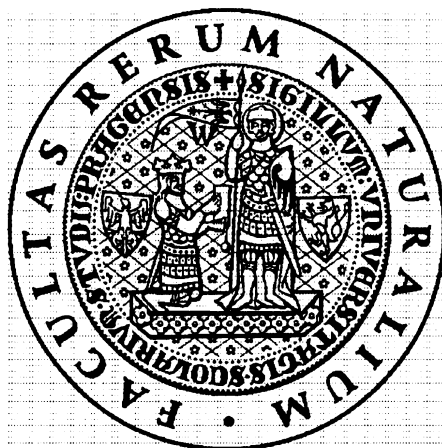


Magisterská diplomová práce



Fylogeografie a šíření stulíku žlutého (*Nuphar lutea*)

Phylogeography and dispersal of *Nuphar lutea*

Bc. Vojtěch Zeisek

Školitel: Mgr. Tomáš Fér, Ph.D.

Katedra botaniky
Přírodovědecké fakulty
Univerzity Karlovy v Praze
Benátská 2, Praha 2, 128 01

zeisek@natur.cuni.cz, <http://www.natur.cuni.cz/~zeisek/cs>

Praha, 2009

Diplomová práce **Vojtěcha Zeiska** byla obhájena na katedře botaniky PŘF UK v Praze dne 22.9.2009 a ohodnocena klasifikačním stupněm **v ý b o r n ě**.

Obsah

Obsah	7
Seznam obrázků	10
Seznam tabulek	11
0.1 Prohlášení	12
0.2 Poděkování	13
0.3 Abstrakt	14
0.3.1 Klíčová slova	14
0.4 English summary	15
0.4.1 Keywords	16
1 Úvod	17
1.1 Otázky	18
2 Literární rešerše	21
2.1 Biogeografie	21
2.1.1 Biogeografie a vodní rostliny	22
Způsoby studia šíření rostlin	23
2.1.2 Využití molekulárních markerů, fylogeografie	23
Mikrosatelity (SSRs)	24
Statistické zpracování dat	25
Klonalita, vodní rostliny a mikrosatelity	25
2.1.3 Postglaciální historie	26
2.2 Fylogeografie, vodní rostliny a říční síť	27
2.2.1 Antropogenní vlivy	28
2.3 Stulík žlutý (<i>Nuphar lutea</i> (L.) Sm.)	29
3 Metodika	31
3.1 Sběr vzorků v terénu	31
3.2 Klonální struktura populací	37
3.3 Laboratorní zpracování vzorků	40
3.4 Vyhodnocení primárních dat	42
3.5 Klíčení oddenkových úlomků	44
3.6 Klíčivost semen	46

4	Výsledky	49
4.1	Molekulární analýzy	49
4.1.1	Klonální struktura populací	52
4.1.2	Klony nalezené v různých populacích	56
4.1.3	Analýza molekulární variance (AMOVA)	57
4.1.4	Shlukování jedinců podle PCoA	61
4.1.5	Bayesiánské shlukování	67
4.1.6	Shlukování podle programu Structure	67
4.1.7	Vztah genetické a geografické vzdálenosti	78
4.2	Klíčení oddenkových úlomků	83
4.3	Klíčivost semen	83
5	Diskuze	85
5.1	Klonální struktura populací	86
5.2	Semena, oddenkové úlomky a šíření stulíku	87
5.2.1	Klíčivost semen	87
5.2.2	Plovatelnost semen a šíření v říčním systému	88
5.2.3	Oddenkové úlomky jako možný dispersní agens	89
5.3	Vztahy mezi populacemi	91
5.3.1	Genetická diferenciacce jednotlivých populací a oblastí	91
5.3.2	Geografická vzdálenost a genetická podobnost	93
5.3.3	Možné šíření vodními ptáky	94
5.4	Zobecnění	95
6	Závěr	97
	Literatura	109
A	Přehled lokalit	111
A.1	Povodí Odry	111
A.2	Povodí Moravy	111
A.2.1	Morava	111
A.2.2	Dyje	112
A.2.3	Kyjovka	112
A.3	Povodí Labe	112
A.3.1	Lužnice	112
A.3.2	Nežárka	113
A.3.3	Berounka	113
A.3.4	Ohře	113
A.4	Brusel, Belgie	113
B	Použitý software	115

C Protokoly	117
C.1 Izolace DNA (CTAB)	117
C.2 PCR	118
C.3 Přesrážení mikrosatelitových produktů	119
C.3.1 Přesrážení jednotlivých vzorků	119
C.3.2 Přesrážení v platu do sekvenátoru	120
D Primární data	123

Seznam obrázků

1	<i>Nuphar lutea</i> (L.) Sm., převzato z Thomé (1885).	3
3.1	Mapa rozšíření stulíku žlutého v ČR podle Slavík (1990).	32
3.2	Histogram počtu jedinců v populacích	33
3.3	Mapa sesbíraných populací stulíku žlutého z ČR	34
3.4	Mapa sesbíraných zahraničních populací stulíku žlutého	35
3.5	Ukázky z lokalit, kde byl sbírán stulík žlutý	39
3.6	Bruselské jezírko Etang de Boitsfort	44
3.7	Nasbírané oddenkové úlomky	45
3.8	Bedna s plovoucími oddenkovými úlomky	46
4.1	Přehled délkového rozsahu jednotlivých lokusů	53
4.2	Přehled frekvencí jednotlivých alel pro jednotlivé populace (část 1)	54
4.3	Přehled frekvencí jednotlivých alel pro jednotlivé populace (část 2)	55
4.4	PCoA českých jedinců stulíku žlutého s vyznačenými geografickými oblastmi	62
4.5	PCoA českých jedinců stulíku žlutého s vyznačenými jednotlivými popu- lacemi	63
4.6	PCoA jedinců stulíku žlutého z Odry	64
4.7	PCoA jedinců stulíku žlutého z povodí Moravy	65
4.8	PCoA jedinců stulíku žlutého z povodí Labe	66
4.9	Výstupy Structure-sum pro české vzorky	69
4.10	Podobnost jednotlivých běhů programu Structure pro české vzorky	70
4.11	Koeficient podobnosti mezi jednotlivými páry běhů programu Structure pro české vzorky	71
4.12	Výstupy Structure-sum pro všechny vzorky	72
4.13	Podobnost jednotlivých běhů programu Structure pro všechny vzorky	73
4.14	Koeficient podobnosti mezi jednotlivými páry běhů programu Structure pro všechny vzorky	74
4.15	Shlukování jedinců do skupin podle jejich genetické podobnosti programem Structure	75
4.16	Geografická distribuce genetických shluků vypočítaných programem Structure (2 shluky)	76

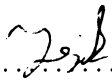
4.17 Geografická distribuce genetických shluků vypočítaných programem Structure (3 shluky)	77
4.18 Prostorová autokorelace vzorků z celé ČR (Moranovo I)	79
4.19 Prostorová autokorelace vzorků z povodí Moravy (Moranovo I)	80
4.20 Prostorová autokorelace vzorků z povodí Labe (Moranovo I)	81
4.21 Typický stav tlustšího oddenkového úlomku po měsíci ve vodní nádrži . . .	83

Seznam tabulek

3.2	Přehled lokalit stulíku žlutého (jména a souřadnice lokalit)	36
3.1	Přehled analyzovaných populací stulíku žlutého	38
3.3	Přehled selektivních jaderných mikrosatelitových primerů	41
4.1	Porovnání počtu alel a H_E mezi populacemi a oblastmi	50
4.2	Porovnání délkového rozsahu alel, počtu alel, H_E a H_O mezi Fér and Hroudová (2008), Ouborg et al. (2000) a mými daty	52
4.3	AMOVA českých populací stulíku počítaná metodou F_{ST} a R_{ST}	58
4.4	AMOVA všech populací stulíku počítaná metodou F_{ST} a R_{ST}	59
4.5	AMOVA počítaná v rámci jednotlivých povodí na základě F_{ST}	60
4.6	Fixační indexy F_{ST} (F-statistika)	60
4.7	Porovnání výpočtů Moranova I v rámci povodí Moravy, povodí Labe a mezi všemi českými vzorky	82
4.8	Počty semen a jejich klíčivost při různých typech ošetření v různých letech	84
C.1	Reakční směs pro PCR	119
C.2	Reakční směs pro PCR s využitím Eppendorf RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	120
C.3	Průběh PCR pro amplifikaci mikrosatelitových primerů	120

0.1 Prohlášení

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

V Praze dne 18. srpna 2009 

0.2 Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval lidem, kteří mi pomohli a nějakou formou prospěli ke zdárnému dokončení této práce.

- Svému školiteli Mgr. Tomáši Férovi, Ph.D. (Katedra botaniky PřF UK) děkuji za veškerou trpělivost, kterou vůči mě projevil a za všechny jeho kritické připomínky.
- Mgr. Kataríně Nemjové (Katedra botaniky PřF UK) děkuji za pomoc při sběru vzorků z Ohře a některých jihočeských populací, za sesbírání vzorků z populace Seeburger See z Německa za připomínkování jedné z verzí DP a za veškerou morální podporu.
- Mgr. Martině Pichrtové (Katedra botaniky PřF UK) bych rád poděkoval za sebrání populace z Gelnarova jezera.
- RNDr. Lubomíru Adamcovi, Ph.D. (Botanický ústav AV ČR Třeboň), Mgr. Rostislavu Černému, CSc. (Katedra biologie PF JČU), Mgr. Anežce Eliášové (Katedra botaniky PřF UK), RNDr. Vítu Grulichovi, CSc. (PřF MU), RNDr. Janu Pokornému, CSc. (PřF UK), Prof. RNDr. Karlu Prachovi, CSc. (Katedra botaniky PřF JČU), Mgr. Ladislavu Rektorisovi (Správa CHKO Třeboňsko) a Mgr. Kateřině Šumberové, Ph.D. (PřF MU) děkuji za nezištné poskytnutí informací vedoucí k dopadení stulíku v jeho přirozeném prostředí.
- Prof. Ludwigu Triestovi z Vrije Universiteit Brussel děkuji za možnost provést v jeho laboratoři pokus s plovatelností a klíčením oddenkových úlomků a za informace o výskytu stulíku v Belgii.
- Naši skvělé laborantce Bc. Veronice Kučabové velmi děkuji za veškerou pomoc při laboratorních analýzách.
- Bc. Vladimíru Lachmanovi a Mgr. Lucii Drhovské (oba Katedra botaniky PřF UK) děkuji za pomoc s analýzami v prostředí ArcGIS.
- Všem svým spolužákům a účastníkům seminářů Prof. RNDr. Tomáše Herbena, CSc. (Katedra botaniky PřF UK) děkuji za všechny kritické připomínky, zpětnou vazbu a rady přispívající k vylepšení díla a zpřesňování výkladu.
- Za finanční podporu děkuji Výzkumnému záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021620828.
- V neposlední řadě nemohu nezmínit všechny vývojáře, kteří dávají svá — mnohdy velkolepá — programátorská díla zdarma k dispozici všem, aby z toho dle principů reciprokého altruismu měli užitek všichni. Linux a další podobné i mnohem menší projekty dávají zdarma možnosti, jejichž nedokonalé odvary jiní draze prodávají.

0.3 Abstrakt

Pomocí mikrosatelitových jaderných markerů byla provedena fylogeografická analýza 528 vzorků stulíku žlutého (*Nuphar lutea*) ze 70 populací (66 z ČR, po jedné z Belgie, Německa, Slovenska a Litvy). Byla odhalena nízká míra klonality v rámci populací a nízká populační struktura na větší prostorové škále. Jednotlivá povodí jsou relativně izolovaná, komunikace mezi nimi je slabá (ale detekovatelná). Semena se šíří až na vzdálenost přes 100 km, ale významné je toto šíření jen do několika desítek km. Stulík žlutý vykazuje genetickou izolaci geografickou vzdáleností. Vegetativní šíření je celkově velmi malé.

0.3.1 Klíčová slova

Biogeografie, botanika, Česko, Česká republika, disperze, ekologie, fylogeografie, fylogenetika, fytogeografie, hydrobiologie, klonalita, migrace, mikrosatelity, molekulární biologie, molekulární ekologie, *Nuphar lutea*, populační genetika, říční systémy, SSRs, stulík žlutý, vodní rostliny.

0.4 English summary

Phylogeographical studies of aquatic plants are relatively rare, although river corridors are amazing study system. There are many questions about dispersal within river catchment and between different river basins.

Using 10 nuclear microsatellite (SSRs) primers, 528 individuals of *Nuphar lutea* from 70 populations (66 from the Czech Republic and one from Belgium, Germany, Slovakia and Lithuania) were analysed. Those analysis allowed reveal kinship of the individuals and obtain information about character of spatial structure of populations of *Nuphar lutea* and about dispersal of *Nuphar lutea*.

Populations seems to consist from many genetically different individuals. There were only 15 clonal individuals found among all samples. Clones are small (biggest sampled clone consisted from 4 ramets — sampled individuals, usual size was 2–3) and common only in specific conditions, when an individual has enough free space for continual growth and frequency of disturbances is low.

Vegetative dispersal is not very important. Among 489 samples from 66 Czech populations, there were detected only 7 clones. The longest distance between clones was about 120 km.

There is not clear tendency for downstream change of genetic diversity. It seems, genetic diversity is more reflecting characteristics of the population: if it is connected with the river (and another populations) or isolated in small water body (pool) separated from the river.

Populations (and especially river catchments) are relatively separated, although there is some communication even between very distant populations. Bayesian clustering did not show any clusters covering more than one population. PCoA shows separation of populations from Odra river and Morava river catchment from populations from Labe river catchment. According to software Structure, populations from Labe (Elbe) river system north-east from Prague together with populations from Berounka river (Central Bohemia, south-west from Prague) are forming strongly separated cluster. But there is some connection with the rest Czech populations.

AMOVA shows high proportion of genetic variability among river catchments and fixation index shows very high separation of river catchments, probably due fixation of very different alleles in populations in different river catchments. It might be result of beginning genetic drift due to the fragmentation of area (because of various human activity like river ship transportation).

There is significant positive autocorrelation among individuals up to more than 100 km of straight distance. It means that repeated seed dispersal on the rate of tens km does regularly occur. *Nuphar lutea* shows clear isolation by distance in the Czech Republic.

0.4.1 Keywords

Biogeography, botany, clonality, Czechia (Czech Republic), dispersal, ecology, hydrobiology, phylogenetics, phylogeography, phytogeography, microsatellites, migration, molecular biology, molecular ecology, *Nuphar lutea*, population genetics, river systems, SSRs, water plants.

Kapitola 1

Úvod

Fylogeografie (Hennig, 1999) je relativně mladou a bouřlivě se rozvíjející větví biogeografie (Brown and Lomolino, 1998). K zodpovězení otázek týkajících se šíření a rozšíření organismů (jeho historického vývoje, současného stavu, obecných charakteristik apod.) využívá informaci uloženou v DNA (hojně využívá cpDNA i variabilnější markery jako AFLP (Vos et al., 1995) nebo mikrosatelity, Balloux and Lugon-Moulin, 2002). Zjišťuje příbuznost studovaných jedinců a z ní odvozuje historii šíření a rozšíření druhu ve studovaném území. Klasické fylogeografické práce se zabývají postglaciální rekolonizací Evropy (Comes and Kadereit, 1998). Studují jak návrat rostlin (typicky stromů) z teplých jižních refugií (Balkánské, Apeninské a Iberské) na sever (např. Bennett et al., 1991; Ferris et al., 1998; Grivet and Petit, 2003), tak příbuznost rostlin z evropských hor (Alpy, Karpaty, . . .) se stejnými nebo blízce příbuznými druhy v severní Evropě a v Arktidě (např. Schönswetter et al., 2004). Metoda je použitelná na prakticky libovolné časoprostorové škále a s její pomocí se poslední dobou řeší stále více otázek, včetně velmi praktických týkajících se invazních (např. Paireon et al., 2006) nebo naopak vzácných druhů (např. Schönswetter et al., 2004) a dopadů lidských aktivit na rostlinné populace (např. Zhang et al., 2007).

Informace získané analýzou DNA nemůžeme nahradit žádnou jinou metodou. Např. při studiu rekolonizace severnějších partií Evropy bukem po poslední době ledové metodou analýzy pylu a makrozbytků můžeme vidět, jak se druh šířil ve vlně na sever (Giesecke et al., 2007; Tinner and Lotter, 2006). Jednotlivé nálezy můžeme datovat a udělat tak mapku globálního růstu areálu. Nicméně bez analýzy DNA bychom nikdy nezjistili, že prakticky veškerý buk severně od Alp pochází z Balkánu: Jedinci z ostatních refugií z nich daleko nedorazili (Tinner and Lotter, 2006).

Poněkud opomíjenou skupinou jsou ve fylogeografických studiích vodní rostliny (Les et al., 2003). Vodní prostředí vykazuje určité na souši neznámé charakteristiky. Např. v řekách proudí voda pouze jedním směrem dolu po proudu, rostliny tak jsou neustále „splachovány“ do dolních partií toku (Danvind and Nilsson, 1997). Proti proudu se mohou šířit buď kontinuálním růstem porostu (což nebývá příliš efektivní) nebo občasným dálkovým transportem za pomoci nějakého externího vektoru, často živočicha (typicky ptáka, Figuerola and Green, 2002). Vodní prostředí tak tvoří síť jednosměrných cest (Jo-

hansson et al., 1996; Burkart, 2001), přičemž šíření mezi jednotlivými toky nebo v protisměru (proti proudu) v rámci jednoho toku je pro rostlinu relativně obtížné (pokud nejde o primárně zoochorní nebo anemochorní druh, u nich je v tomto ohledu situace jednodušší, van der Pijl, 1982). Voda navíc od rostlin vyžaduje speciální adaptace na sníženou možnost výměny plynů, na hrozbu anoxie, na možné velké změny v prostředí (disturbance, vyschnutí, ...) apod (Les et al., 2003). Na druhou stranu zpravidla nenutí rostlinu investovat do opěrných pletiv a do určité míry chrání před UV zářením poškozujícím DNA. V prostředích říčních systémů si můžeme klást řadu otázek. Např.: Je větší genetická variabilita na horním nebo na dolním toku? Šíří se rostliny výhradně říční sítí nebo i mezi jednotlivými toky? Jsou od sebe povodí ostře geneticky oddělené nebo mezi nimi dochází k výměně diaspor (Danvind and Nilsson, 1997; Johansson et al., 1996; Fischer et al., 2000)? Podílí se na transportu semen vodní ptáci (Green et al., 2002; Figuerola et al., 2005; Mueller and van der Valk, 2002)? A mnohé další.

Fylogeografie přináší spoustu informací o (roz)šíření rostlin a vodní rostliny mj. i díky své relativní neprobádanosti slibují řadu objevů. Jako modelový druh jsem si pro svou práci vybral stulík žlutý (*Nuphar lutea* (L.) Sm., Arber, 1920; Heslop-Harrison, 1955, obr. 1), který je svým životním cyklem vázán na vodu (Hart and Cox, 1995), díky čemuž je vhodným modelem pro studium obecnějších procesů šíření vodních rostlin v říčních systémech. Jeho studiem tak máme šanci dozvědět se něco obecnějšího o fungování ekologicky srovnatelných druhů na krajinné úrovni. Stulík žlutý je u nás rozšířen roztroušeně, vyskytuje se hlavně v nížinách, v malých i velkých řekách a v okolních tůňkách (Chytrý and Rafajová, 2003; Slavík, 1990, obr. 3.1). Pro stulík jsou navíc k dispozici mikrosatelitové (Jarne and Lagoda, 1996) jaderné primery (Ouborg et al., 2000), díky čemuž máme k dispozici mimořádně kvalitní a spolehlivý nástroj (Ouborg et al., 1999) k odhalení příbuznosti mezi studovanými jedinci a tak k zodpovězení položených otázek (viz dále).

Jako doplňkové studie slouží analýza klíčivosti semen a oddenkových úlomků, o kterých se předpokládá, že mohou hrát určitou roli v šíření stulíku žlutého (Arber, 1920). Pomocí analýzy mikrosatelitů můžeme odhalit klonální jedince v různých populacích a odhadnout tak míru vegetativního šíření mezi populacemi (např. Ouborg et al., 1999). Tato otázka je bez technik analýzy DNA prakticky nezodpověditelná (Avise, 2000).

Práce navazuje na práci Fér and Hroudová (2008), která se zabývala šířením stulíku žlutého v říčním systému Cidliny, Mrliny a přilehlých částí Labe. Pro svou práci mám kromě dat z Fér and Hroudová (2008) navíc k dispozici data z ostatních částí ČR (Jižní Čechy, Berounka, Ohře, Morava) i ze zahraničí.

1.1 Otázky

K dispozici jsou vzorky ze 66 populací stulíku žlutého z celé ČR a po jedné populaci z Belgie, Německa, Slovenska a Litvy. Celkem je k dispozici 528 vzorků jedinců analy-

zovaných mikrosatelitovou analýzou. Cílem práce bylo získat informace o fylogeografii stulíku žlutého v rámci České republiky a zodpovědět následující otázky:

1. Jaká je genetická struktura vybraných populací? Kolik je tam klonu?
2. Jak klíčivá jsou semena a oddenkové úlomky? Mohou oddenkové úlomky sloužit jako dispersní agens?
3. Liší se geneticky populace stulíku žlutého v jednotlivých oblastech (Polabí, Jižní Čechy, Odra, Jižní Morava, ...) ČR? Jde o rozdíly jak v hydrologicky izolovaných úmořích (úmoří Severního, Baltského a Černého moře) tak v jednotlivých (potenciálně spojených) řekách.
4. Dochází k transportu diaspor mezi povodími (Odra, Morava a Labe), anebo jsou povodí striktně oddělené? Můžeme v různých oblastech najít identické (nebo velmi podobné) jedince? To by znamenalo doklad dálkového šíření.
5. Jaký je vztah geografické vzdálenosti mezi jedinci a genetické podobnosti jedinců? Na jakou vzdálenost jsou ještě jedinci pozitivně autokorelování (na jakou vzdálenost se stulík žlutý šíří semeny)? Dochází u stulíku žlutého ke genetické izolaci geografickou vzdáleností?

Kapitola 2

Literární rešerše

V roce dvou kulatých výročí slavného génia¹ se vynořuje řada úvah bilancujících co všechno dal vědě, co už věděl a v čem se mýlil. Darwin (2007) se v kapitole o geografickém rozšíření zabýval mj. problematikou šíření sladkovodních organismů. Udává příklady ryb, korýšů i vodních rostlin (mezi nimi i stulíku), které mají široké rozšíření jak v rámci „ostrovů“ vody na pevnině, tak na vzdálených oceánských ostrovech. Uvažuje o změnách toků řek, povodních, šířením vodními ptáky i např. šířením podél antarktického pobřeží během teplejších období(!). Uvažuje o možnostech organismů šířit se (jak jsou adaptovány), o dopadu dob ledových apod.² Nyní máme konečně v ruce technologie umožňující nám řadu z jeho otázek zodpovědět, ověřit jeho závěry a posunout lidské poznání zas o krok dál. Darwinovy úvahy byly v principu správné. Dlouho ale chyběl nový impuls, který by bádání na poli šíření organismů posunul dál. Tím nejnovějším je využití informace uložené v DNA.

2.1 Biogeografie

Biogeografie (nauka o šíření a rozšíření organismů) nebyla dlouho řazena mezi vědu, protože se zabývá jak obecnými opakujícími se procesy, tak neopakovatelnými historickými událostmi. Šíření mezi ostrovy se sice opakuje stále podle stejného obecného vzorce, ale Darwinovy pěnkavy na Galapágách vznikly právě a pouze jednou a tato událost je v přesně stejné podobě principiálně neopakovatelná (Komárek, 1997; Brown and Lomolino, 1998).

S rozvojem ekologie se objevila otázka jsou-li živé organismy rozšířeny tak, jak jsou díky svým ekologickým vztahům k jiným organismům a fyziologickým nárokům (ekologická interpretace biogeografie), nebo díky své historii (evoluční interpretace biogeografie): zatím prostě neměli čas tam dorazit, byli tam, ale vyhynuli apod. Jsou důležitější příčiny historické nebo ekologické a fyziologické?

¹200 let od narození Charlese Roberta Darwina a 150 let od prvního vydání jeho přelomové knihy *On The Origin of Species...* (poslední český překlad 2007).

²Nebyl jediný, kdo takto uvažoval, významný byl přínos např. Alfreda Russella Wallace (Komárek, 1997), který je obecně považován za zakladatele biogeografie.

Ekologický přístup nám může odpovědět na otázku, jak dnes studované druhy mohou v daném území spolu žít a jaké jsou mezi nimi vztahy. Historický přístup nám řekne proč tam dané druhy jsou či nejsou (zatím se „jen“ nedošířili, vyhynuli při nějaké pohromě, ...). To ale není jednoduché: společný (velmi často vyhynulý) předek a jeho různými peripetiemi se šířící potomci se dokazují jen velice obtížně.

Možným řešením tohoto problému je fylogeografie (viz též kap. 2.2 na str. 27, Henig, 1999) využívající tzv. molekulárních markerů k nalezení genové variability na širší časoprostorové škále. Můžeme tak objektivizovat naše historická zkoumání: živé organismy si ve své DNA nesou stopy své vlastní minulosti a molekulární techniky nám je umožňují studovat. Pro účely studie si určíme soubor studovaných jedinců, a následně pomocí molekulárně-genetických metod zjišťujeme příbuzenské vztahy mezi těmito jedinci. Nalezením geneticky podobných jedinců (genových linií), tvorbou tzv. fylogenetických stromů zobrazujících příbuzenské vztahy, nehierarchickým rozdělením jedinců do skupin podle jejich příbuznosti a porovnáním s jejich geografickým rozšířením se tak můžeme pokusit rekonstruovat historickou migraci, odlišit jednotlivé migrační proudy a zjistit, které lokality spolu migračně souvisí (Avice, 2000). Molekulární markery pomáhají osvětlit mechanismy a logiku šíření a rozšíření rostlin v krajině, což má i veliký praktický význam. Od pochopení obecných mechanismů šíření rostlin (pak víme, kam povedou naše — i nechtěné — zásahy do životního prostředí) přes ochranu vzácných druhů po potlačování těch invazních.

2.1.1 Biogeografie a vodní rostliny

Vyšší rostliny se vlastními silami z místa na místo zpravidla nepohybují a ve svém šíření z místa svého růstu jsou odkázány na vítr (anemochorie), vodu (hydrochorie), živočichy (zoochorie) nebo lidi (antropochorie), viz van der Pijl (1982). Obvykle se nešíří celá rostlina, ale jen určitá rozmnožovací částice (diaspora, propagule): vegetativní úlomek nebo speciální částice (turiony, ...) nebo generativně (pohlavně) vzniklé semeno či plod (van der Pijl, 1982). K tomu mají rostliny řadu speciálních adaptací. Např. semena přenášená vodou bývají plovatelná, schopná vyklíčit i v anoxických podmínkách a klíčivá alespoň několik let.

Studiu (roz)šíření rostlin se věnuje fyto geografie. V ní zaujímají vodní rostliny poměrně specifické postavení. Sladkovodní cévnaté rostliny mají (patrně mj. díky časté schopnosti klonálního rozmnožování) velice široké až (sub)kosmopolitní areály. Takový široký výskyt je častější na severní polokouli (cirkumboreální druhy), ale některé invazní druhy (např. *Elodea*) jsou široce rozšířené i na jižní polokouli (Thiébaud, 2007; Santamaría, 2002).

Naproti tomu jejich taxonomické bohatství je omezené (Les et al., 2003). Možnou příčinou je, že vodní rostliny jsou často morfologicky redukovány, což (klasické) taxonomické hodnocení ztěžuje. Crow (1993) ukázal, že — překvapivě — v mírném pásmu

je větší diverzita vodních rostlin než v tropech³, avšak přiznává, že z tropických oblastí máme nedostatek taxonomických údajů.

Způsoby studia šíření rostlin

Šíření rostlin lze obecně studovat několika základními, principiálně odlišnými, přístupy, které se mohou vzájemně vhodně doplňovat:

1. Přímým sledováním diaspor během procesu šíření od rodičů po semenáčky. Tato metoda je velice obtížná (i když teoreticky nejlepší). Většinou se používají umělé označené náhražky semen, které se vypustí do vody (např. Nilsson et al., 1991; Danvind and Nilsson, 1997) a pak se sleduje jejich depozice.
2. Zachycováním semen do pastí a zkoumáním jejich složení v závislosti na charakteristikách toku a okolních společenstvech (např. Fér, 2000). Nevýhodou v tomto případě je, že pokud použijeme jen pasti, nezjistíme zdrojové jedince, ze kterých pochází zachycená semena.
3. Matematickými modely (např. Jacobs and Macisaac, 2009). K tomu, abychom je mohli vytvořit, musíme mít minimálně některé údaje z ostatních přístupů ke studiu šíření rostlin. Potom můžeme využít model např. k predikci šíření dalších druhů, které mají obdobnou ekologii jako druhy, jejichž charakteristiky byly použity při tvorbě a kalibrování modelu (viz např. Pairon et al., 2006, porovnávající dva odlišné přístupy k testování modelů šíření semen *Prunus serotina* v podrostu borovicového lesa: genetické studie a mechanistické modely založené na pohybu lehkých plodů ve vzduchu sledovaného pomocí pastí).
4. Využití technik studia DNA nám umožňuje získat informaci o příbuznosti studovaných jedinců, která je jinými metodami nedostupná. Tyto techniky lze použít na různých časoprostorových škálách (od rozpadu Gondwany a studia rozšíření a příbuznosti dávných linií (Wanntorp and Wanntorp, 2003) po sledování právě probíhající invaze (Thiébaud, 2007)) a můžeme pomocí nich tvořit a testovat hypotézy o šíření a rozšíření rostlin (Ouborg et al., 1999). Jde o nepřímou metodu (na rozdíl od bodů 1 a 2) zobrazující variabilitu nasbíranou za celou dobu existence studovaného systému.

2.1.2 Využití molekulárních markerů, fylogeografie

Fylogeografie (Hennig, 1999) využívá postupů kladistické systematiky a dalších disciplín a snaží se s jejich pomocí studovat šíření a rozšíření organismů. Pro fylogeografické studie se většinou používají tzv. nekódující úseky DNA, které nejsou přímo přepisovány do proteinů. Zvláště výhodné je použití tzv. neutrální DNA, která (podle současné úrovně

³Obecně má většina skupin organismů větší biodiverzitu v tropických oblastech (Crow, 1993).

poznání) není pod selekčním tlakem a mohou se tam hromadit mutace, které obvykle nemají negativní dopad na fitness svého nositele (Baker, 2000). Pro fylogeografické analýzy se většinou používají introny (úseky DNA vmezežené mezi exony kódující části proteinů), které nejsou překládány do proteinů (Ouborg et al., 1999). Jinou možností je použít techniky jako AFLP (Vos et al., 1995), které ukazují variabilitu z náhodných míst celého genomu.

V současnosti se zdá, že podstatná část těchto nekódujících úseků je původem tzv. parazitická DNA: různé transpozony, replikony, pozůstatky retrovirů. Jejich funkce v organismu je stále nejasná. Tyto úseky vykazují vysokou mutabilitu a v určitých částech genomu se šíří. Obsah takovéto „neužitečné“ DNA během evoluce roste (Sherratt, 1995).

Nejčastějším a „klasickým“ (např. Petit et al., 1997, a další) molekulárním markerem používaným v řadě analýz je chloroplastová DNA (cpDNA Baker, 2000; McCauley, 1995). Chloroplastová DNA je obvykle poměrně konzervativní a chloroplastové markery nebývají příliš variabilní, proto se pro studie na menší časoprostorové škále často používají variabilní markery jako AFLP nebo mikrosatelity (viz dále). Výhodou AFLP je, že nepotřebujeme žádnou předchozí znalost o genomu studovaného druhu, mikrosatelity jsou na druhou stranu kodominantní, díky čemuž můžeme rozlišit heterozygoty od dominantních homozygotů (Ouborg et al., 1999). Jelikož pro stulík jsou k dispozici mikrosatelitové primery (Ouborg et al., 2000), použil jsem tuto metodu.

Mikrosatelity (SSRs)

Mikrosatelity (SSRs, Simple Sequence Repeats Jarne and Lagoda, 1996; Balloux and Lugon-Moulin, 2002; Slatkin, 1995) jsou velmi variabilní kodominantní markery. Dávají nám dostatek variability i pro populační studie na menší časoprostorové úrovni a díky jejich kodominanci můžeme rozlišit heterozygoty od dominantních homozygotů. Jde o krátké (1–6 bp) mnohokrát se opakující sekvence DNA (např. ... ATATATATATAT ...). Jednotlivé alely jsou pak určeny délkovým polymorfismem (počtem opakování dané repetice v rámci alely), který odhalíme oddělením alel pomocí elektroforézy a vizualizací proužků. Jejich nevýhodou je — na rozdíl od např. AFLP (kde nepotřebujeme žádnou předchozí znalost o studovaném genomu) — nutnost připravit pro každý studovaný druh sadu specifických primerů, jejichž izolace a příprava je poměrně náročná.

Mikrosatelity jsou vysoce specifické, polymorfní a vyskytují se v celém genomu (spíše v nekódujících oblastech). V případě rostlin se používají buď jaderné nebo plastidové mikrosatelity (Provan et al., 2001). Vykazují velkou mutační rychlost (jaderné 10^{-3} – 10^{-5} na lokus za generaci) a vznikají převážně „sklouznutím“ DNA polymerázy při kopírování DNA. Pro stulík (*Nuphar*, Nymphaeaceae) publikovali primery pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitových lokusů Ouborg et al. (2000). Jsou amplifikovány nejen ve druhu *Nuphar lutea*, ale podle autoru i v dalších zástupcích rodu.

Statistické zpracování dat

Získaná molekulární data sama o sobě na položené otázky neodpoví. Je potřeba je analyzovat vhodnými matematickými metodami. K základnímu popisu populací patří očekávaná a pozorovaná heterozygosita, počty a frekvence alel. Genetické vzdálenosti mezi jedinci analyzovanými pomocí kodominantních markerů se běžně určují např. pomocí párové genetické vzdálenosti Nei's chord distance (Nei et al., 1983) vycházející z frekvence sdílených alel. Matice párových genetických vzdáleností slouží jako základní datový soubor pro další analýzy. K popisu rozdělení genetické variability v rámci populací a mezi populacemi a oblastmi se jako nejvhodnější jeví analýza molekulární variance (AMOVA, Excoffier et al., 1992) a F-statistika (Weir and Cockerham, 1984) počítaná jako F_{ST} -like na základě podílu shodných alel (Weir and Cockerham, 1984) nebo R_{ST} -like na základě čtverce rozdílu v délkách alel (Kimura and Weiss, 1964). AMOVA a F-statistika globálně říká jak moc jsou jendotlivé populace izolované, jaká je mezi nimi komunikace a jestli nejsou v nějaké populaci fixované nějaké alely nebo naopak jsou všechny alely všude. U mikrosatelitů známe dosti přesně mutační model (stepping stone, Kimura and Weiss, 1964), což nám umožňuje pracovat přímo s délkami alel. R_{ST} -like varianta AMOVA je určena pro mikrosatelitová kodominantní data, nicméně s velkým počtem velmi vzácných alel lišících se jen o několik opakování může někdy dávat zavádějící výsledky (Balloux and Lugon-Moulin, 2002; Kalinowski, 2002; Hartl and Clark, 1989; Galeuchet et al., 2005).

Prostorové vztahy mezi jedinci (a populacemi) lze zobrazit pomocí mnohorozměrné techniky PCoA (principal coordinate analysis), která redukuje původní n -rozměrný hyperprostor molekulárních znaků do obvykle 2 nebo 3 rozměrů. Jinou možností jak detekovat vztahy mezi populacemi je Bayesiánské shlukování (Corander and Marttinen, 2007; Falush et al., 2003). PCoA a Bayesiánské shlukování jsou nehierarchické metody. K zobrazení hierarchických vztahů lze využít shlukovací metody jako Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (average linkage method, UPGMA). Pokud je ale mezi-populační struktura relativně slabá, tyto metody jsou nepoužitelné, neboť často dochází během výpočtu k situaci, kdy je několik možných řešení stejně dobrých a algoritmus se pak nemůže relevantně rozhodnout. Takové větve při testování (např. bootstrapem) kolabují do polytomii. To je důvod proč hierarchické znázornění vztahů mezi jedinci či populacemi s využitím shlukovacích metod často není vůbec použito. Ke zjištění vykazuje-li studovaný druh genetickou izolaci geografickou vzdáleností (isolation by distance) slouží metody analýzy prostorové autokorelace (do jaké geografické vzdálenosti si jedinci jsou signifikantně geneticky podobní, Hardy and Vekemans, 2002). Výsledky těchto analýz lze zobrazit např. v prostředí geografických informačních systémů.

Klonalita, vodní rostliny a mikrosatelity

Klonální rozmnožování je ve fylogenetickém stromě cévnatých rostlin rozmístěno nerovnoměrně. U nahosemenných je velice vzácné, u krytosemenných se vyskytuje s různou intenzitou napříč liniemi. Obecně se předpokládá, že klonální rozmnožování je evolučně

původnější a pomáhá rostlinám vyrovnat se se stresujícími podmínkami vnějšího prostředí (Klekowski, 2003; Loxdale and Lushai, 2003). Mezi vodními rostlinami je velké množství druhů, které se rozmnožují z větší části klonálně (Les et al., 2003). Zastoupení klonálního rozmnožování je mezi vodními rostlinami vyšší než mezi suchozemskými. To, že jsou vodní rostliny klonální jim umožňuje snadné šíření na velkém území. Druhy, které jsou schopné se rozmnožovat klonálně pomocí vegetativních úlomků (*Elodea*, *Myriophyllum*, ...), bývají široce rozšířené až (sub)kosmopolitní a mají značný invazní potenciál (Thiébaud, 2007; Santamaría, 2002).

Ohledně míry klonality v rámci populací se závěry dělají jen obtížně, neboť jde o druhově a místně specifickou záležitost. Některé druhy tvoří velké populace složené z několika klonů (např. Ren et al., 2005; Thiébaud, 2007), jiné vykazují jen nízkou míru klonality (např. Nies and Reusch, 2005). Fylogeografické studie se mírou klonality zabývají je vzácně. Pollux et al. (2007) ukázali, že míra klonality i celkové genetické struktury v rámci i mezi populacemi je v obou studovaných řekách odlišná a záleží spíše na charakteristikách daných řek (jak příhodné podmínky má druh pro klonální rozrůstání). Vegetativní šíření v rámci řek bylo velmi malé. Nelze tvořit obecné závěry: míra klonality studovaných populací závisí na druhu i na lokalitě a je velmi variabilní (např. Nies and Reusch, 2005; Pollux et al., 2007; Pilon and Santamaría, 2002; Puijalón et al., 2008). Detekce klonů je sama o sobě problematická záležitost (Klekowski, 2003; Loxdale and Lushai, 2003). Použitý molekulární marker musí být dostatečně variabilní, ale u příliš variabilního markeru hrozí riziko somatických mutací. Mikrosatelity jsou pro tento účel dostatečně variabilní (Ouborg et al., 1999). Pravděpodobnost toho, že dva jedinci se stejným genotypem nejsou klony, ale získali shodné genotypy náhodou lze testovat (Arnaud-Haond et al., 2007a). Mikrosatelity k úspěšné detekci klonů úspěšně použili např. Pollux et al. (2007); Fér and Hroudová (2008).

2.1.3 Postglaciální historie

Klasickým fylogeografickým problémem je (post)glaciální historie organismů (Comes and Kadereit, 1998). Evropa byla naposledy zaledněna před asi 18 000–20 000 lety (Ložek, 1973) a obecně se soudí, že většina rostlin a živočichů se stáhla do refugií na jihu (Balkán, Apeniny a Iberský poloostrov). Zpět na sever se rostliny začaly vracet před asi 13 000 lety, ale vrátila se jen malá část alelické a taxonomické variability (Comes and Kadereit, 1998)⁴. Tyto otázky se nejčastěji řeší na stromech a rostlinách rostoucích ve vysokých horách a na severu Evropy (viz např. Maliouchenko et al., 2007; Schönswetter et al., 2004, a další).

Poněkud opomíjenou skupinou jsou v tomto ohledu vodní rostliny, o kterých je relativně málo studií (ale viz např. Dorken and Barrett, 2004; Nies and Reusch, 2005, a další). Mají silnou ekologickou vazbu na své prostředí a šíří se hydrochorně (van der Pijl, 1982) pasivně unášeny vodou (např. Smits et al., 1989; Danvind and Nilsson, 1997; Boedeltje

⁴Evropa tak byla ochuzena o mnoho třetihorních druhů a linií, které dnes rostou ve východní Asii, severní Americe a případně na Kavkaze a ve Středomoří (*Pterocarya*, *Ginkgo*, ...).

et al., 2003) nebo dálkovým transportem (např. za pomoci ptáků, Clausen et al., 2002; Figuerola and Green, 2002). Díky své ekologické vazbě na vodní prostředí jsou vhodnou modelovou skupinou pro pochopení migrace a rozšíření i jiných vodních organismů (viz např. Nilsson et al., 1991; Johansson et al., 1996; Burkart, 2001; Les et al., 2003): na nich získané výsledky mohou mít širší obecnější platnost.

Mezi výjimky patří v této oblasti práce Dorken and Barrett (2004) zkoumající pomocí PCR-RFLP postglaciální historii jedno- a dvoudomých populací *Sagittaria latifolia* ve východní části Severní Ameriky. Glaciální refugia byla pravděpodobně na jihovýchodě (jen tam se vyskytovaly všechny haplotypy). Ve dvoudomých populacích byly nalezeny jen 4 haplotypy a 94 % individuí mělo jen 1 haplotyp.

2.2 Fylogeografie, vodní rostliny a říční síť

Řeky jsou strukturovaný a různorodý systém pro studium transportu genů. Řeky fungují v krajině jako koridory (nejen pro vodní rostliny) i bariéra (Johansson et al., 1996). O vodních rostlinách se obecně předpokládá, že se z velké části šíří právě řekami (hydrochorie, van der Pijl, 1982): řeka tak působí jako šířící koridor, který je navíc jednosměrným tokem vodního proudu směrově polarizovaný (viz např. Danvind and Nilsson, 1997; Nilsson et al., 1991). Předpokládá se, že šíření proti proudu je zajištěno relativně vzácnými událostmi transportu propagulí zvířaty (viz např. Figuerola and Green, 2002, zaměřující se na vodní ptáky). V takovém prostředí vyvstává řada otázek: Kde je větší genetická variabilita? Na horním nebo dolním toku? Jaký je charakter šíření rostliny v říčním systému (Fér and Hroudová, 2008)? Jaké abiotické a lidské zásahy mají vliv na rozšíření vodních rostlin (Burkart, 2001)? Šíří se rostliny výhradně říční sítí nebo i mezi jednotlivými řekami? Jsou od sebe povodí ostře geneticky oddělené nebo mezi nimi dochází k výměně diaspor (Danvind and Nilsson, 1997; Johansson et al., 1996; Fischer et al., 2000)? Podílí se na transportu semen vodní ptáci (Green et al., 2002; Figuerola et al., 2005; Mueller and van der Valk, 2002)?

Většina studií zabývajících se fylogeografií vodních rostlin odhalila dálkové šíření daného druhu (např. Keller, 2000; Lamote et al., 2002; Russell et al., 1999; Kudoh and Whigham, 1997; Lundquist and Andersson, 2001; Pollux et al., 2007; Fér, 2008, a další). Jeho vyloučení je vzácné (např. Imaizumi et al., 2006; Li et al., 2004). U některých druhů bylo omezené na kratší vzdálenosti (např. Liu et al., 2006; Markwith and Scanlon, 2007; Prentis and Mather, 2008; Araki and Kunii, 2006, a další). Studie, které se zabývaly i šířením mezi řekami jej zpravidla — alespoň v malé míře — potvrdily, nicméně údajů stále není dostatek (např. Russell et al., 1999; Kudoh and Whigham, 1997; Lundquist and Andersson, 2001; Pollux et al., 2007). Genetické odlišnosti hydrologicky oddělených říčních systémů se zpravidla vysvětlují genetickým driftem (např. Lamote et al., 2002). Velká nejednotnost panuje v roli vegetativního dálkového šíření a převahy jednosměrného šíření po proudu.

Genetická diverzita v dolních částech údolí může být vyšší než v horních částech toků (Gornall et al., 1998). Topologie říčního systému tak ovlivňuje genetickou diverzitu a její rozložení. Kudoh and Whigham (1997) zjistili, že populace *Hibiscus moscheutos*, které těsně souvisí s vodním tokem, a jsou tudíž často a snadno zásobovány semeny z populací ležících proti proudu, se geneticky příliš neliší. Geneticky více odlišné byly populace od toku vzdálenější, bez tak častého přísunu nového genetického materiálu — diaspor z jiných populací. Naproti tomu Russell et al. (1999) zkoumali populace hydrochorně se šířícího amazonského stromu a vliv hydrochorie na genetickou strukturu neprokázali. Pro vysvětlení rozdílů v pozorovaných charakteristikách je potřeba dostatek informací o ekologii studovaných druhů a o krajině (historie, . . .), kde druh roste.

Neobvyklé výsledky představili Prentis and Mather (2008) zkoumající vzácnou australskou vodní rostlinu *Helmholtzia glaberrima* (Philydraceae). Zjistili, že její výskyt koreluje s určitými charakteristikami vodního toku (nadmořská výška, srážky apod.), ale genetické rozdíly mezi populacemi neodpovídají geografickému rozmístění populací. Dochází k neočekávanému šíření diaspor nezávislému na vodním toku. Ač je rostlina vázána jen na poměrně specifické habitaty, geografie území nemá na její genetickou strukturu významnější vliv.

Fér (2008) se zabýval šířením *Nuphar lutea* (má prakticky neplavající semena), *Sparganium erectum* (semena plavou; oba druhy jsou hydrochorní), *Typha latifolia* a *Phragmites australis* (oba druhy jsou anemochorní) v říčním systému Cidliny, Mrliny a přilehlých částí Labe. Cílem práce bylo určit míru (vegetativního) dálkového šíření, zda je větší genetická diverzita na dolním nebo na horním toku a v jaké míře dochází k šíření mezi jednotlivými řekami. Jednoznačně potvrdil, že řeka je pro vodní rostliny důležitým migračním koridorem (ve velkých vzdálenostech byli nalezeni geneticky velmi podobní jedinci, jedinci byli pozitivně autokorelováni až do vzdálenosti 30 km). Míra hydrochorie a plovatelnosti semen má velký vliv: hydrochorní druhy migrovaly prvořadě podél vodního toku (v nižších částech toku byla větší genetická diverzita). Druhy s lépe plovatelnými propagulemi se šířili na větší vzdálenosti.

Většina prací je omezena na relativně malou oblast nebo jeden říční systém. Práce pokrývající rozsáhlejší území jsou vzácné. Relativně málo se ví o dálkovém transportu propagulí vodních rostlin v rámci jedné řeky i mezi povodími. Nejasnosti panují i o míře klonality v rámci populací vodních rostlin. Tyto otázky, o kterých se toho stále příliš neví jsou hlavní oblasti, kterým se ve své práci (v návaznosti na Fér and Hroudová, 2008) věnuji.

2.2.1 Antropogenní vlivy

Na rozšíření vodních rostlin mají zjevný vliv lidské aktivity, zvláště lodní doprava, úpravy toků a budování přehrad, eutrofizace vod a změny chemismu (Burkart, 2001; Thiébaud, 2007). Dále má člověk nepřímý vliv prostřednictvím ovlivnění počtů a chování ptáků a ryb. Riis and Sand-Jensen (2001) srovnávali dánské nížinné vody na konci 19. a 20. sto-

letí⁵. Ke konci 19. století byl stulík žlutý zaznamenán v mnoha jezerech, po 100 letech jen v řekách dolu po proudu a jeho populační stavy celkově poklesly. Proti proudu (do řek přítékajících do jezer) se vůbec nerozšířil. Zhang et al. (2007) zkoumali vliv přehrady Tři soutěsky na řece Jang-c'-ťiang na šíření pylu a semen *Vitex negundo* (Verbenaceae). Přehrada velmi účinně brání šíření semen, avšak ne pylu (ten se šíří na velkou vzdálenost), čímž se mění charakteristiky genetické struktury i rozšíření samotného druhu.

2.3 Stulík žlutý (*Nuphar lutea* (L.) Sm.)

Jako modelový druh byl pro tuto studii vybrán stulík žlutý (*Nuphar lutea* (L.) Sm., viz obr. 1 a 3.5), protože je to relativně běžná vodní rostlina (hydrofyt) rostoucí ve stojatých až mírně tekoucích vodách (má poměrně širokou ekologickou amplitudu) a svým životním cyklem je plně závislá na vodě. Koření v bahnitěm nebo pískovém substrátu (Arber, 1920; Heslop-Harrison, 1955). Rozmnožuje se jak klonálním růstem, tak pohlavně (Arber, 1920; Heslop-Harrison, 1955; Barrat-Segretain, 1996). Je opylován hmyzem, ale může se i samosprašit (Heslop-Harrison, 1955). Květ se po opylení ponoří a plod ve vodě dozraje po asi 6 týdnech (Arber, 1920). Je široce rozšířený v celé Evropě. U nás se vyskytuje zvláště v Polabí, v jihočeských pánvích, na Jižní Moravě a na mnoha dalších lokalitách (Slavík, 1990). Jsou pro něj dostupné mikrosatelitové jaderné primery (Ouborg et al., 2000), díky kterým máme k dispozici jeden z nejlepších molekulárních markerů pro studium genetické struktury populací i pro fylogeografické studie (Ouborg et al., 1999).

Má houževnaté oddenky nepatrně zploštělé a seshora nazelenalé, dole sinale žluté, pokryté jizvami po odpadlých listech (Arber, 1920). Oddenky mohou být tlusté až přes 10 cm. O oddenkových úlomcích stulíku se běžně uvažuje jako o možném dispersním agens (zvláště po jarních záplavách a podobných disturbancích Arber, 1920; Heslop-Harrison, 1955). Ulomené kousky rostlin mohou odplavat po proudu a pokud se zachytí na vhodném místě, může z nich vzniknout nový jedinec.

Plod (bobule) má dužnatou stěnu, která časem zeslizovává a rozpadne se. Hart and Cox (1995) ukázali, že semena se ve vodě šíří buď v plovoucích plodech nebo jako součást mucilaginózní hmoty vzniklé z rozpadajícího se plodu (perikarp se na bázi rozpadá) a samotná plavou jen kolem 72 hodin. Semena mají téměř stejnou hustotu jako sediment (prakticky neplavou, Barrat-Segretain, 1996). Nezdá se, že by nízká plovatelnost semen měla zásadní vliv na charakteristiku jeho rozšíření (viz též. Smits et al., 1989).

Mnoho semen zůstává dormantních několik let, řádově týdny mohou přežít i mráz (Arber, 1920; Smits et al., 1989), klíčí i ve tmě, ale mnohem lépe na světle. Zdá se, že etiolované listy může produkovat až asi 4–5 m pod hladinou a vyrůst tak z anaerobního

⁵Za tu dobu se dramaticky zvýšilo množství živin v krajině. přes 90 % toků bylo meliorováno a zkráceno a prudce pokleslo druhové bohatství. Takovýto scénář můžeme nalézt ve většině Evropy a Severní Ameriky (např. Egertson et al., 2004; Kadlec et al., 2009; Sweeney et al., 2007).

dna ke světlu a vzduchu. Rozmnožuje se jak semeny tak (převážně) klonálním růstem. Podle Barrat-Segretain (1996) je kolonizace holých habitatů extrémně pomalá a stulík se ve studovaném úseku Rhône šíří prakticky jen vegetativně.

O jeho genetické struktuře a poměru vegetativního a generativního rozmnožování se toho příliš mnoho neví. Fér and Hroudová (2008) odhalili v povodí Cidliny a Mrliny a přilehlých částech Labe jen málo dokladů vegetativního šíření na dlouhé vzdálenosti. Naopak se zdá, že důležitou roli hraje vegetativní šíření na malé škále (v rámci populace, Hart and Cox, 1995; Barrat-Segretain, 1996). O málo větší diverzita byla nalezena v dolních částech toků, což může souviset s přísunem diaspor z mnoha různých přítoků. Celkově se zdá, že převažuje šíření řekou nad transportem mezi řekami (Fér and Hroudová, 2008). Prostorová autokorelace jedinců byla pozorována až do vzdálenosti téměř 30 km.

Kapitola 3

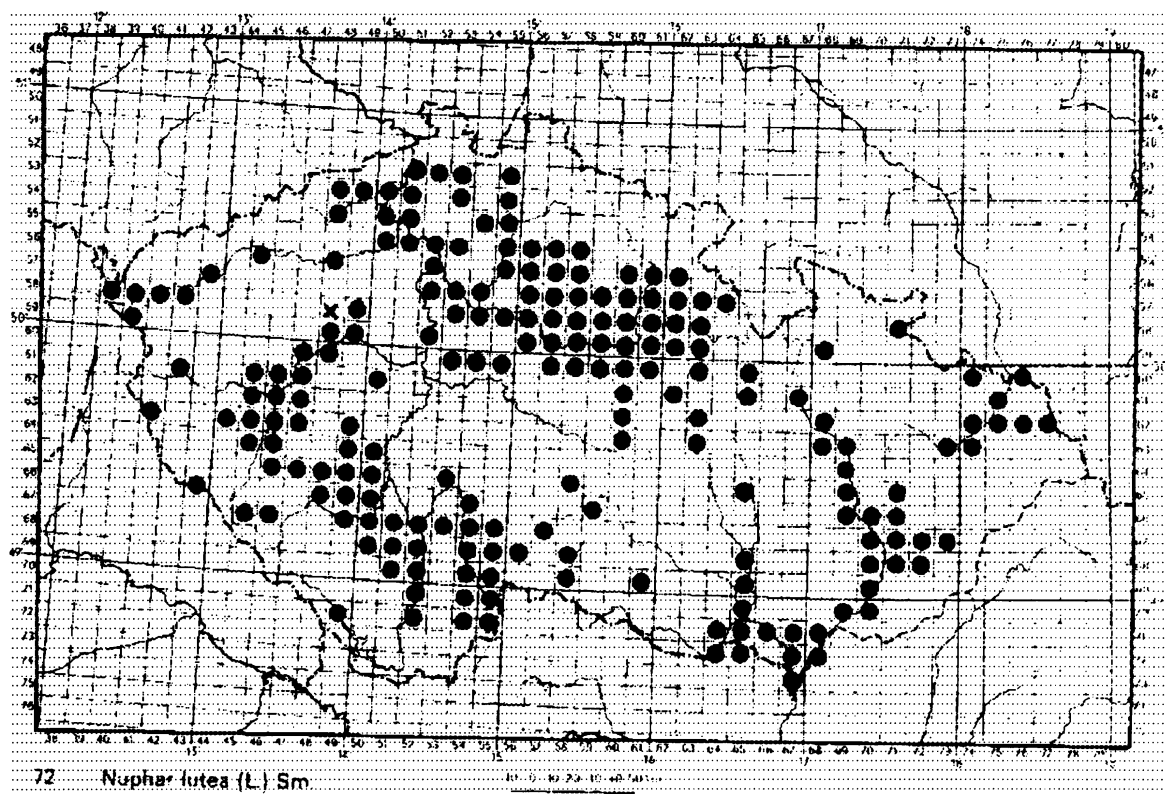
Metodika

3.1 Sběr vzorků v terénu

Z území ČR bylo odebráno 489 vzorků ze 36 populací stulíku žlutého (viz kap. 2.3 na str. 29, obr. 1, 3.5 a obr. 3.1 ukazující jeho rozšíření u nás a mapa na obr. 3.3 ukazující odebrané populace). Po jedné populaci bylo též sebráno z východního Slovenska (Latorica), NP Aukšaitijos (Aukšaitija) ve východní Litvě, Seeburger See (vesnice Seeburg, Dolní Sasko, Německo) a z jihovýchodního okraje Bruselu (řička Woluwe, Belgie, viz mapa na obr. 3.4). Byla zahrnuta i data ze 30 populací z povodí Labe z práce Fér and Hroudová (2008). Pro účely této studie byly některé ze 44 prostorově extrémně blízkých (a)nebo malých populací z práce Fér and Hroudová (2008) sloučeny do výsledných 30 populací. Šlo o populace 1–2, 3–5, 6–8, 9–10, 13–15, 21–24, 25–26, 28–29 a 30–31. Celkem bylo analyzováno 70 populací (z toho 66 z ČR). Byly zaznamenány souřadnice všech lokalit (pomocí GPS nebo později odečtem z mapy). Mapa českých lokalit je na obr. 3.3 a zahraničních na obr. 3.4, jejich stručný přehled je v tab. 3.1 a podrobnější informace na str. 111 v dodatku A. Fotografie z lokalit jsou na <http://botany.natur.cuni.cz/zeisek/galerie/lokality/>.

Podle velikosti populace bylo na každé lokalitě odebráno 2–25 vzorků (většinou 10, viz histogram na obr. 3.2 ukazující počty jedinců v populacích) listů z různých jedinců. Sběry na jednotlivých lokalitách byly provedeny formou transektu podél břehu (v závislosti na dostupnosti vzorků) a byly sbírány malé části mladších listů o ploše asi 10 cm², které byly ukládány do označených pytlíků se silikagelem (ten vzorky vysušil). Protože stulík má dlouhé řapíky se vzplývavými listy, byl z každého trsu odebrán jen jeden vzorek, aby se tak, pokud možno, předešlo odběru více vzorků z téže ramety nebo genety.

Údaje o rozšíření stulíku žlutého v ČR nejsou dostatečně komplexní. Jako základ pro získání přehledu lokalit byla použita mapa rozšíření podle Slavík (1990, obr. 3.1), terénní údaje Rydlo (1986, 1987, 1992a,b,c, 1994a,b, 1995, 1998a,b, 1999a,b, 2000a,b,c,d) a databáze Chytrý and Rafajová (2003). Velmi cenná byla osobní a e-mailová sdělení od R.NDr. Lubomíra Adamce, Ph.D. (Botanický ústav AV ČR Třeboň), Mgr. Rostislava Černého, CSc. (Katedra biologie PF JČU), Mgr. Anežky Eliášové (Katedra botaniky

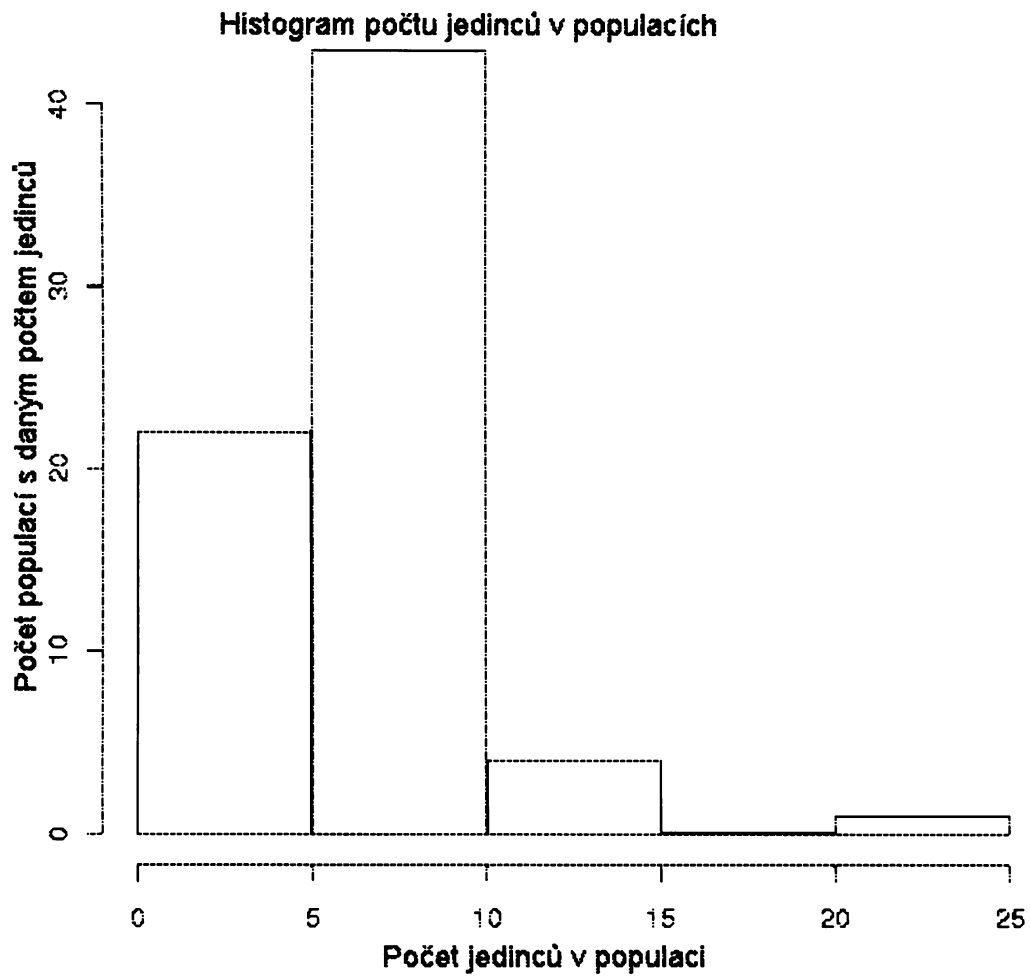


Obrázek 3.1: Mapa rozšíření stulíku žlutého v ČR podle Slavík (1990).

PřF UK), RNDr. Víta Grulich, CSc. (PřF MU), RNDr. Jana Pokorného, CSc. (PřF UK), Prof. RNDr. Karla Pracha, CSc. (Katedra botaniky PřF JČU), Mgr. Ladislava Rektorise (Správa CHKO Třeboňsko) a Mgr. Kateřiny Šumberové, Ph.D. (PřF MU), vše z roku 2007. Práce zvláště se staršími literárními údaji byla poměrně problematická, neboť mnohé lokality postupem času doznaly řady změn. Řada literárně doložených populací nebyla na lokalitách vůbec nalezena, některé lokality prakticky neexistovaly. Byl tedy proveden poměrně podrobný průzkum vytipovaných říčních úseků. Podrobnější údaje jsou v dodatku A na str. 111. Pokud není výskyt stulíku větší než několik trsů uvedený ve výše citované literatuře mezi analyzovanými populacemi nebo zmíněn v dodatku A, nemohu jeho udávaný výskyt potvrdit.

Sebrané populace (popsané v tab. 3.1 na str. 38) byly rozděleny do následujících geografických skupin:

1. CHKO Poodří, populace Kr, Be a Ge
2. Střední Morava, populace Ot, Pn, Ka, Uo, Uh a Mr
3. Jižní Morava (Dyje, soutok Moravy a Dyje), populace Br, Nz, Nj, Ne, Hr, Jl a Lp

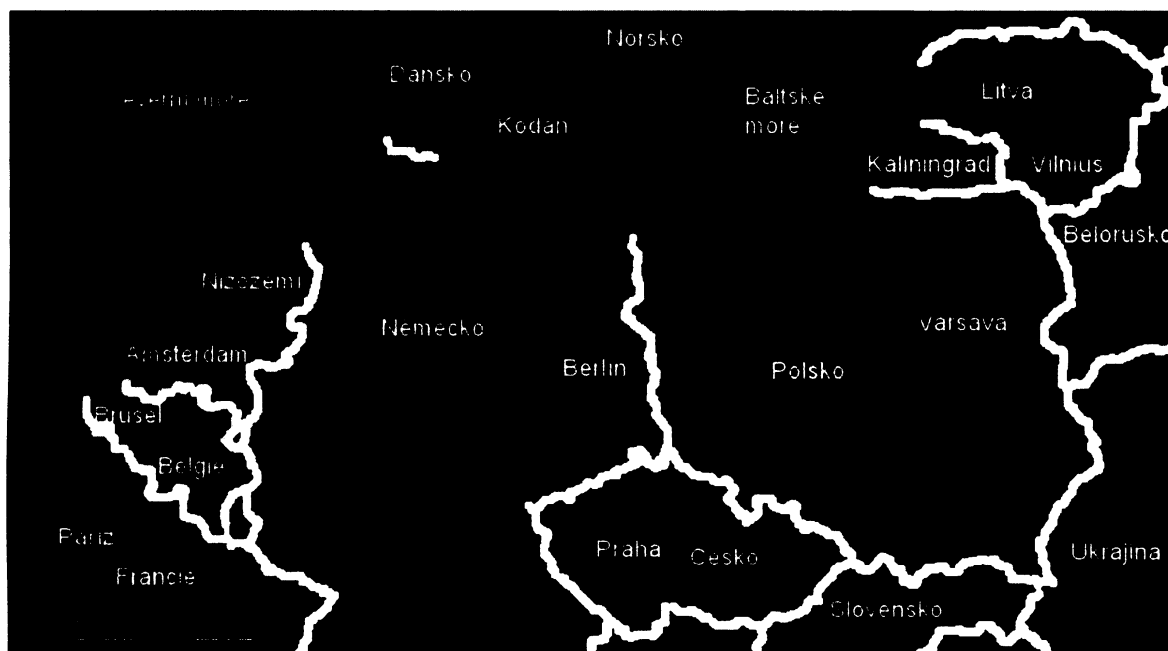


Obrázek 3.2: Histogram počtu jedinců v populacích. Málo přes 20 populací (téměř 1/3) má 5 a méně jedinců, většina jich má velikost 5–10 jedinců.



Lokality stulíku žlutého z Česka

Obrázek 3.3: Mapa sesbíraných populací stulíku žlutého z ČR. Jsou zakresleny i hlavní řeky, odkud byl stulík žlutý sbírán. Ve výřezu je část Polabí severozápadně od Prahy, kde bylo (i díky datům z Fér and Hroudová, 2008) sebráno hodně populací blízko u sebe. Červeně jsou moje vlastní sběry, zeleně lokality převzaté z Fér and Hroudová (2008). Celkem bylo v ČR sebráno 489 vzorků a 66 populací. Z Odry byly sebrány 3 populace, Z povodí Moravy 13 a z povodí Labe 50 populací. Zahraniční populace jsou na obr. 3.4. Podrobnosti jsou v tab. 3.1 a v dodatku A na str. 111.



Obrázek 3.4: Mapa ukazuje, odkud byly sebrány zahraniční populace stulíku žlutého (červené tečky). Od západu: (*Bs*): jihovýchodní okraj Bruselu (řička Woluwe, Belgie), (*Se*): jezero Seeburger See u vesnice Seeburg (asi 50 km východně od Göttingenu, Dolní Sasko, Německo), (*La*): Latorica (jihovýchodní Slovensko, pod jediným slovenským mostem přes tuto řeku) a (*Au*): NP Aukšaitija (Aukšaitijos, východní Litva u městečka Paluse). České populace jsou na obr. 3.3.

4. Lužnice, populace NV, Nm, Du a Vy
5. Nežárka, populace HZ, DZ, ZL a Ls
6. Berounka (Křivoklátsko), populace ZH, Cl, Zv a Ba
7. Ohře (Karlovarsko), populace Ky, Nb a Ch
8. Labe a Jizera, populace Pc, RL, Kt, Pt, Sj, Gr, Va a Ce
9. Mrlina a Labe, populace Ro, Nk, Ha, Ra, Pd, Po, Ny, Sm, VV, Ct, Sl a Ml
10. Cidlina a Bystřice, populace Lu, Zi, Zb, Ze, Lb, Li, Ko, Ks, Kc a SP
11. Horní Labe, populace Nc, RZ, Rc, Tl a Kl
12. Slovensko (Latorica), populace La
13. Belgie (Brusel, Woluwe), populace Bs
14. Německo (Seeburg, Seeburger See), populace Se

15. Litva (Paluse, NP Aukšaitijos), populace Au

Tabulka 3.2: Přehled lokalit stulíku žlutého. Viz též mapa na obr. 3.3 na str. 34. V prvním sloupci je zkratka populace, ve druhém řeka, ze které daná populace pochází, ve třetím povodí odpovídající úmoří (jsou hydrologicky izolovaná — až na systém Dunaje, který zahrnuje jak Moravu tak Tisu, nicméně pro potřeby práce s těmito daty je toto dělení výhodnější), dále je jméno lokality, počet vzorků a souřadnice v souřadném systému WGS84 (severní šířka a východní délka) používaném v GPS.

Zkratka	Řeka	Povodí	Lokalita	Počet	WGS84N	WGS84E
Kr	Odra	Odra	Křivý rybník	10	49,73856	18,15774
Be	Odra	Odra	Svinovské tůň	10	49,80895	18,22394
Ge	Odra	Odra	Gelnarovo jezero	9	49,75504	18,18225
Ot	Morava	Morava	Otrokovice	5	49,18714	17,51081
Pn	Morava	Morava	Pěnné u Napajedel	5	49,15390	17,51419
Ka	Morava	Morava	PR Kanada	10	49,10282	17,49297
Uo	Morava	Morava	Uherský Ostroh	10	48,98086	17,38349
Uh	Morava	Morava	Uherský Ostroh	10	48,98083	17,38033
Mr	Morava	Morava	Veselí nad Moravou	2	48,96414	17,38004
Br	Dyje	Morava	jezíčko Bruksa nad Břeclaví	10	48,76196	16,86837
Nz	Kyjovka	Morava	nejzápadnější most	10	48,65740	16,92614
Nj	Kyjovka	Morava	nejjižnější průtočný kanál	10	48,65689	16,93313
Ne	Kyjovka	Morava	2. nejjižnější most	8	48,66327	16,93287
Hr	Kyjovka	Morava	slepé rameno Hráždění	10	48,66233	16,99882
Jl	Kyjovka	Morava	rozvětvená tůň U Jelení louky	10	48,69467	16,95529
Lp	Kyjovka	Morava	mezi Jelení loukou a Rožkem	10	48,68828	16,96087
NV	Lužnice	Labe	pod Novou Vsí nad Lužnicí	9	48,81701	14,93169
Nm	Lužnice	Labe	Novořecké močály a Rozvodí	4	49,49326	14,84896
Du	Lužnice	Labe	U Dušáků	10	49,99971	14,83952
Vy	Lužnice	Labe	rybník Vyšehrad	10	49,03382	14,85255
HZ	Nežárka	Labe	Horní Žďár	10	49,11364	14,99508
DZ	Nežárka	Labe	Dolní Žďár	10	49,10142	14,98995
ZL	Nežárka	Labe	mezi Dolním Žďárem a Horní Lhotou	10	49,09583	14,98417
Ls	Nežárka	Labe	Lásenice	10	49,07500	14,67149
ZH	Berounka	Labe	mezi Zvíkovcem a Hradištěm	7	49,96718	13,71155
Cl	Berounka	Labe	Čilá	4	49,96440	13,73587
Zv	Berounka	Labe	pod Zvíkovcem	4	49,96031	13,69847
Ba	Berounka	Labe	Zvíkovec	9	49,96253	13,70153
Ky	Ohře	Labe	Kynšperk nad Ohří	9	50,12157	12,52502
Nb	Ohře	Labe	Nebanice	9	50,11175	12,47201
Ch	Ohře	Labe	Chlumek	14	50,13323	12,56905
Pc	Labe	Labe	Počápy	3	50,52286	14,19848
RL	Labe	Labe	Roudnice nad Labem	2	50,42848	14,26492
Kt	Labe	Labe	Kostelec nad Labem	6	50,23765	14,59276
Pt	Jizera	Labe	Podhradská tůň u Dalešic	3	50,46172	14,91231
Sj	Jizera	Labe	tůň Stará Jizera u Dražic	3	50,31346	14,84779
Gr	Labe	Labe	kanál Grada u Čelákovic	9	50,16933	14,74695
Va	Labe	Labe	tůň Václavka u Čelákovic	11	50,17977	14,77232
Ce	Labe	Labe	Čelákovice	6	50,16778	14,75253
Ro	Mrlina	Labe	pod Rožďalovicemi	6	50,29294	15,17063
Nk	Mrlina	Labe	Nové Zámky	3	50,27926	15,16045
Ha	Mrlina	Labe	Havransko	8	50,22581	15,13593
Ra	Mrlina	Labe	Rašovice	8	50,20426	15,11458
Pd	Labe	Labe	Poděbrady	6	50,14163	15,11629
Po	Labe	Labe	mezi Poděbrady a Nymburkem	10	50,18405	15,06563

Zkratka	Řeka	Povodí	Lokalita	Počet	WGS84N	WGS84E
Ny	Labe	Labe	Nymburk	6	50,18394	15,04223
Sm	Javorka	Labe	Smidary	4	50,29455	15,48781
VV	Cidlina	Labe	Vysoké Veselí	7	50,33783	15,42675
Ct	Cidlina	Labe	Chotělice (u Smidar)	7	50,29990	15,47398
Sl	Cidlina	Labe	Sloupno, Skřivany, Metličany	11	50,25589	15,50420
Ml	Cidlina	Labe	Mlékosrby	9	50,19466	15,49937
Lu	Cidlina	Labe	Loukonosy	5	50,12333	15,42569
Zi	Cidlina	Labe	Žiželice	3	50,13222	15,40181
Zb	Cidlina	Labe	Zbraň	6	50,14102	15,36578
Ze	Cidlina	Labe	Žehuňský rybník	2	50,14266	15,28977
Lb	Cidlina	Labe	Libice nad Cidlinou	5	50,12228	15,17320
Li	Cidlina	Labe	mezi Libicí nad Cidlinou a Labem	25	50,12241	15,16174
Ko	Bystřice	Labe	Kosičky	10	50,17630	15,54691
Ks	Bystřice	Labe	okolí Kosiček	10	50,17540	15,56744
Kc	Bystřice	Labe	Kosice	6	50,17615	15,53307
SP	Bystřice	Labe	mezi Sobětuší a Popovicemi	2	50,25657	15,67880
Nc	Labe	Labe	Němčice	5	50,09522	15,80679
RZ	Labe	Labe	Rosice-Zákoutí	3	50,04289	15,72790
Rc	Labe	Labe	Řečany nad Labem	2	50,04111	15,47834
TL	Labe	Labe	Týnec nad Labem	3	50,03851	15,35943
Kl	Labe	Labe	Kolín	6	50,02995	15,20801
La	Latorica	Tisa, Dunaj	most přes Latoricu (Slovensko)	5	48,50043	22,04970
Bs	Woluwe	Schelde (Šelda)	východní okraj Bruselu (Belgie)	15	50,83085	4,43382
Se	Hahle	Rhume	Seeburger See (Německo)	10	51,56377	10,15980
Au	Nemen	Nemen	Aukšaitijos (Aukšaitija, Litva)	9	55,34853	26,07889

3.2 Klonální struktura populací

Cílený transekt na zjištění klonální struktury, při kterém byly sebrány vzorky ze všech trsů (ramet) byl proveden v populacích Libice nad Cidlinou (Li) a Chlumecký (Ch, Ohře). V populaci Li bylo sebráno 25 vzorků, v populaci Ch 14 vzorků. V případě populace Li šlo o delší rovný úsek regulované řeky, strmý břeh je zarostlý křovinami. Populace Ch byla sbírána v lužním lese z tůně (zjevně bývalé slepé rameno, pravděpodobně pravidelně spojené s řekou, 5 vzorků) a z přilehlého dlouhého úzkého kanálu mířícího kolmo od řeky (9 vzorků). V Cidlině voda proudí poměrně rychle a řeka je regulovaná a udržovaná (čištěná), zatímco v tůni a kanálu na Ohři je voda stojatá, tok je z nemalé části neregulovaný a kolem se rozkládá občas zaplavovaný lužní les. Břeh je neupravovaný, časté jsou padlé stromy (a)nebo stromy a keře rostoucí částečně ve vodě. Ty se odstraňují jen z hlavního koryta. Jde tak o různá, pro stulík žlutý typická, prostředí.

Z ostatních populací bylo většinou sebráno výrazně méně vzorků, než bylo trsů. Vzorky z většiny trsů byly sebrány z populace Nb (Ohře, Nebanice). Poměrně dobrou představu o genetické variabilitě v rámci populací představují i populace Ls (Nežárka, Lásenice), Br (Dyje, jezírko Bruksa u Břeclavi¹), Nz, Nj, Ne² a Lp (Kyjovka), dále Gr (kanál Grada

¹Jeden břeh podlouhlého jezírka je dobře přístupný, ten byl prosbírán víceméně celý, protější strana je hustě zarostlá rákosím, nepřístupná a z ní sběry nejsou.

²Na rozdíl od ostatních populací z Kyjovky šlo o rychle proudící vodu pod jezem. Ostatní populace z Kyjovky byly sebrány z pomalu tekoucí řeky nebo z přilehlých tůní a ramen se stojatou vodou.

Tabulka 3.1: Přehled analyzovaných populací stulíku žlutého. V prvním sloupci jsou povodí, ve druhém jednotlivé řeky, ve třetím zkratky populací z daných řek a v posledním sloupci je počet vzorků z každé řeky. České populace jsou vidět na mapě na obr. 3.3, zahraniční na obr. 3.4. Podrobnější informace jsou v dodatku A na str. 111. V rámci ČR byly sebrány vzorky z povodí Odry, Moravy i Labe. Celkem bylo analyzováno 528 vzorků (z toho 489 z ČR) ze 70 populací (z toho 66 z ČR). Z práce Fér and Hroudová (2008) bylo přebráno 156 vzorků (30 populací) z povodí Labe. Rozdělení do geografických oblastí je v seznamu na str. 32. Fotografie z lokalit jsou na webové adrese <http://botany.natur.cuni.cz/zeisek/galerie/lokality/>.

Povodí	Řeka	Zkratky populací	Počet vzorků
Odra	Odra	Kr, Ge, Be	29
Morava	Morava	Ot, Pn, Ka, Uo, Uh, Mr	42
	Dyje	Br	10
	Kyjovka	Nz, Nj, Ne, Hr, Jl, Lp	58
Labe	Lužnice	NV, Nm, Du, Vy	33
	Nežárka	HZ, DZ, ZL, Ls	40
	Berounka	ZH, Cl, ZV, Ba	24
	Ohře	Ky, Nb, Ch	32
	Labe	Pc, Rl, Kt, Gr, Va, Ce, Pd, Po, Ny, Nc, RZ, Rc, TL, Kl	78
	Jizera	Pt, Sj	6
	Mrlina	Ro, Nk, Ha, Ra	25
	Javorka	Sm	4
	Cidlina	VV, Ct, Sl, Ml, Lu, Zi, Zb, Ze, Lb, Li	80
Bystřice	Ko, Ks, Kc, SP	28	
Latorica	Tisa	La (Slovensko)	5
Woluwe	Schelde (Šelda)	Br (Brusel, Belgie)	15
Hahle	Rhume	Se (Seeburg, Německo)	10
Neman (Nemen)	Neman (Nemen)	Au (Paluse, Litva)	9



Obrázek 3.5: Ukázky z lokalit, kde byl sbírán stulík žlutý. (A) tůň u Staré řeky (původní tok Lužnice) u samoty U Dušáků, 16. 8. 2007. (B) Kyjovka v oboře Soutok (soutok Moravy a Dyje) u nejzápadnějšího mostu přes Kyjovku, 20. 8. 2007. Další fotografie z lokalit jsou na webové adrese <http://botany.natur.cuni.cz/zeisek/galerie/lokality/>.

u Čelákovic, Labe), Va (tůň Václavka u Čelákovic), Ko (Kosičky, Bystřice) a populace z Berounky: Cl (Čilí) a Ba, ZH a Zv z okolí Zvíkovce, které ale byly celkově relativně malé.

Vzhledem k vysoké specificitě a spolehlivosti mikrosatelitů (Jarne and Lagoda, 1996; Balloux and Lugon-Moulin, 2002) a pravděpodobnosti toho, že dva vzorky s identickým genotypem jej získali jen náhodou nezávisle na sobě, vzorky, které mají úplně stejné alely ve všech 10 lokusech mohou být nazývány „klony“. Klonální jedinci a jedinci lišící se o jednu alelu byli hledáni pomocí programu GenClone (Arnaud-Haond and Belkhir, 2007). Stejný program byl použit i pro odhad pravděpodobnosti, že dva jedinci s identickým genotypem si nejsou příbuzní a mají stejné alelické složení nezávislým sexuálním procesem (P_{sex} , Arnaud-Haond et al., 2007a). Všechny výpočty byly testovány 1 000 permutacemi.

3.3 Laboratorní zpracování vzorků

Kompletní protokoly jsou v dodatku C na str. 117. Vzorky byly zpracovávány v laboratoři DNA Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (<http://botany.natur.cuni.cz/dna/>). Po vysušení v silikagelu bylo asi 10 mg listů použito k extrakci DNA metodou CTAB (Doyle and Doyle, 1987) a rozpuštěno v $1 \times TE$ pufru. Následně byla změřena koncentrace získané DNA na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf) a DNA byla dvakrát redestilovanou vodou (ddH_2O) naředěna na koncentraci $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Takto naředěná DNA byla následně použita k polymerase chain reaction (PCR). Mikrosatelitová analýza byla provedena s využitím PCR v objemu $10 \mu\text{l}$ (viz tab. C.3) s 10 páry fluorescentně značených primerů (Ouborg et al., 2000), viz tab. 3.3). Forward primery jsou značeny třemi fluorescenčními barvami (HEX, NED a 6-FAM), 4. (červená) slouží pro délkový standard. Zprvu byla míchána reakční směs v objemu $6,75 \mu\text{l}$ ddH_2O , $1 \mu\text{l}$ pufru pro RED Taq (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), $0,15 \mu\text{l}$ forward a reverse primeru (forward primer byl fluorescentně značen), $0,25 \mu\text{l}$ RED Taq DNA polymerázy (Sigma) a $1,5 \mu\text{l}$ naředěné DNA. Primery měly koncentraci $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Později byla používána předpřipravená reakční směs RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) v objemu $5 \mu\text{l}$ Reaction Mixu, $0,15 \mu\text{l}$ forward a reverse primeru (forward primer byl fluorescentně značen), $3,2 \mu\text{l}$ ddH_2O a $1,5 \mu\text{l}$ naředěné DNA. Tento postup je prakticky stejný jako předchozí, je ale jednodušší, rychlejší a předpřipravený kit je levnější než míchání jednotlivých složek. Bylo otestováno, že oba dva postupy dávají shodný výsledek.

Lokusy byly amplifikovány v Mastercycler ep gradient S thermal cykleru (Eppendorf, Hamburg) za následujících podmínek: 94°C 1 minuta, $35 \times 94^\circ\text{C}$ 40 sekund, 50°C 40 sekund a 72°C 50 sekund. Nakonec 72°C 15 minut a 10°C do otevření víka. Pro podrobnosti viz protokoly na str. 118.

Byla prováděna zvláštní PCR s každým primerem zvlášť. Tento postup byl spoleh-

Tabulka 3.3: Přehled 10 párů selektivních jaderných mikrosatelitových primerů pro zástupce rodu *Nuphar* (Ouborg et al., 2000). V prvním sloupci je jméno lokusu, ve druhém motiv opakování (tandemová repetice na DNA), dále forward a reverse primer (sekvence každého páru selektivních primerů). V posledním sloupci je přístupové číslo z GenBank. Teplota annealingu je pro všechny primery 55°C (viz též tab. C.3 na str. 120 popisující průběh PCR).

Lokus	Motiv opakování	Forward primer
NL GA1	(GA)32	CTGAATATTAACCGATTAGCTCC
NL GA2	(GA)37	CTTTAGGAGGGTCTTTAGC
NL GA3	(GA)23	GTTGTAACGTAAATGCCGTC
NL GA4	(GA)23	GCTTCTCTCAGAACAATGGG
NL GA5	(GA)12	CCCGCCATATCTGATGAC
NL GA6	(GA)11	GACGACGGAGTCAGTTCC
NL GA7	(GA)24	ATTTATTCCCAGCACTTTGG
NL GA8	(GA)23	CATCTCAAATTCACATTCAGC
NL CA1	(CA)27	CTCAGAAACGAGGCTCTATG
NL TG/GA1	(GT)8(TG)14(GA)9	AAGCAGCAGCAAATTTGTA

Lokus	Reverse primer	Barva	GenBank
NL GA1	GCTTAGTGACTCAACCAGGTC	HEX	AF136638
NL GA2	CCAATCTCTAGTAGGAGGAGC	NED	AF135840
NL GA3	CTTGCCGATGAAACCCAT	6-FAM	AF136640
NL GA4	CCCTAGTTTGGAAAGGGTTG	HEX	AF136641
NL GA5	AAGTGGAGGGGACGAAAG	NED	AF136642
NL GA6	GTTGAACAATTTGGGTGTTG	6-FAM	AF136643
NL GA7	CTTGACATGATTTCTCTGAACC	HEX	AF137266
NL GA8	GACTTGATAAGGTTGGTGAGG	NED	AF137267
NL CA1	TTTGGTTGGAAGACAAGAAG	6-FAM	AF137265
NL TG/GA1	TGTGCAAGTTACCTGTTTCC	HEX	AF136639



livější než příprava multiplexů s několika primery. Po PCR byly alely pro kontrolu vizualizovány pomocí agarózové elektroforézy s použitím ethidium bromidu ke zviditelnění DNA v UV světle speciální kamerou Kodak Gel Logic 100. Pokud byly proužky viditelné a byly v pozici odpovídající délkovému rozsahu alel, PCR fragmenty byly přesráženy se standardem GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) a vizualizovány s využitím automatického sekvenátoru ABI 3100 Avant Genetic Analyzer nebo ABI 3130 Genetic Analyzer v sekvenační laboratoři biologické sekce PřF UK (<http://www.natur.cuni.cz/~seqlab/>). Analýza na sekvenátoru nám umožňuje dosáhnout mnohem kvalitnějších a spolehlivějších výsledků než běžná elektroforéza. Podrobnější postup je v dodatku C.3 na str. 119.

3.4 Vyhodnocení primárních dat

Veškerý použitý software včetně odkazů na domovské stránky je uveden v dodatku B na str. 115. Primární data ze sekvenátoru byla analyzována pomocí demo verze programu GeneMarker (SoftGenetics, LLC., State College, PA, U.S.A.) a údaje o velikosti alel v jednotlivých lokusech byly zapsány do tabulky (viz str. 123). Tato tabulka byla upravena a sloužila jako výchozí zdroj dat pro další zpracování. Populace byly analyzovány ve dvou skupinách: (1) všechny dohromady a (2) pouze české. V Polabí je u nás stulík asi nejrozšířenější a i díky datům z Fér and Hroudová (2008) byla z této oblasti k dispozici téměř třetina všech vzorků. Polabí tvoří asi největší oblast souvislého výskytu stulíku žlutého v ČR. Pro potřeby analýz bylo rozděleno do několika oblastí podél řek (viz str. 32).

Při slučování mých vlastních dat a dat z Fér and Hroudová (2008) nastal problém u lokusů GA1 a GA7, kde Fér and Hroudová (2008) udávají sudé hodnoty, zatímco já liché (viz tab. 4.2). Jde jen o technický artefakt daný zaokrouhlováním dat. Sekvenátor vrací hodnotu s přesností na desetinu délky báze, pro analýzu je ale potřeba mít délky zaokrouhleny na celé báze, zaokrouhlení je tak do jisté míry arbitrární a je nutné jej sjednotit. To bylo vyřešeno otevřením původních dat Fér and Hroudová (2008) v programu GeneMarker, porovnáním s mými vlastními daty a lokusy GA1 a GA7 z Fér and Hroudová (2008) byly posunuty o 1 (k jejich délce bylo přičtena jednotka), aby jejich skórování odpovídalo skórování mých dat.

Párová genetická vzdálenost Nei's chord distance (Nei et al., 1983) mezi jedinci byla určena pomocí programu MicroSatellite Analyser (MSA, Dieringer and Schlötterer, 2003). Dále byly spočítány minimální a maximální délky, počty a frekvence jednotlivých alel, pozorovaná a očekávaná heterozygosita populací. Všechny výpočty byly testovány permutačním testem o 100 000 permutacích. Nakonec byl vygenerován vstupní soubor pro program Arlequin (Excoffier et al., 2006).

Analýza molekulární variance (AMOVA, Excoffier et al., 1992) pro zjištění rozdělení genetické variability v rámci populací, mezi populacemi a mezi skupinami populací (většími

geografickými oblastmi, povodími) byla provedena v programu Arlequin (Excoffier et al., 2006). AMOVA byla počítána jako F_{ST} (Weir and Cockerham, 1984) i R_{ST} , tedy na základě frekvence sdílených alel i na základě čtverce rozdílu mezi délkami alel. Na základě F_{ST} byla počítána AMOVA i rámci jednotlivých povodí (Odry, Moravy a Labe). Fixační index F -statistiky F_{ST} byl počítán na základě podílu shodných alel. Všechny výpočty byly testovány 10 000 permutacemi.

Mnohorozměrná analýza pomocí techniky PCoA (principal coordinate analysis) zobrazující shluky geneticky podobných jedinců byla provedena v programu SYNTAX 2000 (Podani, 2001). Výsledný graf pak byl nakreslen pomocí OpenOffice.org Calc (Sun Microsystems Inc.). Díky této analýze můžeme vidět, jestli nějaká skupina jedinců, která je geograficky oddělena od ostatních tvoří samostatný shluk geneticky podobných jedinců. PCoA byla počítána s pouze českými vzorky a v rámci jednotlivých českých povodí (Odry, Moravy a Labe).

Bayesiánské shlukování (Corander and Marttinen, 2007) jedinců pro odhalení celkové genetické struktury bylo provedeno v programu BAPS 3.2 (Corander and Marttinen, 2007). Algoritmus využívá stochastickou optimalizaci k odhalení posteriorního stavu genetické struktury: hledá počet shluků s nejvyšší pravděpodobností modelu. Maximální počty bayesiánských shluků byly určeny po jednom od 1 do 40, pro každé nastavení (pro každý počet skupin) byl výpočet desetkrát opakován.

Populační struktura byla zjišťována i v programu Structure (Falush et al., 2007). Structure se snaží tvořit shluky jedinců na základě modelu minimalizace odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a minimalizací nerovnováhy v zastoupení jednotlivých alel (linkage disequilibrium, Falush et al., 2003). Bylo použito výchozí nastavení. Burn-in řetězec měl délku 100 000 kroků a bylo provedeno celkem 1 000 000 kroků. Předem daný počet skupin (K) byl 1–10, pro každý počet (pro každé K) výpočet běžel 10×. Výpočty byly prováděny na speciálním volně dostupném clusteru (bioportál univerzity v norském Oslo, Shalchian-Tabrizi et al., 2004, <http://www.biportal.uio.no/>). Jeho výstupy byly zpracovány pomocí statistického balíku R (R Development Core Team, 2008) a skriptu Sstructure-sum.R (Ehrich et al., 2007) sloužícímu k určení nejlepšího počtu genetických skupin a přípravě dat pro tvorbu grafického výstupu pomocí dalších programů. Skript sloužil k výpočtu koeficientů podobnosti mezi jednotlivými běhy algoritmu Structure (Nordborg et al., 2005) a k určení optimálního počtu přirozených shluků (Evano et al., 2005). Dále byl použit CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007) upravující data do formátu pro nakreslení výsledného obrázku pomocí programu Distruct (Rosenberg, 2004).

Vztahy mezi prostorovými a genetickými vzdálenostmi pro zjištění míry prostorové autokorelace byly počítány pomocí programu SPAGeDi (Hardy and Vekemans, 2002) a párového koeficientu Moranovo I mezi jedinci (Hardy and Vekemans, 1999). Pro tuto analýzu byly použity pouze vzorky z ČR. Byly počítány následující matice: (1) vzorky z celé ČR, (2) vzorky z celého povodí Moravy a (3) vzorky z celého povodí Labe. Bylo počítáno s přímými geografickými vzdálenostmi (získanými pomocí softwarového balíku ArcGIS, Esri). Byly použity následující vzdálenostní třídy (maximální vzdálenost): Pro

populace z celé ČR 0,8, 4,5, 10, 20, 45, 65, 100, 165, 250, 350 a 500 km, pro populace z povodí Moravy 0,8, 4,5, 10, 20, 45, 65 a 100 km a pro povodí Labe 0,8, 4,5, 10, 20, 45, 65, 100, 165 a 250 km. Standardní chyby koeficientů vzdálenosti byly odhadnuty procedurou jackknife (15 000 opakování). Výpočty byly testovány 15 000 permutacemi.

3.5 Klíčení oddenkových úlomků

O oddenkových úlomcích stulíku se běžně uvažuje jako o možném dispersním agens (Arber, 1920; Heslop-Harrison, 1955). Cílem pokusu bylo zjistit, jak tyto úlomky přežívají, mohli se stát základem pro novou rostlinu a sloužit tak k šíření. Pokus byl proveden mezi dubnem a červnem 2008 v laboratoři Prof. Ludwiga Triesta Algemene Plantkunde en Natuurbeheer (APNA, Plant Biology and Nature Management, <http://www.vub.ac.be/APNA/>), Vrije Universiteit Brussel, Belgie během mého pobytu na projektu Erasmus/LLP.



Obrázek 3.6: Bruselské parkové jezírko Etang de Boitsfort, jedna ze dvou lokalit pro odběr vzorků oddenkových úlomků.

Oddenky byly sbírány 17. 4. 2008 v bruselských parkových jezírkách Bemel (Woluwe park) a Etang de Boitsfort (viz obr. 3.6). Oddenky prorůstaly dnem s množstvím bahna, kamenů a pletiv na stabilizaci dna, byly sekány zahradním rýčem a tahány ven hráběmi,

což mělo simulovat větší přírodní disturbanci (jarní povodně, lámání ledu a jeho drhnutí o dno). Díky dlouhým a bohatým kořenům držely i nasekané oddenky stále pevně ve dně a sběr byl velice obtížný.



Obrázek 3.7: Ukázka části oddenkových úlomků stulíku žlutého nasbíraných v bruselských parkových jezírkách Bemel (Woluwe park) a Etang de Boitsfort 17. 4. 2008.

Celkem bylo sebráno 61 úlomků: 2 kusy o průměru 5 cm dlouhé 10 a 15 cm, 6 kusů o průměru 3 cm a délce 5–20 cm (z toho 3 delší úlomky měly listy), 2 kusy o průměru 2 cm a délce 3 a 5 cm (s listy), 9 kusů menšího základu listové růžice s listy, 4 kusy základů listové růžice bez listů a 38 malých úlomků stonků s řapíky. Pro ukázkou viz obr. 3.7. Vzhledem k malému počtu nesourodých vzorků (kvůli obtížnosti sběru se nepodařilo získat dostatek materiálu) nebyl výsledek statisticky zpracováván.

Oddenky byly ponechány ve dvou otevřených plastových nádržích (cca 60×60 cm, viz obr. 3.8) na střeše univerzity³ (bez jakékoliv ochrany proti atmosférickým vlivům), voda byla podle potřeby po několika dnech doplňována z vodovodu (bez úprav nebo přísady živin).

³Je tam skleník a prostor pro experimenty.



Obrázek 3.8: Jedna ze dvou plastových beden, ve které byly volně ve vodě po 7 týdnech ponechány oddenkové úlomky stulíku nasbírané 17. 4. 2008 v bruselských parkových jezírkách Bemel (Woluwe park) a Etang de Boitsfort.

3.6 Klíčivost semen

Cílem pokusu bylo zjistit, za jakých podmínek a jak dobře klíčí semena stulíku žlutého. 11. 9. 2006 bylo v Cidlině mezi Libicí nad Cidlinou a soutokem s Labem (populace Li) sebráno celkem osm zralých plodů stulíku žlutého. Plody byly umístěny v pokojových podmínkách v miskách s vodou dokud se nerozpadly na jednotlivá semena. Ta byla dlouhodobě stratifikovaná v epruvětách v temnu v lednici při 10°C. 16. 3. 2007 byla semena přenesena do velkých Petriho misek. Z každého plodu byla polovina semen dána do vody a byla klíčena v kultivačním boxu na Katedře botaniky PřF UK v režimu teplot 25°C přes den a 10°C v noci. Druhá polovina semen byla klíčena v miskách s vodou za oknem orientovaným směrem k jihu.

23. 4. 2007 byly z misek v kultivačním boxu odebrány 2 skupiny po 20 semenech a byly

vloženy do nových misek (taktéž v kultivačním boxu). K první skupině byla vložena hlína a trs trávy, druhá skupina byla pomocí smirkového papíru jemně povrchově narušena. Obojí mělo simulovat poškození semen v přírodním prostředí a podpořit tak klíčivost.

31. 5. 2007 byla všechna neklíčící semena přenesena do děravých plastových misek naplněných do poloviny hlínou s pískem a přikrytých jemným plastovým pletivem. Ty byly vloženy do bazénku v Ústavu botaniky AV ČR v Průhonicích (<http://ibot.cas.cz/>). Misky byly na svých místech ponechány až do jara 2008, kdy byla zaznamenána velká klíčivost a 3.–8. 7. 2008 byly odebrány klíčící rostlinky. Neklíčící semena byla vrácena do jedné misky zpět do bazénku a ponechány na místě do jara 2009.

Kapitola 4

Výsledky

Bylo analyzováno celkem 528 vzorků stulíku žlutého (*Nuphar lutea* (L) Sm.) z 66 českých a 4 zahraničních (Slovensko, Německo, Belgie a Litva) populací. Vzorky byly sebrány ze 13 českých a 4 zahraničních řek z úmoří Severního, Baltského a Černého moře. Vzorky byly analyzovány technikou mikrosatelitových jaderných primerů a dále zpracovány matematickými metodami.

4.1 Molekulární analýzy

Ne ve všech jedincích se podařilo detekovat alely ze všech lokusů. Chybějící data se vyskytovala ve 20 jedincích. V těch byly detekovány alely v 6–9 lokusech. Očekávaná heterozygosita byla 0,502–0,901, pozorovaná 0,263–0,551, alel bylo v každém lokusu nalezeno 6–23. Celkem bylo nalezeno 192 různých alel (vše i s daty z [\(1999\)](#), [\(2000\)](#)). V populacích bylo nalezeno 19–52 alel, očekávaná heterozygosita v rámci populací byla 0,1–0,78, v rámci oblastí 0,31–0,75. Tab. 4.1 porovnává očekávanou heterozygositu mezi jednotlivými populacemi a oblastmi. Tab. 4.2 porovnává základní charakteristiky mezi datovým souborem [\(1999, 2000\)](#), v této práci byly publikovány použité mikrosatelitové jaderné primery), kde jsou data z nizozemských řek, [\(1999\)](#), kde jsou data z Polabí a mými vlastními daty (bez dat převzatých z [\(1999\)](#), [\(2000\)](#)) z celé ČR, Slovenska, Belgie, Německa a Litvy. Moje data mají ve většině lokusů nejvyšší počty a délkové rozsahy alel. Velké rozdíly jsou v heterozygositě, a to jak mezi očekávanou a pozorovanou, tak mezi různými autory. U mých dat obecně vychází velice vysoká očekávaná heterozygosita, ale pozorovaná heterozygosita je oproti tomu — i oproti [\(1999\)](#) a [\(2000\)](#) — velmi nízká.

Přehled délkového rozsahu alel pro všechny populace ukazuje krabicový graf na obr. 4.1. Většina alel je relativně vzácná. Ve většině lokusů i populací bylo malé množství četných alel a větší množství vzácných, vyskytujících se jen v několika populacích. Obecně vzácné alely mají v některých jednotlivých populacích vysokou frekvenci výskytu (viz obr. 4.2 a 4.3). Některé alely byly specifické jen pro určité populace: GA1 131 pro La, GA1 173

pro Ze, GA1 175 pro RL, GA3 134 pro Be, GA6 252 pro Ze a GA2 78 pro La. V těchto případech šlo o řádově jednotkové výskyty, které zjevně nemají větší význam. Žádná alela nebyla specifická pro nějakým způsobem geograficky související skupinu populací.

Tabulka 4.1: Základní porovnání jednotlivých populací a oblastí. První tři sloupce ukazují povodí, geografickou oblast a jednotlivé populace. Dále je počet alel přes všechny lokusy (4. sloupec) v dané populaci a očekávaná heterozygosita (H_E) v rámci populací (5. sloupec) a v rámci geografických oblastí (6. sloupec).

Povodí	Oblast	Populace	Počet alel	H_E v rámci populací	H_E v rámci oblastí
Odra	Poodří	Kr	22	0,23	0,4
Odra	Poodří	Be	35	0,46	
Odra	Poodří	Ge	34	0,51	
Morava	Střední Morava	Ot	22	0,33	0,49
Morava	Střední Morava	Pn	24	0,41	
Morava	Střední Morava	Ka	26	0,43	
Morava	Střední Morava	Uo	41	0,57	
Morava	Střední Morava	Uh	40	0,57	
Morava	Střední Morava	Mr	23	0,62	
Morava	Střední Morava	Br	44	0,56	
Morava	Jižní Morava	Nz	51	0,64	0,58
Morava	Jižní Morava	Nj	45	0,59	
Morava	Jižní Morava	ne	45	0,62	
Morava	Jižní Morava	Hr	34	0,51	
Morava	Jižní Morava	Jl	38	0,54	
Morava	Jižní Morava	Lp	37	0,6	
Morava	Jižní Morava	NV	20	0,24	
Labe	Lužnice	Nm	19	0,31	0,33
Labe	Lužnice	Du	35	0,48	
Labe	Lužnice	Vy	22	0,29	
Labe	Lužnice	Hz	27	0,38	
Labe	Nežárka	DZ	25	0,36	0,31
Labe	Nežárka	ZL	19	0,2	
Labe	Nežárka	Ls	19	0,29	
Labe	Nežárka	ZH	26	0,39	
Labe	Berounka	Cl	26	0,52	0,5
Labe	Berounka	Zv	29	0,53	
Labe	Berounka	Ba	37	0,56	
Labe	Berounka	Ky	37	0,58	
Labe	Ohře	Nb	43	0,68	0,65

Povodí	Oblast	Populace	Počet alel	H_E v rámci populací	H_E v rámci oblastí	
Labe	Ohře	Ch	52	0,68		
Labe	Labe a Jizera	Pc	25	0,55	0,58	
Labe	Labe a Jizera	RL	23	0,6		
Labe	Labe a Jizera	Kt	37	0,64		
Labe	Labe a Jizera	Pt	29	0,63		
Labe	Labe a Jizera	Sj	28	0,62		
Labe	Labe a Jizera	Gr	32	0,49		
Labe	Labe a Jizera	Va	33	0,47		
Labe	Labe a Jizera	Ce	39	0,62		
Labe	Mrlina a Labe	Ro	28	0,42		0,56
Labe	Mrlina a Labe	Nk	24	0,49		
Labe	Mrlina a Labe	Ha	39	0,53		
Labe	Mrlina a Labe	Ra	37	0,52		
Labe	Mrlina a Labe	Pd	48	0,71		
Labe	Mrlina a Labe	po	47	0,64		
Labe	Mrlina a Labe	Ny	41	0,63		
Labe	Mrlina a Labe	Sm	12	0,1		
Labe	Mrlina a Labe	VV	19	0,31		
Labe	Mrlina a Labe	Ct	30	0,45		
Labe	Mrlina a Labe	Sl	34	0,47		
Labe	Mrlina a Labe	Ml	33	0,5		
Labe	Cidlina a Bystřice	Lu	30	0,55	0,42	
Labe	Cidlina a Bystřice	Zi	30	0,55		
Labe	Cidlina a Bystřice	Zb	33	0,57		
Labe	Cidlina a Bystřice	Ze	19	0,5		
Labe	Cidlina a Bystřice	Lb	25	0,39		
Labe	Cidlina a Bystřice	Li	32	0,38		
Labe	Cidlina a Bystřice	Ko	33	0,44		
Labe	Cidlina a Bystřice	Ks	32	0,47		
Labe	Cidlina a Bystřice	Kc	34	0,58		
Labe	Cidlina a Bystřice	SP	11	0,05		
Labe	Horní Labe	Nc	25	0,47	0,54	
Labe	Horní Labe	RZ	16	0,3		
Labe	Horní Labe	Rc	22	0,6		
Labe	Horní Labe	TL	29	0,67		
Labe	Horní Labe	Kl	42	0,64		
Tisa	Slovensko	La	37	0,75	0,75	
Schelde	Belgie	Bs	41	0,49	0,49	

Povodí	Oblast	Populace	Počet alel	H_E v rámci populací	H_E v rámci oblastí
Rhume	Německo	Se	33	0,5	0,5
Neman	Litva	Au	57	0,75	0,75

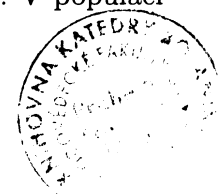
Tabulka 4.2: Porovnání délkového rozsahu alel, počtu alel, očekávané (H_E) a pozorované (H_O) heterozygoty mezi pracemi *Populus euphratica* (L.) (O) z Nizozemí, *Populus euphratica* (L.) (F) z Polabí a mými vlastními daty (Z) z celé ČR, Slovenska, Belgie, Německa a Litvy pro jednotlivé lokusy (ve sloupcích).

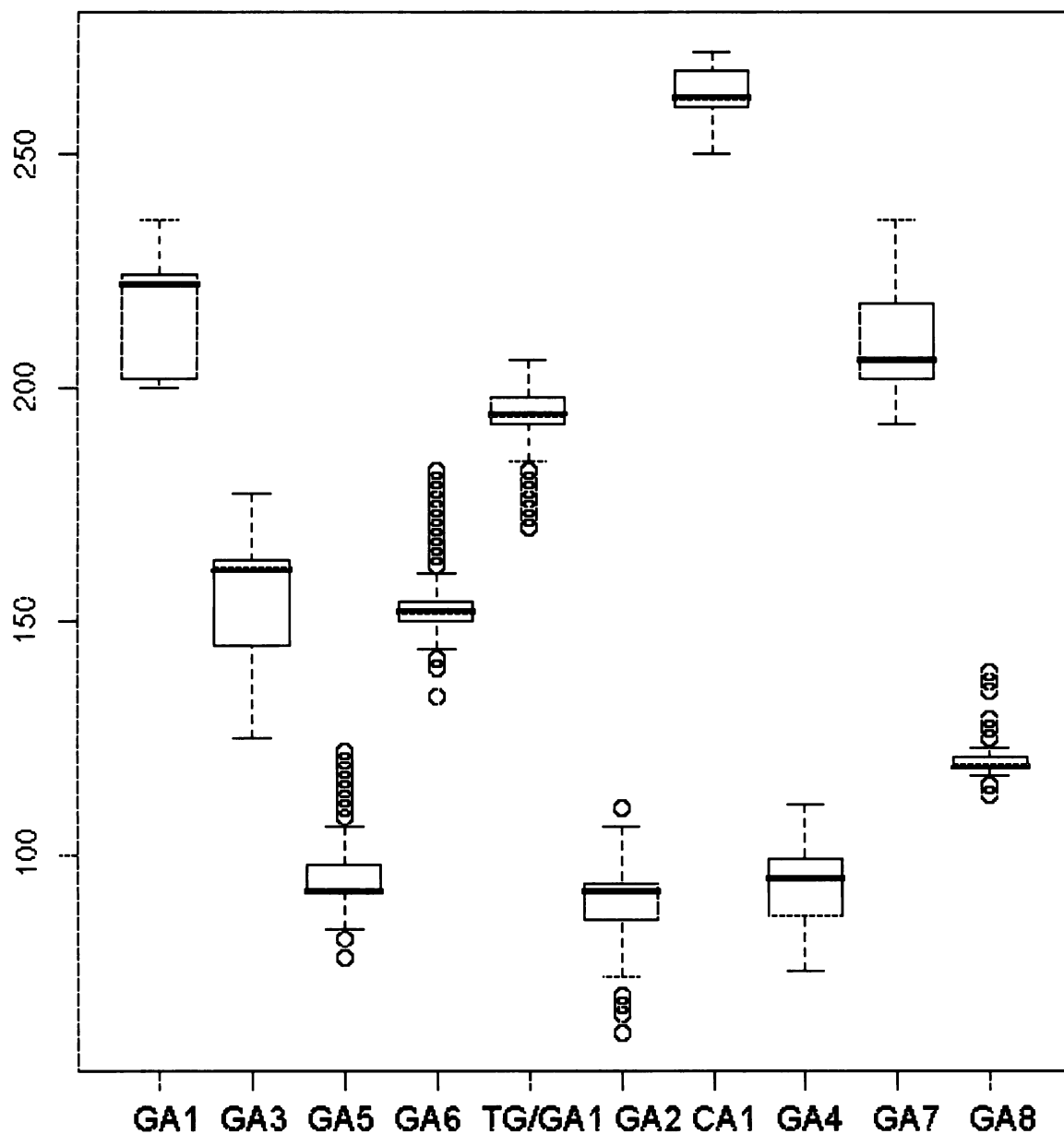
Lokus	NL GA1	NL GA2	NL GA3	NL GA4	NL GA5	NL GA6	NL GA7	NL GA8	NL CA1	NL TG/GA1
Rozsah (O)	140–170	85–127	140–172	166–202	81–103	260–270	80–108	184–228	206–232	118–140
Rozsah (F)	146–176	82–102	142–178	176–202	70–106	250–270	76–106	196–236	202–232	115–137
Rozsah (Z)	125–177	78–122	134–182	170–206	62–110	250–272	75–111	192–224	200–236	113–139
Počet alel (O)	16	18	11	12	6	3	11	18	8	7
Počet alel (F)	14	11	13	9	12	8	13	20	10	6
Počet alel (Z)	23	21	23	19	18	10	19	17	17	9
H_E (O)	0,695	0,570	0,658	0,636	0,399	0,202	0,230	0,587	0,546	0,602
H_E (F)	0,766	0,749	0,535	0,741	0,788	0,502	0,772	0,825	0,615	0,520
H_E (Z)	0,855	0,748	0,874	0,865	0,778	0,710	0,889	0,901	0,837	0,753
H_O (O)	0,482	0,362	0,437	0,400	0,306	0,267	0,270	0,421	0,354	0,240
H_O (F)	0,487	0,365	0,276	0,494	0,365	0,391	0,506	0,551	0,263	0,333
H_O (Z)	0,383	0,285	0,375	0,316	0,277	0,160	0,460	0,301	0,274	0,125

4.1.1 Klonální struktura populací

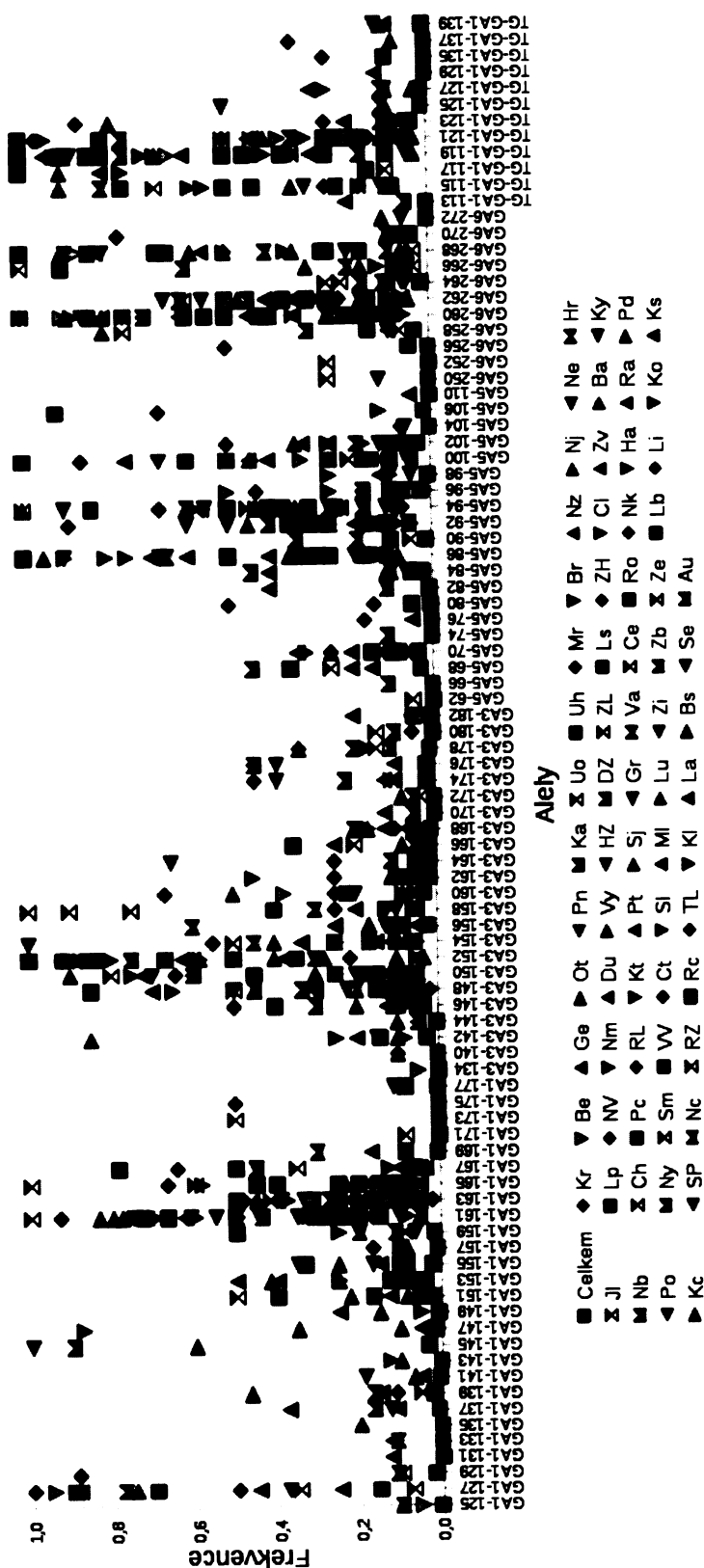
Pravděpodobnost toho, že dva vzorky s identickým genotypem jej získali jen náhodou nezávisle na sobě (P_{sex} $\approx 10^{-10}$ – 10^{-26} , $\approx 10^{-10}$) byla pomocí programu GenClone odhadnuta na řádově 10^{-10} – 10^{-26} , což jsou zanedbatelně malé hodnoty. Z celkového počtu 528 vzorků ze 70 populací bylo nalezeno celkem 501 různých genotypů a v 11 populacích bylo nalezeno celkem 15 klonů o velikosti 2–3 jedinců. Většina zaznamenaných klonů měla velikost 2 jedinců, jen 3 klony měly velikost 3 jedinců.

Cílený transekt na detekci klonů, při kterém byly sebrány vzorky ze všech trsů (ramet) byl proveden v populacích Libice nad Cidlinou (Li) a Chlumeck (Ch, Ohře). V populaci





Obrázek 4.1: Přehled délkového rozsahu (délka fragmentu DNA, svislá osa) jednotlivých lokusu (vodorovná osa) mikrosatelitových alel stulíku žlutého pro všechny populace dohromady. V každém lokusu existuje několik četných alel a větší množství vzácných. Podrobnější přehled podle frekvencí jednotlivých alel pro jednotlivé populace ukazují obr. 4.2 a 4.3.



Obrázek 4.2: Přehled frekvencí jednotlivých alel pro jednotlivé populace. Na vodorovné ose jsou jednotlivé lokusy a jejich alely (popsané ve tvaru *jméno lokusu-délka alely*), na svislé ose je frekvence výskytu daného lokusu v populaci označené barevnými symboly. Barevné symboly odpovídají jednotlivým populacím (viz též tab. 3.2 na str. 36), celková frekvence výskytu přes všechny populace (modré čtverečky) ukazuje, že většina alel je v celkovém pohledu poměrně vzácná a jen několik alel z každého lokusu je široce rozšířených. Obecně vzácné alely mají v některých jednotlivých populacích velmi vysokou frekvenci výskytu. Další lokusy a jejich alely jsou na obr. 4.3.



Obrázek 4.3: Přehled frekvencí jednotlivých alel pro jednotlivé populace. Na vodorovné ose jsou jednotlivé lokusy a jejich alely (popsané ve tvaru *jméno lokusu-délka alely*), na svislé ose je frekvence výskytu daného lokusu v populaci označené barevnými symboly. Barevné symboly odpovídají jednotlivým populacím (viz též tab. 3.2 na str. 36), celková frekvence výskytu přes všechny populace (modré čtverečky) ukazuje, že většina alel je v celkovém pohledu poměrně vzácná a jen několik alel z každého lokusu je široce rozšířených. Obecně vzácné alely mají v některých jednotlivých populacích velmi vysokou frekvenci výskytu. Další lokusy a jejich alely jsou na obr. 4.2.

Li (celkem 25 vzorků) byly nalezeny 3 klony o velikosti 2, 3 a 3 jedinců. V populaci Ch¹ (14 vzorků) nebyl nalezen žádný klon. Ve většině ostatních populací bylo sbíráno méně vzorků, než bylo trsů (ramet) stulíku a nelze tedy vyloučit, že tam jsou větší klony, než byly ty detekované (viz dále).

Na celé Moravě byl nalezen jediný klon o velikosti 2 jedinců (populace Ot u Otrokovic², 5 vzorků). Z populace NV (Nová Ves nad Lužnicí, horní Lužnice) bylo sebráno 9 vzorků, z toho 8 bylo z velké tůně pravděpodobně spojené s řekou jen při záplavách a 1 z nedaleké malé tůně. Tam byly nalezeny 3 klony o velikosti 2 jedinců. Po jednom klonu o velikosti 2 jedinců bylo nalezeno v populacích Du, Vy a Ls. V populacích NV a Du byly sebrány vzorky z podstatné části trsů, populace Ls tvořila velký souvislý porost nad jezem (k tomu pár malých trsů pod mostem dále po proudu).

Na Berounce (všechny 4 populace sebrané na Berounce byly poměrně malé) nebyl nalezen žádný klon. Na Ohři (3 populace) nebyl nalezen žádný klon. Klony nalezené v Polabí (kromě Li, viz výše): V populaci Gr (kanál Grada u Čelákovic) byl nalezen 1 klon o velikosti 2 jedinců (celkem 9 vzorků). Po jednom klonu o velikosti 2 jedinců bylo nalezeno v populacích Ml (Mlékosrby, 9 vzorků), Lu (Loukonosy, 5 vzorků) a Ko (Kosičky, 10 vzorků).

Poslední klon o velikosti 3 jedinců byl nalezen v populaci Bs (Brusel, Woluwe), 15 vzorků z této populace bylo sebráno ve 4 parkových jezírkách. V jezírku, kde byl nalezen klon byly sebrány celkem 4 vzorky.

V rámci 14 populací bylo nalezeno celkem 37 párů jedinců lišících se v jediné alele. Šlo o populace Kr (2 páry) z Odry, DZ (1 pár), HZ (4 páry), Ls (2 páry) a ZL (4 páry) z Nežárky, NV (2 páry) a Vy (3 páry) z Lužnice, Ba (2 páry) z Berounky, Li (7 párů) a VV (3 páry) z Cidliny, Ro (1 pár) z Mrliny, Sm (2 páry) z Javoroky, Gr (1 pár) z Labe a SP (1 pár) z Bystřice.

4.1.2 Klony nalezené v různých populacích

Ze 70 populací byly klony nalezeny mezi celkem 6 různými populacemi (celkem 7 klonálních jedinců). Dva páry klonů byly nalezeny mezi populacemi ZL (mezi Dolním Žďárem a Horní Lhotou) a Ls (Lásenice), které jsou od sebe na Nežárce vzdálené 3,3 km. Tři páry klonů byly nalezeny mezi populacemi Kt (Kostelec nad Labem) a Pt (Podhradská tůň u Dalešic, Jizera), které jsou od sebe po řece vzdálené přes 120 km. Poslední tři páry klonů byly nalezeny mezi populacemi Kt (Kostelec nad Labem) a Sj (tůň Stará Jizera u Dražic, Jizera), které jsou od sebe po řece vzdálené asi 60 km. Jeden klon nalezený v těchto dvou populacích byl nalezen i v populaci TL (Týnec nad Labem), který je od populace Kl vzdálený po řece téměř 90 km (je na horním Labi). Jedinci lišící se v jediné alele byli nalezeni mezi populacemi DZ a HZ (5 párů, 1,8 km) a ZL a LS (2 páry, 3,3 km) z Nežárky.

¹Šlo o tůň a přilehlý dlouhý úzký kanál ústící do řeky.

²Jde o malé bývalé slepé rameno obklopené chatkami, kam nedávno rybáři vysadili amura bílého. Od té doby je vodní vegetace na ústupu (ústní sdělení obyvatel).

4.1.3 Analýza molekulární variance (AMOVA)

Výsledky pro pouze české a české i zahraniční populace dohromady se liší jen minimálně, naproti tomu výsledky počítané metodou F_{ST} a R_{ST} se liší množstvím variability odhadnuté pro rozdíl mezi povodími anebo mezi jedinci v rámci populací. Všechny výsledky se shodují v množství variability na úrovni rozdílů mezi jednotlivými populacemi v rámci jednotlivých povodí (úmoří, kolem 18 %).

Tab. 4.3 ukazuje AMOVA českých populací stulíku žlutého počítanou metodou podílu shodných alel (F_{ST} -like výpočet) a na základě sumy čtverců rozdílů v délkách alel (R_{ST} -like výpočet). Druhý případ ukazuje mnohem větší rozdíl mezi jednotlivými povodími na úkor variability v rámci jednotlivých individuí (u F_{ST} 22 % mezi povodími a 58 % v rámci populací, u R_{ST} 43 % mezi povodími a 37 % v rámci populací). Velmi podobné výsledky dává i AMOVA se zahrnutím všech (i zahraničních) populací (u F_{ST} 22 % mezi povodími a 58 % v rámci populací, u R_{ST} 42 % mezi povodími a 38 % v rámci populací) — viz tab. 4.4 ukazující výsledky počítané na základě podílu shodných alel (F_{ST} -like) a na základě sumy čtverců rozdílů v délkách alel (R_{ST} -like).

AMOVA počítaná v rámci jednotlivých povodí vykazovala zvýšení variability v rámci populací a snížení mezi geografickými oblastmi (skupinami populací, viz tab. 4.5). Vzrostla míra variability v rámci populací (58–74 %) a poklesl podíl variability mezi geografickými oblastmi (skupinami populací, 9–23 %). Nicméně fixační indexy F_{ST} stále ukazují na velmi vysoký stupeň izolovanosti jednotlivých populací.

Fixační indexy F_{ST} (F-statistika) počítané metodou podílu shodných alel (F_{ST} -like) a čtverce rozdílů v délkách alel (R_{ST} -like) jsou v tab. 4.6. Jejich hodnoty se při počítání s pouze českými a českými i zahraničními prakticky neliší. Na základě F_{ST} předpokládá nižší hodnotu než na základě R_{ST} (podle F_{ST} 0,42 a podle R_{ST} 0,63). Výsledky jednoznačně ukazují velmi vysokou diferenciaci na jednotlivé populace. Všechny výpočty vyšly vysoce signifikantně ($p < 0,001$).

Tabulka 4.3: AMOVA českých populací stulíku počítaná programem Arlequin metodou F_{ST} (podíl shodných alel, (A)) a metodou R_{ST} (suma čtverců rozdílů v délkách alel, (B)). Výpočet byl v obou případech testován 10 000 permutacemi a $p < 0,001$. Řádek 3 ukazující variabilitu v rámci jedinců je součtem řádků 4 a 5, které tuto variabilitu rozkládají na variabilitu mezi jedinci a v rámci jedinců (heterozygotitu). Poslední řádek je součtem řádků 1–3 (nebo 1, 2, 4 a 5). Tab. (A) i (B) udávají míru variability mezi populacemi v rámci povodí 18 %, ale liší se podílem variability mezi povodími v rámci populací (přesněji v míře heterozygotity), kde tab. (A) udává 22 % mezi povodími a 58 % mezi jedinci v rámci populace, zatímco tab. (B) 43 % mezi povodími a 37 % mezi jedinci v rámci populace. Výsledky jsou velmi podobné výsledkům ze všech populací v tab. 4.4. Fixační indexy F_{ST} (F-statistika) jsou v tab. 4.6.

Tab. (A), F_{ST}-like Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Variabilita komponent	Procento variability
Mezi povodími	10	950,67	0,92	22,41
V rámci povodí mezi populacemi	55	762,9	0,74	18,12
V rámci populace (bez individuální úrovně)	912	2186,23	2,42	58,06
Mezi jedinci v rámci populace	423	1370,2	0,8	19,59
V rámci jedinců	489	799	1,63	39,88
Celkem	977	3882,76	4,1	

Tab. (B), R_{ST}-like Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Variabilita komponent	Procento variability
Mezi povodími	10	77464,95	81,73	43,18
V rámci povodí mezi populacemi	55	33377,38	34,74	18,35
V rámci populace (bez individuální úrovně)	912	64773,88	71,65	37,15
Mezi jedinci v rámci populace	423	46201,15	36,42	19,24
V rámci jedinců	489	17795,5	36,39	19,23
Celkem	977	174838,98	189,28	

Tabulka 4.4: AMOVA českých i zahraničních populací stulíku počítaná programem Arlequin metodou F_{ST} (podíl shodných alel, (A)) a metodou R_{ST} (suma čtverců rozdílů v délkách alel, (B)). Výpočet byl v obou případech testován 10 000 permutacemi a $p < 0,001$. Řádek 3 ukazující variabilitu v rámci jedinců je součtem řádků 4 a 5, které tuto variabilitu rozkládají na variabilitu mezi jedinci a v rámci jedinců (heterozygositu). Poslední řádek je součtem řádků 1–3 (nebo 1, 2, 4 a 5). Tab. (A) a (B) udávají míru variability mezi populacemi v rámci povodí velmi podobnou: 17 a 19 %, ale liší se podílem variability mezi povodími v rámci populací (přesněji v míře heterozygosity), kde tab. (A) udává 22 % mezi povodími a 58 % mezi jedinci v rámci populace, zatímco tab. (B) 42 % mezi povodími a 38 % mezi jedinci v rámci populace. Výsledky jsou velmi podobné výsledkům pouze českých populací v tab. 4.3. Fixační indexy F_{ST} (F-statistika) jsou v tab. 4.6.

Tab. (A) F_{ST}-like Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Variabilita komponent	Procento variability
Mezi povodími	14	1100,27	0,92	22,21
V rámci povodí mezi populacemi	55	762,9	0,8	19,4
V rámci populace (bez individuální úrovně)	986	2375,15	2,41	58,4
Mezi jedinci v rámci populace	458	1508,15	0,83	20,01
V rámci jedinců	528	867	1,64	39,81
Celkem	1055	4238,317	4,12515	

Tab. (B) R_{ST}-like Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Variabilita komponent	Procento variability
Mezi povodími	14	87268,83	81,46733 Va	42,12
V rámci povodí mezi populacemi	55	33377,382	34,15182 Vb	17,66
V rámci populace (bez individuální úrovně)	986	73912,98	74,96	38,76
Mezi jedinci v rámci populace	458	53870,98	39,83	20,59
V rámci jedinců	528	20042	37,96	19,63
Celkem	1055	194559,2	193,40944	

Tabulka 4.5: AMOVA počítaná v rámci jednotlivých povodí (Odra, Morava a Labe, 2.–4. sloupec) na základě podílu shodných alel (F_{ST}). Povodí byla rozdělena do geografických skupin podle výčtu na str. 32. Povodí Odry (3 populace) není děleno na žádné skupiny populací. Variabilita mezi populacemi v rámci povodí je 19–25 %. Variabilita mezi skupinami populací je v povodí Moravy jen 9 %, v povodí Labe 23 %. Variabilita v rámci populací je 58 % (Labe)–74 % (Odra). Podobně jako u AMOVA počítané metodou F_{ST} se všemi vzorky dohromady (tab. 4.3) je nízký podíl variability mezi povodími a vysoký v rámci populací. V posledním řádku je fixační index F_{ST} (F-statistika počítaná taktéž na základě podílu shodných alel) popisující míru diferenciace na subpopulace. Pohybuje se v rozmezí 0,26 (Odra)–0,42 (Labe), což svědčí pro velmi vysokou míru diferenciace a tedy nízkou míru komunikace mezi populacemi. Všechny výpočty byly testovány 10 000 permutacemi a $p < 0,001$.

Povodí	Odra	Morava	Labe
Zdroj variability	Procento variability	Procento variability	Procento variability
Mezi skupinami populací	—	9,19	22,97
V rámci skupin populací mezi populacemi	25,54	22,63	19,06
V rámci populace	74,46	68,19	57,97
Fixační index F_{ST}	0,26	0,32	0,42

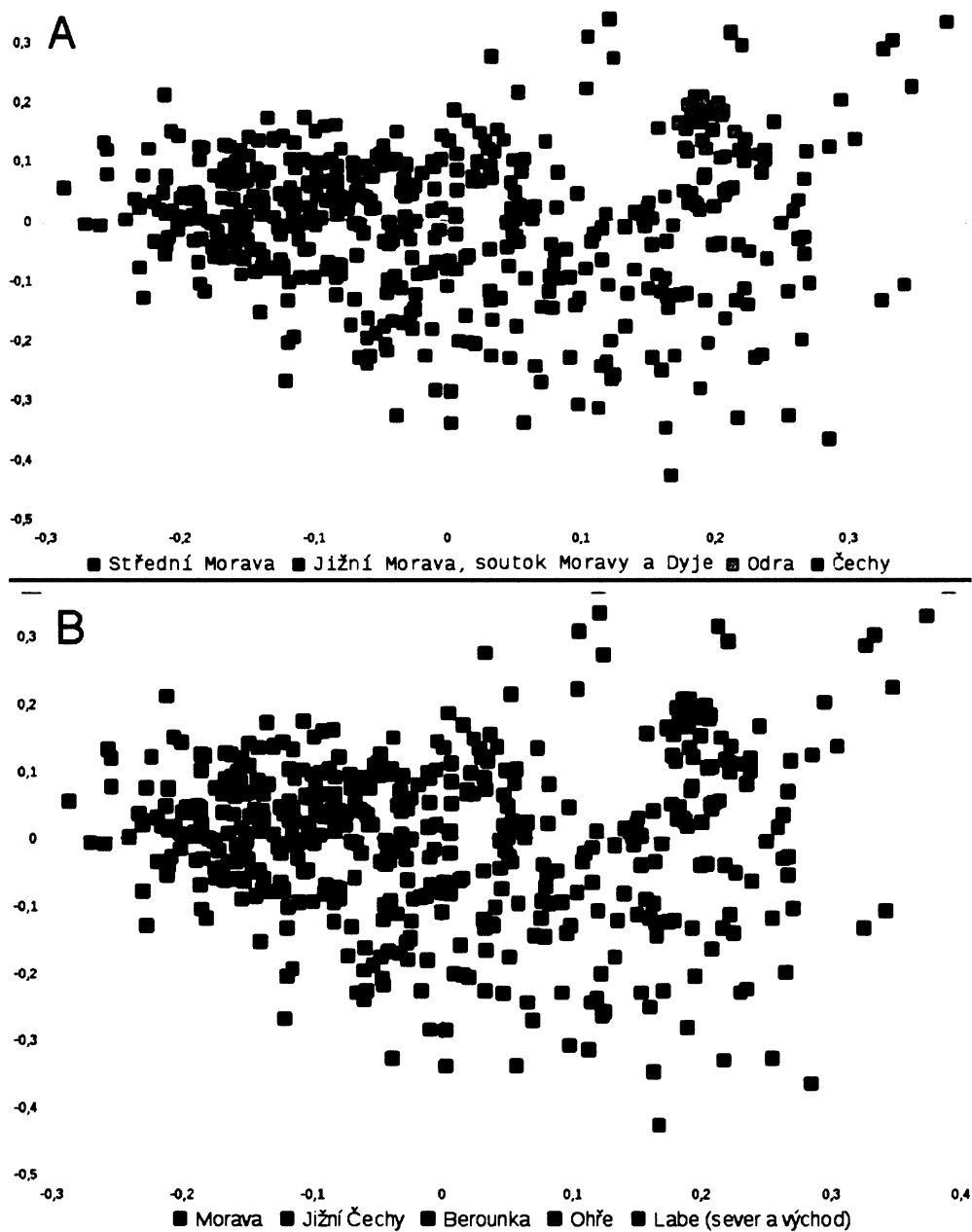
Tabulka 4.6: Fixační indexy F_{ST} (F-statistika) ukazující rozdělení genetické variability na jednotlivých úrovních. Fixační indexy byly počítány na základě F_{ST} (podílu shodných alel) i R_{ST} (čtverce rozdílů v délkách alel) a pro pouze české i všechny populace dohromady. Výsledky se pro pouze české a pro české i zahraniční populace prakticky neliší. Výrazně se liší výsledky získané na základě F_{ST} a R_{ST} , kdy R_{ST} předpokládá výrazně vyšší hodnoty. Stupeň diferenciace na subpopulace je velmi vysoký. Zvláště podle R_{ST} se populace blíží stavu, kdy v každé jsou fixovány jiné alely. Všechny výpočty byly testovány 10 000 permutacemi a $p < 0,001$.

Metoda	Pouze české populace	Všechny populace
F_{ST}	0,42	0,42
R_{ST}	0,63	0,61

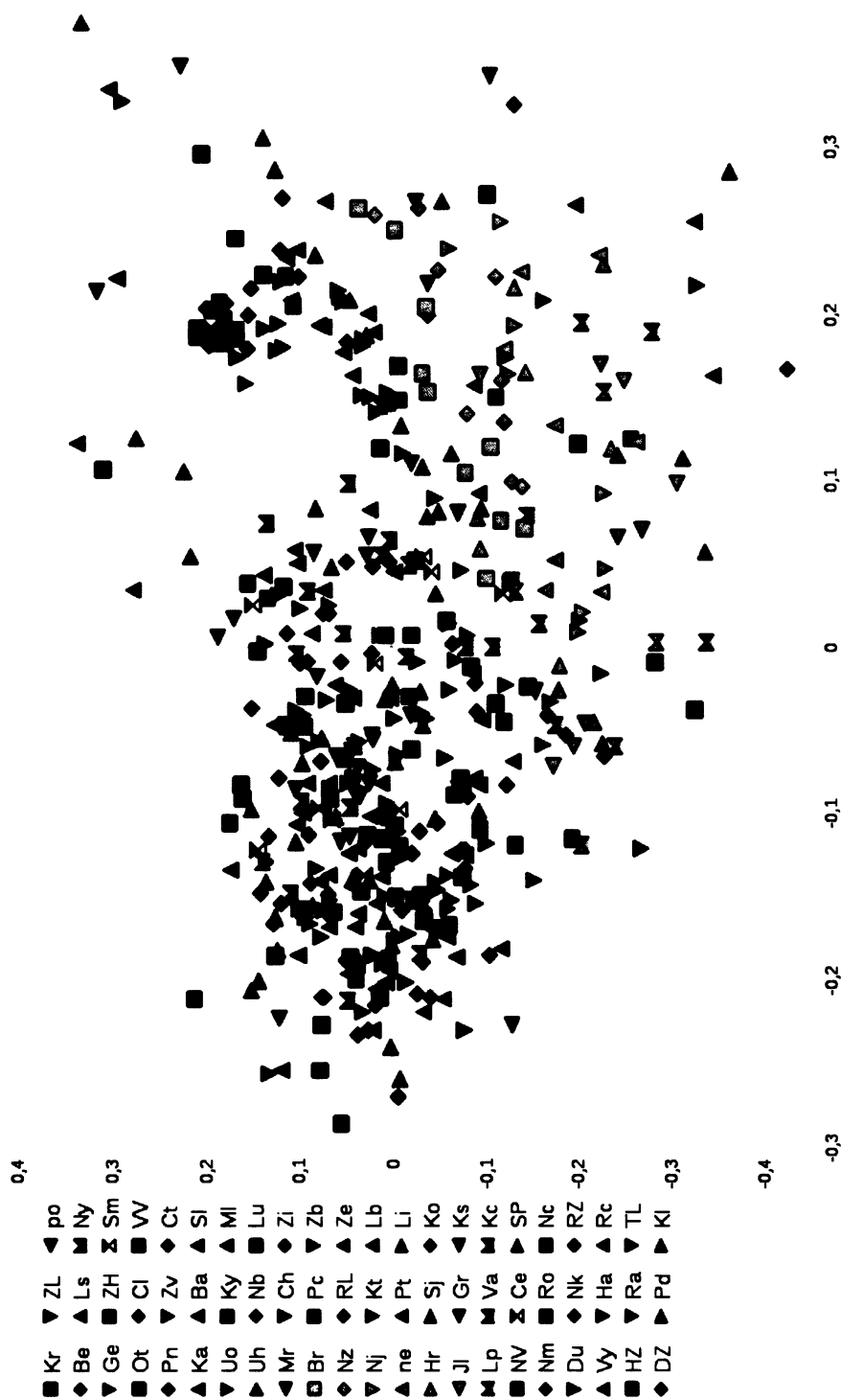
4.1.4 Shlukování jedinců podle PCoA

PCoA ukázala jen slabé rozlišení vzorků z jednotlivých populací, populace ani geografické oblasti zpravidla netvořily dobře oddělené shluky. Dobře se od ostatních populací oddělovala pouze Odra. PCoA na obr. 4.4 ukazuje polohu jednotlivých jedinců v ordinačním prostoru s barevně vyznačenými povodími (jednotlivé populace nejsou rozlišené), na obr. 4.5 je poloha jednotlivých vzorků ve stejném ordinačním prostoru, přičemž jsou zobrazeny všechny populace. Zobrazené osy (1. a 2.) vysvětlují celkem 6,65 % pozorované variability (3,81 a 2,84 %). Poměrně silně se od sebe navzájem oddělily jednotlivé moravské populace (povodí Odry a Moravy), slaběji se oddělily i od povodí Labe (ale částečně se mísí s populacemi NV, Ml, Sl, Li, Ko a dalšími, viz též obr. 4.5, dodatek A na str. 111 a tab. 3.2 na str. 36). K míšení dochází mezi některými populacemi z povodí Moravy (Uh, Br, Jl, Hr, Lp a méně dalšími) na jedné straně a Jižních Čech (zvláště z Nežárky) a části Polabí severovýchodně od Prahy na straně druhé. Populace z Berounky a Ohře — i když jsou neodlišitelně zamíchané mezi ostatními českými populacemi — nevykazují žádné vztahy k Moravě. Celkově poměrně izolované jsou populace z Odry, což odpovídá reálné geografické situaci.

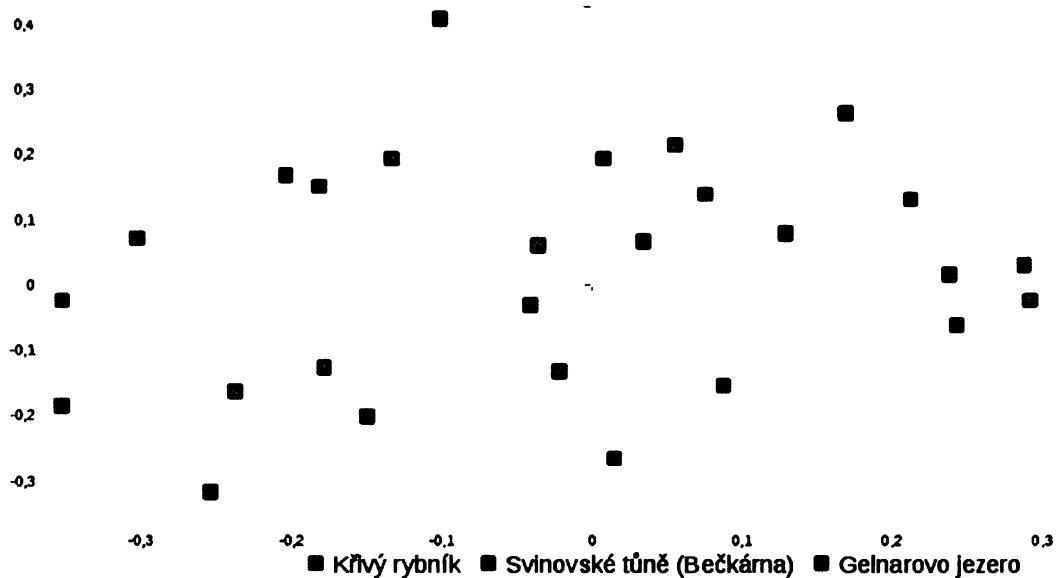
PCoA provedená v rámci jednotlivých povodí je na obr. 4.6 (Odra), 4.7 (Morava) a 4.8 (Labe). PCoA z povodí Odry vysvětlila na dvou osách plných 37,45 % pozorované variability (21,41 a 16,04 %), nicméně populace se nijak neoddělily. PCoA z ostatních povodí vysvětluje výrazně méně pozorované variability: z povodí Moravy 14,63 % (8,05 a 6,58 %) a i když populace vykazují určité náznaky shlukování, celkově tvoří jednu těžko rozlišitelnou skupinu. PCoA z povodí Labe vysvětluje 10,02 % pozorované variability (5,41 a 4,79 %) a jednotlivé populace a povodí se sice většinou drží pospolu, nicméně celkově jde o jeden velký shluk bez zjevné struktury.



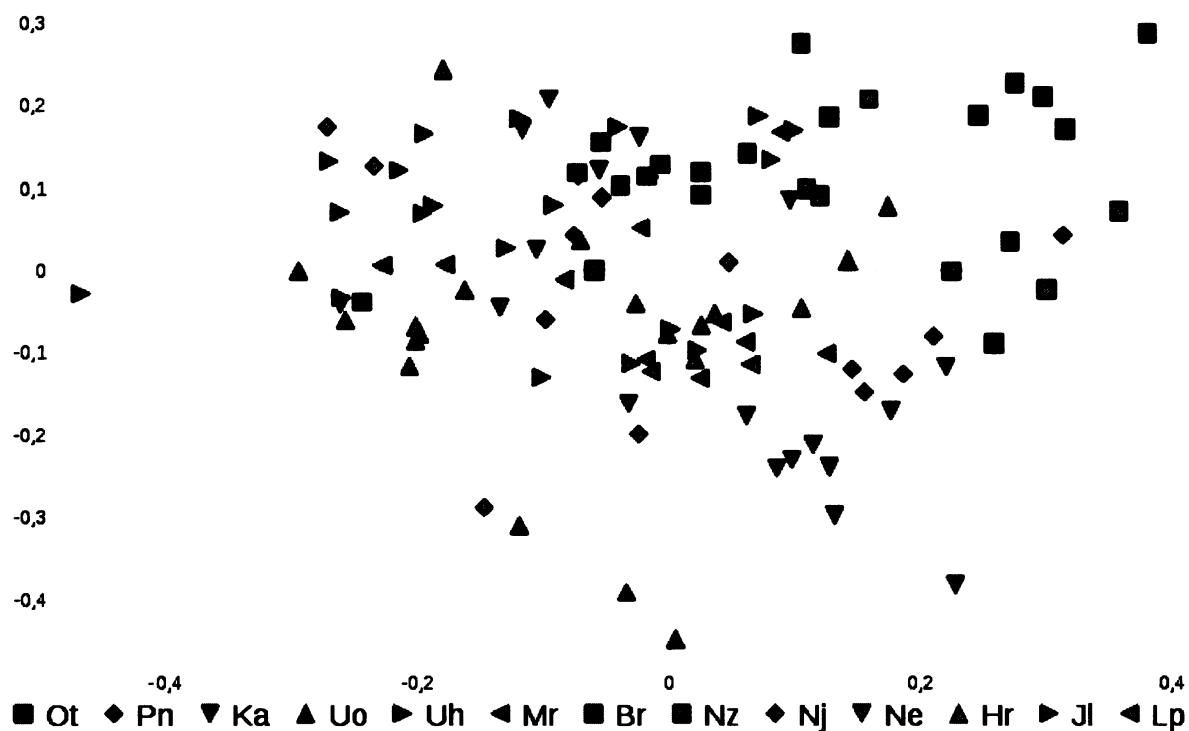
Obrázek 4.4: PCoA českých jedinců stulíku žlutého vypočítána na základě vzdálenosti Nei et al. (1983). První osa ukazuje 3,81 % a druhá 2,84 % pozorované variability (dohromady 6,65 %). Na obr. (A) je vidět, že moravské populace se od sebe navzájem relativně dobře oddělují a viditelně (i když slabě) se oddělují i od českých populací z povodí Labe. Obr. (B) ukazuje velmi promíchané populace z povodí Labe (Jižní Čechy, Berounka a Ohře): populace z různých řek v rámci povodí — i když jsou od sebe často dosti vzdálené — se vůbec neoddělují. PCoA se znázorněnými všemi populacemi je na obr. 4.5.



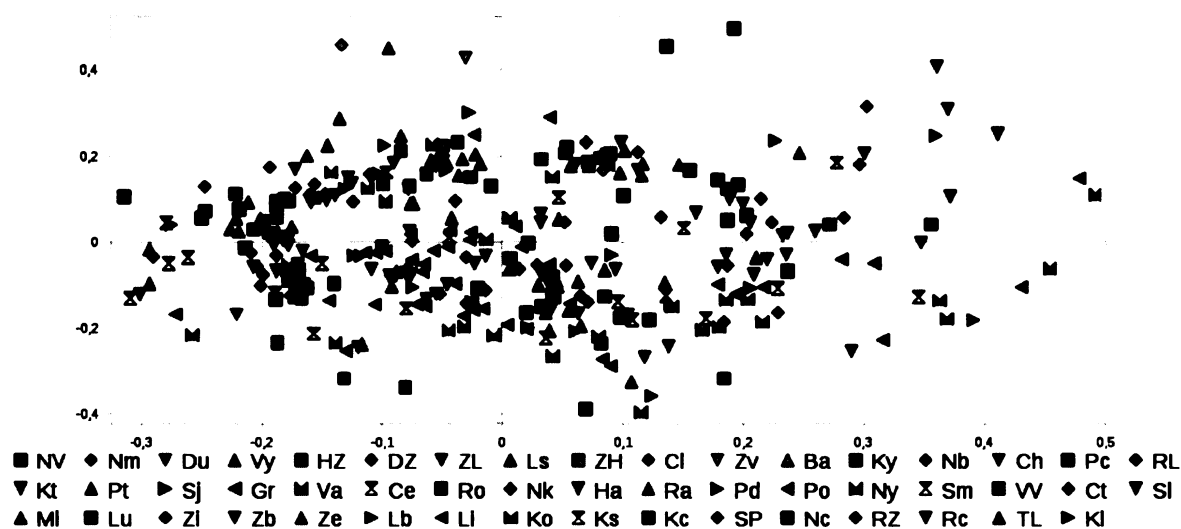
Obrázek 4.5: PCoA českých jedinců stulíku žlutého vypočítána na základě vzdálenosti Nei et al. (1983). První osa ukazuje 3,81 % a druhá 2,84 % pozorované variability (dohromady 6,65 %). Barvy v legendě určují geografické oblasti (viz str. 32): tmavě modře je Odra (Kr-Ge), tmavě oranžově střední Morava (Ot-Mr), žlutě jižní Morava (Br-Lp), světle zeleně Lužnice (NV-Vy), tmavě červeně Nežárka (HZ-Ls), světle modře Berounka (ZH-Ba), tmavě zeleně Ohře (Ky-Ch), nejsvětější zelená je Labe a Jizera (Pc-Ce), tmavě červeně Mrlina a Labe (Ro-Ml), oranžově Cidlina a Bystřice (Lu-SP) a světle červeně horní Labe (Nc-Kl); symboly jsou jednotlivé populace (viz str. 111). Stejný obrázek se zobrazí v roztaženém úmoří (viz obr. 4.4). Jednotlivé populace (kromě Poodří — Kr, Be a Ge) jsou obvykle dosti roztažené a tvoří jednotlivé kompaktní shluky. Ani jednotlivé skupiny populací se nijak zvlášť nerozdělují (kromě úmoří, viz obr. 4.4).



Obrázek 4.6: PCoA jedinců stulíku žlutého z Odry vypočítána na základě vzdálenosti Nei et al. (1983). První osa ukazuje 21,41 % a druhá 16,04 % pozorované variability (dohromady 37,45 %). To je pravděpodobně dáno malým počtem vzorků. Jednotlivé populace jsou odlišeny barevnými symboly. Žádná populace netvoří oddělený shluk, nicméně jak je vidět na obr. 4.4, Odra se relativně dobře odděluje od ostatních českých populací.



Obrázek 4.7: PCoA jedinců stulíku žlutého z povodí Moravy vypočítaná na základě vzdálenosti Nei et al. (1983). První osa ukazuje 8,05 % a druhá 6,58 % pozorované variability (dohromady 14,63 %). Jednotlivé oblasti jsou barevně odlišené: modře je střední Morava mezi Otrokovicemi a Veselím nad Moravou, oranžově je jezírko Bruksa u Dyje nad Břeclaví a žlutě je Kyjovka z obory Soutok (soutok Moravy a Dyje). Jednotlivé populace jsou odlišené symboly. Většina populací vykazuje určitou tendenci se shlukovat, ale shluky nejsou oddělené od ostatních populací a všechny populace tak prakticky tvoří jeden balík.



Obrázek 4.8: PCoA jedinců stolíku žlutého z povodí Labe vypočítaná na základě vzdálenosti Nei et al. (1983). První osa ukazuje 5,41 % a druhá 4,79 % pozorované variability (dohromady 10,2 %). Jednotlivé oblasti jsou barevně odlišené: tmavě modře je Lužnice (NV–Vy), oranžově Nežárka (HZ–Ls), žlutě Berounka (ZH–Ba), světle zeleně Ohře (Ky–Ch), tmavě červeně Labe a Jizera (Pc–Ce), světle modře Mrlina a Labe (Ro–Ml), tmavě zeleně Cidlina a Bystřice (Li–SP) a nejsvětější zelená je horní Labe (Nc–Kl). Jednotlivé populace jsou odlišené symboly. Jednotlivé populace a oblasti vykazují slabou tendenci se shlukovat, ale shluky jsou silně promíchané. Jednotlivé populace (a)nebo geografické oblasti tak prakticky nelze rozlišit.

4.1.5 Bayesiánské shlukování

V případě počítání s jedinci nebyl bayesiánský shlukovací algoritmus v programu BAPS 3.2 (Corander and Marttinen, 2007) schopen rozdělit jedince do skupin populací, ale dělil je jen do shluků odpovídajících původním populacím. Obdobně vypadal výsledek v případě počítání na úrovni skupin populací (ne celých povodí), kdy opět každá předem geograficky definovaná skupina populací tvořila vlastní dobře oddělený shluk odpovídající reálné geografické situaci, kdy jednotlivé populace jsou prostorově oddělené. V žádném případě nevznikaly shluky, které by obsahovaly více populací nebo jejich skupin.

4.1.6 Shlukování podle programu Structure

Pro počítání s jen českými i všemi populacemi vyšlo jako nejlepší výsledek rozdělení všech jedinců do dvou skupin (má nejvyšší ΔK , pravděpodobnost i koeficient podobnosti — podobnost jednotlivých opakování výpočtu). Rozdělení bylo naprosto stejné ve všech 10 různých opakováních výpočtu. Jeden přirozený shluk tvoří moravské a jihočeské populace spolu s Ohří (v případě počítání i se zahraničními populacemi se k nim shlukuje ještě Slovensko, Belgie a Litva); druhý přirozený shluk je tvořen Berounkou a polabskými populacemi z oblasti severovýchodně od Prahy (v případě počítání i se zahraničními populacemi se k nim shlukuje ještě Německo). Grafy pomáhající zvolit optimální počet skupin (K) pro české vzorky jsou na obr. 4.9, pro české a zahraniční na obr. 4.12. Grafy ukazují pravděpodobnost modelu rozdělujícího jedince do daného počtu skupin (K) a změnu pravděpodobnosti mezi běhy programu pro různé K (pro různé předem určené počty skupin). Míra podobnosti mezi jednotlivými běhy programu Structure pro české vzorky je na obr. 4.10, pro české i zahraniční na obr. 4.13. Vysoká podobnost mezi jednotlivými výpočty se stejným daným počtem skupin (K) ukazuje na vysokou stabilitu takového rozdělení jedinců (každé nezávislé opakování výpočtu vyšlo stejně nebo velmi podobně) a na jeho velkou pravděpodobnost. Podobnost mezi jednotlivými páry běhů algoritmu pro české vzorky je na obr. 4.11, pro české i zahraniční na obr. 4.14. Důležitým vodítkem pro určení nejlepšího počtu skupin je nejen vysoké ΔK , ale také vysoký koeficient podobnosti (similarity coefficient, Falush et al., 2003) jednotlivých běhů programu³ vyjádřený malou směrodatnou odchylkou. Výsledné rozdělení do shluků je na obr. 4.15 na str. 75.

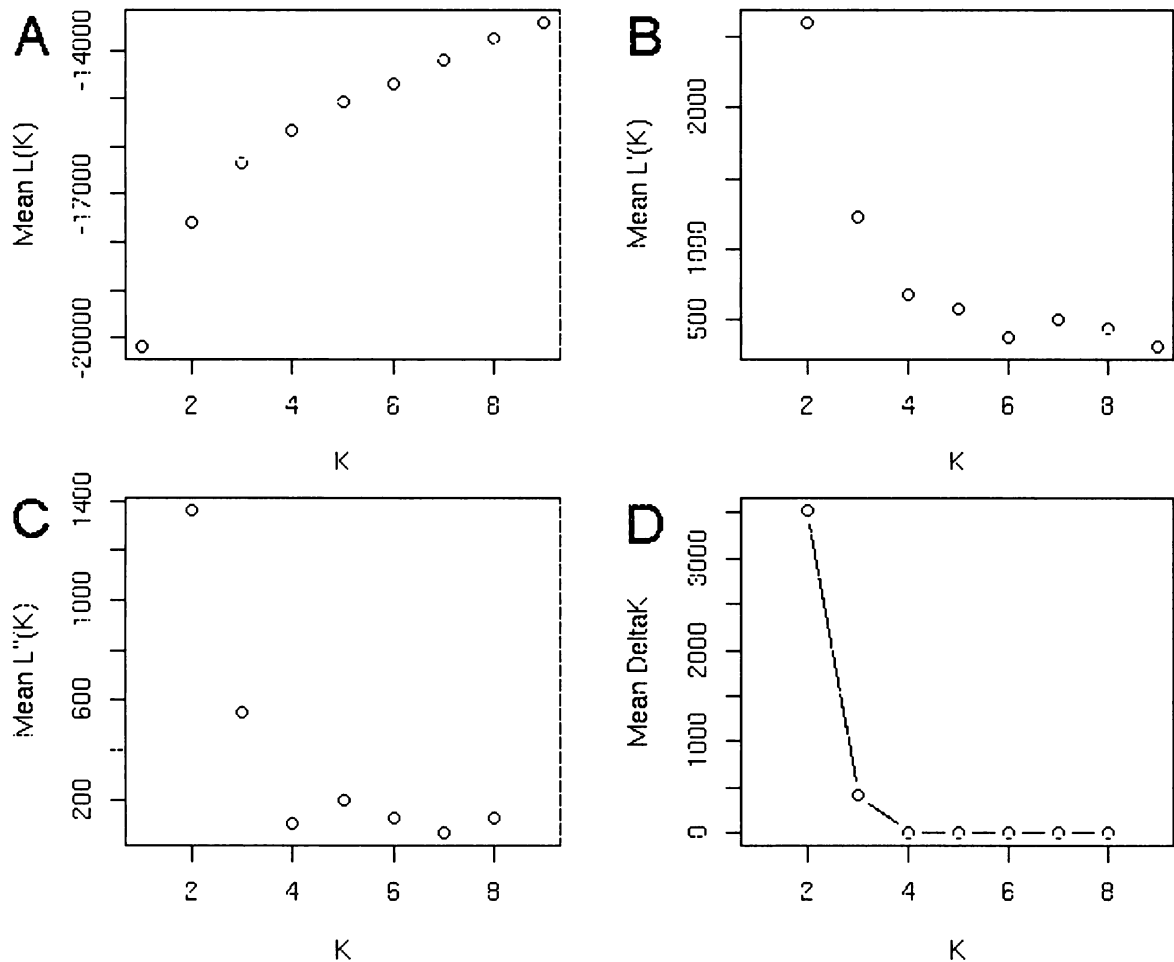
Na základě relativně vysoké pravděpodobnosti a koeficientu podobnosti (vysoké podobnosti mezi jednotlivými výpočty) se dá uvažovat i o rozdělení jedinců do 3 skupin (viz obr. 4.11 a 4.14. Jako nejlepší sice vychází rozdělení na 2 skupiny (má nejvyšší ΔK), nicméně toto má také vysoký koeficient podobnosti (similarity coefficient, podobnost jednotlivých běhů výpočtu) a výrazně vyšší pravděpodobnost než vyšší počty skupin (i když pravděpodobnost je výrazně nižší než u rozdělení na 2 skupiny). V tomto případě se shluk tvořený moravskými a jihočeskými populacemi rozpadá a vyděluje se část Lužnice,

³Tzn. že algoritmus rozdělí jedince při všech nezávislých opakováních výpočtu stejně nebo velmi podobně.

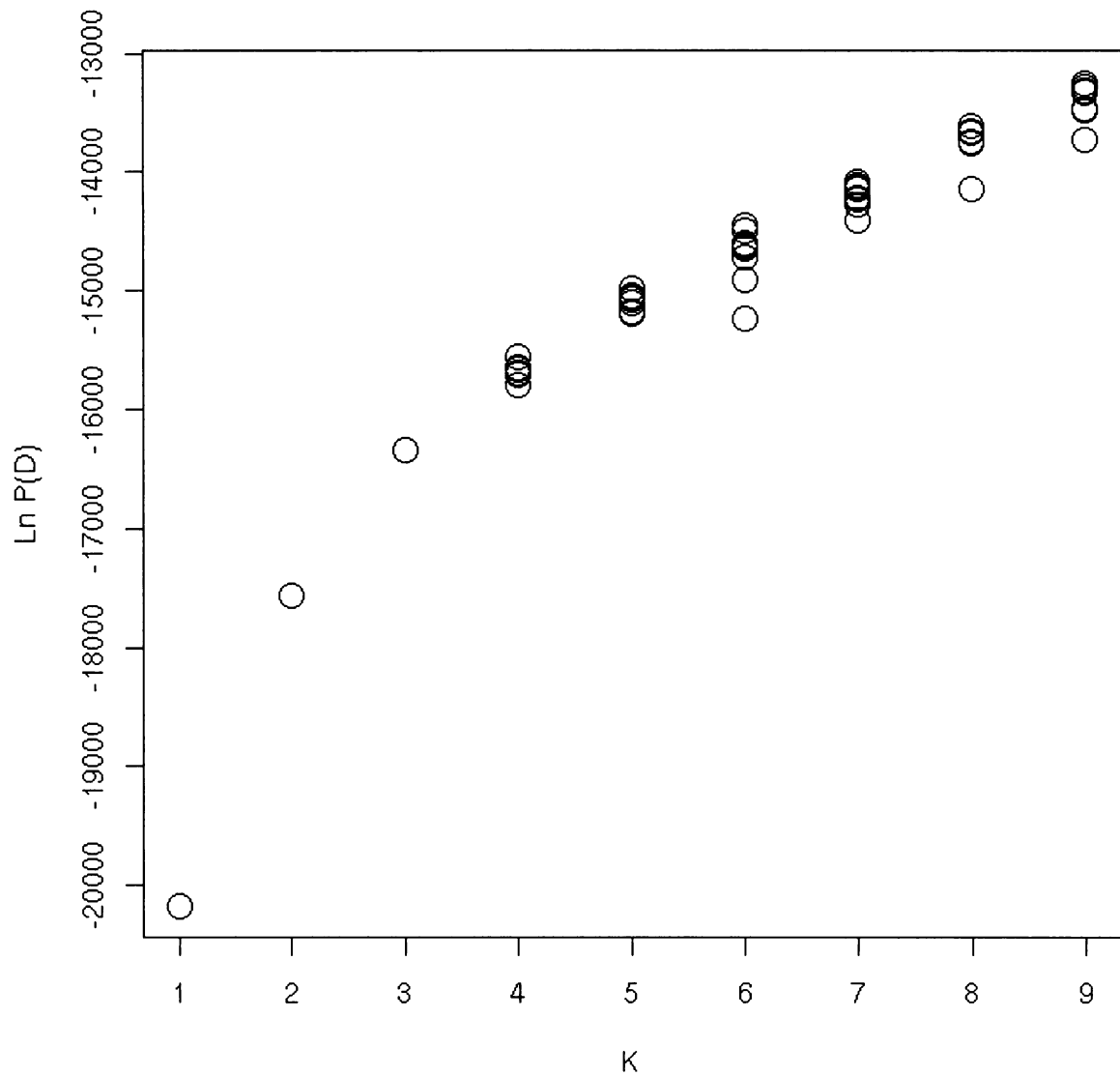
Nežárka a Odra tvořící nový samostatný shluk (viz obr. 4.15 na str. 75). Na stabilitě Polabí se nic nemění, stále tvoří poměrně kompaktní shluk oddělený od ostatních populací. Stejně dopadlo i přiřazení zahraničních populací.

Polabí severozápadně od Prahy (skupiny (8)–(11), obr. 4.15) vychází ve všech opakováních jako dobře rozlišená skupina. Z velké části do této skupiny patří i Berounka (6). Podle obr. 4.15 (B) navíc vykazuje silnou vazbu k Německu (14). Při dělení na 2 skupiny tvoří druhý velký shluk Morava ((1)–(3)), Jižní Čechy ((4)–(5)) a Ohře (7); v případě obr. 4.15 (B) je shluk doplněn ještě o Slovensko (12), Belgii (13) a Litvu (15). Při dělení na 3 skupiny (obr. 4.15 (C)–(F)) se původně jednoduší červený shluk Moravy ((1)–(3)) a Jižních Čech ((4)–(5)) rozpadá (obr. 4.15 (C)–(D), jen ČR): odděluje se část Lužnice (4) a Nežárka (5) a v 9 z 10 opakováních (C) ještě Odra (1). Při zahrnutí i zahraničních populací (obr. 4.15 (E)–(F)) je v tomto ohledu rozdíl jen v míře příslušnosti Lužnice (4) a Odry (1) do zeleného shluku. Všechny zahraniční populace (12–15) se shlukují s Jižní Moravou (2–3) a Ohří (7).

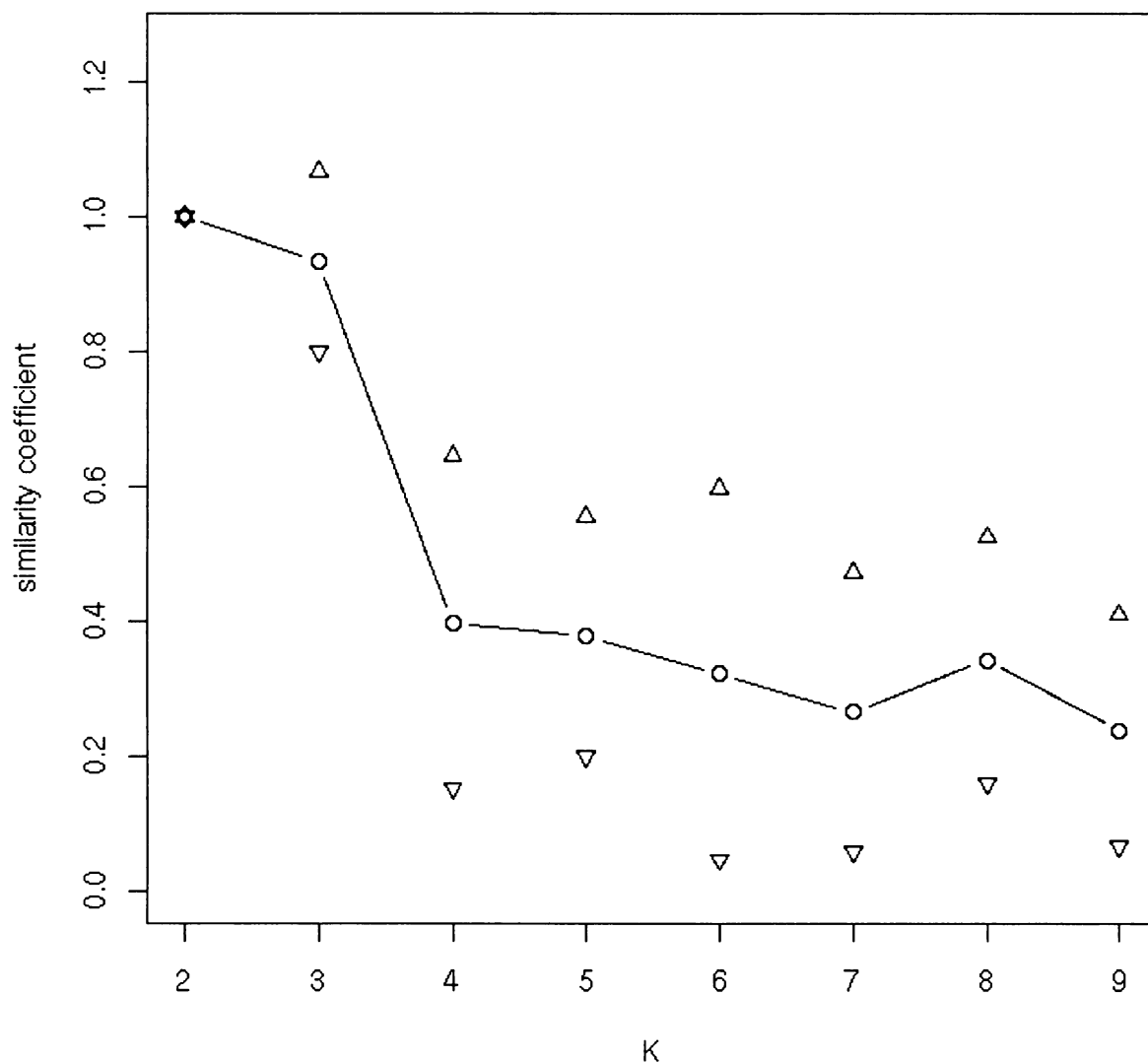
Mapka ukazující rozdělení geografických oblastí do genetických shluků je na obr. 4.16 (2 shluky) a 4.17 (3 shluky). Výsledky jsou mírně odlišné od výstupu PCoA (obr. 4.4), nicméně také ukazují určitou separaci jednotlivých povodí.



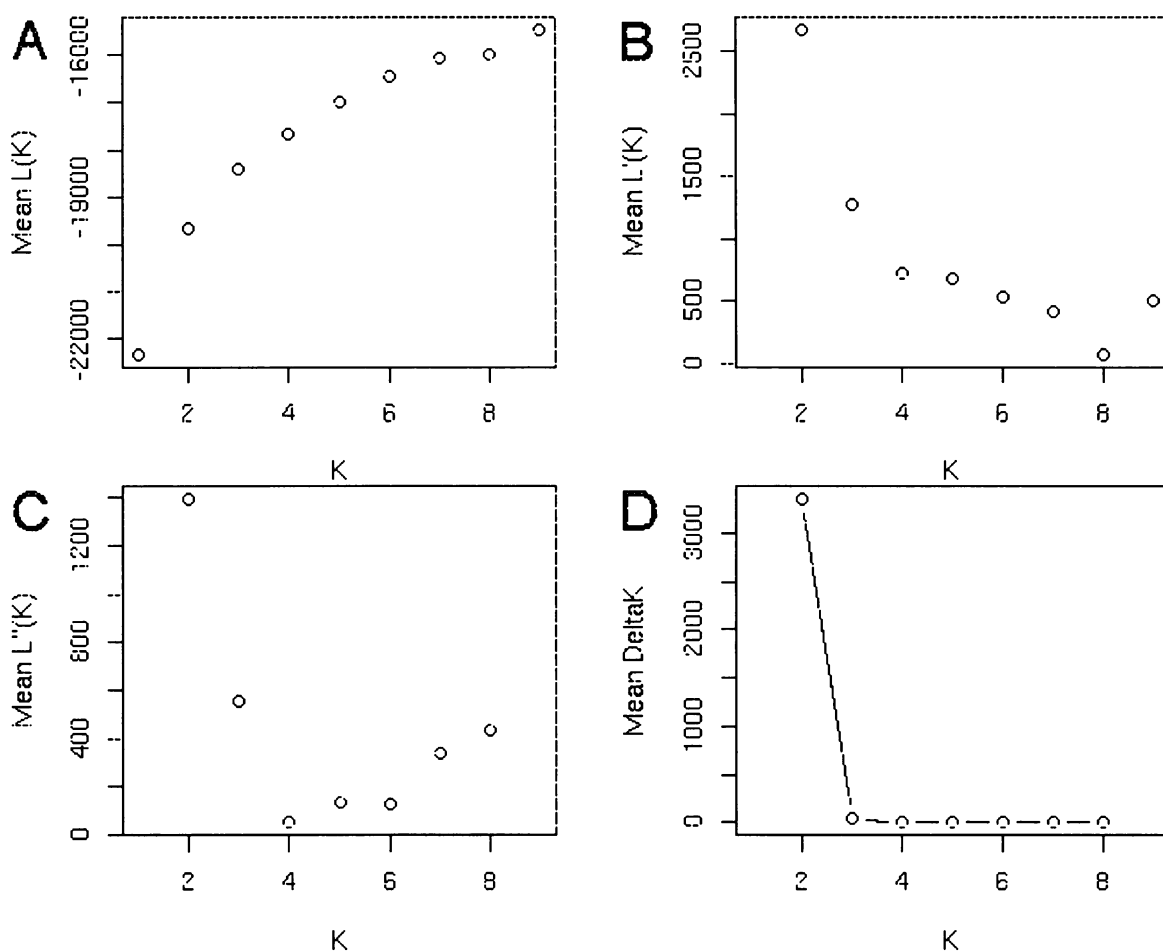
Obrázek 4.9: Výstupy Structure-sum ukazující výsledky získané s pouze českými vzorky. Graf (A) ukazuje na svislé ose logaritmus pravděpodobnosti modelu optimálního rozdělení do daného počtu skupin (K , vodorovná osa). Jde o průměrnou hodnotu z 10 běhů programu. Čím vyšší je hodnota, tím pravděpodobnější je rozdělení do daného počtu skupin. $L(K)$ roste s počtem skupin až do K =počet jedinců. Hledáme takové K , kdy zlepšení pro $K+1$ již není výrazné (to je nejlepší, má nejvyšší ΔK). Graf (B) ukazuje průměrnou míru změny pravděpodobnosti mezi výpočty s dvěma různými K (počty skupin). Graf (C) analogicky ukazuje míru změny mezi dvěma páry běhů programu, tedy mezi dvěma body grafu (B). Graf (D) ukazuje ΔK získané jako průměr absolutních hodnot z grafu (C) za všechny běhy programu pro dané K . Jako nejlepší se ukazuje rozdělení jedinců do 2 skupin (má nejvyšší ΔK). Podobnost mezi jednotlivými běhy programu Structure, která pomáhá vybrat optimální K je i na obr. 4.10 a 4.11.



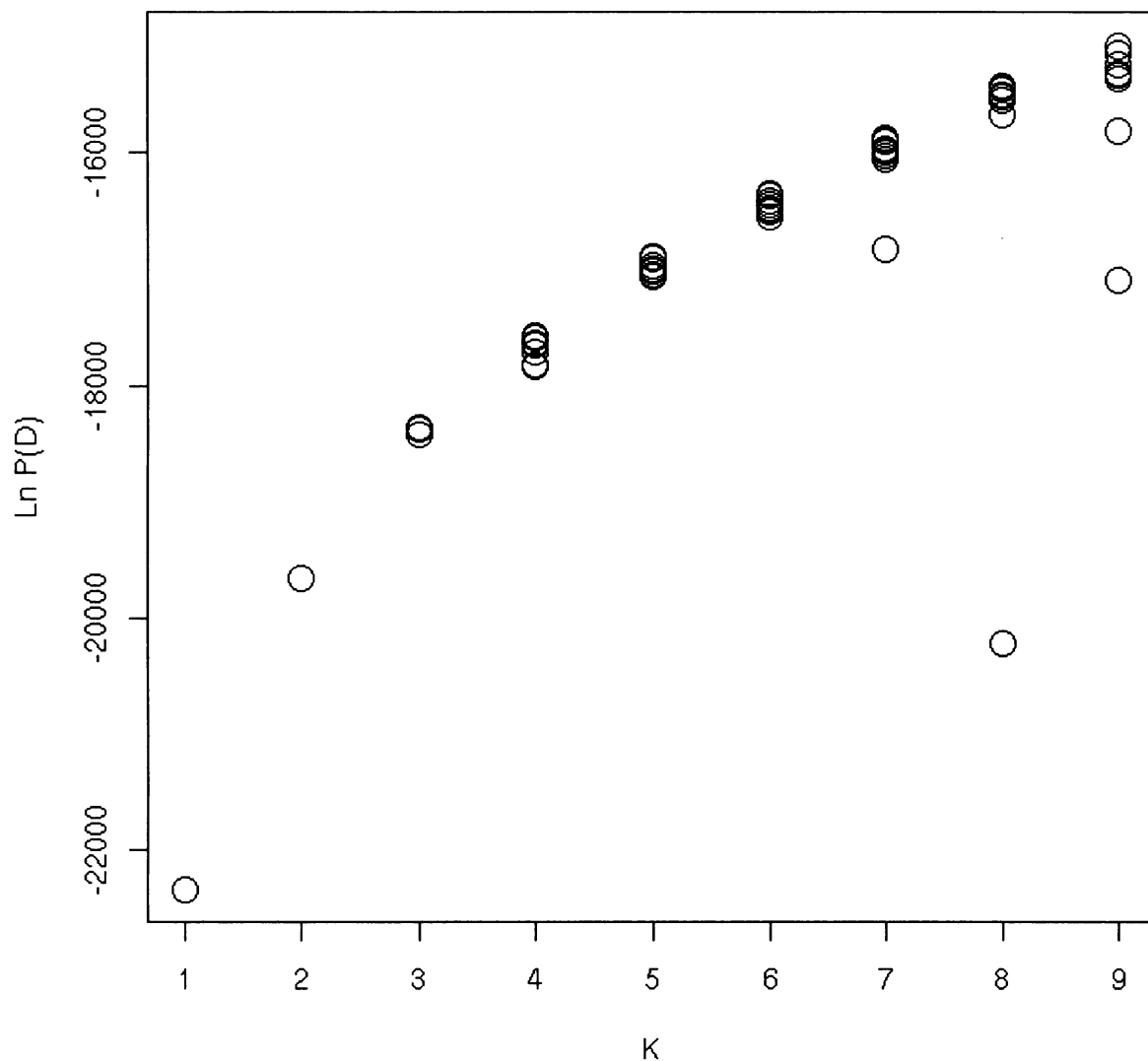
Obrázek 4.10: Podobnost jednotlivých běhů programu Structure pro české vzorky pro určené počty shluků. Algoritmus měl určený maximální počet shluků (K , vodorovná osa), pro každý počet běžel výpočet 10×. Na svislé ose je logaritmus pravděpodobnosti modelu optimálního rozdělení do daného počtu skupin (K). Nejstabilnější výstupy jsou pro dva a tři shluky (pravděpodobnost se mezi jednotlivými běhy algoritmu nemění, výsledek je konzistentní). Viz též obr. 4.11.



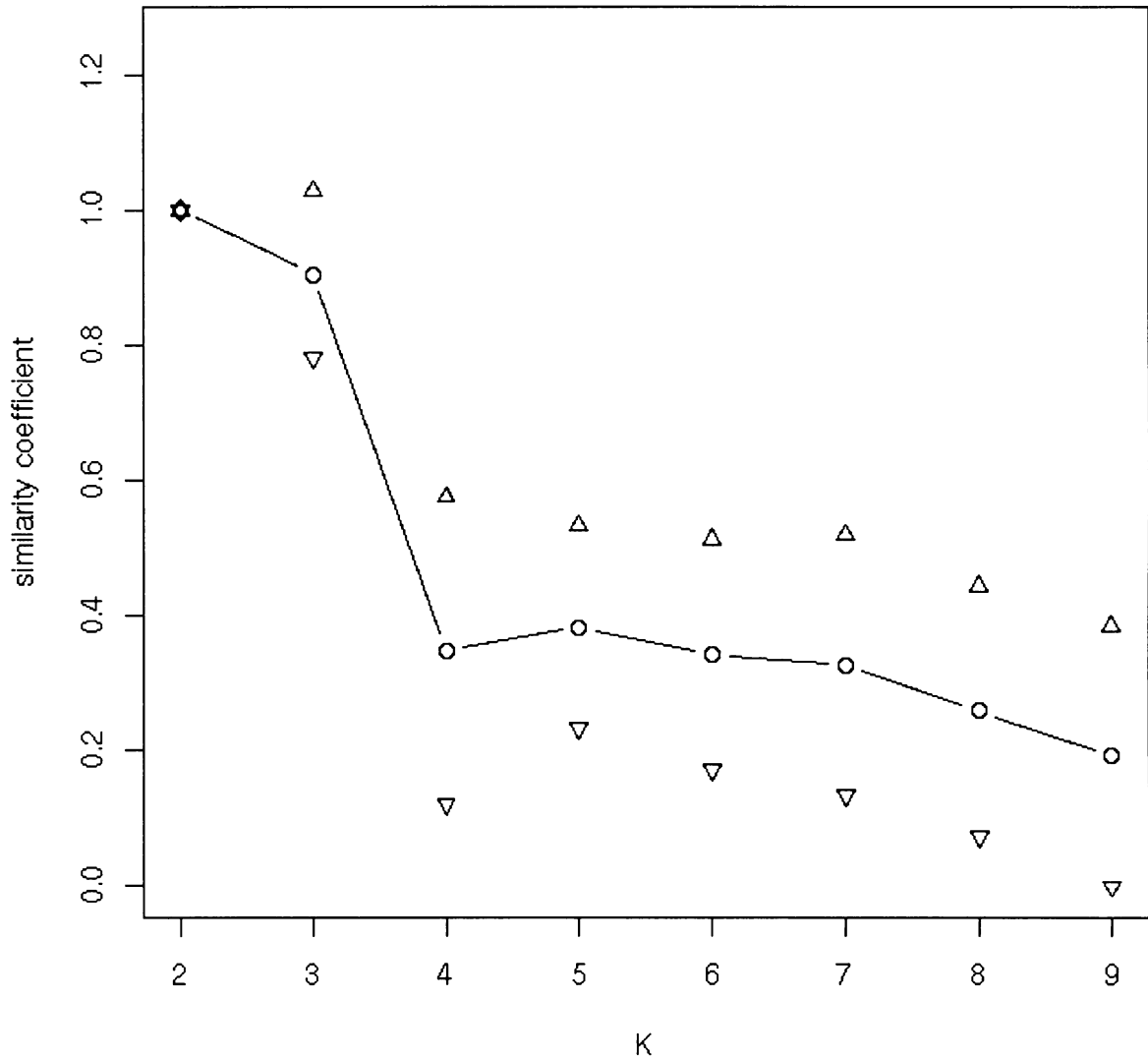
Obrázek 4.11: Koeficient podobnosti (svislá osa) mezi jednotlivými páry běhů programu Structure pro české vzorky pro určené počty shluků (K , vodorovná osa). Algoritmus měl určený maximální počet shluků (K , vodorovná osa), pro každý počet shluků (pro každé K) běžel výpočet $10\times$. Graf ukazuje průměrný koeficient podobnosti mezi páry běhů programu Structure a směrodatnou odchylku. Jako jednoznačně nejlepší vychází rozdělení na 2 skupiny (všechny běhy jsou stejné), ale má smysl uvažovat i o rozdělení na 3 skupiny, protože je mezi nimi stále vysoká podobnost a mají malou směrodatnou odchylku. Jak je vidět na obr. 4.15, jedna varianta vyšla v tomto případě $9\times$ a druhá $1\times$. Viz též obr. 4.10.



Obrázek 4.12: Výstupy Structure-sum ukazující výsledky získané s českými i zahraničními vzorky. Graf (A) ukazuje na svislé ose logaritmus pravděpodobnosti modelu optimálního rozdělení do daného počtu skupin (K , vodorovná osa). Jde o průměrnou hodnotu z 10 běhů programu. Čím vyšší je hodnota, tím pravděpodobnější je rozdělení do daného počtu skupin. $L(K)$ roste s počtem skupin až do K =počet jedinců. Hledáme takové K , kdy zlepšení pro $K+1$ již není výrazné (to je nejlepší, má nejvyšší ΔK). Graf (B) ukazuje průměrnou míru změny pravděpodobnosti mezi výpočty s dvěma různými K (počty skupin). Graf (C) analogicky ukazuje míru změny mezi dvěma páry běhů programu, tedy mezi dvěma body grafu (B). Graf (D) ukazuje ΔK získané jako průměr absolutních hodnot z grafu (C) za všechny běhy programu pro dané K . Jako nejlepší se ukazuje rozdělení jedinců do 2 skupin (má nejvyšší ΔK). Podobnost mezi jednotlivými běhy programu Structure, která pomáhá vybrat optimální K je i na obr. 4.13 a 4.14.



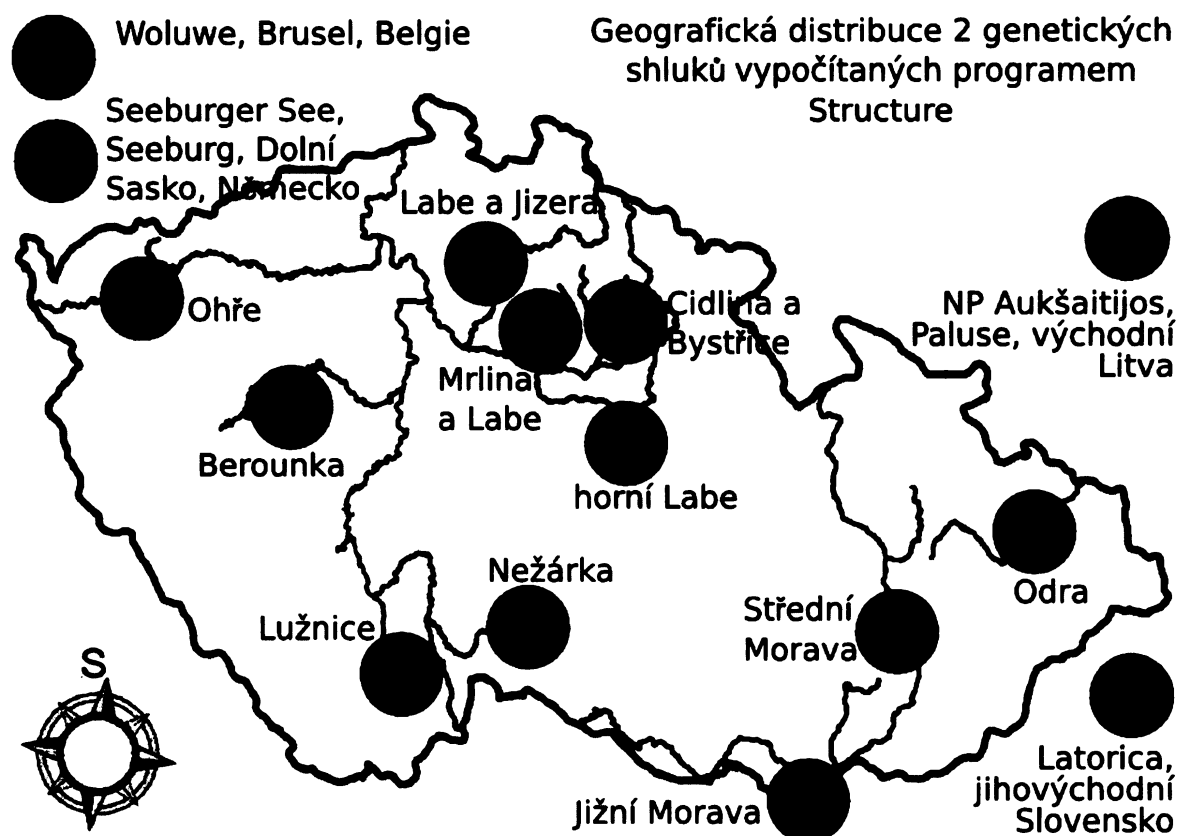
Obrázek 4.13: Podobnost jednotlivých běhů programu Structure pro české i zahraniční vzorky pro určené počty shluků. Algoritmus měl určený maximální počet shluků (K , vodorovná osa), pro každý počet běžel výpočet 10×. Na svislé ose je logaritmus pravděpodobnosti modelu optimálního rozdělení do daného počtu skupin (K). Nejstabilnější výstupy jsou pro dva a tři shluky (pravděpodobnost se mezi jednotlivými běhy algoritmu nemění, výsledek je konzistentní). Viz též obr. 4.14.



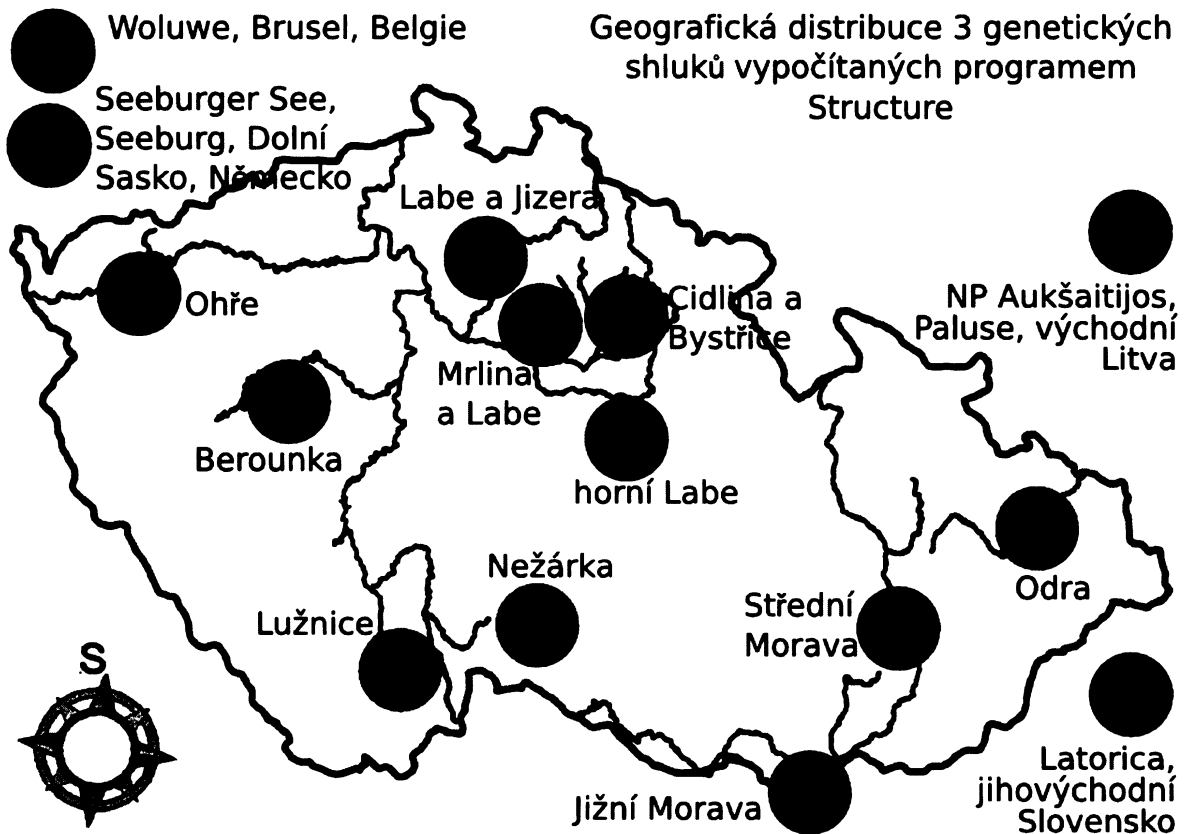
Obrázek 4.14: Koeficient podobnosti (svislá osa) mezi jednotlivými páry běhů programu Structure pro české i zahraniční vzorky pro určené počty shluků (K , vodorovná osa). Algoritmus měl určený maximální počet shluků (K , vodorovná osa), pro každý počet (pro každé K) běžel výpočet $10\times$. Graf ukazuje průměrný koeficient podobnosti mezi páry běhů programu Structure a směrodatnou odchylku. Jako jednoznačně nejlepší vychází rozdělení na 2 skupiny (všechny běhy jsou stejné), ale má smysl uvažovat i o rozdělení na 3 skupiny, protože je mezi nimi stále vysoká podobnost a mají malou směrodatnou odchylku. Jak je vidět na obr. 4.15, jedna varianta vyšla v tomto případě $9\times$ a druhá $1\times$. Viz též obr. 4.13.



Obrázek 4.15: Shlukování jedinců do skupin podle jejich genetické podobnosti programem Structure. Každý sloupeček je jeden jedinec. Je-li jednobarevný, znamená to, že jedinec se 100% pravděpodobností náleží do daného barevně odlišeného genetického shluku. Poměr barev ve sloupečku odpovídá pravděpodobnosti příslušnosti daného jedince do daných barevně odlišených genetických shluků. Obr. (A), (C) a (D) ukazují shlukování vzorků pouze z ČR, obr. (B), (E) a (F) i z dalších zemí. Podle výsledků (obr. 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 a 4.14) vychází jako jednoznačně nejlepší rozdělení na 2 skupiny ((A) a (B), které bylo velice ustálené a ve všech 10 opakováních vyšlo stejně), nicméně má smysl uvažovat i o rozdělení na 3 skupiny ((C)–(F)): rozdělení českých vzorků na 3 skupiny vyšlo 9× podle (C) a 1× podle (D). Obdobně rozdělení českých i zahraničních vzorků na 3 skupiny vyšlo 9× podle (E) a 1× podle (F). Čísla pod obrázky odpovídají geografickým oblastem (viz str. 32, 38 a 111): (1) CHKO Poodří, (2) Střední Morava, (3) Jižní Morava, (4) Lužnice, (5) Nežárka, (6) Berounka (Křivoklátsko), (7) Ohře (Karlovarsko), (8) Labe a Jizera, (9) Mrlina a Labe, (10) Cidlina a Bystřice, (11) horní Labe, (12) Slovensko, (13) Belgie, (14) Německo a (15) Litva. Mapa ukazující polohu jednotlivých populací je na obr. 3.3 (ČR) a 3.4 (zahraničí). Mapa zobrazující geografickou distribuci vypočítaných genetických skupin je na obr. 4.16 (2 shluky) a 4.17 (3 shluky).



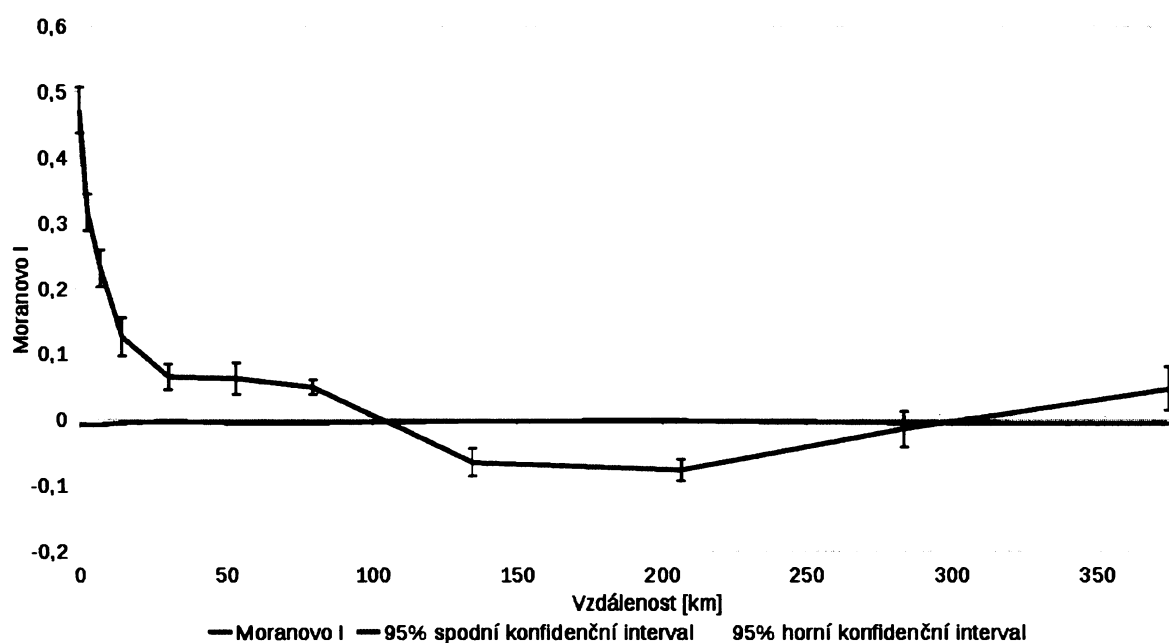
Obrázek 4.16: Geografická distribuce genetických (barevně odlišených) shluků vypočítaných programem Structure a zobrazených na obr. 4.15 (barvy jsou stejné) v rámci geografických oblastí (skupin populací, viz str. 32 a 111). Pro popis vazeb mezi oblastmi viz popisek k obr. 4.15. Jde o variantu se 2 shluky, která je podle výsledků nejlepším rozdělením jedinců do genetických skupin. Varianta s rozdělením na 3 shluky je na obr. 4.17.



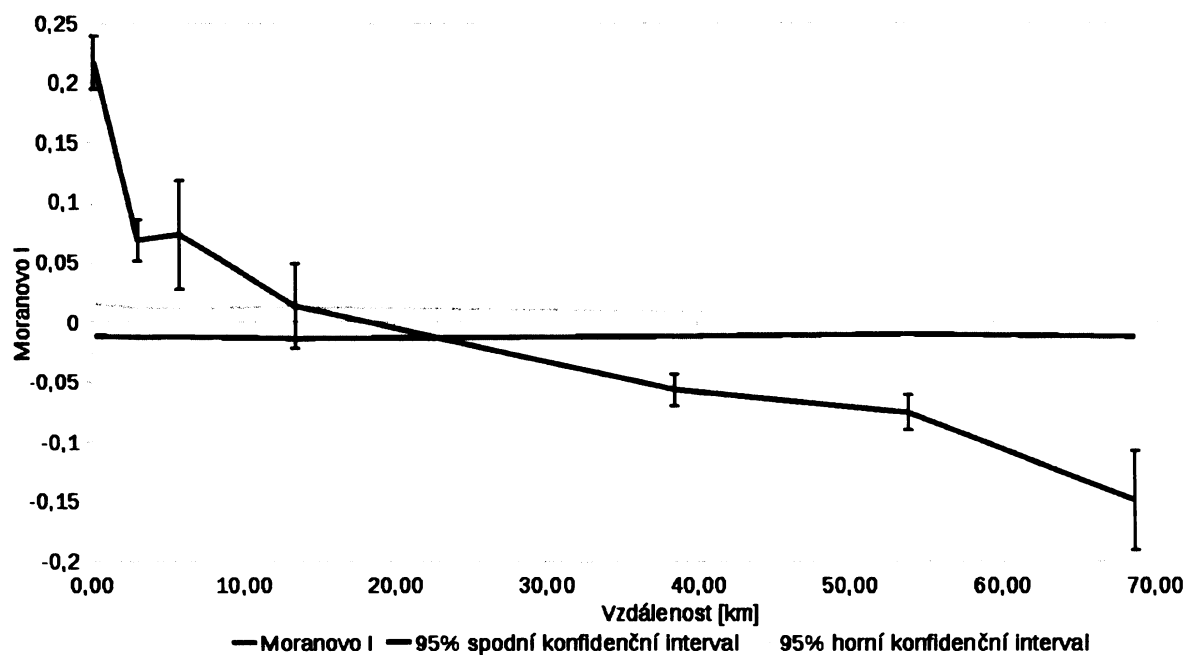
Obrázek 4.17: Geografická distribuce genetických (barevně odlišených) shluků vypočítaných programem Structure a zobrazených na obr. 4.15 (barvy jsou stejné) v rámci geografických oblastí (skupin populací, viz str. 32 a 111). Pro popis vazeb mezi oblastmi viz popisek k obr. 4.15. Jde o variantu se 3 shluky, která je podle výsledků nejlepším rozdělením jedinců do genetických skupin. Varianta s rozdělením na 2 shluky je na obr. 4.16.

4.1.7 Vztah genetické a geografické vzdálenosti

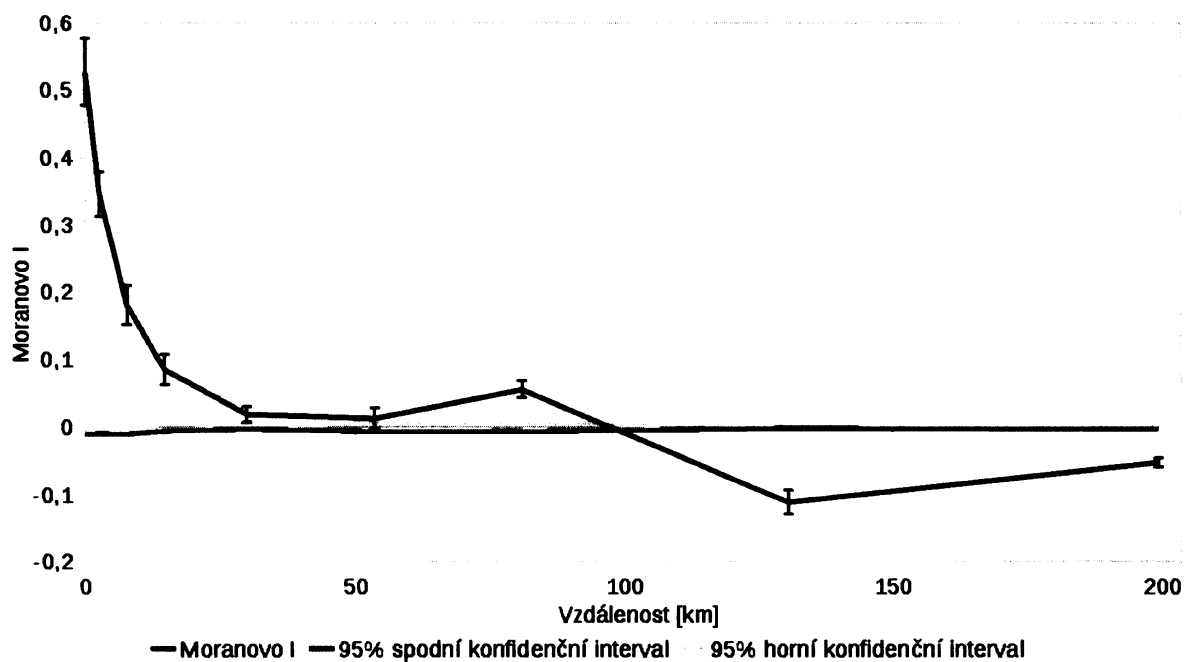
V datech byla pomocí měření Moranova I objevena signifikantní prostorová struktura párové genetické podobnosti mezi jedinci. Se vzrůstem přímé geografické vzdálenosti mezi jedinci v průměru klesala jejich genetická podobnost (viz obr. 4.18, 4.19 a 4.20). Bylo počítáno s přímými geografickými vzdálenostmi (1) mezi všemi českými vzorky (489 vzorků, obr. 4.18), (2) mezi vzorky z povodí Moravy (110 vzorků, obr. 4.19) a (3) mezi vzorky z povodí Labe (350 vzorků, obr. 4.20). Obecně párová genetická podobnost se vzdáleností klesá, u středních vzdáleností dochází ke stagnaci až slabému nárůstu podobnosti. Jedinci jsou prostorově autokorelovaní. Jedinci vzdálení více jak 110–120 km jsou negativně autokorelovaní, což naznačuje izolaci geografickou vzdáleností (isolation by distance) u stulíku žlutého. V rámci povodí Moravy k tomuto dochází už na 25. km, což může souviset s tím, že stulík byl sbírán z úseku střední Moravy a velké množství vzorků je z poměrně malého povodí Kyjovky. Údaje o výskytu stulíku mezi těmito dvěma oblastmi jsou velmi vzácné a nejisté. Navíc je v Povodí Moravy Moranovo I nejmenší, což může souviset s tím, že populace ze střední Moravy jsou z izolovaných tůní mimo vlastní řeku. Podobný vzorkovací problém nastává v povodí Labe, kde chybí vzorky z Vltavy (stulík z ní prakticky není udáván), ale (pravděpodobně vzhledem k větší rozloze, zvláště pak Polabí severozápadně od Prahy) jsou negativně korelování až velmi vzdálení jedinci. Výpočty shrnuje tab. 4.7.



Obrázek 4.18: Prostorová autokorelace 489 vzorků z celé ČR. Modrá čára zobrazuje získanou hodnotu Moranova I (svislá osa) a směrodatnou odchylku pro danou přímou geografickou vzdálenost mezi jedinci (vodorovná osa). Přehled vzdáleností pro jednotlivé vzdálenostní třídy je v tab. 4.7. Do 45. km dochází k poklesu párové genetické podobnosti mezi jedinci, dalších 55 km podobnost stagnuje a jedinci vzdálení více než asi 110 km již nejsou pozitivně autokorelování. Vzdálenější jedinci jsou negativně korelování, což naznačuje izolaci geografickou vzdáleností u stulíku žlutého.



Obrázek 4.19: Prostorová autokorelace 110 vzorků z povodí Moravy. Modrá čára zobrazuje získanou hodnotu Moranova I (svislá osa) a směrodatnou odchylku pro danou přímou geografickou vzdálenost mezi jedinci (vodorovná osa). Přehled vzdáleností pro jednotlivé vzdálenostní třídy je v tab. 4.7. Prvních 4,5 km dochází k rychlému poklesu, dále dochází ke stagnaci párové genetické podobnosti a následuje opětovný pokles. Jedinci vzdálení více jak zhruba 25 km už spolu nejsou pozitivně autokorelování. Korelace je v povodí Moravy celkově poměrně slabá, zhruba poloviční oproti Polabí (obr. 4.20) i celé ČR (obr. 4.18). Vzdálenější jedinci jsou negativně korelování, což naznačuje izolaci geografickou vzdáleností u stulíku žlutého.



Obrázek 4.20: Prostorová autokorelace 350 vzorků z Čech. Modrá čára zobrazuje získanou hodnotu Moranova I (svíslá osa) a směrodatnou odchylku pro danou přímou geografickou vzdálenost mezi jedinci (vodorovná osa). Přehled vzdáleností pro jednotlivé vzdálenostní třídy je v tab. 4.7. Během prvních 45 km dochází k poklesu párové genetické podobnosti, dalších téměř 55 km je jen málo pozitivní, zprvu stagnuje, posléze mírně roste. Jedinci vzdálení více jak asi 110 km spolu již nejsou pozitivně autokorelování. Vzdálenější jedinci jsou negativně korelování, což naznačuje izolaci geografickou vzdáleností u stulíku žlutého.

4.2 Klíčení oddenkových úlomků



Obrázek 4.21: Typický stav tlustšího oddenkového úlomku po měsíci ve vodní nádrži (stav 21. 5. 2008).

Průběh počasí byl následující: duben — zamračený, deštivý, chladný, květen — sucho, slunečno, teplo a červen — deštivo, až posledních pár dnů před koncem pokusu se vyjasnilo a oteplilo. Všechny úlomky oddenků byly v polovině vynořené nad hladinou fialové, ponořená část byla bílá, po prohnití černá (více rozložená), a celkově byly změkklé (viz obr. 4.21). Oddenky bez listů (bez vzrostného vrcholu) se až na tvrdší povrchovou vrstvu úplně rozložily a jejich obsah vytekl do vody. Všechny oddenky s listy (vzrostným vrcholem) bez ohledu na velikost dobře prosperovaly a tvořily mladé listy (pokud na oddenku nebyl kus kořene, nové kořeny se netvořily) a využívaly zásob k aktivnímu růstu.

4.3 Klíčivost semen

V osmi plodech bylo celkem 982 semen (v 1 jednom plodu nebylo žádné, v jednom 26, v ostatních 114–184, průměr byl v 7 plodech 140). Ze 491 semen umístěných v kultivačním boxu jich na jaře 2007 vyklíčilo 11 (2,2 %). Ze 491 semen klíčících v miskách za oknem

Tabulka 4.8: Počty semen (2. sloupec) a jejich klíčivost při různých typech ošetření (řádky) a v různých letech (3.–5. sloupec). Semena pocházela ze sedmi plodů z jedné populace (Li z Cidliny mezi Libicí nad Cidlinou a soutokem s Labem). — značí, že v daném roce nebylo ošetření tímto způsobem provedeno. První rok byla polovina semen klíčena ve vodě v kultivačním boxu (z nich vyklíčilo 2,2 %) a polovina ve vodě za oknem (z nich nevyklíčilo nic), ze semen klíčících v kultivačním boxu bylo odebráno po 20 semenech a povrchově narušeno (1. skupina) a byl k nim přidán zahnívajícím materiál (2. skupina). Z nich také nevyklíčilo nic. Druhý rok byla všechna semena nechána od léta přes zimu po následující léto v bazénku v BÚ AV ČR v Průhonicích. Tam vyklíčilo 43,6 %. Poslední rok na stejném místě již nevyklíčilo nic.

Ošetření	Počet semen	Klíčivost 2007	Klíčivost 2008	Klíčivost 2009
Kultivační box	491	11 (2,2 %)	—	—
Misky za oknem	491	0	—	—
Narušené broušením	20	0	—	—
S přidáním zahnívajícím materiálem	20	0	—	—
V miskách s hlínou v bazénku v BÚ AV ČR v Průhonicích	951	—	415 (43,6 %)	0

nevyklíčilo žádné. Ze 40 semen odebraných z kultivačního boxu a narušených broušením (20 semen) a přidáním zahnívajícím materiálu (20 semen) nevyklíčilo žádné. Roku 2007 tak z 982 semen vyklíčilo pouze 11 (1,1 %). Z 951 semen nechaných v bazénku v Botanickém ústavu Akademie věd ČR v Průhonicích jich na jaře 2008 vyklíčilo 415 (43,6 %). V jedné misce nevyklíčilo žádné semeno, v jedné vše a ve zbylých pěti miskách 20–60 %. Na jaře 2009 již nic nevyklíčilo. Celkový přehled ukazuje tab. 4.8.

Kapitola 5

Diskuze

Molekulární techniky umožnily zodpovědět řadu fylogeografických otázek o šíření a rozšíření stulíku žlutého, které by jinými technikami byly neřešitelné. Používal jsem nepřímé metody odhadu šíření (využívající molekulární techniky), tj. studuji historii šíření za celou dobu existence systému. Výsledky tak neukazují pouze současný stav, ale i jeho vývoj (Avice, 2000; Ouborg et al., 1999).

Častým problémem fylogeografických analýz bývá nedostatečné rozlišení použitého molekulárního markeru. V tomto případě je, jak ukazuje AMOVA, variabilita v rámci populací tak vysoká (podle F_{ST} : 58 % a podle R_{ST} : 37 %), že jakákoliv struktura na vyšší úrovni se stává velmi nezřetelnou. To může být způsobeno jak tím, že použité mikrosatelitové lokusy jsou příliš variabilní, tak tím, že mezi populacemi opravdu není žádná výraznější struktura a jednotlivé populace jsou dosti izolované a zvláště vzdálenější populace (z různých povodí, ...) jsou velmi odlišné. Pro jasné odlišení těchto případů by bylo potřeba zopakovat analýzy s méně variabilním markerem.

Obdobný problém zaznamenali i Arafah and Kadereit (2006) studující *Calystegia soldanella* na evropském pobřeží. Nepodařilo se jim odhalit žádnou fylogeografickou strukturu. Autoři diskutují možnou roli poslední doby ledové, ale nakonec se přiklání k vysvětlení kombinací častého dálkového přenosu (semena mají obrovskou klíčivost i po dlouhém pobytu v moři a velice dobře plavou) a dlouhověkých klonů. I když klony jsou velké maximálně asi 30 m, vnitropopulační genetická variabilita je velice malá.

Genetická variabilita uvnitř populací vodních rostlin bývá obecně spíše nízká, ale mezi populacemi vysoká (Santamaría, 2002). Pravděpodobně je to díky dlouhodobě žijícím klonům. Tendence ke klonalitě zlepšuje možnosti přežití populace. Vodní klonální rostliny žijí v mikrohabitatu, v prostředí, ve kterém je na omezené ploše mozaika různých habitatů, které se vyplatí obsadit klonálním růstem (protože daný klon je pro daný konkrétní mikrohabitat nejlépe přizpůsoben). Naopak na větší vzdálenosti je výhodnější šířit se variabilnějšími generativními diasporami, u kterých je větší šance, že jejich různé genotypy budou odpovídat i jiným prostředím (Santamaría, 2002; Clausen et al., 2002). Rozdílný charakter distribuce genetické diverzity stulíku je pravděpodobně dán tím, že míra jeho klonality je výrazně nižší než u rostlin typu *Potamogeton* (Mader et al., 1998) nebo *Ei-*

chhornia (Ren et al., 2005).

5.1 Klonální struktura populací

Mezi 528 analyzovanými jedinci ze 70 populací bylo v 11 populacích nalezeno jen 15 malých klonů o velikosti 2–3 jedinců. Kromě klonů bylo v rámci 14 populací nalezeno ještě celkem 37 párů jedinců, kteří se lišili v jediné alele, což svědčí pro blízkou příbuznost takových jedinců (může jít i o somatickou mutaci¹). Všechny nalezené klony vykazují několik společných rysů: jedná se o větší populace vyskytující se v klidné vodě (tůň nebo nějaká říční laguna, třeba nad jezem) a v místech, kde má jedinec kolem sebe dostatek volného prostoru na růst a není ničím omezován. Populace také musí být dostatečně stabilní v čase (nesmí být příliš často disturbována). Vzhledem k tomu, že takových populací jsem potkal jen málo (populace nejčastěji sestávala z řady skupin jedinců oddělených volným prostorem, málokdy šlo o jeden velký souvislý porost), nedomnívám se, že by míra klonality měla být výrazně vyšší, než ta — i přes místy poměrně řídký sběr — detekovaná. Spíš se domnívám, že to závisí na výše zmíněných charakteristikách populace. Obecně se dá tvrdit, že populace sestává spíše z většího množství menších klonů než z několika rozsáhlých klonů. Klonální růst se zdá být důležitý na prostorové škále jednotek metrů (což souhlasí s Hart and Cox, 1995; Barrat-Segretain, 1996; Fér and Hroudová, 2008; Zeisek, 2007).

Za převahu klonálního růstu na velmi malých škálách může být zodpovědné nejlepší přizpůsobení daného klonu jeho mikrohabitatu (Santamaría, 2002). Např. Pilon and Santamaría (2002) zjistili, že *Potamogeton pectinatus* tvoří v jednotlivých lokalitách klony adaptované na různé teploty vody (mají různé teplotní optimum fotosyntézy). Puijalón et al. (2008) přišli s výsledky zajímavými i pro růst stulíku v různých typech prostředí²: zjistili, že klony *Potamogeton coloratus* a *Mentha aquatica* přenesené do proudící vody zareagovaly na proud změnou charakteru klonálního růstu, zvýšeným podílem dlouhivého růstu a stonků plazících se po směru proudu. Obdobný mechanismus je představitelný i pro stulík v proudící vodě, kde mu proud nebo jiný druh (mechanického) stresu nedovoluje plně uplatnit své možnosti klonálního rozrůstání se do všech stran, zatímco v klidné vodě tůň se může relativně volně rozrůstat (nestojí-li mu v cestě nějaká překážka typu vyvráceného stromu).

Míra klonality vodních rostlin je stále poněkud sporná záležitost. Dříve se obecně předpokládalo vysoký stupeň klonality (Santamaría, 2002), dnešní studie (snad díky vyšší rozlišovací schopnosti molekulárních markerů) odhadují spíše nižší míru klonality. Úplná shoda nepanuje ani v rámci jednoho druhu a oblasti. Např. Ren et al. (2005) zjistili v rámci čínských populací *Eichhornia crassipes* vysokou míru klonality a nízkou diferenciaci v rámci i mezi populacemi a argumentují lidským vlivem (člověk jej nezáměrně šíří, podobně to bylo v Evropě s invazí *Elodea canadensis*, Thiébaud, 2007) a vysokou mírou

¹Vyloučit nelze ani skórovací chybu při zpracovávání primárních dat. Tomu jsem se však snažil předejít opakovanými kontrolami.

²Je míněn hlavně charakter proudění vody, dna apod.

klonálního růstu; v pozdější práci (Ren and Zhang, 2007) objevili v populacích větší množství klonů (a nepotvrzují tak původní předpoklad monoklonality populací *Eichhornia*). Uvažují jednak o vlivu člověka přenášejícího klony z lokality na lokalitu (zvyšuje se tak množství klonů na jedné lokalitě) a disturbujícího populace, jednak o vlivu vodního proudu (v řekách byla míra klonality menší). Podobně Pollux et al. (2007) zjistili, že míra klonality v rámci populací z nemalé části závisí na rychlosti říčního proudu, což je mechanismus představitelný i pro stulík (a moje data jej naznačují). Dvě studované řeky v tomto ohledu vykazovaly značné rozdíly.

Na základě dostupných dat a srovnání s dalšími druhy se domnívám, že stulík tvoří spíše menší klony, a to především v místech, kde má dostatek prostoru k volnému růstu a netrpí přílišnými disturbancemi nebo jiným stresem. Rozhodně netvoří (i díky důležité roli pohlavního rozmnožování, Arber, 1920; Heslop-Harrison, 1955) porosty tvořené jedním nebo několika málo klony, spíše naopak. Pro důkaz by bylo potřeba sesbírat vzorky z úplně všech jedinců z celé velké populace. Takovýto sběr by bylo vhodné opakovat ve více populacích. Jak bylo v této práci ukázáno, použité mikrosatelitové lokusy jsou dostatečně variabilní, aby bylo možné jednotlivé klonální jedince spolehlivě detekovat.

5.2 Semena, oddenkové úlomky a šíření stulíku

Na nejkratší vzdálenosti se stulík žlutý šíří převážně rozrůstáním jednotlivých trsů, na delší semeny (Barrat-Segretain, 1996; Smits et al., 1989). Méně se ví o možné roli oddenkových úlomků, o kterých se předpokládá, že se jejich prostřednictvím stulík může šířit, ale že toto šíření není příliš významné (Arber, 1920; Heslop-Harrison, 1955). Nelze pominout ani možnost šíření vodními ptáky (str. 94) nebo člověka.

5.2.1 Klíčivost semen

Dramatický rozdíl mezi prakticky nulovým klíčením v umělých podmínkách (které se snažily napodobit podmínky přirozené) a mohutným klíčením ve víceméně přirozených podmínkách druhý rok může být způsoben dvěma faktory:

1. Umělé podmínky semenům z nějakého důvodu nevyhovovaly anebo
2. jde o ukázkou obecnější skutečnosti, že vodní rostliny mají často pozdrženou klíčivost semen a v 1. sezóně jich vyklíčí jen relativně málo, semena však zůstávají klíčivá několik let (viz např. Arber, 1920).

Obdobné výsledky získal i Fér (2000). Semena stratifikovaná na vzduchu (na vlhkém filtračním papíru) vůbec neklíčila, ta stratifikovaná ve vodě klíčila ve vodě, ale ne na vzduchu. Klíčilo asi 20 % semen. Pokus byl prováděn pouze jednu sezónu. V přírodě semena klíčí v anaerobním bahně a mladé semenáčky rychle rostou ke světlu. Úspěšnost semenáčků je limitována hlavně světlem. Semena mohou zůstat klíčivá několik málo let (Arber, 1920;

Heslop-Harrison, 1955; Barrat-Segretain, 1996). Fér (2000) udává průměrný počet semen v plodu téměř 200, Barrat-Segretain (1996) 285, ale považuje to za podhodnocené. Já jsem našel v sedmi plodech v průměru 140 semen (26–184), v jednom dalším plodu nebylo žádné (pravděpodobně šlo o nedozrálý plod), ale vzhledem k malému počtu plodů nemohu průměrný počet semen v plodu blíže odhadnout. Na vině může být i případná geografická variabilita v počtu semen v plodu, nicméně já jsem semena sbíral ve stejné oblasti jako Fér (2000).

Je možné, že v tomto případě se podepsaly oba dva vlivy. Každopádně jako nejvhodnější se jeví stratifikování i klíčení semen v přirozených podmínkách (nepříliš hluboká stojatá až mírně proudící voda, bahnitě až kamenité dno). V přírodě, kde stulík přirozeně roste lze taková místa najít velmi často do úrovně normální hladiny. Malé periodické tůně vznikající při jarních povodních stulíku nevyhovují a v řekách (hlavně v neregulovaných úsecích), slepých ramenech a velkých tůních je míst vhodných ke klíčení dostatek (pokud sama tato místa nejsou regulacemi a melioracemi toku zničena). Zdá se, že etiolované listy může produkovat až asi 4–5 m pod hladinou a vyrůst tak z anaerobního dna ke světlu a vzduchu Barrat-Segretain (1996).

5.2.2 Plovatelnost semen a šíření v říčním systému

Semena stulíku prakticky neplavou (Arber, 1920; Heslop-Harrison, 1955; Hart and Cox, 1995; Barrat-Segretain, 1996; Smits et al., 1989; Fér, 2000). Mají téměř stejnou hustotu jako sediment a rychle se potápí. Jednotliví jedinci si jsou významně podobní až na vzdálenost asi 110 km (v povodí Moravy jen do asi 20 km, tam je díky geografické situaci výměna diaspor stížená a koeficient podobnosti je mnohem nižší než v Polabí nebo v celé ČR), což naznačuje určitou komunikaci semeny i mezi vzdálenými populacemi. AMOVA (viz dále) sice ukazuje vysokou míru izolace jednotlivých populací a zvláště povodí, nicméně mezi prostorově bližšími populacemi zjevně dochází k určité (i když asi nepříliš intenzivní) výměně genetického materiálu. Výsledky analýzy prostorové autokorelace mezi genetickou podobností a geografickou vzdáleností ukazují, že blízké populace si jsou významně podobné, zatímco vzdálené jsou velmi odlišné (viz kap. 5.3.2). AMOVA dává „globální“ obraz a nebere v potaz prostorovou blízkost/vzdálenost lokalit, proto je možné tvrdit, že mezi prostorově bližšími populacemi dochází k určité výměně semen. Tomu nasvědčuje i skutečnost, že AMOVA počítaná v rámci jednotlivých povodí vykazovala zvýšení variability v rámci populací a snížení mezi geografickými oblastmi (skupinami populací).

Pravděpodobnost šíření semeny zvyšuje jednak vysoká produkce semen (Hart and Cox, 1995; Barrat-Segretain, 1996), jednak to, že semena zůstávají po rozpadu dobře plavajícího plodu ještě několik dní spojena v plavající hlenovité hmotě (Arber, 1920; Heslop-Harrison, 1955; Hart and Cox, 1995; Barrat-Segretain, 1996; Smits et al., 1989). Dobře plavající plody mohou být říčním proudem snadno transportovány. I neplavající semena mohou být transportována spolu se sedimentem a jejich velká produkce může zaručit, že alespoň

část z nich se dostane do podmínek vhodných k vyklíčení. Klíčení stulíku je limitováno hlubší vodou, anoxií a nedostatkem světla (stulík může klíčit i ve tmě, ale musí se rychle dostat na světlo Smits et al., 1989; Hart and Cox, 1995; Barrat-Segretain, 1996). Mnoho semen navíc zůstává dormantních několik let a řádově týdny mohou přežít i mráz (Arber, 1920; Smits et al., 1989).

Nilsson et al. (1991) prováděli pokusy s dřevěnými kostkami napodobujícími semena uvolněná do proudu a zkoumali jejich depozici (odpovídala rozložení pobřežní vegetace). Podle výsledků je hydrochorie neefektivní pro krátce plovatelná semena. To ale znamená, že je bezvýznamná. Pro stulík a jeho neplavající semena je jen málo dokladů vegetativního šíření na větší vzdálenost, naopak o generativním šíření je dostatek informací (Fér and Hroudová, 2008; Barrat-Segretain, 1996; Smits et al., 1989). Johansson and Nilsson (1993) ukázali na příkladu *Ranunculus lingua* ve Švédsku, že u vodních rostlin není selekční tlak na plovatelnost semen, protože se velmi snadno — v porovnání se suchozemskými — fragmentují a šíří vegetativně. Je to odpověď na zdánlivý paradox, že vodní rostliny s dobrou schopností klonálního rozmnožování nemívají příliš plovatelná semena (Johansson et al., 1996). Pohlavní rozmnožování je často omezováno stresujícími podmínkami vodního prostředí, které je prostorově velmi heterogenní. Jde např. o zaplavení a následnou anoxii nebo naopak o pokles hladiny vody a hrozící vyschnutí atd (Santamaría, 2002).

K velkému transportu diaspor stulíku možná dochází převážně během krátkých period záplav a podobných událostí, které mají obvykle za následek přesun velkého množství různého materiálu. Dá se předpokládat, že semena (nebo jiné propagule) se pohybují spíše na krátké vzdálenosti (stepping-stone model příbuznosti a šíření Kimura and Weiss, 1964). Některé populace mezi současnými výskyty stulíku mohly již dávno zaniknout (Riis and Sand-Jensen, 2001; Egertson et al., 2004) a my tak dnes máme tendenci nadhodnocovat význam dálkového šíření na úkor krátkých přesunů mezi sousedními populacemi. Lze si i představit, že velká plovatelnost semen je pro vodní rostliny nevýhodná: semena mohou odplavat až příliš daleko (mimo vhodné biotopy) nebo je vysoká hladina vody během povodní vynese vysoko nad normální stav vody, kde pak semena zahynou.

5.2.3 Oddenkové úlomky jako možný dispersní agens

Na jakékoliv kategoričtější závěry bylo zkoumáno příliš malé množství vzorků, což bylo dáno jejich nadmíru obtížným sběrem (ve dne jsou zarostlé nad očekávání pevně). Vzhledem k pevnému srůstu se dnem považují možnost šíření tímto vektorem za spíše méně pravděpodobnou. Ale např. Arber (1920); Heslop-Harrison (1955) o této možnosti uvažují jako reálné formě šíření. Pokud už je oddenek ulomen a má-li pár listů, trochu zásob a kořenů, zdá se, že může bez potíží úspěšně zakořenit a dát vznik nové rostlince. Musí se ale zachytit na vhodném místě. Jarní záplavy jej mohou vynést vysoko nad normální stav vody, kde pak na suchu zahyne.

Geneticky totožní jedinci byli nalezeni jen v několika málo případech. To sice může být

dáno příliš řídkým samplingem, který nebyl prvořadě cílen na detekci klonů v celém říčním systému, ale i tak lze dálkové vegetativní šíření považovat za spíše řídké. Ačkoliv pro vegetativní šíření mezi populacemi bylo nalezeno jen málo dokladů, nelze jej vyloučit, ale pravděpodobně nehraje významnější roli. Mezi 489 českými vzorky z 66 českých populací bylo nalezeno jen 7 klonů, které se vyskytovaly v různých populacích.

Na Nežárce, kde byly zachyceny dva páry geneticky identických jedinců ve dvou různých populacích, jsou populace v klidnějších tůních nad jezy a kolem mostů. Vegetativní úlomky i plody se mohou poměrně rychlým proudem dostat do populace níže po proudu, zachytit se v klidnější vodě, kde se potom nový jedinec rozrůstá. Populace si jsou geneticky poměrně podobné. Nejvyšší genetická diverzita byla zaznamenána ve dvou populacích na horním toku (které byly největší), nejnižší byla ve 3. ze 4 populací. To nesevědí o zásadním vlivu šíření, spíš o charakteristikách populací: jak jsou velké (a tedy jak jsou náchylné ke genetickému driftu) a jak v nich rostlina roste: jestli jde o souvislý porost pár klonů nebo o diverzifikovanější prostředí. Tuto hypotézu podporují práce Pilon and Santamaría (2002); Puijalón et al. (2008); Ren and Zhang (2007) zmíněné v kap. 5.1 a další.

Zbylé 4 mezipopulační klony byly detekovány v Labi a Jizeře v populacích vzdálených od sebe desítky km (populace Kt, Pt, Sj a Tl, viz str. 36). Vzhledem k četným překážkám v říčním proudu (včetně řady měst) je plování vegetativního úlomku celou cestu naráz poměrně těžko představitelné. Na druhou stranu, současný charakter rozšíření stulíku v krajině nevznikl během několika posledních sezón, ale během stovek, možná až tisíců let. Použitá metoda odhaluje variabilitu nasbíranou za celou dobu historie systému, nejen za pár posledních sezón. Klony mohly být přineseny do svých současných lokalit např. během nějaké velké dávné povodně (nebo během mnoha takovýchto menších událostí). Mohly také migrovat postupně přes řetěz dnes již možná zaniklých nebo jen neovzorkovaných populací. Nebo naopak může jít o náhodný transport v souvislosti s lodní dopravou nebo jinou lidskou aktivitou. Nelze vyloučit ani možnou roli vodního ptactva (např. Figueroles, 2002, str. 94), rybářství, pěstování apod. Obecně nelze vyloučit vliv lidských aktivit, který by výsledky mohl snadno zkreslit. Stulík může být nezáměrně šířen rybáři nebo lodní dopravou a často bývá pěstován jako okrasná květina (i když častější je příbuzný leknín). K vysazování stulíku do zahradních jezírek nebo chatových osad na březích řek prakticky neexistuje evidence, ale určitě k němu dochází. Většinou asi sběrem z jiných nedalekých místních populací a přenesením na nové místo.

Poměrně hustý sběr vzorků byl proveden v Kyjovce a okolních tůních, kde ale nebyly zaznamenány žádné klony. Absence klonů mezi populacemi může být dána tím, že dostat se z tůně do řeky a pak dál je pro semena i vegetativní úlomky poměrně obtížné. Navíc je proud v Kyjovce výrazně pomalejší než v Nežárce, což ještě snižuje šanci na transport diaspor (semena mají hustotu sedimentu a prakticky neplavou, Barrat-Segretain, 1996). Populace v Kyjovce zpravidla tvořily souvislejší porosty, ale spíše shluky několika jedinců oddělené volným prostorem. Jednotliví jedinci z různých populací Kyjovky si jsou geneticky podobní, pravděpodobně tedy dochází k výměně genetického materiálu mezi po-

pulacemi. Podle PCoA (obr. 4.7 na str. 65) nemají jedinci z jednotlivých populací tendenci tvořit shluky, ale populace jsou promíchané. Genetická diverzita nevykazuje po proudu tendenci ke vzrůstu ani k poklesu.

5.3 Vztahy mezi populacemi

5.3.1 Genetická diferenciacie jednotlivých populací a oblastí

Jelikož mikrosatelity vykazují stepwise mutační model (Slatkin, 1995), lze pro odhady genetické podobnosti použít nejen frekvence alel, ale i jejich délky (např. R_{ST} , Slatkin, 1995). Podle AMOVA počítané jako F_{ST} -like je mezi povodími 22 % variability, podle R_{ST} -like 43 % (tab. 4.3 na str. 58). Výrazně vyšší hodnota R_{ST} je pravděpodobně dána výskytem alel, které se mezi vzdálenými populacemi liší o velké množství opakování (jsou velmi odlišné). R_{ST} je bere jako velký rozdíl. Zatímco F_{ST} hodnotí každou rozdílnou alelu stejně, bez ohledu na míru rozdílnosti v délkách. R_{ST} vykazuje nízké hodnoty v rámci populací, což je pravděpodobně dáno výskytem velkého množství vzácných alel, které se liší jen o jedno nebo několik málo opakování. R_{ST} je v tomto případě hodnotí jako relativně menší rozdíl než F_{ST} , které je dáno hlavně společným výskytem relativně běžných alel mezi populacemi a skupinami populací. Kalinowski (2002) přišel s podezřením, že výhody R_{ST} jsou velmi malé došlo-li k izolaci populací relativně nedávno a Balloux and Lugon-Moulin (2002) se domnívají, že v situaci, kdy struktura populací není zcela jasná je F_{ST} lepší než R_{ST} . Proto se domnívám, že F_{ST} analog AMOVA v tomto případě lépe odpovídá realitě (Hartl and Clark, 1989; Galeuchet et al., 2005).

Podobný závěr dávají i fixační koeficienty F-statistiky. Na základě F_{ST} i R_{ST} předpokládají velmi vysoký stupeň izolovanosti jednotlivých populací. Fixační index F_{ST} počítaný na základě čtverce rozdílů v délkách alel (R_{ST}) je výrazně vyšší než na základě podílu shodných alel (F_{ST}), což svědčí pro velmi rozdílné alely v různých povodích, a tedy pro reálně poměrně nízkou míru komunikace mezi povodími.

Potenciálním rizikem s touto AMOVA je určitá nevyrovnanost v počtech jedinců v populacích (viz histogram na str. 33), kdy existuje poměrně vysoké množství populací s malým počtem jedinců. Na to je metoda citlivá (Excoffier et al., 1992). Většina z populací z nejmenší velikostní třídy měla velikost 4 jedinců, ale několik jich bylo jen ze dvou jedinců. Je tedy nutné výsledky AMOVA interpretovat s určitou obezřetností.

Bayesiánské shlukování pomocí programu BAPS 3.2 neodhalilo žádné shluky, které by zabíraly více populací, což svědčí pro velkou míru odlišnosti daných populací. Znamená to, že mezi populacemi není zřetelná struktura na vyšší prostorové úrovni a že jednotlivé populace se od ostatních poměrně výrazně odlišují. To poměrně dobře odpovídá výsledkům AMOVA a F-statistiky. I když některé alely se z velké části vyskytují jen v některých populacích, odlišnosti geografických oblastí nejsou dost velké na to, aby pro ně bayesiánský algoritmus vytvořil vlastní větší shluk. Program Structure (obr. 4.15 na str. 75) jasně definuje shluk Polabí. Prvky polabských populací v jiných populacích



a naopak naznačují občasné dálkové šíření diaspor. Shluk obsahující prakticky celou Moravu je doplněn o jihočeské a další populace. Shluk Moravy není tolik stabilní jako Polabí. Naproti tomu PCoA (viz obr. 4.4 na str. 62) jasně vyděluje Odru, méně i Střední a Jižní Moravu. Od nich se pak odděluje Polabí (i když dochází k určitému míšení jedinců) To velmi dobře odpovídá reálné geografické situaci. Mírně odlišné výsledky Structure a PCoA jsou způsobeny odlišnými algoritmy, nicméně vedou k velmi podobnému závěru: jednotlivá povodí jsou z velké části oddělená. Jednotlivá povodí jsou geneticky hodně odlišná, nicméně k určité komunikaci mezi nimi dochází. Za pozorované charakteristiky genetické diverzity může distribuce alel, kdy existují velmi hojné alely, které se sice vyskytují v celém areálu, ale výrazněji zastoupené jsou jen v některých populacích. Naproti tomu existují velmi vzácné alely, které se s mizivou frekvencí vyskytují jen v několika populacích. Je to stav, se kterým se použité algoritmy vyrovnávají jen s obtížemi.

Relativně dobře interpretovatelné jsou genetické shluky vytvořené pomocí Structure (obr. 4.15 na str. 75 a obr. 4.16 na str. 76) a PCoA (obr. 4.4 na str. 62). Structure jasně vyděluje Polabí, ke kterému se z větší části přidružuje Berounka. Trochu překvapivě se k němu nepřipojuje o něco vzdálenější, ale hydrologicky spojená Ohře. Druhý shluk (Morava, Jižní Čechy a Ohře) může být z části metodologický artefakt: některé oblasti se k němu připojily čistě proto, že nebyly podobné Polabí, ani dost odlišné na to, aby vytvořily vlastní shluk. Nicméně stále to vypovídá o určité podobnosti (propojenosti) daných oblastí. Zato přiřazení zahraničních populací do těchto shluků nejspíše nebude — vzhledem k velké prostorové vzdálenosti a množství neovzorkovaných populací mezi nimi — příliš relevantní. Ale je zajímavé, že populace východně od ČR (Slovensko a Litva) se shlukují s Moravou, zatímco Německo s Čechami. Toto uspořádání narušuje Brusel shlukující se s Moravou (anebo s Ohří?). PCoA spíše než jednotnost Polabí zdůrazňuje určitou izolaci Poodří a Moravy, ale principiálně říká totéž.

Velmi podobně se dá uvažovat o variantě výpočtu Structure pro 3 genetické shluky (obr. 4.17 na str. 77). Na výlučnosti Polabí se nic nemění. Stále tvoří dobře definovaný shluk. Vyděluje se nový shluk obsahující Lužnici, Nežárku (tzn. všechny jihočeské populace) a Odrou (zde se dá uvažovat např. o ptačích tazích). Nežárka vykazuje silnou vazbu k Moravě a Jižní Morava malou vazbu na Odru a Jižní Čechy. Velmi silná je vazba Ohře k povodí Moravy, což už je hůře vysvětlitelné. Vzhledem k tomu, že z Ohře je oproti Moravě k dispozici relativně málo vzorků může jít o důsledek nějakého dálkového transportu, možná s lidským přičiněním.

Zdá se, že pro dálkový transport je výrazně důležitější generativní než vegetativní šíření (což souhlasí s výsledky získanými pouze v Polabí Fér and Hroudová, 2008): populace vykazují určitou příbuznost, nicméně nějaká jasná struktura mezi populacemi není. Populace mezi sebou zjevně (hlavně na kratší) vzdálenosti komunikují, nicméně vzdálené populace z různých řek a povodí mají již velmi odlišné alely. Jednotlivá povodí tak jsou vzájemně odlišitelná (např. obr. 4.4 na str. 62 a obr. 4.15 na str. 75), nicméně vykazují určité vztahy. Nejsou tedy izolovaná stoprocentně.

Současné charakteristiky genetické podobnosti populací stulíku mohou být způsobeny

nastupujícím genetickým driftem ve fragmentovaném areálu (Ellstrand and Elam, 1993; Hartl and Clark, 1989; Hamrick and Godt, 1996). Velké množství lokalit, kde by stulík mohl růst (a v minulosti pravděpodobně rostl) bylo zničeno během úprav řek (napřimování, vybetonování koryta, odřezávání a zazemňování slepých ramen, stavba vodních děl apod., např. Kadlec et al., 2009; Sweeney et al., 2007). Tento relativně souvislý areál se vlivem lidské činnosti fragmentoval, čímž se možnosti výměny diaspor zhoršily. Stulík je dlouhověký (Arber, 1920), ale vlivy genetického driftu již pomalu nastupují. Je to vidět na tom, že jednotlivé populace k sobě stále vykazují určité vazby, ale nadpopulační struktura již je nezřetelná a v populacích se šíří nové, zatím vzácné, alely (Hartl and Clark, 1989). Tato zjištění jsou trochu podobná práci Lamote et al. (2002), kde autoři taktéž odhalili vysokou míru izolace jednotlivých povodí a vysoký podíl genetické variability v rámci populací (patrně díky genetickému driftu ve fragmentovaném areálu).

Podobné závěry jsou známy např. z druhů rostoucích v evropských horách (např. Reisch et al., 2003; Schönswetter et al., 2004; Huck et al., 2009), jejichž areál se měnil v důsledku dob ledových (glaciální relikt). Ale takovéto pattern můžeme najít i u lesních druhů (např. Griffin and Barrett, 2004) nebo na ostrovech (např. Molins et al., 2009; Diaz-Perez et al., 2008). Všechny případy mají bez ohledu na své velké odlišnosti jednoho společného jmenovatele: relativně krátkou dobu fragmentovaný areál a případně nedávné velké změny početnosti. Takové druhy (typicky s nízkou konektivitou populací) vykazují v určitých pohledech srovnatelné charakteristiky jako stulík žlutý.

5.3.2 Geografická vzdálenost a genetická podobnost

Heterozygosita (tab. 4.1 na str. 50) vykazuje mezi populacemi a povodími určité, i když slabé tendence. Jižní Morava vykazuje jako oblast vyšší heterozygositu než Morava střední. To může být dáno jednak samotnou polohou níže po proudu, jednak tím, že populace z Kyjovky jsou v průměru větší a jsou potenciálně lépe propojené (populace ze střední Moravy jsou povětšinou z izolovaných tůní dále od řeky). Nicméně jednotlivé populace jako takové vykazují dosti podobné hodnoty heterozygosity. V rámci Lužnice a Nežárky žádná takováto tendence není. V Polabí sice jsou rozdíly v heterozygositě, ale nevykazují žádnou geografickou tendenci a spíše vypovídají o rozdílnostech jednotlivých populací. Tamní populace jsou často poměrně malé, což použitelnost tohoto indikátoru výrazně snižuje.

Stulík žlutý v ČR jasně vykazuje genetickou izolaci geografickou vzdáleností (isolation by distance). Prostorově bližší populace si jsou geneticky podobnější, vzdálené jsou signifikantně odlišné. Na to ukazují výsledky AMOVA i PCoA. Takový výsledek je v obdobných studiích poměrně běžný. Např.: Keller (2000, *Lythrum*, *Phragmites* a *Typha*), Gornall et al. (1998, *Potamogeton coloratus*), Kudoh and Whigham (1997, *Hibiscus moscheutos*), Russell et al. (1999, *Calycophyllum spruceanum*), Lundquist and Andersson (2001, *Viscaria alpina* a *Angelica archangelica*), Pollux et al. (2007, *Sparganium emersum*). Tedy pokud jde o druhy, které se šíří nejčastěji vodou nebo alespoň říčním koridorem. Naopak

např. Prentis and Mather (2008) zkoumali *Helmholtzia glaberrima*, která se šíří nezávisle na vodním toku a genetická struktura tak reflektuje spíše podmínky vhodné k růstu rostliny než geografii říční sítě.

Obdobné výsledky byly získány i mimo říční systémy. Mader et al. (1998) zkoumali genetickou diverzitu 19 populací *Potamogeton pectinatus* z celé Evropy a severní Afriky a v jaderných ani plastidových sekvencích pomocí RFLP nenalezli žádné shodné jedince. Nutno však podotknout, že sběr vzorků byl, vzhledem k rozlehlosti oblasti, poměrně řídký. Genetická variabilita rostla se vzdáleností, situaci nejlépe popisoval stepping stone anebo isolation by distance model. Podle autorů je zjevný vliv ptačích tahů. Je škoda, že práce měla tak řídký sampling.

S těmito výsledky zajímavě kontrastuje práce Nies and Reusch (2005) zkoumající baltské a jezerní populace *Potamogeton pectinatus*. Severní Evropu druh rekolonizoval z většího množství refugií před cca 12 000 lety a roste jak v prakticky brakickém Baltu, tak např. v jezerech. Genetická příbuznost populací nevykazuje žádné geografické pattern. Baltské populace jsou geneticky méně diferencované a je mezi nimi 2,5× větší genový tok. V každé jednotlivé populaci dochází k silné adaptaci k lokálním podmínkám. Asi pozorujeme prvopočátek speciace mezi baltskými a jezerními populacemi, nicméně sekvence rRNA jsou u obou skupin populací identické.

Zajímavé je, že Fér and Hroudová (2008) pozorovali pozitivní autokorelaci mezi jedinci do vzdálenosti 25 km (což odpovídá mým výsledkům z povodí Moravy, kde byla obecně tato vzdálenost výrazně slabší než v Polabí nebo v celé ČR), nicméně v rámci povodí Labe a celé ČR jsem pozitivní autokorelaci zaznamenal až do vzdálenosti přes 110 km (na velkých vzdálenostech už byla velmi slabá). To implikuje šíření generativních diaspor na větší vzdálenosti než se předpokládalo.

Genetická izolovanost geografickou vzdáleností (isolation by distance) je poměrně běžná i mezi jinými rostlinami. Např.: Molins et al. (2009, *Senecio rodriguezii*), Gaudel (2006, *Hypericum nummularium*), Olsen et al. (2004, *Zostera marina*), Reisch et al. (2003, *Saxifraga paniculata*), Sharbel et al. (2000, *Arabidopsis thaliana*), Arnaud-Haond et al. (2007b, *Posidonia oceanica*). Jiné studie tuto závislost nepotvrzují. Např.: Griffin and Barrett (2004, *Trillium erectum*), Wroblewska and Brzosko (2006, *Iris aphylla*). Vzhledem k obrovské variabilitě studovaných druhů i jejich prostředí nelze v tomto ohledu dělat jednoznačný závěr. Obecně se dá říci, že druhy nevykazující genetickou izolaci geografickou vzdáleností bývají extrémně dobře šířitelné nebo v nedávné minulosti prošly událostí typu delšího bottleneckingu a následného prudkého nárůstu populační početnosti (a/nebo areálu). To ale není případ stulíku.

5.3.3 Možné šíření vodními ptáky

Figuerola and Green (2002) konstatovali, že transport rostlinných propagulí vodními ptáky (ornitochorie³) je sice z terénních studií dobře dokumentovaný, chybí však po-

³Semena se mohou jak zachytit zevně na těle ptáka (exozochorie), tak mohou procházet jeho zažívacím

drobnější informace o vlastnostech transportovaných propagulích a o ptácích, kteří je transportují a jak tyto jejich vlastnosti ovlivňují celý proces. Clausen et al. (2002) se k možnosti šíření vodních rostlin v ptačích žaludcích na velké vzdálenosti staví velice skepticky protože (1) Ptáci žerou semena mimo dobu z hlediska rostlin nejvhodnější pro rozmnožování (což nevyklučuje možnost transportu vegetativních diaspor), (2) dálkový transport by logicky připadal v úvahu jen na podzim ze severu na jih (průsečík generační doby rostlin a ptačího tahu), (3) většina ptačího žaludku se vyprázdňuje do asi 300 km letu (stejně tak nevíme nic o tom, jak dlouho mohou diasporu vydržet zachyceny na ptačím těle) a (4) ptáci mnohdy cestují mezi velmi odlišnými habitaty: rostliny se tak mohou snadno dostat z prostředí, pro které jsou přizpůsobené do prostředí o poznání méně vhodného. Na druhou stranu mají obvykle širokou ekologickou amplitudu a jsou přizpůsobivé.

Figuerola (2002) jasně ukazuje, že dálkový transport vodním ptactvem je možný, nepřináší však důkazy o jeho síle a významnosti. Ukazuje mj. řadu krmných pokusů (ptáci byli někdy krmeni i násilím nebo neměli na výběr jinou potravu). Takové pokusy — i když ukazují, že semena si po průchodu ptačím žaludkem uchovávají klíčivost — musíme brát s rezervou. Nevypovídají o potravních preferencích ptáků v přírodě.

Výsledky Structure i PCoA naznačují určitou komunikaci zvláště mezi moravskými a jihočeskými populacemi. Zvláště na Jižní Moravě a v Jižních Čechách jsou významné ptačí oblasti, kde se ptáci často zastavují. Alespoň část pozorovaných vztahů mezi těmito oblastmi lze jistě přičíst na vrub vodním ptákům. Vzhledem k dostupným údajům (studie o šíření ptáky, ptačích migracích i charakter rozdělení genetické diverzity stulíku) je prakticky jisté, že dochází k šíření semen stulíku prostřednictvím vodních ptáků, nicméně jeho intenzita je pravděpodobně nevelká. Jasný vliv ptačích tahů naproti tomu odhalili Mader et al. (1998) studující vysoce klonální *Potamogeton pectinatus* v celé Evropě a severní Africe.

5.4 Zobecnění

Je jen relativně málo fylogeografických prací na vodních rostlinách, které měly srovnatelný rozsah. Patří mezi ně mj. Dorken and Barrett (2004) zabývající se jedno- a dvoudomými populacemi *Sagittaria latifolia* v Severní Americe. Populace *S. latifolia* vykazují mnohem větší strukturu a poměrně jasné pattern rekolonizace východní části Severní Ameriky po poslední době ledové. Mader et al. (1998) na rozdíl od mých výsledků jasně prokázali vliv ptačích tahů na evropské populace *Potamogeton pectinatus* a odhalili vysoký stupeň klonálního rozmnožování. Pozorované pattern nejlépe popisoval isolation by distance nebo stepping-stone model. Zajímavé je srovnání se stromy (např. Maliouchenko et al., 2007; Bennett et al., 1991; Ferris et al., 1998; Grivet and Petit, 2003; Petit et al., 1997; King and Ferris, 1998; Heuertz et al., 2004). Ty — snad díky své dlouhověkosti a nízké míře

traktem (endozoochorie; van der Pijl, 1982).

klonálního rozmnožování — zpravidla ukazují jasné geografické pattern genetické diversity (a nepodobají se zde prezentovaným výsledkům), zpravidla související s postglaciální rekolonizací Evropy (Comes and Kadereit, 1998; Tinner and Lotter, 2006).

Příklady jiných vodních rostlin i horských a ostrovních druhů mnohdy ukázaly podobné charakteristiky genetické variability. Přínos této práce zůstává v tom, že poodhalila situaci u málo probádaných vodních rostlin a pracovala na relativně velkém a diverzifikovaném území. Vzhledem k prezentovaným podobnostem s druhy, které vykazují určité podobné charakteristiky se domnívám, že tyto závěry lze do určité míry zobecnit i na další doposud nestudované druhy (např. *Nymphaea*, *Trapa*, *Stratoides*, širolisté rdesty, pobřežní rostliny, ...).

Kapitola 6

Závěr

Pomocí mikrosatelitové analýzy 528 jedinců ze 70 populací stulíku žlutého z ČR (66 populací a 489 jedinců), Slovenska, Belgie, Německa a Litvy byly zodpovězeny otázky o fylogeografii stulíku žlutého v ČR (str. 18). Mikrosatelitové lokusy byly velmi variabilní a sber dat dostatečně hustý, aby prezentované závěry byly kvalitně podložené. Nízká struktura mezi populacemi je pravděpodobně dána charakteristikami současného šíření stulíku žlutého v české krajině a ne vlastnostmi použitých molekulárních markerů. Podrobnosti jsou v diskuzi začínající na str. 85.

- 1. Klonální struktura populací:** Ukazuje se, že populace sestávají spíše z většího počtu menších klonů a příbuzných jedinců. Nedochází k převaze jednoho nebo několika málo klonálních jedinců. Každý trs se, pokud mu to okolní podmínky dovolují, rozrůstá kolem sebe (jde o růst v řádově jednotkách metrů). K převaze klonů tak pravděpodobně může dojít jen ve specifických podmínkách (malé disturbance, slabý až žádný proud a dostatek volného prostoru — podmínky vhodné pro rozrůstání trsu do stran). V rámci populací pravděpodobně nedochází k významnému šíření vegetativních úlomků.
- 2. Klíčivost semen a potenciální role oddenkových úlomků jako dispersního agens:** První rok semena klíčila velmi slabě (vyklíčilo pouze 1,1 % semen), druhý rok v téměř přirozených podmínkách vyklíčilo 43,6 % semen. Semena si mohou udržovat klíčivost několik málo let a nejlépe klíčí v mělké prohráté vodě v písčitém až bahnitěm substrátu. Plody dobře plavou, samotná semena ne, ale vzhledem k jejich množství mohou sloužit jako efektivní vektor šíření. Přílišná plovatelnost by mohla být i nevýhodná: semena by se mohla snadno dosta daleko mimo vhodné lokality nebo např. při vysokém stavu vody nad úroveň normální hladiny a zahynout na suchu. Oddenkové úlomky jsou velmi pevně vzrostlé do dna, uvolnit je tak dokáže jen velká disturbance (povodně, drhnutí ledových ker o dno za jarního tání a praskání ledu apod.), navíc se úlomek musí zachytit na vhodném místě, což je při vysokém stavu

vody za povodní dosti obtížné. Má-li oddenkový úlomek vzrostlý vrchol a dostatek živin a zachytí-li se na vhodném místě, může snadno dát vznik novému jedinci (takové úlomky velmi dobře přežívají a rostou). Nicméně bylo nalezeno jen málo dokladů vegetativního šíření mezi populacemi, dá se tedy tvrdit, že tento způsob není pro stulík tím nejdůležitějším. Abychom to mohli tvrdit s jistotou, museli bychom ale sesbírat vzorky ze všech trsů rostoucích ve studované řece. Je-li mi známo, studie takového rozsahu nebyla doposud provedena.

3. **Genetická variabilita populací mezi různými oblastmi (říčními úseky, povodími):** Jednotlivá povodí i řeky jsou dobře izolované (to potvrzuje F-statistika i Bayesiánské shlukování), v různých povodích dominují velmi odlišné alely (nicméně žádné nejsou pro nějaké povodí výlučné), ale stále mezi nimi dochází (nebo docházelo v nedávné minulosti) k výměně genetického materiálu (jak naznačuje PCoA a shlukování Structure). Použité metody odráží genetickou variabilitu sesbíranou za celou dobu existence populací, zjištěné charakteristiky tak nemusí přesně odpovídat současnému stavu možností šíření stulíku v české krajině.
4. **Transport diaspor mezi povodími:** Mezi všemi populacemi bylo nalezeno jen celkem 7 klonů (všechny byly nalezeny v hydrologicky propojených lokalitách), lze tedy tvrdit, že vegetativní šíření mezi populacemi je velmi omezené (i když detekovatelné). K šíření semeny dochází až na vzdálenost asi 120 km (i když reaktivně vzácně — s rostoucí vzdáleností jeho míra prudce klesá), je tedy detekovatelné i mezi různými populacemi a povodími. Nicméně významnou roli hraje hlavně na kratších vzdálenostech (řádově jednotky km). Transport diaspor na velké vzdálenosti je omezený.
5. **Vztah geografické vzdálenosti a párové genetické podobnosti mezi jedinci:** Stulík vykazuje jasnou genetickou izolaci geografickou vzdáleností (isolation by distance). Pozitivní autokorelace (signifikantní podobnost) mezi jedinci je detekovatelná až do 25 km v povodí Moravy a do asi 120 km v povodí Labe a v rámci celé ČR. Genetická podobnost jedinců klesá s rostoucí geografickou vzdáleností.

Literatura

- Arafeh, R. and Kadereit, J. W. (2006). Long-distance seed dispersal, clone longevity and lack of phylogeographical structure in the european distributional range of the coastal *Calystegia soldanella* (L.) R. Br.(Convolvulaceae). *Journal of Biogeography*, 33(8):1461–1469.
- Araki, S. and Kunii, H. (2006). Allozymic implications of the propagation of eelgrass *Zostera japonica* within a river system. *Limnology*, 7:15–21.
- Arber, A. (1920). *Water plants: a study of aquatic angiosperms*. Cambridge University Press.
- Arnaud-Haond, S. and Belkhir, K. (2007). *Program GenClone*. Laboratory of “Ecology and Evolution of Marine Organisms”, CCMAR, F.C.M.A. — Universidade do Algarve, Faro, Portugalsko, Laboratory of “Ecology and Evolution of Marine Organisms” CCMAR — Center for Marine Sciences, F.C.M.A. — Univ. Algarve, Gambelas, P-8005-139, Faro, Portugalsko.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C. M., Alberto, F., and Serrão, E. A. (2007a). Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*.
- Arnaud-Haond, S., Migliaccio, M., Diaz-Almela, E., Teixeira, S., van de Vliet, M. S., Alberto, F., Procaccini, G., Duarte, C. M., and Serrão, E. A. (2007b). Vicariance patterns in the Mediterranean Sea: east–west cleavage and low dispersal in the endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Journal of Biogeography*, 34:963–976.
- Avise, J. C. (2000). *Molecular markers, natural history and evolution*. Sinauer Associates, 2 edition.
- Baker, A. J. (2000). *Molecular methods in ecology*. Blackwell Publishing.
- Balloux, F. and Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11(2):155–165.
- Barrat-Segretain, M.-H. (1996). Germination and colonisation dynamics of *Nuphar lutea* (L.) Sm. in a former river channel. *Aquatic Botany*, 55:31–38.

- Bennett, K. D., Tzedakis, P., and Willis, K. (1991). Quaternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography*, 18:103–115.
- Boedeltje, G., Bakker, J. P., Bekker, R. M., van Groenendael, J. M., and Soesbergen, M. (2003). Plant dispersal in a lowland stream in relation to occurrence and three specific life-history traits of the species in the species pool. *Journal of Ecology*, 91:855–866.
- Brown, J. H. and Lomolino, M. V. (1998). *Biogeography, 2nd Edition*, chapter History of Biogeography, pages 13–35. Sinauer Associates. Historie biogeografie.
- Burkart, M. (2001). River Corridors Plants (Stromtpflanzen) in Central European lowland: a review of a poorly understood plant distribution pattern. *Global Ecology and Biogeography*, 10:449–468.
- Chytrý, M. and Rafajová, M. (2003). Czech National Phytosociological Database: basic statistics of the available vegetation-plot data. *Preslia*, 75:1–15.
- Clausen, P., Nolet, B. A., Fox, A. D., and Klaassen, M. (2002). Long-distance endozoochorous dispersal of submerged macrophyte seeds by migratory waterbirds in northern Europe — a critical review of possibilities and limitations. *Acta Oecologica*, 23:191–203.
- Comes, H. P. and Kadereit, J. W. (1998). The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in plant science*, 3(11):432–438.
- Corander, J. and Marttinen, P. (2007). BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure. Manual v. 3.1. Technical report, Department of Mathematics, University of Helsinki, Helsinki.
- Crow, G. E. (1993). Species diversity in aquatic angiosperms: latitudinal patterns. *Aquatic Botany*, 44(2–3):229–258.
- Danvind, M. and Nilsson, C. (1997). Seed floating ability and distribution of alpine plants along a northern Swedish river. *Journal of Vegetation Science*, 8:271–276.
- Darwin, C. (2007). *O vzniku druhů přírodním výběrem*. Academia, Nakladatelství Academia, Vodičkova 40, 110 00, Praha 1, Europa edition.
- Diaz-Perez, A., Sequeira, M., Santos-Guerra, A., and Catalan, P. (2008). Multiple Colonizations, In Situ Speciation, and Volcanism-Associated Stepping-Stone Dispersals Shaped the Phylogeography of the Macaronesian Red Fescues (*Festuca* l., gramineae). *Systematic Biology*, 57(5):732–749.
- Dieringer, D. and Schlötterer, C. (2003). Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Technical report.

- Dorken, M. E. and Barrett, S. C. H. (2004). Chloroplast haplotype variation among monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae) in eastern North America. *Molecular Ecology*, 13:2699–2707.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*.
- Egertson, C. J., Kopaska, J. A., and Downing, J. A. (2004). A century of change in macrophyte abundance and composition in response to agricultural eutrophication. *Hydrobiologia*, 524(1):145–156.
- Ehrich, D., Gaudeul, M., Assefa, A., Koch, M., Mummenhoff, K., and Nemomissa, S. (2007). Genetic consequences of Pleistocene range shifts: Contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology*, 16:2542–2559.
- Ellstrand, N. C. and Elam, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1):217–242.
- Evano, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.*, 14:2611–2620.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. (2006). ARLEQUIN Version 3.01 An integrated software package for population genetics. Technical report, Univerzita Bern.
- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479–491.
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164:1567–1587.
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*.
- Ferris, C., King, R. A., Vainola, R., and Hewitt, G. M. (1998). Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland. *Heredity*, 5:584–593.
- Figuerola, J. (2002). *The role of waterfowl in the passive transport of aquatic organisms: from local processes to long-distance dispersal*. PhD thesis, Universidad autónoma de Madrid, Facultad de ciencias, Departamento de ecología.

- Figuerola, J. and Green, A. J. (2002). Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology*, 47:483–494.
- Figuerola, J., Santamaría, L., Green, A. J., Luque, I., Alvarez, R., and Charalambidou, I. (2005). Endozoochorous dispersal of aquatic plants: Does seed gut passage affect plant performance? *American Journal of Botany*, 92(4):696–699.
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., van Kleunen, M., and Schmid, B. (2000). RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 87(8):1128–1137.
- Fér, T. (2000). Vztah parametrů generativního šíření vodních rostlin k jejich skutečnému rozšíření podle vodního toku. Master's thesis, Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Benátská 2, 128 01, Praha 2.
- Fér, T. (2008). *Study of plant dispersal in river corridors using molecular markers*. Ph.d. thesis, Charles University Prague, Faculty of Science, Department of Botany, Benátská 2, Praha 2, 128 01.
- Fér, T. and Hroudová, Z. (2008). Detecting dispersal of *Nuphar lutea* in river corridors using microsatellite markers. *Freshwater biology*, 53(7):1409–1422.
- Galeuchet, D. . J. ., Perret, C. ., and Fischer, M. . (2005). Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flos-cuculi* L., in a fragmented landscape. *Molecular Ecology*, 14:991–1000.
- Gaudeul, M. (2006). Disjunct distribution of *Hypericum nummularium* L. (Hypericaceae): molecular data suggest bidirectional colonization from a single refugium rather than survival in distinct refugia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 87(3):437–447.
- Giesecke, T., Hickler, T., Kunkel, T., Sykes, M. T., and Bradshaw, R. H. W. (2007). Towards an understanding of the holocene distribution of *Fagus sylvatica* L. *Journal of Biogeography*, 34:118–131.
- Gornall, R. J., Hollingsworth, P. M., and Preston, C. D. (1998). Evidence for spatial structure and directional gene flow in population of an aquatic plant, *Potamogeton coloratus*. *Heredity*, 80:414–421.
- Green, A. J., Figuerola, J., and Sánchez, M. I. (2002). Implications of waterbird ecology for the dispersal of aquatic organisms. *Acta Oecologica*, 23:177–189.
- Griffin, S. R. and Barrett, S. C. H. (2004). Genetic variation in *Trillium erectum* (Melanthiaceae), a widespread forest herb in eastern North America. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, 82(3):316–321.

- Grivet, D. and Petit, R. (2003). Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. *Conservation Genetics*, 4:47–56.
- Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W. (1996). Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 351(1345):1291–1298.
- Hardy, O. J. and Vekemans, X. (1999). Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, 83(145–154).
- Hardy, O. J. and Vekemans, X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Technical report, Université Liberté Bruxelles.
- Hart, K. H. and Cox, P. A. (1995). Dispersal ecology of *Nuphar luteum* (L.) Sibthorp & Smith: abiotic seed dispersal mechanism. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 119:87–100.
- Hartl, D. L. and Clark, A. G. (1989). *Principles of Population Genetics*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 2nd edition.
- Hennig, W. (1999). *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press.
- Heslop-Harrison, Y. (1955). Biological flora of the British Isles, *Nuphar lutea* (L.) Sm. (*Nuphar lutea* L.). *J. Ecol.*, 43:344–355.
- Heuertz, M., Fineschi, S., Anzidei, M., Pastorelli, R., Salvini, D., Paule, L., Frascaria-Lacoste, N., Hardy, O. J., Vekemans, X., and Vendramin, G. G. (2004). Chloroplast DNA variation and postglacial recolonisation of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology*, 13:3437–3452.
- Huck, S., Budel, B., Kadereit, J. W., and Printzen, C. (2009). Range-wide phylogeography of the European temperate-montane herbaceous plant *Meum athamanticum* Jacq.: evidence for periglacial persistence. *Journal of Biogeography*, 36(8):1588–1599.
- Imaizumi, T., Kurokawa, S., Ito, M., Auld, B., and Wang, G. X. (2006). Population structure of *Solanum carolinense* along the Takano river in Kyoto, Japan as determined by amplified fragment length polymorphism. *Weed Research*, 46:219–225.
- Jacobs, M. J. and Macisaac, H. J. (2009). Modelling spread of the invasive macrophyte *Cabomba*. *Freshwater Biology*, 54:296–305.

- Jakobsson, M. and Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23:1801–1806.
- Jarne, P. and Lagoda, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 11:424–429.
- Johansson, M. E. and Nilsson, C. (1993). Hydrochory, population dynamics and distribution of the clonal aquatic plant *Ranunculus lingua*. *Journal of Ecology*, 81:81–91.
- Johansson, M. E., Nilsson, C., and Nilsson, E. (1996). Do rivers function as corridors for plant dispersal? *Journal of Vegetation Science*.
- Kadlec, J., Grygar, T., Světlík, I., Ettler, V., Mihaljevič, M., Diehl, J. F., Beske-Diehl, S., and Svitavská-Svobodová, H. (2009). Morava River floodplain development during the last millennium, Strážnické Pomoraví, Czech Republic. *Holocene*, 19(3):499.
- Kalinowski, S. T. (2002). Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. *Molecular Ecology*, 11:1263–1273.
- Keller, B. E. M. (2000). Plant diversity in *Lythrum*, *Phragmites*, and *Typha* marshes, Massachusetts, U.S.A. *Wetland Ecology and Management*, 8(6).
- Kimura, M. and Weiss, G. H. (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49(4):561–576.
- King, R. A. and Ferris, C. (1998). Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology*, 7:1151–1161.
- Klekowski, E. J. (2003). Plant clonality, mutation, diplontic selection and mutational meltdown. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79:61–67.
- Komárek, S. (1997). *Dějiny biologického myšlení*. Vesmír, Praha, Medúza edition.
- Kudoh, H. and Whigham, D. (1997). Microgeographic genetic structure and gene flow in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae) populations. *American Journal of Botany*, 84(9):1285–1285.
- Lamote, V., Roldán-Ruiz, I., Coart, E., De Loose, M., and van Bockstaele, E. (2002). A study of genetic variation in *Iris pseudacorus* populations using amplified length polymorphism (AFLPs). *Aquatic Botany*, 73:19–31.
- Les, D. H., Crawford, D. J., Kimball, R. T., Moody, M. L., and Landolt, E. (2003). Biogeography of Discontinuously Distributed Hydrophytes: A Molecular Appraisal of Intercontinental Disjunction. *International Journal of Plant Sciences*, 164(6):917–932.

- Li, W., Xia, L. Q., Li, J. Q., and Wang, G. X. (2004). Genetic diversity of *Potamogeton maackianus* in the Yangtze River. *Aquatic Botany*, 80:227–240.
- Liu, Y. F., Wang, Y., and Huang, H. W. (2006). High interpopulation genetic differentiation and unidirectional linear migration patterns in *Myricaria laxiflora* (Tamaricaceae), an endemic riparian plant in the Three Gorges Valley of the Yangtze River. *American Journal of Botany*.
- Loxdale, H. D. and Lushai, G. (2003). Rapid changes in clonal lines: the death of a 'sacred cow'. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79:3–16. O klonalitě a klonálních liniích.
- Ložek, V. (1973). *Příroda ve čtvrtohorách*. Academia, Nakladatelství Academia, Vodičkova 40, 110 00, Praha 1.
- Lundquist, E. and Andersson, E. (2001). Genetic diversity in populations of plants with different breeding and dispersal strategies in a free-flowing boreal river system. *Hereditas*, 93:206–215.
- Mader, E., van Vierssen, W., and Schwenk, K. (1998). Clonal diversity in the submerged macrophyte *Potamogeton pectinatus* L. inferred from nuclear and cytoplasmic variation. *Aquatic Botany*, 62:147–160.
- Maliouchenko, O., Palmé, A. E., Buonamici, A., Vendramin, G. G., and Lascoux, M. (2007). Comparative phylogeography and population structure of European *Betula* species, with particular focus on *B. pendula* and *B. pubescens*. *Journal of Biogeography*, 34:1601–1610.
- Markwith, S. H. and Scanlon, M. J. (2007). Multiscale analysis of *Hymenocallis coronaria* (Amaryllidaceae) genetic diversity, genetic structure and gene movement under the influence of unidirectional stream flow. *American Journal of Botany*, 94:151–160.
- McCauley, D. E. (1995). The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 10(5):198–202.
- Molins, A., Mayol, M., and Rossello, J. A. (2009). Phylogeographical structure in the coastal species *Senecio rodriguezii* (Asteraceae), a narrowly distributed endemic Mediterranean plant. *Journal of Biogeography*, 36(7):1372–1383.
- Mueller, M. H. and van der Valk, A. G. (2002). The potential role of ducks in wetland dispersal. *Wetlands*, 22(1):170–178.
- Nei, M., Tajima, F., and Tateno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19:153–170.

- Nies, G. and Reusch, T. B. H. (2005). Evolutionary divergence and possible incipient speciation in post-glacial populations of a cosmopolitan aquatic plant. *J. Biol. Evol.*, 18:19–26.
- Nilsson, C., Gardfjell, M., and Grelsson, G. (1991). Importance of hydrochory in structuring plant communities along rivers. *Canadian Journal of Botany*.
- Nordborg, M., Hu, T. T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C., et al. (2005). The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol*, 3(7):196.
- Olsen, J. L., Stam, W. T., Coyer, J. A., Reusch, T. B. H., Billingham, M., Bostrom, C., Calvert, E., Christie, H., Granger, S., La Lumiere, R., Milchakova, N., Oudot-Le Secq, M. P., Procaccini, G., Sanjabi, B., Serrao, E., Veldsink, J., Widdicombe, S., and Wyllie-Echeverria, S. (2004). North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. *Molecular Ecology*, 13(7):1923–1941.
- Ouborg, N. J., Goodall-Copestake, W. P., Saumitou-Laprade, P., Bonnin, I., and Epplen, J. T. (2000). Novel polymorphic microsatellite loci isolated from the yellow waterlily, *Nuphar lutea*. *Molecular Ecology*, 9:489–504.
- Ouborg, N. J., Piquot, Y., and Van Groenendael (1999). Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*, 87:551–568.
- Pairon, M., Jonard, M., and Jacquemart, A. L. (2006). Modeling seed dispersal of black cherry, an invasive forest tree: how microsatellites may help? *Canadian Journal of Forest Research*, 36(6):1385–1394.
- Petit, R. J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducouso, A., and Kremer, A. (1997). Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:9996–10001.
- Pilon, J. and Santamaría, L. (2002). Clonal variation in the thermal response of the submerged aquatic macrophyte *Potamogeton pectinatus*. *Journal of Ecology*, 90(1):141–152.
- Podani, J. (2001). SYNTAX 2000, Computer programs for data analysis in ecology and systematics. User's manual. Technical report, Scientia., Budapest.
- Pollux, B. J. A., De Jong, M., Steegh, A., Verbruggen, E., Van Groenendael, J. M., and Ouborg, N. J. (2007). Reproductive strategy, clonal structure and genetic diversity in populations of the aquatic macrophyte *Sparganium emersum* in river systems. *Molecular Ecology*, 16:313–325.
- Prentis, P. J. and Mather, P. B. (2008). Fine-scale patterns of genetic variation indicate non-equilibrium gene frequency divergence in the stream lily, *Helmholtzia glaberrima*. *Freshwater Biology*, 53(5):973–980.

- Provan, J., Powell, W., and Hollingsworth, P. M. (2001). Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 16(3).
- Puijalon, S and Bouma, T., Van Groenendael, J., and Bornette, G. (2008). Clonal Plasticity of Aquatic Plant Species Submitted to Mechanical Stress: Escape versus Resistance Strategy. *Annals of Botany*, 102(6):989–996.
- R Development Core Team (2008). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Reisch, C., Poschlod, P., and Wingender, R. (2003). Genetic variation of *Saxifraga paniculata* Mill. (Saxifragaceae): molecular evidence for glacial relict endemism in central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80(1):11–21.
- Ren, M. X. and Zhang, Q. G. (2007). Clonal diversity and structure of the invasive aquatic plant *Eichhornia crassipes* in China. *Aquatic Botany*, 87:242–246.
- Ren, M. X., Zhang, Q. G., and Zhang, D. Y. (2005). Random amplified polymorphic DNA markers reveal low genetic variation and a single dominant genotype in *Eichhornia crassipes* populations throughout China. *Weed Research*, 45(3):236–244.
- Riis, T. and Sand-Jensen, K. (2001). Historical changes in species composition and richness accompanying perturbation and eutrophication of Danish lowland streams over 100 years. *Freshwater Biology*, 46:269–280.
- Rosenberg, N. A. (2004). Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4:137–138.
- Russell, J. R., Weber, J. C., Booth, A., Powell, W., Sotelo-Montes, C., and Dawson, I. K. (1999). Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology*, 8(2):199.
- Rydlo, J. (1986). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 1:49–77.
- Rydlo, J. (1987). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 2:67–122.
- Rydlo, J. (1992a). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 6:11–38.
- Rydlo, J. (1992b). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 6:67–108.
- Rydlo, J. (1992c). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 6:39–66.
- Rydlo, J. (1994a). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 8:67–77.
- Rydlo, J. (1994b). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 8:79–96.

- Rydlo, J. (1995). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 9:115–128.
- Rydlo, J. (1998a). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 12:109–122.
- Rydlo, J. (1998b). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 12:123–128.
- Rydlo, J. (1999a). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 13:113–117.
- Rydlo, J. (1999b). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 13:141–146.
- Rydlo, J. (2000a). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 14:83–85.
- Rydlo, J. (2000b). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 14:105–113.
- Rydlo, J. (2000c). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 14:116–136.
- Rydlo, J. (2000d). *Muzeum a současnost, Roztoky, ser. natur.*, 14:136–167.
- Santamaría, L. (2002). Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. *Acta Oecologica*, 23:137–154.
- Schönswetter, P., Tribsch, A., and Niklfeld, H. (2004). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) suggests old and recent immigration into the Alps by the arctic-alpine annual *Comastoma tenellum* (Gentianaceae). *Journal of Biogeography*, 31:1673–1681.
- Shalchian-Tabrizi, K., Åsmund Skjæveland, Enger, P., Mevik, B.-H., Orr, R., Kumar, S., et al. (2004). The Bioportal at University of Oslo.
- Sharbel, T. F., Haubold, B., and Mitchell-Olds, T. (2000). Genetic isolation by distance in *Arabidopsis thaliana*: biogeography and postglacial colonization of Europe. *Molecular Ecology*, 9(12):2109–2118.
- Sherratt, D. J. (1995). Mobile Genetic Elements. *Frontiers in molecular biology*.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139(1):457–462.
- Slavík, B. (1990). *Fytokartografické syntézy ČR / Phytocartographical syntheses of the ČR*. Botanický ústav ČSAV, Průhonice.
- Smits, A. J. M., van Ruremonde, R., and van der Velde, G. (1989). Seed dispersal of three nymphaeid macrophytes. *Aquatic Botany*, pages 167–180.
- Sweeney, S., Jurek, M., and Bednář, M. (2007). Using place names to interpret former floodplain connectivity in the Morava River, Czech Republic. *Landscape Ecology*, 22(7):1007–1018.

- Thiébaud, G. (2007). Invasion success of non-indigenous aquatic and semi-aquatic plants in their and introduced ranges. A comparison between their invasiveness in North America and in France. *Biological Invasions*, 9:1–12.
- Thomé, O. W. (1885). *Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz*. Gera, Německo.
- Tinner, W. and Lotter, A. F. (2006). Holocene expansions of *Fagus sylvatica* and *Abies alba* in Central Europe: where are we after eight decades of debate? *Quaternary Science Reviews*, 25:526–549.
- van der Pijl, L. (1982). *Principles of Dispersal in Higher Plants*. Springer-Verlag, Third Revised and Expanded Edition edition.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21):4407–4414.
- Wanntorp, L. and Wanntorp, H.-E. (2003). The biogeography of *Gunnera* L.: vicariance and dispersal. *Journal of Biogeography*, 30:979–987.
- Weir, B. and Cockerham, C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358–1370.
- Wroblewska, A. and Brzosko, E. (2006). The genetic structure of the steppe plant *Iris aphylla* L. at the northern limit of its geographical range. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(2):245–255.
- Zeisek, V. (2007). Fylogeografie a možnosti šíření vodních klonálních rostlin. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. <http://www.natur.cuni.cz/~zeisek/cs/bakalarska-prace>.
- Zhang, Z.-Y., Zheng, X.-M., and Ge, S. (2007). Population genetic structure of *Vitex negundo* (Verbenaceae) in Three-Gorge Area of the Yangtze River: The riverine barrier to seed dispersal in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(8):506–516.

Dodatek A

Přehled lokalit

Níže je uveden stručný popis jednotlivých oblastí výskytu stulíku žlutého v ČR, které byly během diplomové práce prozkoumány. Přehled lokalit je v tab. 3.2 na str. 36 a 3.1 na str. 38. Rozdělení populací do geografických skupin je na str. 32. Mapa českých populací je na obr. 3.3 na str. 34, zahraničních na obr. 3.4 na str. 35. Fotografie z lokalit jsou na webové adrese <http://botany.natur.cuni.cz/zeisek/galerie/lokality/>.

A.1 Povodí Odry

V CHKO Poodří v Odře mezi Jistebníkem a Ostravou–Svinovem byl stulík zaznamenán pouze v jižní části Křivého rybníka, na obnaženém dně rybníků Prošňáku a Kukly a ve Svinských (Svinovských) tůních (Bečkárna). V samotné řece zaznamenán nebyl. Dále byly Mgr. Martinou Pichrtovou (Katedra botaniky PřF UK) sebrány vzorky z populace z Gelnarova jezera.

A.2 Povodí Moravy

A.2.1 Morava

V Litovelském Pomoraví v Moravě v Kurfürstově rameni a okolí nebyl stulík zaznamenán (je tam udáván¹). Mezi Otrokovicemi a Veselím nad Moravou nebyl v řece zaznamenán (řeka je prakticky mrtvá, regulovaná, bez makrofyt). Je zjevně pěstován v tůni na pravém břehu mezi Otrokovicemi a Napajedly (chatová osada), menší trsy jsou v bývalém slepém rameni Pěnné (levý břeh, jižní okraj Napajedel), několik trsů je zjevně vysazeno do severozápadního okraje ramene, do kterého teče Pohořelický potok. V bývalém slepém rameni na jižním okraji Spytihněvu je na soukromém pozemku pěstován. Obrovská populace je v PR Kanada severně od Jarošova (levý břeh), hlavně v jejím jižním rameni. Několik trsů je v PR Tuň u Kostelan. Poslední větší populace jsou slepá ramena jižně od Uherského

¹Podle Mgr. Tomáše Vítka, který dlouho působil jako dobrovolný strážce v CHKO Litovelské Pomoraví.

Ostrohu (levý břeh, chaty), větší populace je na jihozápadním okraji města na pravém břehu (nejseverovýchodnější a prostřední ze tří tůní, v poslední není nic). Dva trsy byly v tůni severně od Veselí nad Moravou na pravém břehu. V ostatním lokalitách (zvláště kolem Uherského Ostrohu) nebyl stulík nalezen. Nelze tak potvrdit údaje z Rydlo (1992c, 2000a); Chytrý and Rafajová (2003). Pravděpodobně je to dáno tím, že záznamy jsou již staršího data a od té doby došlo v krajině k řadě změn.

A.2.2 Dyje

V oboře soutok v Dyji stulík žlutý pravděpodobně není (možná je v nejjižnějším cípu u vlastního soutoku s Moravou, je v Kyjovce — viz dále). Kolem Břeclavi je řeka silně regulovaná, stulík byl nalezen jen v jezírku Bruksa (bývalé rameno dnes oddělené protipovodňovou hrází) nad městem směrem k Lednici. Dál proti proudu k Bulharům nenalezen. Nenalezen ani v lednickém parku ve Staré Dyji (silně zarostlá okřehky), je tam jen pár vysazených trsů. Okolo Lednice jsou údajné významné lokality vodní květeny (Pastvisko u Lednice, Květné jezero, Kutna a Mahenovo jezero), které ale byly v létě 2007 buď vyschlé nebo bez vodních makrofyt.

A.2.3 Kyjovka

V oboře Soutok jsou velké populace stulíku jak v samotné řece, tak (výrazně častěji) v jejích přítocích a v okolních tůních. Směrem proti proudu k Lanžhotu rychle ubývá. Nebyla projitá nejjižnější část u vlastního soutoku s Dyjí.

A.3 Povodí Labe

Pro podrobnější informace o výskytu stulíku v povodí Labe severně a východně od Prahy viz Fér and Hroudová (2008) a tam citovanou literaturu.

A.3.1 Lužnice

Údaje o výskytu stulíku žlutého na horní Lužnici se různí, ale obecně se tam předpokládá². V úseku asi 2 km pod Novou Vsí nad Lužnicí byl nalezen jen v několika tůních okolo řeky, ve vlastní řece ne. Okolo Dvorů nad Lužnicí nenalezen. V Nové řece není, je v Novořeckých močálech (ze severní a východní strany, od Nové řeky je nepřístupný), několik skupin je kolem Rozvodí. V samotné Staré řece nebyl nalezen, pouze v tůni u samoty U Dušáků. Někdy je udáván ze stok v okolí Třeboně. V blízkosti města ale nebyl zaznamenán. Byl nalezen pouze v rybníku Vyšehrad (velká populace).

²Ústní sdělení Mgr. Ladislava Rektorise z CHKO Třeboňsko, prof. Karla Pracha z PřF JČU, Dr. Lubomíra Adamce z BÚ AV ČR Třeboň a dalších.

A.3.2 Nežárka

Mezi Jindřichovým Hradcem a Lásenicí zaznamenán pouze v místech klidnějšího proudu kolem mostů a jezů, v řece mezi vesnicemi ne. Z Nežárky pod Lásenicí není doložen.

A.3.3 Berounka

Řeka byla prozkoumána od Roztok u Křivoklátu po Zvíkovec. Menší populace je při levém břehu nad jezem ve Zvíkovci (zarostlé okřehky) a cca 300 m pod mostem ve Zvíkovci (levý břeh při ústí potoka), dále u levého břehu pod Zvíkovcem u školky dubů, ve slepém rameni (spojené s řekou) u levého břehu pod pilou pod Zvíkovcem severozápadně od Hradiště, v levém rameni mezi Hradištěm a Čilou kolem říčního ostrova (i u nepřístupného pravého břehu dále po proudu) a u pravého břehu pod Čilou pod ohradou (malá populace). Všechny populace nalezené v Berounce byly poměrně malé.

A.3.4 Ohře

Největší výskyt je udáván mezi Citicemi nad Sokolovem a Vokovem (Rydlo, 1992a), tam ale bylo nalezeno jen několik osamocených trsů. Stulík nebyl nalezen ani mezi Chlumkem a Hlavnem a mezi Kynšperkem nad Ohří a Dobroší. Kromě samotného Kynšperka nad Ohří se vyskytuje prakticky výhradně v tůních kolem řeky. Ty postupně zarůstají, zezemňují se a podmínky pro růst stulíku se zhoršují. Pod Sokolovem již stulík prakticky není doložen, občas je udáván z horní Ohře u německých hranic.

A.4 Brusel, Belgie

Vzorky byly sbírány podél říčky Woluwe. Jde o mělkou malou říčku procházející jihovýchodním okrajem města (to se tam rozrostlo relativně nedávno, podobně jako pražská okrajová sídliště zabírají bývalé vesnice). Celý tok a okolí jsou víceméně udržované, rostliny v jezírkách, kterými řeka protéká, jsou povětšinou pěstované (ne vždy, s různou intenzitou), podle Prof. Ludwiga Triesta (ústní sdělení) je stulík i na starých předválečných fotografiích (což by mohlo indikovat jeho přirozený původ, z belgických řek zmizel až kvůli rostoucímu znečištění, před tím byl hojný, dnes povětšinou jen v jezírkách a rybnících okolo řek, ne ve vlastních řekách).

Dodatek B

Použitý software

Níže je uveden seznam a odkazy na domovské stránky (případně i citace článku) softwarového vybavení použitého při tvorbě diplomové práce.

- Arlequin (Excoffier et al., 2006), <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>
- BAPS 3.2 (Corander and Marttinen, 2007),
<http://web.abo.fi/fak/mnf/mate/jc/software/baps.html>
- Bib \TeX (bibliografický doplněk pro $\LaTeX 2_{\epsilon}$), <http://www.bibtex.org/>
- CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007),
<http://rosenberglab.bioinformatics.med.umich.edu/clumpp.html>
- Distruct (Rosenberg, 2004),
<http://rosenberglab.bioinformatics.med.umich.edu/distruct.html>
- Esri ArcGIS, <http://www.esri.com/>
- GenClone (Arnaud-Haond and Belkhir, 2007),
<http://www.ccmr.ualg.pt/maree/software.php?soft=genclon>
- GeneMarker Demo, <http://www.softgenetics.com/GeneMarker.html>
- GNU Image Manipulation Project (GIMP), <http://www.gimp.org/>
- Inkscape, <http://www.inkscape.org/>
- K Desktop Environment (KDE), <http://www.kde.org/>
- KBib \TeX (Bib \TeX editor pro KDE),
<http://www.unix-ag.uni-kl.de/~fischer/kbibtex/>
- Kile ($\LaTeX 2_{\epsilon}$ IDE pro KDE), <http://kile.sourceforge.net/>

- Typografický systém \LaTeX 2 ϵ , <http://www.latex-project.org/>,
<http://www.tug.org/texlive/>
- MicroSatellite Analyser (MSA, Dieringer and Schlötterer, 2003),
http://i122server.vu-wien.ac.at/MSA/MSA_download.html
- OpenOffice.org, <http://www.openoffice.cz/>, <http://www.openoffice.org/>
- openSUSE GNU/Linux, <http://www.opensuse.org/>, <http://www.gnu.org/>,
<http://www.linux.org/>
- Statistický balík R (R Development Core Team, 2008), <http://www.r-project.org/>
- Rkward (R GUI pro KDE), <http://rkward.sourceforge.net/>
- SPAGeDi (Hardy and Vekemans, 2002),
<http://www.ulb.ac.be/sciences/ecoevol/spagedi.html>
- Structure (Falush et al., 2007), <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>
- Structure sum (Ehrich et al., 2007),
<http://www.nhm.uio.no/forskning-samlinger/forskning/forskningsgrupper/ncb/>
- SYNTAX 2000 (Podani, 2001), <http://ramet.elte.hu/~podani/>

Dodatek C

Protokoly

Protokoly používané při izolaci DNA, přípravě a průběhu PCR a při přečišťování DNA před odesláním na fragmentační analýzu na automatickém sekvenátoru.

C.1 Izolace DNA (CTAB)

Jde o mírně upravenou variantu postupu Doyle and Doyle (1987), princip se nemění. Metoda poskytuje i bez zvláštního přečištění při dostatečné čistotě výsledné DNA a nízké ceně velmi kvalitní a stabilní výtěžky.

1. Cca 0,5 g suchého materiálu (ze silikagelu, ...) dát do kulatých eppendorfek a přidat 5–10 skleněných nebo 2 kovové kuličky.
2. Drcení, 30 ot./sek., 10 minut (nejde-li, přidat kuličky a drtit dalších 10 min.).
3. Přidat 700 μ l CTAB (s merkaptanolem) + 5 μ l RNázy a protřepat.
4. Inkubace na termobloku 60°C, 14 000 rpm, 30 min.
5. Po 2 min. inkubace na lžičce přidat PVP.
6. Centrifugace 14 000 rpm, 3 min.
7. Přidat 500 μ l směsi chloroform : isoamylalkohol 24 : 1.
8. Promíchat otočením na misce a nechat 5 min. stát
9. Centrifugace 14 000 rpm, 6 min.
10. Přepipetovat 500 μ l supernatantu do nových eppendorfek (v digestoři, staré špičky a eppendorfky vyhodit do zvláštní nádoby).
11. 500 μ l vychlazeného isopropanolu.

12. 1–2× převrátit.
13. Nechat 30 min. při laboratorní teplotě.
14. Centrifugace 14 000 rpm, 3 min.
15. V digestoři slít supernatant a otevřené eppendorfky převrátit dnem nahoru na filtrační papír.
16. Přidat 400 μl vychlazeného 96% ethanolu.
17. Inkubace na termobloku 37°C, 1 200 rpm, 3 min. (možno vynechat).
18. Centrifugace 14 000 rpm, 3 min.
19. Slít supernatant.
20. Přidat 200 μl vychlazeného 70% ethanolu
21. Nechat stát 5 min.
22. Centrifugace 14 000 rpm, 3 min.
23. Slít supernatant, nechat stát 10 min.
24. Vysušit otevřené na termobloku při 90°C, 1–2 min.
25. Dle potřeby přidat 200 μl TE pufru.
26. Dle potřeby inkubace na termobloku 37°C, 600 rpm, 30 min.
27. Dle potřeby krátce centrifugovat.
28. Měření koncentrace až druhý den.

C.2 PCR

Příprava reakční směsi pro PCR pro každý z 10 párů fluorescentně značených primerů zvlášť ukazuje tab. C.1. Primery měly koncentraci 25 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Většinou byla používána poloviční reakce (v polovičním objemu), protože při mnohem nižší ceně poskytuje plně srovnatelné výstupy jako reakce ve standardním objemu. Reakční směs s využitím Eppendorf RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix ukazuje tab. C.2. Od předchozí reakce se principiálně neliší, jen reakční směs je již připravena výrobcem. Průběh PCR v termocyklu ukazuje tab. C.3.

Tabulka C.1: Reakční směs pro PCR se připravuje pro každý z 10 primerů zvlášť. V prvním sloupci jsou jednotlivé složky reakční směsi, ve druhém jejich objem pro reakci ve 20 μl (plná reakce) a ve třetím sloupci jsou objemy pro poloviční reakci v 10 μl . Všechny objemy jsou v μl . Poslední řádek je součtem předchozích řádků.

Reakce	Plná (20 μl)	Poloviční (10 μl)
Sterilní voda	13,6	6,75
Pufr	2	1
dNTP	0,4	0,2
Forward primer	0,25	0,15
Reverse primer	0,25	0,15
Taq polymeráza	0,5	0,25
DNA	3	1,5
Do stripu	17 multimixu a 3 DNA	8,5 multimixu a 1,5 DNA

C.3 Přesrážení mikrosatelitových produktů

C.3.1 Přesrážení jednotlivých vzorků

1. Ve zvláštním stripu naředit produkty (obvykle 1 : 1 s ddH₂O).
2. Do 1,5 ml eppendorfek přidat na stěnu 2 μl CH₃COOH a 1 μl naředěného produktu.
3. Přidat 25 μl předchlazeného 96% ethanolu, promíchat.
4. Dát na 20 min. do mrazáku.
5. Centrifugovat v centrifuze předchlazené na 4° C 30 min. na maximum.
6. Opatrně slít.
7. Přidat 100 μl předchlazeného 70% ethanolu.
8. Centrifugovat 3 min. na maximum.
9. Opatrně slít.
10. Nechat stát 10 min. ve flow boxu.
11. Dle potřeby nechat asi 10 min. schnout v termobloku předehřátém na 65° C.
12. Uložit do mrazáku.

Tabulka C.2: Reakční směs pro PCR s využitím Eppendorf RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix. Reakční směs se připravuje pro každý z 10 primerů zvlášť. V prvním sloupci jsou jednotlivé složky reakční směsi, ve druhém jejich objem pro poloviční reakci v 10 μl . Poslední řádek je součtem předchozích řádků.

Složka	Objem v μl
Sterilní voda	3,2
RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	5
Forward primer	0,15
Reverse primer	0,15
DNA	1,5
Do stripu	8,5 multimixu a 1,5 DNA

Tabulka C.3: PCR používaná pro amplifikaci mikrosatelitových primerů. Po iniciálním zahřátí následuje 35 cyklů a 15 minut na dosyntetizování zbytků, čímž PCR končí. Až do otevření víka termocykleru a vyjmutí vzorků je teplota držena na 10°C.

Teplota ve °C	Čas	
94	1 minuta	iniciální
94	40 sekund	35 cyklů
50	40 sekund	
72	50 sekund	
72	15 minut	terminační
10	hold	

C.3.2 Přesrážení v platu do sekvenátoru

1. Ve zvláštním stripu naředit produkty (obvykle 1 : 1 s ddH₂O).
2. Do každé jamky plata přidat na stěnu 2 μl CH₃COOH a 1 μl naředěného produktu.
3. Sekvenátor čte plato ve směru A1, B1, C1, ...
4. Do každé jamky multikanálovou pipetou přidat 25 μl 96% ethanolu.
5. Uzavřít destičku a opatrně zvortexovat.
6. Stočit destičku v centrifuze 1 min. Při 40 RCF.
7. Dát na 20 min. do mrazáku.

8. Centrifugovat při 4° C 20 min. při 2250 RCF (maximální brzdění).
9. Opatrně odstranit víko destičky, přikrýt buničinou, otočit dnem vzhůru a centrifugovat 1 min. při 40 RCF (vyteče ethanol, neviditelný precipitát zůstane na stěně).
10. Multikanálovou pipetou přidat 100 μ l 70% ethanolu.
11. Zavřít plato a centrifugovat 15 min. při 2250 RCF.
12. Opatrně odstranit víko destičky, přikrýt novou buničinou, otočit dnem vzhůru a centrifugovat 1 min. při 40 RCF (vyteče ethanol, neviditelný precipitát zůstane na stěně).
13. Nechat stát otevřenou destičku 10 min. ve flow boxu.
14. Nechat 5 min. schnout v termobloku předehřátém na 65° C.
15. Uložit do mrazáku.

Po přesrážení byly vzorky odeslány na fragmentační analýzu na automatický sekvenátor ABI Avant 3100 nebo ABI 3130 Genetic Analyzer v Sekvenační laboratoři Přírodovědecké fakulty UK v Praze (<http://www.natur.cuni.cz/~seqlab/>).

Dodatek D

Primární data

Délky jednotlivých alel všech analyzovaných jedinců. S těmito daty bylo v počítáno ve všech analýzách. V prvním sloupci je zkratka jedince (dvojpísmenná část zkratky odpovídá zkratkám populací podle tab. 3.2 na str. 36, v dalších sloupcích jsou po řadě délky alel pro jednotlivé lokusy. Pro každý lokus jsou uvedeny 2 alely (stůlek žlutý je diploidní). Otazníky (?) znamenají chybějící data.

Vzorek	GA1	GA3	GA5	GA6	TG/GA1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8
Kr 1	127 127	152 152	86 86	260 260	121 121	104 106	202 202	184 184	89 89	202 202
Kr 2	127 127	152 154	86 86	260 260	121 121	116 118	202 202	184 196	87 89	202 202
Kr 3	127 127	152 154	86 86	260 260	121 121	116 116	202 202	184 184	91 91	202 202
Kr 4	127 127	140 140	86 86	260 260	121 121	100 100	202 202	184 196	105 105	202 202
Kr 5	127 127	154 154	86 86	260 260	121 121	116 116	202 202	184 184	89 89	202 202
Kr 6	127 127	154 154	86 86	260 260	121 121	114 116	202 202	184 196	89 89	202 202
Kr 7	127 127	152 152	86 86	260 260	121 121	116 118	202 202	184 184	87 101	202 202
Kr 8	127 127	152 154	86 86	260 260	121 121	116 118	202 202	184 184	89 101	202 202
Kr 9	127 127	154 154	86 86	260 260	121 121	116 116	202 202	184 196	89 101	202 202
Kr 10	127 127	154 154	86 86	260 260	121 121	116 116	202 202	184 184	89 101	202 202
Be 1	127 127	154 162	86 86	260 260	117 117	116 118	202 202	186 196	87 97	202 202
Be 2	127 127	152 162	86 86	260 260	117 121	116 118	202 202	192 192	91 91	202 204
Be 3	125 127	154 162	86 86	260 260	117 117	116 116	202 202	188 188	87 87	204 204
Be 4	127 127	154 162	86 86	260 260	117 121	116 118	202 202	192 196	87 91	202 204
Be 5	127 127	162 162	98 98	260 260	117 121	98 98	202 202	186 192	87 91	196 204
Be 6	127 127	154 162	86 86	260 260	117 121	116 118	202 202	186 192	87 91	196 204
Be 7	127 127	148 148	86 86	260 260	117 117	98 98	200 202	188 188	87 93	218 220
Be 8	127 127	154 162	86 86	260 260	117 117	116 116	202 202	202 202	87 97	204 204
Be 9	127 127	134 146	86 86	260 260	117 121	98 98	202 202	192 196	87 91	196 204
Be 10	127 127	160 162	86 86	262 262	117 117	98 98	202 202	196 196	107 107	204 204
Ge 1	127 127	154 154	86 92	262 262	119 121	98 98	200 202	190 190	107 107	202 202
Ge 2	127 127	146 146	86 92	260 260	121 121	114 116	202 202	192 196	87 105	196 202
Ge 3	127 127	150 160	86 86	260 260	119 121	98 98	202 202	192 192	107 107	202 202
Ge 4	127 127	150 150	? ?	262 262	? ?	98 98	? ?	190 190	107 107	202 204
Ge 5	127 127	150 150	86 86	262 262	? ?	86 116	? ?	190 202	107 107	202 202
Ge 6	127 127	150 150	86 86	260 266	127 127	116 116	202 202	194 202	101 101	202 202
Ge 7	137 137	150 150	98 98	260 260	127 127	118 118	? ?	? ?	105 105	? ?
Ge 8	127 127	150 150	86 92	260 260	119 121	116 116	202 202	194 202	87 101	202 202
Ge 9	127 127	150 150	86 86	260 260	119 121	98 98	202 202	192 192	87 87	202 202
Ot 1	145 145	150 152	94 94	258 258	121 121	94 94	230 230	170 192	89 89	196 196
Ot 2	143 147	150 150	94 94	260 260	121 121	94 94	230 230	188 190	89 89	196 196
Ot 3	145 145	152 152	94 94	258 258	121 121	94 94	230 230	188 188	87 87	196 210
Ot 4	145 145	152 152	94 94	258 258	121 121	94 94	230 230	188 188	87 87	196 210
Ot 5	135 135	140 142	94 94	258 258	121 121	94 94	230 230	188 188	87 89	196 210
Pn 1	145 145	152 152	92 94	260 260	121 121	94 94	230 230	170 170	89 89	196 196
Pn 2	145 145	148 148	92 94	260 260	121 121	94 94	230 230	170 170	89 89	200 212
Pn 3	145 145	148 150	92 94	260 260	121 121	94 94	232 232	172 172	89 89	196 210
Pn 4	145 145	152 152	92 94	260 260	121 121	90 110	232 232	170 190	77 77	200 200
Pn 5	145 145	150 152	92 92	260 260	121 121	94 94	230 230	170 190	87 89	198 198
Ka 1	145 145	182 182	94 94	260 260	121 121	94 94	222 222	170 170	89 89	196 196
Ka 2	145 145	146 146	92 92	260 260	121 121	94 94	230 230	170 170	89 89	198 198
Ka 3	145 145	146 146	92 94	258 258	121 121	94 94	230 230	170 170	87 87	198 198
Ka 4	125 125	146 146	92 92	260 260	121 121	94 94	230 230	190 190	87 87	198 198
Ka 5	145 145	148 148	94 94	260 260	121 121	98 98	232 232	170 190	87 89	196 196
Ka 6	145 145	148 148	94 94	260 260	121 121	94 94	230 230	170 170	89 89	196 196
Ka 7	145 145	148 148	92 94	260 260	121 121	94 94	230 230	170 170	87 87	198 198
Ka 8	145 145	144 162	92 92	260 260	121 121	94 94	230 230	190 190	87 87	198 198

Vzorek	GA1	GA3	GA5	GA6	TG/GA1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8
Ka 9	145 145	148 150	94 94	258 258	121 121	94 94	232 232	172 172	89 89	200 200
Ka 10	145 145	148 148	94 94	258 258	121 121	94 94	232 232	190 190	87 87	198 198
Uo 1	165 165	158 158	68 90	258 258	119 119	114 114	232 232	196 196	89 101	218 218
Uo 2	127 165	158 158	92 92	258 260	119 119	114 114	232 232	194 194	89 89	200 218
Uo 3	139 165	158 166	100 100	258 258	119 119	92 114	226 232	194 194	87 89	218 218
Uo 4	165 165	158 158	68 68	258 258	119 119	114 114	232 232	194 194	91 97	222 222
Uo 5	165 165	158 158	68 68	258 258	117 117	114 114	228 228	194 194	89 97	222 222
Uo 6	127 127	166 166	92 92	262 262	123 123	92 92	220 220	194 194	99 99	220 220
Uo 7	165 165	158 158	100 100	258 258	119 119	92 92	202 208	196 196	89 89	198 220
Uo 8	127 127	158 182	68 68	258 258	119 119	92 92	232 232	196 196	99 99	200 200
Uo 9	165 165	158 158	62 70	258 258	119 119	114 114	230 230	194 194	89 89	218 218
Uo 10	127 127	158 166	92 92	260 260	119 119	114 114	236 236	194 194	87 89	218 218
Uh 1	127 127	166 166	68 68	260 260	119 119	114 114	218 220	194 194	89 89	218 218
Uh 2	127 127	158 166	90 92	258 258	119 119	92 92	228 228	194 194	87 87	218 218
Uh 3	127 127	158 166	68 82	260 260	119 119	92 114	230 230	194 194	89 89	218 218
Uh 4	127 127	158 166	70 92	260 262	119 119	114 114	230 230	194 194	87 89	198 198
Uh 5	127 165	156 158	92 92	260 260	119 119	114 114	230 230	194 196	87 89	198 198
Uh 6	127 165	158 158	92 92	258 260	119 119	92 92	228 228	194 194	87 93	218 218
Uh 7	127 127	148 148	70 70	260 260	119 119	90 90	230 230	200 200	87 87	220 220
Uh 8	127 127	166 166	68 90	260 262	119 119	102 102	218 218	194 194	89 97	220 220
Uh 9	127 127	158 158	68 68	262 262	119 119	92 114	218 218	194 196	99 99	196 196
Uh 10	127 127	156 164	68 92	262 262	119 119	92 94	216 216	194 194	101 103	196 220
Mr 1	161 161	162 164	94 94	256 256	115 123	86 96	230 230	194 194	77 77	224 224
Mr 2	127 127	158 160	70 92	260 260	119 119	92 92	230 230	194 194	91 91	220 220
Br 1	163 165	148 148	86 92	260 260	119 119	92 92	202 202	194 198	89 97	210 220
Br 2	161 161	148 166	86 86	260 260	115 119	92 92	202 216	194 194	81 93	210 220
Br 3	161 161	146 146	86 86	260 260	115 119	92 92	202 216	198 198	93 93	210 220
Br 4	161 161	150 150	86 86	260 260	115 119	92 92	202 216	194 194	89 89	200 200
Br 5	161 161	148 148	86 86	260 260	115 119	92 116	202 202	192 198	97 97	196 222
Br 6	161 163	148 148	86 86	260 260	115 115	92 116	202 216	192 192	89 89	202 218
Br 7	161 163	148 154	86 86	260 260	115 121	92 92	216 216	178 178	89 89	196 204
Br 8	149 151	148 166	86 86	260 260	115 115	94 94	202 216	198 198	89 91	202 204
Br 9	159 159	148 148	84 92	260 260	119 119	92 116	204 204	184 188	91 91	202 202
Br 10	161 161	148 148	86 92	260 260	115 115	92 92	202 202	198 198	91 91	198 202
Nz 1	157 157	148 148	70 86	260 260	119 119	92 94	202 216	194 198	85 85	202 202
Nz 2	127 127	148 148	86 86	260 260	119 119	102 102	218 218	188 188	? ?	202 202
Nz 3	141 165	156 158	100 110	260 260	119 119	92 94	202 216	194 198	85 85	202 202
Nz 4	127 127	148 148	68 86	260 260	119 119	92 94	202 216	194 198	85 85	196 202
Nz 5	127 127	148 148	68 68	264 264	119 119	92 94	? ?	198 198	? ?	196 204
Nz 6	139 151	148 150	84 92	260 260	121 121	118 118	218 232	196 200	99 99	202 202
Nz 7	127 161	148 148	86 86	260 260	119 119	92 92	202 202	198 198	85 85	196 202
Nz 8	161 161	148 148	86 86	260 260	119 119	104 110	204 234	198 198	85 93	202 204
Nz 9	127 127	150 150	92 92	258 260	119 119	92 92	202 202	194 194	99 99	196 196
Nz 10	139 139	144 148	102 102	258 260	123 123	100 100	234 234	196 196	97 97	204 204
Nj 1	127 127	144 148	86 92	260 260	119 119	92 116	202 216	194 194	87 89	196 202
Nj 2	125 125	144 154	86 86	260 260	119 119	92 92	206 206	192 192	87 89	198 200
Nj 3	127 127	148 148	92 92	260 260	119 119	116 116	216 216	198 198	87 87	196 208
Nj 4	127 127	146 146	86 92	260 260	125 125	116 116	202 202	194 194	87 99	204 204
Nj 5	127 127	148 150	90 92	270 270	119 119	92 116	216 216	198 198	81 89	194 194
Nj 6	127 161	146 148	90 92	260 260	119 119	92 116	202 202	186 198	89 97	194 202
Nj 7	153 153	152 152	100 100	260 260	119 119	92 116	202 230	194 198	85 89	202 204
Nj 8	127 127	148 154	86 86	260 260	119 119	92 92	216 230	186 194	89 91	196 204
Nj 9	127 127	148 148	92 92	262 262	119 119	92 92	202 202	194 194	89 89	196 218
Nj 10	127 127	146 148	86 92	260 260	119 119	92 92	202 202	194 194	89 105	204 218
Ne 1	159 161	148 150	92 96	260 260	119 119	92 92	216 232	194 198	91 105	196 202
Ne 2	127 127	148 148	92 92	260 260	119 119	92 92	202 216	194 198	89 105	216 218
Ne 3	127 161	148 150	92 92	264 272	119 119	92 92	202 202	194 194	89 99	196 196
Ne 4	161 161	148 150	86 92	260 260	119 119	92 92	202 202	194 194	89 99	196 204
Ne 5	127 127	146 148	92 92	260 260	139 139	104 104	220 220	200 200	99 99	222 222
Ne 6	137 137	156 158	102 102	250 250	119 119	92 92	202 202	194 194	87 89	196 218
Ne 7	141 141	156 158	84 104	260 260	119 119	92 92	216 216	198 198	81 105	196 218
Ne 8	127 141	148 148	86 86	260 260	119 119	92 116	216 216	198 202	89 105	196 218
Hr 1	127 127	154 154	86 86	266 266	119 119	92 92	? ?	190 192	77 89	196 196
Hr 2	127 127	158 158	86 86	262 262	119 119	92 102	202 202	190 190	77 93	196 196
Hr 3	153 153	148 148	86 92	262 262	119 119	92 102	202 230	200 200	89 91	196 196
Hr 4	127 127	158 158	86 86	262 262	119 119	92 102	202 202	190 200	89 93	196 196
Hr 5	127 127	148 158	92 92	262 262	119 119	92 92	202 230	180 198	93 95	196 196
Hr 6	127 127	154 154	86 92	262 262	119 119	92 92	? ?	186 200	93 95	196 196
Hr 7	? ?	154 182	84 84	268 268	127 127	92 92	206 206	? ?	? ?	196 196
Hr 8	127 127	154 158	86 92	266 266	119 119	92 92	230 230	198 200	93 95	196 196
Hr 9	133 133	154 154	86 86	270 270	119 119	92 102	202 202	190 190	89 89	196 196
Hr 10	127 127	148 154	86 86	260 260	119 119	102 102	202 202	190 190	89 89	196 196
Jl 1	127 127	148 158	68 94	260 260	119 119	92 92	200 200	200 200	97 97	196 216
Jl 2	127 127	158 158	68 68	260 260	139 139	100 100	202 202	202 206	93 109	200 220
Jl 3	127 127	148 158	68 94	260 260	121 121	100 100	200 200	200 200	75 75	196 216
Jl 4	127 127	158 158	68 94	260 260	119 119	92 92	202 202	196 196	89 89	192 192
Jl 5	129 129	158 158	100 100	262 262	119 119	92 92	202 202	196 196	105 105	194 194
Jl 6	127 127	158 158	94 94	262 262	119 119	92 92	208 208	202 202	89 89	202 202
Jl 7	127 127	158 158	94 94	262 262	119 119	92 92	202 202	196 196	91 91	194 194
Jl 8	127 127	158 158	94 94	262 262	119 119	92 92	206 206	196 196	89 91	196 196
Jl 9	127 127	158 158	70 70	262 262	119 119	92 92	? ?	188 188	97 97	196 196
Jl 10	127 127	158 158	100 100	262 262	119 119	92 92	208 208	196 196	89 89	196 196
Lp 1	127 127	148 148	100 100	262 262	121 121	92 92	202 202	194 200	105 105	196 196

Vzorek	GA1	GA3	GA5	GA6	TG/GA1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8
Lp 2	127 127	148 148	86 92	262 262	121 121	116 116	216 216	186 198	87 105	204 204
Lp 3	127 127	148 148	86 92	256 270	119 119	114 116	216 216	186 198	87 105	204 204
Lp 4	161 161	148 148	92 92	260 260	119 119	92 92	230 230	194 194	85 85	196 204
Lp 5	127 127	148 148	92 92	260 260	119 119	114 116	216 216	186 198	105 105	204 204
Lp 6	151 161	148 148	86 86	260 260	119 119	92 92	202 202	186 186	85 89	202 202
Lp 7	127 127	150 150	86 86	260 260	119 119	92 92	202 202	198 198	89 89	196 196
Lp 8	127 127	148 150	86 86	260 260	119 119	116 116	202 216	194 198	87 87	218 220
Lp 9	127 127	148 148	96 96	262 262	119 119	98 98	216 216	198 198	105 105	216 216
Lp 10	157 157	148 148	86 86	260 260	119 119	114 116	202 202	194 194	87 87	218 218
NV 1	129 129	174 176	92 92	260 260	117 117	114 114	210 228	202 202	105 105	216 216
NV 2	129 129	174 176	92 92	260 260	117 117	114 114	210 228	202 202	95 97	216 216
NV 3	129 129	174 176	92 92	260 260	117 117	114 114	210 228	202 202	95 97	216 216
NV 4	129 129	174 176	92 92	260 260	117 117	114 114	210 228	202 202	93 97	216 216
NV 5	129 129	174 176	92 92	260 260	117 117	114 114	228 228	202 202	95 97	216 216
NV 6	129 129	174 176	92 92	260 260	117 117	114 114	228 228	202 202	93 97	216 216
NV 7	129 129	174 176	92 92	260 260	117 117	114 114	228 228	202 202	95 97	216 216
NV 8	129 129	174 176	92 92	260 260	117 117	114 114	228 228	202 202	93 97	216 216
NV 9	139 139	180 182	100 100	260 260	117 117	116 116	228 228	202 202	95 95	216 216
Nm 1	143 147	142 142	96 96	260 260	127 127	92 92	? ?	172 172	87 87	202 202
Nm 2	147 147	150 150	86 86	260 266	117 117	92 92	202 202	196 196	87 87	202 202
Nm 3	147 147	150 150	86 86	260 260	117 117	92 118	202 202	196 196	87 87	212 212
Nm 4	147 147	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	196 196	87 87	202 220
Du 1	149 163	142 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 198	87 87	200 200
Du 2	147 163	142 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 198	87 87	202 202
Du 3	149 149	150 150	86 86	262 262	117 117	90 90	202 202	192 200	81 87	202 202
Du 4	149 163	142 150	86 86	262 262	117 117	92 92	202 202	192 192	87 87	202 202
Du 5	149 163	142 150	86 86	262 262	117 117	92 92	202 202	192 192	87 87	202 202
Du 6	161 163	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	87 87	202 202
Du 7	165 167	148 152	84 84	260 260	121 121	100 100	202 202	194 202	87 87	204 204
Du 8	161 163	148 150	84 84	260 260	139 139	100 100	202 202	200 200	83 93	206 208
Du 9	161 163	150 150	84 84	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
Du 10	163 167	148 150	84 84	260 260	117 117	90 90	202 202	192 192	81 87	202 202
Vy 1	147 149	142 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	87 87	196 202
Vy 2	147 147	142 150	84 86	260 260	127 127	92 92	202 202	192 192	87 87	196 202
Vy 3	147 147	142 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	87 87	196 202
Vy 4	161 163	142 142	86 86	260 266	117 117	92 92	202 202	192 196	87 87	202 202
Vy 5	163 163	142 142	86 86	260 266	117 117	92 92	202 202	192 196	87 87	202 202
Vy 6	163 163	142 142	86 86	260 266	117 117	92 92	202 202	192 196	87 87	196 202
Vy 7	163 163	142 142	86 86	260 266	117 117	92 92	202 202	192 196	87 87	196 202
Vy 8	147 147	142 142	86 86	260 266	117 117	92 92	202 202	192 196	87 87	196 196
Vy 9	149 163	142 142	86 86	260 266	117 117	92 92	200 202	192 196	87 87	196 196
Vy 10	149 163	142 142	86 86	262 268	117 117	92 92	202 202	192 196	87 87	196 196
HZ 1	165 167	150 152	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 220
HZ 2	165 167	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	220 222
HZ 3	165 167	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	204 204	81 87	202 220
HZ 4	161 161	152 152	98 98	258 258	117 117	86 98	210 210	188 188	105 105	? ?
HZ 5	165 167	150 152	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 204	81 87	202 220
HZ 6	165 167	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	182 192	81 87	218 220
HZ 7	165 167	150 152	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	218 220
HZ 8	165 167	150 152	86 86	260 266	117 117	92 92	202 202	182 192	81 87	202 220
HZ 9	165 167	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
HZ 10	165 167	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 204	81 87	202 220
DZ 1	165 167	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	182 204	81 87	202 220
DZ 2	165 167	152 152	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	204 204	81 87	202 202
DZ 3	165 167	150 152	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	182 204	81 87	220 220
DZ 4	161 163	150 152	86 86	260 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	218 220
DZ 5	165 167	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 220
DZ 6	165 167	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	107 107	202 202
DZ 7	165 167	146 148	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	188 188	81 87	202 202
DZ 8	165 167	150 152	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 204	81 87	196 220
DZ 9	165 167	150 150	86 86	260 260	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	218 220
DZ 10	165 167	150 152	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 204	81 87	202 220
ZL 1	165 165	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
ZL 2	165 167	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	204 204	192 192	81 87	202 202
ZL 3	165 167	148 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
ZL 4	165 167	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 216	192 192	81 87	202 202
ZL 5	165 167	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 204	81 87	202 202
ZL 6	163 163	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
ZL 7	165 167	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	196 202
ZL 8	165 167	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
ZL 9	163 163	148 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
ZL 10	165 167	146 146	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
Ls 1	165 167	148 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
Ls 2	165 167	146 146	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
Ls 3	165 167	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	204 204	81 87	196 196
Ls 4	165 167	148 148	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
Ls 5	163 163	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	204 204	81 87	196 202
Ls 6	165 167	146 146	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	204 204	81 87	202 202
Ls 7	165 167	146 146	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 202
Ls 8	165 167	146 146	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	202 222
Ls 9	165 167	150 150	86 86	266 266	117 117	92 92	202 202	204 204	81 87	202 202
Ls 10	167 167	150 150	86 86	264 264	117 117	92 92	202 202	192 192	81 87	196 202
ZH 1	159 161	152 160	86 96	260 260	121 121	92 92	222 222	194 194	87 97	224 224

Vzorek	GA1	GA3	GA5	GA6	TG/GA1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8
ZH 2	161 161	160 160	86 96	260 260	123 123	88 92	222 230	194 196	87 91	224 224
ZH 3	161 161	152 152	92 92	260 260	123 123	92 92	222 222	194 194	99 99	224 224
ZH 4	161 161	146 146	96 96	260 260	123 123	92 92	222 222	198 198	97 97	224 224
ZH 5	161 161	146 146	86 96	260 260	123 123	92 92	222 222	194 194	87 97	224 224
ZH 6	161 161	146 146	86 96	260 260	123 123	88 92	222 230	194 194	97 99	224 224
ZH 7	161 161	146 148	80 80	260 260	123 123	88 92	222 230	182 182	97 99	224 224
Cl 1	161 167	150 150	98 98	260 260	121 121	88 92	230 230	198 198	97 99	206 224
Cl 2	161 163	160 160	102 102	260 260	121 121	92 92	222 230	198 198	97 97	206 206
Cl 3	161 161	154 154	96 96	260 260	121 121	88 92	230 230	198 198	97 99	206 224
Cl 4	161 161	158 160	96 96	260 260	121 121	96 96	232 232	190 190	105 105	196 196
Zv 1	161 163	150 152	102 102	260 260	121 121	92 92	216 224	198 200	91 91	206 206
Zv 2	161 163	152 152	100 100	260 260	121 121	92 92	224 232	200 200	91 97	208 208
Zv 3	161 165	146 166	100 100	260 260	121 121	88 92	222 222	170 194	87 99	206 206
Zv 4	161 161	166 174	100 100	260 260	121 121	88 88	222 230	194 198	87 87	206 206
Ba 1	157 157	160 160	84 84	260 260	139 139	104 106	232 232	200 200	101 111	222 222
Ba 2	157 157	160 160	86 86	260 260	123 123	92 92	232 232	194 194	87 97	206 224
Ba 3	161 161	160 160	86 100	260 260	123 123	88 92	230 230	198 198	91 97	206 206
Ba 4	161 161	160 160	86 100	260 260	123 123	88 92	230 230	198 198	93 97	206 206
Ba 5	161 161	162 162	86 100	260 260	123 123	88 92	230 230	198 198	91 97	206 206
Ba 6	161 161	152 160	100 100	260 260	123 123	92 92	222 230	194 194	87 97	206 224
Ba 7	161 161	152 152	100 100	260 260	123 123	92 92	222 230	194 194	97 101	222 222
Ba 8	161 161	152 152	86 100	260 260	123 123	92 92	222 230	194 198	87 97	224 224
Ba 9	161 161	148 150	92 92	272 272	121 121	92 92	220 228	194 198	87 97	222 222
Ky 1	161 163	174 176	84 86	260 260	119 119	114 114	202 202	170 170	91 91	198 198
Ky 2	163 165	174 176	86 86	260 260	119 119	88 88	234 234	170 170	95 95	200 200
Ky 3	161 163	174 176	86 94	262 262	119 119	114 116	206 234	170 196	93 93	200 200
Ky 4	161 161	174 176	86 94	262 262	119 119	116 116	206 232	170 196	93 93	200 200
Ky 5	163 163	174 176	86 92	262 264	119 119	114 114	232 236	170 194	93 95	198 198
Ky 6	161 161	174 176	86 86	260 262	119 119	116 116	200 234	170 170	91 91	198 198
Ky 7	177 177	148 148	82 82	260 260	??	112 114	??	176 176	93 93	200 200
Ky 8	161 163	174 176	86 86	262 262	119 119	114 116	202 202	176 176	93 93	200 208
Ky 9	161 165	148 148	86 86	262 262	119 119	114 118	234 236	170 194	93 93	200 200
Nb 1	161 161	176 178	86 94	264 264	119 119	122 122	234 234	198 198	103 103	198 198
Nb 2	??	148 148	84 84	260 260	127 127	??	234 234	??	107 107	200 200
Nb 3	161 163	172 174	82 82	262 262	119 119	114 114	232 232	194 194	93 93	200 200
Nb 4	161 163	174 176	84 84	260 260	119 119	114 114	202 202	176 176	91 93	200 200
Nb 5	161 163	176 176	86 86	260 262	119 119	120 122	232 234	194 194	93 93	198 200
Nb 6	153 153	174 176	84 84	260 262	119 119	102 102	??	188 188	91 91	198 200
Nb 7	161 161	176 178	84 84	260 262	119 119	90 92	204 204	194 194	107 107	198 198
Nb 8	163 165	162 176	94 94	262 262	119 119	116 118	202 202	194 194	93 95	200 200
Nb 9	163 165	174 176	86 86	262 264	119 119	116 116	202 202	170 170	93 95	198 200
Ch 1	165 167	178 180	94 96	260 264	119 121	114 114	232 234	178 194	91 103	198 210
Ch 2	161 163	178 180	94 94	262 264	119 121	108 116	232 234	170 170	89 97	218 220
Ch 3	161 163	172 174	94 94	266 268	121 121	90 90	228 230	170 190	97 97	200 200
Ch 4	163 165	178 180	94 96	262 264	121 123	88 114	232 234	198 198	93 103	198 210
Ch 5	163 165	178 180	86 94	262 264	121 123	88 114	232 234	198 198	93 93	198 210
Ch 6	161 163	148 148	86 94	258 258	119 119	114 116	??	176 190	107 107	198 198
Ch 7	161 163	146 146	86 86	264 264	119 119	88 88	232 232	194 194	95 95	200 200
Ch 8	127 127	148 148	86 94	262 262	119 119	88 88	??	??	107 107	200 200
Ch 9	161 163	148 148	86 86	262 262	121 121	88 88	232 232	194 194	95 103	200 200
Ch 10	163 163	148 148	86 86	260 260	121 121	116 116	232 234	194 194	95 103	200 200
Ch 11	161 163	148 148	86 86	260 262	119 119	116 116	232 234	194 194	95 103	200 200
Ch 12	161 163	148 148	86 94	262 262	119 119	116 118	230 232	194 194	107 107	200 200
Ch 13	161 163	174 174	86 94	262 262	119 119	116 116	232 234	200 200	107 107	200 200
Ch 14	161 163	148 148	86 94	262 262	121 121	118 118	232 232	194 194	93 93	210 210
Pc 1	163 163	152 152	94 94	260 260	115 115	92 92	216 216	194 194	99 103	222 222
Pc 2	151 163	150 152	94 100	260 260	115 119	92 102	216 220	194 196	99 103	198 222
Pc 3	155 155	152 152	94 94	260 268	119 119	92 92	224 224	192 194	97 103	218 218
RL 1	161 161	152 152	102 102	268 268	119 121	92 96	216 220	192 196	103 103	214 222
RL 2	175 175	152 152	80 80	268 268	121 135	94 94	224 224	194 198	99 99	222 222
Kt 1	153 153	154 154	94 94	260 260	119 119	92 102	216 216	198 198	91 99	204 204
Kt 2	153 169	152 152	94 96	268 268	119 119	92 92	216 216	180 196	97 97	214 222
Kt 3	161 163	152 152	92 92	268 268	119 121	92 92	222 222	192 200	97 103	204 222
Kt 4	161 161	152 152	92 92	268 268	115 119	92 92	218 224	192 194	97 103	204 204
Kt 5	161 163	152 154	102 102	260 266	119 119	92 92	222 222	194 200	97 103	214 222
Kt 6	161 161	178 178	94 94	260 260	115 121	92 92	222 222	196 200	103 103	196 214
Pt 1	153 153	154 154	94 94	260 260	119 119	92 102	216 216	198 198	91 99	204 204
Pt 2	153 169	152 152	94 96	268 268	119 119	92 92	216 216	180 196	97 97	214 222
Pt 3	161 163	152 152	92 92	268 268	119 121	92 92	222 222	192 200	97 103	204 222
Sj 1	161 161	152 152	92 92	268 268	115 119	92 92	218 224	192 194	97 103	204 204
Sj 2	161 163	152 154	102 102	260 266	119 119	92 92	222 222	194 200	97 103	214 222
Sj 3	161 161	178 178	94 94	260 260	115 121	92 92	222 222	196 200	103 103	196 214
Gr 1	163 163	152 152	86 94	260 268	119 119	94 100	222 222	194 194	95 97	214 214
Gr 2	163 163	156 156	94 94	268 268	119 119	94 100	222 222	194 194	95 97	214 214
Gr 3	161 161	152 152	86 94	268 268	119 119	92 92	216 216	194 194	97 103	204 210
Gr 4	163 163	152 152	86 94	260 268	119 119	94 100	222 222	194 194	95 97	214 214
Gr 5	161 161	152 152	94 94	268 268	115 119	92 92	222 222	192 194	97 97	204 204
Gr 6	161 161	152 152	92 94	268 268	119 119	92 100	216 222	194 204	97 97	204 204
Gr 7	161 163	150 152	100 102	268 268	115 121	92 92	216 222	194 194	97 97	204 214
Gr 8	161 161	152 152	92 94	268 268	119 119	86 94	216 222	190 190	97 103	204 224
Gr 9	161 161	152 152	92 94	268 268	119 119	86 94	216 222	190 190	97 103	204 204
Va 1	161 163	152 152	94 102	268 268	119 119	92 94	222 222	192 196	97 97	222 222
Va 2	161 163	152 152	94 102	268 268	119 119	94 100	216 218	192 196	97 97	222 222

Vzorek	GA1	GA3	GA5	GA6	TG/GA1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8
Va 3	161 161	152 152	94 102	268 268	119 119	90 100	222 222	194 198	91 97	222 222
Va 4	161 163	152 152	92 94	268 268	119 119	92 94	222 232	194 198	97 103	204 204
Va 5	161 163	152 152	92 94	268 268	119 119	94 100	232 232	194 198	97 103	202 202
Va 6	161 161	152 152	92 94	268 268	119 119	94 94	222 230	194 198	91 91	204 204
Va 7	161 163	152 152	92 94	268 268	119 119	94 94	222 230	194 204	97 103	204 220
Va 8	161 163	152 152	92 94	268 268	119 119	92 102	222 232	194 204	? ?	204 220
Va 9	161 161	152 152	92 102	268 268	119 119	94 100	218 218	194 198	97 103	204 222
Va 10	161 161	152 152	90 90	268 268	119 119	100 100	222 222	194 204	97 103	204 204
Va 11	161 161	152 152	90 90	268 268	119 119	106 108	222 222	192 194	97 103	204 204
Ce 1	163 171	150 168	94 102	268 268	119 119	92 96	218 222	194 198	97 97	222 224
Ce 2	165 177	152 152	94 94	268 268	119 119	96 100	222 232	194 196	103 103	204 214
Ce 3	163 163	150 152	92 102	260 260	115 119	92 100	222 222	194 194	103 103	204 204
Ce 4	161 163	152 152	92 100	268 268	119 119	86 92	216 216	192 200	97 103	204 222
Ce 5	161 163	152 160	94 102	268 268	119 119	92 92	222 222	194 200	103 103	222 222
Ce 6	161 161	152 152	100 100	268 268	115 119	92 94	222 224	192 196	97 103	216 222
Ro 1	161 163	152 162	106 106	268 268	119 119	94 94	216 216	188 202	89 97	214 220
Ro 2	161 161	152 152	102 106	268 268	119 119	94 100	216 216	198 198	89 97	198 214
Ro 3	165 165	152 152	106 106	268 268	119 119	86 96	216 224	202 202	89 105	214 222
Ro 4	161 165	152 152	106 106	268 268	119 119	94 96	216 224	188 202	89 89	198 214
Ro 5	161 161	152 152	106 106	268 268	119 119	96 96	216 216	192 192	93 93	220 220
Ro 6	161 161	152 152	106 106	268 268	119 119	90 96	216 216	192 192	93 93	220 220
Nk 1	161 163	152 152	76 96	268 268	119 119	90 90	212 216	198 198	97 97	214 218
Nk 2	165 165	152 152	106 106	268 268	119 119	94 94	216 216	194 198	89 97	220 220
Nk 3	165 165	152 152	106 106	268 268	119 119	96 96	224 224	202 202	89 89	222 222
Ha 1	163 163	152 154	70 70	260 268	119 119	90 90	216 216	194 198	93 97	204 214
Ha 2	161 163	152 152	70 94	268 268	119 119	90 90	216 216	192 198	93 97	214 222
Ha 3	161 161	152 152	70 94	262 268	119 119	94 94	216 216	194 198	89 97	220 220
Ha 4	161 163	152 152	86 86	268 268	119 119	90 96	216 230	194 196	97 103	206 222
Ha 5	161 161	152 152	106 106	268 268	119 119	90 90	216 224	192 192	93 97	214 220
Ha 6	153 153	152 152	70 102	268 268	119 119	94 100	216 216	198 198	97 97	198 220
Ha 7	163 163	150 152	94 94	266 268	119 119	96 96	216 216	196 196	93 97	214 220
Ha 8	161 161	152 152	94 94	268 268	119 121	90 90	216 216	198 198	95 95	204 220
Ra 1	161 161	152 152	94 94	268 268	119 119	94 94	216 216	198 198	97 97	214 218
Ra 2	161 163	152 152	94 94	268 268	119 119	90 96	216 218	192 194	95 97	220 220
Ra 3	161 161	170 170	102 102	268 268	119 119	88 100	216 216	198 198	95 95	220 220
Ra 4	161 161	152 152	94 102	262 268	119 119	90 96	? ?	194 198	93 95	214 220
Ra 5	161 161	150 168	94 102	268 268	119 119	86 90	216 216	198 200	97 105	214 222
Ra 6	161 163	152 154	70 94	260 268	119 121	86 90	216 216	194 194	97 103	214 214
Ra 7	151 161	152 168	94 102	260 268	119 119	86 94	216 216	194 198	103 103	? ?
Ra 8	161 163	152 152	70 94	268 268	119 119	94 96	216 216	194 198	97 103	214 214
Pd 1	153 165	152 152	92 94	262 268	119 121	92 92	222 230	194 196	97 105	204 214
Pd 2	151 157	152 160	94 94	262 268	119 119	92 92	222 222	196 196	97 97	216 218
Pd 3	161 163	152 152	92 92	268 268	119 119	100 100	216 224	196 196	103 103	222 228
Pd 4	153 163	152 166	86 100	260 268	115 137	92 92	222 222	194 196	97 103	210 214
Pd 5	155 161	152 152	94 94	260 268	119 119	92 102	216 216	192 198	91 91	214 216
Pd 6	153 161	156 156	86 100	260 268	119 121	88 92	216 220	194 194	103 103	198 206
Po 1	153 153	152 160	94 96	268 268	119 119	100 102	224 224	200 202	103 103	220 222
Po 2	165 165	152 160	70 98	268 268	119 119	92 92	216 222	194 194	97 103	220 222
Po 3	161 161	152 152	86 94	268 268	123 123	92 92	222 224	196 200	97 103	200 200
Po 4	161 161	150 152	86 100	260 268	119 119	92 94	222 224	194 196	87 97	216 216
Po 5	155 155	152 152	92 100	260 268	119 119	92 102	222 222	194 196	97 103	204 204
Po 6	155 161	152 152	94 100	268 268	119 121	92 102	218 232	194 196	97 103	200 200
Po 7	161 161	152 152	94 94	268 268	119 119	92 92	218 218	194 196	97 103	216 218
Po 8	155 155	160 160	70 92	260 260	119 119	102 102	216 216	178 194	103 103	220 222
Po 9	163 165	152 152	86 100	268 268	119 119	92 102	216 222	194 196	103 103	206 206
Po 10	155 155	152 152	96 100	268 268	119 121	92 100	222 224	180 194	91 97	198 198
Ny 1	161 161	152 152	96 96	268 268	119 119	92 92	216 216	192 194	93 97	216 224
Ny 2	153 163	152 152	92 92	268 268	119 121	92 100	222 222	196 198	103 103	204 218
Ny 3	161 177	150 152	70 94	268 268	119 121	92 92	220 220	194 196	97 97	214 222
Ny 4	161 165	150 150	92 94	268 268	119 119	92 92	216 222	194 196	97 97	228 228
Ny 5	161 161	152 156	86 94	260 268	119 121	92 100	216 222	194 196	91 97	214 218
Ny 6	163 169	152 152	86 86	260 268	119 119	92 94	222 224	194 196	103 103	198 214
Sm 1	161 161	152 152	94 94	268 268	119 119	96 96	222 222	198 198	103 103	208 208
Sm 2	161 161	152 152	94 94	268 268	119 119	96 96	222 222	198 198	89 103	208 208
Sm 3	161 161	152 152	94 94	268 268	119 119	96 96	222 222	198 198	89 103	224 224
Sm 4	161 161	152 152	94 94	268 268	119 119	96 96	222 222	198 198	103 103	224 224
VV 1	161 161	142 142	100 100	262 268	119 121	86 96	222 222	198 198	95 95	214 214
VV 2	167 167	152 152	100 100	262 268	115 119	86 86	222 222	198 198	103 103	214 214
VV 3	167 167	152 152	100 100	262 268	115 119	86 86	224 224	198 198	103 103	214 214
VV 4	167 167	152 152	100 100	262 268	115 115	86 86	224 224	198 198	103 103	214 214
VV 5	167 167	152 152	100 100	262 268	119 119	86 86	224 224	198 198	103 103	214 214
VV 6	167 167	152 152	100 100	268 268	115 115	86 86	224 224	198 198	103 103	214 214
VV 7	161 167	152 152	100 100	268 268	121 121	86 86	222 222	198 198	95 95	214 230
Ct 1	167 167	150 150	100 100	262 268	119 119	86 96	222 222	196 198	103 103	214 214
Ct 2	161 167	150 150	100 104	262 268	119 119	84 84	222 222	196 198	97 103	216 216
Ct 3	161 167	150 152	100 100	262 268	119 119	86 96	222 222	196 198	97 103	214 214
Ct 4	161 167	150 152	100 100	268 268	119 119	92 92	222 222	196 198	103 103	214 214
Ct 5	167 167	150 150	100 100	268 268	119 119	90 92	? ?	198 198	? ?	214 220
Ct 6	167 167	150 152	100 100	262 268	119 119	82 82	222 222	200 200	103 103	216 216
Ct 7	161 163	152 152	94 100	260 268	119 121	86 96	222 222	198 198	89 103	214 218
Sl 1	161 161	150 150	100 100	268 268	119 119	86 86	222 222	198 198	103 103	214 214
Sl 2	153 161	152 152	100 100	260 268	119 121	86 96	222 222	198 198	105 107	218 224
Sl 3	153 163	152 152	94 100	268 268	121 121	92 96	222 222	198 198	97 105	216 218

Vzorek	GA1	GA3	GA5	GA6	TG/GA1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8
SI 4	161 161	152 152	94 102	268 268	119 121	88 92	222 222	198 200	89 105	218 232
SI 5	161 163	152 152	94 100	268 268	119 121	92 92	222 222	198 198	97 103	214 232
SI 6	161 163	152 152	94 102	268 268	119 121	92 96	222 222	198 200	103 105	214 218
SI 7	161 163	152 152	94 94	268 268	119 119	88 92	222 222	198 198	97 103	214 232
SI 8	163 163	152 152	94 94	260 268	119 119	92 92	222 222	198 198	103 103	214 214
SI 9	151 161	152 152	70 70	268 268	119 119	86 86	222 222	198 198	89 89	214 214
SI 10	163 167	152 152	94 100	260 268	119 121	92 92	222 222	198 200	103 103	214 214
SI 11	161 161	154 154	94 94	268 268	119 121	92 92	222 222	198 198	89 95	214 232
MI 1	161 161	152 152	100 100	260 260	119 121	86 86	222 222	198 198	89 89	214 214
MI 2	161 161	152 152	100 100	260 268	119 121	86 86	222 222	198 198	89 99	214 228
MI 3	161 163	152 168	70 70	260 268	129 129	86 86	222 222	198 200	83 89	214 216
MI 4	161 161	152 152	70 70	268 268	119 121	92 92	222 222	198 198	83 103	214 214
MI 5	161 161	152 154	94 100	268 268	119 119	86 86	222 222	198 198	89 97	234 236
MI 6	161 161	152 152	70 100	260 268	121 121	96 96	202 222	198 198	77 89	218 218
MI 7	161 163	152 152	94 100	260 268	119 121	92 96	222 222	198 200	103 103	214 214
MI 8	163 167	152 152	70 94	260 268	??	86 92	??	198 198	??	??
MI 9	161 163	152 152	94 100	260 268	119 121	92 96	222 222	198 200	103 103	214 214
Lu 1	153 161	152 152	94 100	260 268	119 119	92 96	222 222	194 198	97 103	214 222
Lu 2	161 161	168 168	70 94	268 268	119 119	92 96	216 216	196 196	89 103	214 214
Lu 3	161 161	152 154	94 94	268 268	121 121	96 96	222 222	198 198	89 89	206 206
Lu 4	161 161	152 154	94 94	268 268	121 121	96 96	222 222	198 198	89 89	206 206
Lu 5	161 163	154 154	86 102	268 268	115 119	102 102	216 222	198 198	103 103	214 214
Zi 1	155 161	152 152	86 94	260 268	119 119	92 92	222 222	196 200	87 97	200 214
Zi 2	151 161	152 152	100 100	262 268	119 121	92 92	222 222	198 198	103 105	214 216
Zi 3	161 163	152 154	100 100	268 268	119 119	92 92	222 224	194 196	89 95	214 214
Zb 1	155 161	152 152	100 100	268 268	119 119	92 100	202 222	198 200	103 105	204 214
Zb 2	161 163	152 152	90 100	260 268	121 121	92 92	224 224	198 202	95 103	206 216
Zb 3	163 163	152 154	90 90	268 268	119 121	92 92	222 222	178 198	103 105	214 216
Zb 4	161 161	152 154	92 100	260 268	121 121	92 92	222 224	194 194	97 103	214 216
Zb 5	161 161	152 154	92 100	268 270	121 121	92 92	222 224	194 200	89 97	210 214
Zb 6	161 161	152 152	90 100	260 268	121 121	92 92	222 222	194 200	89 103	214 214
Ze 1	151 173	152 154	94 100	250 252	119 121	92 92	222 222	198 198	97 103	214 216
Ze 2	151 173	152 154	94 100	262 264	119 121	92 92	222 222	198 198	97 103	214 216
Lb 1	151 151	152 152	94 100	268 268	121 121	92 92	220 222	192 194	97 97	214 218
Lb 2	155 161	152 152	94 100	268 268	119 121	92 92	220 222	194 196	97 103	198 216
Lb 3	165 165	152 152	100 100	268 268	121 121	92 92	220 222	192 194	97 97	198 198
Lb 4	151 153	152 152	70 94	268 268	121 135	92 92	220 222	196 196	97 97	198 214
Lb 5	151 161	152 152	100 100	268 268	121 121	92 92	220 222	194 196	97 97	198 198
Li 1	161 161	152 152	94 94	264 270	121 121	92 92	226 234	194 194	97 97	204 204
Li 2	161 161	152 152	94 100	270 270	121 121	92 92	224 224	196 196	97 97	218 218
Li 3	161 161	152 152	94 100	270 270	121 121	92 92	226 234	194 196	97 97	198 198
Li 4	151 165	152 152	100 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 97	198 198
Li 5	151 165	148 150	100 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	99 99	198 198
Li 6	161 163	152 152	100 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 105	218 218
Li 7	161 161	152 152	94 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 105	198 198
Li 8	151 161	152 152	94 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 105	198 198
Li 9	151 161	152 152	94 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 105	198 198
Li 10	161 161	152 152	94 94	262 270	121 121	92 92	226 234	196 200	97 105	204 204
Li 11	153 165	150 152	94 100	262 270	121 123	92 92	226 232	196 196	99 99	204 218
Li 12	161 161	152 152	94 94	262 270	121 121	92 92	226 234	194 200	97 97	204 218
Li 13	161 161	152 152	94 94	262 270	121 121	92 92	226 234	196 200	97 97	204 204
Li 14	161 161	152 152	94 94	262 270	121 121	92 92	226 234	194 200	97 97	204 204
Li 15	153 165	150 152	94 100	262 270	121 123	92 92	226 232	196 196	97 97	204 204
Li 16	161 161	152 152	94 94	262 270	121 121	92 92	226 234	196 196	83 97	204 204
Li 17	161 161	152 152	94 94	262 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 97	204 204
Li 18	161 161	152 152	94 94	262 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 97	204 204
Li 19	161 161	152 152	94 94	262 270	121 121	92 92	226 234	196 196	83 97	204 218
Li 20	151 155	152 152	94 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 97	198 198
Li 21	161 161	152 152	94 94	262 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 97	204 204
Li 22	151 165	152 152	100 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 97	198 198
Li 23	151 165	152 152	100 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	97 97	198 198
Li 24	151 165	152 152	100 100	270 270	121 121	92 92	226 234	196 196	99 99	198 198
Li 25	161 161	152 152	100 100	270 270	121 121	92 108	224 226	196 196	99 99	204 204
Ko 1	161 161	152 152	86 94	260 268	119 121	92 92	222 222	194 194	93 93	220 220
Ko 2	161 163	152 152	86 86	260 268	119 119	92 92	222 222	194 194	87 101	214 214
Ko 3	155 155	152 154	94 100	260 268	119 121	92 92	222 222	194 194	103 103	222 222
Ko 4	153 161	152 154	94 100	260 260	119 119	90 92	222 224	196 196	97 97	216 216
Ko 5	161 163	152 152	94 94	260 268	119 121	92 92	222 222	192 194	97 97	214 222
Ko 6	161 161	152 156	100 100	260 260	119 121	92 92	222 222	194 194	97 97	214 214
Ko 7	161 161	152 156	100 100	260 260	119 121	92 92	222 222	194 194	97 97	214 214
Ko 8	153 161	152 152	100 100	268 268	119 121	92 96	222 222	194 194	97 97	214 214
Ko 9	161 161	152 152	92 94	262 268	119 119	92 92	222 222	194 196	97 97	214 214
Ko 10	161 161	152 152	100 100	262 262	119 119	92 92	222 222	194 194	97 97	214 222
Ks 1	153 153	152 152	86 86	260 260	119 119	92 92	222 224	194 194	97 97	222 222
Ks 2	153 163	152 152	86 86	260 260	119 119	92 92	222 222	194 198	97 97	220 222
Ks 3	153 153	152 152	94 94	260 260	119 119	92 92	222 224	194 194	91 97	220 220
Ks 4	153 161	156 156	70 70	260 260	119 119	92 96	222 222	194 194	91 91	214 214
Ks 5	161 161	152 152	76 100	260 260	119 119	92 92	222 222	194 194	97 101	214 222
Ks 6	155 163	154 154	100 100	260 268	119 119	92 92	222 222	178 200	89 89	220 220
Ks 7	161 161	152 154	70 70	260 268	119 119	92 92	222 222	194 194	89 89	214 214
Ks 8	155 155	152 156	100 100	260 268	119 119	92 96	222 222	194 194	89 103	214 214
Ks 9	153 153	152 152	86 100	260 268	119 119	92 92	222 222	194 194	97 103	222 222
Ks 10	161 167	156 156	100 100	260 268	119 119	92 92	222 222	198 198	89 97	214 222

Vzorek	GA1	GA3	GA5	GA6	TG/GA1	GA2	CA1	GA4	GA7	GA8
Kc 1	161 161	152 156	100 100	260 268	119 119	92 92	222 222	194 194	87 105	214 214
Kc 2	155 163	152 168	70 94	260 268	119 119	92 96	222 222	196 198	103 105	202 214
Kc 3	153 155	152 168	70 70	268 268	119 121	92 92	222 222	194 200	95 97	214 214
Kc 4	153 153	152 152	94 94	260 260	119 119	96 96	222 222	196 196	105 105	216 216
Kc 5	153 161	152 172	94 100	260 260	119 121	90 92	222 222	194 198	? ?	220 222
Kc 6	153 155	152 156	86 94	268 268	119 119	92 92	222 222	196 198	103 105	216 216
SP 1	161 161	154 154	100 100	268 268	119 119	98 98	222 222	196 196	103 103	210 210
SP 2	161 163	154 154	100 100	268 268	119 119	98 98	222 222	196 196	103 103	210 210
Nc 1	159 161	168 178	86 86	260 268	115 121	92 92	222 222	198 198	103 103	216 218
Nc 2	161 169	156 168	86 94	260 260	115 115	92 92	222 222	198 200	103 103	218 224
Nc 3	159 161	156 156	94 96	260 268	115 115	92 96	222 222	198 198	103 103	196 214
Nc 4	169 169	156 156	94 94	268 268	115 115	92 96	222 222	200 200	103 103	214 214
Nc 5	161 161	156 178	86 86	260 260	115 121	? ?	222 222	194 198	103 103	218 224
RZ 1	165 165	158 158	100 100	260 268	115 119	88 88	224 224	194 194	87 91	196 218
RZ 2	165 165	158 158	100 100	268 268	115 119	88 92	224 224	194 198	91 91	196 196
RZ 3	165 165	158 158	100 100	260 268	115 115	88 88	224 224	194 198	87 91	196 218
Rc 1	159 163	152 152	86 86	260 262	115 115	94 94	216 222	178 198	91 103	218 220
Rc 2	159 161	152 152	94 94	260 268	115 119	92 94	216 222	198 198	91 103	220 224
TL 1	161 165	160 160	86 86	268 268	137 137	92 96	216 224	178 198	103 103	218 218
TL 2	157 163	160 160	94 94	260 268	119 119	96 96	216 222	198 200	91 103	198 214
TL 3	161 161	178 178	94 94	260 260	115 121	92 92	222 222	196 200	103 103	196 214
Kl 1	159 177	150 152	94 94	268 268	115 119	88 98	216 222	194 198	103 107	218 222
Kl 2	165 165	152 152	86 94	260 260	119 121	90 94	224 224	194 198	91 103	214 214
Kl 3	159 165	142 154	86 86	260 260	115 121	92 92	216 222	194 194	103 103	210 224
Kl 4	159 165	152 154	86 92	260 260	115 115	90 92	222 228	194 194	103 103	210 218
Kl 5	165 165	152 152	94 94	260 268	115 115	90 90	222 222	194 194	99 105	216 226
Kl 6	161 165	168 168	94 94	260 260	115 119	94 94	222 222	194 198	103 103	196 204
La 1	131 133	148 148	82 82	262 262	123 123	82 82	? ?	? ?	105 105	206 206
La 2	? ?	174 176	82 82	260 260	113 113	82 82	? ?	176 176	? ?	? ?
La 3	137 137	182 182	70 86	260 260	119 119	88 88	232 232	192 192	75 75	198 198
La 4	137 151	148 150	68 68	262 262	119 119	88 96	220 220	? ?	? ?	? ?
La 5	127 127	158 158	86 86	260 260	119 119	78 96	200 202	176 176	77 77	194 196
Bs 1	163 165	150 150	94 94	262 262	115 115	116 116	216 216	192 192	97 103	212 212
Bs 2	163 165	150 150	94 94	262 262	115 115	116 116	216 216	192 192	97 103	212 212
Bs 3	163 165	150 150	94 94	262 262	115 115	116 116	216 216	192 192	97 103	212 212
Bs 4	163 165	148 150	94 94	262 262	115 115	114 116	216 216	192 192	97 103	212 212
Bs 5	139 139	150 150	86 86	262 262	115 115	116 116	216 216	194 194	97 97	212 212
Bs 6	139 139	150 150	86 86	262 262	115 115	90 116	230 230	192 194	97 107	196 212
Bs 7	139 139	150 150	86 86	266 266	115 115	114 116	216 216	194 194	97 97	212 212
Bs 8	139 139	150 150	86 86	262 262	115 115	114 116	216 216	194 194	97 97	210 212
Bs 9	139 139	148 150	86 86	260 260	115 115	114 116	216 216	194 194	77 77	210 212
Bs 10	141 141	150 150	86 86	260 260	115 115	116 116	216 216	172 194	77 77	212 212
Bs 11	139 139	150 150	86 86	260 260	115 115	116 116	216 216	180 194	77 77	212 212
Bs 12	165 167	150 150	94 94	260 260	115 115	114 116	216 216	194 194	97 103	210 212
Bs 13	163 165	150 150	96 96	260 260	121 127	108 108	216 220	200 200	97 97	216 216
Bs 14	163 165	150 150	94 94	260 260	115 115	116 116	216 216	178 192	97 103	212 212
Bs 15	139 139	150 152	86 94	268 268	115 119	90 120	220 230	172 194	97 107	216 216
Se 1	161 163	162 164	94 94	262 262	119 125	86 100	220 230	178 192	77 77	224 224
Se 2	161 163	164 164	94 94	260 260	115 125	86 96	220 232	194 194	77 77	222 224
Se 3	161 163	164 164	94 94	260 268	115 125	86 96	220 220	194 194	77 77	204 204
Se 4	161 161	164 164	94 94	262 268	115 125	86 96	220 220	194 194	77 77	204 204
Se 5	161 163	164 164	94 94	262 262	115 125	86 96	220 232	194 194	77 77	222 224
Se 6	161 163	158 158	70 70	262 262	121 121	114 114	232 232	194 194	101 101	220 220
Se 7	159 161	142 142	94 94	262 268	125 125	86 96	220 232	194 194	77 77	204 204
Se 8	159 161	142 164	94 94	262 268	125 125	86 96	220 230	194 194	77 77	204 204
Se 9	159 161	164 164	94 94	262 262	115 125	86 96	230 230	194 194	77 77	204 204
Se 10	159 161	162 164	94 94	262 262	115 123	86 96	232 232	194 194	77 77	222 224
Au 1	139 163	148 154	92 94	262 262	115 121	118 118	220 220	172 172	77 79	202 222
Au 2	137 161	148 160	68 68	262 262	115 119	94 116	200 200	180 192	79 93	196 222
Au 3	153 161	146 160	74 74	262 262	121 121	92 116	200 200	172 180	79 79	222 222
Au 4	159 161	148 160	66 68	262 262	115 121	92 114	200 200	178 184	77 77	196 220
Au 5	137 137	164 166	86 86	262 262	121 125	90 114	232 232	180 192	79 79	220 220
Au 6	139 151	146 160	94 94	260 260	123 125	90 90	232 232	178 178	79 79	196 220
Au 7	159 161	168 170	66 68	260 260	121 123	90 94	200 200	174 180	79 79	196 218
Au 8	129 139	148 164	68 68	264 264	113 115	92 92	200 200	170 192	79 79	206 206
Au 9	129 161	148 148	68 68	262 266	119 119	92 92	200 200	170 192	77 77	218 220