do druhé skupiny patří *G. notata* a *G. nemoralis* s vyšší průměrnou hodnotou pH (6,5).

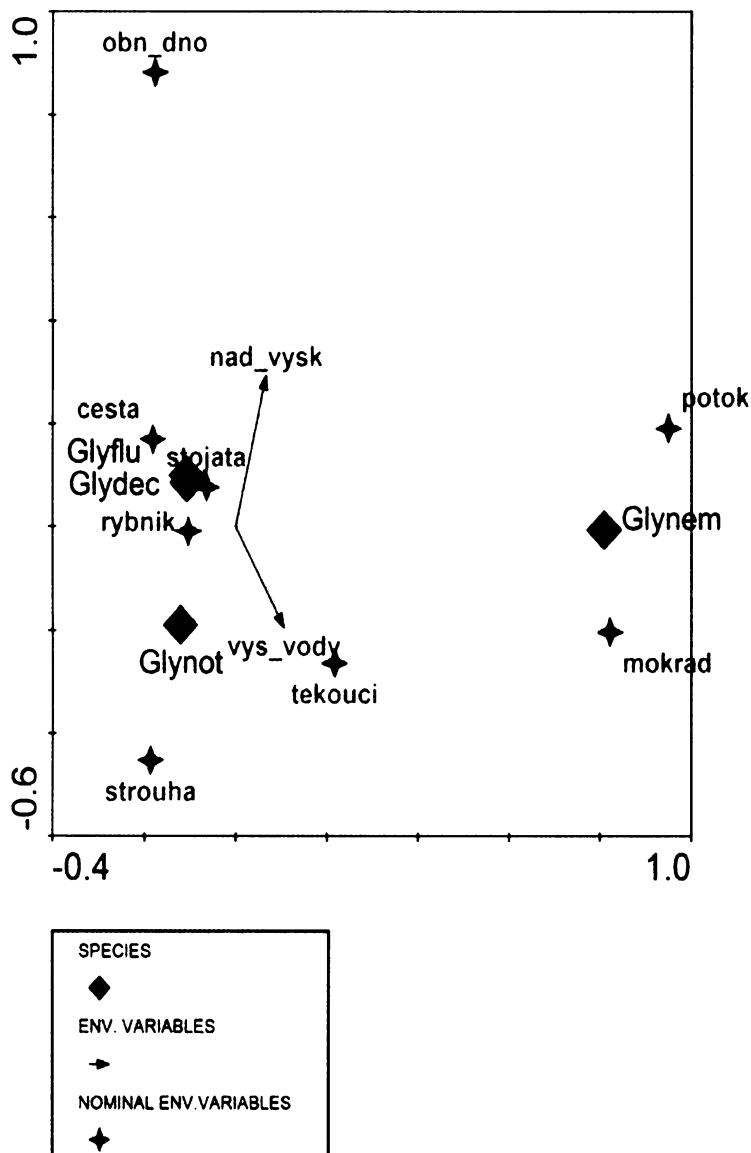
V reakci na přítomnost fosforu a kationtů se mezi sebou výrazně liší diploidní druhy – výskyt *G. nemoralis* je nápadně korelovaný s přítomností fosforu v půdě, vyšším obsahem dusíku i hořečnatých iontů, zatímco *G. declinata* preferuje půdy s nízkým obsahem všech uvedených prvků.



Obr. 5: Vztah výskytu studovaných druhů k hlavním složkám chemismu prostředí (grafický výstup unimodální přímé gradientové analýzy (CCA) s výběrem nejdůležitějších chemických charakteristik prostředí nejlépe odrážejících variabilitu vstupních dat; zobrazení 1. a 2. osy; model vysvětluje 27,9% variability).

3) Stanovištní typy

Prostřednictvím CCA stanovištních typů na souboru 48 půdních vzorků (*G. fluitans* – 22, *G. notata* – 19, *G. declinata* – 17 a *G. nemoralis* – 8) bylo vysvětleno 39,7% celkové variability. K nejvýraznějšímu odlišení typu preferovaného stanoviště došlo mezi druhem *G. nemoralis* a zbývajícími taxony. Byla potvrzena jednoznačná převaha výskytu tohoto druhu v pomalu tekoucích vodách. K dalšímu, poněkud méně nápadnému odlišení preferovaného typu stanoviště došlo u druhu *G. notata*, kde se potvrdil častější výskyt tohoto druhu v tekoucích vodách. Zbývající druhy preferují stanoviště se stojatou vodou (spíše *G. fluitans*), nebo sušší, antropogenně ovlivněná stanoviště typu cest (spíše *G. declinata*).



Obr. 6: Vztah výskytu studovaných druhů k typu stanoviště (grafický výstup unimodální přímé gradientové analýzy (CCA) s výběrem stanovištních typů.(zobrazení 1. a 2. osy; model vysvětluje 39,7% variability); nad_vysk - nadmořská výška, vys_vody - výška vodní hladiny na stanovišti).

4) Stanovištní typy na základě herbářových údajů

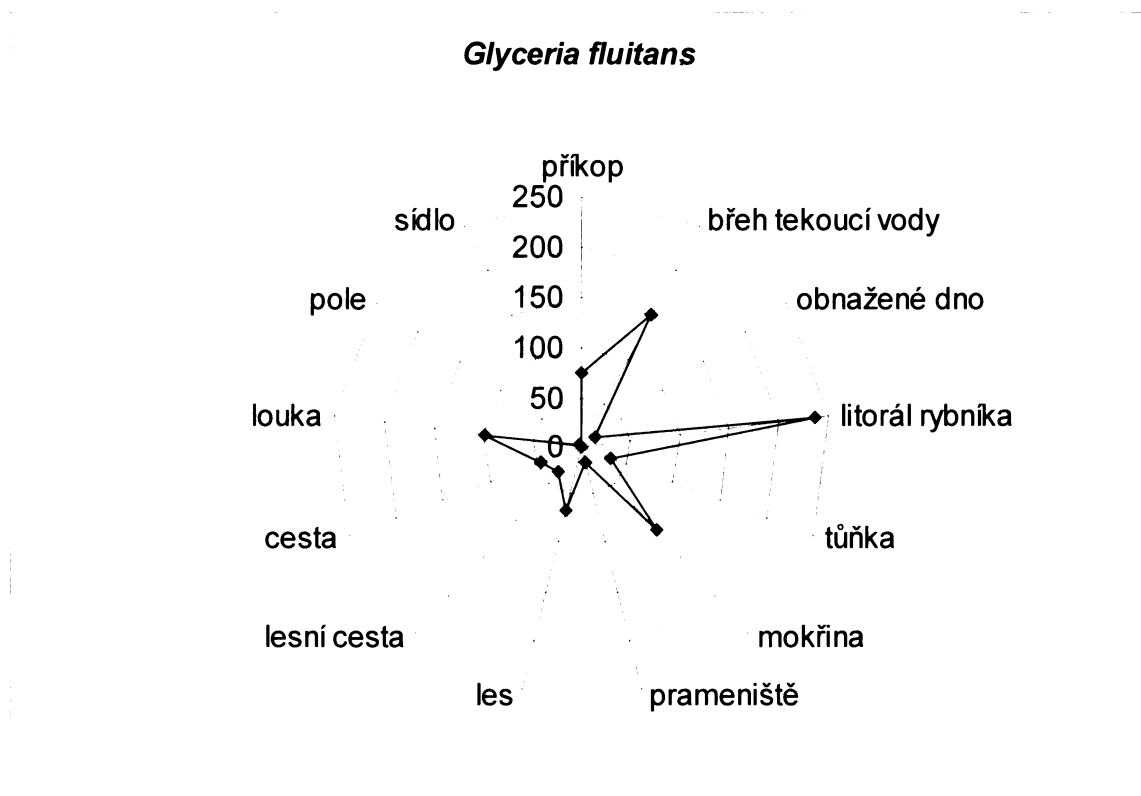
Z důvodu nedostatečného množství vstupních dat z vlastních sběrů byly využity výsledky exercepce herbářových sbírek provedené P. Hrančíkem (2005) v rámci jeho diplomové práce obhájené na Univerzitě Palackého v Olomouci v roce 2005. Z této práce byly extrahovány informace o stanovištních charakteristikách.

V uvedené práci bylo provedeno podrobné mapování rozšíření všech druhů rodu *Glyceria* vyskytujících se na našem území. Rozšíření jednotlivých druhů bylo stanoveno na základě studia herbářových položek z těchto herbářových sbírek z území ČR: BRNM, BRNU, CB, LIT, MP, OL, OLM, OP, CHOM, MP, SOB, MMI, PL, PR, HR, NJM, MJ, LIM, VM, GM, FMM, BRNL, OSM, HOMP, SOKO, ROZ (zkratky podle Hradílek et al. 1992).

Pro exercepci byly vynechány údaje, v nichž se neobjevily údaje o stanovišti a všechny sběry ze stejného místa stejným sběratelem ve stejném roce byly počítány pouze jednou. Z důvodu velkých rozdílů v počtech lokalit u jednotlivých druhů byla data pro každý druh zpracována samostatně, v absolutních množstvích a nikoli souhrnně v procentech. Počty lokalit, které byly do analýzy zahrnuty jsou uvedeny u grafů jednotlivých druhů. Tato čísla mohou částečně vypovídat i o frekvenci výskytu jednotlivých druhů v ČR, přestože je třeba brát v úvahu subjektivitu při sběrech a často i nenáhodnou koncentraci sběrů do atraktivních lokalit. S určitou subjektivitou je nutné počítat také v hodnocení kategorií a vzhledem k často nepřesným popisům na schedách je třeba brát v úvahu určitou chybu v zařazení do jednotlivých podobných kategorií (např. příkop – prohlubeň). Stanoviště označené termínem „litorál rybníka“ zahrnuje pobřežní zónu s mělkou vodou po litorální čáru, při poklesu hladiny bývají rostliny někdy nad vodou. Skupina označená obecným pojmem „sídlo“ zahrnuje položky, na jejichž schedách nebyla podrobnější zmínka o charakteru stanoviště a uvedeno bylo pouze „ve městě, vesnici, na nádraží“ a vypovídá tak o osidlování antropogenních stanovišť.

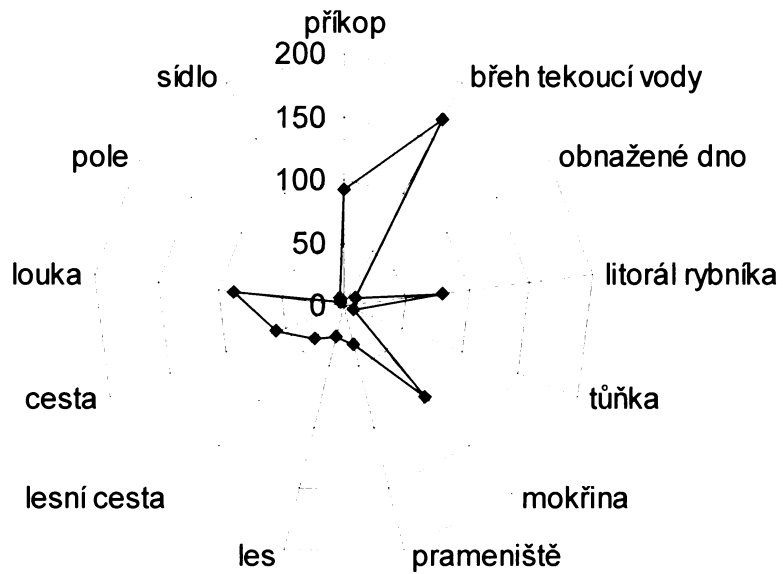
Ze srovnání stanovištního spektra jednotlivých druhů (obr. 7–10) vyplývá existence výrazného rozdílu mezi druhy v šířce spektra stanovišť. Nejširší ekologickou amplitudu má *G. fluitans*, přestože vykazuje preference stojatých vod (obr. 7). Velmi širokou ekologickou amplitudu má ovšem i druhý tetraploidní taxon – *G. notata* (obr. 8). Mezi těmito dvěma druhy (*G. fluitans* a *G. notata*) lze nalézt rozdíly v osidlování stojatých a tekoucích vod. Ve stojatých vodách se častěji vyskytuje *G. fluitans*, zatímco v tekoucí vodě běžněji roste *G. notata*. V osidlování druhotných stanovišť (cesty, louky a příkopy) byly nalezeny výrazné rozdíly mezi diploidními druhy. *G. nemoralis* (obr. 10) se na těchto stanovištích nevyskytuje

(dává přednost stinným bažinným lesům), naopak *G. declinata* (obr. 9) osidluje převážně druhotná, obvykle také sušší stanoviště.



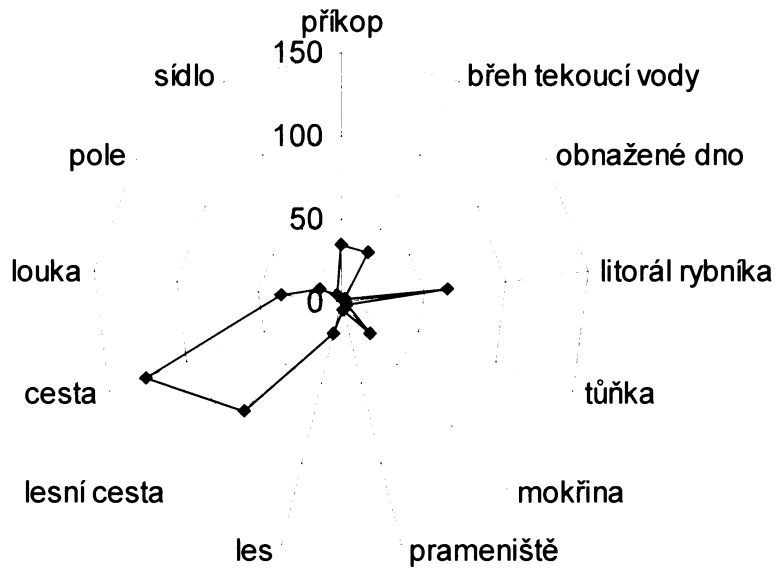
Obr. 7: Charakteristika stanovištních preferencí *G. fluitans*, celkový počet stanovišť 885.

Glyceria notata



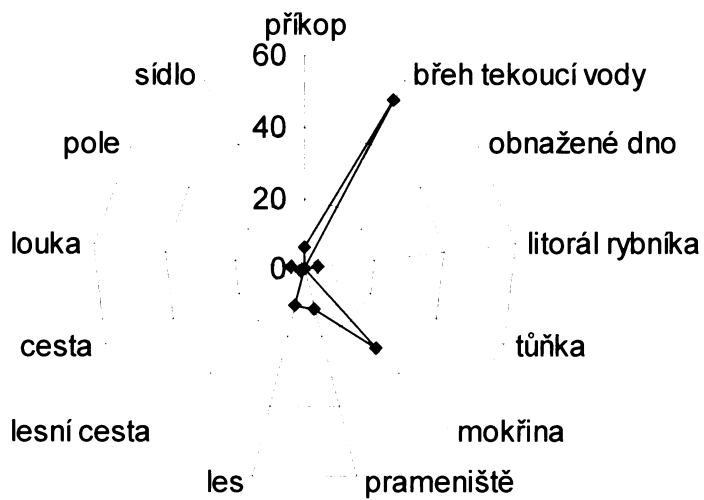
Obr. 8: Charakteristika stanovištních preferencí *G. notata*, celkový počet stanovišť 706.

Glyceria declinata



Obr. 9: Charakteristika stanovištních preferencí *G. declinata*, celkový počet stanovišť 459.

Glyceria nemoralis



Obr. 10: Charakteristika stanovištních preferencí *G. nemoralis*, celkový počet stanovišť 122.

Nadmořská výška

Z údajů v České národní fytoecologické databázi (Chytrý et Rafajová 2003) bylo provedeno srovnání výskytu rostlin v různých nadmořských výškách. Z výsledků (nezobrazeny) vyplývá signifikantní rozdíl mezi *G. declinata* a *G. fluitans* – druh *G. declinata* se vyskytuje v nižších nadmořských výškách. Mezi jinými druhy se rozdíly nepodařilo prokázat – všechny druhy mají u nás těžiště výskytu v nížině až pahorkatině. Protože data byla převzata z České národní fytoecologické databáze, je nutné interpretovat tyto výsledky s jistou obezřetností, zejména proto, že databáze může obsahovat určité procento chybně určených taxonů. Přestože údaje z databáze nemohou obsahovat vyčerpávající informace o výskytu druhů, indikují stav v přírodě a mají výhodu velkého souboru dat, který by jinak nebyl k dispozici. Protože k záměnám mezi *G. declinata* a *G. fluitans* dochází jen velmi zřídka pro jejich nápadně odlišné morfologické znaky, byl zde výsledek srovnání uveden i přes výhrady výše zmíněné.

Závěr

Druhy se na základě hodnot pH výrazně rozdělily na dvě skupiny v rámci ploidních úrovní – z tetraploidních druhů *Glyceria fluitans* preferuje kyselé, dusíkem bohaté půdy, zatímco *G. notata* upřednostňuje půdy zásadité, s vyšším obsahem kationtů (K^+). *G. notata* celkově vykazuje širší ekologickou amplitudu vzhledem k trofii. Tato větší tolerance k trofii prostředí může souviset s častým výskytem uvedeného druhu v tekoucí vodě – tekoucí voda umožňuje lépe snášet eutrofní prostředí díky lepšímu provzdušnění. Společný výskyt tetraploidů, který byl potvrzen na několika lokalitách pak odpovídá místům s komplikovanou pedologickou strukturou v oblastech společného výskytu kyselých i zásaditých podloží.

Naopak diploidní druhy se mezi sebou výrazně liší v reakci na přítomnost fosforu a kationtů – výskyt *G. nemoralis* je nápadně korelovaný s přítomností fosforu v půdě, zatímco *G. declinata* preferuje půdy s nízkým obsahem dusíku i hořečnatých kationtů. Z výše uvedených faktů vyplývá, že výskyt konkrétních druhů rodu je poměrně silně korelovan s gradientem prostředí – tj. výskyt určitého druhu na určitém stanovišti je nenáhodný a řídí se parametry daného stanoviště.

4. Karyologie a cytometrie

Ke stanovení DNA ploidního stupně a absolutní velikosti genomu byla použita metoda průtokové cytometrie, která využívá měření optických vlastností (v našem případě fluorescence) obarvených buněčných jader. Suspenze intaktních jader, připravená z části vegetativního pletiva analyzované rostliny, je obarvena fluorescenčním barvivem a pomocí kapaliny přiváděna do průtokové komůrky, která tvoří jádro cytometru. Analyzovaná jádra procházejí středem vodního paprsku přes průtokovou komůrku do ohniska zdroje excitačního záření (tím může být laser nebo vysokotlaká rtuťová výbojka). Fluorescence emitovaná barvivem je zachycena pomocí optické soustavy a převedena do digitální podoby. Oproti klasickým karyologickým metodám přináší cytometrie mnoho výhod, mezi něž patří zejména časová nenáročnost přípravy vzorků – možnost analyzovat velké množství vzorků během jediného dne, přesnost (detekce i velmi malých rozdílů ve velikosti genomu), nedestruktivnost metody (odběrem se rostlina ani populace nezahubí, lze pracovat s velikostí pletiv v řádu cm²), metoda nevyžaduje mitoticky aktivní buňky, snadné odhalení směsných vzorků, nízké finanční náklady na analýzy (Doležel 1997). K hlavním nevýhodám průtokové cytometrie patří potřeba čerstvého materiálu (čím déle se materiál skladuje, tím horší analýzy poskytuje) a neuspokojivé výsledky analýz rostlin s vysokým obsahem sekundárních metabolitů (např. čeleď Rosaceae). Pro určení DNA ploidie i absolutního množství DNA je nutno vzorek analyzovat s interním standardem, kterým je rostlina se známým obsahem DNA. Přesnost analýz vyjadřuje koeficient variance (CV) udávaný v procentech, přičemž měření s koeficientem variance pod 3% jsou považována za přesná (Doležel et al 2007). Výsledkem celé analýzy je pak dvourozměrný histogram zobrazující na ose x relativní intenzitu fluorescence jednotlivých izolovaných částic a na ose y počet těchto částic.

4.1 Metodika

Všechna měření byla prováděna v laboratoři průtokové cytometrie v Botanickém ústavu AV ČR, v.v.i. v Průhonicích.

Stanovení stupně DNA ploidie

Pro stanovení stupně DNA ploidie byl použit fluorochrom DAPI, který se selektivně váže na DNA v oblastech bohatých na AT páry bází. Stupeň DNA ploidie byl stanoven z mladých živých listových pletiv na cytometru Partec PA II se rtuťovou UV výbojkou jako excitačním zdrojem. Pro izolaci a barvení jader byla zvolena modifikovaná metodika podle Otto (1990).

Jako vhodný interní standard byla zvolena *Glycine max* 'Polanka' ($2C = 2,50$ pg). Vzorky pro cytometrické analýzy byly připravovány následovně: přibližně $0,5$ cm² nepoškozeného listového pletiva analyzované rostliny a přibližně stejné (v případě diploidů přibližně o třetinu větší) množství interního standardu bylo homogenizováno ostrou žiletkou spolu s $0,5$ ml chlazeného extrakčního pufru Otto I v Petriho misce. Získaná suspenze byla přefiltrována přes 42 µm nylonový filtr do PE zkumavek a byl přidán 1 ml barvicího roztoku složeného z pufru Otto II, fluorescenčního barviva DAPI (finální koncentrace 4 µg/ml) a antioxidantu β-mercaptoethanolu (2 µg/ml). Poté byl vzorek analyzován až do dosažení 3000 částic.

Absolutní velikost genomu

Absolutní velikost genomu byla měřena pomocí interkalačního barviva propidium jodid, které nevykazuje preferenci k určitým bázím DNA a intenzita fluorescence je tak přímo úměrná celkovému obsahu DNA. Stanovení absolutní velikosti genomu (C - a C_x -hodnoty; viz Greilhuber et al. 2005) pro jednotlivé druhy probíhalo na cytometru CyFlow se zeleným laserem (532 nm) jako excitačním zdrojem. Vzorky byly připravovány obdobným způsobem jako při stanovení DNA ploidie, pouze s několika rozdíly: pletiva vzorku i standardu (jako interní standard byly z důvodu překryvu píků soji a tetraploidních druhů použity diploidní rostliny *Bellis perennis*, $2C = 3,815$ pg) byla homogenizovaná v 1 ml chlazeného extrakčního pufru Otto I, přefiltrována přes 42 µm nylonový filtr do PE zkumavek a centrifugována ve stolní centrifuze při 150 g po dobu 5 minut. Supernatant byl poté odstraněn, zbylý obsah zkumavky byl doplněn 100 µl čerstvého pufru Otto I, protřepán a ponechán 5 – 15 minut inkubovat při pokojové teplotě. Poté byl přidán barvicí roztok (propidium jodid – 50 µg/ml, RNaza A – 50 µg/ml, β-mercaptoethanol – 2 µg/ml). Při analýzách absolutní velikosti genomu byl každý jedinec měřen samostatně ve třech různých dnech. Výsledky s rozdílem mezi měřeními jednoho jedince větším než 2% byly vyřazeny a měření opakována v jiný den. V každém vzorku bylo analyzováno 5000 částic.

Zpracování cytometrických dat

Výsledné histogramy byly vyhodnoceny programem FloMax (ver.2.4b; Münster, Germany). K výpočtům byly použity pouze analýzy se souměrnými píky a dostatečně nízkým koeficientem variance (pod 3%).

Rozdíly v absolutní velikosti genomu jednotlivých taxonů byly otestovány procedurou GLM (General linear model; SAS 8e), jako hranice rozdílnosti byla zvolena $\alpha = 5\%$. Procedura GLM je modifikovaná analýza rozptylu (ANOVA), která je robustní k nestejným velikostem jednotlivých skupin, porovnává průměry a rozptyl.

Karyologické analýzy

Pro standardizaci cytometrických měření a ověření neznámých rostlin z havranické populace byla použita metoda počítání chromozómů pomocí roztakových preparátů. Pro přípravu mikroskopických preparátů byly použity kořenové špičky odebrané na podzim roku 2008 a v dubnu roku 2009. U roztakových preparátů byla použita standardní metoda barvení meristému kořenových špiček acetokarmínem (Krahulcová 1998) – předpůsobení 8-hydroxychinolinem (0,002 M roztok) po dobu 3 hodin při pokojové teplotě, fixace v roztoku ethanolu (96%) a ledové kyselině octové (3:1) přes noc při 4°C a macerace v roztoku HCl a ethanolu (96%) 1:1 po dobu 3 minut při pokojové teplotě. Preparáty byly prohlíženy na mikroskopu Olympus BX-61 při 1000 násobném zvětšení s použitím imerze.

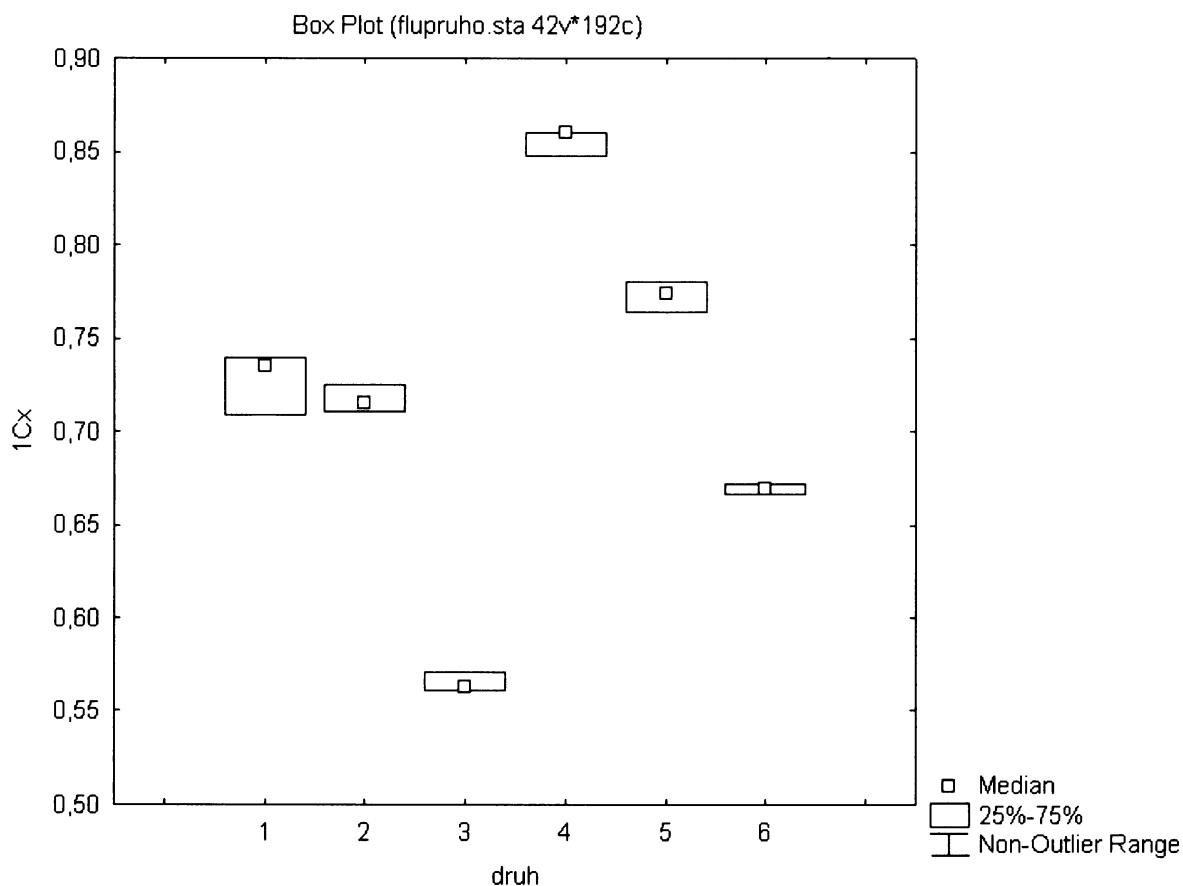
4.2 Výsledky

Poprvé byly stanoveny hodnoty absolutní velikosti jaderného genomu pro druhy *Glyceria notata*, *G. declinata* a *G. nemoralis*. Tetraploidní druhy *G. fluitans* a *G. notata* mají téměř shodnou absolutní velikost genomu a pro jejich vzájemné rozlišení nemůže být tedy tato charakteristika využita (rozdíl 1,6%). Tyto druhy jsou však velmi dobře odlišitelné morfologicky a záměna tedy není pravděpodobná. Vnitrodruhová variabilita velikosti genomu se ukázala být velmi nízká u diploidních druhů *G. declinata* a *G. nemoralis* (1,7 resp. 1,4%). Z tetraploidních druhů byla nižší vnitrodruhová variabilita nalezena u *G. notata* (necelá 3%). U druhu *G. fluitans* je situace složitější. Celkově byla v rámci tohoto druhu odhalena variabilita okolo 4,5 %, avšak v jedné populaci (lokalita uprostřed havranického vřesoviště, Znojmo) byla nalezena variabilita velikosti genomu tak nápadná, že spolehlivě odlišila dvě subpopulace („havranická malá“ a „havranická velká“ (z nedostatku lepšího pojmenování je tohoto označení použito i ve zbývajícím textu; rozlišení „malá“ – „velká“ odpovídá rozdílu ve velikosti genomu). Vzájemný rozdíl „havranická malá“ – „havranická velká“ činil 15,38%; rozdíl „havranická velká“ – *G. fluitans* 6,1%; „havranická malá“ – *G. fluitans* 8,75% (obr. 13-14). Rostliny nalezené v havranické populaci se i morfologicky velmi nápadně odlišovaly od tetraploidního druhu *G. fluitans*, k němuž byly zpočátku přiřazeny. Jejich morfologickým znakům se věnuje příslušná kapitola o morfologii (kapitola 6). Jeden z histogramů (obr. 12) zachycuje nápadný rozdíl v absolutní velikosti genomu havranických rostlin, výstup analýzy SAS 8e procedury GLM prokázal rozdílnost mezi skupinami havranických rostlin na hladině $\alpha=0,05$ i $\alpha=0,01$ (stejně jako mezi ostatními druhy kromě zmiňovaných tetraploidů *G. fluitans* a *G. notata*; výstup analýzy na CD-ROM). Zatímco interpretace subpopulace s absolutní velikostí genomu $1Cx = 0,744$ pg, tedy

větší než u *G. fluitans* ($1Cx = 0,701$ pg), bude vyžadovat podrobnější studium, u rostlin s velikostí genomu $1Cx = 0,645$ pg lze v souvislosti s jejich intermediárními morfologickými znaky (např. délka a tvar pluchy; viz kapitola 6) uvažovat o hybridním původu. Velikost genomu ($2C=2,58$ pg) totiž odpovídá velikosti genomu hypotetického zpětného křížence *G. declinata* ($1Cx = 0,544$ pg) × *G. fluitans* ($1Cx = 0,701$ pg; $2C$ „havranické malé“ se rovná $1Cx$ *G. declinata* + $3 \times 1Cx$ *G. fluitans*). Také ověřený počet chromozomů - $2n=40$ odpovídá uvedené hypotéze.

Výsledky analýz absolutní velikosti genomu (obr. 11-19) také podporují hypotézu o allopolyploidním původu *G. notata* ($2C = 2,764$ pg), s rodičovskými taxony *G. declinata* ($2C = 1,09$ pg) a *G. nemoralis* ($2C = 1,65$ pg). Tato hypotéza je nepřímo potvrzena také intermediárním postavením morfologických znaků mezi pravděpodobnými rodičovskými druhy *G. declinata* a *G. nemoralis* (viz kapitola 6).

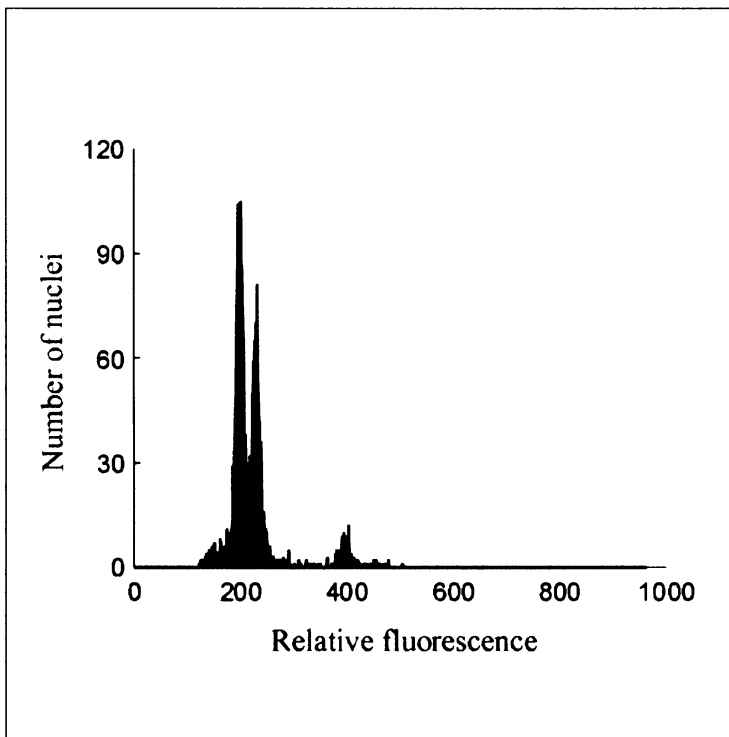
Pro testování hypotéz o původu druhu *G. notata* i vzniku křížence mezi druhy *G. fluitans* a *G. declinata* bude nutné využít moderní molekulární metody.



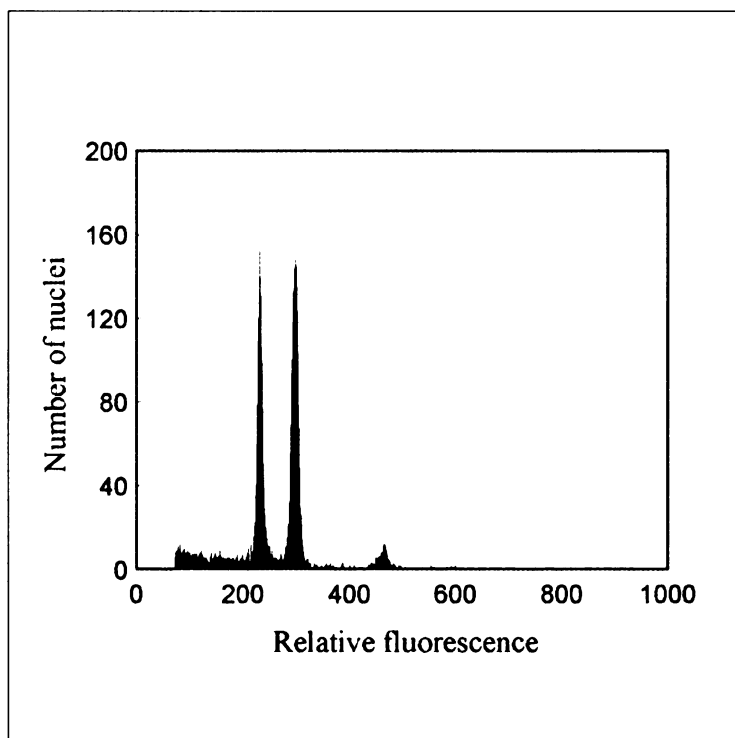
Obr. 11: Obsah DNA haploidního genomu $1Cx$ u zástupců rodu *Glyceria* (1- *G. fluitans*, 2- *G. notata*, 3- *G. declinata*, 4- *G. nemoralis*, 5- *G.* „havranická velká“, 6- *G.* „havranická malá“)

Tab. 1: Absolutní velikosti genomu zástupců rodu *Glyceria* (v pikogramech. 2C = obsah DNA somatických buněk (ploidie se nebere v potaz), 1Cx = obsah DNA haploidního genomu (Greilhuber et al. 2005), S.D. = směrodatná odchylka).

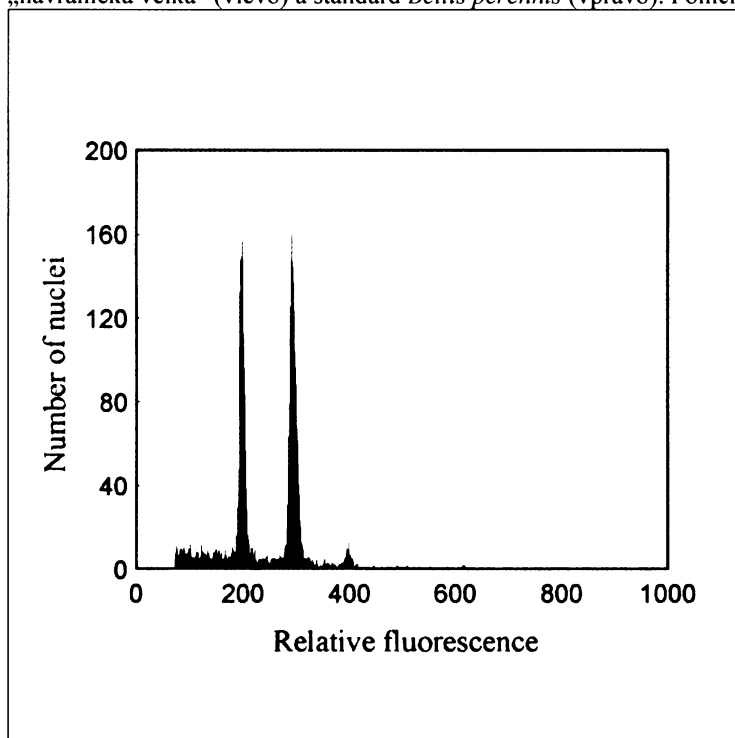
Druh	Průměrné 2C (pg)	S.D.	Průměrné 1 Cx (pg)	S. D.	Vnitrodruhová variabilita (%)
<i>G. fluitans</i>	2,81	0,06	0,70	0,016	4,4
<i>G. notata</i>	2,76	0,03	0,69	0,008	2,9
<i>G. declinata</i>	1,09	0,01	0,54	0,005	1,5
<i>G. nemoralis</i>	1,65	0,01	0,83	0,007	1,4
<i>G. „havranická velká“</i>	2,97	0,03	0,74	0,008	2,0
<i>G. „havranická malá“</i>	2,58	0,01	0,65	0,002	0,7 8



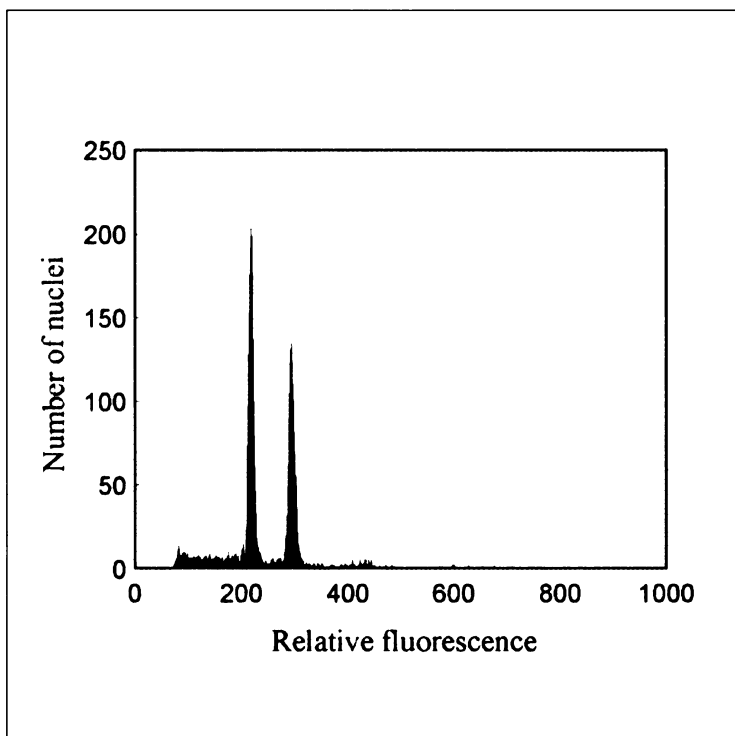
Obr. 12: Grafický výstup analýzy obou havranických taxonů na průtokovém cytometru. Analýza dvou rostlin, „havranická malá“ (vlevo) a „havranická velká“ (vpravo). Poměr píků je 1,15, CV1 – 3,28%; CV2 - 3,63%.



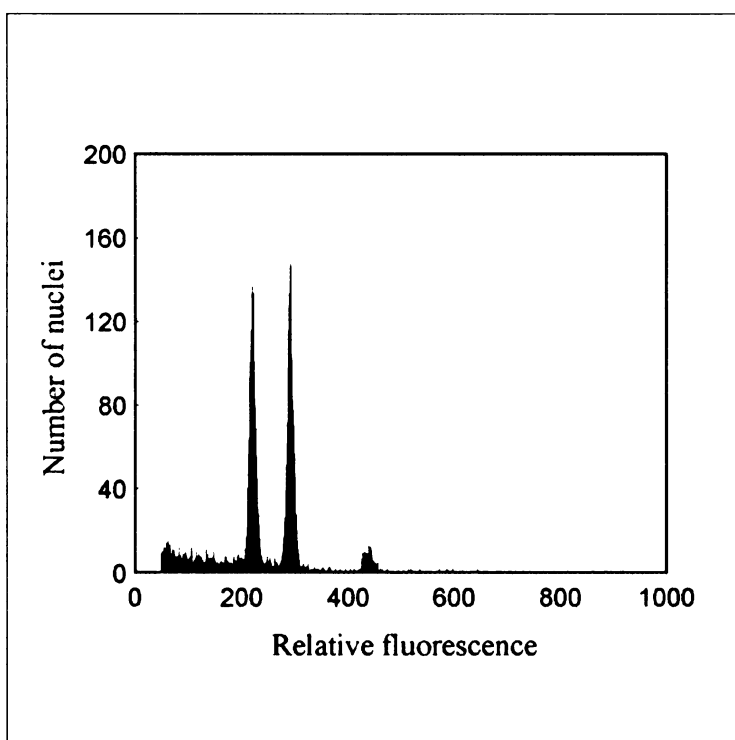
Obr. 13: Grafický výstup analýzy taxonu „havraníky velká“ na průtokovém cytometru. Analýza dvou rostlin, „havranická velká“ (vlevo) a standard *Bellis perennis* (vpravo). Poměr píků je 0,78, CV1 - 2,1%, CV2 - 2,02%.



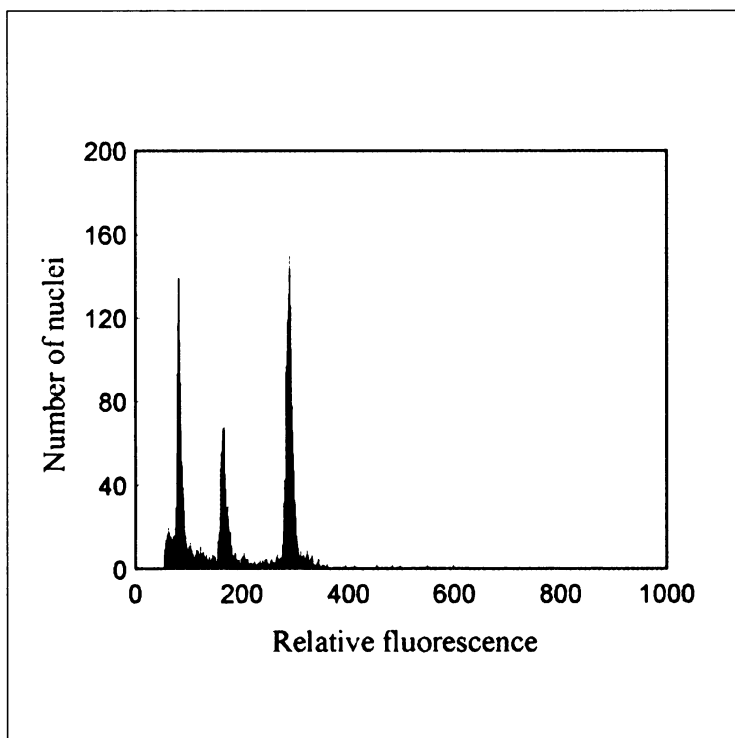
Obr. 14: Grafický výstup analýzy taxonu „havraníky malá“ na průtokovém cytometru . Analýza dvou rostlin, „havranická malá“ (vlevo) a standard *Bellis perennis* (vpravo). Poměr píků je 0,67, CV1 - 2,13%, CV2 - 1,47%.



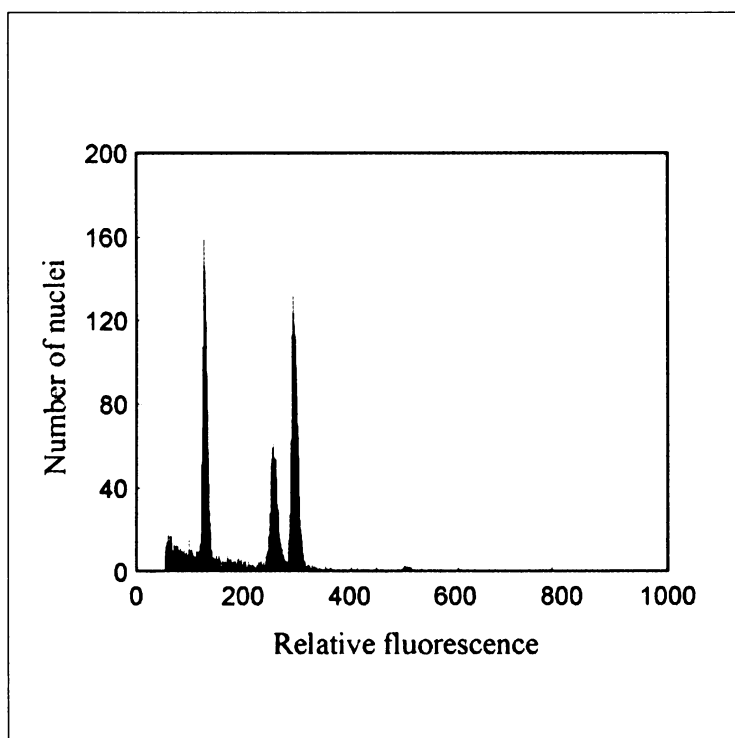
Obr. 15: Grafický výstup analýzy druhu *G. notata* na průtokovém cytometru. Analýza dvou rostlin, *G. notata* (vlevo) a standardu *Bellis perennis* (vpravo). Poměr píků je 0,74, CV 1 – 2,013%; CV 2 - 1,93%.



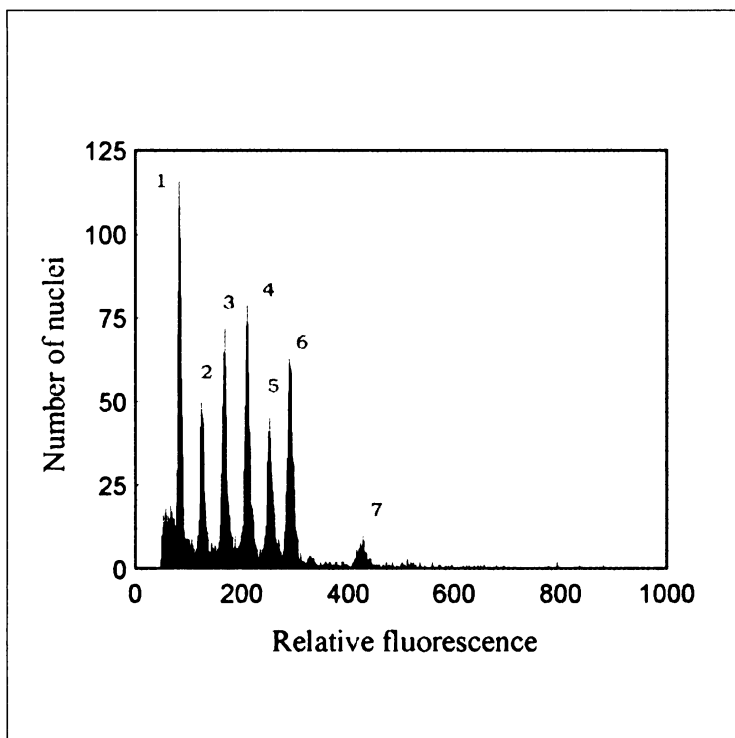
Obr. 16: Grafický výstup analýzy druhu *G. fluitans* na průtokovém cytometru. Analýza dvou rostlin, *G. fluitans* (vlevo), standardu *Bellis perennis* (vpravo). Poměr píků je 0,75, CV 1 – 2,59%; CV 2 - 1,92%.



Obr. 17: Grafický výstup analýzy druhu *G. declinata* na průtokovém cytometru. Analýza dvou rostlin, *G. declinata* (vlevo), standardu *Bellis perennis* (vpravo), G2 fáze od *G. declinata* (pík uprostřed). Poměr píků je 0,285, CV1 – 3,05%; CV3 – 2,98%.



Obr. 18: Grafický výstup analýzy *G. nemoralis* na průtokovém cytometru. Analýza dvou rostlin, *G. nemoralis* (vlevo) a *Bellis perennis* (vpravo), uprostřed G2 fáze od *G. nemoralis*. Poměr píků je 0,431, CV 1 – 2,73%; CV 3 – 2,05%.



Obr. 19: Grafický výstup směsné analýzy na průtokovém cytometru. Analýza směsného vzorku 3 druhů: 1.+3. *G. declinata* (CV1- 3.83%, CV3 - 2.83%), 2.+5. *G. nemoralis* (CV3 - 3.51%,CV5 - 2.71%) a 4.+7. *G. fluitans* (CV4 - 2.25%, CV7 -1.90%). 6. *Bellis perennis* (1,81%). Píky uvedené na druhém místě jsou vždy G2 příslušných druhů.

5. Isoenzymové analýzy

Isoenzymová analýza patří mezi metody sloužící ke zjišťování vnitropopulační a mezipopulační genetické variability rostlin, založená na principu elektroforetického stanovení spektra vybraných proteinů (Kirschner et al. 2000). Mezi nejčastěji studované proteiny patří enzymy, které slouží jako katalyzátory chemických reakcí. Isoenzymy jsou enzymy katalyzující stejnou chemickou reakci, lišící se svojí primární, geneticky danou, strukturou. Allozymy se pak nazývají isoenzymy kódované různými alelami téhož genu. Genetické rozdíly v primární struktuře (aminokyselinovém složení) proteinu způsobené mutačními změnami v sekvenci nukleotidů DNA se odráží v celkovém náboji, velikosti a tvaru molekuly proteinu, čímž způsobují rozdílnou pohyblivost v elektrickém poli. Toho se využívá při elektroforéze (metoda určená pro zjišťování pohyblivosti molekul v elektrickém poli), která probíhá na gelovém nosiči (obvykle polyakrylamidový, případně škrobový). Vzhledem k tomu, že molekuly proteinu jsou většinou ionizované, výsledkem je gel obsahující enzymy rozdělené do separovaných proužků. Vizualizace enzymů v gelu je prováděna barvením. K detekci enzymů se používá histochemické stanovení, které je založeno na reakcích, jež dané enzymy katalyzují. K obarvení dojde pouze u těch enzymů v gelu, které mají stejnou katalytickou funkci. Pro správnou interpretaci výsledných zymogramů je nutné znát ploidní stupeň analyzované rostliny, kvartérní strukturu příslušného enzymu a počet lokusů, ve kterých je kódován. Potřebná je i znalost o lokalizaci jednotlivých enzymů či jejich aktivitě v různých kompartmentech buňky. Jednotlivé proužky je možné interpretovat jako alelické konstituce analyzovaného jedince. Pokud je uspořádání proužků na gelu složitější, lze *pattern* vzájemně porovnávat jako celek.

Hlavní nevýhodou isoenzymových analýz je skutečnost, že umožňují rozeznat jen určitou část reálné variability v daných isoenzymových lokusech (20-60% skutečné variability) a vzorek genetické variability získaný isoenzymovou analýzou je značně omezený - v současné době lze využít cca 100 enzymatických systémů (Kirschner et al. 2000). Při vyhodnocování mohou často nastat problémy kvůli přítomnosti nulových alel, které nejsou dále přepisovány nebo kódují defektní polypeptidy bez enzymatické aktivity (Weeden et Wendel 1990). Komplikace způsobují i některé posttranslační úpravy, které vedou ke změně vlastností proteinů. Následkem toho (nebo degradací proteinů během laboratorního zpracování) se mohou na gelu objevit sekundární proužky. Interpretaci výsledných *pattern* mohou dále ztěžovat intergenické heteromery vzniklé aktivitou heteromerických enzymů

(složených z podjednotek z různých lokusů). Tyto intergenické heteromery se projevují jako zóna aktivity mezi produkty dvou lokusů a mohou tedy mylně být považovány za aktivitu produktů lokusu třetího (Kirschner et al 2000).

Jako relativně levná metoda s poměrně dobře interpretovatelnými výsledky našla isoenzymová analýza i přes výše zmíněné nedostatky široké uplatnění. Využívána je ke stanovení vnitropopulační a mezipopulační genetické variability, slouží k určení původu hybridních taxonů, vzniku polyploidů či k odhadu převažujícího reprodukčního způsobu populace nebo taxonu (Soltis et Soltis 1989). Hlavní výhodou oproti přímému stanovení variability pomocí DNA je kodominantní projev isoenzymů, což umožňuje odlišit heterozygoty a dominantní homozygoty.

5.1 Metodika

Veškeré isoenzymové analýzy byly prováděny v isoenzymové laboratoři Botanického ústavu AV ČR v.v.i v Průhonicích za použití standardních postupů optimalizovaných touto laboratoří. Separace probíhala vertikálně na polyakrylamidovém gelu (PAGE). Její výhodou je velmi účinná separace a dobrá reprodukovatelnost gelů. Bylo využito aparatury HOEFER SE 600, která umožňuje současné zpracování 80 vzorků. Bylo zanalyzováno celkem 116 jedinců ze 53 populací ze všech čtyř studovaných druhů. Lokality byly vybírány s ohledem na geografickou polohu, typ stanoviště i početnost jedinců.

Testováno bylo celkem 6 enzymatických systémů: AAT (aspartát aminotransferáza, EC 2.6.1.1), ADH (alkohol dehydrogenáza, E.C. 1.1.1.1), SOD (superoxid dismutáza, E.C. 1.15.1.1), PGM (fosfoglukomutáza, E.C. 5.4.2.2), PGI (fosfoglukoisomeráza, E.C. 5.3.1.9), LAP (eucin aminopeptidáza, E.C. 3.4.11.1), EST (esterázy E.C.3.1.1.). Leucin aminopeptidáza (LAP) a fosfoglukomutáza (PGM) jsou enzymy monomerické, složené z jednoho aminokyselinového řetězce, aspartát aminotransferáza (AAT), alkohol dehydrogenáza (ADH), karboxylesteráza (EST), fosfoglukoisomeráza (PGI) a superoxid dismutáza (SOD) představují dimerické enzymy kódované ve dvou lokusech.

Příprava vzorků

Příprava vzorků a elektroforéza probíhala za nepřetržitého chlazení, aby zůstala zachována aktivita enzymů. Asi 50 mg mladých listů odebraných z rostlin umístěných na experimentální zahradě BÚ AV ČR bylo homogenizováno v chlazené třecí misce spolu se 400 µl extrakčního pufru LUZULA (75 mM tris-H₃PO₄ pH 7.5, 13 mM 2-mercaptoethanol, 7.8 mM dithioerythritol, 2.8 mM L-ascorbic acid, 4% polyvinylpyrrolidon), přídavkem mořského

písku a malým množstvím Dowexu sloužícímu k vyvázání sekundárních metabolitů. Homogenát byl poté přelit do mikrozkuavek a centrifugován 10 minut při 12 000 otáčkách /min v předem vychlazené centrifuze. Supernatant byl poté slit a rozdělen do tří 170 μ l mikrozkuavek, v nichž byl uchován v mrazícím boxu při teplotě -75°C až do dalšího zpracování.

Příprava polyakrylamidového gelu

Každý gel je tvořen dvěma vrstvami o různé koncentraci. V dolní vrstvě, tzv. separačním gelu (8% acrylamide, pufr 1.82 M tris-HCl, pH 8.9), s vyšší hustotou, dochází k vlastní separaci proteinů. Horní vrstvu tvoří koncentrační gel ((4% acrylamide, pufr 0.069 M tris-HCl, pH 6.9) s nižší hustotou, ve kterém dochází k soustředění shodných molekul. Během přípravy separačního i koncentračního gelu je nutno kádinky v nichž jsou gely připravovány zakrývat, neboť kyslík inhibuje polymeraci. Polymerace je spuštěna pomocí TEMEDu, který se k roztokům přidává jako poslední, těsně před nalitím gelů.

Jako první se připravuje separační gel, jehož roztok se po krátkém zamíchání a odsátí vodní vývěvou nalévá pomocí injekční stříkačky asi 3,5 cm po horní okraj formy. Poté se separační gel převrství asi 1,5 cm vysokou vrstvou destilované vody a ponechá se polymerovat do druhého dne. Druhý den se pomocí injekční stříkačky odsaje destilovaná voda a připraví se koncentrační gel, který se po přidání TEMEDu a krátkém zamíchání nalije na separační gel. Do gelu se poté zasune hřeben a gel se nechá asi 45 minut polymerovat. Po skončení polymerace se hřebeny vyndávají, zbylý nezpolymerovaný roztok se z komůrek vypláchnutých koncentrovaným elektrodoým pufrem (0.02 M tris and 0.24 M glycine, pH 8.3) odsaje injekční stříkačkou a poté znovu naplní koncentrovaným elektrodoým pufrem

Vlastní elektroforéza

Spodní elektrodová vana se naplnění vychlazeným zředěným elektrodoým pufrem. Forma s připravenými gely se zasune do této nádoby a zapojí se chlazení aparatury. Do každé komůrky je pak mikropipetou naneseo 30 μ l vzorku. Po nanesení vzorků se připevní horní elektrodová vana naplněná koncentrovaným elektrodoým pufrem. Aparatura je poté uzavřena krytem a připojena ke zdroji elektrického napětí. Elektroforéza probíhá přibližně 4 hodiny, zpočátku při napětí 80 mA (20 mA na gel), po projití vzorků rozhraním koncentračního a separačního gelu při napětí 100 mA (25 mA na gel).

Detekce

Po ukončení elektroforézy a vyjmutí gelu z forem se gely opláchnou destilovanou vodou a ve tmě přelijí detekčními roztoky. Dále se inkubují ve tmě v termostatu při 32°C. Barvení ADH probíhalo podle Vallejos (1983), barvení PGM, PGI, EST a SOD podle Wendel et Weeden (1989) s následujícími modifikacemi: ADH (20 ml ethanolu), PGM (24 mg MgCl₂, 50 mg glukosa-1-fosfát, 10 mg NADP), PGI (10 mg NADP, 24 mg MgCl₂), EST (Naphosphate buffer pH 6.45; 25 mg β-naphthylphosphate, 50 mg Fast Blue BB), SOD (0.05 M tris-HCl pH 8.2, 4.5 mg EDTA, 5 mg NBT).

Enzymové systémy AAT and LAP byly barveny následujícím způsobem: Pro AAT byly připraveny 2 barvicí roztoky - A (20 ml 0.1 M tris-HCl pH 8.4, 240 mg aspartic acid, 40 mg α-ketoglutaric acid) a B (20 ml 0.1 M tris-HCl pH 8.4, 50 mg Fast Blue BB Salt, 50 mg Fast Violet B). Roztok A je nutno připravit asi 15 minut před aplikací, narozdíl od roztoku B, který se připravuje těsně před aplikací. Gel je nutno propláchnout ve vodě a poté v pufru tris-HCl pH 7. Roztoky A a B se smíchají a nalijí na gel. Gel je třeba inkubovat ve tmě (meziprodukt je fotosenzitivní) při 32 °C dokud se neobjeví proužky (obvykle 2-4 hodiny). Poté se roztok slijí, gel se opláchně a fixuje fixačním roztokem (1:1:3:5, glycerine, acetic acid, dH₂O, methanol). Gel barvený pro systém LAP se opláchně v pufru (60 ml 0.2 M tris-maleate pH 6) a až 10 minut se ponechá ve tmě inkubovat se se 40 mg L-leucyl-α-naphthylamide-HCl rozpuštěném v 50% acetonu a 60 mg MgCl₂. Pak se přidá barvicí roztok 25 mg Fast Black K Salt rozpuštěný ve 30 ml pufru a gel je dále inkubován ve tmě až do objevení proužku (1-4 hodiny). Po skončení detekcí byly gely vloženy mezi dvě vlhké celofánové folie, napnuté do rámu a takto sušeny minimálně tři dny.

5.2 Výsledky

U studovaných druhů (116 rostlin z 57 populací) byla nalezena minimální vnitro- i mezidruhová variabilita. Tento fakt potvrzuje velmi blízkou příbuznost všech čtyř druhů, což platí i v případě havranických subpopulací. V žádném druhu ani populaci nebyly nalezeny unikátní alely, vždy šlo o kombinaci 4 alel (a,b,c,d - a,b,c u tetraploidů i diploidů, d pouze u tetraploidů a „havranické velké“). Systémy LAP, EST1 a EST2 se ukázaly příliš nepřehledné na vyhodnocení proužků a *pattern* byly proto porovnávány pouze celkově.

Druh *G. nemoralis* vykazoval zcela shodnou alelickou konstituci a to ve všech 9 analyzovaných enzymových systémech (tab. 6.). U druhého diploida, *G. declinata* také jednoznačně převažovali homozygoti, alespoň ojedinele se zde však vyskytly heterozygotní kombinace (3 rostliny z 21; tj. 1.4%) a to ve 4 systémech (viz tab. 5). Nejvyšší míru

heterozygoty ukázaly analýzy isoenzymů u druhu *G. fluitans* (tab. 2), ačkoliv celková vnitrodruhová variabilita byla opět velmi nízká. U druhu *G. notata* byla v 1 polymorfním lokusu (ADH1) zaznamenána fixovaná homozygotita, stejně jako u druhu *G. declinata*. U druhu *G. notata* (tab. 4) byla zaznamenána fixovaná heterozygotita v jednom lokusu (AAT2), druh *G. fluitans* vykazoval ve všech lokusech jak homozygoty, tak i heterozygoty, byť frekvence heterozygotů byla ve většině lokusů velmi nízká. Rostliny z havranické populace (tab. 3) byly vzájemně odlišné, u obou subpopulací byla zaznamenána fixovaná heterozygotita ve 4 lokusech.

Tabulka 2: Vyhodnocení isoenzymových *pattern* druhu *G. fluitans*. Z tabulky výsledků vyřazeny systémy ADH1, ADH2 z důvodu nekompletnosti analýz.

č.vzorku	AAT 2	SOD 4	PGM	PGI	LAP	EST 1	EST 2	Lokalita
1	bbbb	aacc	bbbb	bbbb	A	A	A	Mor. Knín. 2
2	bbbb	aacc	bbbb	bbbb	B ?sl.	A	B	Ratiboř 6
4	bccc	aacc	aabb	bbbb	A	A	C	Pískovna
5	aacc	aacc	aabb	bbbb	B	A	C	Milovy 1
6	bccc	aacc	aabb	bbbb	A	A	F	Černice
7	bbbb	aacc	aabb	bbbb	A	A	B	Rožd. F 1
8	aacc	aacc	bbbb	bbbb	B	A	D	Havířov 1
9	bbbb	aacc	bbbb	bbbb	A ?sl.	A	C	Step F 2
10	bbbb	aacc	bbbb	bbbb	A	A	D	Pihulík 1
11	abbb	aacc	bbbb	bbbb	B	A	B	Sedloňov B 2
12	aacc	bbbb	bbbb	bbbb	A	A	E	Lažínky F 4
13	abcd	aacc	bbbb	bbbb	H	A ?	D	Hvězdov 5
14	bbbc	aacc	bbbb	bbbb	sl	A	D	Dominova skalka F 4
15	bbbb	aacc	bbbb	bbcc	sl	A	D	Lhotka 4
16	bbbb	aacc	bbbb	bbbb	sl	A	B	Slavk.les 5
17	bccc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	B	Magnesia F 5
18	hbhc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	E	Sax 5
24	bccc	aacc	bbbb	bbbb	sl	A	G	Dominova skalka 4
37	hbhc	aacc	bbbb	bbbb	sl	A	H	Maxičky
41	bbbb	aacc	bbbb	bbcc	B	A	I	Bělýš 4
43	bbbb	aacc	bbbb	bbbb	B	A	E	Magie
48	bccc	aacc	aabb	bbbb	B ?sl.	A	E	Polom
80	bbbb	aacc	bbbb	bbcc	B	A	C	Bělýš 4

Tabulka 3: Vyhodnocení isoenzymových *pattern* druhů *G. „havranická malá“* a „havranická velká“.

č.vzorku	AAT 2	ADH 1	ADH 2	SOD 4	PGM	PGI	LAP	EST 1	EST 2	
81	bbbc	accc	aacc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	B	„havr. velká“
82	bbbc	accc	aacc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	B	„havr. velká“
83	bbbc	accc	aacc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	B	„havr. velká“
84	bbbc	accc	aacc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	D	„havr. velká“
85	bbbc	accc	aacc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	D	„havr. velká“
86	bbbc	accc	aacc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	D	„havr. velká“
87	bbbc	accc	aacc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	D	„havr. velká“
88	bbbc	accc	aacc	aacc	bbbb	bbbb	A	A	D	„havr. velká“
89	bbbc	aac	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D ?	„havr. malá“
90	bbbc	aac	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D	„havr. malá“
91	bbbc	aac	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D	„havr. malá“
92	bbbc	accc	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D ?	„havr. malá“
93	bbbc	aac	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D	„havr. malá“
94	bbbc	aac	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D	„havr. malá“
95	bbbc	aac	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D	„havr. malá“
96	bbbc	aac	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D	„havr. malá“
97	bbbc	aac	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D	„havr. malá“
98	bbbc	accc	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D	„havr. malá“
99	bbbc	accc	aac	aaaa	bbbb	aabb	A	A	D	„havr. malá“

Tabulka 4: Vyhodnocení isoenzymových *pattern* druhu *G. notata*.

č.vzorku	AAT 2	ADH 1	ADH 2	SOD 4	PGM	PGI	LAP	EST 1	EST 2	Lokalita
19	aadd	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aaaa	D	B	P	Diváky 3
20	aacc	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aaaa	E	B	J	Semet not 2
22	aadd	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aaaa	E	B	P	Magnesia 2-1
23	aadd	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aabb	E	B	R	Pilský 5
25	aadd	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aabb	E	B	R	Rožd' D 1
26	aadd	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aaaa	E	B	J	Sedloňovo A 1
27	hbdd	hbhb	aaaa	bbbb	bbbb	aabb	D	B	R	Trnovany 1
28	hbcc	hbhb	aaaa	bbbb	bbbb	aaaa	F	B	J	Fryd no 1
29	aadd	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aabb	D	B	R	Trnovany 5
30	aacc	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aabb	E	B	R	Kam. Žehr.
31	aacc	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aaaa	E	B	J	Radějov 5
42	aacc	hbhb	aaaa	bbbb	aabb	aaaa	D	B	P	Lažínky No
45	aadd	hbhb	aaaa	bbbb	aabb	aaaa	E	B	J	Hráz No
46	aadd	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aabb	E	B	R	Třeboc
53	aadd	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aabb	E	B	R	Dom Nem
57	aacc	cccc	aaaa	bbbb	bbbb	aaaa	E	B	J	Zákop 1

Tabulka 5: Vyhodnocení isoenzymových *pattern* druhu *G. declinata*.

č.vzorku	AAT 2	ADH 1	ADH 2	SOD 4	PGM	PGI	LAP	EST 1	EST 2	Lokalita
33	bc	cc	aa	bb	bb	aa	F	B	J	Dubičná
34	bb	ac	ac	ac	bb	bb	B	A	K	Step D1
35	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	L	Step D 3
36	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	L	Step D 4
38	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	L	Mníšek
39	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	L	Marunka
40	ac	cc	aa	bb	bb	aa	E	B	M	Čilá
44	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	L	Černice D
47	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	L	Mšec
49	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	L	Havran 4
50	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	L	Zákop 2
51	bb	cc	aa	aa	bb	aa	G	A	N	Roztoky 4
52	bb	cc	aa	aa	ab	aa	G	A	N	Roztoky 3
55	bc	cc	aa	bb	bb	aa	F	B	J	Dubičná 3
58	bb	cc	aa	aa	bb	aa	B	A	L	Pískovna 2007
59	bb	cc	aa	aa	bb	aa	B	A	L	Pískovna 2008
60	bb	cc	aa	aa	bb	aa	B	A	O	Kunratice
112	bb	cc	aa	aa	bb	aa	B	A	L	Havr vřes
113	bb	cc	aa	aa	bb	aa	G	A	O	Fryd D 3
114	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	N	Havran 1
116	bb	cc	aa	aa	bb	aa	A	A	N	Havran 3
106	bc	cc	aa	bb	bb	aa	F	B	J	Dubičná

Tabulka 6: Vyhodnocení isoenzymových *pattern* druhu *G. nemoralis*. Z výsledné tabulky jsou vyřazeny výsledky systému EST2, které byly příliš slabě vyditelné na vyhodnocení.

č.vzorku	AAT 2	ADH 1	ADH 2	SOD 4	PGM	PGI	LAP	EST 1	Lokalita
32	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Hráz 6
54	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E sl.	C	Konojedy
56	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Semetín
100	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Štěpková
101	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Mrkllov
102	cc	bb ?	bb	bb	bb	aa	E	C	Semetín potok
103	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Štěpková
104	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Mrkllov
105	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Dědov
107	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Semetín
108	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Konojedy
109	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Dědov 5
110	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Dědov H
111	cc	bb	bb	bb	bb	aa	E	C	Konojedy

Je velmi pravděpodobné, že skutečná variabilita však i v rámci jednotlivých populací existuje, bohužel isoenzymy zřejmě nejsou schopny tuto variabilitu plně zachytit. Pro případnou další studii genetické variability je proto nutné využít jiných molekulárních nástrojů, např. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al. 1995). Tato metoda umožňuje studovat variabilitu na úrovni celého genomu bez předchozí znalosti genetické variability taxonů a poskytuje různé škály variability díky kombinaci 72 AFLP primerů.

6. Morfometrika

Cílem této části práce bylo nalezení spolehlivých znaků k determinaci jednotlivých druhů okruhu *G. fluitans* a porovnání morfologické variability jednotlivých druhů za účelem testování hypotézy o větší adaptabilitě polyploidů (Stebbins 1971).

Sběr rostlin probíhal na území České Republiky v letech 2006–2008. Lokality byly vybrány tak, aby pokud možno rovnoměrně pokrývaly celý areál výskytu druhů v České republice a zahrnovaly různé typy stanovišť. Na lokalitě byly provedeny následující sběry: 25 náhodně vybraných kvetoucích prýtů pro herbářové položky (od prvního kořene – tedy kořene vyrůstajícího z nodu nejbližší k latě) a 5 jedinců vhodných pro pěstování. Tyto rostliny byly pěstovány na pozemcích experimentální zahrady BÚ AV ČR v Průhonicích. Po roce byl proveden na experimentální zahradě sběr 25 kvetoucích prýtů (5 exemplářů z každého „klonu“ – z každé rostliny přesazené z terénu), rostliny byly zaherbářovány. Vzhledem k obtížím s pěstováním rostlin druhu *G. nemoralis* nebylo možno tyto pěstované rostliny zahrnout do srovnávacích analýz. V případě příznivé reakce na změnu způsobu pěstování *G. nemoralis* jsou plánována dodatečná morfometrická měření. Podobně i druhý diploidní druh, *Glyceria declinata*, vykazoval při pěstování omezenou vitalitu a zejména nižší tendenci ke kvetení, což mělo za následek nižší počet rostlin z jednotlivých populací dostupných pro morfometrické analýzy. Přímé porovnání populační variability a posouzení vlivu stanoviště na variabilitu rostlin bylo proto umožněno pouze na několika populacích.

6.1 Metodika

Celkový počet měřených rostlin byl 685 ze 41 populací, z každé populace zpravidla 15 rostlin (z finálních analýz byly vyřazeny populační sběry s méně než 5 jedinci). Počet rostlin v rámci jednotlivých druhů je uveden v tabulce č. 7, přehled lokalit je uveden v Příloze. U všech rostlin zahrnutých do morfometrických analýz byla nejprve průtokovou cytometrií stanovena jejich ploidní úroveň resp. absolutní velikost jaderného genomu.

Dokladové herbářové položky budou uloženy v herbářových sbírkách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (PRC)

Měřené znaky

Na základě literárních údajů (Borrill 1956, 1958, Holub 1960, Holub 1970, Kubát 2002) a vlastních pozorování bylo vytipováno 130 znaků (z nich 6 poměrových). V pilotní studii provedené na 150 rostlinách z 8 lokalit, které rovnoměrně pokrývaly všechny studované

taxony, byl změřen primární soubor 130 znaků. Získaná data byla následně podrobena statistickému zpracování (prostřednictvím programu SAS 8e; SAS Institute 2004) a na základě procedur PCA a CDA byl primární soubor znaků zredukován na 85 znaků. Následoval obdobný metodický postup, tj. rozšířený soubor dat (198 rostlin z 11 lokalit) byl opět obdobně statisticky zpracován a následovala redukce počtu znaků na ty, které byly nejtěsněji korelované s kanonickými osami, tj. nejlépe oddělovaly jednotlivé taxony (51 znaků – 42 primárních a 9 poměrových). Pro rostliny pěstované v prostorách experimentální zahrady bylo vybráno pouze 41 znaků (pěstované rostliny se vyznačovaly mnohem menším vzrůstem a chudší latou – měly méně pater květenství, tj. méně měřitelných znaků). V analýzách souboru rostlin z terénu a z experimentálních podmínek bylo použito 41 znaků shodných pro oba soubory. Z těchto 41 znaků bylo 33 primárních a 8 poměrových (viz Příloha).

Znaky v47 (celková délka rostliny) a v48 (délka laty) byly měřeny pomocí termostabilního pravítka s přesností na 1 mm. Ostatní znaky byly měřeny pomocí binokulární lupy (Olympus SZ51) s okulárovým měřítkem s přesností 0,1 mm při desetinásobném zvětšení.

Tab. 7: Počet morfometricky zpracovaných rostlin / počet populací

	<i>G. fluitans</i>	<i>G. notata</i>	<i>G. declinata</i>	<i>G. nemoralis</i>	„havranická malá“	„havranická velká“
sběr v terénu	91 / 7	72 / 6	134 / 8	93 / 6	24 / 1	26 / 1
pěstované	103 / 7	95 / 10	49 / 7	3 / 1	0	0

Statistické zpracování dat

Ke statistickému zpracování dat byly použity základní statistiky, korelační matice a ordinační metody získané programem SAS (verze 8e; SAS Institute 2004). Vnitrodruhová variabilita nalezená v rámci rostlin zaherbářovaných na lokalitě a rostlinách herbářovaných po ročním pěstování na experimentální zahradě (Botanický ústav AV ČR v.v.i.) byla zhodnocena porovnáním box plot výstupů z programu STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc.).

Základní statistiky (průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum, horní (75 %) a dolní (25 %) kvartil a medián) byly vypočítány procedurou UNIVARIATE (SAS 8e) pro všech 51 (rostliny z terénu), resp. 41 (rostliny z experimentálních podmínek a následně všechny rostliny) analyzovaných znaků. Normální rozdělení hodnot jednotlivých znaků bylo testováno „Shapiro-Wilk“ testem, který je vhodný pro menší a středně velké soubory objektů (Marhold

et Suda 2002). 21 z 41, resp. xxx z 50 znaků nemělo normální rozdělení (hodnoty Shapirova-Wilkova testu byly nižší než 0,95 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$), tj. nelze předpokládat mnohorozměrné normální rozdělení u celého souboru dat. Kvůli možné korelaci znaků (citlivost ordinačních metod na vysoce korelované znaky, zvláště pak u diskriminačních analýz; Marhold et Suda 2002) byly všechny znaky datového souboru otestovány procedurou CORR (SAS 8e). Jako hodnota těsné korelace byla použita hranice běžně aplikovaná při zpracování botanických dat (0,95; Marhold et Suda 2002). Pro zjištění míry korelace byl vybrán Spearmanův korelační koeficient nevyžadující normální rozdělení vstupních dat (Marhold et Suda 2002). Hranici těsné korelace přesáhlo 6 dvojic znaků (s jedinou výjimkou poměrových), proto byl z dalších analýz vyřazen jeden znak z každé dvojice.

Ordinační metody

Ordinační analýzy morfometrických dat byly zpracovány v programu SAS 8e. Výstupy analýz jsou součástí elektronické přílohy. Pro odhalení základní struktury v datovém souboru a v jeho částech byla použita metoda analýzy hlavních komponent – trojrozměrná standardizovaná (vycházející z korelační matice dat) PCA pracující s předpokladem, že znaky se pohybují v euklidovském prostoru. Tato metoda se používá ke zjištění základní struktury v datech, jejím principem je nahrazení původního souboru pozorovaných znaků souborem nových, vzájemně nekorelovaných znaků tak, aby byla postihnuta maximální variabilita souboru. Výstupem jsou pak osy, hlavní komponenty, které jsou vedeny ve směru největší celkové variability datového souboru (Marhold et Suda 2002).

K určení nejdůležitějších znaků, které odlišují jednotlivé taxony, byly použity diskriminační analýzy – kanonická analýza (procedura CANDIS) a klasifikační analýza (procedura DISCRIM). U kanonické analýzy (oproti PCA) jsou data předem rozdělena do skupin, kanonické osy jsou tedy vedeny ve směru největší variability mezi skupinami (tj. největší podíl na kanonických osách mají znaky, které jsou málo variabilní uvnitř skupin a hodně variabilní mezi skupinami). Při neparametrické klasifikační analýze bylo využito neparametrické metody *k* – nejbližších sousedů (*k-nearest neighbours*) a tzv. křížového ověření (*cross-validation*). Koeficient *k* určuje klasifikaci objektu do skupiny na základě informací získaných z *k* – nejbližších objektů známého zařazení. Nejvhodnější hodnota koeficientu byla stanovena experimentálně tak, aby analýza přinesla maximální počet (a podíl) správně determinovaných jedinců. Smyslem křížového ověření je aplikace klasifikačního kritéria odvozeného z *n-1* objektů na jeden vyřazený objekt (Marhold et Suda

2002). Celý postup se opakuje n-krát, výsledkem jsou procentuální úspěšnosti zařazení objektů do skupin.

Nutnou podmínkou diskriminačních analýz jsou předem vymezené skupiny, které jsou definovány pomocí parametrů, které nejsou do vlastní analýzy zahrnuty – např. ploidie nebo absolutní velikost genomu.

Jako skupiny byly zvoleny jednotlivé druhy, které jsou od sebe dobře odděleny velikostí genomu. V případě *G. fluitans* a *G. notata* se shodnou velikostí genomu byly skupiny vymezeny na základě celkového habitu. Dalším nutným předpokladem je fakt, že žádný ze znaků nesmí být lineární kombinací jiného znaku (Klečka 1980). Velmi silně korelované znaky by měly být vyřazeny a znaky charakterizující skupiny by měly splňovat požadavek mnohorozměrného normálního rozdělení. Počet znaků použitých v analýze musí být menší než počet objektů v analýze zmenšený o počet skupin. Ačkoliv získaná data nespĺňují zcela všechny podmínky (mnohorozměrné normální rozdělení), diskriminační metody jsou celkově robustní k nedodržení podmínek (případné odchylky se týkají zejména úspěšnosti klasifikace). Pokud vzniklo podezření na nedodržení statistických požadavků, došlo k modifikaci postupů směrem k minimalizaci možných chyb (snížení počtu analyzovaných znaků, vypuštění konstantních znaků apod.). Oddělené analýzy byly provedeny pro populace rostlin pěstovaných a herbářovaných přímo v terénu.

Veškeré výstupy z analýz jsou k dispozici na přiloženém CD-ROMu.

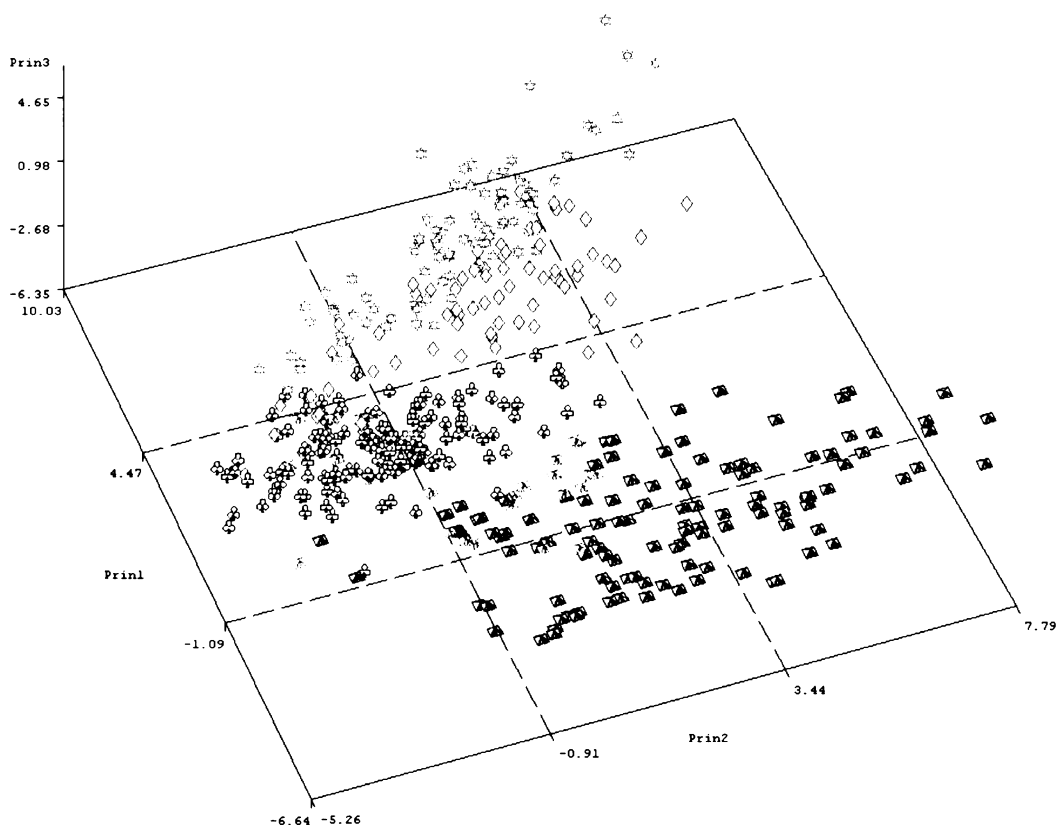
6.2 Výsledky

Mezidruhová diferenciace na základě morfologických znaků

Analýza hlavních komponent

Výsledek PCA (obr. 20) odhalil existenci nápadné struktury v datovém souboru, došlo k dobrému oddělení všech druhů kromě populací z havranického vřesoviště, v nichž však lze také vysledovat výraznou strukturu. Celá plocha grafu je dobře pokryta, což odpovídá rozdílné variabilitě podél jednotlivých os v rámci jednotlivých druhů. Tato analýza tedy potvrdila velmi dobré oddělení jednotlivých druhů pomocí znaků známých z určovacích klíčů. Pozornost byla proto upřena na odhalení znaků, které nejlépe charakterizují jednotlivé druhy jako i k nalezení znaků charakterizujících a odlišujících cytometricky odlišné subpopulace z

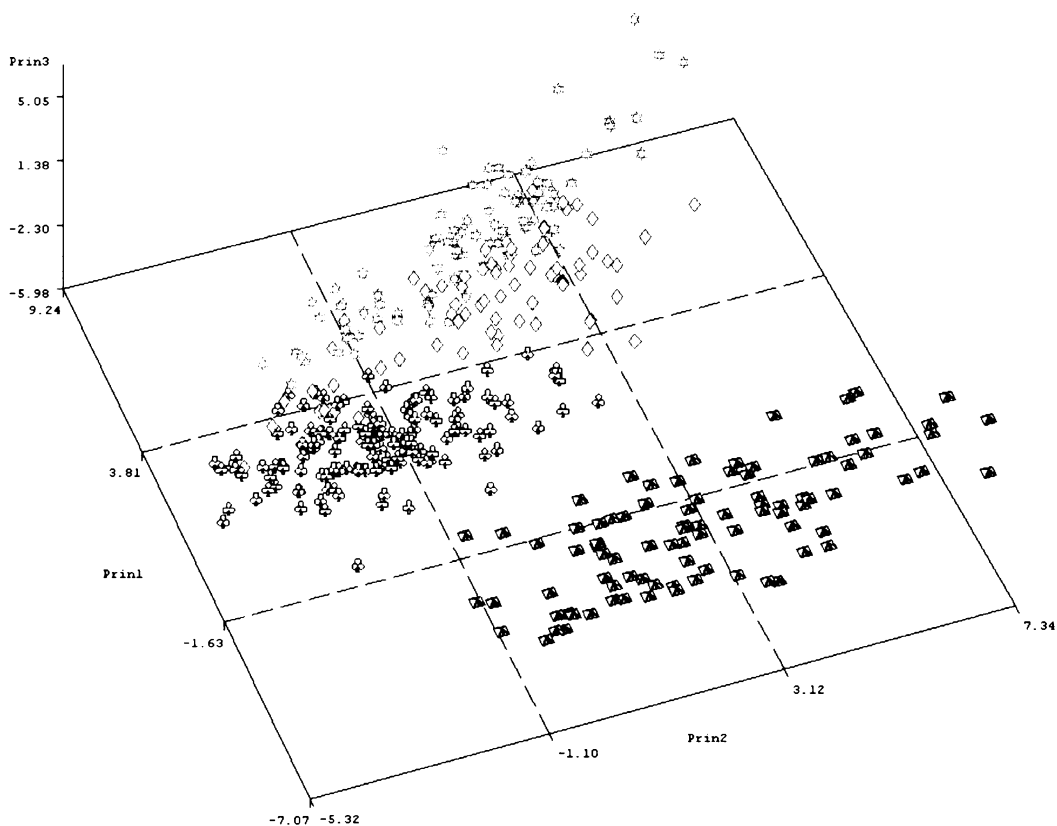
havranického vřesoviště (Znojmo). V dalším textu bude používáno spojení „havranická malá“ a „havranická velká“ vycházející z hodnot absolutní velikosti genomu (viz kapitola karyologie a cytometrie).



Obr. 20: Rozlišení jednotlivých druhů v grafickém výstupu PCA všech jedinců (sběry přímo na stanovišti) se zahrnutím všech 50 znaků. První osa vysvětluje 33,2%, druhá 16,5 % a třetí 9,6% variability.

(„havranická malá“ „havranická velká“ *G. fluitans* *G. notata* *G. nemoralis* *G. declinata*)

V PCA 4 druhů (obr. 21) se podle osy Prin 1 oddělily *G. declinata*, *G. notata* a *G. nemoralis*, podle osy Prin2 se pak odděluje druh *G. fluitans*. Znak nejtěsněji korelovaný s osou Prin 1 je v26 (průměrný počet klásků) a v22 (počet klásků ve 2 patře); s osou Prin2 znak v15 (průměrná délka větví) a v17 (průměrná délka větví ve 4. patře).



Obr. 21: Rozlišení 4 základních druhů v grafickém výstupu PCA (sběry přímo na stanovišti). Jednotlivé osy vysvětlují 32,8%, 17,1 % a 10 % variability.

(*G. fluitans* *G. notata* *G. nemoralis* *G. declinata*)

Diskriminační analýzy

Pro odhalení znaků, které nejlépe charakterizují jednotlivé druhy byly použity diskriminační analýzy. Do kanonické diskriminační analýzy byli po počátečních analýzách zahrnuti všichni jedinci (439) pocházející z terénních sběrů a 44 nejvýznamnějších znaků (39 primárních a 5 poměrových; obr. 22). Nejprve byl analyzován celý datový soubor (všech 6 taxonů) s cílem zjistit základní trendy fenotypové diferenciaci ve studované skupině. Pro odhalení druhově specifických znaků byl v následujícím kroku soubor rozdělen do menších skupin, které byly vzájemně porovnávány. Provedeny byly následující modifikace:

Glyceria fluitans vs. *G. notata* vs. *G. declinata* vs. *G. nemoralis*

Glyceria fluitans vs. „havranická malá“

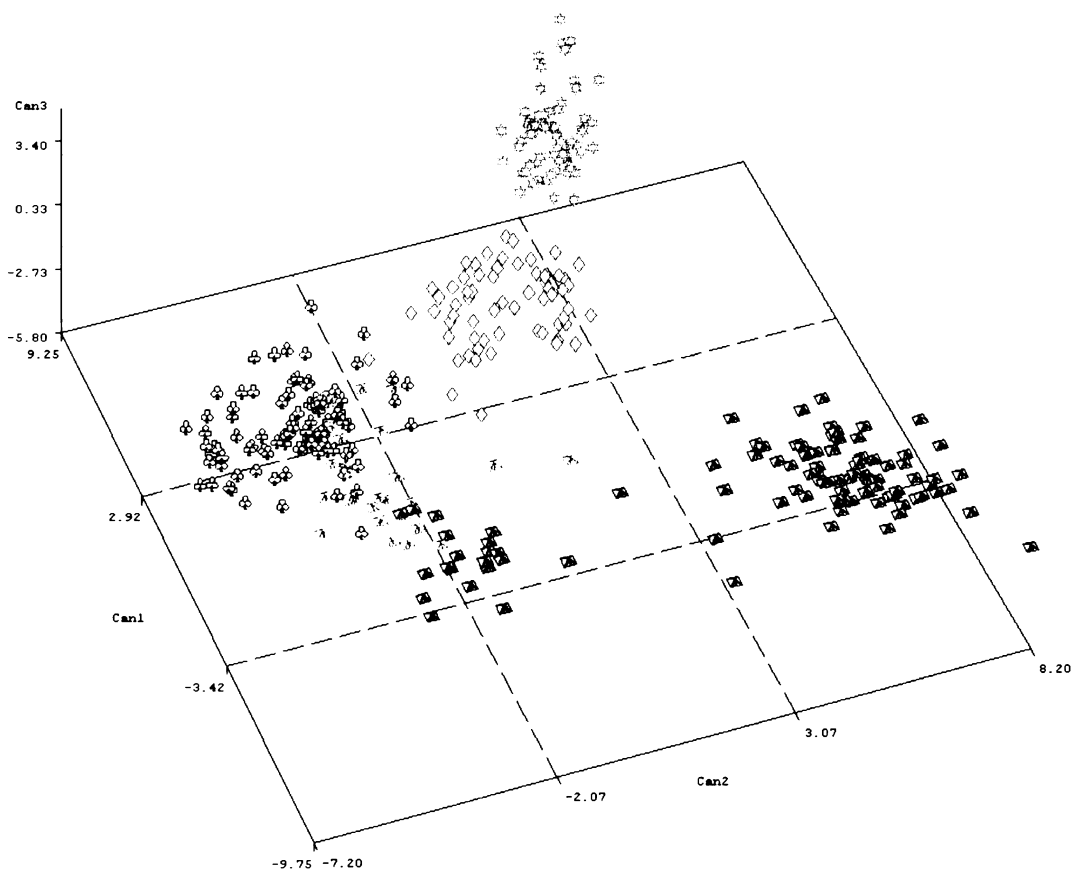
G. fluitans vs. „havranická velká“

„havranická malá“ vs. „havranická velká“

G. declinata vs. „havranická malá“ vs. „havranická velká“

G. fluitans vs. „havranická malá“ vs. „havranická velká“

Z obr. č. 22 je patrné velmi dobré rozdělení jednotlivých taxonů. Znaky nejtěsněji korelované s osou Can1 (tab. 8) jsou v36 (délka/šířka plušky; -0,962) a v29 (délka pluchy; -0,959) a dobře odlišily jednotlivé skupiny. Podle osy Can2 se výrazně odlišily skupiny na základě znaku v35 (šířka plušky; -0,969). *Glyceria nemoralis* je od ostatních druhů oddělena podél 3. osy na základě znaku v30 (šířka pluchy; -0,462). Všechny tři kanonické osy dohromady vysvětlují 96,3% celkové variability souboru.



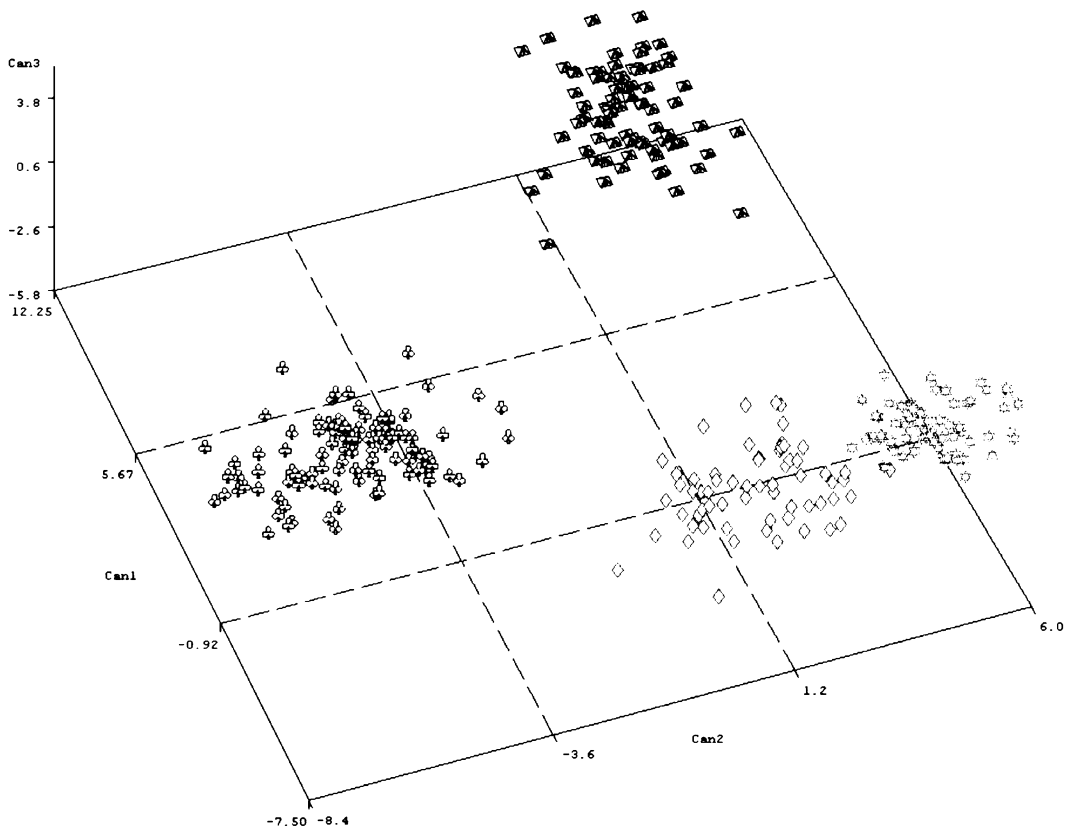
Obr. 22: Rozlišení všech taxonů na grafickém výstupu kanonické diskriminační analýzy všech taxonů (439 jedinců, 44 znaků; sběry přímo na stanovišti). První kanonická osa Can1 vysvětluje 54,4%, osa Can2 38,3 % a osa Can3 vysvětluje 4,3% variability.

(„havranická malá“ *G. fluitans* *G. notata* *G. nemoralis* *G. declinata* „havranická velká“)

Tab. 8: Kanonické korelační koeficienty pro všechny měřené znaky na všech družicích ze sběru na stanovišti.

znak	Can1	Can2	Can3	znak	Can1	Can2	Can3
v4	0.44675	0.366314	-0.248597	v25	0.592632	0.263743	0.404652
v5	0.282292	-0.049895	0.214109	v26	0.725531	0.270096	0.322479
v6	0.44100	0.10683	0.186245	v27	-0.682022	0.216249	-0.051843
v7	0.510915	0.226311	0.161090	v28	-0.823378	0.216738	0.006556
v8	0.524752	0.190179	0.143042	v29	-0.959632	0.168407	-0.085433
v9	0.409062	0.109081	0.270253	v30	-0.381082	-0.376836	-0.462351
v10	0.523489	0.114991	0.308515	v31	-0.786968	0.393755	0.178694
v11	0.203643	0.200132	-0.297035	v33	0.802899	-0.276866	-0.190187
v12	0.342525	0.256521	-0.031553	v35	0.075523	-0.969839	-0.036901
v13	0.085484	0.395897	-0.311685	v36	-0.961569	0.158658	0.015305
v14	0.077655	0.42445	-0.041813	v38	-0.418042	-0.268478	-0.350432
v15	- 0.046427	0.351916	-0.389114	v39	-0.701253	0.337408	0.244431
v16	- 0.108769	0.370128	-0.068073	v40	0.699632	-0.223749	-0.288378
v17	- 0.061283	0.393452	-0.381662	v41	-0.552367	0.621587	-0.127239
v18	- 0.203075	0.362479	-0.145387	v42	-0.466394	-0.068203	-0.135167
v19	- 0.099179	0.386764	-0.305059	v44	-0.656427	-0.125316	0.077365
v20	-0.21633	0.293693	-0.110841	v45	-0.187225	-0.090509	0.055277
v21	0.705262	0.170701	0.213327	v47	-0.648769	0.145679	0.015412
v22	0.70959	0.287468	0.222382	v48	0.605656	-0.012601	-0.038027
v23	0.704442	0.325581	0.272203	v49	-0.644354	-0.413902	0.118115
v24	0.658607	0.32342	0.298723				

Z CDA 4 druhů (po vyřazení havranických rostlin) (obr. 23) vyplývá jasné oddělení jednotlivých druhů - podle osy Can1 *G. fluitans*, *G. declinata* a *G. notata* s *G. nemoralis* na základě nejtěsněji korelovaných znaků (tab. 9) v29 (délka pluchy; 0,978935), v36 (délka/šířka plušky; 0,970758), podél osy Can 2 se nápadně odděluje *G. declinata* na základě znaku v35 (šířka plušky; -0,886176), třetí osa pak odlišuje *G. fluitans* a *G. nemoralis* od ostatních díky nejtěsněji korelovanému znaku v30 (šířka pluchy; 0,459) a v25 (počet klásků v 5. patře laty; 0,451). Všechny tři osy dohromady vysvětlují 100% variability souboru. Z výsledku CDA vyplývá důležitost květních charakteristik pro odlišení jednotlivých druhů z okruhu *G. fluitans*.



Obr. 23: Grafický výstup analýzy jednorozměrné kanonické diskriminační analýzy 4 základních druhů (386 rostlin, 44 znaků). První osa vysvětluje téměř 60%, druhá osa dalších 37%, třetí osa 3% variability.

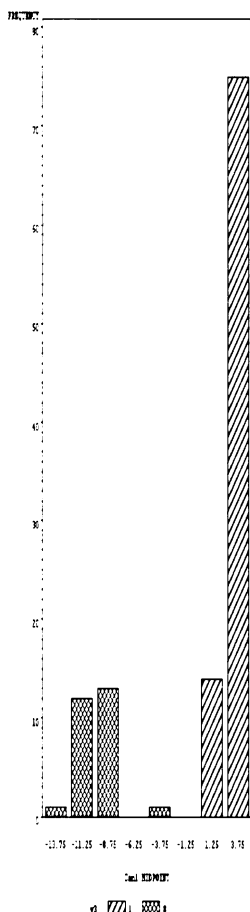
(*G. fluitans* *G. notata* *G. nemoralis* *G. declinata*)

Tab. 9: Kanonické korelační koeficienty pro všechny měřené znaky na 4 základních druzích z terénních sběrů.

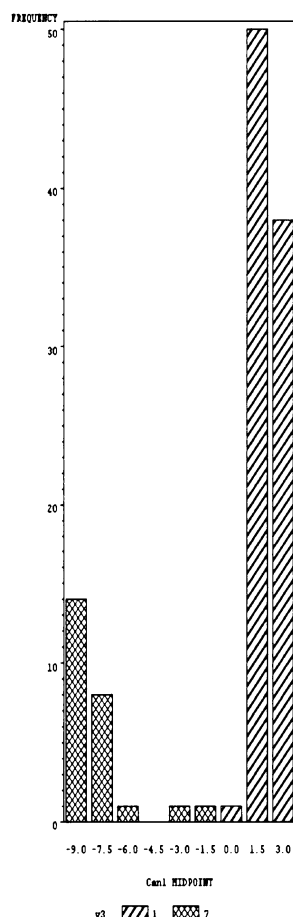
znak	Can1	Can2	Can3	znak	Can1	Can2	Can3
v4	-0.327089	0.513171	-0.181233	v25	-0.475039	0.400704	0.450920
v5	-0.265860	-0.01683	0.172577	v26	-0.599650	0.448664	0.370717
v6	-0.368029	0.180567	0.152267	v27	0.829252	0.112664	0.015758
v7	-0.403522	0.328583	0.158759	v28	0.868226	-0.046043	-0.027447
v8	-0.429166	0.304125	0.148307	v29	0.978935	-0.077508	-0.061525
v9	-0.338693	0.186897	0.268994	v30	0.218645	-0.420650	-0.459264
v10	-0.445637	0.211108	0.296417	v31	0.874200	0.134413	0.164594
v11	-0.138455	0.304607	-0.296766	v33	-0.853844	-0.034092	-0.198722
v12	-0.240756	0.356652	-0.017566	v35	-0.425154	-0.886176	-0.003217
v13	0.049427	0.384689	-0.357929	v36	0.970758	-0.098261	0.029628
v14	0.068746	0.402853	-0.060011	v38	-0.307504	-0.272899	0.279967
v15	0.151069	0.331525	-0.410653	v39	0.797039	0.070002	0.166524
v16	0.320832	-0.056167	0.217121	v40	-0.753205	0.019423	-0.237228
v17	0.385754	-0.368236	0.167533	v41	0.693630	0.506029	-0.016127
v18	0.329729	-0.086874	0.289330	v42	-0.197360	-0.163464	0.425113
v19	0.201532	0.375127	-0.278445	v44	-0.304228	0.078186	0.616245
v20	0.280815	0.274536	-0.038154	v45	-0.151782	0.033601	0.149240

v21	-0.612512	0.345272	0.241496	v47	0.707076	-0.018701	0.012307
v22	-0.580551	0.462499	0.262419	v48	-0.588774	0.146303	-0.030811
v23	-0.565380	0.499897	0.328129	v49	-0.514348	0.637479	0.015630
v24	-0.524125	0.489268	0.360966				

Na dvojici obr. 24a a 24b je patrné velmi dobré oddělení druhu *G. fluitans* od každého ze 2 typů nalezených na havranickém vřesovišti. Nejvýznamnějším znakem rozlišujícím *G. fluitans* od „havranické velké“ i „havranické malé“ jsou shodné znaky v 35 (šířka plušky) a v40 (délka obilky).

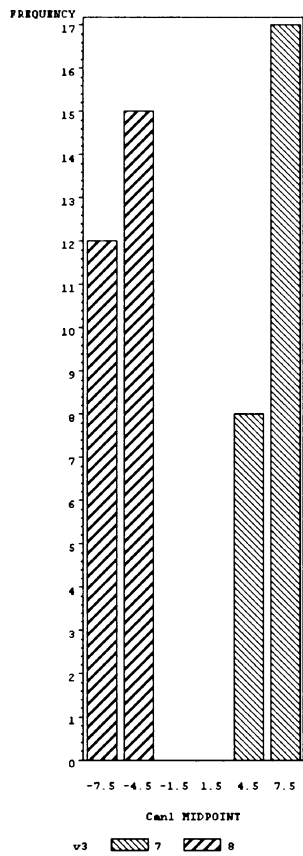


Obr. 24a: Grafický výstup analýzy jednorozměrné kanonické diskriminační analýzy.
 1 - *G. fluitans* 8 - „havranická malá“
 velká“



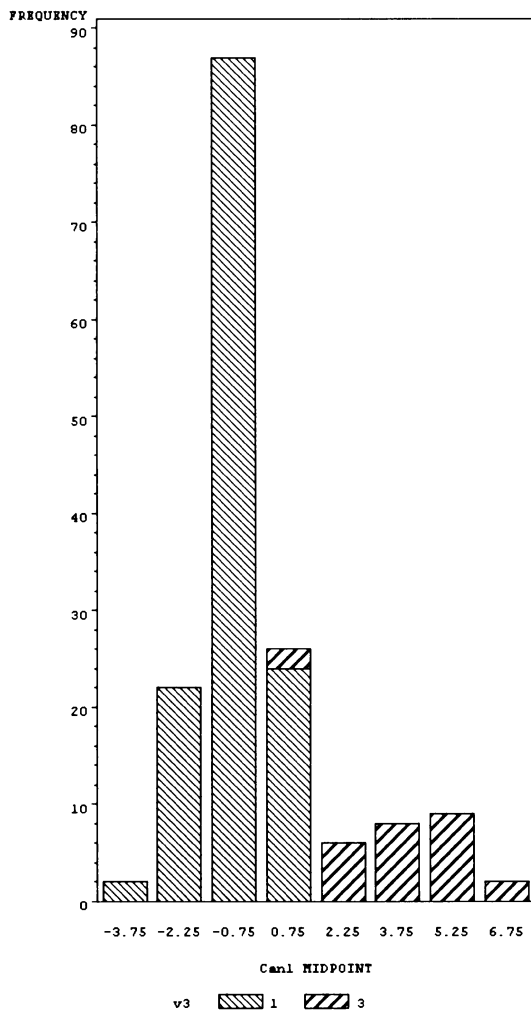
Obr. 24b: Grafický výstup analýzy jednorozměrné diskriminační analýzy.
 1 - *G. fluitans* 7 - „havranická velká“

Na obr. 25 se jednoznačně odlišují dvě havranické subpopulace. Znak nejtěsněji korelovaný s osou Can1 je v41 (šířka obilky), v36 (poměr délka / šířka plušky) a v29 (délka pluchy).





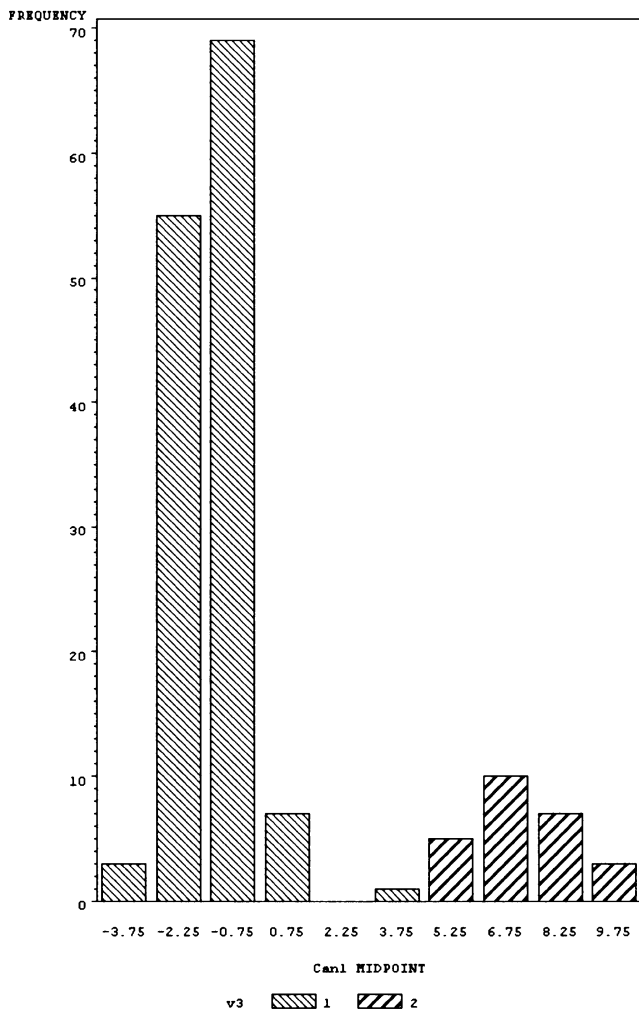
Obr. 25: Zřetelné oddělení druhů obou havranických subpopulací

. 7  - „havranická velká“, 8 -  „havranická malá“ (50 rostlin, 41 znaků).



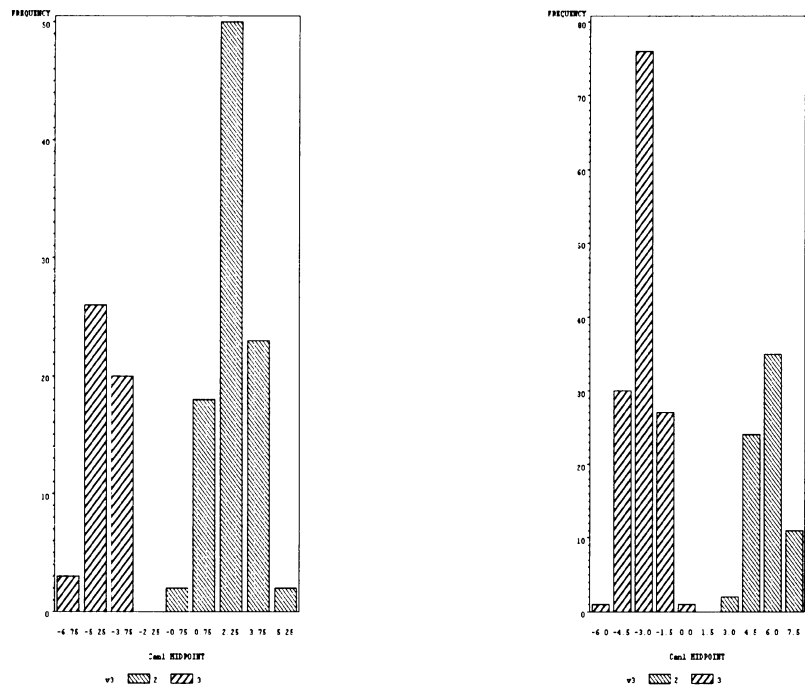
Obr. 26a: Zřetelné oddělení druhů *G. declinata* a „havranická malá“ (vlevo; jednorozměrná CDA)

. 1  - *G. declinata* , 3  - „havranická malá“.



Obr. 26b: Zřetelné oddělení druhů *G. declinata* a „havranická velká“ (jednorozměrná CDA)
 Grafický výstup analýzy jednorozměrné kanonické diskriminační analýzy.

1 - *G. declinata*, 3 - „havranická velká“.

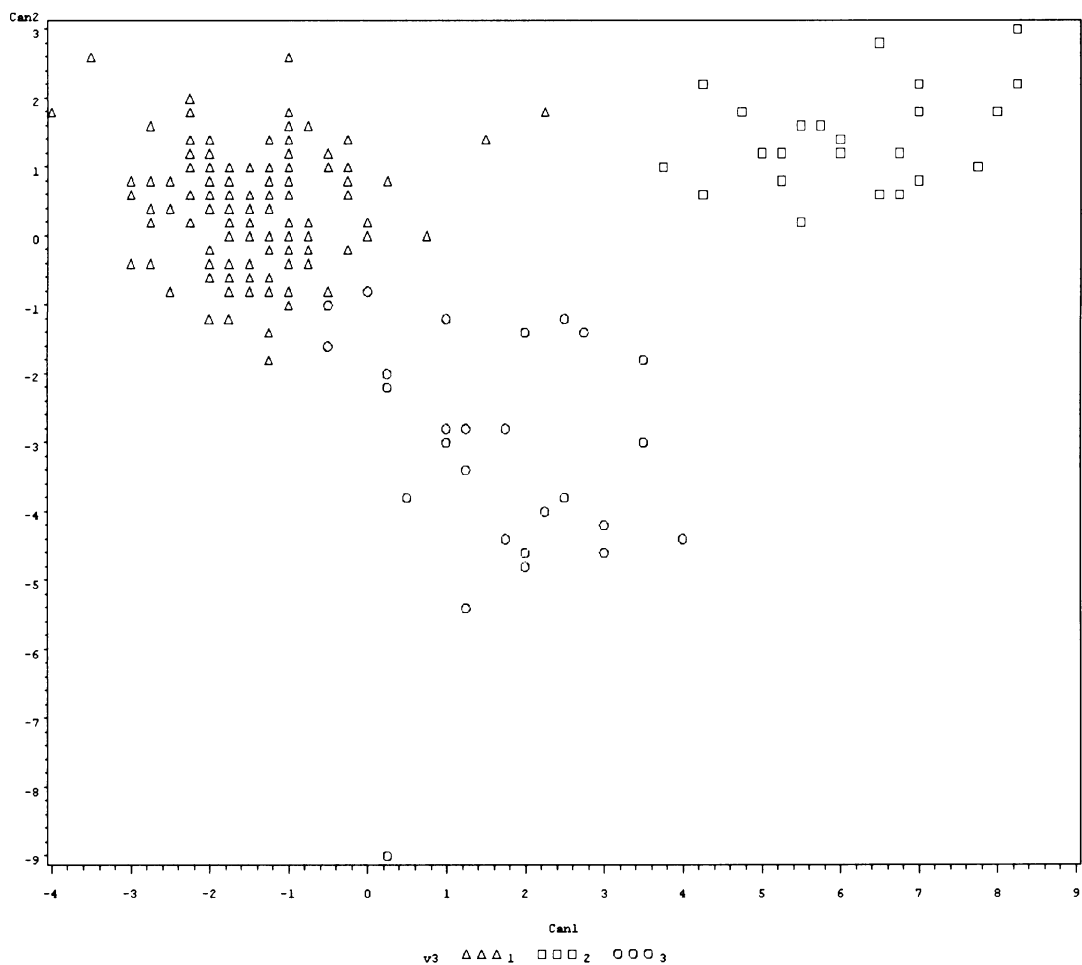


Obr. 27: Zřetelné oddělení *G. notata* a *G. declinata* (vlevo porovnání pěstovaných rostlin , vpravo rostliny sbírané přímo na stanovišti).

 2-*G. notata*
  3-*G. declinata*

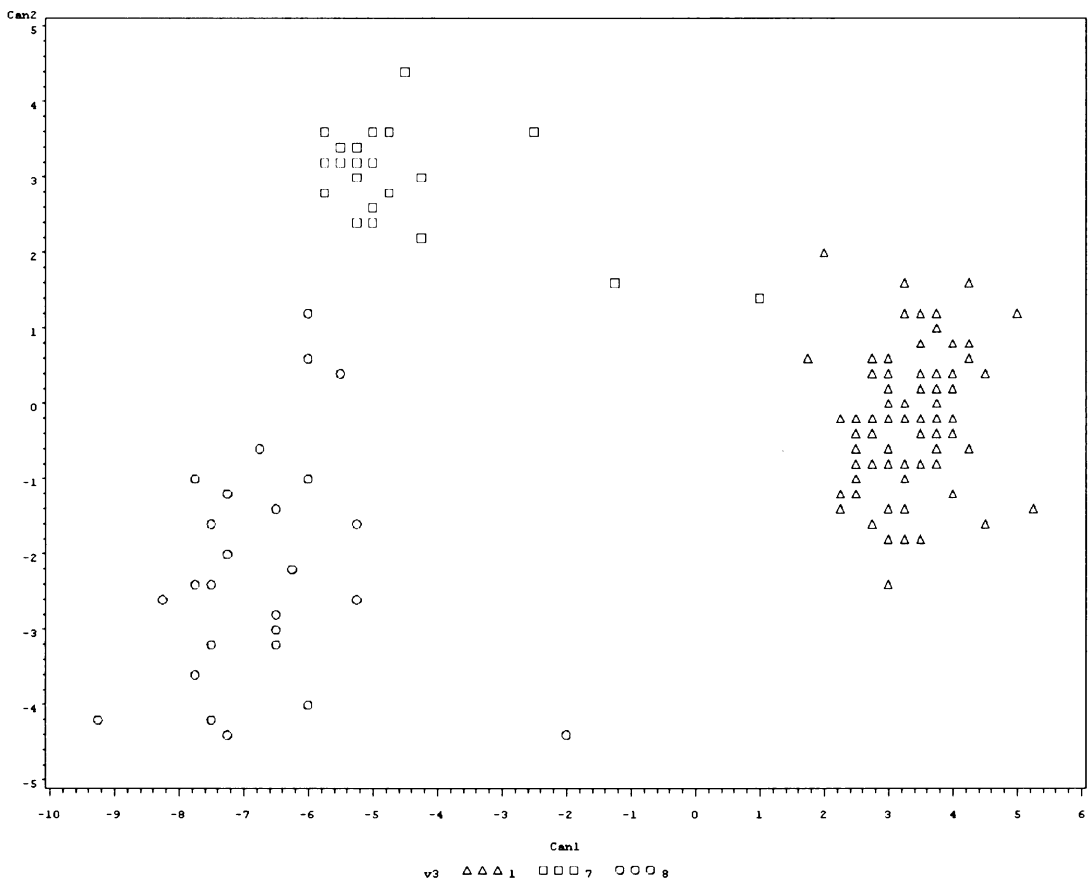
  *G. notata*
  3- *G. declinata*

Na obr. 28 je zřetelně zobrazeno rozdělení jednotlivých skupin. Zznaky nejtěsňji korelované s osou Can1 jsou v41(šířka obilky) v31(poměr délka / šířce pluchy) a s osou Can2 v27 (délka dolní plevy) a v47(délka rostliny).

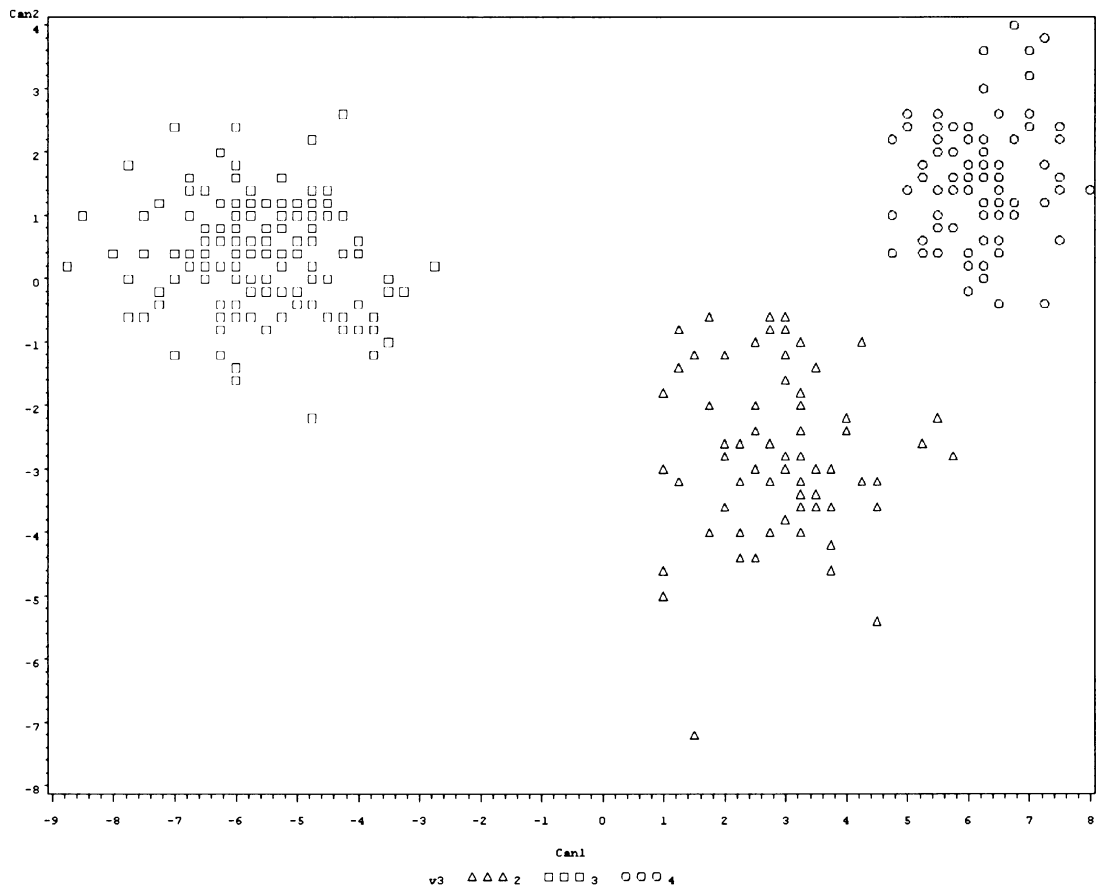


Obr. 28: Grafický výstup dvourozměrné kanonické diskriminační analýzy (Δ *G. declinata* \square „havranická velká“ \circ „havranická malá“)

Na obr. 29 se podobně zřetelně odlišily obě havranické skupiny i *G. fluitans*. S osou Can1 nejtěsněji koreluje znak v35 (šířka plušky; -0,97), s osou Can2 v27 (délka dolní plevy; -0,38) a v38 (délka prašníku; 0,28)

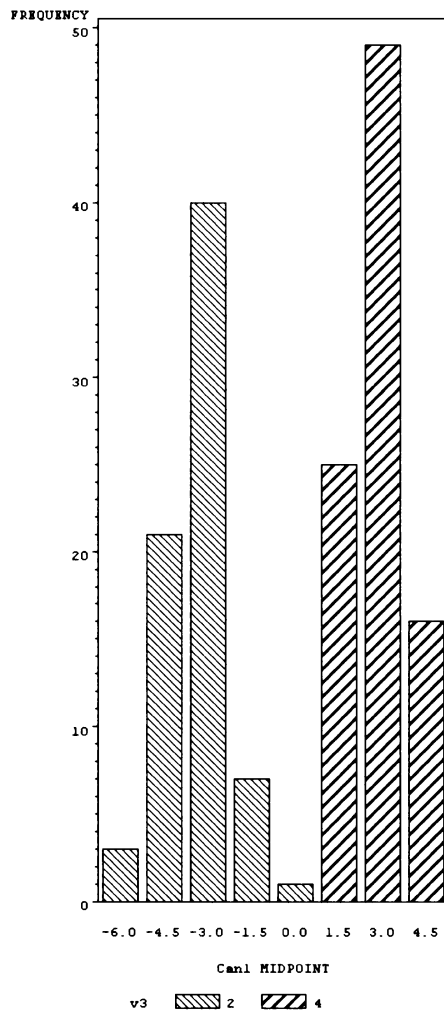


Obr. 29: Rozdělení havranických taxonů a *G. fluitans* na grafickém výstupu dvourozměrné CDA. (Δ *G. fluitans* □ „havranická velká“ ○ „havranická malá“)



Obr. 30: Grafický výstup dvourozměrné kanonické diskriminační analýzy zaměřovaných druhů Δ *G. notata* \square *G. declinata* \circ *G. nemoralis*

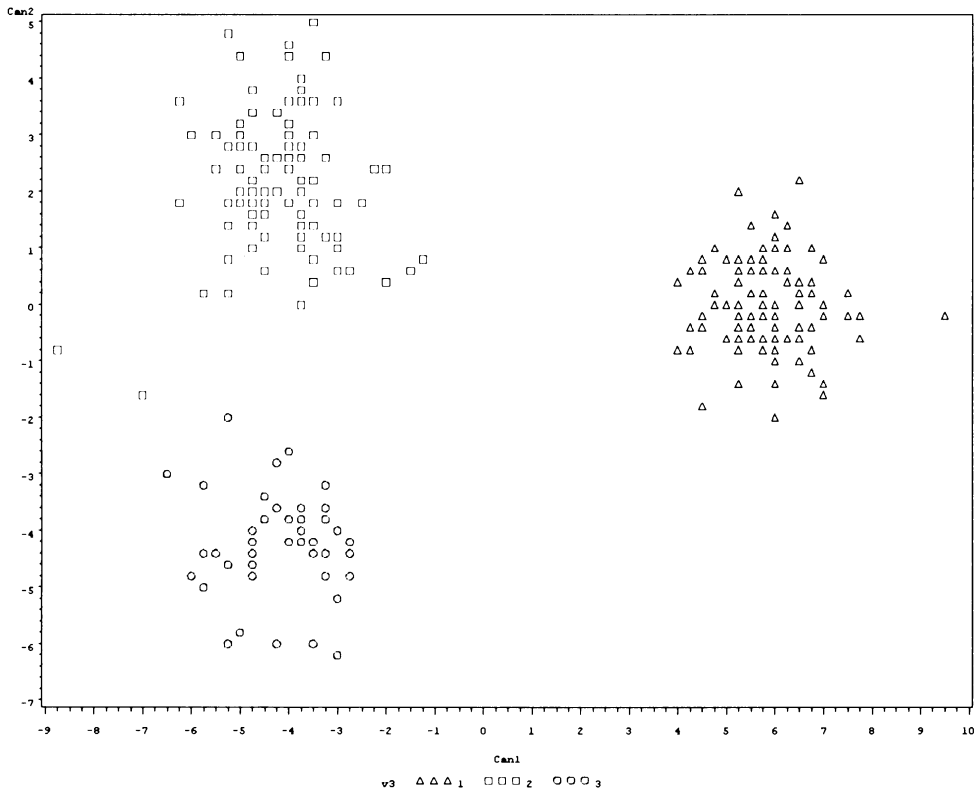
Kvůli častým záměnám druhů *G. declinata*, *G. notata* a *G. nemoralis* byla provedena následující série analýz. Na grafickém výstupu dvourozměrné CDA na všech 3 druzích je patrné jednoznačné odlišení jednotlivých druhů. Nejdůležitějšími znaky pro determinaci (obr. 30) can1 jsou: v35 (šířka plušky, -0,936), v36 (d/š plušky, -0,919), v29 (délka plušky, -0,893) korelované s osou Can1, a v15 (prům. délka větví 3.patro, -0,480) a v25 (počet klásků 5.patro, 0,486), korelované s osou Can2.



Obr. 31: Grafický výstup jednorozměrné CDA na *G. notata* a *G. nemoralis*.

▨ 2 -*G notata* ▩ 4-*G. nemoralis*

Pro stanovení stálosti nejdůležitějších diskriminačních znaků po ročním pěstování v kultuře byla provedena dvourozměrná CDA na souboru všech rostlin tří pěstovaných druhů (*G. fluitans*, *G. notata* a *G. declinata*; obr. 32)



Obr. 32: Grafický výstup dvourozměrné CDA pěstovaných rostlin (druhy *G. fluitans*, *G. notata*, *G. declinata*, všechny znaky, všechny rostliny).

(Δ *G. fluitans* \square *G. notata* \circ *G. declinata*)

K oddělení druhu *G. fluitans* od zbývajících došlo na základě znaků nejtěsněji korelovaných s osou Can1 – v21 (délka pluchy; 0,903) a v33 (šířka obilky; 0,922). Rozlišení *G. declinata* a *G. notata* na základě znaků nejvíce korelovaných s osou Can2 – v4 (počet pater; 0,645), v16 (počet klásků ve 2. patře laty; 0,525) a v15 (počet klásků v 1. patře laty; 0,517), viz tab.10.

Tab. 10: Kanonické korelační koeficienty pro všechny měřené znaky na 3 pěstovaných druzích

znak	Can1	Can2	znak	Can1	Can2
v4	0.108165	0.649520	v20	0.616405	-0.045957
v5	-0.095283	-0.083255	v21	0.903460	-0.177751
v6	-0.184399	0.307338	v22	0.053369	-0.241521
v7	-0.274541	0.170252	v23	0.812674	-0.069648
v8	-0.364786	0.043860	v25	-0.823427	0.094930
v9	-0.210408	0.281548	v27	-0.875025	-0.412990
v10	-0.149181	0.376387	v28	0.858090	-0.313530
v11	0.064369	0.397835	v30	0.418997	-0.279399
v12	0.187376	0.357613	v31	0.569229	-0.159338
v13	0.189360	0.283834	v32	-0.560807	0.165377
v14	0.359052	0.093110	v33	0.921778	0.161423
v15	-0.402634	0.517278	v34	0.545791	-0.256574
v16	-0.363274	0.524979	v36	0.632221	-0.271210
v17	-0.394638	0.452641	v38	0.072402	0.032687
v18	-0.463784	0.487558	v39	0.548919	-0.273337
v19	0.622027	-0.031119	v40	-0.545205	0.346510

Klasifikační diskriminační analýza

Jak je zřejmé z výsledků neparametrické klasifikační analýzy (tab. č. 11.), na základě všech znaků je možné správně klasifikovat více než 90% rostlin (klasifikace na základě $k=2$ nejbližších sousedů). Největší podíl správně klasifikovaných jedinců patřil taxonu „havranická velká“ (100%), taxon „havranická malá“ měl naopak nejmenší podíl dobře determinovaných jedinců (59,26%).

Tab. 11.: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy všech studovaných jedinců z přír. populací se zahrnutím všech měřených znaků ($k=2$). V tabulce zobrazeny údaje o skutečné příslušnosti jedinců a o počtu a podílu jedinců klasifikovaných do jednotlivých skupin. V prvním řádku u každé skupiny je počet jedinců, v druhém řádku je procentuální zastoupení z celé skupiny.

druh	zařazeno do druhu						celkem
	<i>G. fluitans</i>	<i>G. notata</i>	<i>G. declinata</i>	<i>G. nemoralis</i>	„havranická malá“	„havranická velká“	
<i>G. fluitans</i>	87,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	89,00
	97.75	0.00	0.00	0.00	0.00	2,25	100.00
<i>G. notata</i>	0,00	70,00	0,00	1,00	1,00	0,00	72,00
	0.00	97.22	0.00	1,39	1,39	0.00	100.00
<i>G. declinata</i>	0,00	0,00	130,00	0,00	3,00	2,00	135,00
	0.00	0.00	96,3	0.00	2,22	1,48	100.00
<i>G. nemoralis</i>	0,00	5,00	0,00	85,00	0,00	0,00	90,00
	0.00	5,56	0.00	94.44	0.00	0.00	100.00
„havranická malá“	0,00	0,00	7,00	0,00	16,00	4,00	27,00
	0.00	0.00	25.93	0.00	59.26	14.81	100.00
„havranická velká“	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00	25,00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00
chybně určeno (%)	2,25	2,78	3,7	5,56	40,7	0	9,17

Při provedení klasifikační diskriminační analýzy na souboru 4 základních druhů se zahrnutím 18 nejtěsněji korelovaných znaků (tab.12.) bylo dosaženo 100% správnosti klasifikace.

Tabulka 12.: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy jedinců ze 4 základních druhů se zahrnutím 18 nejtěsněji korelovaných znaků.

druh	zařazeno k druhu				
	<i>G. fluitans</i>	<i>G. notata</i>	<i>G. declinata</i>	<i>G. nemoralis</i>	celkem
<i>G. fluitans</i>	89	0	0	0	89
	100	0.00	0.00	0.00	100
<i>G. notata</i>	0	72	0	0	72
	0.00	100	0.00	0.00	100
<i>G. declinata</i>	0	0	135	0	135
	0.00	0.00	100	0.00	100
<i>G. nemoralis</i>	0	0	0	90	90
	0.00	0.00	0.00	100	100
chybně zařazených (%)	0	0	0	0	0

V klasifikační analýze „problematických skupin“ a jejich nejbližších taxonů při zahrnutí 17 nejtěsněji korelovaných znaků bylo dosaženo necelých 11% chybně zařazených rostlin, opět převážná většina chybně zařazených taxonů náležela taxonu „havranická malá“.

Tabulka 13.: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy jedinců ze 4 4 “problematických skupin“ se zahrnutím 17 nejtěsněji korelovaných znaků (k=6).

druh	zařazeno k druhu				celkem
	<i>G. fluitans</i>	„havranická velká“	„havranická malá“	<i>G. declinata</i>	
<i>G. fluitans</i>	89,00 100.00	0,00 0.00	0,00 0.00	0,00 0.00	89,00 100.00
„havranická velká“	2,00 8.00	23,00 92.00	0,00 0.00	0,00 0.00	25,00 100.00
„havranická malá“	0,00 0.00	2,00 7,41	20,00 74.07	5,00 18.52	27,00 100.00
<i>G. declinata</i>	0,00 0.00	2,00 1,48	11,00 8,15	122,00 90.37	135,00 100.00
chybně zařazených (%)	0	8	25,93	9,63	10,89

Stálost znaků i na pěstovaných rostlinách

Při aplikaci nejtěsněji korelovaných znaků z CDA na rostlinách z terénu na pěstované rostliny, došlo při použití 15 a posléze jen 8 nejvýznamějších znaků (k=30 resp. k=11) ke 100% oddělení všech skupin, při použití 5 znaků byly 3% rostlin druhu *G. declinata* chybně zařazeny do druhu *G. notata* (výsledky nezobrazeny). Z uvedeného vyplývá stálost znaků důležitých při determinaci rostlin v terénu i při aplikaci na rostliny z jiného místa. To má význam při určování ekotypů, jaké často vytváří *G. fluitans* nebo *G. declinata*.

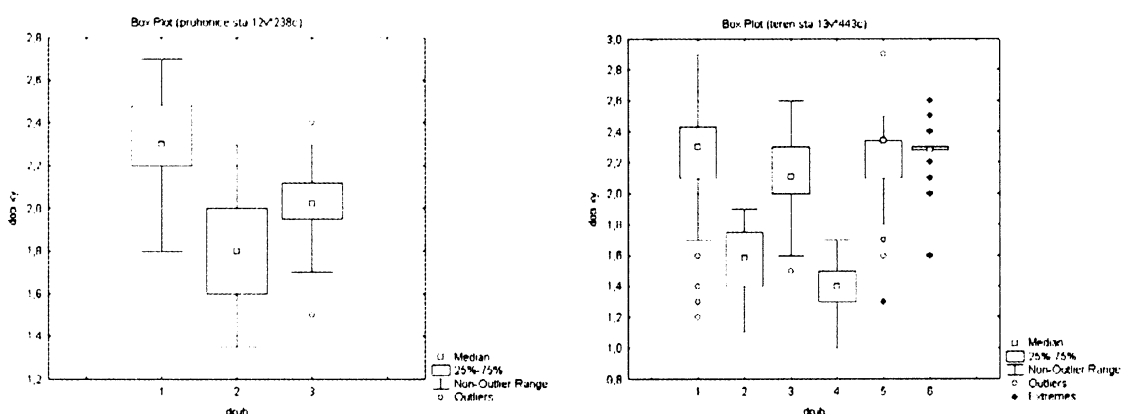
Zhodnocení stálosti rozlišovacích znaků po přenesení rostlin do kultury

Zajímavé výsledky přineslo i srovnání variability rostlin přenesených do kultury s rostlinami z přírody. Bylo potvrzeno, že rostliny si drží své rozlišovací znaky i po přenesení do konstantních podmínek, je tedy možno tvrdit, že tyto znaky jsou stabilní a spolehlivé a determinace by neměla být problematická. Na základě výsledků (nezobrazeny) klasifikační diskriminační analýzy na 15 nejvýznamnějších znacích je možno správně určit 100% (k=30), z populací pěstovaných rostlin pak rovněž 100% rostlin (k=16). Při redukci počtu znaků na 8 procento chybně určených jedinců vzrostlo u přenesených rostlin na 3,2%, rostliny z přírody se i při takto malém počtu znaků odliší 100%. Při chybných určeních se bez výjimky jednalo o chybně zařazený druh *G. declinata*. Hlavní determinační znaky jsou u všech zástupců okruhu *G. fluitans* soustředěny na květních částech. Nejdůležitějším znakem je délka a tvar pluchy, dále pak šířka plušky, tvar plušky

Stálost důležitých determinačních znaků i po přenesení rostlin do jednotných podmínek je zřejmá z diskriminačních analýz, kdy jak na souboru rostlin z terénu tak rostlin pěstovaných nejtěsněji korelují s jednotlivými kanonickými osami tytéž znaky. Následující obrázky jsou vizualizací variability ve vybraných znacích.

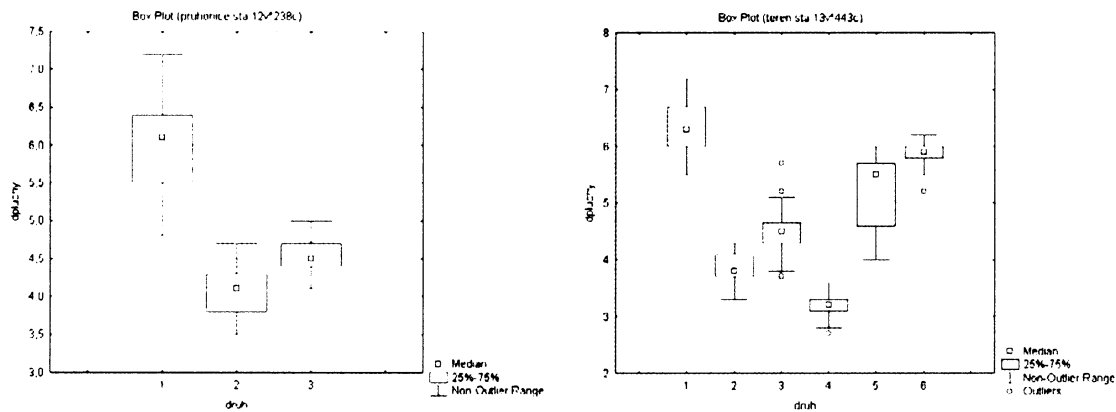
Srovnání variability druhů okruhu *G. fluitans*

Obr. 33– 37 znázorňují úroveň variability v jednotlivých znacích (vlevo rostliny pěstované na experimentální zahradě, vpravo přírodní populace; vybráno několik nejvariabilnějších znaků a znaky důležité pro odlišení druhů). Čísla 1– 6 označují jednotlivé taxony (1- *G. fluitans*, 2- *G. notata*, 3- *G. declinata*, 4 – *G. nemoralis*, 5 – „havranická malá“, 6 – „havranická velká“

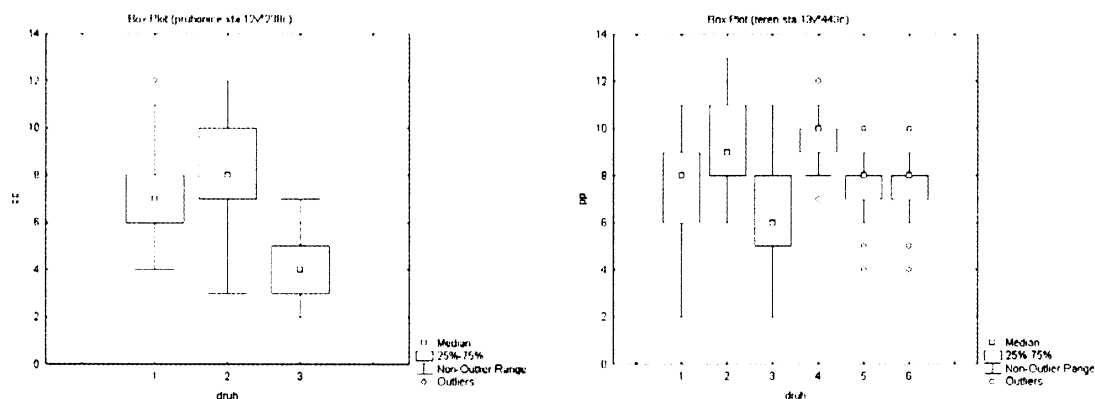


Obr.33 Grafické zobrazení variability délky obilky u rostlin pěstovaných (vlevo) a z přírody (vpravo).

Z obr. 33 je patrné prodloužení obilky u pěstovaných rostlin druhu *G. notata*. Ostatní druhy (*G. fluitans* a *G. declinata*) mají delší obilky i větší variabilitu v tomto znaku v populacích z terénu.

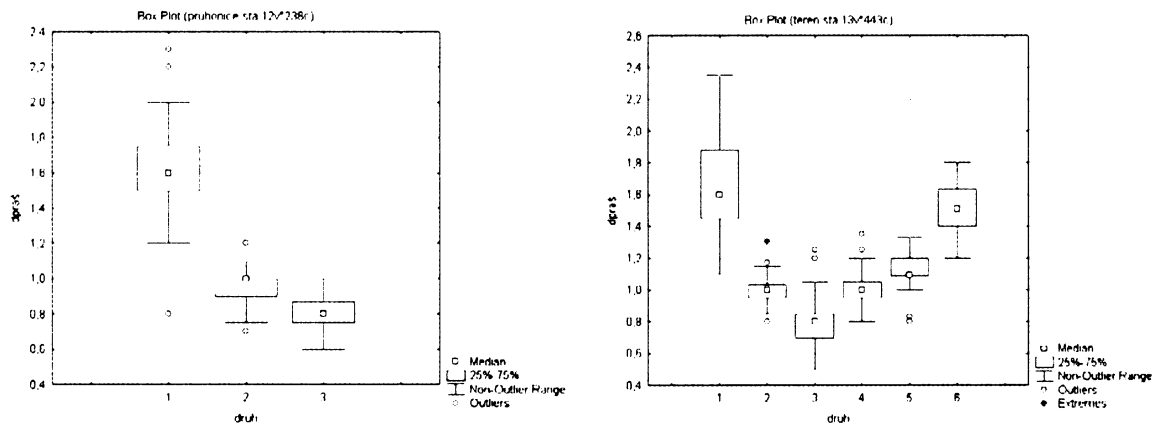


Obr.34 Grafické zobrazení variability délky pluchy u rostlin pěstovaných (vlevo) a z přírody (vpravo).

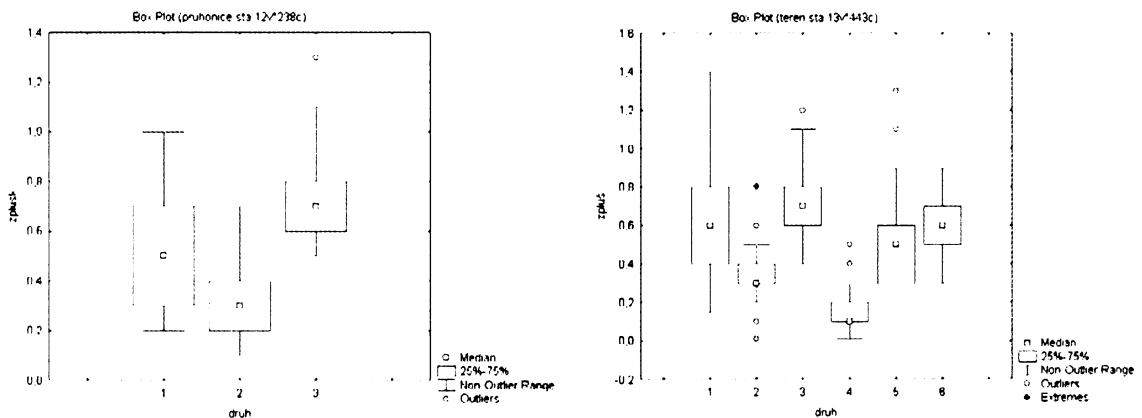


Obr.35 Grafické zobrazení variability počtu pater u rostlin pěstovaných (vlevo) a z přírody (vpravo).

Na obou z dvojice obrázků je patrné odlišení druhu *G. notata* a na pravém obrázku i *G. nemoralis* od ostatních druhů v počtu pater v latě, neboli znaku částečně odrážejícím celkovou délku rostliny. Výrazné oddělení druhu *G. declinata* tomto znaku v pěstovaných rostlinách odpovídá pozorované zhoršené vitalitě tohoto druhu v experimentálních podmínkách.

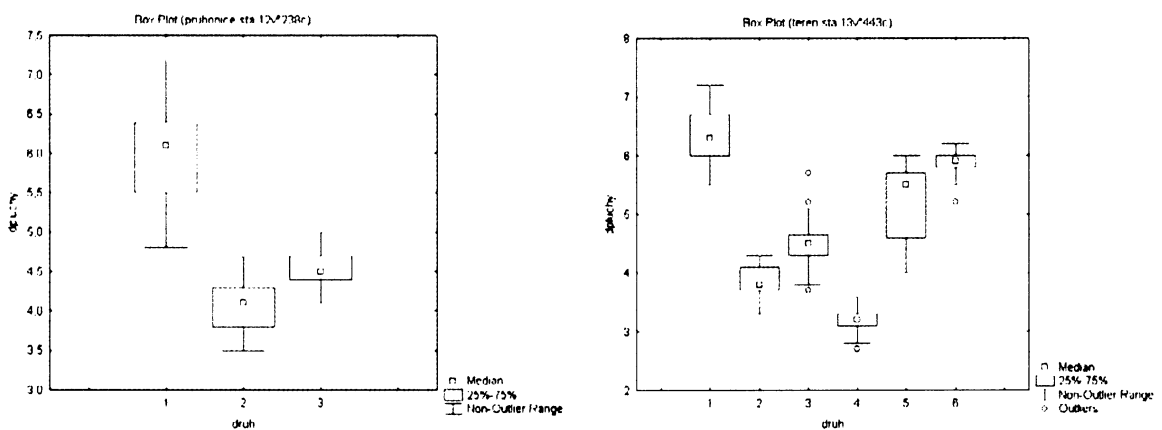


Obr.36 Grafické zobrazení variability délky prašníků u rostlin pěstovaných (vlevo) a z přírody (vpravo).



Obr.37 Grafické zobrazení variability délky zobáku na plušce u rostlin pěstovaných (vlevo) a z přírody (vpravo).

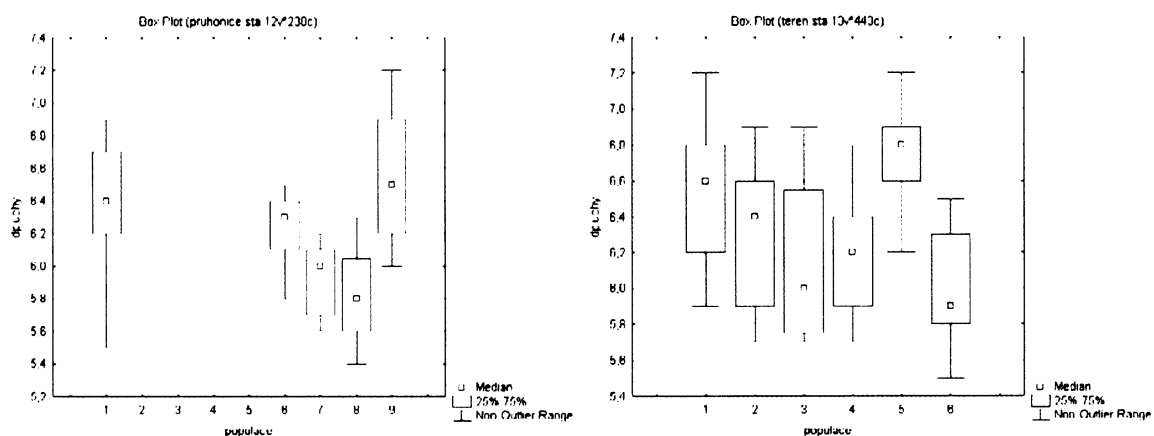
Na obr. 38 je zobrazena mezi- i vnitrodruhová variabilita v jednom z nejdůležitějších determinačních znaků celého okruhu – délky pluchy. Celkově nevelká variabilita v obou souborech je narušena pouze u druhu *G. fluitans*, který vykazuje poněkud větší variabilitu v tomto znaku na rostlinách pěstovaných v jednotných podmínkách. Velkou variabilitu ve svém přirozeném prostředí vykazuje také populace „havranická malá“.



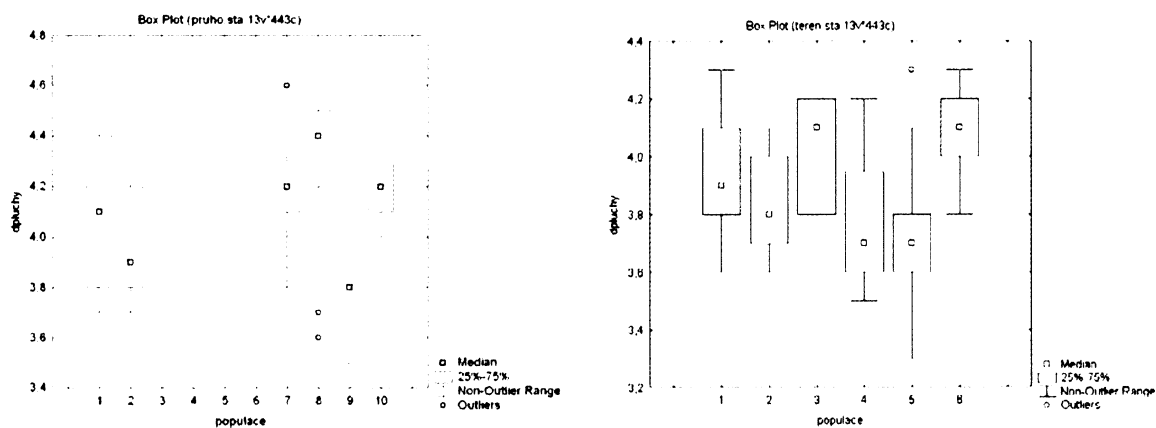
Obr.38 Grafické zobrazení variability délky pluchy u rostlin pěstovaných (vlevo) a z přírody (vpravo).

Porovnání variability pěstovaných rostlin a rostlin z přírodních populací v rámci jednotlivých druhů

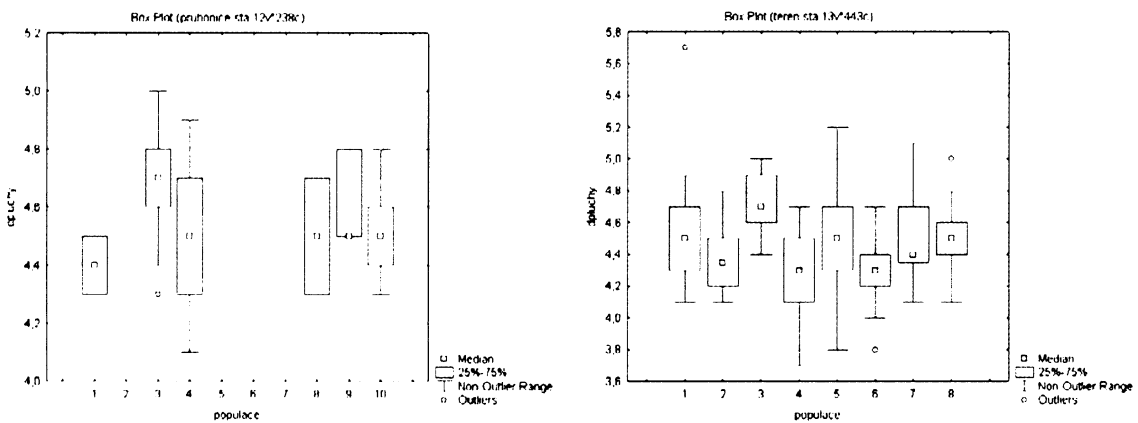
Na obr. 39 je opět zobrazena, tentokrát podrobněji, vnitrodruhová variabilita v hlavním určovacím znaku – délce pluchy (vlevo ze zahrady, vpravo rostliny z přirozených populací) čísla označují číslo populace daného druhu, shodná čísla na obou grafech znamenají shodné populace. Z grafického výstupu programu STATISTICA je zřetelné, že ke snižování vnitrodruhové i vnitropopulační variability s přenesením rostlin do jednotných podmínek nedochází u všech druhů stejně. Zatímco *G. notata* a *G. declinata* vykazují určitou uniformitu rozměrů v přirozeném prostředí po přenesení do jednotných podmínek se vnitro i mezipopulační variabilita nepatrně zvýší, u druhu *G. fluitans* dochází ke snižování variability s přesazením do uniformních podmínek. Příčina tohoto chování by opět mohla být nalezena v rozdílném způsobu rozmnožování uvedených druhů.



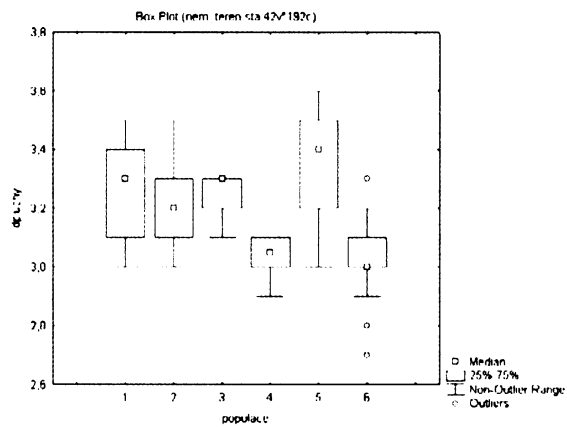
Obr. 39: Zobrazení vnitrodruhové variability u *Glyceria fluitans* na příkladu délky pluchy.



Obr. 40: Zobrazení vnitrodruhové variability u *G. notata* na příkladu délky pluchy.

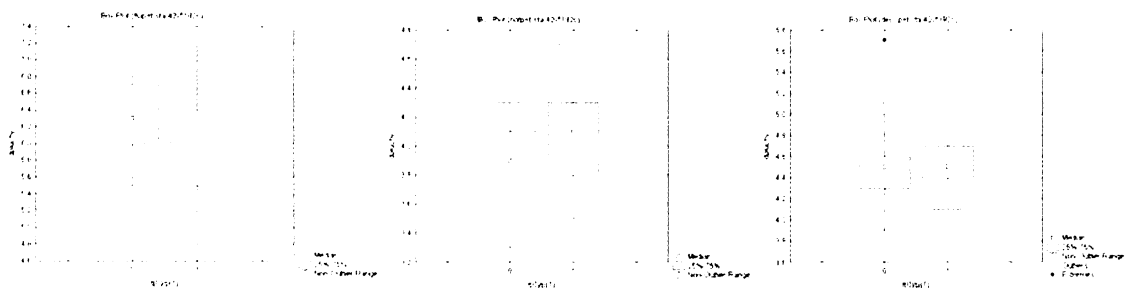


Obr. 41: Zobrazení vnitrodruhové variability u *G. declinata* na příkladu délky pluchy.



Obr. 42: Zobrazení vnitrodruhové variability u *G. nemoralis* na příkladu délky pluchy

Na obr. 43 je ilustrován posun variability mezi rostlinami pěstovanými a z přírody. Zajímavý je trend druhu *G. fluitans*, u něhož dochází s přenosem do shodných podmínek ke zvětšení variability za celkového zmenšení délky pluchy. U druhého tetraploida - *G. notata* - dochází rovněž k mírnému nárůstu variability, a le zároveň i nárůstu velikosti znaku (zde délky pluchy). *G. declinata* vykazuje nejslabší reakci, drobný posun směrem k delším pluchám lze však rovněž zaznamenat.



Obr. 43: Zobrazení variability mezi rostlinami z přírody (0 – levý box plot) a pěstovanými (1 – pravý box plot) na příkladu délky pluchy. Druhy zleva: *G. fluitans*, *G. notata*, *G. declinata*.

Syntéza výsledků ekologických i morfologických analýz

Spojení ekologických charakteristik stanoviště (typ stanoviště, půdní chemismus, výška hladiny, nadmořská výška) s morfologickými charakteristikami jednotlivých rostlin z příslušných populací a následná analýza je jen logickým doplněním předchozích oddělených analýz.

Metodika

Náhodným výběrem 11 rostlin z každé populace s kompletním chemickým rozbohem a změřenými morfologickými znaky (20 lokalit) byl získán datový soubor, který byl otestován v programu Canoco (ter Braak et Šmilauer 2002; DCA morfologických znaků, druhy jako kovariáty). Na základě výsledku bylo rozhodnuto o použití lineárních metod hodnocení variability. Na celém datovém souboru byla provedena RDA (centrovaná a standardizovaná přes morfologické znaky, příslušnost k druhu jako kovariáta). Následovala tatož analýza s využitím datového souboru obsahující informace o typu stanoviště a morfologických znacích, v další analýze pak byla porovnáována stejnou metodikou závislost morfologické variability na chemismu půd.

Výsledky

Na základě RDA se zahrnutím všech faktorů prostředí bylo vysvětleno 34% vnitrodruhové variability (průkaznost $p=0,002$). Při stejné analýze se zahrnutím pouze informací o typu stanoviště bylo vysvětleno 14,4% vnitrodruhové variability s průkazností modelu $p=0,032$. Z analýzy chemických charakteristik stanovišť vychází 20,3% vnitrodruhové variability vysvětlených pomocí tohoto modelu ($p=0,044$). Znamená to tedy, že ač je morfologická variabilita rostlin rodu *Glyceria* do jisté nezanedbatelné míry ovlivněna prostředím, parametry stanoviště nezodpovídají za celou vnitrodruhovou variabilitu jednotlivých druhů a velká část variability je dána reálně existujícími rozdíly na genetické úrovni.

7. Morfologická charakteristika jednotlivých druhů

U kvantitativních proměnných jsou uvedeny následující údaje: (minimum-) 10% kvantil – 90% kvantil (-maximum).

Základní druhy

Glyceria fluitans (L.) R. Brown

(zblochan vzplývavý)

Rostliny zelené, stébla vystoupavá nebo poléhavé, bohatě kořenující v nodech. Délka rostliny (6–)70–105(–130) cm; pochvy listů mírně zploštělé, žilky rovné; jazýček (5,8–)7–13(–15) mm dlouhý, čepele ploché, (5–)7–18(–21) cm dlouhé, široké (3–)3,2–4,9(–6,5) mm, zašpičatělé. Lata (26–)30–47(–50) cm dlouhá, jednostranná, s krátkými i dlouhými větévkami (průměrně 2–3 v patře), obvykle přitisklými k vřetenu laty, řídká, s (5–)7–10(–11) patry. Klásky jsou (9,1–)11,3–18,3(–21) mm dlouhé, špičaté, podlouhlého tvaru, průměrný počet klásků v patře 2–6. Průměrný počet květů v klásku je (4)5–7(–8). Dolní pleva (2,2–)2,3 – 3,9(–4) mm dlouhá, 1–3-žilná, špičatá, horní pleva (3,2–) 3,4–5,3(–6) mm dlouhá, tupá. Plucha podlouhlá, špičatá nebo zašpičatělá s úzkým blanitým lemem 5–7-žilná, (5,9–)6,1–7(–7,2) mm dlouhá, (1,4–)1,6–2(–2,1) mm široká. Pluška (5,7–) 5,7–6,8(–6,9) mm dlouhá (obvykle nápadně kratší než plucha, někdy naopak), podlouhle protažená, 1,1–1,5(–1,6) mm široká, s mělkými zuby (0,2–)0,3–0,6 mm dlouhými. Poměr délky zubů a plušky je (0,03–) 0,05–0,1(–0,15). Prašníky žluté nebo častěji sytě fialové, 1,2–1,8(–1,9) mm dlouhé. Obilka podlouhlá, s rozměry (1,2–)2,1–2,7(–2,9) × (0,3–)0,4–0,9(–0,9) mm.

Glyceria notata Chevall.

syn. *G. plicata* (Fries) Fries.

(z. řasnatý)

Rostliny tmavě zelené až namodralé, stébla vystoupavá, bohatě kořenující v nodech. Délka rostliny (51–)62–88(–96) cm; pochvy listů mírně zploštělé, žilky rovné; jazýček (5,1–)5,9–9,9(–11) mm dlouhý, čepele ploché, zašpičatělé, 6–12 cm dlouhé, široké (2,9–)3,3–5,1(–5,3) mm, v mládí 2x podélně zřasené. Lata (14,5–)19,5– 26,5(–27,5) cm dlouhá, všestranná, bohatá, s dlouhými i krátkými 3–4 větévkami (v dolních patrech větévky nápadně

prodloužené), po odkvětu doširoka rozestálými, jinak vzpřímenými. Klásků je mnoho, průměrně (3–)4–9(–12) v jednom patře, jsou (11–)12–16(–17) mm dlouhé, špičaté, podlouhlého tvaru s (5,86–)6,4–8,4(–9,7) květy. Dolní pleva (1,3–)1,5–2,2(–2,4) mm dlouhá, špičatá; horní pleva (2,4–)2,7–3,3(–3,5) mm dlouhá, tupá. Plucha široce eliptická, na vrcholu zaoblená, ale častěji zvlněná, někdy i s nápadnými zuby, (3,6–)3,7–4,15(–4,3) mm dlouhá, (1,8–)1,9–2,4 mm široká. Pluška je (3,1–)3,3–3,8(–3,9) mm dlouhá, obvykle kratší než plucha, zaoblená, s nevýraznými zuby dlouhými (0,2–)0,2–0,4(–0,5) mm. Šířka plušky je (0,8–)1,1–1,55(–1,9) mm. Prašníky žluté, (0,8–)0,9–1,1(–1,2) mm dlouhé. Obilka obvejčitá s rozměry (0,9–)1,1–1,7(–1,9) × 0,5–0,9 mm.

***Glyceria declinata* Bréb.**

(z. zoubkatý)

Rostliny až namodrale zelené, stébla obloukovitě vystoupavá, často volně trsnatá. Délka rostliny (45–)50–80(–85) cm; pochvy listů mírně zploštělé, žilky rovné; jazýček (4,1–)5,2–8,2(–8,8) mm dlouhý, čepele ploché, (4–)5–8(–8) cm dlouhé, široké (2,8–) 3,1–4,4(–9,5) mm, kápoité. Lata (14–)16–27(–35) cm dlouhá, jednostranná, řídká, s dlouhými větévkami, obvykle přitisklými k vřetenu laty. Klásky jsou (8,9–)10,6–15,9(–16,5) mm dlouhé, podlouhlého tvaru, často nachově zbarvené. Dolní pleva 1,7–2,6(–2,8) mm dlouhá, špičatá, horní pleva (2,4–)2,9–3,6(–4,1) mm dlouhá, elipticky vejčitá. Plucha podlouhle vejčitá, obvykle na vrcholu výrazně (3–)5-zubá, 7-žilná, (4,1–)4,2– 4,9 mm dlouhá, 1,8–2,5 mm široká. Pluška (4–)4,2–4,8(–5,2) mm dlouhá (obvykle nápadně přesahující pluchu), podlouhle protažená (0,9–)1,1–1,8(–1,9) mm široká, hluboce rozeklaná, s (0,4–)0,4– 0,9(–1,2) dlouhými zuby. Prašníky žluté nebo častěji fialové, (0,7–)0,7–1(–1,3) mm dlouhé. Obilka podlouhle obvejčitá (0,9–)1,9–2,4(–2,6) × (0,3–)0,8–1,2 mm.

***Glyceria nemoralis* (Uechtr.) Uechtr. et Körnicke**

(z. hajní)

Rostliny žlutozelené, stébla vystoupavá, bohatě kořenující v nodech. Délka rostliny (78–) 94–109,9(–117,7) cm; pochvy listů mírně zploštělé, žilky na pochvách nápadně zvlněné; jazýček 2,8–6(–8,2) mm dlouhý, čepele ploché, (9–)18–24(–25) cm dlouhé, (1,8–)3,3–4,8(–5,7) mm široké, zašpičatělé. Lata 19–30(–33) cm dlouhá, všestranná, hustá, s dlouhými větévkami, obvykle rozestálými. Klásky jsou bledě až žlutozelené (6)7–15 mm dlouhé, špičaté,

podlouhlého tvaru. Dolní pleva (-1,4)1,6-2,1(-2,2) mm dlouhá, tupá, horní pleva (1,7-)2,2-2,9(-3,2) mm dlouhá, tupá. Plucha široce eliptická až uťatá, s nestejně dlouhými žilkami (4 kratší, 3 delší; někdy tento znak chybí), (3-)3-3,4(-3,5) mm dlouhá, (1,1-)1,3-1,8(-2,1) mm široká. Pluška (2,8-)3-3,4(-3,4) mm dlouhá (obvykle přesahuje pluchu), podlouhle protažená, 0,8-1,2(-1,4) mm široká, téměř nerozdělena do zubů. Prašníky žluté (0,6-)0,8-1,2(-1,35) mm dlouhé. Obilka podlouhle obvejčitá (1-)1,1-1,4(-1,7) × (-0,4)0,5-0,8(-0,8) mm.

Taxonomicky obtížně definovatelné typy

„havranická malá“

Rostliny tmavě zelené, sivé nebo až namodralé, stébla vystoupavá nebo poléhavá, bohatě kořenující v nodech. Délka rostliny (40-)55-100(-115) cm; pochvy listů mírně zploštělé, žilky rovné; jazýček (5-)5,5-11(-13) mm dlouhý, čepele ploché, (5-)7-14(-19) cm dlouhé, široké (3,2-)3,5-4,8(-5,6) mm, s kápoovitou špičkou. Lata (16-)19-40(-51) cm dlouhá, jednostranná, řídká se (4)5-10 patry, se 2-3 krátkými i dlouhými větvkami, obvykle přitisklými k vřetenu laty. Klásků bývá průměrně 2-5 v patře s (4-)5-7(-9) květy. Klásky jsou (9-)11,5-16,5(-19,13) mm dlouhé, podlouhlého tvaru. Dolní pleva 1,7-4,6(-4,7) mm dlouhá, špičatá, horní pleva (2,5-)2,5-4,3(-4,5) mm dlouhá, špičatá. Plucha podlouhlá, úzká, se 5-7 nápadnými zoubky na vrcholu (obr. v přílohách), 7-9-žilná, (4-)4,1-5,9(-6) mm dlouhá, 1,9-2,6(-2,7) mm široká. Pluška (4,3-)4,4-5,6(-5,7) mm dlouhá (často nápadně delší než plucha), podlouhle protažená (2,75-)3-3,8(-4,5) mm široká, s mělkými zuby dlouhými (0,2-)0,3-0,5(-0,6). Poměr délky zubů a plušky je 0,3-1,1(-1,3). (Prašníky (0,7-)0,8-1,25(-1,3) mm dlouhé. Obilka podlouhle obvejčitá (0,7-)1,6-3,2(-4,4) × (0,2)0,7-1(1,1) mm.

„havranická velká“

Rostliny zelené až nasivělé, stébla vystoupavá, bohatě kořenující v nodech. Délka rostliny (62-)70-102(-120) cm; pochvy listů mírně zploštělé, žilky rovné; jazýček (3)4-13(15) mm dlouhý, čepele ploché, (8-)13-23(-26) cm dlouhé, široké (2,83-)3,2-4,4(-4,9) mm, zašpičatělé. Lata (22-)24-45(-50) cm dlouhá, jednostranná, velmi řídká se (4-)6-8(-10) patry, se 2-3 dlouhými i krátkými větvkami, obvykle přitisklými k vřetenu laty. 2-4 klásky v patře jsou (12,59-)14,5-22,1(26,9) mm dlouhé, podlouhlého tvaru. Dolní pleva (1,7-)2-3,1(-3,2) mm dlouhá, 1-3-žilná, špičatá, horní pleva (2,6-)3,4-4,4- (4,6) mm dlouhá, tupá.

Plucha podlouhlá, se 3 nápadnými zoubky na vrcholu (obr. v přílohách), 7-žilná, (5,2–)5,5–6,1(–6,2) mm dlouhá, (1,9–)2–2,5(–2,7) mm široká. Pluška (4,8–)5,2–5,8(–5,9) mm dlouhá (obvykle nápadně delší než plucha), podlouhle protažená (1,4–)1,4–1,8(–2) mm široká, s mělkými zuby (0,35–)0,4(–0,45) mm dlouhými. Prašníky žluté nebo fialové (1,2–)1,27–1,7(–1,8) mm dlouhé. Obilka podlouhle obvejčitá (1,6–)2,1–2,5(–2,6) × (0,6–)0,8–1 mm.

8. Diskuse

Předkládaná práce si klade za cíl zhodnocení ekologické, genetické a morfologické variability blízce příbuzných druhů z okruhu *Glyceria fluitans*. Byly využity moderní biosystematické metody (průtoková cytometrie, morfometrika zhodnocená mnohorozměrnými statistickými analýzami, izozymová analýza) a kombinace různých ekologických metod k vyhodnocení stanovištních charakteristik.

Nalezené rozdíly v charakteru jednotlivých druhů a jejich populací je možno uvést do souvislosti s rozdílnými způsoby rozmnožování. Zatímco u druhů *G. fluitans*, *G. notata* a *G. declinata* jsou známy dílčí informace o jejich reprodukčních způsobech, na způsob rozmnožování druhu *G. nemoralis* lze vzhledem k neexistenci relevantních údajů usuzovat pouze z pozorování charakteru populací (pravděpodobně převažuje vegetativní rozmnožování pomocí dlouhých nadzemních výběžků, které byly pozorovány na rostlinách v kultuře). Na druhou stranu, podle charakteru populací *G. declinata* (často jednotlivé rostliny vtroušené do porostu jiných druhů) lze usuzovat na převážně generativní způsob rozmnožování. Pouze ve velmi příhodných podmínkách (například pozvolný narušený okraj rybníka) má *G. declinata* tendence vytvářet bohatý porost pravděpodobně tvořený z velké části rametami. K doplnění kusých informací o reprodukčních systémech taxonů sekce *Glyceria* přispěla analýza isoenzymů. Srovnávací morfometrické analýzy naznačily, že řada morfotypů (jimž je občas přisuzována taxonomická hodnota - subsp. *poiformis*, var. *islandica*; viz kapitola úvod) mohou být spíše projevy fenotypové plasticity aniž by byly zakotveny v genotypu. Na druhou stranu izozymové analýzy naznačily velmi nízkou genotypovou variabilitu spolu s nízkou heterozygotitou. Tento pattern může být vysvětlen převažujícím klonálním růstem.

V souvislosti s charakterem stanovišť *G. declinata* by bylo vhodné najít metodický přístup, který by zodpověděl otázku o jeho primárním typu biotopů (vyskytuje se na antropogenních stanovištích). Tento problém se samozřejmě netýká pouze uvedeného druhu, příkladů může být mnohem více (*Bellis perennis*, tento archeofyt, pravděpodobně kdysi osidloval naprosto odlišná stanoviště; Tutin et al. 1976). V případě *G. declinata* by se mohlo jednat o přirozeně narušovaná místa (místa na břehu tůní rozšlapaná zvěří, podmáčená místa v rozvolněných lučních porostech apod. Z literárních údajů nejsou známa žádná přirozenější stanoviště, na nichž by se v současné době vyskytovala (z východní části areálu, kde je potenciálně vyšší naděje na zachovaná původní stanoviště údaje chybí).

Zcela poprvé byla stanovena hodnota absolutní velikosti genomu pro druhy *G. notata*, *G. declinata* a *G. nemoralis*: 1Cx-hodnoty \pm směrodatné odchylky byly stanoveny následovně:

G. notata 0,69±0,08 pg, *G. declinata* 0,54 ±0,05 pg, *G. nemoralis* 0,83±0,007 pg, „havranická velká“ 0,74±0,008 pg a 0,65±0,002 pg „havranická malá“. Mnoho prací z posledních let (např. Knight et al. 2005, Vinogradov 2003) se zabývá hypotézou o souvislostech mezi absolutní velikostí genomu a šíří ekologické amplitudy a úspěšnosti druhů v osidlování nových stanovišť. Z uvedených prací vyplývá, že druhy s velkými genomy mívají obvykle sníženou schopnost rychlé kolonizace nových lokalit, jsou méně kompetičně zdatné a častěji se objevují na seznamech ohrožených druhů v lokálním i celosvětovém měřítku. Tyto hypotézy podporují i výsledky analýz velikosti genomu okruhu *G. fluitans* – druh *G. nemoralis*, s největším absolutním obsahem DNA, je skutečně nejméně rozšířeným druhem jak na území České republiky tak celosvětově, není znám jeho sekundární výskyt a variabilita stanovišť, na nich bývá nalézán, je velmi nízká. Druh s nejnižší absolutní velikostí genomu by podle výše uvedené teorie měl mít největší areál a vysoký kolonizační potenciál, to však naráží na polyploidní původ dvou zbývajících druhů (*G. notata*, *G. fluitans*). *G. fluitans* a *G. notata* naopak zjevně odpovídají i v jiných případech pozorovanému trendu o větší kolonizační úspěšnosti polyploidních taxonů (Stebbins 19741, Soltis et Soltis 2000, Urfus 2006, Rauchová 2007). Druh *G. declinata* má však nesporně kolonizačně-invazní potenciál, což se v poslední době potvrzuje např. v rámci sekundárního výskytu invazního charakteru v Kalifornii (Rogers 1998, Witham 2003).

Isoenzymové studie mohou být také užitečnou pomůckou při hledání původu polyploidních taxonů (úspěšnost vyhodnocení isoenzymů se s vyššími ploidiemi rapidně snižuje, přičemž v praxi bývá tato metoda úspěšná nejvýše na úrovni tetraploidní; Mahy et al. 2000). Identifikace přírodních polyploidů bývá ovšem poměrně obtížná. Autopolyploidní rostliny nesou několik kopií téhož genomu, proto je lze identifikovat na základě tetrasomické dědičnosti (případně polysomické dědičnosti u polyploidů vyššího řádu), jež je pro tetraploidní organismy typická (funguje převážně u mladých polyploidů, u starších lze narazit na problematiku funkční diploidizace; Briggs et Walters 2001). Tento postup je přesnější a účinnější než starší cytogenetické práce a pomohl odhalit autopolyploidní původ u několika rostlinných druhů (např. Soltis et Rieseberg 1986, Ehrendorfer et al. 1996, Mahy et al. 2000). Allopolyploidní rostliny se naopak spíše vyznačují disomickou dědičností. Samotná genetická data, založená jen na jednom nebo několika málo lokusech, mohou být ovšem zavádějící. Při rozhodování o autopolyploidním či allopolyploidním původu jsou důležitá i cytogenetická data, jako je tvorba multivalentů a bivalentů během meiózy. Avšak nejvhodnějším přístupem pro studium výše uvedené problematiky jsou nesporně moderní přístupy založené na studiu

molekulárních markerů (kombinace jaderného a chloroplastového genomu, metoda GISH a podobně).

Do studia genetické variability bylo zařazeno 116 rostlin z 57 populací všech druhů. Celková genetická variabilita zachycená analýzou isoenzymů byla velmi nízká, jen s obtížemi bylo možno vysledovat rozdíly ve variabilitě diploidních a tetraploidních druhů. Celkově byla frekvence heterozygotů vyšší u tetraploidních druhů. Převažovaly ovšem monomorfní lokusy, pouze u druhů *G. fluitans* a *G. declinata* byly všechny lokusy alespoň u jednoho jedince heterozygotní. Druh *Glyceria nemoralis* byl ve všech sledovaných systémech uniformní, nebyla nalezena ani jedna vzácná alela ani jiná odchylka, a tak lze získané pattern interpretovat jako fixovanou homozygotitu (nutno ještě v budoucnu potvrdit), což podporuje výše uvedenou hypotézu o možném výskytu autogamie v rámci klonálních populací.

Pouze u *G. fluitans* a rostlin z havranické populace lze s jistotou očekávat allogamické rozmnožování. Avšak problematiku reprodukčních způsobů u rostlin z okruhu *G. fluitans* je nezbytné podrobit dalšímu testování a využít další molekulární markery pro její plné zodpovězení. Většina zástupců čeledi *Poaceae* se vyznačuje relativně malým množstvím morfologicky hodnotitelných znaků, proto představuje předkládaná práce nesporný přínos pro determinaci skupiny taxonů kolem *G. fluitans*. Morfometrické analýzy, do nichž bylo zahrnuto 684 jedinců z 41 populací, potvrdily dobrou diferenciaci jednotlivých druhů. Byla potvrzena vhodnost používání determinačních znaků na květech, které nejsou stanovištními charakteristikami ovlivněny do té míry, že by docházelo k jejich překryvu a tím znehodnocení jejich využití. Kromě potvrzení stávajících hlavních determinačních znaků vedly výsledky morfometrických analýz i terénního pozorování k odhalení několika znaků, které v klíčích nebývají zvažovány jako významné, protože se povětšinou jedná o znaky kvalitativní, ale mohou napomoci k úspěšné determinaci. Jedná se o celkový vzhled rostlin, hustou vs. řídkou latu (hustou latu mají *G. notata* a *G. nemoralis*, řídkou naopak *G. fluitans* a *G. declinata*) často nápadnou sivou barvu *G. declinata*, naopak žlutozelenou barvu *G. notata*. Jediným druhem, který lze bez obtíží určit i ve sterilním stavu je *G. nemoralis* - díky zvlněným žilkám na pochvě nejspodnějších listů.

Mezi nejpozoruhodnější výsledky patří nalezení 2 morfologicky atypických populací na havranickém vřesovišti, pracovníčně řazených do druhu *G. fluitans*. Podařilo se již potvrdit odlišnou absolutní velikost genomu obou typů oproti pravděpodobně příbuznému druhu *G. fluitans* i mezi sebou navzájem. Získané výsledky (cytometrická a morfometrická data) potvrzují hybridní původ obou populací. Jak již bylo výše zmíněno, hybridizace u této skupiny je relativně vzácná a v případě havranické populace se navíc pravděpodobně jedná o

zpětné hybridy (introgresanty), což činí z obou havranických populací unikátní nález a oběma populacím bude i nadále věnována zvýšená pozornost.

Vzájemný rozdíl získaných absolutních velikostí jaderného genomu populací „havranická malá“ vs. „havranická velká“ (obě populace jsou tetraploidní) činí 15,4 %; rozdíl „havranická velká“ vs. *G. fluitans* 6,1 %; „havranická malá“ vs. *G. fluitans* 8,8 %. Rostliny nalezené v havranické populaci se i morfologicky velmi nápadně odlišovaly od tetraploidního druhu *G. fluitans*, k němuž byly zpočátku přiřazeny.

Zatímco interpretace subpopulace s absolutní velikostí genomu $1Cx = 0,744$ pg, tedy větší než u *G. fluitans* ($1Cx = 0,701$ pg), bude vyžadovat podrobnější studium, u rostlin s velikostí genomu $1Cx = 0,645$ pg lze v souvislosti s jejich intermediárními morfologickými znaky (např. délka a tvar pluchy viz kapitola morfologie) uvažovat o hybridním původu. Velikost genomu ($2C=2,58$ pg) totiž odpovídá velikosti genomu hypotetického zpětného křížence *G. declinata* ($1Cx = 0,544$ pg) × *G. fluitans* ($1Cx = 0,701$ pg; $2C$ „havranické malé“ se rovná $1Cx$ *G. declinata* + $3 \times 1Cx$ *G. fluitans*). Také ověřený počet chromozomů – $2n=40$ odpovídá uvedené hypotéze.

V rozsáhlé studii okruhu *G. fluitans* z Velké Británie z 50. let 20. století Borrill (1956b) uvádí hypotézu o autopolyploidním, případně segmentálně allopolyploidním vzniku druhu *G. notata*, která je založena na studiu párování chromozomů (jako pravděpodobný předek je v této práci označen *G. declinata*). Borrill však neměl k dispozici údaje o druhu *G. nemoralis*, jehož západní hranice rozšíření prochází území České republiky a dále na západ se nevyskytuje. Výsledky analýz absolutní velikosti genomu podporují teorii o allopolyploidním původu *G. notata* ($2C = 2,764$ pg) s rodičovskými taxony *G. declinata* ($2C = 1,09$ pg) a *G. nemoralis* ($2C = 1,65$ pg). Tato hypotéza je nepřímo potvrzena také intermediárním postavením morfologických znaků mezi pravděpodobnými rodičovskými druhy *G. declinata* a *G. nemoralis* (viz kapitola morfometrika).

Pro definitivní důkaz správnosti této hypotézy bude nutno využít nejmodernější molekulární metody (ITS, mikrosatelity, GISH). Z posledních let (Stace 1984) je výskyt křížence *G. fluitans* × *G. declinata* uváděn z oblasti Cambridge ve Velké Británii. Do budoucna je předpokládáno porovnání položek těchto rostlin s havranickými rostlinami a další spolupráce s britskými botaniky.

Pozoruhodné výsledky poskytlo i srovnání variability rostlin pěstovaných v umělých podmínkách s rostlinami z přirozených populací. Bylo zjištěno, že nejdůležitější rozlišovací znaky jednotlivých taxonů se uchovávají i po delší kultivaci v kontrolovaných podmínkách. Je tedy možno tvrdit, že získané determinační znaky jsou stabilní, spolehlivé a lze je plně využít

při určování taxonů. Na základě výsledků klasifikační diskriminační analýzy na 8 nejvýznamnějších znacích je možno správně určit 100%, z populací pěstovaných rostlin pak téměř 97% rostlin. Hlavním determinačním znakem v okruhu *G. fluitans* je tedy potvrzena délka a tvar pluchy, dále pak šířka plušky, délka prašníků. K překryvům dochází jen výjimečně, nejčastěji ve tvaru pluchy u druhů *G. notata* a *G. declinata*, což může vést k problematickému určení. Záměna *G. notata* a *G. nemoralis* vyplývá spíše ze vzácnosti *G. nemoralis*, a tudíž nízké frekvenci, s níž je možno tento taxon spatřit než z nedostatku dobrých determinačních znaků (zvlněné žilky na pochvě, střídání krátkých a dlouhých žilek na pluše atd.). Výstupy této práce lze velmi dobře prakticky využít - ať už při determinaci rostlin v přírodě (existence velmi dobrých determinačních znaků) tak pro další zhodnocení naměřených znaků - k rozlišení druhů lze s úspěchem použít znaky naměřené na pěstovaných rostlinách.

9. Závěr

1. Na základě studia stanovištních charakteristik a dalších ekologických faktorů byla potvrzena hypotéza o odlišných ekologických nárocích a šíři spektra stanovišť jednotlivých druhů rodu *Glyceria*. Prokázány byly odlišné nároky i s ohledem na chemismus půd – odlišné nároky na pH, obsah kationtů a obsah fosforu a dusíku. Druhy se širší ekologickou amplitudou, tetraploidní druhy *G. fluitans* a *G. notata*, se vzájemně liší v ekologickém optimu (stojatá vs. tekoucí voda), diploidní druhy spíše odlišuje reakce na přítomnost fosforu a kationtů a povaha stanoviště.
2. Zcela poprvé byla stanovena hodnota absolutní velikosti genomu pro jednotlivé druhy sekce *Glyceria*. Velikost genomu je v kombinaci s ostatními stanovenými charakteristikami plně využitelným markerem pro determinaci taxonů skupiny. Rovněž se na úrovni absolutní velikosti jaderného genomu signifikantně odlišily morfologicky atypické populace z havranického vřesoviště od zbývajících taxonů a od sebe navzájem.
3. Výsledky morfometrických analýz potvrdily signifikantní odlišení druhů. Jednotlivé druhy jsou jasně diferencované a liší se rozpětím variability. Nejvariabilnější jsou tetraploidní druhy *G. fluitans* a *G. notata*.
4. K nejpřekvapivějším výsledkům patří nález 2 morfologicky atypických populací na havranickém vřesovišti (u Znojma), prozatím řazených k taxonu *G. fluitans*. Rozdíly v absolutních velikostech jaderného genomu i morfologických znacích potvrdily odlišnost těchto populací od všech zástupců rodu *Glyceria* známých z území České republiky. Pro definitivní důkaz o původu těchto rostlin však bude nutno využít dalších molekulárních metod (např.: sekvenování ITS, mikrosatelity, GISH).
5. Pravděpodobný původ allotetraploidního taxonu *G. notata* rovněž naznačila kombinace cytometrických a morfometrických analýz (podobně jako u havranických rostlin je nezbytné následné ověření molekulárními metodami).
6. Ze srovnání ekologické a morfologické variability vyplývá potvrzení hypotézy o vyšší adaptabilitě tetraploidních druhů a tím i vyšší míře variability. Tetraploidní druhy si i po přenesení do experimentálních podmínek uchovávají poměrně vysokou míru variability, zatímco diploidní *G. declinata* ztrácí ve většině znaků značnou část variability.

10. Abstract

The presented thesis aims to clarify relationship between morphological variability and ecological differences in the group of closely related wetland species - *Glyceria fluitans* group.

Glyceria fluitans group is a complex of closely related taxa that differ, besides ploidy level, also in their European area of distribution and frequency of occurrence. Their distribution areas overlap in the Czech Republic. Some differences in reproductive systems were known for this group thanks to work of English botanist Martin Borrill (Borrill 1956a,b, 1958a,b). Frequency of occurrence seems to correlate with ploidy level, tetraploids (*G. fluitans* and *G. notata*) being the more frequent while diploids (*G. declinata* and *G. nemoralis*) occur rarely. The theses has attempted to reveal which environmental conditions and characteristics of individual species may be connected to their performance and whether their morphological variation correlates with their ecological amplitude.

The species under study showed differences in habitat range (polyploids having more than one ecological optimum), soil reaction (*G. fluitans* preferring lower pH whereas *G. notata* occurs in alkaline, K⁺ rich soils), soil trophic levels (the occurrence of *G. nemoralis* seems to correlate closely with the presence of phosphorus in the soil – unlike *G. declinata*, which prefers soils low in nutrients), and in species composition of plant communities (this reflects the differences in preferred habitats). Among diploids *G. declinata* inhabits secondary habitats, contrary to *G. nemoralis*, while tetraploids differ in their preference of either running or stagnant water. Although *G. declinata* is distributed sparsely in its native area of distribution, it was currently found spreading as an invasive plant in parts of California.

Using very efficient method of flow cytometry, the nuclear genome size was established for the first time for most members of this group. Differences in nuclear genome size among diploids were found – unlike in tetraploids, which are indistinguishable. The results are consistent with studies showing that species with larger genomes tend to be limited in their distribution and range of ecological environments they can occupy (*G. nemoralis*, with the highest 1Cx value, is the rarest species in this group).

A biosystematic approach (DAPI and propidium-iodide flow cytometry, chromosome counting using rapid squash techniques, isoenzyme analyses and multivariate morphometrics)

was employed together with measurements of environmental factors such as soil chemistry, plant species community.

Frequency of occurrence, morphological variation and ties to abiotic environmental factors were compared in order to assess the influence of various environmental factors on the main characteristics of each species.

Multivariate statistics shed some light on the main differences among the studied species. Two taxa with previously unknown morphology were found on one location in the vicinity of Znojmo (southern Moravia). As the flow cytometry analyses revealed major differences in these two taxa nuclear genome size unlike any interspecies variation found among the rest of the other 600 plants it is thought to be somewhat different from the rest of the *Glyceria fluitans* group. When morphological differences were found to support the flow cytometry results, a hybrid origin of at least one of these taxa was proposed.

The possibility of allotetraploid origin of *Glyceria notata* was proposed as well as it carries intermediate morphological characteristics of the two possible parents – the diploids *G. nemoralis* and *G. declinata*. Although the cytometry analyses support this hypothesis we were unable to obtain a verification by the means of isoenzyme analyses. Therefore employment of molecular techniques such as AFLP or ITS is needed in order to solve this matter without any doubts.

11. Seznam použité literatury

- APG II. 2003.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of Linnean Society* 141:399-436
- Boček, P.(1987):** Analytická kapilární izotachoforéza. Academia Praha, p.133
- Borrill, M. (1956a):** A biosystematic study of some *Glyceria* species in Britain. 1. Taxonomy. –*Watsonia*, 3 p.291-298
- Borrill, M. (1956b):** A biosystematic study of some *Glyceria* species in Britain. 2. Cytology. – *Watsonia*, 3 p.299-306
- Borrill, M. (1958a):** A biosystematic study of some *Glyceria* species in Britain. 3. Biometrical studies. – *Watsonia*, 4 p.77-88
- Borrill, M. (1958b):** A biosystematic study of some *Glyceria* species in Britain. 4. Breeding systems, fertility relationships and general discussion. – *Watsonia*, 4 p.89-100
- Bradshaw, A. D. (1965):** Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. – *Advances in Genetics* 13: 115–155.
- Brochman C., et Elven, R.(1992).** Ecological and genetic consequences of polyploidy in Arctic *Draba*. *Evolutionary trends in Plants*, 6: 111-123.
- Carvill, P. H. (1974):** *Glyceria declinata* Bréb. and *G. x pedicellata* in Co. Dublin. – *Irish Naturalists' J.*, 18: 23
- Carvill, P. H. (1975):** *Glyceria declinata* Bréb. and *G. x pedicellata* in Co. Dublin. – *Irish Naturalists' J.*, 18: 203
- Conert, H. J. (1992):** 55. *Glyceria* R. Brown. – In: Hegi G. (ed.), *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, 1/3: 440-457 – Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg.
- Cronk, J.K., Fennessy, M.S. (2001):** *Wetland Plants: Biology and Ecology*. 462 pp. CRC Press, Boca Raton, FL
- Church, G. L. (1949):** A cytotaxonomic study of *Glyceria* and *Puccinellia*. – *Amer. J. Botany*, Lancaster, 36: 155-165.
- Chytrý, M., Kučera, T. Kočí, M. [eds.] (2001):** *Katalog biotopů České Republiky*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. Praha.
- Chytrý, M. et Tichý, L. (2003):** Diagnostic, constant and dominant species of vegetation classes and alliances of the Czech Republic: a statistical revision – *Folia*, Masaryk University, Brno
- Chytrý, M. et Rafajová, M. (2003):** Czech National Phytosociological Database: basic statistics of the available vegetation-plot data. *Preslia, Praha*, 75: 1–15.

- Dančák, M. (2002):** *Glyceria striata* – a new alien grass species in the flora of the Czech republic. – Preslia, Praha 74: 281 – 289.
- Debussche, M., Thompson, J.D. (2003):** Habitat differentiation between two closely related Mediterranean plant species, the endemic *Cyclamen balearicum* and the widespread *C. repandum*. Acta Oecologica Volume 24, Issue 1. 35-45
- Dědina, J. a kol. (1987):** Vybrané metody analytické atomové spektrochemie. Čs. spektroskopická společnost, Praha.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. [eds.] (2007):** Flow cytometry with plant cells - Wiley-VCH, Weinheim.
- Dostál, J. (1950):** Květena ČSR III. – Přírodovědecké nakladatelství, Praha: 1971 - 1974
- Dostál, J. (1954):** Klíč k úplné květeně ČSR. – Praha: 1060 - 1062
- Dostál, J. (1982):** Seznam cévnatých rostlin květeny československé. – Pražská bot. zahrada Praha-Troja.
- Dostál, J. (1989):** Nová květena ČSSR. – Academia, Praha
- Dostál, J. et Červenka, M. (1992):** Velký klíč na určování vyšších rostlín II. – Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava: 1380 - 1382
- Ehrenberger, F., Gorbach, S. (1973):** Methoden der organischen Elementar- und Spurenanalyse. Verlag Chemie, Weinheim.
- Ehrendorfer, F. [ed.] (1973):** Liste der Gefäßpflanzen Mitteleuropas. Ed. 2. - G. Fischer, Stuttgart.)
- Fitzpatrick, J. M. (1946):** A cytological and ecological study of some British species of *Glyceria*. – New Phytologist, Vol. 45, No.1: 137 - 144
- Glowacki, Z. et Celinska E. (1996):** Distribution of *Glyceria declinata* and *G. x pedicellata* (Poaceae) in middle-eastern Poland. – Fragmenta Floristica et Geobotanica, 41(2): 582-584.
- Hermann, F. (1938).** Die deutschen *Glyceria* Arten. - Hercynia, Halle, 1:272-273.
- Hermann, F. (1956):** Flora von Nord- und Mitteleuropa. -Stuttgart.
- Holub, J. (1960):** *Glyceria declinata* Bréb. – Nový druh československé květeny. Preslia 32: 341 – 359.
- Holub, J., Měsíček, J., Javůrková, V. (1970):** Chromosome counts – *Glyceria nemoralis* – Folia Geobotanica et Phytotaxonomica 5: 361 - 368
- Holub, J. (1980):** *Glyceria* R. Br. – In: Tutin T. G. et al. [eds.] – Flora Europaea 5: 179-181, Cambridge Univ. Press, Cambridge.

- Hradílek, Z. et al. (1992):** Index herbariorum czechoslovacorum. – Pr. Odb. Přír. Věd. Vlast. Muz. Olomouc č. 37.
- Hrančík, P. (2005):** Rozšíření druhů rodu *Glyceria* v České republice. – MS., Dipl. Pr. UJEP Olomouc.
- Hubbard, C. E. (1942):** The collective species *Glyceria fluitans*. – The Journal of Ecology, Cambridge, 30: 233
- Idestam-Almquist, J. et Kautsky, L. (1995):** Plastic responses in morphology of *Potamogeton pectinatus* L. to sediment and above-sediment conditions at two sites in the northern Baltic proper. – Aquatic Botany 52: 205–216.
- Jansen et Wachter (1931):** Floristische aantekeningen. *Glyceria* II. - Nedertl. Kruidk. Arch., Amsterdam, 1931:575 - 579.
- Kirschner, Jan et al. (2000):** Analýza isoenzymů v populační biologii rostlin. Průhonice
- Kopecký, K. (1972):** Das *Glycerietum nemoralis-plicatae*, eine neue Assoziation des *Sparganio-Glycerion-* Verbandes – Folia Geobotanica et Phytotaxonomica 7: 47 - 52
- Krahulec, F., Marhold, K., Schmid, B. (1999):** Ecology of closely related plant species: An introduction. – *Folia Geobotanica* 34: 1-5
- Kubát, K. (2002):** Klíč ke květeně České republiky – Academia, Praha.
- Löve, Á. (1951):** Taxonomical evaluation of polyploids. – Caryologia, 3: 262–284
- Leach, S. J. et al. (1987):** *Glyceria declinata* Bréb. in Northern Ireland. – Irish Naturalists' J., 22: 261 - 262
- Levin, DA (1975)** Minority cyotype exclusion in local plant populations. Taxon 24:35–43
- Levin, D. A. (1983):** Polyploidy and novelty in flowering plants. – The Amer. Natur. 122: 1–25.
- Levin, D. A. (2002):** The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press, New York, New York, USA
- Lewis, W. H. (1980):** Polyploidy in species populations. – In: Lewis W. H. (ed.): Polyploidy. Biological relevance, p. 103–144, New York et London.
- Mahy, G., Bruederle, L.P., Connors, B., Van Hofwegen, M. & Vorsa, N. (2000):** Allozyme evidence for genetic autopolyploidy and high genetic diversity in tetraploid cranberry, *Vaccinium oxycoccos* (Ericaceae). Amer. J. Bot. 87: 1882–1889.
- Matthews, D. J., Gallagher, T. F., Otte, M. L. (2005):** Genetic variation in zinc-tolerant populations of *Glyceria fluitans*. - Aquatic Botany 82, 157–167
- Maude, P. F. (1939):** Chromosome studies in some British plants. – New. Phytol., 39: 17 - 32

- Miner, B. G., Sultan, S. E., Morgan, S. E., Padilla, D. K. et Relyea, R. A. (2005):** Ecological consequences of phenotypic plasticity. – *Trends Ecol. Evol.* 20(12): 685–692.
- Mirek, Z. et Zaluski, T. (1986):** *Glyceria declinata* Bréb. (Gramineae) in Poland, distribution and habitats. – *Acta Soc. Bot. Pol.*, 55(3): 505-516.
- Monar, I. (1972):** Analyseautomat zur simultanen Mikrobestimmung von C, H und N. *Mikrochimica Acta*, p.784
- Moore, P.D., Chapman, S. B. (1986):** *Methods in Plant Ecology.* Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Moravec, J. a kol. (1995):** Rostlinná společenstva České republiky a jejich ohrožení, – Severočeskou Přírodou, příl. 1995, Litoměřice.
- Murphy, J., Riley J. P. (1962):** A modified single solution method the determination of phosphate. - *Analytica chimica Acta*, 27(1):31-36
- Olsen, R. S.(1954):** Estimation for available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate.U.S.Dept.Agric.Stat.,No.939
- Olsen, R. S.(1982):** Phosphorus in: A.L.Page et al. (ed): *Methods in Soil Analysis, Part 2, Agronomy series 9, ASA, Madison, Wisconsin*, pp.403-430.
- Prokudin, J. N. et al. (1977):** Zlaky Ukrainy. – Naukova Dumka, Kiev.
- Rauchová J. (2007):** Karyologická, fenetická a genetická diferenciace českého subendemického taxonu *Campanula gentilis* Kovanda. – Ms. [Dipl. práce, depon. In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Rogers, D. C. (1998):** Aquatic macroinvertebrate occurrences and population trends in constructed vernal pools in Folsom, California. In Witham, C., Bauder, E.T., Belk, D.,
- Roshevits, R. Yu. (1980):** Grasses – An introduction to the study of fodder and areal grasses. – Indian National Scientific Documentation centre, New Delhi
- Sculthorpe, C. D. (1967):** *The biology of aquatic vascular plants.* – Edward Arnold, London.
- Soltis, D. E. et Soltis P. S. [eds] (1989):** *Isozymes in plant biology.* Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Soltis, D. E. et Soltis P. S. (1999):** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. – *Tree* 14: 348–352.
- Soltis, P. S. et Soltis D. E. (2000):** The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7051–7057.
- Soltis, D. E, Soltis P. E. & Tate J. A. (2004):** Advances in the study of polyploidy since plant speciation. – *New Phytol.* 161: 173–191.

Stace, C. A. (2000): Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. – *Taxon* 49: 451–477.

Stace, C. A. (1984): Chromosome numbers in British plants, 7. *Watsonia* 15:33

Stebbins, G. L. (1950): Variation and Evolution in Plants (Columbia Univ. Press, New York).

Stebbins, G. L. (1971): Chromosomal evolution in higher plants. – London.

Stojanov, N. et Stefanov, B. (1948): Flora Balgarija. 3. ed. Sofija

Takhtajan, A. (1996): Diversity and Classification of Flowering Plants. – New York.

Tanksley, S. D. et Orton, T.J [eds.] (1983): Isozymes in plant genetic and breeding, part A, B. Elsevier, Amsterdam.

ter Braak, C. J. F. et Smilauer, P (2002). Canoco reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, New York.

Tutin, T. G. et al (1976): *Bellis* L. . – In: Tutin T. G. et al. [eds.] – *Flora Europea* 4: 111-112, Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Tzvelev, N. N. (1976): Zlaki SSSR. – Izdatelstvo Nauka, Leningrad.

Uechtritz, R. et Körnicke, F. (1866): *Glyceria nemoralis*, eine noch unbeschriebene Grassart Schlesiens. - *Bot. Zeitung*, 24: 121-124.

Urfus, T. (2006): Zdroje variability u *Hieracium pilosella* L. – Ms. [Dipl. práce, depon. In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].

Walters, S. M. (1959): *Heleocharis austriaca* Hayek and *Glyceria declinata* Bréb., two plants new to the flora of Poland. – *Fragmenta Floristica et Geobotanica*, Ann. V., pars 2: 241 - 244

Wells, C et Pigliucci, M. (2000): Heterophylly in aquatic plants: considering the evidence for adaptive plasticity. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* 3:1-18

Wendel, J. F. (2000): Genome evolution in polyploids. – *Pl. Mol. Biol.* 42: 225–249.

Zbiral, J. (1995): Analýza půd, jednotné analytické postupy. SKZÚZ, Brno.

URL:

Witham, Carol (2003):

(URL:http://www.cal-ipc.org/ip/management/plant_profiles/Glyceria_declinata.php).

Poslední přístup dne 29.4.2009

Seznam příloh

Příloha 1 - Měřené znaky

Příloha 2 - Tvary pluch *G. fluitans*, „havranická velká“

Příloha 3 - Tvary pluch, *G. declinata* a „havranická malá“

Příloha 4 - Tvary žilek na pochvě spodních listů (*G. fluitans* - vlevo, *G. nemoralis* - vpravo)

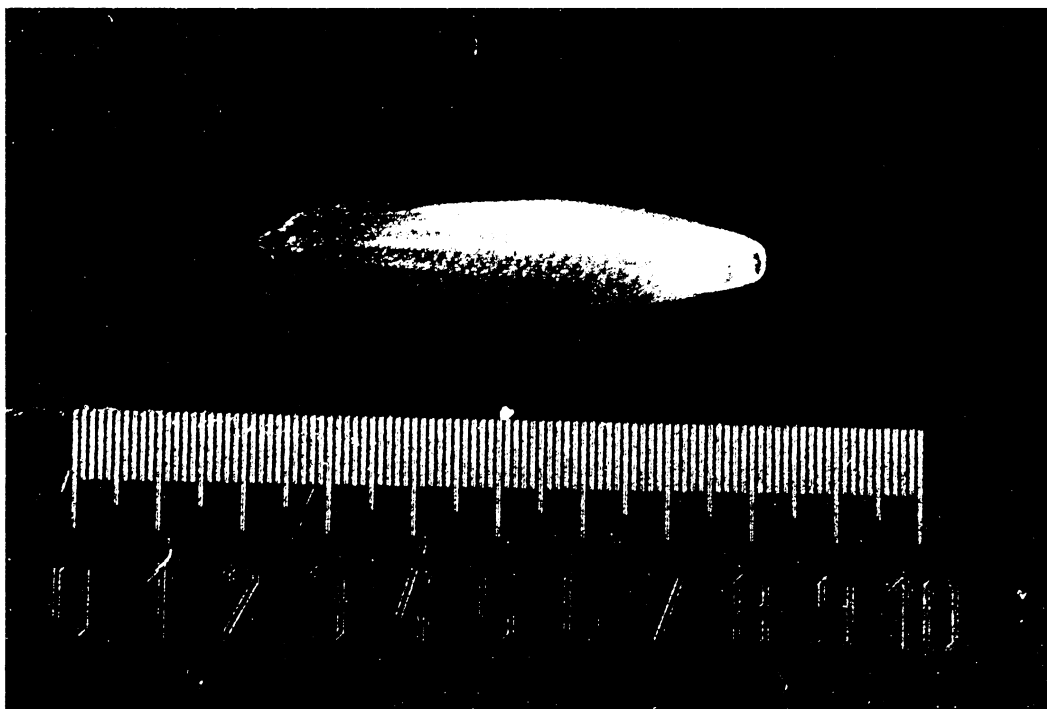
Příloha 5 - Chromozómová figura

Příloha 6 - Seznam lokalit

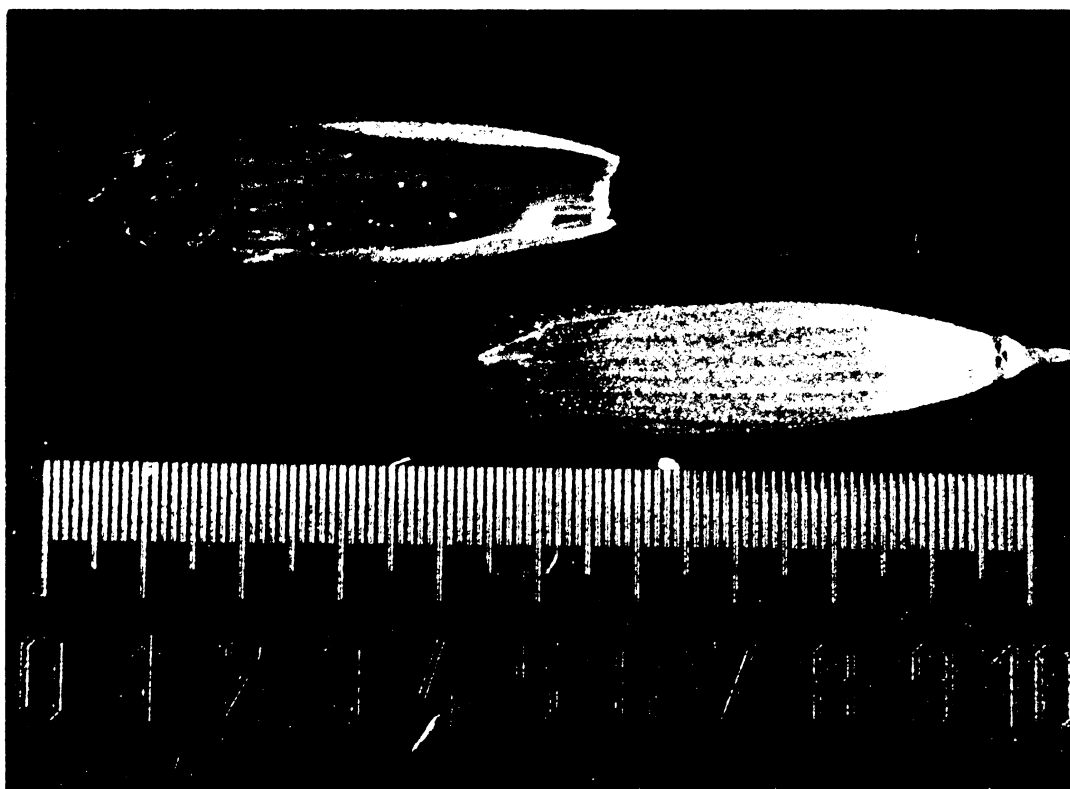
Tab.: Přehled měřených morfologických znaků

(* znaky pro pěstované rostliny; ** znaky pro sběry z terénu; tučně vyznačeny silně korelované znaky - vždy ten z dvojice, který byl z analýz vyřazen)

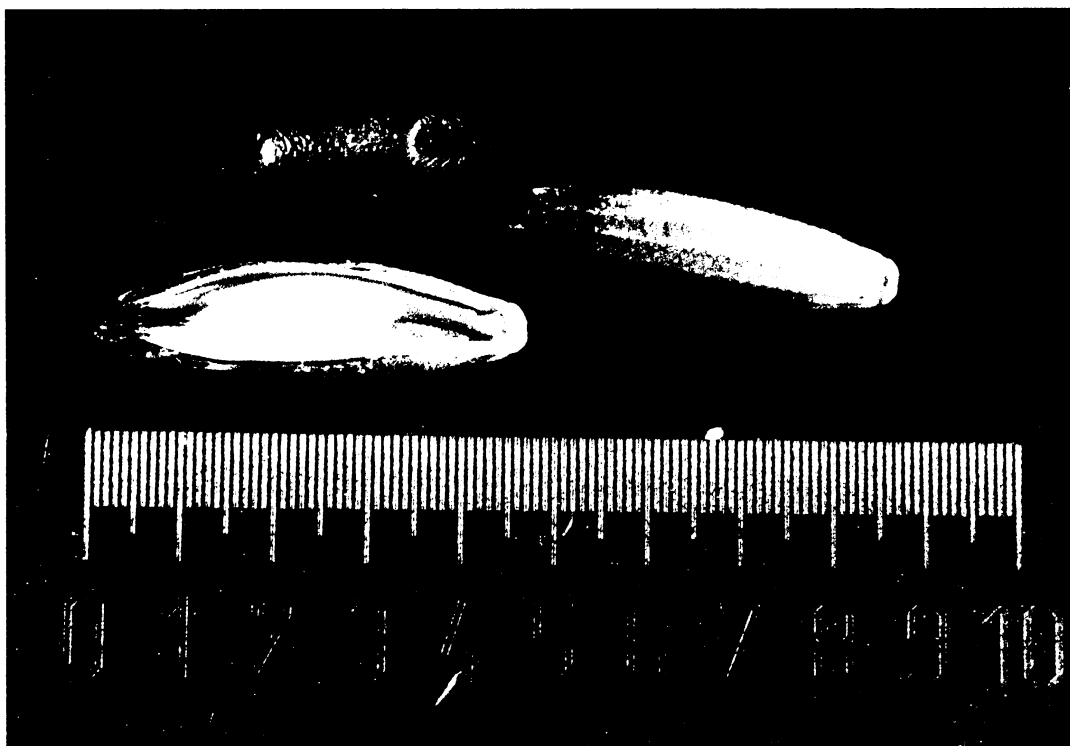
kód SAS (50)**	Název znaku	kód SAS (41)*	kód SAS (50)**		kód SAS (41)*
v4	počet pater	v4	v28	délka horní plevy	v19
v5	počet větví 1. patro	v5	v29	délka pluchy	v20
v6	počet větví 2. patro	v6	v30	šířka pluchy	v21
v7	počet větví 3. patro	---	v31	poměr délka / šířka pluchy	v22
v8	počet větví 4. patro	---	v32	poměr šířka /délka pluchy	v23
v9	počet větví 5. patro	---	v33	tvar pluchy	v24
v10	průměrný počet větví	v7	v34	délka plušky	v25
v11	průměrná délka větví 1.p	v8	v35	šířka plušky	v26
v12	max-min délky větví v 1.p	v9	v36	poměr délka / šířka plušky	v27
v13	průměrná délka větví 2.p	v10	v37	poměr šířka /délka plušky	v28
v14	max-min délky větví v 2.p	v11	v38	délka prašníku	v29
v15	průměrná délka větví 3.p	v12	v39	barva prašníku	v30
v16	max-min délky větví v 3.p	v13	v40	délka obilky	v31
v17	průměrná délka větví 4.p	---	v41	šířka obilky	v32
v18	max-min délky větví 4.p	---	v42	poměr délka / šířka obilky	v33
v19	průměrná délka větví 5.p	---	v43	poměr šířka / délka obilky	v34
v20	max-min délky větví v 5.p	---	v44	zuby na plušce	v35
v21	počet klásků v 1. patře	v14	v45	poměr délka zubů/délka plušky	v36
v22	počet klásků v 2.patře	v15	v46	délka plušky/poměr délka zubů	v37
v23	počet klásků ve 3. patře	v16	v47	délka rostliny	v38
v24	počet klásků ve 4. patře	---	v48	délka laty	v39
v25	počet klásků v 5. patře	---	v49	délka rostliny/délka laty	v40
v26	průměrný počet klásků	v17	v50	délka laty/délka rostliny	v41
v27	délka dolní plevy	v18			



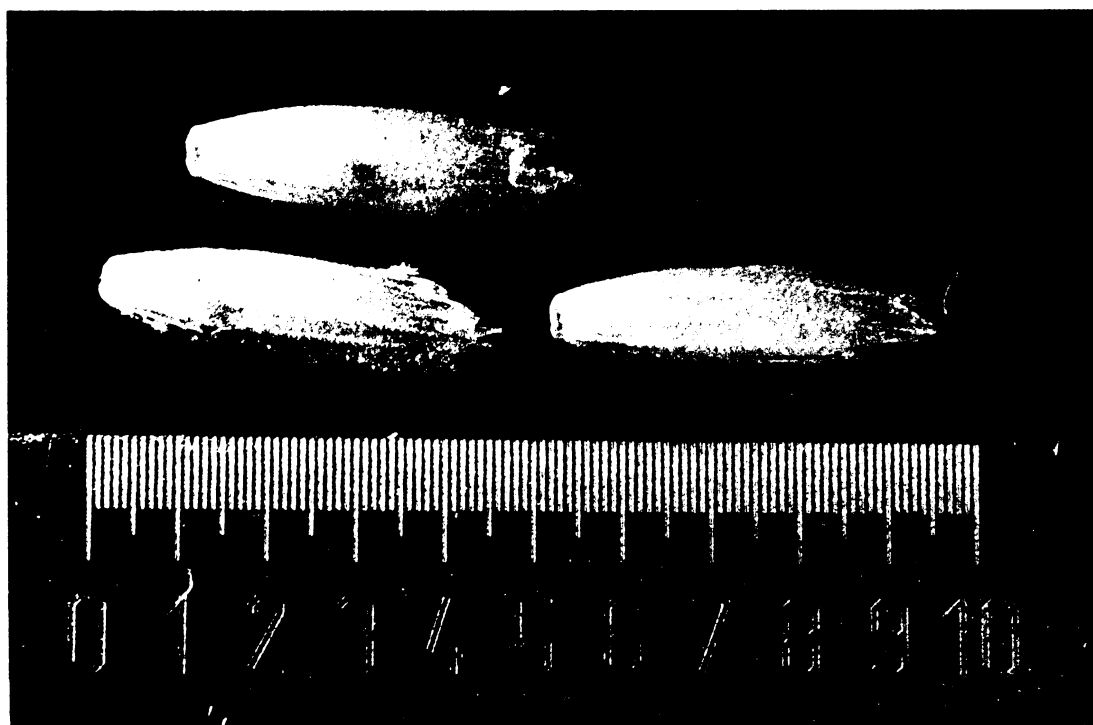
Tvar pluchy *G. fluitans*



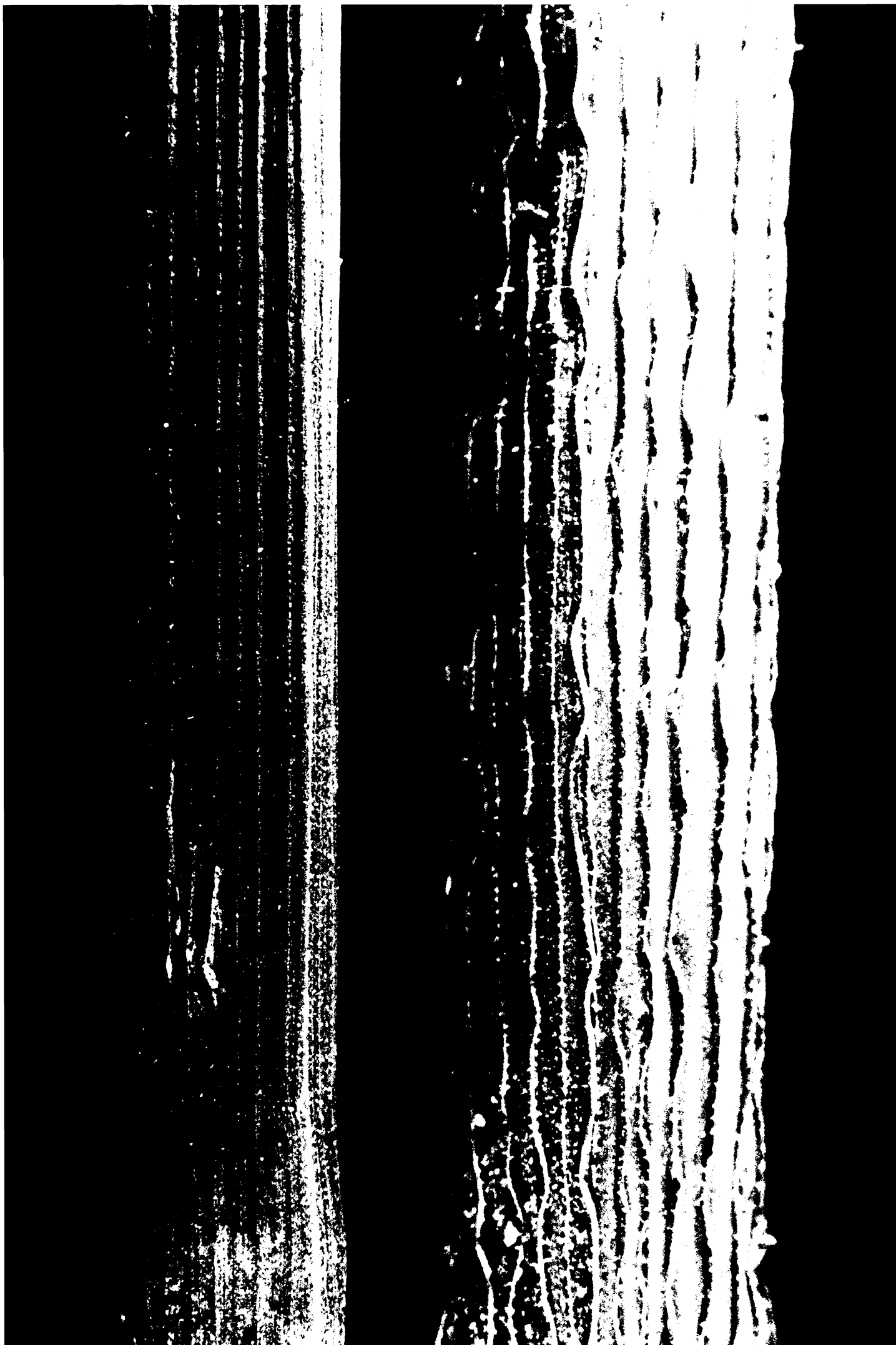
Tvar pluchy „havranická velká“



Tvar pluchy, plušky a obilka *G. declinata*



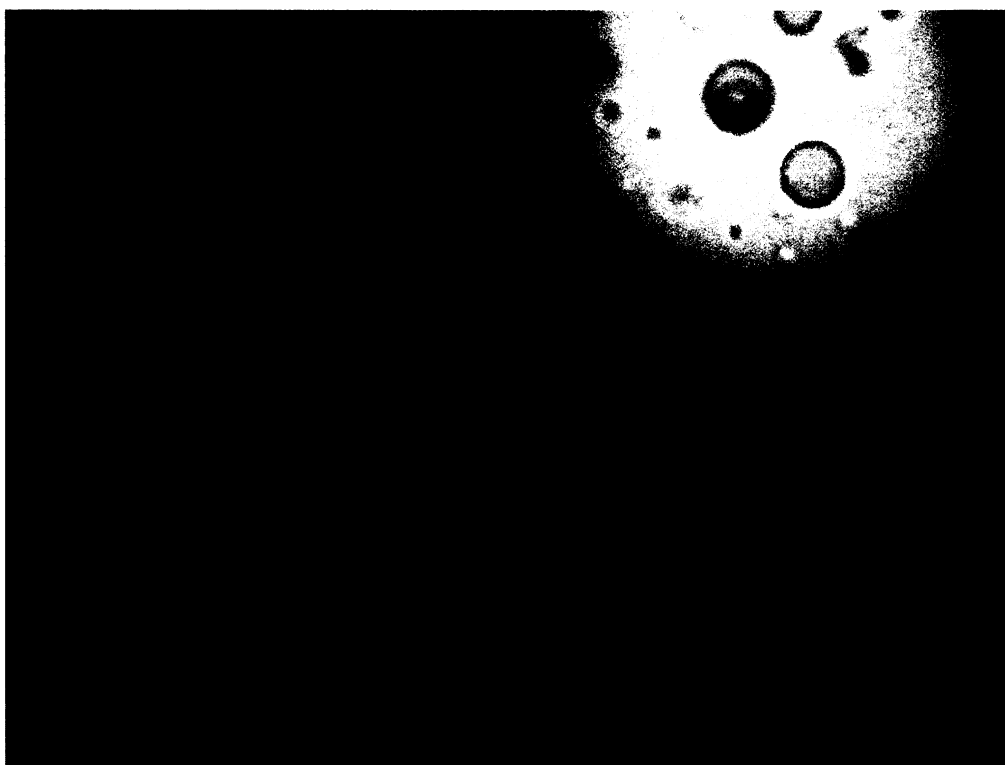
Tvar pluchy "malý havran"



Chromozómy



Glyceria notata, $2n = 40$ (foto V. Jarolímová)



Glyceria declinata, $2n = 20$ (foto V. Jarolímová)

PŘÍLOHA

Lokalita

Glyceria fluitans

lokalita	GPS		stanoviště	datum sběru	geomorfologický celek	nadmoř. výška (m n. m.)
Sedloňov B	50°20'23,2	16°18'24,6	mokřina u silnice	25/6/2006	Orlické hory	640
Řevničov	50°08'57,8	13°50'07,6	lesní cesta	11/7/2006	Křivoklátská vrchovina	440
Rožd'alovic ko	50°17'0,54	15°12'30,5	strouha u silnice	6/8/2007	Polabská nížina	230
Ratiboř	49 °22'23,6	17 °54'54,6	rybník	18/7/2006	Bílé Karpaty	370
Havířov	49°48'24,8	18°26'23,9	rybník	3/8/2007	Ostravská pánev	250
Pískovna	48°53'31	14°41'52	obnaž. dno	26/7/2007	Třeboňsko	502
Pihulík	49°02'14	14°46'23	obnaž.dno	26/7/2007	Třeboňsko	431
Zadní Sax	49°09'44,3	14°45'38,7	příkop	28/7/2007	Třeboňsko	421
Černická obora	49°17'22,3	14°33'14,2	rybník	28/7/2007	Třeboňsko	474
Štěpková	49°20'56,5	17°52'26,1	lesní cesta	18/7/2006	Hostýnsko-vsetínská hornatina	450
Štěpková nem	49 °20'15,8	17 °52'40,6	potok	18/7/2006	Hostýnsko-vsetínská hornatina	450
Slavkovský les	50°01'07,4	12°42'57,6	potok	14/6/2007	Slavkovský les	450

Glyceria notata

Kamenné Žehrovice	14°1'22.3	50°8'23.8	břeh rybníka	24/5/2007	Džbán	440
Semetín	17° 55'42,9	49°19' 54,5	rybník	10/07/08	Hostýnsko- vsetínská hornatina	430
Hrubá Vrbka	54°15'858	06°81'704	strouha	25/6/2006	Bílé Karpaty	272
Pilský rybník	50°7'6.178	13°52'40.4	strouha	11/07/06	Džbán	360
Čilá	49°57'38.03	13°44'32.6	rybník	09/08/07	Křivoklátsk á vrchovina	350
Zákop	15°36'38.5	50°24;33.2	lesní cesta	3/7/2008	Jičínská pahorkatina	300
Řevničov	13° 50'07,6	50°08'57,8	příkop	30/5/2007	Džbán	441
Dubičná	50°36'58.6	14°21'2.6	příkop u silnice	13/7/2006	České středohoří	290
Rakovec	49°16;03.4	16°36'20.8	mokřina u rybníka	2/6/2008	Bobravská vrchovina	317

Glyceria declinata

Kunratice u Frýdlantu	50°55'41.4	15°00'49.2	pastvina	22/6/2008	Frýdlantská pahorkatina	294
Havraníky vřesoviště	49°49'04.3	15°59'56,9	mokřina	22/7/2008	Dyjsko- svratecký úval	321
Mšec	50°10'35.9	13°5256.2	mokřina u les. cesty	10/08/07	Křivoklátská vrchovina	420

Mníšek	49°01'49,6	14°55'05,3	strouha	26/7/2007	Křivoklátská vrchovina	450
Marunka	49°18'35,6	14°33'33,7	lesní cesta	28/7/2007	Třeboňsko	496
Roztoky	50°01'18,4	13°52'05	návesní rybník	09/08/07	Křivoklátská vrchovina	293
Čilá	49°57'38.03	13°44'32.6	rybník	09/08/07	Křivoklátská vrchovina	350
Dubičná	50°36'58.6	14°21'2.657	příkop silnice	u 13/7/2006	České středohoří	290
Havraníky (obec)	48°48'52.9	16°0'15.89	rybník		Dyjsko- svratecký úval	290
Zákop	50°24'33.2	15°36'38.5	lesní cesta	3/7/2008	Podkrkonoší	300

Glyceria nemoralis

Konojedy	50°37'17	14°21'13,2	mokřina rybníka	u 13/7/2006	České středohoří	307
Semetín potok	49°19'53,8	17°55'42,8	potok	10/07/08	Hostýnské vrchy	430
Štěpková potok	49°20'15,8	17°52'40,6	potok	07/10/08	Hostýnské vrchy	450
Mrklov (Benecko)	50°38'16.8	15°34'00.7	mokřina potoka	u 03/07/08	Krkonošské podhůří	730
Rakovec	49°16'03.4	16°36'20.8	mokřina rybníka	u 2/6/2008	Bobravská vrchovina	317
Dědov	50°33'37.3	16°10'59.8	potok	/07/08	Broumovská vrchovina	580