

Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity
Karlovy v Praze



Diplomová práce

Morfologická a fytoocenologická diferenciace zástupců rodu *Empetrum*

Lenka Hocková

Školitel: RNDr. Jan Suda PhD.

Praha 2007

Diplomová práce **Lenky Hockové** byla obhájena na katedře botaniky PřF UK v Praze dne 20.9.2007 a ohodnocena klasifikačním stupněm **v ý b o r n ě**.



Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

V Praze dne: *3.9.2007*Podpis: *Hochová Lenka*

Tímto bych ráda poděkovala Janu Sudovi za to, že vymyslel zajímavé téma a měl vždy po ruce věcné připomínky či rady.

Další dík patří Jaroslavovi Vojtovi a Lucii Drhovské za pomoc při vyhodnocování fytoecnologických dat.

Cytometru Partec Pa II a jeho ošetřovateli Pavlu Trávníčkovi děkuji za trpělivost.

Děkuji za rady a zkušenosti všem spolužákům a dalším botanikům.

Ráda bych také poděkovala svému manželovi, který kromě svého náročného povolání zvládnul vykonávat ještě mnohá další. Byl mi šerpou, převozníkem, psychologem, tajemníkem,...

Dalším členům mé rodiny patří taktéž nemalý dík. Pochopením, podporou a pomocí nikterak nešetřili. A to vše z lásky a nezištně ☺.

Děkuji!!!



Obsah

<u>1.</u>	<u>Úvod.....</u>	<u>2</u>
<u>2.</u>	<u>Taxonomie rodu <i>Empetrum</i></u>	<u>4</u>
<u>3.</u>	<u>Charakteristika rodu <i>Empetrum</i></u>	<u>5</u>
3.1	Evropské druhy rodu <i>Empetrum</i>	7
3.2	Výskyty taxonů <i>E. nigrum</i> a <i>E. hermaphroditum</i> v Evropě	8
3.3	Charakteristiky <i>Empetrum hermaphroditum</i> a <i>Empetrum nigrum</i>	10
3.4	Výskyt zástupců rodu <i>Empetrum</i> v České republice podle předchozích studií .	14
3.5	Triploidní rostliny	17
<u>4.</u>	<u>Materiál</u>	<u>18</u>
<u>5.</u>	<u>Cytologická variabilita rodu <i>Empetrum</i>.....</u>	<u>22</u>
5.1	Úvod.....	22
5.2	Princip.....	22
5.2.1	Výhody a nevýhody FCM:.....	23
5.2.2	Příprava vzorku.....	24
5.3	Aplikace metody průtokové cytometrie během studia rodu <i>Empetrum</i>	24
5.4	Výsledky	25
5.5	Shrnutí výsledků	31
<u>6.</u>	<u>Morfometrická analýza</u>	<u>33</u>
6.1	Měřené znaky.....	33
6.2	Statistické zpracování dat	36
6.2.1	Základní statistiky	38
6.2.2	Korelace proměnných	38
6.2.3	Analýza hlavních komponent (PCA).....	38
6.2.4	Shlukovací analýza	39
6.2.5	Diskriminační analýza	40
6.3	Výsledky	42
6.3.1	Analýza variability na základě charakteristik listů	42
6.3.2	Analýzy variability na základě charakteristik plodů.....	49
6.3.3	Analýzy variability na základě charakteristik listů a plodů.....	55
6.3.4	Analýzy jednotlivých cytotypů s využitím listových charakteristik a květních charakteristik samičího pohlaví (♀).....	58
6.3.5	Analýzy jednotlivých cytotypů s využitím listových charakteristik a květních charakteristik samčího pohlaví (♂).....	64
6.3.6	Analýzy jednotlivých cytotypů s využitím listových charakteristik a květních obalů.....	71
<u>7.</u>	<u>Fytcenologické snímkování</u>	<u>77</u>
7.1	Statistické zpracování dat	77
7.2	Výsledky	78
7.2.1	Mikrosnímky z krkonošských lokalit (30x30 cm).....	78
<u>8.</u>	<u>Diskuze</u>	<u>81</u>
<u>9.</u>	<u>Závěr</u>	<u>90</u>
<u>10.</u>	<u>Seznam použité literatury</u>	<u>91</u>
<u>11.</u>	<u>Přílohy.....</u>	<u>95</u>
11.1	Seznam obrázků.....	95
11.2	Seznam tabulek	96
11.3	Základní statistiky morfometrických analýz.....	97
11.4	Seznam zkratk zkoumaných druhů	99
11.5	Abstrakt.....	99
11.6	Klíč k určení zástupců rodu <i>Empetrum</i>	101

1. Úvod

Rod *Empetrum* není druhově příliš bohatý. Areál rodu je bipolární s rozšířením na severní polokouli od mírného pásu po subarktický pás a s omezenějším areálem na jižní polokouli (Humphries and Parenti 1986). V současné době je celosvětově uznávaná na druhové úrovni pouze pětice taxonů (Andenberg 1994). Nicméně blízká příbuznost a vysoká míra proměnlivosti ve fenotypových projevech činí neustále tuto skupinu taxonomicky nevyjasněnou a zajímavou.

Na území Evropy rostou z této pětice pouze dva taxony. Diploidní *Empetrum nigrum* a tetraploidní *Empetrum hermaphroditum* a triploidní cytotyp zřejmě hybridního původu (Suda 2002).

Rod *Empetrum* má tři hladiny ploidie a to diploidní, triploidní a tetraploidní. Triploidní cytotyp byl objeven prvně teprve v roce 2000 v národním parku Jotunsheimen v Norsku a záhy byl tento cytotyp objeven i v České republice v Krkonoších (Suda 2002, 2004).

Velmi unikátním znakem u rodu *Empetrum* je vazba pohlavnosti květů s ploidií. Diploidní *E. nigrum* má jednopohlavné květy a je dvoudomá a tetraploidní *E. hermaphroditum* má květy oboupohlavné. Existují ovšem i nezanedbatelně často výjimky, které samozřejmě znesnadňují jejich determinaci.

Jednotlivé taxony jsou navíc velice proměnlivé a často se fenotypovými charakteristikami vzájemně prolínají. U sterilních lodyh je pak téměř nemožné určit taxonomickou příslušnost, přestože existují údaje o stanovištních preferencích růstu, podle nichž se oba taxony vzájemně vylučují. Nedávné odhalení lokalit, kde rostou oba taxony pospolu nebo dokonce i s triploidním cytotypem, ukazuje na nedokonalost ekologické diferenciaci a problematická zůstává i spolehlivost znaků jako je např. pohlavnost květů, či další vegetativní i generativní charakteristiky (velikost pylové tetrády, listové charakteristiky,...).

Zdá se tedy, že pokud není jasně stanovená hladina ploidie, není determinace téměř možná.

Cílem práce bylo přispět k řešení fenotypové variability na území střední Evropy a ekologických preferencí ve studované skupině.

Okruhy otázek řešené v diplomové práci:

Jaké je rozšíření jednotlivých cytotypů (diploidů, tetraploidů a triploidů) na různých prostorových škálách v České republice?

Lze jednotlivé cytotypy odlišit bez znalosti počtu chromozómů?

Jaké jsou stanovištní preference jednotlivých cytotypů?

Má distribuce cytotypů ve smíšených populacích určité zákonitosti?

Jaká je vitalita pylu u jednotlivých cytotypů (zejména u triploidů)?

Je druhový rank pro jednotlivé cytotypy oprávněný?

2. Taxonomie rodu *Empetrum*

Nomenklatura byla v této práci sjednocena podle literatury: Klíč ke květeně České republiky (Kubát 2002).

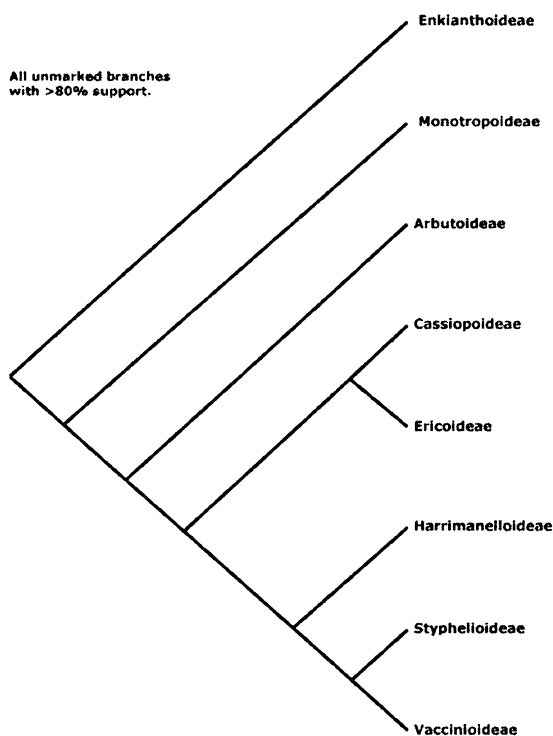
Zařazení rodu podle molekulárních studií (Kron & Chase 1993, Stevens 2006):

Řád: *Ericales*

Čeleď: *Ericaceae*

Podčeleď: *Ericoideae*

Obr. 2.1: Recentní dělení čeledi *Ericaceae* (Stevens 2006)



Čeleď *Ericaceae* s.l. má 125 rodů, v nichž je 4000 druhů. Její zástupci jsou mykorrhizní keřky (keře) rostoucí na kyselých půdách, vyskytují se kosmopolitně mimo tropické nížiny.

Neblížejší příbuzní rodu *Empetrum* jsou rody *Ceratiola* a *Corema*. Tyto tři druhy byly dříve zařazeny do samostatné čeledi *Empetraceae* Lindl. Takovéto vyčlenění bylo podporováno jejich větrosprašností, nenápadnými květy s redukovanými obaly. Dále se tyto rody odlišovaly od ostatních krátkou čnělkou,

bliznou, která je na vrcholu rozšířená a dělená v několik laloků a nakonec plody, kterými jsou peckovičky. Nicméně důkladnější kladistické a fylogenetické studie v řádu *Ericales* ukázaly, že čeleď *Ericaceae* může být monofyletická jen pokud bude obsahovat rody z bývalé čeledi *Empetraceae* a také čeledi *Epacridaceae* (Anderberg 1992).

3. Charakteristika rodu *Empetrum*

Empetrum Linnaeus Sp. Pl. 1022, 1753

Obr. 3.1: Vyobrazení zástupců rodu *Empetrum*, habitus, stavba květů, plodu, typy květů



Všichni zástupci rodu *Empetrum* jsou vždyzelené, zakrslé, někdy dvoudomé keříčky podobné vřesovcům. Hlavní kořen mají větvený, a na poléhavých větvích někdy vytvářejí tenké, větvené adventivní kořeny. Lodyhy jsou hnědé až červenohnědé, poléhavé, plazivé, vystoupavé, hustě větvené. *Empetrum* má listy téměř přisedlé v nepravidelných přeslenech nebo střídavě uspořádané. Listy jsou kožovité, čárkovitě podlouhlé až úzce eliptické, na špičce zaoblené. Mladé listy a lodyhy jsou žláznaté, později více méně lysé. Okraje listů jsou zahnuté a sblížené tak, že na spodní straně listů můžeme najít jen úzkou štěrbinu. Tato

štěrbina vede do vnitřního uzavřeného prostoru, který představuje abaxiální stranu listu.

Květy má rod *Empetrum* nenápadné, jsou uspořádané v redukovaných 1 (-3) květných úžlabních hrozních a mohou být oboupohlavné nebo jednopohlavné (Čvančara 1990).

Na bázi květu jsou šupinovitě, střechovitě se kryjící, vejčité, hnědé listeny s bělavým slabě trásnitým lemem, v počtu (3-)4-5. Kališní lístky mají zástupci v obrysu vejčité až okrouhlé, často na okraji jemně brvitě. Korunní lístky mají eliptické až podlouhle obvejčité. Prašníky vyrůstají na dlouhých nitkách a vyčnívají z koruny. Bliznu mají rozčleněnou v 6-9 laloků. Plodem je modročerná či červená lesklá kulovitá, nasládlá peckovička s 6-9(-11) semeny (Čvančara 1990, Kubát 2002).

Dříve byl jako důležitější způsob rozmnožování u rodu *Empetrum* uznáván vegetativní způsob rozmnožování (Bell & Tallis 1958), ale pokud se zamyslíme nad vznikem izolovaných lokalit, ty musely vzniknout ze semene pohlavním rozmnožováním. Celý klon tak může vzniknout jen z jednoho semene (Bell & Tallis 1958). Pohlavnímu

rozmnožování byl přikládán minoritní význam. Nicméně díky genetickým studiím v severním Švédsku nebyla výše uvedená teorie podpořena. Genetická variabilita mezi zkoumanými populacemi byla 18,74%, zatímco v rámci populací bylo 81,26% zkoumaných vzorků různorodých (Parisy 2000).

Studiem populací různého stáří od posledních ohňů proběhlých na zkoumaných švédských lokalitách se zjistilo, že u nejmladších populací představoval klonální prvek jen 14% oproti nejstarší populaci, kde se klony vyskytovaly ve více než 30%. Lze tedy usuzovat, že pohlavní rozmnožování pomocí semen má mnohem větší význam, než se dříve předpokládalo a že vegetativní rozmnožování je naopak velmi pomalé (Szmidt 2002).

U rodu *Empetrum* je za barvu plodu zodpovědno několik antokyanů. Červené peckovičky obsahují kyanidin a peonidin. Černé peckovičky mají navíc petunidin, malvidin a delphinidin (Anderberg 1994).

Některé údaje uvádí, že *Empetrum* je slabě jedovaté díky obsahu andrometoxinu (Aichele 1996), nicméně v severských zemích jsou plody hojně využívanou pochutinou a lodyhy se dříve využívaly například k plnění matrací do iglú (Suda 2003).

Empetrum je anemogamní a endozoochorní. Pyl je roznášen větrem, nicméně nemá žádné adaptace pro dálkový transport (Suda 2003) a vzhledem k tomu, že jsou zrna po velmi dlouhou dobu spojena v tetrády, tudíž jde o těžší objekt, nedostane se pyl příliš daleko.

Plody roznáší jak ptáci, tak savci. Mohlo by se zdát, že spouštěčem klíčení u tvrdých semen šich je právě průchod trávicím traktem živočichů, ale není tomu tak. Klíčení semen je v první řadě ovlivněno kolísáním teplot (Bell & Tallis 1958).

Počet druhů rodu *Empetrum* je nejednotný, v závislosti na taxonomickém pojetí jednotlivých botaniků bylo rozlišováno od 1 po 18 druhů. Nejčastějšími znaky, na základě nichž byly jednotlivé taxony popsány, jsou pohlavnost květů, barva plodů, listové charakteristiky, sekundární metabolity, přítomnost či nepřítomnost žláznatých nebo jednoduchých chlupů na lodyhách, případně jejich barva. Často i zeměpisná poloha a izolovanost lokality vedla k ustanovení nového taxonu (Anderberg 2004).

Mezi taxony rodu *Empetrum* panuje blízká příbuznost a většina znaků vykazuje značnou variabilitu. Díky tomu byla například v ruské literatuře publikována desítka taxonů (Vasil'ev 1961), které nelze bez přezkoumání důkladnějšími biosystematickými studii s ověřením ploidního stupně považovat za druhy.

V současné době je nejčastěji uznáváno 5 druhů. Jsou jimi *Empetrum nigrum* a *Empetrum hermaphroditum* zasahující do Evropy. Tři zbývající *Empetrum rubrum* Vahl, *Empetrum atropurpureum* Fern. & Wieg. a *Empetrum eamesii* Fern. & Wieg. můžeme najít jen na americkém kontinentu (Anderberg 2004).

Areál rodu *Empetrum* je bipolární, disjunktivní (Deyl 1955) se širokým, cirkumpolárním rozšířením na severní polokouli (od mírného až po subarktický pás) a omezenějším areálem na jižní polokouli (Chile, Sierra del Fuego, Falklandy a Tristan da Cunha) (Humphries and Parenti 1986, Anderberg 1994). Centrem výskytu jsou boreální zóny Eurasie a Severní Ameriky. Na území Afriky a Austrálie se nevyskytuje.

3.1 Evropské druhy rodu *Empetrum*

Na území Evropy můžeme najít *Empetrum nigrum* a *Empetrum hermaphroditum*. Jejich taxonomické postavení je ovšem doposud hodně debatovaným tématem.

Někteří autoři považují *Empetrum hermaphroditum* za poddruh *Empetrum eamesii* Fernald & Wiegand → *Empetrum eamesii* subsp. *hermaphroditum* (Hagerup) D. Löve (Löve & Löve 1966).

Jiní botanikové považují oba taxony za poddruhy druhu *Empetrum nigrum* L., tedy *Empetrum nigrum* subsp. *nigrum* a *Empetrum nigrum* subsp. *hermaphroditum* (Hagerup) Böcher (Polunin 1959, Hultén 1968, Webb 1972).

Tyto taxony jsou však i mnohými botaniky akceptovány jako samostatné druhy *Empetrum nigrum* L. a *Empetrum hermaphroditum* Hagerup (Hagerup 1927, Klášterský 1960).

***Empetrum nigrum* L. - šicha černá**

Empetrum nigrum Linnaeus Sp. Pl. 1022, 1753

Syn.: *Empetrum procumbens* Gilib. (1792), *Empetrum nigrum* f. *loiseleuriforme* Borb. (1908) (Čvančara 1990, IPNI 2004).

Tento diploidní taxon má $2n=26$ chromozómů (Löve & Löve 1956, Hadač 1959, Löve & Löve 1961, Uhríková & Májovský 1980).

***Empetrum hermaphroditum* Hagerup - šicha oboupohlavná**

Empetrum hermaphroditum Hagerup Dansk Bot. Ark. 5/2: 16, 1927

Syn.: *Empetrum nigrum* f. *hermaphroditum* Lange (1880), *Empetrum nigrum* subsp. *hermaphroditum* (Hagerup) Böcher (1952), *Empetrum nigrum* var. *hermaphroditum* (Hagerup) T.J.Sørensen (1933), *Empetrum eamesii* Fern. et Wieg. subsp. *hermaphroditum* (Lange) O. Löve (1962) (Čvančara 1990, IPNI 2004).

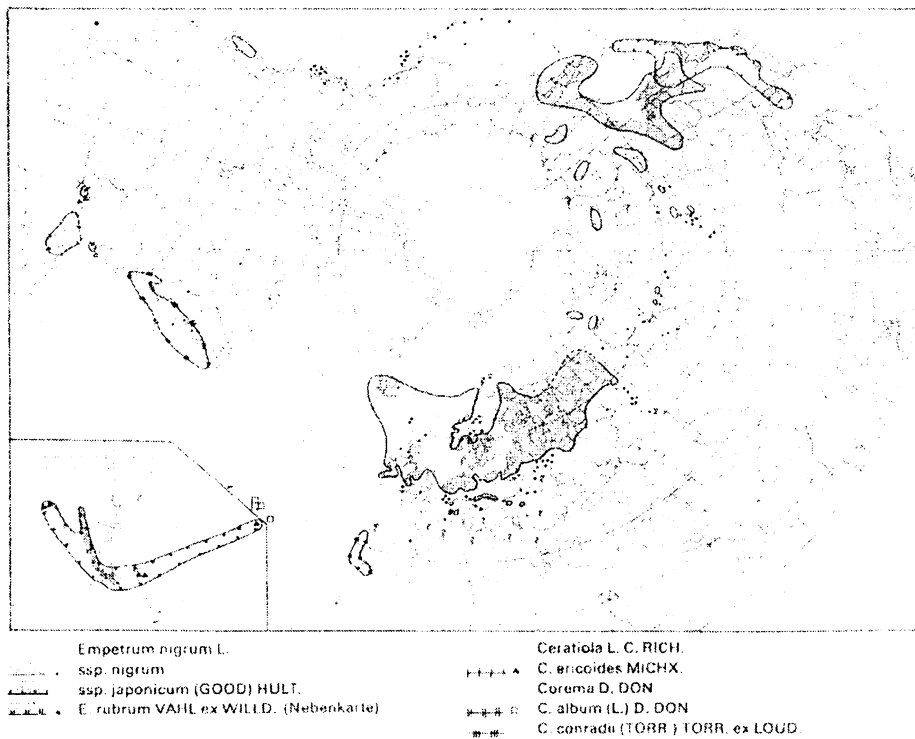
Tento taxon se vyznačuje tetraploidním počtem chromozómů ($2n=52$) (Hagerup 1927, Löve & Löve 1956, Uhríková & Pačlová 1986).

3.2 Výskyty taxonů *E. nigrum* a *E. hermaphroditum* v Evropě

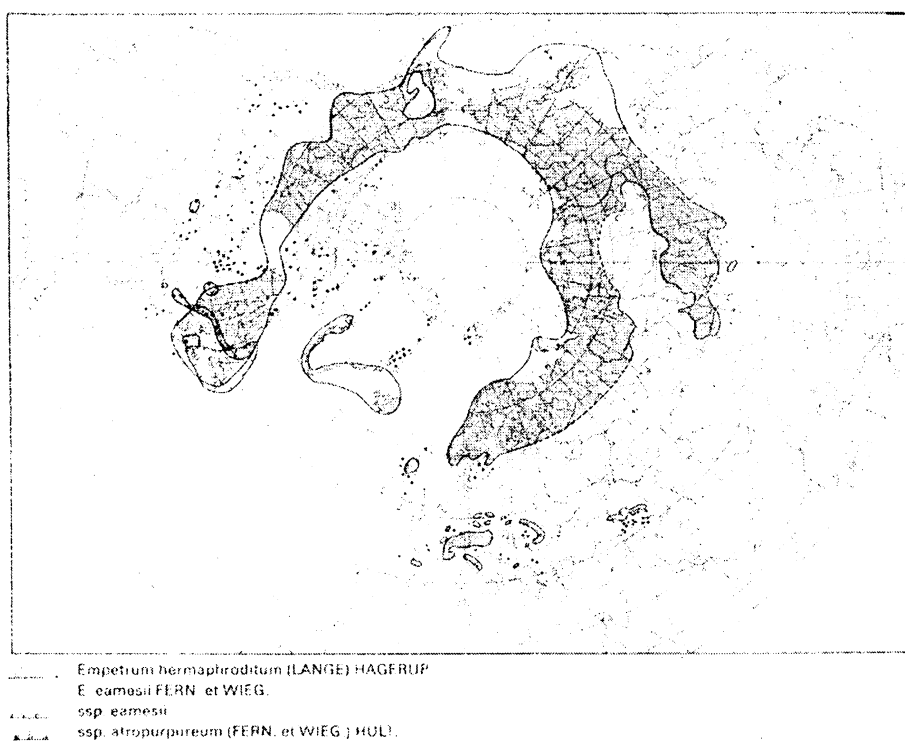
Oba taxony (*E. nigrum* i *E. hermaphroditum*) mají cirkumpolární rozšíření od mírného pásu po subarktický (Meusel et al. 1978).

Empetrum nigrum má centrum výskytu v boreálních zónách. V rámci Evropy může nalézat příhodná stanoviště na vrchovištích a přechodových rašeliništích, ale i na přímořských písečných dunách. Jihozápadní hranicí jejího výskytu jsou Kantenberské pohory a Pyreneje na Pyrenejském poloostrově. Méně častým výskytem pokračuje přes severní Apeniny, SV Alpy, Karpaty, Bulharské hory dále na východ. Souvislejší pás výskytu prochází přes střední Evropu, Britské ostrovy, Island, až do Skandinávie po 68. rovnoběžku. V severnějších zeměpisných šířkách roste v nižších nadmořských výškách dokonce ve výšce mořské hladiny, zatím co při jižním okraji výskytu může v horách vystupovat až do 2000 metrů nad mořem (Bell & Tallis 1958, Meusel et al. 1978, Boratyński & Vera de la Puente 1995). Mapa výskytu viz obr. 3.2.

Empetrum hermaphroditum má centrum rozšíření v boreálních a jižních arktických oblastech. Roste na skálách a subalpínských holích, v porostech kosodřeviny. Jižněji roste jen v Pyrenejích, poněkud hojnější než předchozí taxon je v Alpách a v Karpatech. Dále areál pokrývá téměř celou střední Evropu a roste až ve Skotsku, na Islandu a ve Skandinávii. Výskyt tohoto taxonu dosahuje 80. rovnoběžky (Bell & Tallis 1958, Meusel et al. 1978, Boratyński & Vera de la Puente 1995). Mapa výskytu viz. Obr. 3.3.



Obr. 3.2: Mapa výskytu *E. nigrum* (Meusel et al. 1978)



Obr. 3.3: Mapa výskytu *E. hermaphroditum* (Meusel et al. 1978)

3.3 Charakteristiky *Empetrum hermaphroditum* a *Empetrum nigrum*

	<i>Empetrum nigrum</i>	<i>Empetrum hermaphroditum</i>
Lodyhy	poléhavé, větve plazivé, až 1 m dlouhé, řidčeji větvené, kořenující	poléhavé nebo rozprostřené, kratší, většinou do 50 cm, hustě větvené, kompaktní, často tvořící polokulovité polštáře, nekořenující
Internodia	zřetelná	obvykle nezřetelná
Letorosty	letorosty nejčastěji červenohnědé, roztroušeně žláznaté	hustě olistěné, zelenavé, vzácně načervenalé a jemně žláznaté
Listy	podlouhlé, 4,5-6,0(-7,0) mm dlouhé a 1,0-1,2(-1,5) mm široké, většinou 3-5 x delší než široké , lesklé, nejčastěji rovnovážně odstávající	úzce eliptické až eliptické, 3-4(-5) mm dlouhé, 1,2-1,5(-2,0) mm široké, většinou 2-3 x delší než široké , lesklé, nejčastěji šikmo nebo nepravidelně odstávající
Štěrbina na rubu listu	úzká, 0,1 mm široká a málo zřetelná	0,1-0,2 mm široká, zřetelná
Květy	téměř vždy jednopohlavné (rostliny dvoudomé)	obvykle oboupohlavné, vzácně jednopohlavné (pak rostliny jednodomé)
Chromosomy	diploidní, 2n = 26	tetraploidní, 4n = 52
Čnělky	cca 1,6 mm	cca 1,9 mm
Kališní lístky	lžicovité, 1,0-1,5 mm dlouhé, 0,8-1,2(-1,5) široké	lžicovité, 1,3-1,6 mm dlouhé a 1,1-1,5 mm široké
Korunní lístky	eliptické až podlouhle obvejčité, zelenavě narůžovělé až červenavé, 1,5-2,0(-2,5) mm dlouhé, 0,8-1,2(-1,5) mm široké	eliptické až podlouhle obvejčité, zelenavě růžové až červené, vzácně i bílé, 1,5-2,2(-2,5) mm dlouhé a 1,0-1,5 mm široké
Tyčinky	nitky 4-5 mm dlouhé, v samičích květech jsou často 3 staminodia asi 1 mm dlouhá	nitky až 5 mm dlouhé, některé vytrvávající i v době plodu
Pylové tetrády	průměr 23-24 μm	průměr 33-44 μm
Peckovičky	5-8 mm v průměru, nejčastěji 8-9(-11) semeny, bez zbytku tyčinek , více-méně lesklé	7-8 mm v průměru, nejčastěji s 6-7(-8) semeny, se zbytky tyčinek , matné
Stanoviště	vrchoviště, vzácněji přechodová rašeliniště (v prostorech blatky), méně subalpínské hole, roste na kyselých, rašelinných, vlhkých až trvale zamokřených půdách	skály, subalpínské hole , porosty kosodřeviny, méně často i vrchoviště, ekologické optimum na skalnatých nebo balvanitých stanovištích, roste na kyselých nebo rašelinných, dostatečně vlhkých půdách, na vrchovištích v supramontánním stupni je většinou nahrazován <i>E. nigrum</i>
Svazy	<i>Oxycocco-Empetrion hermaphroditi</i> , <i>Sphagnion medii</i> (zvláště v asociaci <i>Pino rotundatae-Sphagnetum</i> Kästner et Flössner 1993 opravil Neuhausl 1969) a <i>Pinion mughi</i> .	<i>Oxycocco-Empetrion hermaphroditi</i> (zvláště v asociaci <i>Sphagno robusti-Empetretum hermaphroditi</i> Hadač et Váňa 1967 em. Neuhausl in Moravec et al. 1983 a <i>Empetro hermaphroditi-Sphagnetum fuscii</i> Du Rietz 1926). <i>E. hermaphroditum</i> můžeme najít též ve společenstvech svazu <i>Juncion trifidi</i> , zde v asociaci <i>Empetro hermaphroditi-Juncetum trifidi</i> Šmarda 1950, a <i>Pinion mughi</i>
Semenáčky	báze bez šupinovitých útvarů	šupinovité útvary na bázi

Tab. 3.1: Charakteristiky taxonů *E. nigrum* a *E. hermaphroditum*, (vytvořena podle Kazimierz 1975, Kubát 2002, Čvančara 1990). Tučně jsou vyznačeny znaky, kterých je v klíčích nejčastěji využíváno k determinaci.

U celého rodu *Empetrum* je problém s určováním díky blízké příbuznosti taxonů a značné fenotypové variabilitě v důsledku vlivu prostředí.

Druh *E. hermaphroditum* je proměnlivý v délce větví, způsobu olistění, v celkovém vzhledu a kompaktnosti rostlin i v barvě letorostů. Proměnlivá je také pohlavnost květů. Někteří jedinci v populaci mohou mít jednopohlavné květy, někdy jednopohlavné i oboupohlavné (polygamie). Oboupohlavné květy ovšem převažují (Čvančara 1990, Suda 2003).

Druh *Empetrum nigrum* je proměnlivý v délce větví, způsobu olistění, v celkovém vzhledu a kompaktnosti rostlin, v barvě letorostů, tak jako u *Empetrum hermaphroditum*. Někdy se vyskytuje i pohlavní dimorfismus, kdy samčí rostliny jsou hustší a kompaktnější a vzhledem se velmi podobají taxonu *Empetrum hermaphroditum* (Čvančara 1990, Suda 2003).

Příkladem proměnlivosti mohou být výsledky pozorování, kdy se zdálo, že v Krkonoších je *Empetrum nigrum* gracilnější s kratšími a svěžeji zelenými listy než *Empetrum hermaphroditum* (Suda 2004a). Ovšem na jiném území bychom podle těchto znaků *Empetrum* těžko rozlišovali.

Rozdíly mezi ploidiemi jsou nicméně i tak velmi nestabilní. Většina morfologických znaků může vlivem ekologických podmínek měnit svůj charakter. Dochází tak k překryvu charakteristik jednotlivých taxonů (Bell & Tallis 1958).

Například na sušších a exponovanějších místech bývají rostliny více keříčkovité, častěji větvené s krátkými internodiemi a vytvářejí nízké polštáře. A nezáleží na tom, jaké jsou ploidy. Na více podmáčených a závětrných stanovištích mají jedinci delší a méně větvené lodyhy a celkově působí rozvolněnějším dojmem. Dále může intenzita osvětlení ovlivnit barvu letorostů. Se zvyšováním osvětlení se intenzivněji vyvíjí červenofialový odstín (Suda 2003).

Velikost pylových zrn a hladina ploidy se na základě literárních údajů zdá být druhově-specifická. Velikost pylových tetrad, která je u tetraploidů větší, by se mohla použít k taxonomickému rozlišování (Warne & Chinnappa 1990).

Roku 1805 byla zaznamenána existence oboupohlavných květů u šich a tuto formu roku 1880 Lange pojmenoval *Empetrum nigrum* forma *hermaphroditum*, nom. nud. (Boratyński 1995, Suda 2002). Roku 1927 byl u oboupohlavných rostlin objeven

dvojnásobný počet chromozómů oproti počtu u dříve známých jednopohlavně kvetoucích rostlin *E. nigrum*. Tento jev vysoké korelace s pohlavností květů je naprosto unikátní a je považován za hlavní a dobrý determinační znak. Díky tomu byly rostliny s oboupohlavními květy povýšeny na druhovou úroveň - *Empetrum hermaphroditum* Hagerup (Hagerup 1927).

Pohlavnost květů je považována za značně spolehlivý morfologický znak k separaci taxonů. *Empetrum nigrum* je jednopohlavná a v květech má buď tyčinky nebo plodolisty zakrnělé a *Empetrum hermaphroditum* je oboupohlavná a má tyčinky i plodolisty funkční. Tyčinky nebo alespoň nitky zůstávají na květu po dlouhou dobu. Díky tomu můžeme určit druhy i s značným odstupem po odkvětu, kdy *Empetrum hermaphroditum* nese plody se zbytky tyčinek na bázi (Čvančara 1990, Suda 2002, 2003).

Nicméně existují i výjimky.

Byli nalezeni jedinci taxonu *Empetrum nigrum*, kteří nesli oboupohlavné květy, přestože byli diploidní nebo *Empetrum hermaphroditum* nesoucí pouze samičí květy či pouze samčí s abortovaným samičím pohlavím. Na rostlinách tedy můžeme najít pouze samičí květy, pouze samčí, pouze oboupohlavné, samičí spolu se samičími nebo dokonce samčí, samičí i oboupohlavné současně na jednom jedinci.

Je tedy sporné do jaké míry je pohlavnost květů spolehlivá a do jaké míry je korelována s hladinou ploidie (Anderberg 1994 nepovažuje korelaci za striktní).

Podobné závěry byly získány na základě studia rostlin ve střední Evropě. Pohlavnost květů nebo přítomnost či nepřítomnost nitek z tyčinek na plodu souhlasila v drtivé většině u sesbíraných vzorků s hladinou ploidie (v Krkonoších, na Šumavě, v Jizerských horách, v Jeseníkách). Nicméně na jedné lokalitě v Krkonoších se z 24 sesbíraných diploidních vzorků 4 lišily (16,7 %). Měly vždy nejméně jednu lodyhu, která nesla plody se zbytky tyčinek nebo celé tyčinky (Suda 2004a).

Preference stanovišť (viz. výše), kterou by se taxony *Empetrum nigrum* a *Empetrum hermaphroditum* měly lišit, může být nápomocná k jejich určování. Je to možné především v místech, kde jsou jednotlivé lokality izolované, kde nedochází k prolínání mocných rašelinišť se suššími kamenitými svahy či skalnatými vrcholy. Ve vyšších polohách Alp, Skandinávie a v našich Krkonoších byla prokázána existence lokalit se smíšeným výskytem *Empetrum nigrum* i *Empetrum hermaphroditum* (Suda 2002, 2003).

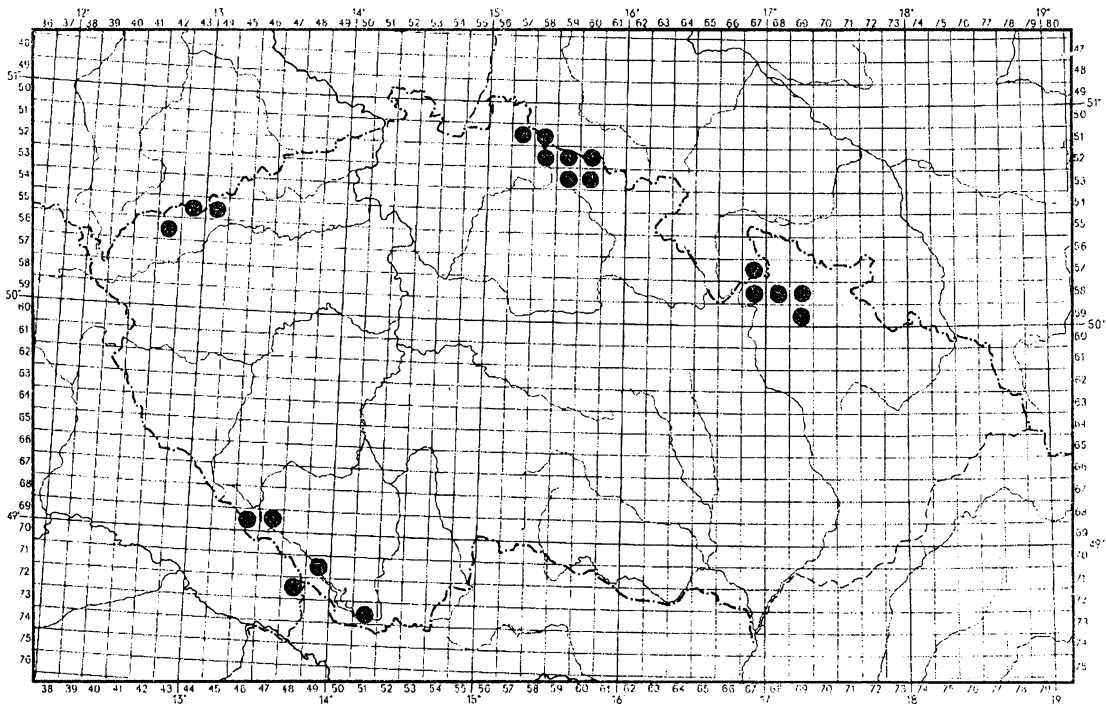
Krkonoše se svojí značnější mozaikovostí vlhčích a sušších rašeliništních mikrostanovišť daly zřejmě možnost vzniku lokalit se společným růstem všech cytotypů.

Díky tomu patří také krkonošské populace šich z hlediska determinace k nejobtížnějším v rámci celé republiky. Při určování je třeba vycházet z pozorování celé populace. Určit cytotyp sterilních lodyh není možné (Abazid & al. 2004).

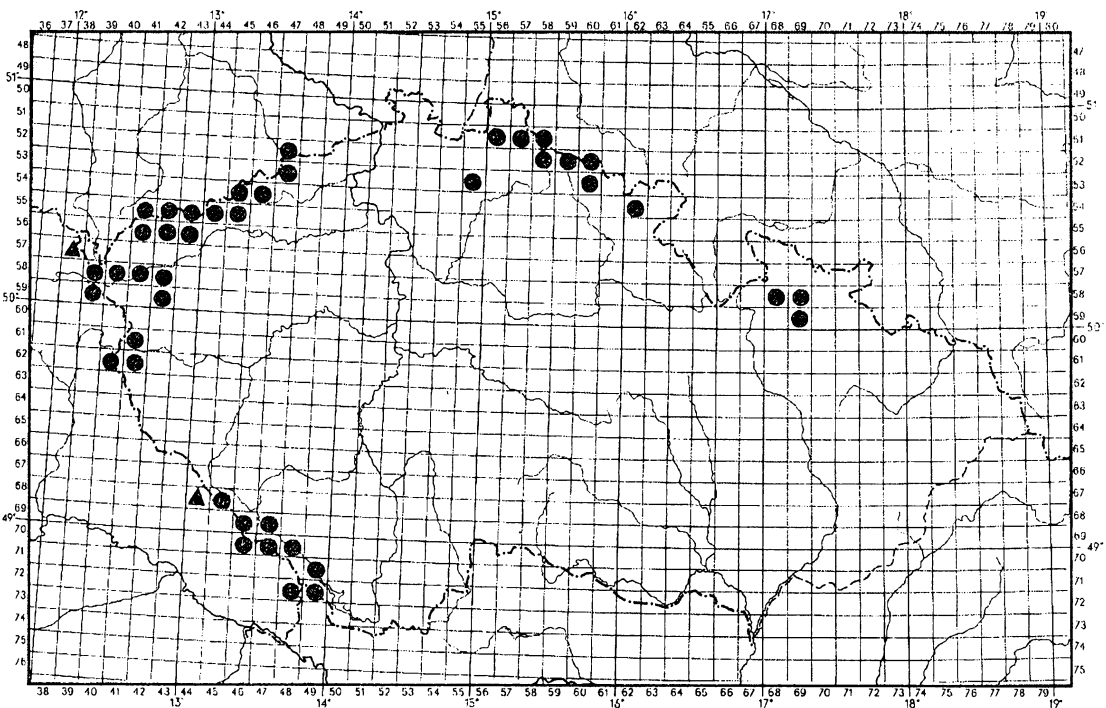
Nejspolehlivější je rozlišení taxonů pomocí stanovení počtu chromozómů nebo jen určením ploidie. Tento způsob je však v terénu nepoužitelný.

3.4 Výskyt zástupců rodu *Empetrum* v České republice podle předchozích studií

Obr. 3.4: Mapa výskytu druhů *Empetrum* v ČR (Slavík 1990)



448 *Empetrum hermaphroditum* (Lange) Hagerup



449 *Empetrum nigrum* L.

10 0 10 20 30 40 50 km

Empetrum nigrum najdeme roztroušeně v oreofytiku Českého masívu v montánním a supramontánním stupni, ojediněle v mezofytiku na rašeliništích v Českém lese (minimum: SPR Podkovák u Rozvadova, 630 m a maximum na Šumavě mezi Velkým Špičníkem a Blatným vrchem, 1320 m). Dva nedoložené údaje a jedna dokladová lokalita staršího data jsou ze Smrčín a z Chebské pánve, kde však dnes s největší pravděpodobností již nerostou. *E. nigrum* patří mezi ohrožené taxony naší květeny (Čvančara 1990).

V České republice můžeme najít *Empetrum hermaphroditum* roztroušeně až vzácně v supramontánním až subalpínském stupni oreofytika. Výškové minimum je v Jizerských horách na Pytláckých kamenech, 970 m a výškové maximum výskytu je v Krkonoších na lokalitě Bílá louka, ca 1400 m (Čvančara 1990).

Tento druh je považován za silně ohrožený pro ČR (Kubát 2002).

Z pozorování, která prováděl I. Klášterský na rašeliništích v okolí Horské Kvildy na Šumavě v letech 1951-1957, je potvrzen výskyt rostlin s jednopohlavnými i oboupohlavnými květy, z toho 9 rostlin z 18 hodnocených nesly stále oboupohlavné květy a zbylých 9 rostlin se po oněch 6 let nechovalo stabilně (Klašterský 1960). Klášterský pozorované rostliny hodnotil jako *E. hermaphroditum*. Pozorovaná oblast je v severnější části Šumavy, kde byly provedeny sběry z 9 lokalit (Suda 2004a). Studovaných vzorků bylo mnohokrát více než v 60. letech minulého století, ale přesto v této oblasti byly nalezeny jen diploidní rostliny a žádné tetraploidní rostliny.

Tetraploidi byli od roku 2000 sbíráni z Krkonoš, Šumavy, Jizerských hor a Jeseníků. V prvních třech pohořích jsou i lokality diploidních rostlin *Empetrum nigrum*. V Jeseníkách se vyskytovaly lokality jen tetraploidního taxonu *Empetrum hermaphroditum*, i když v dřívějších pracích je odtud uváděn taktéž diploidní *Empetrum nigrum*. Nicméně doposud se nepodařilo jeho výskyt spolehlivě potvrdit. Tetraploidi preferují horská skalnatá místa, ale mohou prosperovat i na rašeliništích, např. v Krkonoších a v Jeseníkách nebo rašelinných loukách na Šumavě (Suda 2004a).

Výskyt diploidních rostlin byl potvrzen v Krkonoších, na Šumavě, v Jizerských horách v Krušných horách, Labských pískovcích a Adršpašsko-teplických skalách (Suda 2004a).

Zajímavá zjištění přinesly sběry provedené mezi lety 2000-2002 (Suda 2004a). Jen 3 lokality z 11 lokalit v Krkonoších se vyznačovaly přítomností pouze jednoho taxonu. Pouze diploidi rostli SV od Petrovy boudy (Przeł. Dołek) na polské straně Krkonoš a jen tetraploidní cytotyp rostl na Mumlavské louce a na Černoorských rašeliništích. Na pěti

lokalitách byl prokázán společný růst diploidů a tetraploidů. Na jednom rašeliništi rostli diploidní jedinci s triploidními (Hraniční louka). Na Lubošské planině a na Čertově louce byly nalezeny všechny 3 cytotypy (Suda 2004a). Mapa karyologicky ověřených lokalit České republiky do roku 2002 je vyobrazena níže (viz Obr. 3.5).

Obr. 3.5: Mapa karyologicky ověřených lokalit (Suda 2004a)

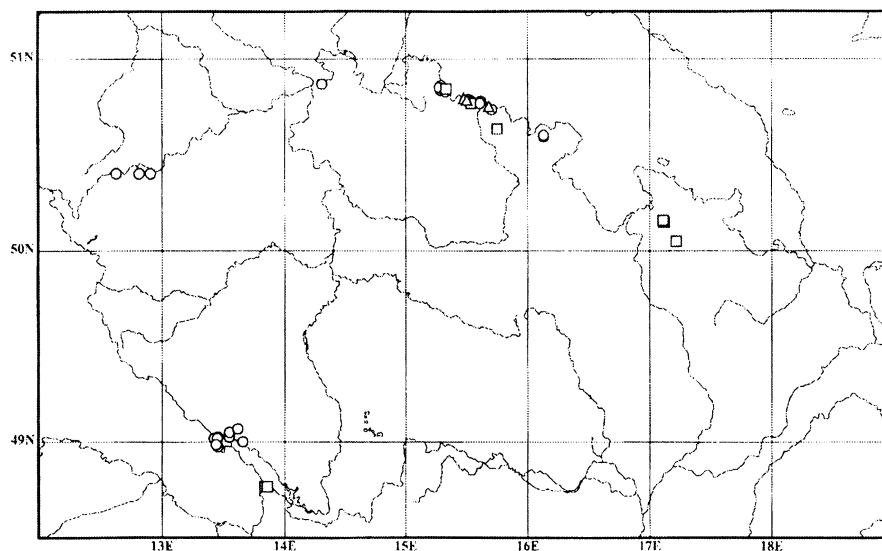


Figure 1. Distribution of *Empetrum* cytotypes in the area studied: circle – diploid (*E. nigrum* s.s.), triangle – triploid, square – tetraploid (*E. hermaphroditum*).

3.5 Triploidní rostliny

V řádu *Ericales* byly triploidní rostliny nalézány jen zřídka (např. *Vaccinium vitis-idaea* s $3x = 36$ v Finsku) (Ahokas 1971). Důvodem by mohl být triploidní blok nebo nižší životaschopnost. U rodu *Vaccinium* bylo provedeno mnoho experimentálních studií, které poukazují na to, že triploidní blok je silný, i když ne úplný. Při zpětném křížení tetraploida s diploidem vznikne jen několik málo tetraploidů či triploidů (Lyrene 2003).

Při sběru rostlin rodu *Empetrum* roku 2000 a 2001 v Norsku, Švedsku a Dánsku byly v národním parku Jotunsheimen v Norsku nalezeni první jedinci jiného než diploidního či tetraploidního cytotypu. Byl to první nález triploidního cytotypu pro skupinu šichovitých vůbec. Tito jedinci rostli na lokalitě, kde se vyskytovaly oba druhy. Byli sterilní a ani v kultivaci nevytvářeli květy (Suda 2002).

Je vyslovena teorie, že triploidní rostliny vznikly pravděpodobně hybridizací $2x$ a $4x$ cytotypů. Mateřskou rostlinou by mohl být druh *E. nigrum* a dárce pylu by mohl být spíše druh *E. hermaphroditum*. Tato teorie je podpořena existencí lokality, kde se společně vyskytovali diploidi a triploidi (Hraniční louka v Krkonoších). Tetraploidi na této lokalitě chyběli, ale zřejmě rostli na nějakém nedalekém rašeliništi. Pro diploidní rostliny jako mateřské svědčí existence diploidních a triploidních semen v peckovicích sesbíraných z jednoho jedince. Tato teorie je navíc podporována tím, že triploidní rostliny se vyskytovaly pouze v těch pohořích, kde rostli diploidi i tetraploidi (Suda 2004, Abazid & al. 2004).

Existují ovšem i další možnosti vzniku hybridů, které se zdají být méně pravděpodobné. K hybridizaci mohlo dojít i za obrácených okolností. Mateřskou rostlinou by byl tetraploid a dárce pylu diploid (Suda 2004). To, která z obou variant je ta reálnější, by se dalo soudit podle ploidy endospermu v plodu. Pokud by samičí rostlinou byl diploidní cytotyp, byl by endosperm plodu tetraploidní. Za předpokladu, že by samičí rostlinou byl tetraploidní cytotyp, ploidy endospermu by byl pentaploidní.

Dále by mohli triploidi vzniknout z redukované a neredukované gamety diploidního druhu *E. nigrum*, avšak doposud nebyl na lokalitách dobře izolovaných od taxonu *E. hermaphroditum* žádný triploidní cytotyp nalezen, tudíž se to zdá být zatím dosti nepravděpodobná alternativa (Suda 2003).

Nicméně v řádu *Ericales* byla existence neredukovaných gamet pozorována a bylo také poukázáno na jejich význam při výměně genetické informace. Při studii *Vaccinium*

darrowi ($2n = 2x = 24$) a *Vaccinium corymbosum* ($2n = 4x = 48$) bylo objeveno, že polyploidní mohou volně měnit geny se sympatricky rostoucími diploidními cytotypy pomocí neredukovaných gamet (Hancock & Whallon 1998).

Možností, jak se podívat na vznik triploidů, by byly procesy zpětného křížení. Nicméně tento způsob se bude asi potýkat s problémy, neboť dosavadní výsledky z průtokové cytometrie zatím nenašly u žádné rostliny obsah DNA v intervalu mezi diploidním a triploidním nebo triploidním a tetraploidním cytotypem (Abazid & al. 2004)

V České republice byly nalezeny triploidní rostliny v Krkonoších. Byl to první nález pro střední Evropu. Přestože diploidní a zároveň tetraploidní cytotypy rostou i na Šumavě a v Jizerských horách, jen v Krkonoších se našly lokality, kde nedocházelo k izolaci obou cytotypů a mohlo dojít k společnému růstu a hybridizaci (Suda 2004). Ze všech krkonošských vzorků čítaly triploidní rostliny 6,3 %. Toto vysoké číslo by mohlo naznačovat, že za vhodných podmínek je vznik hybridů zřejmě docela častý jev. Bylo zjištěno, že hybridy se podobají diploidům ve svých vegetativních znacích. Mají tendenci k zkracování lodyh a hustějšímu uspořádání listů (Suda 2004).

Hybridní rostliny se zatím zdají být sterilní, i když byl nalezen 1 plod na Lubošské planině, bohužel neživotoschopný. Měl zárodek i endosperm degenerovaný. Na plodu se nenacházely žádné zbytky tyčinek, ale pro ověření pohlavnosti by bylo potřeba ohodnotit ještě květy (Suda 2003, Abazid & al. 2004).

4. Materiál

Od podzimu 2004 do podzimu 2006 probíhal sběr rostlinného materiálu na lokalitách vytipovaných dle literatury (Slavík 1990, Abazid 2004, Suda 2004a).

Celkem byl nasbírán materiál z 39 lokalit z České republiky. Krkonoše jsou výjimečné společným výskytem diploidů a tetraploidů na jedné lokalitě a navíc výskytem triploidů, proto byl na tuto geografickou oblast kladen největší důraz. Můžeme zde totiž nejlépe pozorovat proměnlivost a prolínání znaků a vlastností jednotlivých cytotypů.

Jednotlivé lokality byly přibližně ve středu sbírané oblasti zaměřeny pomocí systému GPS (WGS-84).

Sbíraný jedinec byl chápán jako úsek porostu 30x30 centimetrů, na kterém bylo sebráno po deseti lodyžkách.

Na lokalitách bylo podle množství jedinců sbíráno 3 - 50 vzorků (nejčastěji 20-30 jedinců).

Pro každou rostlinu bylo potřeba získat květy i plody, proto byli jedinci označováni plastovým štítkem.

Krkonošské lokality byly navštíveny 3x a někdy dokonce 4x. Všechny ostatní lokality z ČR byly navštíveny 2x.

Rostliny s květy se na lokalitách sbíraly většinou na přelomu května a června, v srpnu se vyhotovily fytoocenologické snímky a od srpna do října se sbíraly rostliny s plody. Rostlinný materiál byl poté převezen do sušárny herbářů PRC umístěné na Katedře botaniky PřF UK, kde se nechal více než týden sušit.

Květy usušené v sušárně byly před morfometrickým měřením přelity vroucí vodou a nechaly se nabýt původního tvaru (měření byla prováděna cca po 20 min.).

Plody byly uchovávány v 70% ethanolu. Z každého jedince, pokud byl na plody bohatší, se takto uchovaly 2-3 plodné lodyžky.

Herbářové položky z jednotlivých lokalit a jednotlivých ploidii ze smíšených lokalit budou uloženy v herbáři Přírodovědecké fakulty UK (PRC).

Jednotlivé lokality jsou řazeny a číslovány od Krkonoš směrem na západ (proti směru hodinových ručiček).

Tab. 4.1: Souhrn lokalit, fytochorion podle literatury (Skalický 1988), geografická poloha, nadmořská výška, GPS souřadnice (WGS-84)

Č. lokality	Území	Fytochorion	Poloha lokality	Nadmořská výška (m n.m.)	GPS souřadnice (WGS-84)
1	Krkonoše	93 a	Rašeliniště pod Černou horou	1200	50°39'50"N 15°45'15"E
2	Krkonoše	93 b	Úpská louka	1430	50°44'20"N 15°42'40"E
3	Krkonoše	93 b	Čertova louka	1405	50°44'50"N 15°41'15"E
4	Krkonoše	93 b	SV od Petrovy boudy na polské straně	1230	50°46'20"N 15°37'05"E
5	Krkonoše	93 b	JV do Petrovy boudy	1240	50°46'15"N 15°36'40"E
6	Krkonoše	93 b	Pančavská louka, SV orientace svahu	1330	50°45'40"N 15°32'30"E
7	Krkonoše	93 b	Pančavské rašeliniště, JZ orientace sv.	1320	50°45'50"N 15°32'20"E
8	Krkonoše	93 b	Labská louka	1365	50°46'15"N 15°32'20"E
9	Krkonoše	93 b	Mumlavská louka	1330	50°45'50"N

					15°32'00"E
10	Krkonoše	93 b	Hraniční louka, mezi Voseckou boudou a horou Luboch	1250	50°47'20"N 15°30'E
11	Krkonoše	93 a	Lubošská planina	1224	50°47'30"N 15°28'30"E
12	Jizerské hory	92 b	Rašeliniště Jizerky, Osada Jizerka	855	50°49'40"N 15°19'40"E
13	Jizerské hory	92 b	Pytlácké kameny	945	50°50'30"N 15°20'20"E
14	Jizerské hory	92 b	Rašeliniště Jizery	850	50°50'40"N 15°17'45"E
15	Jizerské hory	92 a	Louka u studánky	890	50°50'00"N 15°15'50"E
16	Jizerské hory	92 a	Suchopýrová louka	900	50°51'20"N 15°16'30"E
17	Jizerské hory	92 a	Velká klečová louka	990	50°49'50"N 15°14'40"E
18	Jizerské hory	92 a	Malá klečová louka	980	50°50'15"N 15°14'50"E
19	Jizerské hory	92 a	Jelení louka	970	50°50'20"N 15°15'00"E
20	Jizerské hory	92 a	Nová louka	780	50°50'50"N 15°09'30"E
21	Krušné hory	85	Boží Dar	1005	50°24'10"N 12°55'00"E
22	Krušné hory	85	Bludná	1030	50°23'50"N 12°49'10"E
23	Krušné hory	85	Přebuz	895	50°22'30"N 12°36'50"E
24	Šumava	88b	Rokytecká slat'	1110	49°00'00"N 13°25'25"E
25	Šumava	88b	Nohohuťské močály	1210	48°59'00"N 13°26'30"E
26	Šumava	88b	Blatenská slat'	1250	48°58'30"N 13°27'30"E
27	Šumava	88b	Přední mlynářská slat'	1050	49°01'20"N 13°27'32"E
28	Šumava	88b	Tetřevská slat'	1145	49°01'30"N 13°33'05"E
29	Šumava	88b	Vydří most	1070	49°02'36"N 13°34'55"E
30	Šumava	88b	Churáňov-Malý Polec	1050	49°03'50"N 13°36'00"E
31	Šumava	88b	Chalupářská slat'	910	48°59'50"N 13°39'25"E
32	Šumava	88e	Rakouská slat'	1350	48°46'20"N 13°51'00"E
33	Jeseníky	97	Velký Máj	1380	50°02'40"N

					17°12'40"E
34	Jeseníky	97	Petrovy kameny	1420	50°4'10"N 17°14'00"E
35	Jeseníky	97	Červená hora	1335	50°08'40"N 15°08'10"E
36	Jeseníky	97	Vrchoviště Trojmezí	1300	50°09'42"N 15°07'05"E
37	Jeseníky	97	Keprník	1420	50°09'45"N 15°06'00"E
38	Jeseníky	97	Rašeliniště pod horou Vozka	1320	50°09'25"N 15°06'20"E
39	Jeseníky	97	Vozka	1365	50°09'10"N 15°06'30"E

Lokality a sběr dat byl volen tak, aby byla zahrnuta veškerá území s bohatými populacemi a zároveň aby byla z území prosbírána co nejrůznorodější stanoviště. Na samotných lokalitách byly vzorky sbírány víceméně náhodně, ale tak, aby jednotliví jedinci postihli co největší možnou variabilitu vyskytující se na lokalitě.

Fytcenologické snímky byly provedeny ve velikosti 2x2 m na všech lokalitách a 30x30 cm na smíšených lokalitách v Krkonoších. Z snímků byli odebíráni jedinci rodu *Empetrum* pro následné hodnocení metodou průtokové cytometrie a mechorosty pro dodatečné určení.

5. Cytologická variabilita rodu *Empetrum*

5.1 Úvod

Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) je dnes velmi rozšířenou metodou sloužící k analýze a třídění částic jednoho typu, nejčastěji jader (Doležel et. al 1997). Původně byla v sedmdesátých letech minulého století vyvinuta pro aplikaci v biomedicínkách odvětvích, kde sloužila primárně k rychlému počítání a analyzování krvinek (Doležel 1997). Dnes nám pomáhá ve velkém množství biologických oborů jak v základním, tak i v aplikovaném výzkumu. A to především v imunologii, molekulární biologii, genetice, farmakologii, zoologii, mořské biologii a botanice (Suda 2004b). Jednotlivé aplikace nám pomáhají stanovit obsah jaderné DNA, obsah RNA, složení bází, obsah proteinů, vnitrobuněčné pH, koncentraci vápníku, velikost chromozómů, centromerický index (Suda 2004b). Můžeme tedy díky FCM určit ploidii, studovat genovou expresi, analyzovat buněčný cyklus, detekovat a charakterizovat mikroorganismy, třídit požadované částice, atd. (Suda 2003).

Botanické obory počaly využívat FCM opožděně díky problémům spojených s vlastnostmi rostlinných buněk (přítomnost buněčné stěny, sekundární metabolity, atd.). Pevná buněčná stěna rostlinných buněk je autofluorescenční a je nepravidelného tvaru. Její tvar narušuje úzký proud, ve kterém jsou unášeny jednotlivé měřené částice.

Tento problém byl odstraněn díky objevu a práci D. W. Galbraitha. Buňky z čerstvého rostlinného materiálu je potřeba rozsekát ve vhodném izolačním puftru, čímž získáme suspenzi intaktních jader (Galbraith 1983).

5.2 Princip

Metoda průtoková cytometrie zaznamenává optické vlastnosti jednotlivých buněk, nejčastěji intenzitu fluorescence. Fluorescenčně obarvená jádra vyizolovaná z buněk jsou unášena velkou rychlostí v úzkém proudu kapaliny přes optickou komůrku, ve které dojde k jejich osvětlení paprskem světla z UV lampy či laseru o určité vlnové délce (Shapiro 1995).

Výsledkem jednoparametrových analýz bývá histogram intenzity fluorescence; (Doležel et al. 1997). Přesnost analýz je vyjádřena koeficientem variance (CV). Je

udávána v procentech. Měření s koeficientem pod 3 % jsou dobře interpretovatelná a dají se považovat za přesná. Obvykle pracujeme s koeficientem v rozmezí 1-10 %.

$$CV = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{průměr}} \cdot 100$$

Přístroj dokáže postihnout rozdíl v obsahu DNA měřených vzorků, jehož velikost je alespoň dvojnásobkem velikosti CV daného měření (Doležel et al. 1997). Aby tato podmínka platila, musí být množství analyzovaných jader jedinců stejné a výsledné píky histogramu budou stejně vysoké. Pokud tomu tak není bude rozlišovací schopnost nižší (Rosenbaumová, 2002).

5.2.1 Výhody a nevýhody FCM:

Mezi hlavní výhody FCM (oproti karyologickým metodám) patří (Doležel 1997, Suda 2003) jednoduchost přípravy vzorků a nízké finanční náklady, které činí několik desítek korun za vzorek. Malé množství rostlinného materiálu se během chvíle rozseká v Petriho misce s vhodným pufrům a obarví fluorescenčním barvivem a do několika málo minut můžeme začít analyzovat. K analýze stačí malé množství rostlinného pletiva (často jen 1 cm²). Může se tudíž bez zdecimování jedince či populace měření zopakovat.

FCM umožňuje jednoduše odhalit smíšené vzorky obsahující dva nebo i více ploidních stupňů, díky skutečnosti, že intenzita fluorescence jednotlivých částic je snímána samostatně. Další výhodou je rychlost přípravy, která umožňuje stanovit během jednoho dne plodní stupeň i u 500 jedinců. Díky zmíněné schopnosti analyzovat jádra jednotlivě, lze totiž analyzovat pohromadě i 10 jedinců a navíc můžeme analyzovat mitoticky neaktivní buňky.

Nevýhodou FCM (Suda 2005) je nutnost pracovat s živým materiálem. Čím déle se materiál skladuje, tím horší je kvalita výsledných histogramů. Neplatí to však u všech skupin rostlin. U některých skupin rostlin lze materiál uchovat pouhým vysušením a existuje i možnost studovat recentní herbářové položky. Tento způsob byl použit pro vybrané zástupce čeledi *Poaceae*, *Cyperaceae* a *Ericaceae* (Suda 2005). Další nevýhoda FCM je horší schopnost detekce aneuploidie, pokud mají zkoumané rostliny somatický počet chromosomů vyšší než 2n=30. A nakonec to mohou být sekundární metabolity, které u rostlinných buněk mohou ovlivnit kvalitu výsledných histogramů.

5.2.2 Příprava vzorku

V Petriho misce se v 500 ml roztoku Otto I rozsekalo ostrou žiletkou přibližně 0,5 cm² analyzované rostliny s přibližně 0,5 cm² interního standardu. Suspenze se přefiltrovala přes nylonový filtr (velikost oka 42 µm).

K barvení jader byl použit fluorochrom DAPI, který se váže na AT oblasti DNA a je používán při stanovování DNA ploidie. Jeho vlnová délka excitačního záření je 360 nm a emitovaného záření je 460 nm (Doležel et al. 1997b). Ke vzorku byl přidán vždy 1 ml barvicího roztoku a poté se nechal vzorek necelou 1 minutu probarvovat při pokojové teplotě.

Složení roztoků používaných v průtokové cytometrii:

Pufr Otto I

0,1M	Monohydrát kyseliny citronové	4,2 g
0,5%	Tween 20	1 ml
	Destilovaná voda	100 ml
	Doplněno destilovanou vodou do 200 ml	
	přefiltrovat přes nylonový filtr (velikost oka 42µm) a skladovat při teplotě 4°C	

Pufr Otto II

0,4M	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	28,65 g
	Destilovaná voda	100 ml
	Doplněno destilovanou vodou do 200 ml	
	Přefiltrovat přes nylonový filtr (velikost oka 42µm) a skladovat při pokojové teplotě	

Barvicí roztok DAPI (4µg/ml)

0,1M	zásobní roztok DAPI	400 µl
0,5%	Pufr Otto II (přefiltrovat přes filtr)	10 ml
	2-merkapt ethanol	20 µl

5.3 Aplikace metody průtokové cytometrie během studia rodu *Empetrum*

Průtoková cytometrie má v této práci nezanedbatelný význam. Díky této metodě bylo ověřeno ploidní stupeň u každé sebrané rostliny. Následně získaná morfologická a

fytoecnologická data se tak vztahují k jednoznačně určeným jedincům a jejich věrohodnost je tak výrazně větší nežli v předchozích studiích.

Veškerá měření byla prováděna v cytometrické laboratoři Botanického ústavu AV ČR, v.v.i. v Průhoncích na průtokovém cytometru Partec Pa II.

U čeledi Ericaceae lze úspěšně zjistit stupeň ploidity z herbářových položek (Suda 2003). Díky tomuto zjištění jsem většinu materiálu analyzovala z herbářových položek. Pokud jsou herbářové položky kvalitně usušené, výsledky analýz jsou velmi dobré a k určení ploidity stupně naprosto dostačující. Pro izolaci jader byla používána pletiva listu.

Pro interpretaci výsledků je vždy nutné analyzovat vzorek současně s interním standardem. K určení ploidity stupně rodu *Empetrum* byly jako standart použity listy sedmikrásky obecné (*Bellis perennis*, 2C DNA obsah (pg) : 3,686 pg.).

5.4 Výsledky

Pro mou studii bylo analyzováno 1556 vzorků z 39 lokalit.

Z níže uvedené tabulky (viz Tab. 5.1) je zřejmé, že metoda průtokové cytometrie je schopná jednoznačně oddělit tři cytotypy rodu *Empetrum* (diploidní, triploidní a tetraploidní).

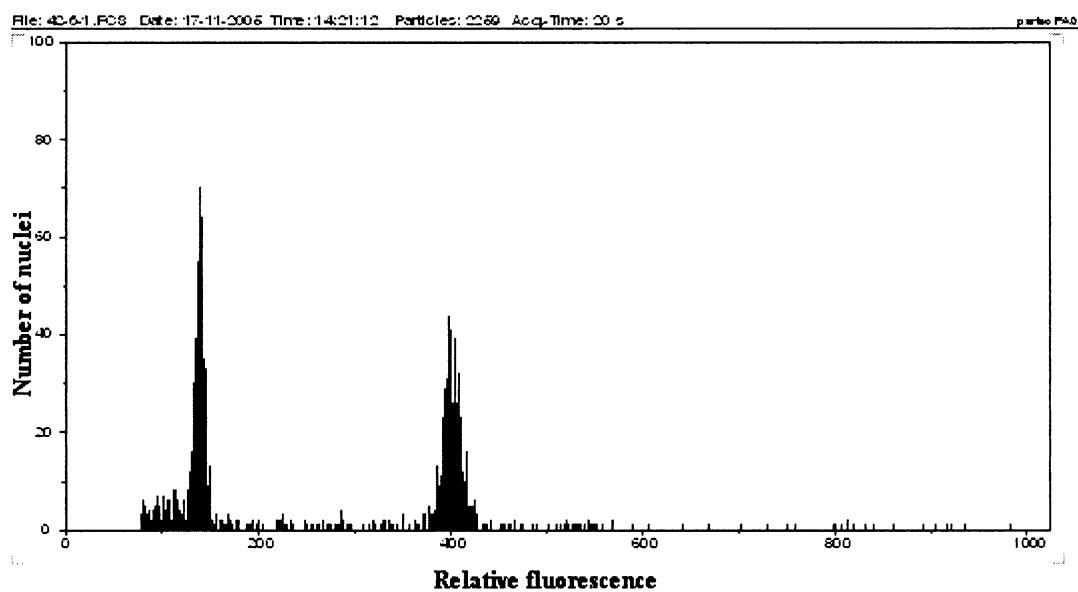
Ploidy byla stanovena z herbářových položek někdy i s ročním zpožděním, což se projevilo na vyšších hodnotách CV. Nicméně stupeň ploidity se podařilo jednoznačně stanovit i ve smíšených vzorcích.

Následující tabulka zachycuje počet vzorků jednotlivých ploidity a charakteristiky jejich fluorescence.

Tab. 5.1: Relativní fluorescence jader všech tří cytotypů, vztažena k internímu standardu *Bellis perennis*, jehož fluorescence byla považována za jednotkovou.

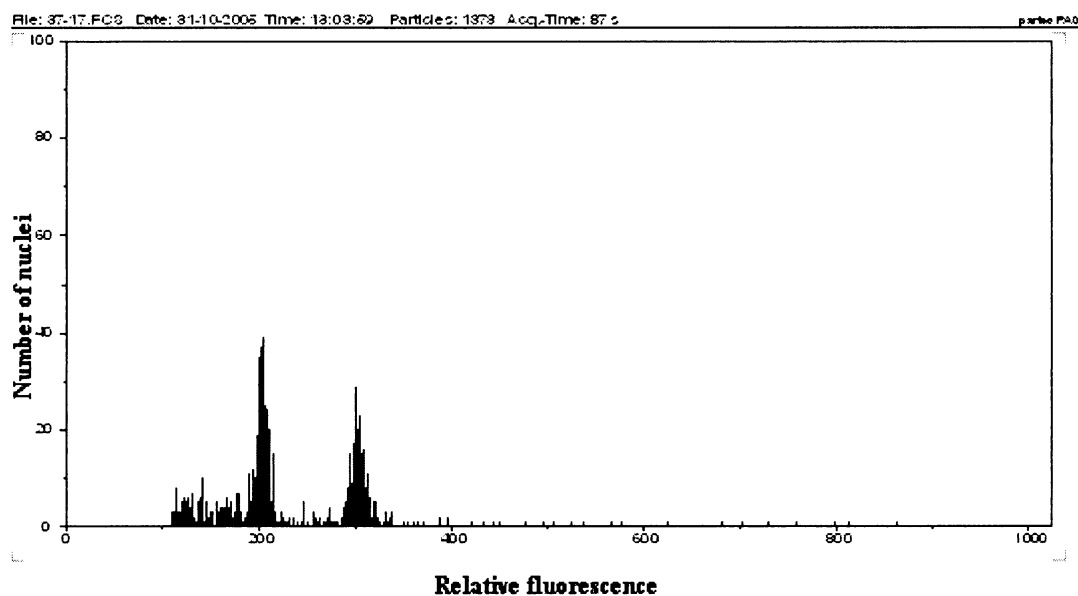
cytotyp	počet analyzovaných jedinců	poměr fluorescence ke standartu (průměr±SD)	CV vzorku (průměr)±SD
diploidní	806	2,894±0,093	4,491±2,348
triploidní	22	1,948±0,027	5,720±1,292
tetraploidní	686	1,476±0,015	3,590±0,972

Obr. 5.1: Výsledný graf a hodnoty analýzy diploidní rostliny z lokality č. 26



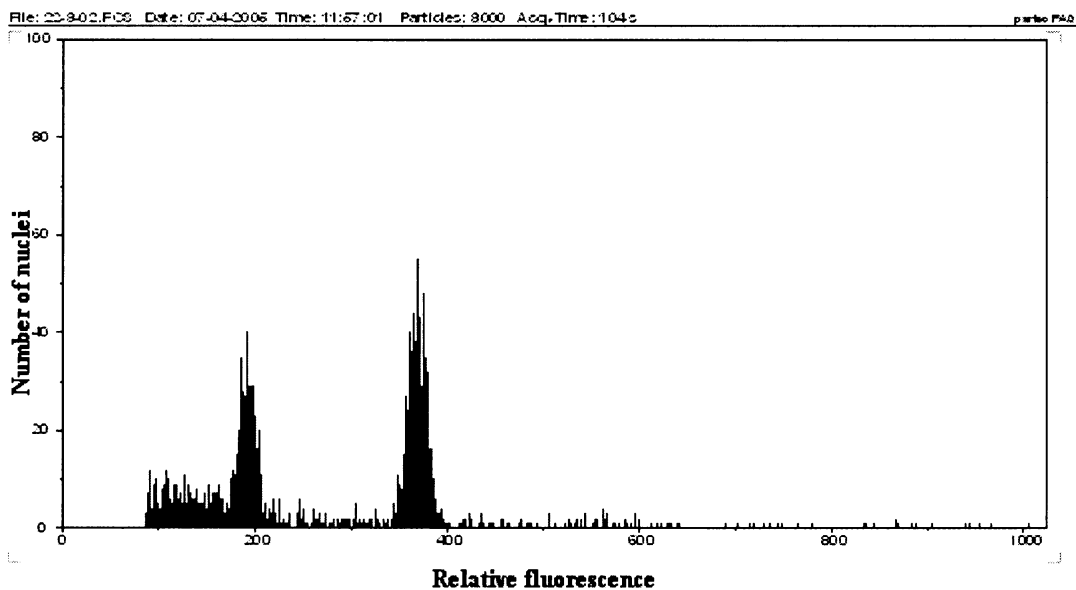
Peak	Index	Mean	Area	CV%
1	1.000	138.93	836	3.98
2	2.886	400.91	819	2.34

Obr. 5.2: Výsledný graf a hodnoty analýzy tetraploidní rostliny z lokality č. 2



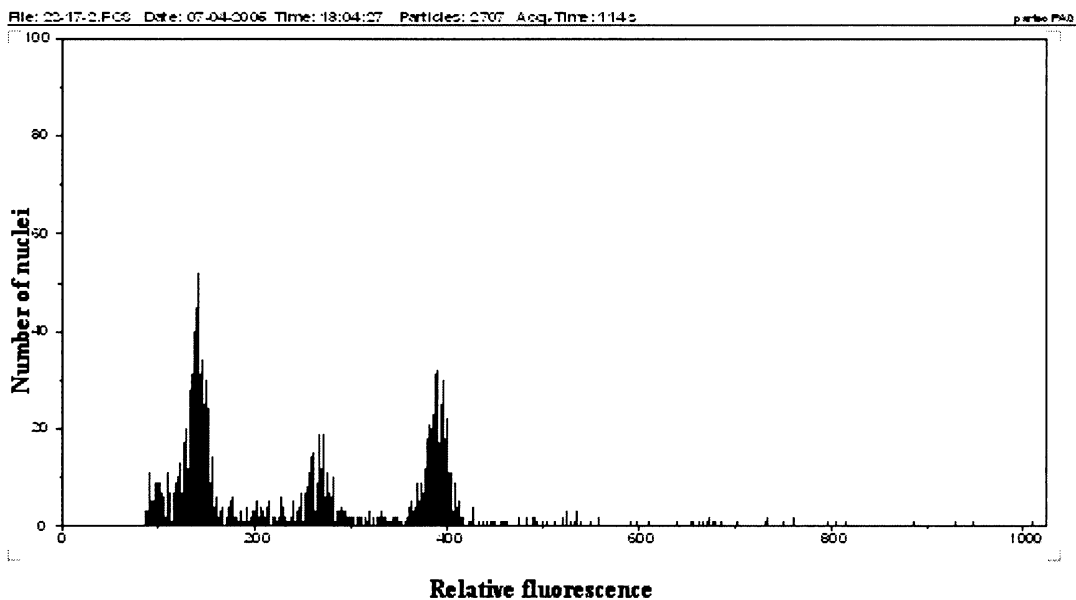
Peak	Index	Mean	CV%
1	1.000	202.86	3.03
2	1.489	302.01	2.67

Obr. 5.3: Výsledný graf a hodnoty analýzy triploidní rostliny z lokality č. 3



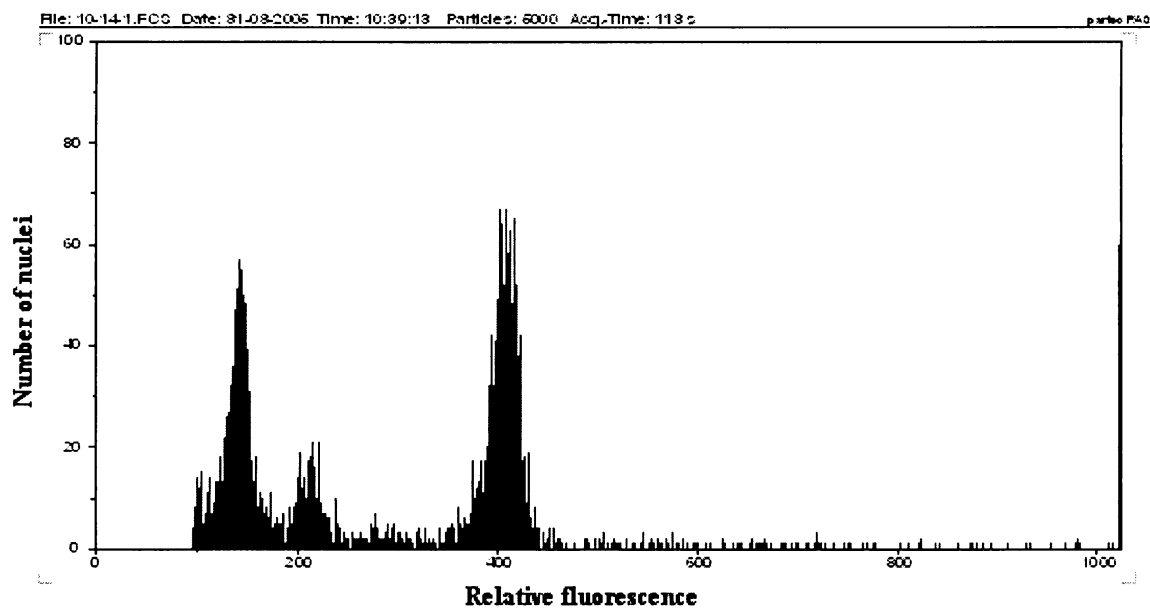
Peak	Index	Mean	CV%
1	1.000	192.32	4.28
2	1.912	367.71	2.54

Obr. 5.4: Výsledný graf a hodnoty analýzy smíšeného vzorku diploidní a tetraploidní rostliny z lokality č. 11



Peak	Index	Mean	CV%
1	1.000	140.26	6.92
2	1.896	265.87	4.61
3	2.764	387.71	2.82

Obr. 5.5: Výsledný graf a hodnoty analýzy smíšeného vzorku diploidní a triploidní rostliny z lokality č. 10



Peak	Index	Mean	CV%
1	1.000	141.84	8.41
2	1.488	211.00	7.63
3	2.869	406.88	3.12

Tabulka 5.2 znázorňuje číslo lokality, území, polohu lokality, počet vzorků, který byl na lokalitách nasbíráán pro jarní aspekt. Dále je uvedeno, jaké složení vzorků jednotlivých cytotypů (s jejich počty) se na lokalitách nalezlo.

V tabulkách jsou uvedena čísla jen pro jarní aspekt. Na podzim bylo sesbírááno stejné množství vzorků, tudíž byl celkový počet analyzovaných jedinců a vzorků je dvojnásobný.

Tab. 5.2: Počty vzorků se stanoveným stupněm ploidie na jednotlivých lokalitách na základě výsledků cytometrické analýzy

	Území	Poloha lokality	Počet jedinců
1	Krkonoše	Rašeliniště pod Černou horou	32 2x(3),3x (1),4x(28)
2	Krkonoše	Úpská louka	30 2x(2),3x(3),4x(25)
3	Krkonoše	Čertova louka	11 2x(5), 4x(6)
4	Krkonoše	SV od Petrovy boudy na polské straně	50 2x(3), 4x(47)
5	Krkonoše	JV do Petrovy boudy	15 4x
6	Krkonoše	Pančavská louka, SV orientace svahu	36 2x(7),4x(27),2x+4x(2)
7	Krkonoše	Pančavské rašeliniště, JZ orientace sv.	35 2x(6),4x(29)
8	Krkonoše	Labská louka	45 2x(9),4x(35)2x+4x(1)
9	Krkonoše	Mumlavská louka	37 2x(2),4x(36)
10	Krkonoše	Hraniční louka, mezi Voseckou boudou a horou Luboch	48 2x(42),3x(2)4x(2) 2x+3x(1) 2x+4x(1)
11	Krkonoše	Lubošská planina	36 2x(15),3x(3),4x(7),3x+4x(1) 2x+4x(10)
12	Jizerské hory	Rašeliniště Jizerky, Osada Jizerka	26 2x
13	Jizerské hory	Pytlácké kameny	12 4x
14	Jizerské hory	Rašeliniště Jizery	2 2x
15	Jizerské hory	Louka u studánky	10 2x
16	Jizerské hory	Suchopýrová louka	10 2x
17	Jizerské hory	Velká klečová louka	18 2x
18	Jizerské hory	Malá klečová louka	11 2x
19	Jizerské hory	Jelení louka	6 2x
20	Jizerské hory	Nová louka	3 2x
21	Krušné hory	Boží Dar	30 2x

22	Krušné hory	Bludná	32 2x
23	Krušné hory	Přebuz	15 2x
24	Šumava	Rokytecká slat'	3 2x
25	Šumava	Nohohuťské močály	10 2x
26	Šumava	Blatenská slat'	30 2x
27	Šumava	Přední mlynářská slat'	20 2x
28	Šumava	Tetřevská slat'	17 2x
29	Šumava	Vydří most	6 2x
30	Šumava	Churáňov-Malý Polec	28 2x
31	Šumava	Chalupářská slat'	25 2x
32	Šumava	Rakouská slat'	5 4x
33	Jeseníky	Rašeliniště Velký Máj	12 4x
34	Jeseníky	Petrovy kameny	3 4x
35	Jeseníky	Červená hora	7 4x
36	Jeseníky	Vrchoviště Trojmezi	11 4x
37	Jeseníky	Keprník	6 4x
38	Jeseníky	Rašeliniště pod horou Vozka	30 4x
39	Jeseníky	Vozka	15 4x
		Vzorků pro jarní aspekt: 778	
		Celkem vzorků: 1556	

Vzhledem k existenci smíšeného růstu dvou cytotypů na úseku 30x30 cm, ze kterého byly lodyžky sbírány, byl výsledný počet stanovených jedinců vyšší než počet odebraných vzorků. Pro jarní aspekt bylo analyzováno **803** jedinců a společně s podzimním sběrem celkem **1606** jedinců.

V tabulkách 5.3 a 5.4 je uveden přehled cytotypů, čísla lokalit a jejich počty

Tab. 5.3: Počty jedinců pro lokality s výskytem pouze jednoho cytotypu

Cytotyp	Počet lokalit	Čísla lokalit	Počet jedinců
<i>E. nigrum</i> (~2x)	19	12, 14-31	302
<i>E. hermaphroditum</i> (~4x)	10	5, 13, 32-39	116

Tab. 5.4: Počty jedinců pro lokality se smíšeným výskytem

Cytotyp	Čísla lokalit	Počet jedinců
<i>E. nigrum</i> (2n=2x)	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	109
Triploidní jedinci (2n=3x)	1,2,10,11	11
<i>E. hermaphroditum</i> (2n=4x)	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	265

5.5 Shrnutí výsledků

Pomocí průtokové cytometrie byl stanoven ploidní stupeň u 1606 jedinců z 39 populací České republiky. Na 19 lokalitách byl ověřen diploidní cytotyp, na 10 lokalitách byl ověřen tetraploidní cytotyp. Na zbylých 10 byl nalezen smíšený růst diploidního a tetraploidního cytotypu a na čtyřech z nich dokonce rostl triploidní cytotyp.

V závorkách následujícího textu je uveden souhrnný počet jedinců pro tuto diplomovou práci z jednotlivých pohoří.

Do současné doby byly karyologicky ověřeny 4 lokality z Krušných hor. Podle literatury zde byl zaznamenán výskyt tetraploidního cytotypu, nicméně v tomto pohoří byly nalezeni jen diploidní jedinci (77 jedinců ověřených touto prací.).

Na Šumavě je podle dřívější literatury (Slavík 1990, Klášterský 1960) tetraploidní cytotyp zaznamenán poměrně hojně, bohužel přiřazení k tetraploidnímu cytotypu neproběhlo na základě karyologického stanovení ploidního stupně. Z okolí Horské Kvildy byl díky tomu popsán tetraploidní cytotyp, jehož existence uváděná v literatuře nebyla v rámci sběrů této diplomové práce potvrzena.

Na lokalitách Plechý a Trojmezna hora, kde byl v letech 2000-2002 karyologicky ověřen výskyt tetraploidních jedinců (Suda 2004a), nebyl výskyt tohoto cytotypu v roce 2005 potvrzen. Na území NP Šumavy byl pro tuto studii nasbíráán tetraploidní cytotyp pouze z jedné lokality (5 jedinců). Zbylé lokality byly diploidní (139 jedinců).

Na základě výsledků této práce spolu s předchozími pracemi (Suda 2004a) je v současné době karyologicky ověřeno 5 lokalit z Jeseníků, které byly jak skalnaté, tak rašelinné, nicméně diploidní jedinci udávaní v literatuře (Slavík 1990) nebyli nalezeni. V Jeseníkách byl nalezen jen tetraploidní cytotyp (84 jedinců).

V Jizerských horách byl potvrzen výskyt diploidního cytotypu (86 jedinců) a na 1 lokalitě tetraploidního cytotypu (12 jedinců).

Během sběru pro tuto diplomovou práci bylo v Krkonoších nasbíráno celkem 400 jedinců z 11 lokalit. Deset z nich bylo smíšených s výskytem obou nebo dokonce všech tří cytotypů.

Jediná lokalita nesmíšená byla JV od Petrovy boudy. Malé rašeliniště, kde bylo nalezeno 15 tetraploidních jedinců, je nicméně také smíšenou lokalitou, neboť během studie v letech 2000-2002 byl zde nalezen 1 diploidní jedinec (Abazid 2004, Suda 2004a).

Během předchozích karyologických studií (Abazid 2004, Suda 2004a) byly v Krkonoších nalezeny 4 jednocytotypové lokality. Byly jimi lokality SV od Petrovy

boudy na polské straně, Mumlavská louka a Černohorské rašeliniště a malé lesní rašeliniště nedaleko Černohorského rašeliniště.

Na lokalitě SV od Petrovy boudy na polské straně, kde bylo v minulosti sesbíráno pouze 7 jedinců a to diploidních, bylo během této studie sesbíráno 50 jedinců, z nichž byli jen 3 diploidní a zbylých 47 bylo tetraploidních.

Na Mumlavské louce bylo nasbíráno 37 vzorků z toho 2 byly diploidní a zbytek tetraploidní. Vzhledem k tomu, že 2 diploidní vzorky byly od sebe vzdálené pouze 1 m, je dost pravděpodobné, že jde ve skutečnosti jen o jeden klon.

Na Černohorských rašeliništích byly z 32 vzorků 3 diploidní a 1 triploidní.

Lesní rašeliniště SV od Černohorského rašeliniště nebylo v rámci této diplomové práce navštíveno.

Během studií 2000-2002 (Suda 2004) byly v Krkonoších objeveny 2 lokality s výskytem všech tří cytotypů (Čertova louka, Lubošská planina) a 1 s výskytem diploidů a triploidů (Hraniční louka). Na lokalitě Hraniční louka byli nalezeni 2 tetraploidi, a tudíž i tato lokalita se vyznačuje výskytem všech tří ploidií, tak jako lokalita Úpská louka, kde byl k dříve ověřeným diploidům a tetraploidům objeven výskyt 3 triploidních jedinců. A jako poslední lokalita s výskytem všech tří cytotypů byla objevena lokalita Černohorských rašelinišť. V předchozích studiích zde byli nalezeni jen tetraploidi. Nyní se však podařilo karyologicky potvrdit výskyt 3 diploidních a 1 triploidního jedince.

Závěrem lze tedy shrnout, že všechny lokality v Krkonoších s výjimkou malého lesního rašeliniště poblíž Černohorských rašelinišť (Abazid 2004) se vyznačují společným růstem diploidního cytotypu *E. nigrum*, tetraploidního *E. hermaphroditum* a 5 z nich navíc i výskytem triploidního cytotypu.

Na jiných lokalitách České republiky nebyl společný růst cytotypů prokázán.

6. Morfometrická analýza

6.1 Měřené znaky

Jak už bylo uvedeno, rod *Empetrum* má na území České republiky 2 cytotypy, které bývají hodnoceny jako samostatné taxony (nejčastěji na druhové úrovni): *Empetrum nigrum* a *Empetrum hermaphroditum*. Znaky používané pro jejich odlišení jsou však velmi nestabilní a často dochází k překryvu hodnot, a to nejen na území ČR. V určovacích klíčích a jiných publikacích je udáváno mnoho znaků, podle kterých by se zdálo, že je druhy možné spolehlivě odlišovat. Vezmeme-li v potaz překryv hodnot znaků a také to, že správnost a spolehlivost udávaných charakteristik nebyla ověřena kritickými (např. morfometrickými) analýzami, nemůžeme se na udávané informace plně spolehnout.

Morfometrická metoda, patřící mezi mnohorozměrné statistické techniky studující fenotypovou proměnlivost, může pomoci zhodnotit fenotypovou variabilitu a taxonomický význam jednotlivých znaků. Je zde předpoklad pro vazbu pohlavnosti květů s ploidií, ale tato vazba zatím nemůže být a není považována za striktní (Anderberg 2004). Pomůže tato metoda najít existenci nějakého znaku, který je korelován s ploidií a odpovědět tak na otázku, zda-li lze jednotlivé cytotypy odlišit bez znalosti počtu chromozómů?

Velikost svěracích buněk průduchu

Hledání průduchů je u rodu *Empetrum* samo o sobě docela náročný úkol. Průduchy jsou docela malé a díky stavbě a podvnutí listu ne moc hojné. Nejčastěji byly průduchy nalézány poblíž štěrbin na spodu listu. Velikost průduchů byla stanovena u 49 rostlin z 12 lokalit. Vzorků s diploidním cytotypem bylo změřeno 28, tetraploidních 19 a triploidních 2. U každého jedince byly měřeny 3 průduchy, z nichž byl vypočítán průměr.

Základní charakteristiky tohoto znaku pro jednotlivé cytotypy, ukázaly, že pro separaci cytotypů nemá tento znak žádný význam. Vzhledem k náročnosti získávání hodnot tohoto znaku, nebylo měřeno více průduchů a do závěrečných morfometrických analýz nebyl tento znak zařazen.

Tab. 6.1: Měřené znaky zahrnuté v morfometrických analýzách

Název znaku	Zvětšení, při ve kterém byl znak měřen	Zkratka v programu SAS
Číslo lokality		v1
Číslo jedince na lokalitě		v2
Ploidie		v3
Pohlavnost květu		v4
Počet listů / 5 cm lodyhy		v5
Délka čepele listu [mm]	1,8x	v6
Šířka čepele listu [mm]	1,8x	v7
Délka/šířka listu (index)		v8
Šířka bílé linie na spodu listu	10x	v9
Šířka štěrbiny na spodu listu	10x	v10
Počet květů na lodyhy za posledním větvením		v11
Přítomnost dvou květů v úžlabí listu		v12
Počet tyčinek		v13
Délka nitky [mm]	3x	v14
Délka prašníku [mm]	3x	v15
Počet plně vyvinutých prašníků		v16
Délka tyčinek/délka kalichu (index)		v17
Délka staminodia v květu [mm]	3x	v18
Délka čnělky [mm]	3x	v19
Počet laloků blizny	3x	v20
Počet listenů	3x	v21
Přítomnost zárodku 2.květu		v22
Délka největšího listenu [mm]	3x	v23
Šířka největšího listenu [mm]	3x	v24
Délka/šířka největšího listenu (index)		v25
Délka nejmenšího listenu [mm]	3x	v26
Šířka nejmenšího listenu [mm]	3x	v27
Délka/šířka nejmenšího listenu (index)		v28
Délka kališního lístku [mm]	3x	v29
Šířka kališního lístku [mm]	3x	v30
Délka/šířka kališního lístku (index)		v31
Délka korunního lístku [mm]	3x	v32
Šířka korunního lístku [mm]	3x	v33
Délka/šířka korunního lístku (index)		v34
Vitalita pylu (%)	12x	v35
Velikost pylové tetrády [μm]	24x	v36
Průměr peckovičky [mm]	1,8x	v37
Délka peckovičky [mm]	1,8x	v38
Průměr/délka peckovičky (index)		v39
Počet semen v peckovičce		v40
Délka průduchu [μm]	10/100x	v41

Měřené znaky byly vybrány na základě údajů uváděných v literatuře (Zarzycki 1975, Čvančara 1990, Kubát 2002), z předchozích studií a článků (Suda 2003, 2004a, 2004b) a dle vlastních zkušeností.

Vybrány byly znaky jak kvantitativní, tak kvalitativní.

Kvalitativní binární znaky jsou v12, v22 a mezi kvalitativní vícestavové patří v5, v11, v13, v21 a v40.

Kódování ploidie jedinců v analýzách bylo následovné: $2x = 1$, $4x = 2$, $3x = 3$.

Pohlavnost samčího květu byla označena číslem **1**, samičí pohlaví dostalo číslo **2** a oboupohlavní jedinci **3**.

U všech sesbíraných vzorků kvetoucích i plodných rostlin z jednotlivých lokalit bylo provedeno ověření jejich ploidního stupně metodou průtokové cytometrie.

Znaky - vitalita pylu a velikost pylové tetrády [μm] byly měřeny pomocí mikroskopu MEOPTA a zbylé byly měřeny pomocí binokulární lupy téže značky. Oba přístroje měly do 8x zvětšujícího okuláru vložené okulárové měřítko s rozlišením 0,1 mm.

Délka průduchu [μm] byla měřena pomocí mikroskopu Olympus CX31 při celkovém zvětšení 1000x (100x objektiv /10x okulár) s pomocí imersního oleje. Zdravě vypadající list vybraný z herbářové položky (z části lodyhy za nejmladším větvením) se vařil ve vodě při teplotě 100 stupňů přibližně 20 minut, poté se lehce osušil a položil se vzhůru spodní stranou listu na pevnou podložku. Následovalo přetření tenkou vrstvou bezbarvého laku. Vrstvička laku se z listu snímala pomocí průhledné izolepy. Pokud nejde o rostliny živé, ale o sušené, musí se list předem povařit, aby nebyl zkrabacený a bylo pak hledání průduchů snadnější.

Úsek, na kterém byl počítán počet listů, měřil 5 cm a počáteční bod byl pod vzrostným vrcholem. Pokud byla lodyha fertilní, byl počet listů stanoven na fertilní lodyze. Do počtu listů nebyly zahrnuty listy, které byly už před sběrem a preparací položky uschlé a zřetelně nefotosyntetizující.

List, u kterého byly stanoveny následující 4 znaky byl vybírán náhodně na části prýtu vyrostlé předchozí rok. Tedy pod nejmladšími květy či plody, pokud byla lodyha fertilní. Měření probíhalo přibližně po dvacetiminutovém vaření ve vodě, během kterého list nabyl původního tvaru.

Znak délka čepele listu [mm] nezahrnovala část zužující se v řapík. Šířka čepele listu [mm] byla měřena v nejširší části listu.

Šířka bílé linie na spodu listu [mm]. Jde o bílou linku viditelnou pouhým okem, kterou tvoří zahnuté a přibližné bělavé okraje listu. Její šířka byla měřena ve střední části listu. Mezi přibližnými okraji listu bývá často štěrbina.

Šířka štěrbin na spodu listu [mm] vzniká v případě, kdy se okraje listů nedotknou. Pokud štěrbina existovala, byla měřena ve stejném místě jako předchozí znak.

Počet květů byl stanoven na části lodyhy za nejmladším větvením a pro tuto část lodyhy byla dále zaznamenána existence dvou květů v úžlabí jednoho listu, pokud se takový jev vyskytoval.

Počet tyčinek a ostatní květní znaky byly stanoveny u náhodně vybraného květu zalitého vroucí vodou a ponechaného v lázni 15 minut.

Hodnoty u následujících znaků byly vždy zaznamenány pro největší rozměr.

Z tyčinek byla vybrána náhodně jedna, u které byla změřena délka nitky od báze po přisednutí prašníků. Pokud byly prašníky 2, byla délka prašníku stanovena u většího z nich. U počtu prašníků byly hodnoceny 2 stavy (přítomnost dvou nebo jen jednoho prašníku).

Délka staminodií byla určena u všech nalezených staminodií a následně byl vypočítán průměr.

Čnělka byla vypreparována ze semeníku a následně změřena od báze po přechod v bliznové laloky, jejichž počet byl také spočítán.

Z květu byly odpreparovány a spočítány všechny listeny, z nichž byl vybrán největší a nejmenší listen a zaznamenána přítomnost zárodku 2. květu ukrytého mezi listeny. Kališní a korunní lístky pro měření byl vybrán náhodně a spolu s listeny byl přikryt před měřením délky a šířky krycím sklem.

Pyl byl na podložní skličku vypreparován, zakápnut roztokem acetokarmínu a přikryt krycím sklem. ^{na 15 minut} Velikost pylové tetrády se hodnotila u 3 zrn, z nichž byl poté stanoven průměr. Při stanovení vitality pylu byl zaznamenáván celkový počet zrn a počet zrn abortovaných nebo nerovnoměrně probarvených. Zaznamenávána byla procenta životaschopného pylu. Počet takto hodnocených zrn byl závislý na množství pylových tetrád v preparátu (zpravidla 100 - 600 tetrád).

Průměr a délka peckovičky byla stanovena pro největší rozměr.

6.2 Statistické zpracování dat

Naměřená data byla rozdělena do dvou základních souborů, které byly hodnoceny samostatně. Jeden obsahoval hodnoty znaků na plodech a listech a druhý obsahoval

listové a květní charakteristiky. Druhý soubor byl následně podle charakteru sledovaných vztahů 4x různě upořádán do 4 skupin hodnocených samostatně. Soubory, které byly vytvořeny a hodnoceny jsou uvedené v následující tabulce (viz Tab. 6.2).

Tab. 6.2: Přehled hodnocených statistických souborů naměřených dat

Soubor jedinců s hodnotami znaku:	
1	listu
2	plodu
3	listu a plodu
4	listu a květu: jednopohlavné ♀ + oboupohlavné
5	listu a květu: jednopohlavné ♂ + oboupohlavné
6	listu a květních obalech: jednopohlavné ♀, ♂ + oboupohlavné

První soubor dat slouží k posouzení, jak důležité jsou pro rozdělení jednotlivých cytotypů samotné vegetativní znaky. Jejich výstupy lze tedy použít k hodnocení sterilních jedinců.

Druhý a třetí soubor dat sloužil ke zjištění, zda mají znaky na plodech schopnost rozlišit jednotlivé cytotypy a do jaké míry. Vzhledem k tomu, že počet jedinců, u kterých bylo možno hodnotit současně plody i listy (viz soubor č. 3), byl nižší než celkový počet jedinců se stanovenými charakteristikami plodu, byla pozornost zaměřena i na tento početnější soubor, i když hodnotil jen 4 znaky (č. 2).

Čtvrtý a pátý soubor dat hledal existenci vhodných znaků k separaci jednotlivých cytotypů podle pohlavnosti květů (tj. podle znaku, který by měl mít klíčový taxonomický význam).

Šestý soubor byl vytvořen jen ze znaků, které lze stanovit u květů všech třech možných pohlavností. Díky tomu bylo možno hodnotit najednou mnohem vyšší počet jedinců.

Data byla podrobena těmto statistickým operacím programu Syn-tax 2000 a SAS (verze 9.1.3., SAS Institute 2007): (Podani 2001)

Základní statistiky

Korelace proměnných

Analýza hlavních komponent (PCA)

Shlukovací analýza

Diskriminační analýza

6.2.1 Základní statistiky

Cílem této analýzy provedené pomocí procedury UNIVARIATE programu SAS bylo získat prvotní informace o naměřených datech (jejich rozložení, variabilitu ...) a díky tomu také nalézt odlehle hodnoty, které by bylo vhodné při počítání populačních průměrů vyloučit).

Pro jednotlivé cytotypy byla vypočtena průměrná hodnota, minimum, maximum, 25% a 75% kvartily a směrodatné odchylky pro všechny znaky.

Pro jednotlivé znaky bylo dále provedeno testování normálního rozdělení pomocí Shapiro – Wilkova testu. Protože velká část dat vykazovala odchylky od normálního rozdělení, bylo v následujících analýzách vyžadujících normální rozdělení použito neparametrických metod (Marhold & Suda 2002).

6.2.2 Korelace proměnných

Cílem analýzy bylo hledání vysoce korelovaných skupin či dvojic znaků, které by mohly následně negativně ovlivnit například diskriminační analýzy.

Analýza byla provedena pomocí procedury CORR programu SAS.

Měřítkem jednotlivých proměnných byl Spearmanův korelační koeficient vhodný pro data nevykazující normální rozdělení. Míra korelace byla zjišťována pro celý datový soubor i pro jednotlivé skupiny (cytotypy).

Korelace 0,6-0,95

Vysoká korelace 0,95-0,99

Velmi vysoká korelace 0,99-1

U vysokých korelací nad 0,97 je vhodné jeden z těsně korelovaných znaků z dalších analýz vyloučit. Při korelačních koeficientech 0,95-0,97 je třeba přihlížet ke konkrétní situaci. Při hodnotách nižších než 0,95 se do analýz většinou zahrnují oba korelované znaky (Marhold & Suda 2002).

6.2.3 Analýza hlavních komponent (PCA)

Tato analýza byla provedena procedurou PRINCOMP programu SAS a sloužila k převedení z n-rozměrného prostoru charakterizovaného n znaky do trojrozměrného. Umožňuje tedy najít menší počet lineárních kombinací původního počtu znaků (n). Navíc stejně tak jako základní statistiky pomáhá odhalit odlehle hodnoty v naměřených znacích (Marhold & Suda 2002).

6.2.4 Shlukovací analýza

Tato metoda shluhuje objekty nebo skupiny objektů do nenáhodných skupin na základě jejich podobnosti. Svým hierarchickým uspořádáním pomocí dendrogramu podává informaci o struktuře dat (Marhold & Suda 2002).

Analýza hodnotila průměry z jednotlivých populací a pro jednotlivé ploidie, čímž došlo k redukci variability a proto je nutné interpretovat její výsledky s opatrností.

Byly začleněny jen ty populace, které obsahovaly 5 a více hodnotitelných jedinců.

Jestliže byla populace smíšená, tudíž obsahovala jak diploidní tak tetraploidní cytotyp, byl stanoven průměr pro každou ploidiu (za předpokladu, že bylo k dispozici pět a více jedinců pro daný cytotyp).

Triploidní cytotyp nebyl pro malý počet (3 plodných a 7 kvetoucích) jedinců zohledněn.

Analýza byla provedena procedurou HIERARCHICAL CLASSIFICATION v programu Syn-Tax (Podani 2001) s využitím metod:

Simple average – WPGMA

Group average, tzv. metoda průměrné vazby – UPGMA

Mediánová metoda – WPGMC

Centroidová metoda – UPGMC

Jako měřítko vzdálenosti byla v analýzách použita Euklidovská vzdálenost a data byla standardizována tak, aby se průměr rovnal nule a směrodatná odchylka byla rovna jedné.

Shlukovací metoda pro charakteristiky plodu

Shlukovací metoda byla vypracována pro soubor znaků jen na plodech. Hodnoty plodu byly stanoveny pro více lokalit a více jedinců, než by tomu bylo při použití souboru dat s hodnotami znaků na listech i plodech. Jejich seznam s počty vzorků a stupněm ploidie je uveden v následující tabulce. Celkový počet vzorků byl 335.

Tab. 6.3: Souhrn populací, s počtem plodných jedinců a stupněm ploidie hodnocených shlukovací metodou

číslo populace	ploidie	počet vzorků	číslo populace	ploidie	počet vzorků
10	2x	27	4	4x	25
11	2x	13	5	4x	9
12	2x	11	6	4x	12
17-19	2x	14	7	4x	14
21	2x	13	8	4x	20
22	2x	15	9	4x	17
23	2x	5	11	4x	8
26	2x	11	33	4x	10
28	2x	7	35	4x	7
30	2x	10	36	4x	7
31	2x	10	37	4x	5
1	4x	21	38	4x	17
2	4x	14	39	4x	13
celkem	2x	136		4x	199

Lokality 17, 18 a 19 nalézající se na území Jizerských hor nejsou příliš bohaté co do počtu jedinců. Protože se nacházejí v bezprostřední blízkosti, byly pro shlukovací metodiku sloučeny.

Shlukovací metody pro charakteristiky listu a květních obalů

Přehled lokalit, ploidního stupně a počtu jedinců je v tabulce č. 6.4. Analýza hodnotila 26 skupin s celkovým počtem jedinců 477.

Tab. 6.4: Souhrn populací, s počtem jedinců a stupněm ploidie zahrnutých v shlukovací analýze charakteristik listů a květních obalů

číslo populace	ploidie	počet vzorků	číslo populace	ploidie	počet vzorků
7	2x	5	1	4x	25
10	2x	49	2	4x	24
11	2x	19	4	4x	25
14	2x	10	5	4x	9
21	2x	20	6	4x	25
22	2x	20	7	4x	17
25	2x	7	8	4x	21
26	2x	27	9	4x	22
27	2x	18	11	4x	7
28	2x	19	13	4x	9
29	2x	8	36	4x	11
30	2x	31	38	4x	28
31	2x	21	Celkem	2x-254	4x-223

Pro porovnání, jaké významnosti dosahují znaky na listech, byla na základě stejného souboru dat vypracována i shlukovací analýza jen pro charakteristiky listu.

6.2.5 Diskriminační analýza

Diskriminační analýza zahrnuje několik metod dostupných v programu SAS. Pomocí nich lze například určit, jakými znaky jsou charakterizovány předem stanovené skupiny objektů či jaká je úspěšnost klasifikace neznámých objektů do těchto skupin (Klečka 1980).

Kanonická diskriminační analýza pomáhá odhalit, které znaky ze souboru umožňují co nejlépe oddělit předem dané skupiny. Metoda přiřazuje meziskupinové variabilitě mnohem větší váhu než vnitroskupinové. Výsledkem procedury CANDISC programu SAS je jedna nebo několik kanonických diskriminačních funkcí (os), které jsou vedeny ve směru největší variability. První osa je ve směru největší variability, druhá osa ve směru druhé největší variability a je kolmá na první, atd. (Marhold & Suda 2002).

Podle kanonických korelačních koeficientů, které jsou počítány bez ohledu na hodnoty ostatních znaků, je posuzována důležitost znaku pro odlišení skupin. Ta je

vyjádřena mírou korelace jednotlivých znaků s příslušnou kanonickou osou (Marhold & Suda 2002).

Klasifikační diskriminační analýza zprostředkovaná procedurou DISCRIM programu SAS počítá podle kvantitativních znaků klasifikační funkci, která je využita k zařazování objektů do předem stanovených skupin a následně je hodnocena úspěšnost správného zařazení. Spolehlivost odlišení skupin je určena počtem a podílem nesprávně klasifikovaných jedinců (Marhold & Suda 2002).

Pomocí této analýzy můžeme zařadit objekty neznámé příslušnosti k jedné ze skupin.

Tato analýza byla provedena s použitím neparametrické metody k - nejbližších sousedů (*k nearest neighbor*) a tzv. křížového ověření (*Cross-validation*).

Pro morfometrické studie jsou důležité výstupy metody *cross-validation*, která je vhodnější ke zjištění skutečného podílu správně klasifikovaných objektů. Tato metoda počítá pro každý objekt klasifikační funkci, tento objekt se při její tvorbě nezohledňuje a je tedy počítáno s $n-1$ pozorováními. Poté je tato klasifikační funkce aplikována na zbývající objekt. Metoda pracuje s n klasifikačními funkcemi (Marhold & Suda 2002).

Diskriminační analýzy byly pro všechny soubory dat vypracovány dvakrát. Byly vypracovány jednak (i) pro diploidní a tetraploidní cytotyp a (ii) jednak pro všechny tři cytotypy. Triploidní cytotyp je velmi vzácný a ve většině případů byla početnost této skupiny menší než počet hodnocených znaků, což je porušením jednoho z předpokladů, z kterých diskriminační analýza vychází. Nicméně vzhledem k tomu, že neparametrické diskriminační analýzy bývají poměrně robustní k porušení uvedeného předpokladu (Klecka 1980), byla provedena i tato modifikace, jejíž cílem bylo zhodnotit možnosti úspěšné determinace intermediární ploidie (výsledky však byly interpretovány obezřetně). Ve výsledcích kanonické diskriminační analýzy jsou uváděny výstupy všech tří cytotypů. Pokud se výstupy lišily od výstupů vycházejících z hodnocení dvou skupin (tedy bez triploidních jedinců), je na tento fakt v textu upozorněno a jsou rozdílnosti uvedeny.

U klasifikační diskriminační analýzy je vždy uváděn výstup analýzy hodnotící jen dva základní cytotypy, neboť zahrnutím triploidního cytotypu docházelo ke zhoršení rozlišovací schopnosti klasifikační funkce přibližně o 10 - 25%. Je to způsobeno výše uvedeným artefaktem malého počtu triploidních jedinců. Nicméně pro porovnání obou výstupů je vždy uvedeno i procento úspěšnosti při zahrnutí triploidních jedinců.

6.3 Výsledky

Souhrnné výsledky a výstupy analýz jsou k dispozici na přiloženém CD-ROMu.

V analýzách jsou zahrnuti jedinci všech tří existujících ploidií rodu *Empetrum*, nicméně u výsledků jednotlivých analýz je třeba přihlížet ke skutečnosti, že triploidní cytotyp je zastoupen jen velmi malým počtem jedinců.

Proto také byly veškeré diskriminační analýzy pomocí metody DISCRIM hodnoceny jen pro diploidní a tetraploidní cytotyp.

Korelace znaků

U všech 6 analyzovaných souborů pomocí metody CORR nebyly zjištěny korelace, které by měly hodnotu korelačního koeficientu vyšší než 0,95. Z tohoto důvodu byly do následujících analýz zahrnuty všechny studované proměnné.

Znaky, které vykazovaly nejtěsnější korelace, byly v9/v10 (s nejvyšší hodnotou 0,865), v25/v27 (s nejvyšší hodnotou 0,815), nebo v30/v33 (s nejvyšší hodnotou 0,735).

6.3.1 Analýza variability na základě charakteristik listů

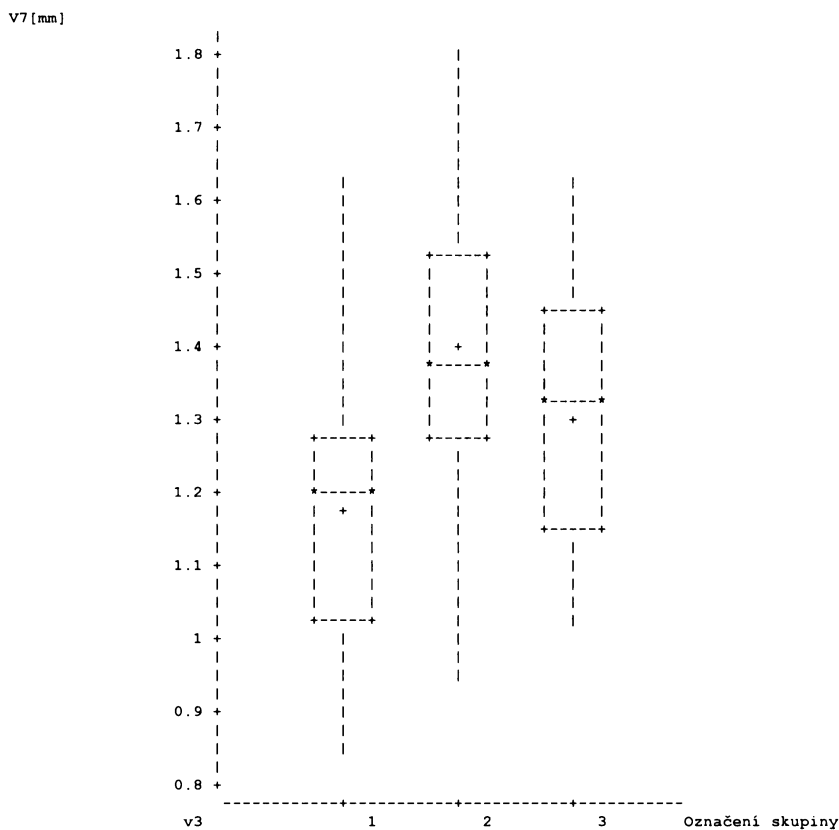
Celkem bylo analyzováno 492 rostlin. Hodnocenými znaky byly v5 (počet listů), v6 (délka listu), v7 (šířka listu), v8 (poměr délky ku šířce listu), v9 (šířka bílé linky na spodní straně listu), v10 (šířka štěrbiny na spodní straně listu).

cytotyp	počet jedinců
diploidní	248
tetraploidní	236
triploidní	8

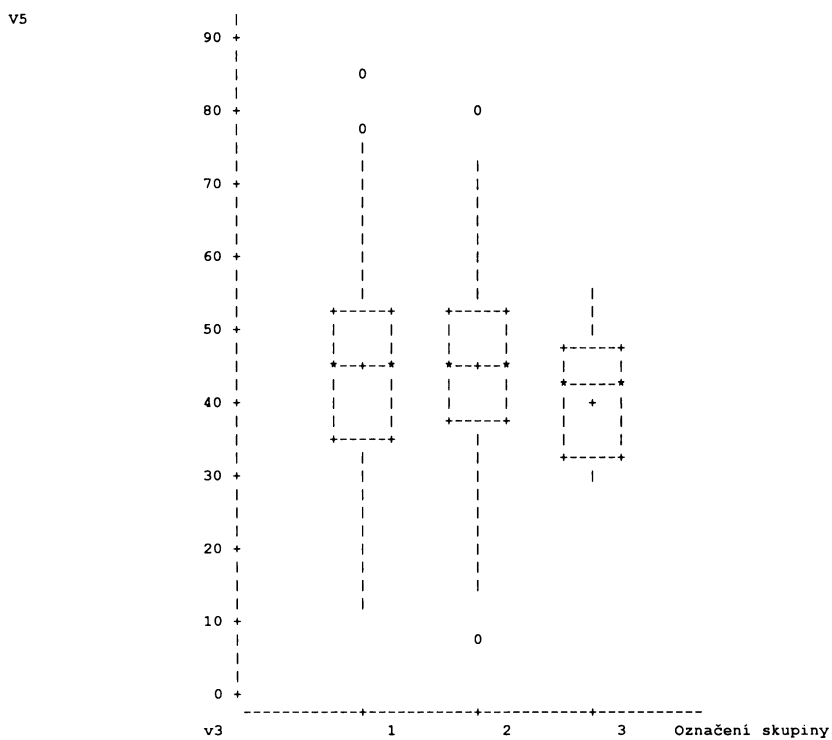
Základní statistiky

Jako první je uveden krabicový graf znaku, který nejlépe jednotlivé skupiny oddělil. Druhý znak je naopak vyobrazen proto, že se jednotlivé cytotypy podle něho neliší (byť často bývá uváděn jako taxonomicky významný).

Obr. 6.1: Krabicový graf znaku v7-šířka listu (1-diploidní cytotyp, 2-tetraploidní cytotyp, 3-triploidní cytotyp)



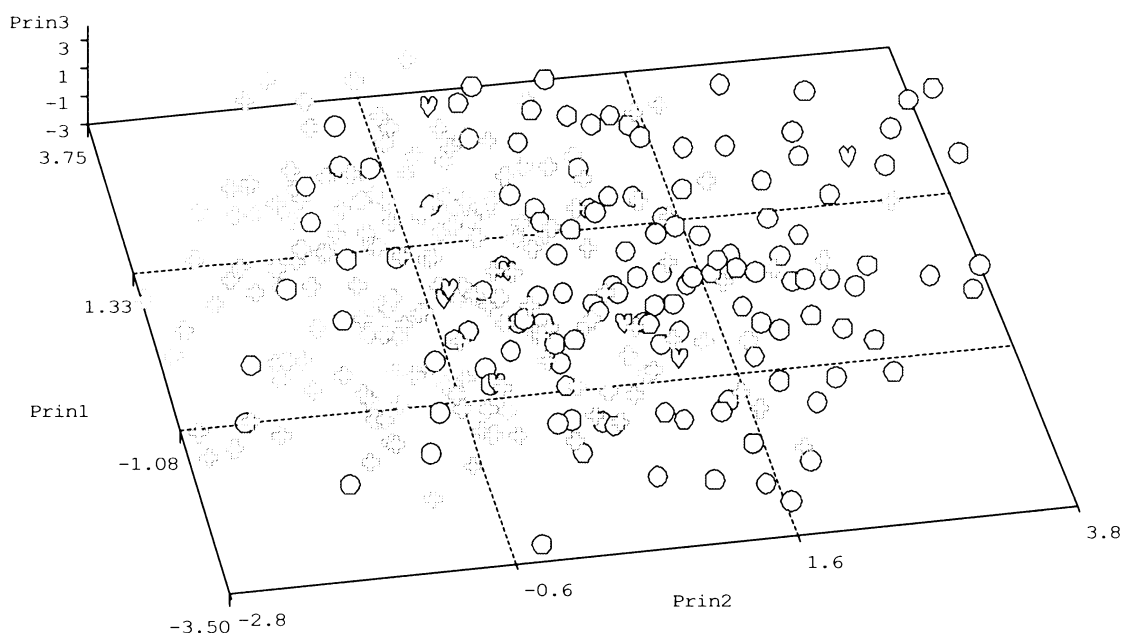
Obr. 6.2: Krabicový graf znaku v5-počet listů na lodyze (1-diploidní cytotyp, 2-tetraploidní cytotyp, 3-triploidní cytotyp)



Na základě výše uvedeného krabicového grafu lze konstatovat, že oba hlavní cytotypy mohou mít naprosto stejný počet listů a neliší se v průměrné početnosti (rozpětí znaku se pohybuje od 10 do 80 listů). Variabilita tohoto znaku není ovlivněna ploidií, ale s největší pravděpodobností ekologickými podmínkami.

Analýza hlavních komponent (PCA)

Obr. 6.3: Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě znaků na listu (○ 2x, ◻ 4x, ♥ 3x)



Výsledek PCA ukazuje značnou variabilitu ve znacích na listech. Objekty se zdají být lépe rozděleni podél druhé osy (počet listů, dochází však k jejich docela výraznému prolínání. Přesto určitý trend nenáhodné polohy objektů je z grafu patrný. Vzhledem k počtu hodnocených znaků popisují uvedené tři osy dohromady 82,4% z celkové variability. První osa zachycuje 33,47%, druhá osa 26,41% a třetí 22,52% z celkové variability. Dvojice znaků v9 a v10 (šířka bílé linky a šterbiny na spodní straně listu) nejvíce ovlivňuje rozložení znaků podél první osy (hodnoty vlastních vektorů: 0,627 a 0,624). Druhá osa je ovlivněna jen jedním znakem s vyšší hodnotou vlastního vektoru (0,742), kterým je v7 (šířka listu). Ostatní znaky podél této osy mají na rozložení objektů menší vliv. Vzhledem k tomu, že již při základních statistikách prokazoval tento znak nejlepší schopnost rozlišit od sebe jednotlivé ploidie, dochází k lépe viditelnému rozdělení shluků podél osy 2.

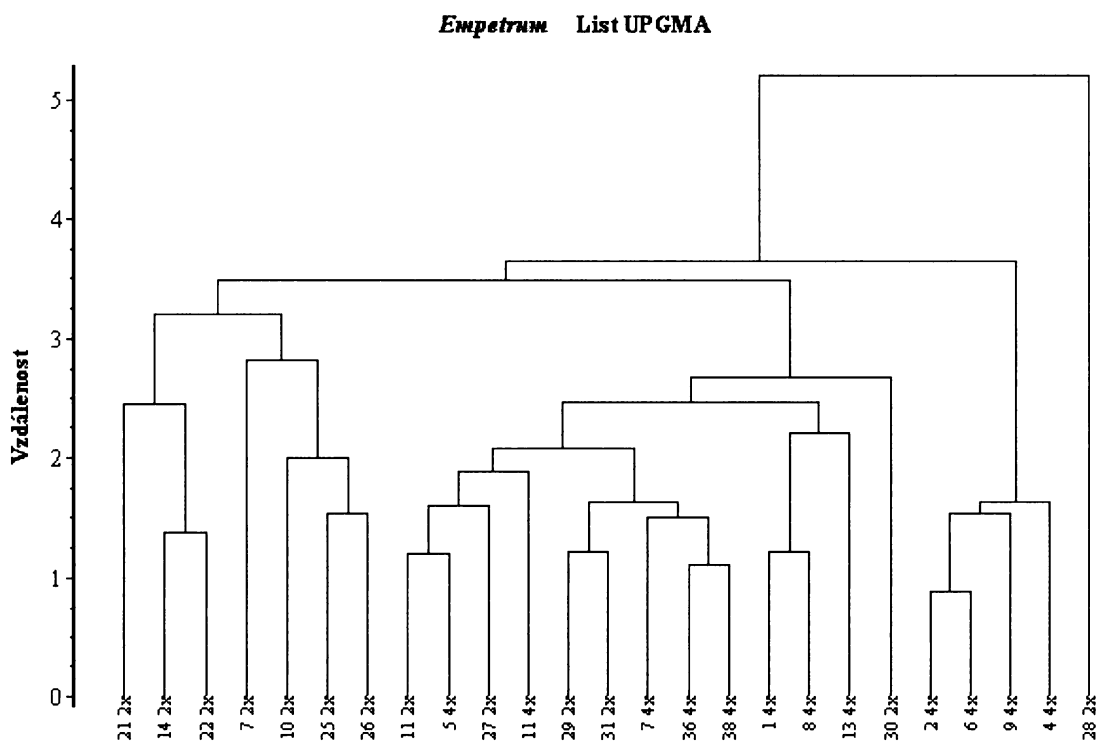
Sedm z osmi triploidních jedinců spadá na základě listových charakteristik do oblasti vzájemného prolínání diploidního a tetraploidního cytotypu. Osmý jedinec je

v oblasti diploidních jedinců. Jde o nekvetoucího jedince z lokality Hraniční louka (lok. č. 10), kde v drtivé většině roste diploidní cytotyp.

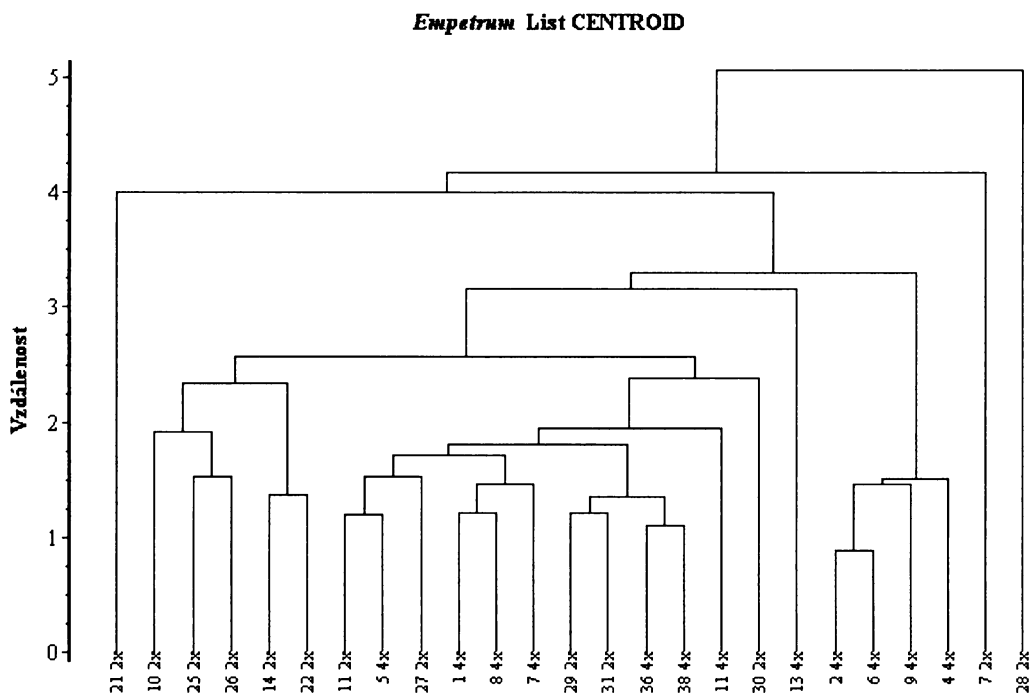
Shlukovací analýzy

Výsledky jednotlivých shlukovacích algoritmů byly přibližně stejné, lišily se v umístění lokalit 7, 13 a 21. Níže jsou uvedeny 2 výstupy, které tento odlišný trend zachycují.

Obr. 6.4: Shlukovací analýza provedená metodou UPGMA na souboru dat jedinců se znaky na listu



Obr. 6.5: Shlukovací analýza provedená centroidovou metodou na souboru dat jedinců se znaky na listu



Legenda: 2x – diploidní cytotyp, 4x – tetraploidní cytotyp. Lokality 1-11 jsou z Krkonoš, lokality 12 a 14 z Jizerských hor, 21 a 22 z Krušných hor, lokality 25-31 jsou šumavské a 36 a 38 z Jeseníků.

Z výsledků shlukovacích analýz je patrný určitý trend rozdělení jednotlivých cytotypů, nicméně vzhledem k vysoké podobnosti není rozdělení úplné a často dochází k prolínání. Na dendrogramu lze pozorovat treizákladní větve. Nejmenší zahrnuje 4 lokality tetraploidních jedinců z Krkonoš (lokality č. 2, 6, 9, 4), která je stálá bez ohledu na použitou shlukovací metodu. Druhou menší větví je větev diploidních cytotypů, ta je stálá s výjimkou lokalit 7 a 21, které jsou buď v rámci této větve, nebo se oddělují na vyšším stupni. Prostřední větev zahrnuje početný zbytek lokalit obou cytotypů. Postavení jednotlivých objektů (populací jednotlivých cytotypů) v rámci této větve je mírně proměnlivé díky vlivu výše zmíněné podobnosti a také vlivem použité shlukovací metody. Lokalita 13 je buď zahrnutá v tomto větvení nebo je oddělena na vyšší hladině větvení.

Při všech provedených shlukovacích metodách došlo k oddělení lokality 28 na nejvyšším stupni větvení.

Na základě shlukovacích analýz lze posuzovat zda se jedinci z jednotlivých pohoří preferenčně shlukují pospolu či jsou promíchány. Existuje předpoklad, že lokality

stejného pohoří si budou ve fenotypových projevech bližší. Přestože jsou populace jednotlivých lokalit a ploidii značně promíchány, lze pozorovat i vytvoření shluků, které zahrnují lokality ze stejného pohoří. Například již výše zmíněná větev tetraploidních populací (lokality 2, 4, 6, 9), která obsahuje jen lokality z Krkonoš. Dalším takovým projevem je dvojice lokalit z Jeseníků (lok. Č. 36, 38). Při všech shlukovacích metodách zůstává tato dvojice pospolu na nejnižším stupni větvení.

Bohužel na základě výsledků je možno konstatovat, že se lokality spíše promíchávají.

Lokalita 13 je tetraploidní a vyznačuje se největším průměrem šířky štěrbin na spodní straně listu, to je zřejmě důvod, proč je její postavení mírně nestabilní.

Lokalita 28 se svými diploidními jedinci je jasně oddělená na nejvyšším stupni větvení. Důvod? Jedinci této lokality dosahují zřetelně vyšších délek listů oproti všem zahrnutým populacím. Průměr hodnot délky listu je o více než 0,5mm delší, nežli u ostatních populací. Průměr šířky listů této lokality patří spíše k menším a tudíž se tato lokalita vyznačuje i největším poměrem délky ku šířce listu. Vzhledem k tomu, že je tedy ve dvou znacích z šesti výrazně odlišná, odděluje se na nejvyšším stupni větvení.

Lokalita 7 s diploidními jedinci je v průměru délky a šířky listu nejmenší a to způsobilo, že například centroidová metoda ji oddělila na druhém nejvyšším větvení do pravé části dendrogramu.

Lokalita 21 je při centroidové metodě vyřazena z diploidního větve vytvořené metodou UPGMA, tak jako lokalita 7. Zde je však původem tohoto jevu výrazně vysoký počet listů na lodyze.

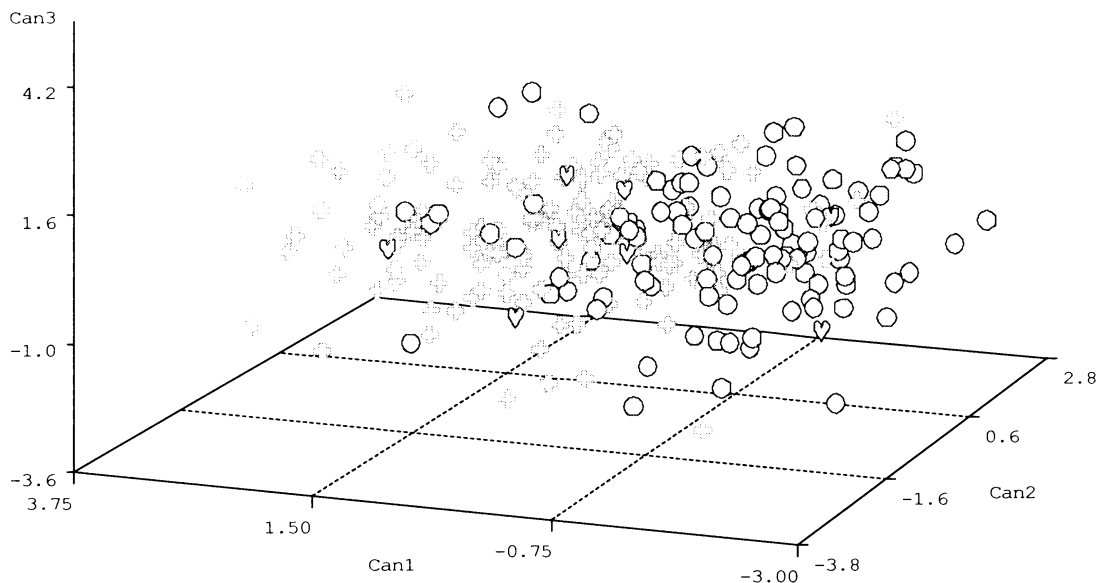
Shlukovací analýza koresponduje s výsledkem PCA. I zde je znatelné velké prolínání cytotypů na základě listových charakteristik. Menší množství jedinců či lokalit je jasně vyděleno z oblasti prolínání. U shlukovací analýzy bylo jen 9 lokalit stálých a jasně oddělených od větve zahrnující oba cytotypy.

Diskriminační analýzy

Tab. 6.5: Kanonické korelační koeficienty pro charakteristiky listu všech tří ploidii

Znak	Can1	Can2	Can3
v5	0.033860	0.483194	0.089999
v6	0.157108	-0.672265	-0.212279
v7	0.938624	-0.187629	0.171119
v8	-0.683041	-0.466500	-0.342634
v9	0.183270	0.319877	-0.658042
v10	-0.046335	0.279972	-0.309539

Obr. 6.6: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých ploidních úrovní na základě charakteristik listu (○ 2x, 4x, ♥ 3x).



Diskriminační analýza stanovila jako znaky největšího významu na rozdělení jednotlivých ploidií v7 - šířku listu a v8 - poměr mezi délkou s šířkou listu (hodnoty korelačních koeficientů viz tab. č.).

Zatímco znaky v9 a v10 (šířka linky a štěrbiny na spodu listu) měly u PCA největší vliv na rozmístění objektů podél osy 1, u diskriminační analýzy je tomu jinak. Znaky v9 a v10 ovlivnily rozmístění objektů podél třetí osy.

S druhou osou nejvíce koreluje znak v6 – délka listu.

Pokud byla analýza provedena bez triploidních jedinců, byl rozdíl pouze u znaku, který měl vliv na druhou kanonickou osu. Znaky mající největší vliv na první osu zůstaly stejné, ale nejtěsněji s druhou osou koreloval znak v5 - počet listů.

Tab. 6.6: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy diploidního a tetraploidního cytotypu na základě listových charakteristik. Uvedené jsou počty správně a nesprávně zařazených jedinců a jejich procentuální podíl

Z cytotypu	Zařazeno k cytotypu		
	2x	4x	Celkem
2x	1178 71,77	70 28,23	248 100
4x	51 21,61	185 78,39	236 100
Celkem	229 47,31	255 52,69	484 100
Chybně zařazených (%)	28,23	21,61	25,00

S použitím znaků v5, v6, v7, v8, v9, v10 na listu je možné správně určit 75 % analyzovaných rostlin.

Při provedení analýzy se začleněním všech tří cytotypů bylo možné správně zařadit jen 50,2% analyzovaných rostlin. Je to celkem logický výsledek, neboť pokud máme málopočetnou skupinu, což triploidní cytotyp je, pak například jeden špatně zařazený triploid představuje mnohem větší procentuální podíl než špatně zařazený tetraploid, kterých je mnohokrát více. Celkově pak procento špatně určených jedinců stoupá.

Úspěšnost správného určení podle listových charakteristik není moc vysoká. Ze všech analýz provedených na uvažovaných souborech dat této práce byl její výsledek nejméně spolehlivý. Dá se konstatovat, že znaky na vegetativních orgánech u rodu *Empetrum* nejsou moc použitelné ke kritickému odlišování jednotlivých cytotypů. Tyto znaky mohou být nápomocné v kombinaci s generativními znaky, pokud znaky na generativních orgánech nejsou jednoznačné.

6.3.2 Analýzy variability na základě charakteristik plodů.

Celkem bylo analyzováno 359 rostlin.

Hodnocené znaky: (v1, v2, v3), v37 – v40.

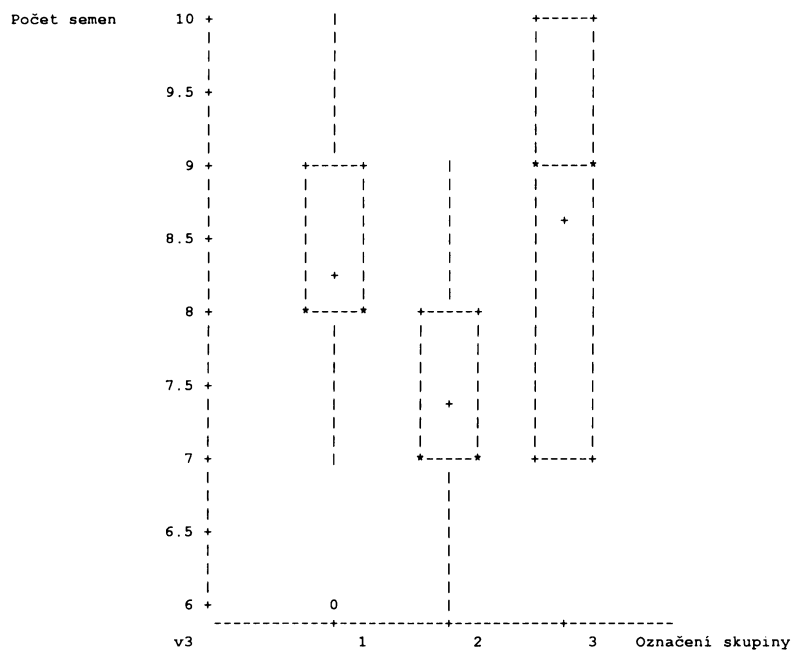
Počet hodnocených znaků je sice nízký, nicméně byla i tomuto souboru dat věnována pozornost, neboť umožňoval hodnotit charakteristiky plodu u většího počtu jedinců, než při zahrnutí znaků i na listech. Dalším důvodem bylo zjištění, že při hodnocení zároveň s listy (viz. dále), mají charakteristiky listu větší schopnost rozdělit jednotlivé cytotypy než znaky na plodech, a tudíž nebylo úplně jasné, jak se rostliny podle plodů liší.

cytotyp	počet jedinců
diploidní	147
tetraploidní	209
triploidní	3

Základní charakteristiky

Nejlépe se skupiny oddělily podle znaku v40-počet semen v peckovičce.

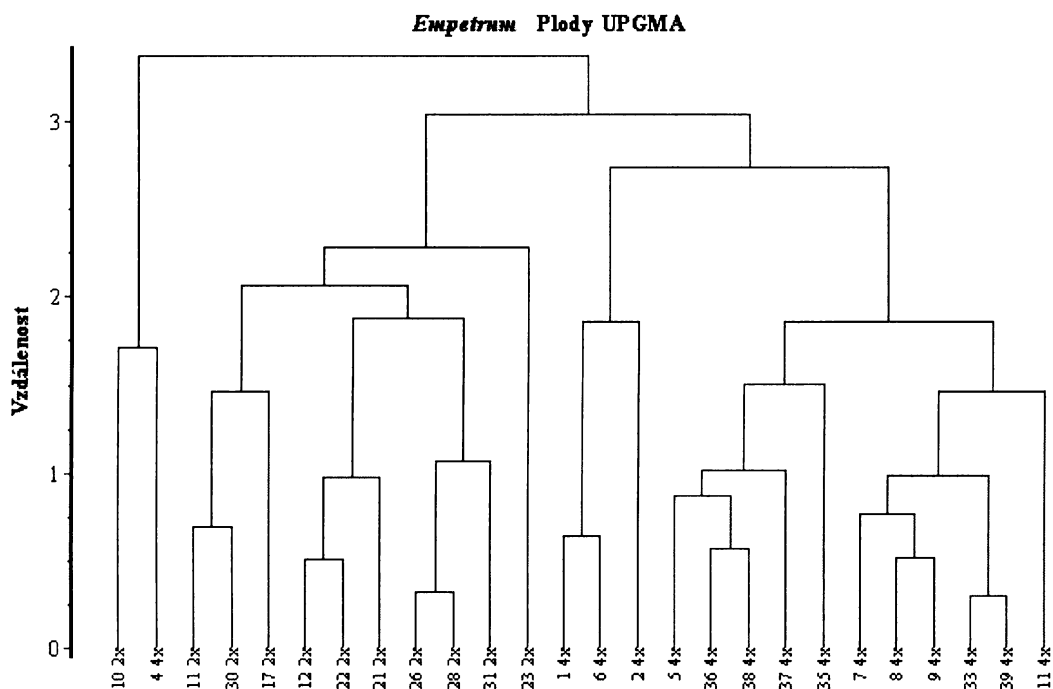
Obr. 6.7: Krabicový graf znaku v40-počet semen v peckovičce (1-diploidní cytotyp, 2-tetraploidní cytotyp, 3-triploidní cytotyp)



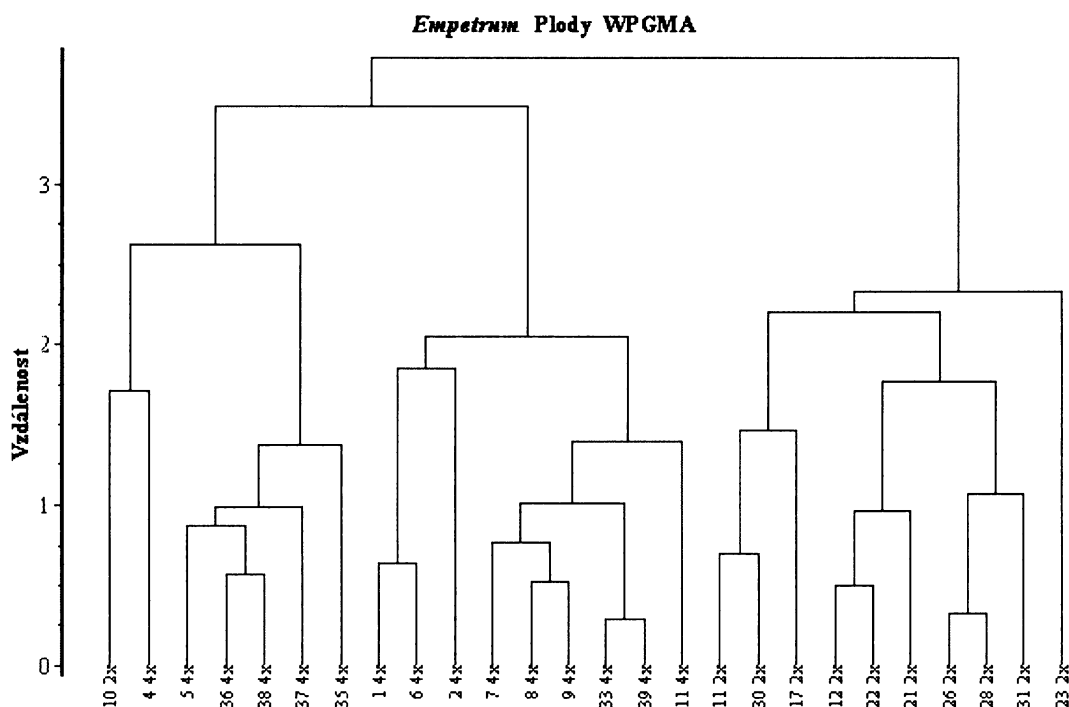
Shlukovací analýza

Výsledné dendrogramy zvolených metod vykazovaly obdobné řetězení, proto jsou níže uvedeny jen výstupy dvou algoritmů.

Obr. 6.8: Shlukovací analýza provedená metodou UPGMA na souboru dat jedinců se znaky na plodu



Obr. 6.9: Shlukovací analýza provedená metodou WPGMA na souboru dat jedinců se znaky na plodu



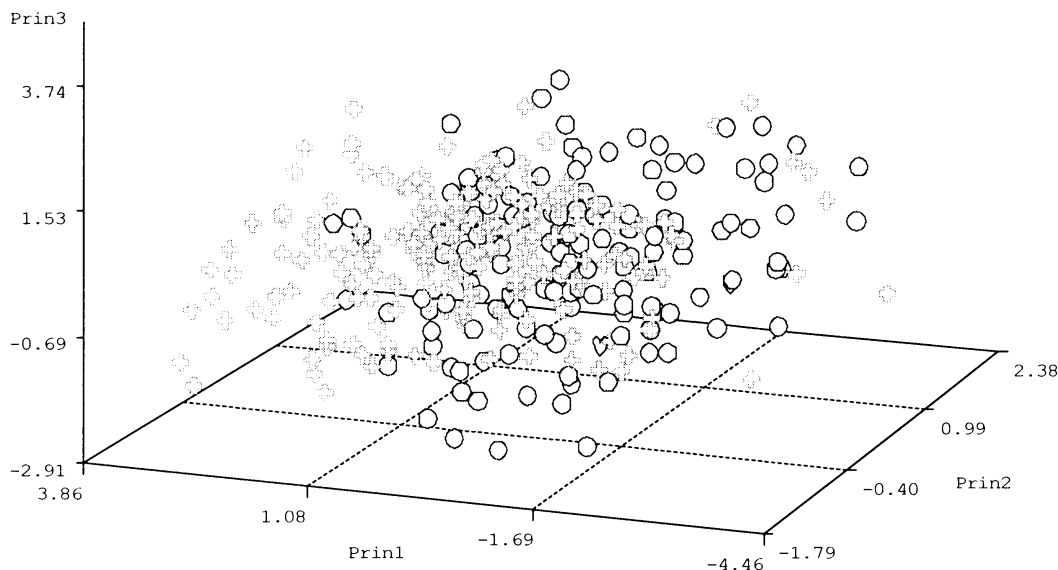
Na základě uvedených výstupů shlukovacích analýz lze konstatovat, že kromě diploidních jedinců z lokality Hraniční louka (lok. 10) v Krkonoších a tetraploidních jedinců SV od Petrovy boudy (lok. 4) rovněž z Krkonoš, došlo k vytvoření shluků diploidních a tetraploidních zástupců lokalit, kteří se vzájemně nemísili.

Lokalita 10 v rámci diploidních cytotypů vykazovala nejvyšší poměr mezi znaky v37 a v38 (o 0,08 vyšší oproti druhé nejvyšší hodnotě). Průměr zbylých diploidních populací při nezapočítání lokality 10 činí 1,17 a hodnota indexu této lokality je 1,29.

Důvod, proč byla lokalita č. 4 mimo větve tetraploidů, je možná velmi jednoduchý. Plody na této lokalitě byly sbírány jako první s mírným odstupem oproti ostatním tetraploidním populacím. Dá se tedy předpokládat, že ještě nemusely být plně zralé. Na druhou stranu, ale byla ve stejný den prosbírána i lokalita č. 5 a ta nebyla z větví tetraploidů vyřazena. Lokalita č. 5 však není tak početná a sesbíraných plodů bylo jen 9 oproti 25 z lokality 4. Vzhledem k tomu, že na této malé lokalitě roste zhruba polovina jedinců na vcelku velkých kamenech a zbylé při zemi, je to možná příčina toho, proč tato lokalita nebyla vyřazena ze shluku tetraploidů. Na kamenech dříve odtaje sníh a rostliny rychleji začnou kvést a plodit oproti jedincům při zemi. Celkový poměr mezi více a méně zralými plody způsobil vyšší průměry hodnot znaků než u lokality č. 4.

Analýza hlavních komponent (PCA)

Obr. 6.10 : Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě znaků na plodu (○ 2x, □ 4x, ♥ 3x)



Z výsledku metody PCA (obr.6.10) je zřejmé, že v tomto datovém souboru nedochází k zřetelnému oddělení zkoumaných skupin, tak jak tomu bylo pomocí shlukovací metody. Příčinou je skutečnost, že shlukovací metoda pracuje s populačními průměry a dochází tak k setření velké variability mezi jednotlivými jedinci.

Vzhledem k nízkému počtu znaků vyjadřují všechny tři osy dohromady téměř 100% celkové variability. Osa 1 vyjadřuje 52,4% z celkové variability, osa 2 shrnuje 25% variability a třetí osa popisuje 22,3% variability.

Tab. 6.7: Vlastní vektory hlavních komponent PCA

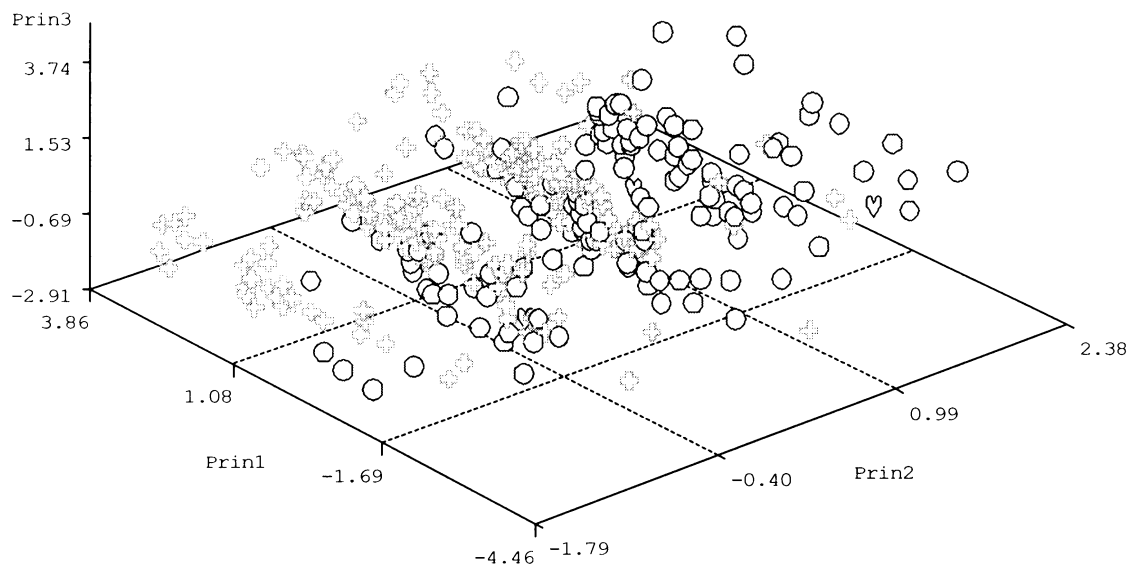
Znak	osa 1	osa 2	osa 3
v37	0.533792	-.035316	0.668534
v38	0.688239	-.004463	0.010778
v39	-.491273	-.031182	0.742126
v40	0.006612	0.998880	0.046852

K rozložení objektů podél osy 1 přispívá nejvíce znak v38 – délka peckovičky.

S druhou osou nejtěsněji koreluje znak v40 - počet semen v peckovičce s hodnotou vlastního vektoru víc než 0,99

(viz tab. 6.7). Rozložení podél druhé osy je touto výrazně vysokou hodnotou vlastního vektoru výrazně ovlivněno. Znak v40 nabývá jen pěti stavů, což je viditelné, pokud grafický výstup natočíme, tak abychom na osy 1 a 2 viděli shora. Objekty jsou potom seskupeny do pěti shluků.

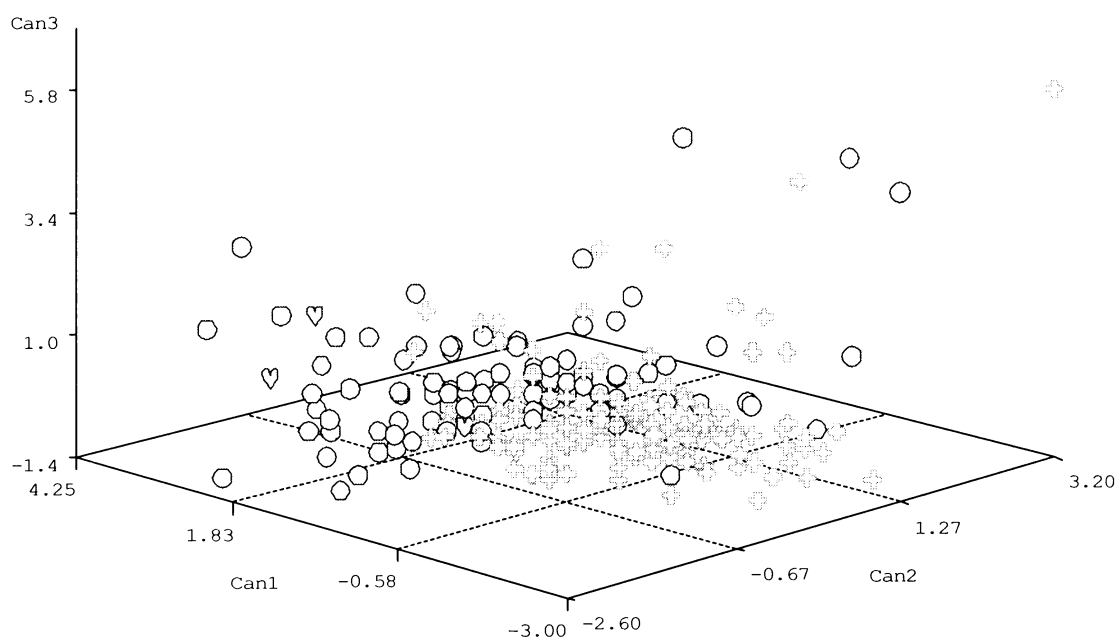
Obr. 6.11: Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě znaků na plodu (○ 2x, ⊕ 4x, ♥ 3x) při pohledu shora



Triploidní jedinci jsou na základě charakteristik plodů v části grafu patřící spíše diploidnímu cytotypu. Ten, který je tetraploidům nejvíce podobný je z lokality Lubošská planina. Měl nižší počet semen a vyšší hodnotu poměru průměru ku délce peckovičky, což jsou znaky charakteristické spíše pro tetraploidy. Triploidní jedinec, který se nachází v oblasti patřící vesměs diploidním jedincům, je z lokality Hraniční louka (lok. č. 10).

Diskriminační analýzy

Obr. 6.12: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých ploidních úrovní na základě charakteristik plodu (○ 2x, ⊕ 4x, ♥ 3x)



Z grafu obr. 6.11 je patrné prolínání cytotypů, jako u obr. č. 6.12, nicméně i tak se dá konstatovat, že podle osy 1 i osy 2 dochází mírně ke vzniku shluků, které představují variabilitu velké části jedinců jednotlivých cytotypů. Znak, který s touto osou nejtěsněji koreluje, je v40 – počet semen v peckovičce (hodnota kanonického korelačního koeficientu je 0,726, viz tab. 6.8). S druhou osou nejtěsněji koreluje znak v39 – délka peckovičky s hodnotou kanonického korelačního koeficientu 0,689 (viz Tab. 6.8).

Tab. 6.8: Kanonické korelační koeficienty pro charakteristiky plodu u všech tří ploidii.

Znak	Can1	Can2	Can3
v37	-0.608769	0.326482	-0.103795
v38	-0.269604	-0.198044	0.010122
v39	-0.255045	0.689163	0.105267
v40	0.726415	0.595767	-0.046744

Z výsledků diskriminačních analýz lze dojít k přibližně stejným závěrům o triploidních jedincích jako z výsledků PCA. Triploid, který se nachází v oblasti, kde se promíchávají diploidní s tetraploidními jedinci, je z lokality 11 (Lubošská planina). A zbylí dva triploidi nacházející se v prostoru diploidních jedinců jsou z lokalit 2 a 10 (Úpská louka a Hraniční louka). Tato skutečnost je zde uváděna z důvodu následného diskutování s výsledky souboru dat se znaky na listech a plodech.

Výsledky klasifikační diskriminační analýzy procedurou DISCRIM jsou uvedeny v tabulce 6.9.

Tab. 6.9: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy plodných rostlin *E. nigrum* (2x) a *E. hermaphroditum* (4x) na základě znaků v37, v38, v39, v40. Uvedené jsou počty správně zařazených a nesprávně zařazených jedinců a jejich procentuální podíl

Z cytotypu	Zařazeno k cytotypu		
	2x	4x	Celkem
2x	119 78,91	31 21,09	147 100
4x	31 14,83	178 85,17	209 100
Celkem	147 41,29	209 58,71	356 100
Chybně zařazených (%)	21,09	14,83	17,13

S použitím uvedených znaků na plodu je možné správně určit 82,87 % analyzovaných rostlin. Při provedení analýzy se začleněním všech tří cytotypů bylo možné správně zařadit jen 75,66% analyzovaných rostlin.

Triploidní jedinci jsou velmi vzácní, proto byla tato analýza vypracována po jejich vyloučení. Bylo by vhodnější provádět i metodu CANDISC bez triploidních jedinců, nicméně jejich umístění a hodnocení touto metodou je velmi zajímavé z pohledu porovnání s výsledky PCA.

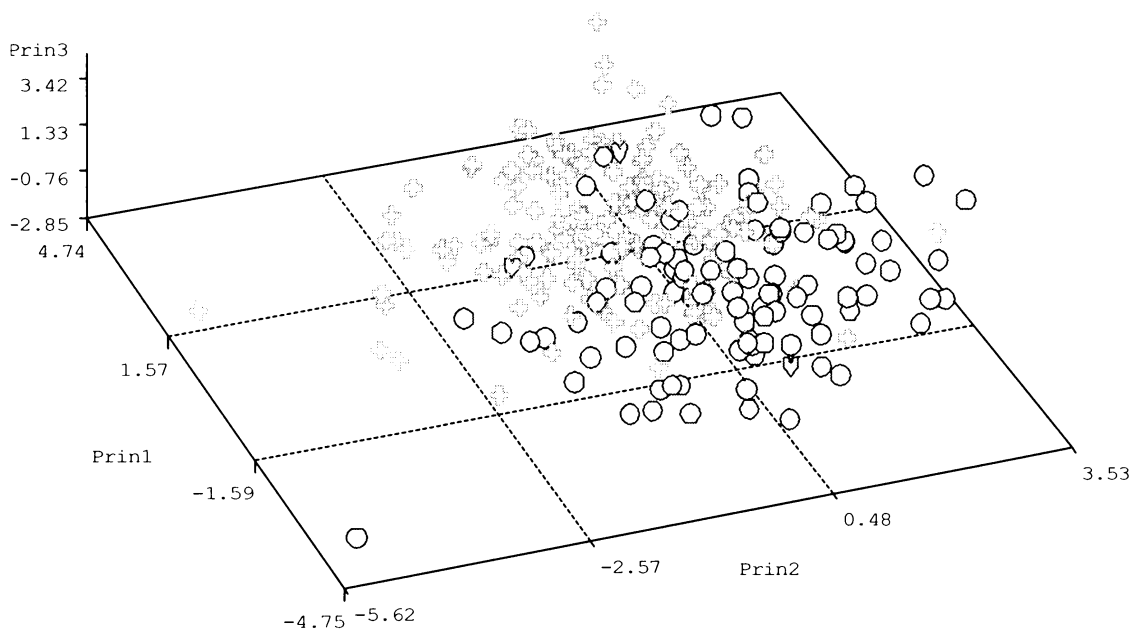
6.3.3 Analýzy variability na základě charakteristik listů a plodů.

V této analýze bylo hodnoceno 278 jedinců a byla provedena na souboru dat s hodnotami znaků (v1-v3),v5-v10, v37-v40.

Výstupy základních statistik nejsou uvedené. Charakteristiky plodů byly probrány v předchozí kapitole a variabilita znaků na listech byla probrána v kapitole hodnotící jen znaky na listech.

Analýza hlavních komponent (PCA)

Obr. 6.13: Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě znaků na plodu a listu (○ 2x, ◐ 4x, ♥ 3x)



Pokud porovnáme výstupy této a předchozí analýzy je zřejmé, že přidáním hodnot listů se jednotlivé shluky poněkud lépe separují. Je samozřejmé, že čím více znaků poslouží k hodnocení, tím lepší je šance správného zařazení. Nicméně lepší rozdělení cytotypů přidáním listů potvrzuje i výstup vlastních vektorů nových proměnných (hlavní komponenty), které jsou při PCA vytvářeny, aby došlo k zmenšení n rozměrného prostoru na prostor trojrozměrný (viz tab. 6.10).

Tab. 6.10: Vlastní vektory hlavních komponent PCA

v5	0.029327	0.064054	0.211712
v6	0.166148	0.256845	0.685012
v7	0.560362	-0.210567	0.178016
v8	-0.318990	0.400316	0.481804
v9	0.560362	-0.210567	0.178016
v10	0.088503	0.021742	0.175332
v37	0.257718	0.405281	-0.238896
v38	0.312059	0.550782	-0.281857
v39	-0.187402	-0.416486	0.151033
v40	-0.187130	0.198621	0.018854

S první osou, která vždy vyjadřuje největší procento z celkové variability, v tomto případě 26,5%, je nejtěsněji korelována první trojice znaků na listech (šířka listu, šířka bílé linky na spodní straně listu a poměr délky ku šířce listu). Znaky na plodech se lépe projeví až v rámci druhé osy. Ta vyjadřuje 20% z celkové variability a s ní jsou nejtěsněji korelovány znaky průměr, délka peckovičky a poměr těchto znaků. Třetí osa popisuje 15,4% z celkové variability.

Po hodnocení plodů i s listy se zdá být trend umístění triploidních jedinců opačný nežli u hodnocení předchozího souboru dat. Zde jsou dva triploidi bližší tetraploidnímu shluku a jen jeden diploidnímu.

Diskriminační analýzy

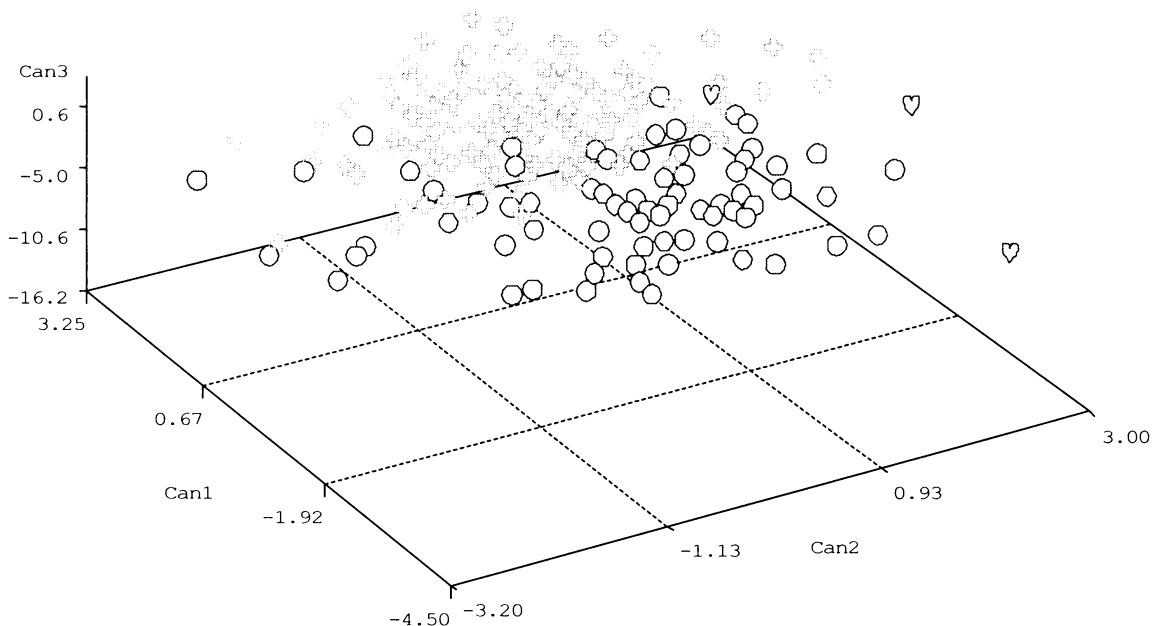
Tab. 6.11: Kanonické korelační koeficienty pro charakteristiky plodu a listu u všech tří ploidii

Znak	Can1	Can2	Can3
v5	-0.015730	-0.129902	0.008515
v6	0.159832	0.124235	0.002514
v7	0.785831	0.508054	0.136688
v8	-0.534125	-0.323411	0.040029
v9	0.785831	0.508054	0.136688
v10	0.140581	-0.157758	-0.011207
v37	0.407432	-0.450795	0.046709
v38	0.232593	-0.063631	-0.067837
v39	0.073250	-0.390237	0.003377
v40	-0.613330	0.195403	0.101060

K rozložení objektů podél první kanonické osy jsou nejdůležitější znaky šířka listu a šířka bílé linky na spodní straně listu. Dalším nejtěsněji korelovaným znakem je počet semen v peckovičce.

S druhou osou nejvíce korelují opět první dva uvedené znaky a třetím důležitým znakem je průměr peckovičky. Nicméně nejlépe je rozdělení cytotypu viditelné podél první osy, tak jak jej vyobrazuje následující obrázek 6.14.

Obr. 6.14: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých ploidních úrovní na základě charakteristik listu a plodu (○ 2x, ◐ 4x, ♥ 3x)



Tab. 6.12: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy diploidního a tetraploidního cytotypu na základě listových charakteristik bez znaku v10. Uvedené jsou počty správně a nesprávně zařazených jedinců a jejich procentuální podíl.

Z cytotypu	Zařazeno k cytotypu		
	2x	4x	Celkem
2x	74 73,27	27 26,73	101 100
4x	20 11,49	154 88,51	174 100
Celkem	94 34,18	181 65,82	275 100
Chybně zařazených (%)	26,73	11,49	17,09

S použitím uvedených znaků na plodu je možné správně určit 82,91 % analyzovaných rostlin. Při provedení analýzy se začleněním všech tří cytotypů bylo možné správně zařadit jen 67,27% analyzovaných rostlin.

Výsledek této analýzy a analýzy provedené pouze na plodech se liší jen o 0,04%, přestože v hodnoceném souboru dat bylo o 81 jedinců méně, tento nedostatek byl ale zřejmě vykompenzován přidáním znaků na listech. Dá se tedy usoudit, že s růstem počtu hodnocených znaků přímo úměrně roste i schopnost rozlišit jednotlivé cytotypy.

6.3.4 Analýzy jednotlivých cytotypů s využitím listových charakteristik a květních charakteristik samičího pohlaví (♀).

Celkem u 333 rostlin byly hodnocené tyto znaky: (v1-)v4-v12, v18-v34

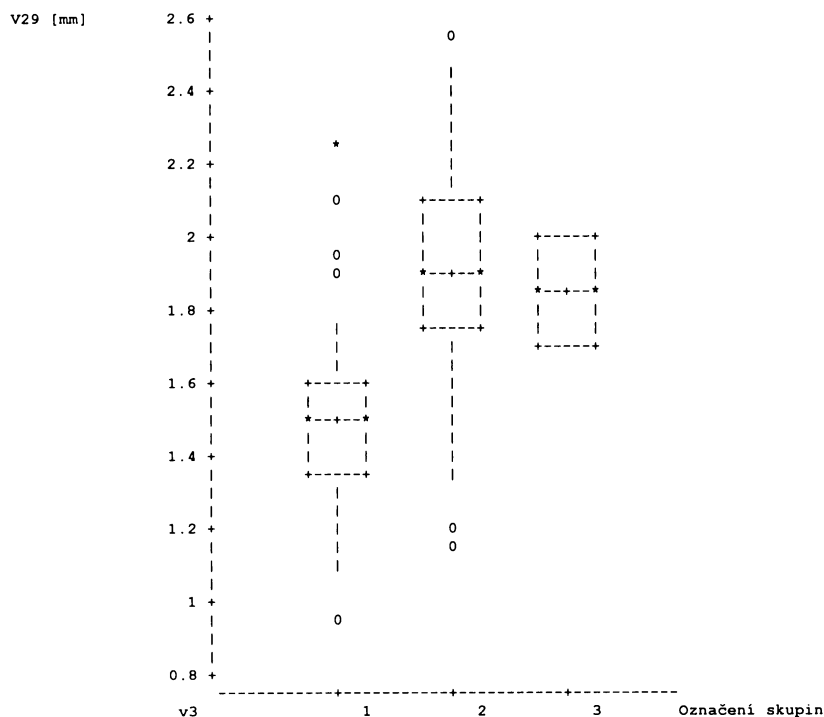
Přehled počtu jedinců jednotlivých ploidii a pohlavnosti květu pro analýzy se souborem dat listových a květních charakteristik samičího pohlaví.

cytotyp	počet jedinců	pohlavnost květu	počet jedinců
diploidní	133	jednopolhavné ♀	130
		oboupohlavné	3
tetraploidní	197	jednopolhavné ♀	23
		oboupohlavné	174
triploidní	3	oboupohlavné	3

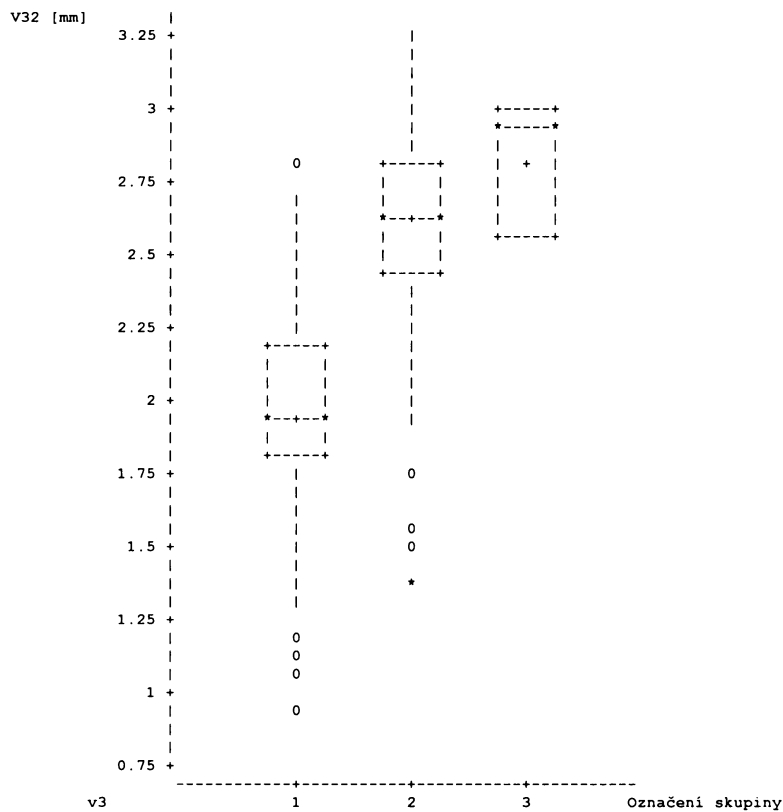
Základní statistiky

Z hodnocených 29 znaků je níže uveden výstup 3 znaků na květech, které nejlépe jednotlivé skupiny oddělily, především diploidní a tetraploidní cytotyp.

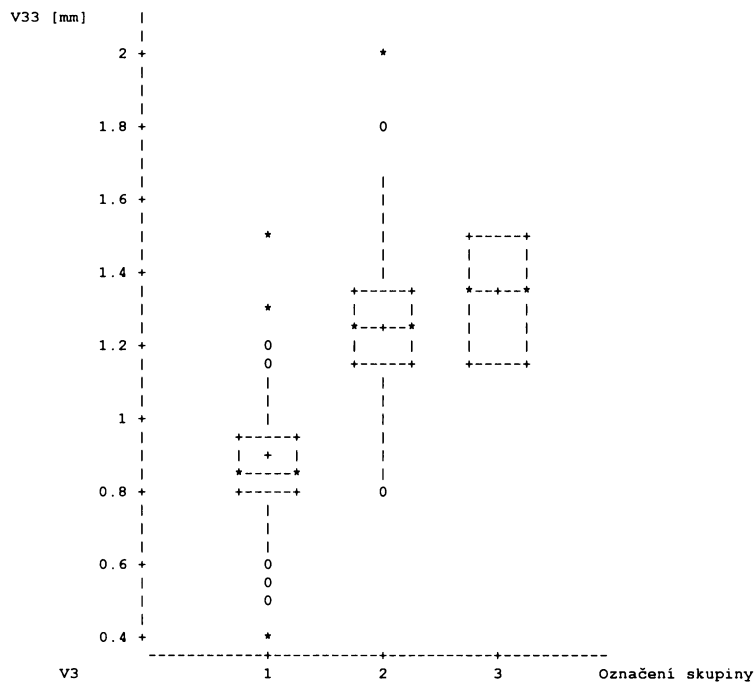
Obr. 6.15: Krabicový graf znaku v29-délka kališního lístku [mm] (1-diploidní cytotyp, 2-tetraploidní cytotyp, 3-triploidní cytotyp)



Obr. 6.16:Krabicový graf znaku v32-délka korunního lístku [mm] (1-diploidní cytotyp, 2-tetraploidní cytotyp, 3-triploidní cytotyp)



Obr. 6.17:Krabicový graf znaku v33-šířka korunního lístku [mm] (1-diploidní cytotyp, 2-tetraploidní cytotyp, 3-triploidní cytotyp)

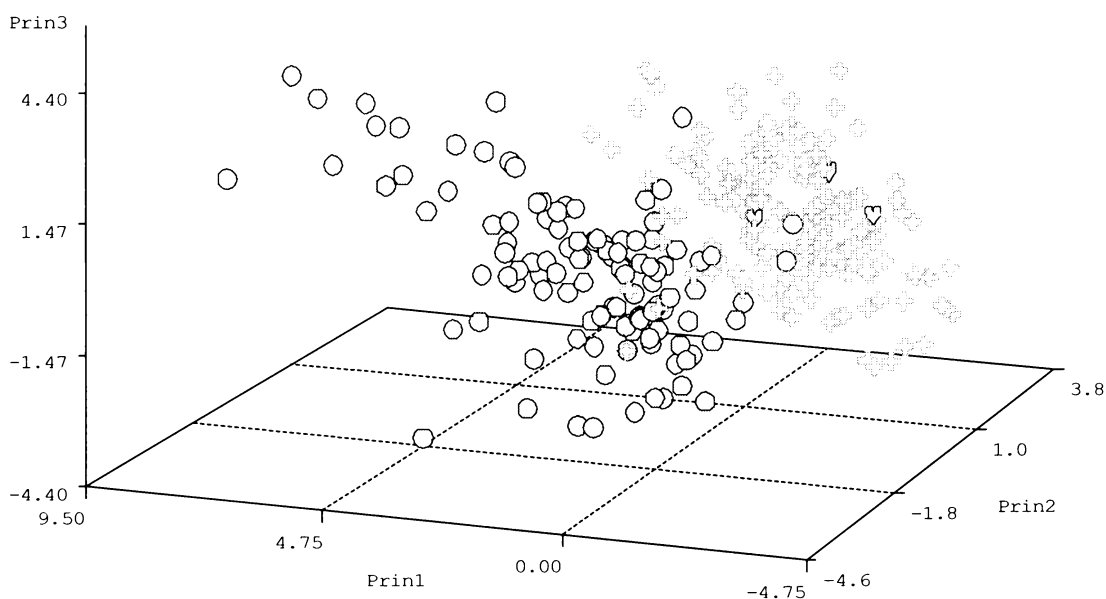


Všechny tři krabicové grafy velmi dobře vyobrazují schopnost uvedených znaků separovat od sebe diploidní a tetraploidní cytotyp. Diploidní cytotyp dosahuje ztelně

menších hodnot. Box plot triploidní cytotypu se v zásadě sousedí s tetraploidním cytotypem, jen s menším rozpětím variability, což je ovlivněno tím, že byli do této analýzy zahrnuti jen 3 jedinci. Blízký vztah mezi tetraploidem a triploidem je znatelný i v níže uvedených výstupech, tak jako velmi dobré separování diploidního cytotypu od tetraploidního.

Analýza hlavních komponent (PCA)

Obr. 6.18: Grafický výstup PCA všech tří plodných úrovní na základě charakteristik listů, květních obalů a samičích částí květu (○ 2x, ⊕ 4x, ♥ 3x).



Podle výše uvedených výsledků PCA je vidět, že tato metoda dokáže celkem dobře oddělit jednotlivé cytotypy. První osa vysvětluje 22,5% variability, druhá osa 10,1% a třetí 8,8% u celkové variability. Všechny tři osy postihují dohromady 41% z celkové variability.

Dalším zajímavým prvkem je začlenění triploidních jedinců v rámci tetraploidního shluku. Téma triploidních jedinců bude více diskutováno na konci kapitoly morfometrických analýz s ohledem na výstupy ostatních analýz.

Diploidní cytotyp podle těchto výstupů vykazuje větší variabilitu podél osy 1 oproti tetraploidům. První osa je podle hodnot vlastních vektorů hlavních komponent nejvíce ovlivněna znaky v30, v29, v24, v26 (šířka a délka kališního lístku, šířka největšího listenu a délka nejmenšího listenu). Více méně to odpovídá skutečnosti, kdy diploidi pro tyto znaky (v30, v29, v24) dosahují velmi často vysokých hodnot (běžných

pro tetraploidy), zatímco tetraploidní cytotyp jen zřídka nabývá malých velikostí typických pro diploidy.

K rozložení objektů podél druhé osy přispívají největší měrou znaky v9, v10 a v31 (šířka bílé linky a šterbiny na spodní straně listu, poměr délky a šířka kališního lístku).

Přestože v diskriminační analýze (viz dále) má pohlavnost květů vliv na rozmístění objektů podél osy 1 největší vliv, u PCA tomu tak zdaleka není. Pohlavnost je až na osmém místě ve významu a předešlých 7 znaků patří ke znakům na květních obalech. Zdá se, že pokud jde o soubor jednopohlavných samičích rostlin a květních obalů se samičími částmi oboupohlavných rostlin, jsou mnohem průkaznější hodnoty na květních obalech. Nicméně, jak už bylo zmíněno, diskriminační analýza vyústila v poněkud jiné výsledky.

Diskriminační analýzy

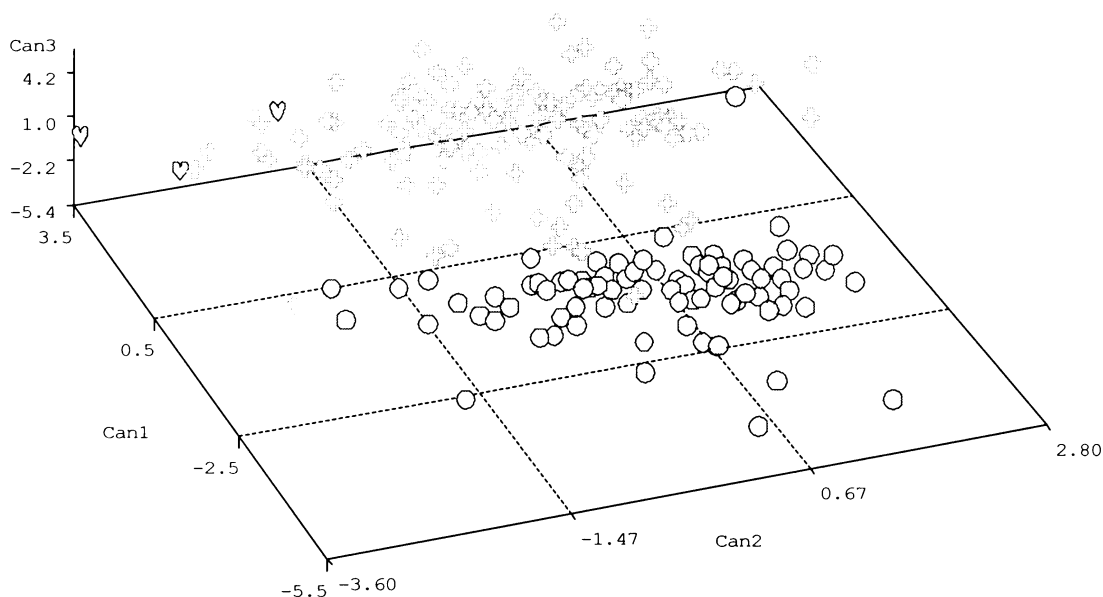
Tab. 6.13: Kanonické korelační koeficienty pro soubor rostlin všech tří ploidií se znaky samičího pohlaví a listů

Znak	Can1	Can2	Can3
v4	0.938245	0.081284	-0.042194
v5	0.003215	0.290792	-0.031183
v6	-0.091951	0.076855	-0.025378
v7	-0.325442	-0.006770	0.013129
v8	0.193451	0.091792	0.012618
v9	-0.048540	0.209919	-0.019145
v10	0.055329	0.008847	0.004858
v11	-0.215802	-0.072597	0.029443
v12	-0.026256	-0.259960	0.034522
v18	0.119165	-0.309247	0.037388
v19	0.222604	0.217708	-0.024917
v20	-0.354609	-0.271928	0.004006
v21	-0.460766	-0.094475	0.039923
v22	-0.327521	0.058675	-0.010141
v23	-0.412822	-0.020833	-0.069103
v24	-0.444362	-0.033375	0.103751
v25	0.176986	0.096725	-0.006484
v26	-0.408769	-0.032236	0.043410
v27	-0.365885	0.162285	-0.051205
v28	-0.007565	-0.447974	0.050612
v29	-0.502972	0.038988	-0.020230
v30	-0.459405	0.083459	0.031912
v31	-0.021578	-0.073604	0.013696
v32	0.790122	-0.050752	-0.023937
v33	0.827878	0.025889	-0.115327
v34	-0.203288	-0.091312	0.037300

První osa je podle hodnot korelačních koeficientů nejvíce ovlivněna znakem v4 – pohlavnost květů. Následující znaky co do významnosti jsou v33, v32, s mírným odstupem v29 (šířka a délka korunního lístku, délka kališního lístku).

Rozložení objektů podél druhé kanonické osy nejlépe popisuje znak v28 a v18 (poměr délky a šířky nejmenšího listu, délka staminodií).

Obr. 6.19: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých plodných úrovní na základě charakteristik samičích květních částí a listů (○ 2x, ⊕ 4x, ♥ 3x)



Na základě výše uvedeného obrázku lze konstatovat, že díky této metodě došlo u souboru samičích charakteristik květů k velmi dobrému oddělení cytotypů podél osy 1. Tak, jak už bylo výše uvedeno, je nejlépe korelována s pohlavností, šířkou a délkou korunního lístku.

Triploidní jedinci zde mají oproti dosavadním analýzám nejzřetelnější postavení a toto postavení je v oblasti tetraploidů, dokonce na opačném konci grafu než se nachází diploidní shluk. Toto umístění je mírně odlišné od výsledků PCA. Je to díky jiným znakům, které diskriminační metoda stanovila jako nejtěsněji korelovány s osou 1. V zásadě je to tím, že diskriminační analýza pracuje už s předem rozdělenými skupinami a hledá znak, který je nejlépe odděluje. Vzhledem k tomu, že tato metoda přiřadila nejvyšší význam na rozdělení objektů jednotlivých cytotypů podél osy 1 znaku v4 (pohlavnost květu), vedlo to k onomu vzdálenému postavení triploidů od diploidů, neboť triploidní jedinci z tohoto souboru dat mají všichni oboupohlavné květy, tak jako většina tetraploidy.

Tab. 6.14: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy kvetoucích rostlin *E. nigrum* (2x) a *E. hermaphroditum* (4x) pro znaky na listech a samičích částech květu (v1-v12,v18-v34). Uvedené jsou počty správně a nesprávně zařazených jedinců a jejich procentuální podíl

Z cytotypu	Zařazeno k cytotypu		
	2x	4x	Celkem
2x	130	3	133
	97,74	2,26	100
4x	17	180	197
	8,63	91,37	100
Celkem	147	183	330
	44,55	55,45	100
Chybně zařazených (%)	2,26	8,63	6,06

S použitím uvedených znaků na listech a na květu se samičími částmi se podařilo zařadit **93,94%** analyzovaných rostlin ke správnému cytotypu. Při provedení analýzy i s třemi triploidními jedinci došlo ke snížení rozlišovací schopnosti na 83,18%.

Při analýze metodou CANDISC bez triploidních jedinců byla trojice prvních znaků nejlépe korelujících s osou 1 stejná jako při provedené analýze s triploidními jedinci. V ostatních znacích se už analýzy rozcházely, nicméně další znaky měly u obou analýz výrazný odstup v absolutních hodnotách korelačních koeficientů od první trojice.

Hledání znaků, které by nejlépe jednotlivé ploidie oddělily na základě tohoto souboru znaků, ukázalo překvapivý výsledek. Už pouhým odebráním jakéhokoliv znaku z 29 hodnocených dojde ke snížení úspěšnosti správného rozdělení cytotypů. Bezpečně nám však stačí jeden z těchto dvou znaků (pohlavnost či šířka korunního lístku), aby se nám podařilo s **92,12%** pravděpodobností správně určit, k jakému cytotypu jedinec patří a tento výsledek je překonán až hodnocením minimálně 11 znaků na 92,73%.

6.3.5 Analýzy jednotlivých cytotypů s využitím listových charakteristik a květních charakteristik samčího pohlaví (♂).

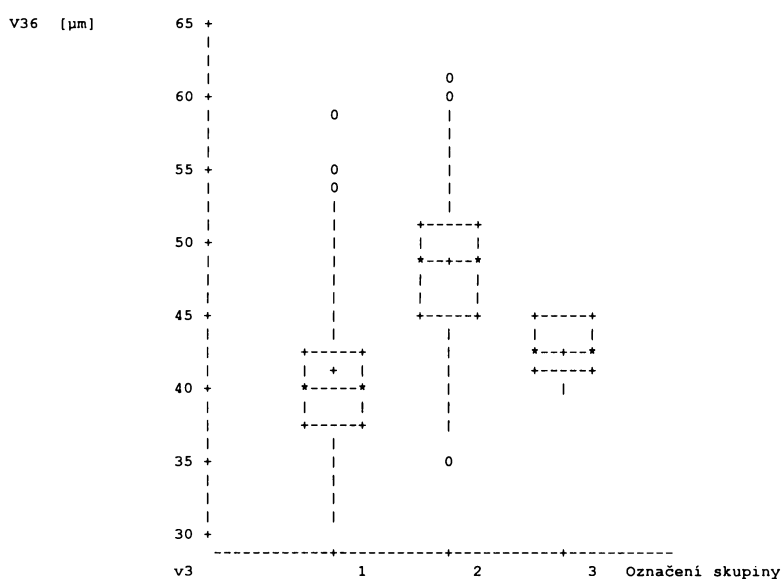
Celkem bylo analyzováno 348 rostlin podle 33 znaků, kterými byly: (v1-)v4-v17, v21-v36.

cytotyp	počet jedinců	pohlavnost květu	počet jedinců
diploidní	138	jednopolhavné ♂	134
		oboupohlavné	4
tetraploidní	203	jednopolhavné ♂	29
		oboupohlavné	174
triploidní	7	jednopolhavné ♂	4
		oboupohlavné	3

Základní statistiky

Výsledky analýzy kvetoucích jedinců s předchozím souborem dat pomocí metody UNIVARIANTE byly obdobné jako výsledky pro samičí květy a samičí části oboupohlavných květů, proto budou jejich výstupy dostupné jen na přiloženém CD-ROMu. Níže jsou vyobrazeny jen krabicové grafy znaků v36-velikost pylové tetrády, v35 – vitalita pylu, které jsou součástí samčího pohlaví.

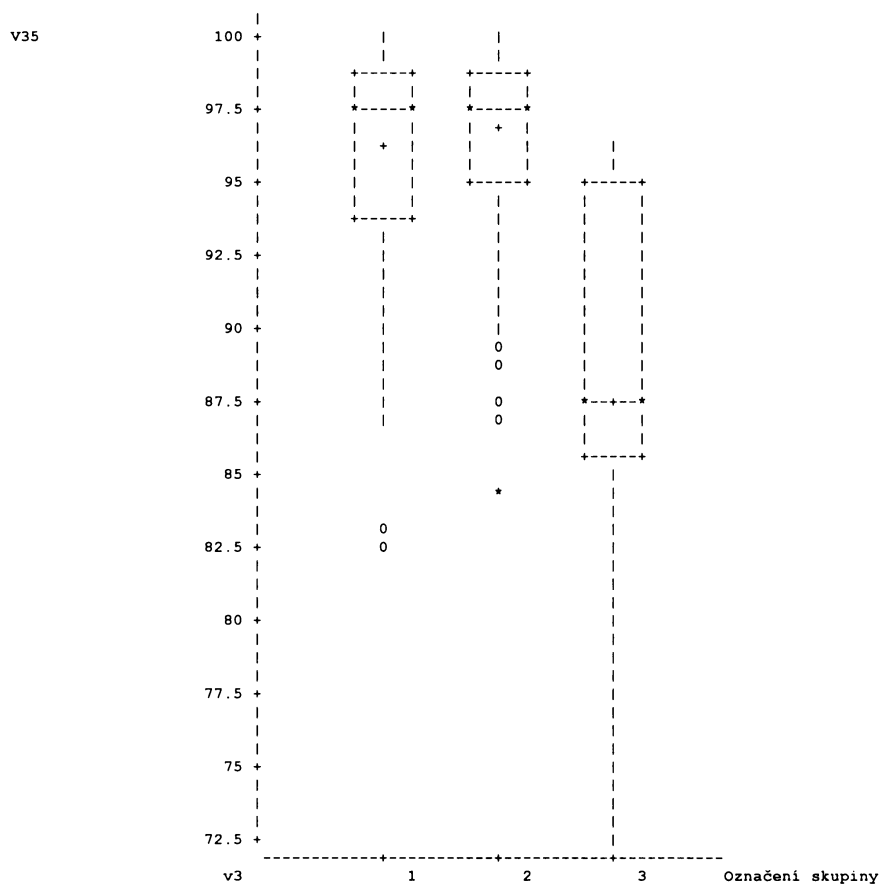
Obr. 6.20: Krabicový graf znaku v36-velikost pylové tetrády [μm] (1-diploidní cytotyp, 2-tetraploidní cytotyp, 3-triploidní cytotyp)



Z krabicového grafu lze soudit, že dochází k mírnému oddělení diploidního a tetraploidního cytotypu. Oba cytotypy dosahují podobného rozpětí variability ve velikosti

pylové tetrády. Diploidní cytotyp však má mírně nižší průměr a dosahoval nejnižších hodnot z celého datového souboru. Triploidní jedinci dosahují hodnot střední části variability celého souboru dat.

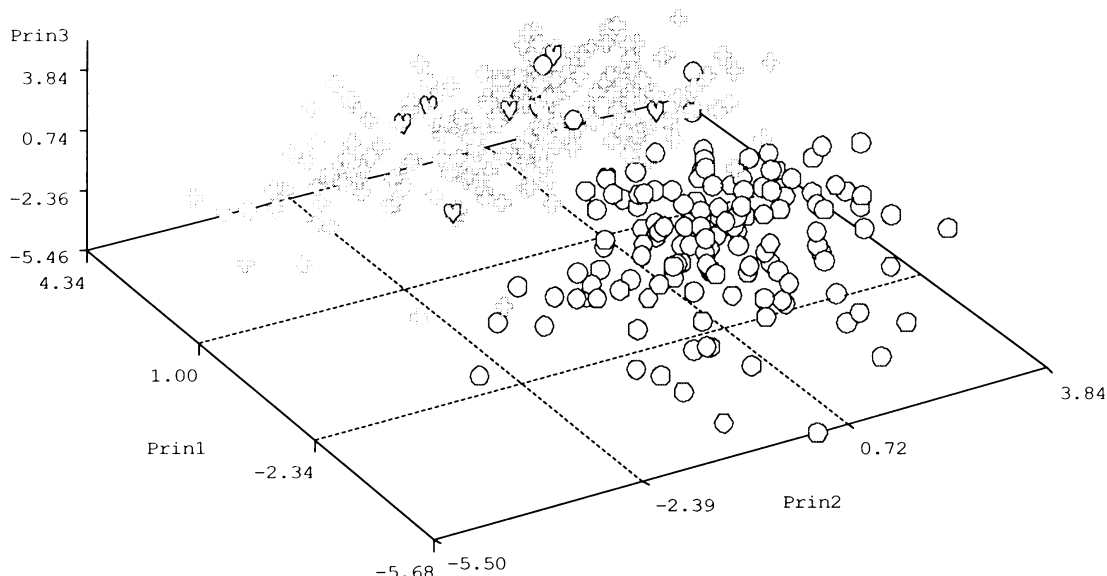
Obr. 6.21: Krabicový graf znaku v35-vitalita pylu (% života schopných zrn) (1-diploidní cytotyp, 2-tetraploidní cytotyp, 3-triploidní cytotyp)



Na základě výstupu krabicového grafu pro znak vitality pylu (v35), lze konstatovat, že dochází k mírnému oddělení triploidního cytotypu, který dosahuje viditelně menších procent života schopným pylových tetrád.

Analýza hlavních komponent (PCA)

Obr. 6.22: Grafický výstup PCA všech tří plodních úrovní na základě charakteristik listu a samčích částí květu (○ 2x, 4x, ♥ 3x)



Všechny tři osy popisují dohromady téměř 40% z celkové variability souboru. První osa zachycuje 22,45% z celkové variability a nejtěsněji s ní korelují znaky v24, v32 a v4 (šířka největšího listenu, šířka korunního lístku a pohlavnost květů). Druhá osa postihuje 10% z celkové variability a znaky mající vliv na rozmístění objektů podél ní jsou v10, v9 a v17 (šířka štěrbiny a bílé linky na spodu listu, poměr délky nitky ku kališnickému lístku).

Z výsledku PCA je viditelné jasné oddělení cytotypů podél osy 1. Je to úžasný výsledek, neboť metoda PCA nevytváří takto krásné grafické výstupy „každý den“

Třetí osa popisuje necelých 7% z celkové variability.

Triploidní jedinci hodnocení v tomto souboru jsou až na jednoho součástí tetraploidního shluku.

Přestože jedinců jiné než očekávané pohlavnosti květů je v tomto souboru dat o necelá 2% více, než je tomu u předchozího souboru dat, přesto má pohlavnost větší úlohu na rozmístění objektů podél osy 1, nežli je tomu u předchozího souboru dat. Zatímco zde je pohlavnost třetím znakem nejvíce ovlivňující osu 1, u předchozího souboru dat je pohlavnost až na osmém místě vlivu na osu 1. Jednou z možností tohoto výsledku je, že samčí jedinci diploidního cytotypu dosahují častěji svými rozměry květních obalů tetraploidy a to je důvod, proč se zde mohl lépe projevit tento znak (bylo ho v tomto souboru dat více za potřebí). Příkladem tohoto jevu jsou lokality na Šumavě. Obecně

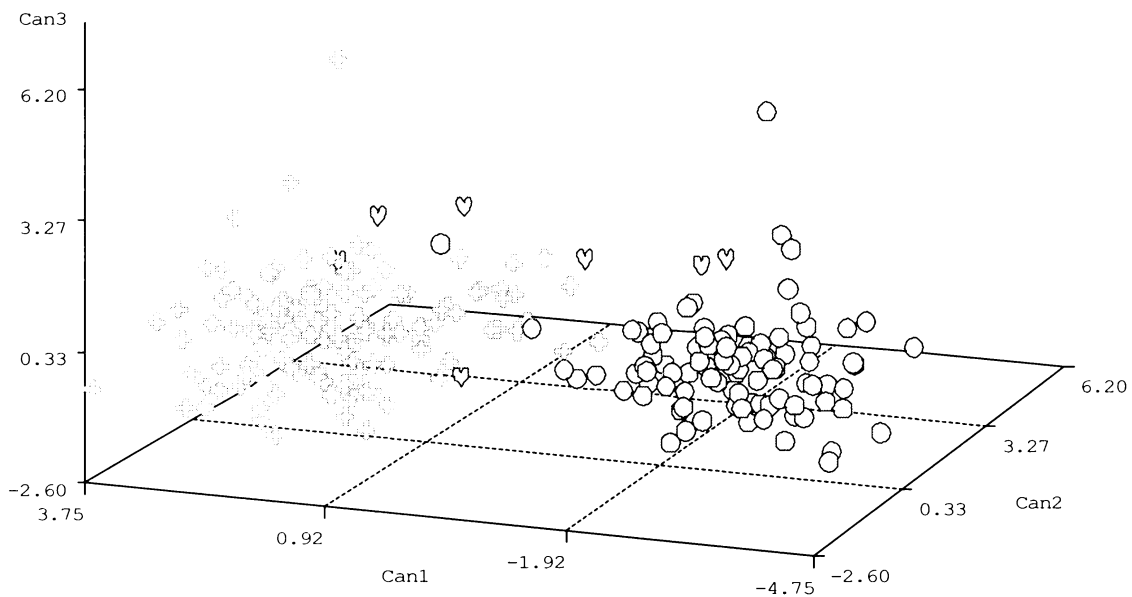
zdejší diploidní jedinci dorůstají velmi vysokých hodnot (patrné zejména na rozměrech květních obalů samčích jedinců).

Diskriminační analýzy

Tab. 6.15: Kanonické korelační koeficienty souboru znaků na listu a samčích částech květu všech tří ploidií

Znak	Can1	Can2	Can3
v4	0.882725	-0.167514	-0.030974
v5	0.022981	-0.138802	0.031962
v6	0.321248	0.085504	-0.044336
v7	0.580995	-0.018625	0.003549
v8	-0.091653	0.086829	-0.013415
v9	0.141935	-0.102596	0.035866
v10	-0.059362	-0.081274	0.016558
v11	-0.488587	-0.077036	-0.029107
v12	-0.158149	0.119268	-0.033303
v13	-0.328903	-0.016922	-0.021988
v14	0.098839	-0.187274	0.038568
v15	0.158160	0.266303	-0.047487
v16	-0.238908	0.172066	-0.043402
v17	-0.193781	-0.211924	0.051570
v21	-0.187015	0.131431	-0.050551
v22	-0.119599	0.099594	-0.027408
v23	0.664255	-0.072335	-0.000344
v24	0.757766	0.013318	0.092011
v25	-0.253559	-0.097300	0.027907
v26	0.595234	0.042569	-0.042787
v27	0.599208	-0.054392	-0.055324
v28	-0.130313	0.145117	-0.039117
v29	0.622382	0.099802	-0.059353
v30	0.738214	0.187142	0.060543
v31	-0.283026	-0.112788	0.037715
v32	0.669960	0.226469	0.028280
v33	0.659987	0.205903	-0.042351
v34	-0.277850	-0.046164	-0.000522
v35	0.057727	-0.634380	0.118296
v36	0.653249	-0.149325	-0.033794

Obr. 6.23: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých plodných úrovní na základě charakteristik samčích květních částí a listů (○ 2x, ⊕ 4x, ♥ 3x)



Diskriminační metoda vybrala na základě tohoto souboru dat znaky, které nejlépe vystihují variabilitu mezi jednotlivými cytotypy, trochu odlišně oproti předchozímu souboru dat. Nejtěsněji koreluje s první osou znak pohlavnosti jako u předchozího souboru dat, nicméně nedosahuje tak vysoké hodnoty korelačního koeficientu. Předchozí soubor byl zásadně ovlivněn prvními třemi znaky (s velkým odstupem od ostatních znaků), zde se tento jev neprokázal. Zde za hlavním znakem následuje čtveřice znaků, které mají nižší, přesto však nezanedbatelný vlivu na rozmístění podél první kanonické osy. Těmito znaky jsou v24, v30, v32 a v36 (šířka největšího listenu, šířka kališního lístku, délka korunního lístku a velikost pylové tetrády). Oproti prvnímu souboru dat se v pětici nejvýznamnějších znaků ovlivňující osu 1 objevil znak charakteristický jen pro samčí části květu.

Při provedení diskriminační analýzy CANDISC i pro soubor dat po vyřazení triploidních jedinců, byly hodnoty korelačních koeficientů podstatně odlišné a jsou níže uvedené pro další potřeby hledání nejvhodnějšího a nejmenšího počtu znaků k separaci diploidů od tetraploidů.

Tab. 6.16: Kanonické korelační koeficienty souboru znaků na listu a samčích částech květu pro tetraploidní a diploidní cytotyp

Znak	Can1	Can2	Can3
v4	-0.687327	-0.082509	-0.425518
v5	-0.095076	0.001983	0.001589
v6	-0.125603	-0.031043	-0.036277
v7	-0.289047	-0.069040	-0.113896
v8	0.083122	0.033391	0.040812
v9	-0.043100	-0.020336	-0.028147
v10	0.065946	0.008119	0.007218
v11	0.338767	-0.029495	0.035402
v12	0.086156	-0.006608	0.011590
v13	0.295566	-0.004069	0.068708
v14	0.208435	0.047170	0.186536
v15	-0.192875	-0.076260	-0.033345
v16	-0.214628	-0.005522	-0.022137
v17	0.053106	0.021269	0.014871
v21	-0.106735	-0.052625	-0.018589
v22	-0.159556	-0.047305	-0.020050
v23	0.152904	0.048698	0.011748
v24	-0.120993	-0.070221	-0.042301
v25	-0.208989	0.030381	-0.073543
v26	0.168128	0.039770	0.058493
v27	-0.137995	0.027506	-0.053101
v28	-0.207948	-0.030320	-0.023065
v29	0.174812	0.053593	0.077696
v30	0.365694	0.061362	0.075253
v31	0.202475	0.007910	0.069731
v32	-0.994042	0.025106	0.026393
v33	-0.700908	0.009488	-0.268581
v34	0.091891	0.016788	0.025928
v35	-0.151078	-0.020754	-0.084214
v36	-0.262038	0.056138	-0.082378

Pro separaci diploidního cytotypu od tetraploidního podél osy 1 byl zřetelně nejdůležitějším znakem znak v32 (délka korunního lístku) s velkým odstupem od dvou dalších důležitých znaků v33 a v4 (šířka korunního lístku a pohlavnost květu). Výsledky

diskriminační analýzy jsou v zásadě obdobné, obzvláště co se týče analýz bez triploidních jedinců. Byla vybrána stejná trojice nejvýznamnějších znaků, ovšem s tím rozdílem, že je zde výrazně nejdůležitějším znakem šířka korunního lístku a pohlavnost je až na třetí místě, zatímco u předchozího souboru dat, byla pohlavnost první a šířka korunního lístku třetí.

Navíc podstatný rozdíl je i v účinku znaků v36 (velikost pylové tetrády) a v35 (vitalita pylu). Při hodnocení s triploidy je znak v36 na pátém místě významnosti vlivu na první osu a znak v 36 ovlivňuje nejvýznamněji druhou a třetí osu, zatímco při hodnocení bez triploidů se tyto znaky ani při jedné z os téměř neprojeví.

Důvodem je fakt, že například pro znak vitality pylu jsou diploidi a tetraploidi vyrovnáni partnery, zatímco triploidi dosahují menších procent životaschopných zrn a při hledání znaků mezi všemi třemi plodnými stupni tudíž získal tento znak na významnosti.

Pro znak velikosti pylové tetrády je problém obdobný. Při nezahrnutí triploidních jedinců pozbývá tento znak na významnosti, neboť znaky na květních obalech a pohlavnost květů pro diploidy a tetraploidy vykazuje mnohem lepší separaci.

Tab. 6.17: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy kvetoucích rostlin *E. nigrum* (2x) a *E. hermaphroditum* (4x) pro znaky na listech a samčích částech květu [(v1-v4-v17,v21-v36)]

Z cytotypu	Zařazeno k cytotypu		
	2x	4x	Celkem
2x	133	5	138
	96,38	3,62	100
4x	8	195	203
	3,94	96,06	100
Celkem	141	200	341
	41,35	58,65	100
Chybně zařazených (%)	3,62	3,94	3,81

S použitím uvedených znaků na listech a květních obalech se samčími částmi se podařilo zpětně zařadit **96,19%** analyzovaných rostlin ke správnému cytotypu. Pokud bychom touto metodou hodnotily soubor dat i s triploidními jedinci snížila by se schopnost zařadit jednotlivé jednice ke správnému cytotypu na 82,47%. Celkově jsou všechny provedené analýzy na tomto souboru dat zatím nejúspěšnější. Je to zřejmě i tím,

že u tohoto souboru dat bylo možno hodnotit největší počet znaků, což koresponduje s faktem, že růstem počtu hodnocených znaků vzrůstá i schopnost správného určení.

Použitím jednoho jediného znaku můžeme dosáhnout 90,62% pravděpodobnosti správného určení. Tímto znakem je v32 (délka korunního lístku). Spolu se znaky v33 a v4 (šířka korunního lístku a pohlavnost květu) je pravděpodobnost správného určení stejná.

6.3.6 Analýzy jednotlivých cytotypů s využitím listových charakteristik a květních obalů.

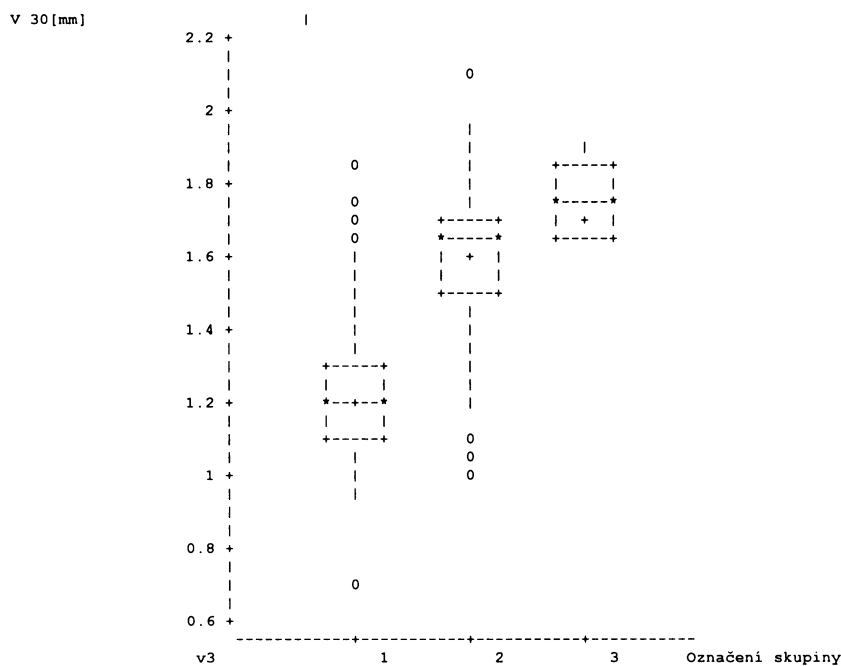
Znaky (v1-)-v4-v12 + v21-v34 byly hodnoceny na souboru 501 rostlin.

cytotyp	počet jedinců	pohlavnost květu	počet jedinců
diploidní	269	jednopohlavné ♂	136
		jednopohlavné ♀	130
		oboupohlavné	3
tetraploidní	225	jednopohlavné ♂	29
		jednopohlavné ♀	22
		oboupohlavné	174
triploidní	7	jednopohlavné ♂	4
		oboupohlavné	3

Základní statistiky

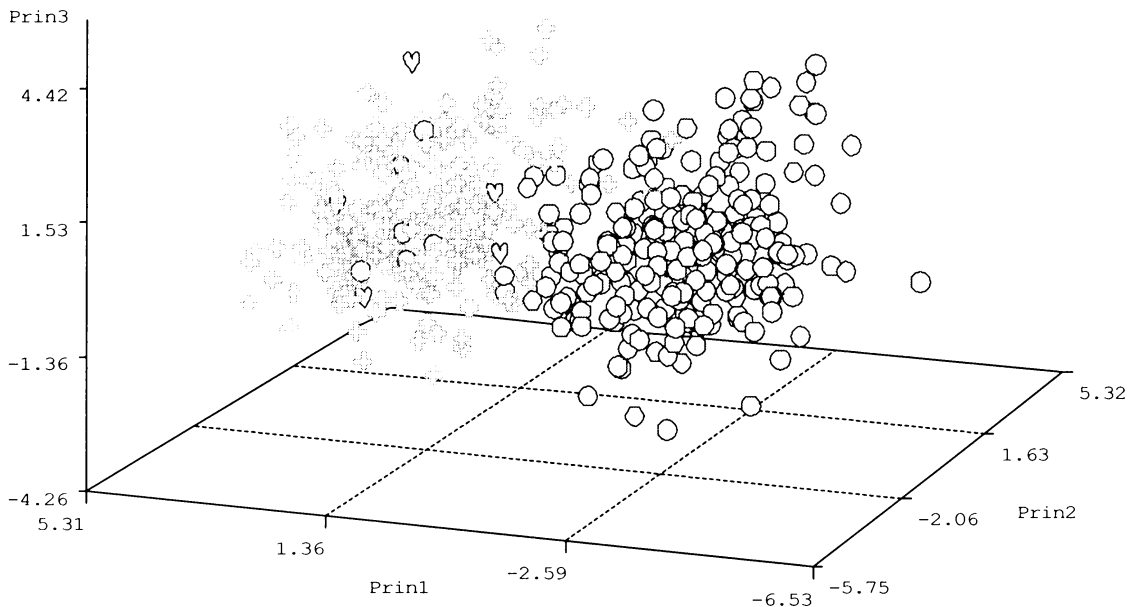
Tento datový soubor je do hodnocených skupin nejlépe rozdělen podle znaku v30 (šířka kališního lístku), jehož krabicový graf je níže uveden. Dobrou rozlišovací schopnost vykazovaly i znaky v24 - šířka nejmenšího listenu, v4 - pohlavnost květů a v32 - délka korunního lístku.

Obr. 6.24: Krabicový graf znaku v30-šířka kališního lístku [mm] (1-diploidní cytotyp, 2-tetraploidní cytotyp, 3-triploidní cytotyp)



Analýza hlavních komponent (PCA)

Obr. 6.25 :Grafický výstup PCA všech tří plodných úrovní na základě charakteristik listu a květu (○ 2x, 4x, ♥ 3x)



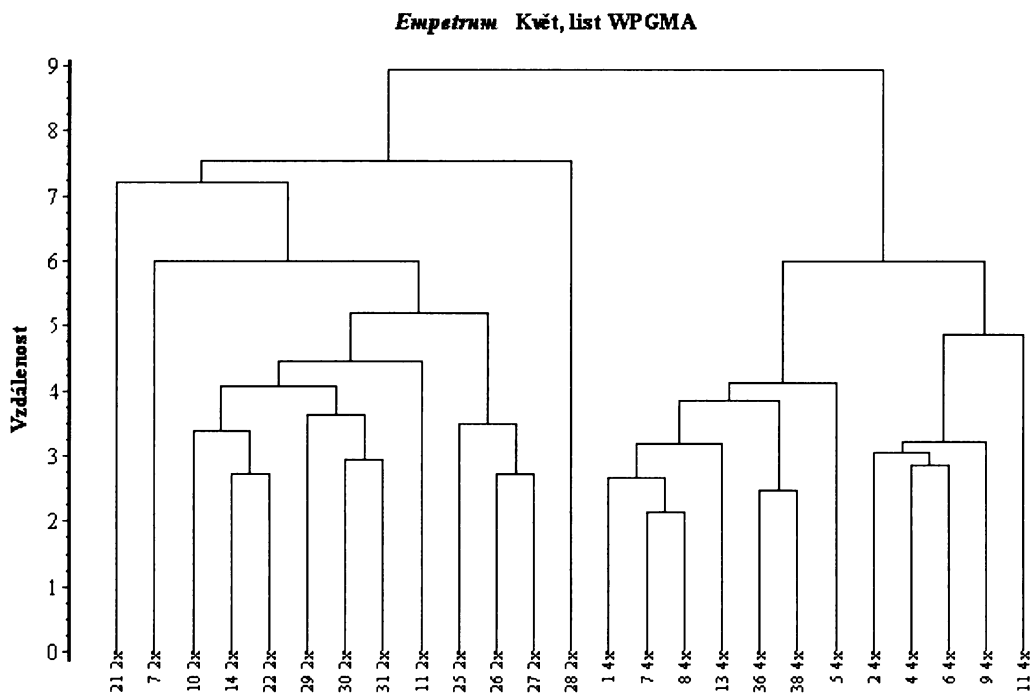
Na základě výstupu této metody, lze konstatovat, že i při hodnocení většího souboru dat dochází k velmi úspěšnému oddělení jednotlivých cytotypů. Všechny tři osy dohromady popisují 45,1% z celkové variability. První osa představuje 27,1% z celkové variability, druhá 9,9% a třetí 8,1% z celkové variability. Znaky nejtěsněji korelované s první osou mají znatelně největší význam pro oddělení cytotypů, neboť první osa popisuje téměř 2/3 variability zobrazené pomocí třech os výše uvedeného grafu. Na rozložení objektů podél první osy se nejvíce podílí pětice znaků (pořadí podle významnosti): v30, v33, v24, v32, v29 (šířka kališního lístku, šířka korunního lístku, šířka největšího listenu, délka korunního lístku, délka kališního lístku). S druhou méně významnou osou nejvíce koreluje pohlavnost květů (v4). Opět se zde potvrzuje, že pohlavnost květů vykazuje jistý vliv na oddělení cytotypů, nicméně není nejdůležitější.

Triploidní jedinci se opět mísí spíše s tetraploidním cytotypem.

Shlukovací analýzy

Shlukovací analýza byla provedena na souboru dat hodnotících znaky na listech a květních obalech diploidního a tetraploidního cytotypu. Výsledky všech provedených analýz podle uvedených metod byly téměř úplně stejné, proto je níže uveden jen jeden obrázek 6.26.

Obr. 6.26: Shlukovací analýza provedená metodou WPGMA na souboru dat jedinců se znaky na listu a květních obalech



Z obrázku 6.26 je viditelné jednoznačné rozdělení jedinců na 2 hlavní větve, přičemž každá větev vždy zahrnuje zástupce jen jedné ploidie. Lokality 7, 21 a 28 jsou odděleny na vyšším stupni větvení. Tento fakt má však své opodstatnění. Zdá se, že důvod je stejný jako při shlukovací analýze listových charakteristik. Lokalita 28 má největší hodnotu průměru pro délku listu a poměr délky ku šířce listu z celého souboru dat. Navíc má v rámci diploidních lokalit i největší délku největšího listu.

Lokalita 7 se vyznačuje nejmenšími listy z celého datového souboru a lokalita 21 má největší počet listů na lodyze z celého datového souboru.

Závěrem lze tedy říci, že znaky, které lokality způsobily vyřazení těchto tří lokalit, byly výrazně odlišné hodnoty na vegetativních orgánech. Kdyby byly lokality hodnoceny jen na základě generativních znaků a květních obalech, k oddělení těchto lokalit na vyšším stupni větvení dendrogramu by nedošlo.

Diskriminační analýzy

Tab. 6.18: Kanonické korelační koeficienty pro soubor rostlin všech tří ploidií se znaky na květu a listu

Znak	Can1	Can2	Can3
v4	0.742428	-0.454249	-0.002199
v5	-0.058578	-0.163124	0.000836
v6	0.126111	0.109077	-0.007872
v7	0.656933	-0.038317	0.029983
v8	-0.465862	0.109955	0.036007
v9	0.039146	-0.111568	-0.000174
v10	-0.036079	-0.125174	0.004702
v11	-0.357610	-0.076279	0.006045
v12	-0.098499	0.174600	0.006624
v21	-0.322046	0.166037	0.010341
v22	-0.237395	0.118429	0.014649
v23	0.658650	-0.120877	-0.045180
v24	0.766412	-0.011738	-0.092581
v25	-0.290372	-0.108721	0.036345
v26	0.591659	0.051659	-0.054233
v27	0.603216	-0.092711	0.030460
v28	-0.140643	0.205299	0.004978
v29	0.730485	0.163706	-0.072409
v30	0.835467	0.260246	0.069279
v31	-0.258723	-0.141965	0.048698
v32	0.754987	0.299709	-0.016371
v33	0.795688	0.302382	-0.004755
v34	-0.262925	-0.068492	0.018561

Tab. 6.19: Kanonické korelační koeficienty pro soubor rostlin diploidního a tetraploidního cytotypu se znaky na květu a listu

Znak	Can1	Can2	Can3
v4	0.758980	-0.081856	-0.017335
v5	-0.053607	-0.005062	-0.003967
v6	0.122724	0.003819	0.017100
v7	0.658032	0.048726	-0.014538
v8	-0.466950	0.029600	0.079025
v9	0.042327	0.002211	0.003161
v10	-0.032441	-0.004656	-0.008738
v11	-0.353713	0.010855	-0.008746
v12	-0.104207	0.000997	-0.010872
v21	-0.328280	-0.049837	0.007743
v22	-0.241318	0.011715	-0.003079
v23	0.661768	0.033235	0.039511
v24	0.767516	0.032555	-0.053510
v25	-0.283468	0.045233	-0.030063
v26	0.588198	0.026356	0.045442
v27	0.604597	-0.016497	-0.036194
v28	-0.146753	0.019495	-0.016359
v29	0.728161	-0.142123	0.089816
v30	0.834905	0.032425	0.094704
v31	-0.254373	0.016037	-0.025089
v32	0.752251	0.034647	-0.066966
v33	0.793632	-0.001025	0.073411
v34	-0.260515	0.002744	0.042172

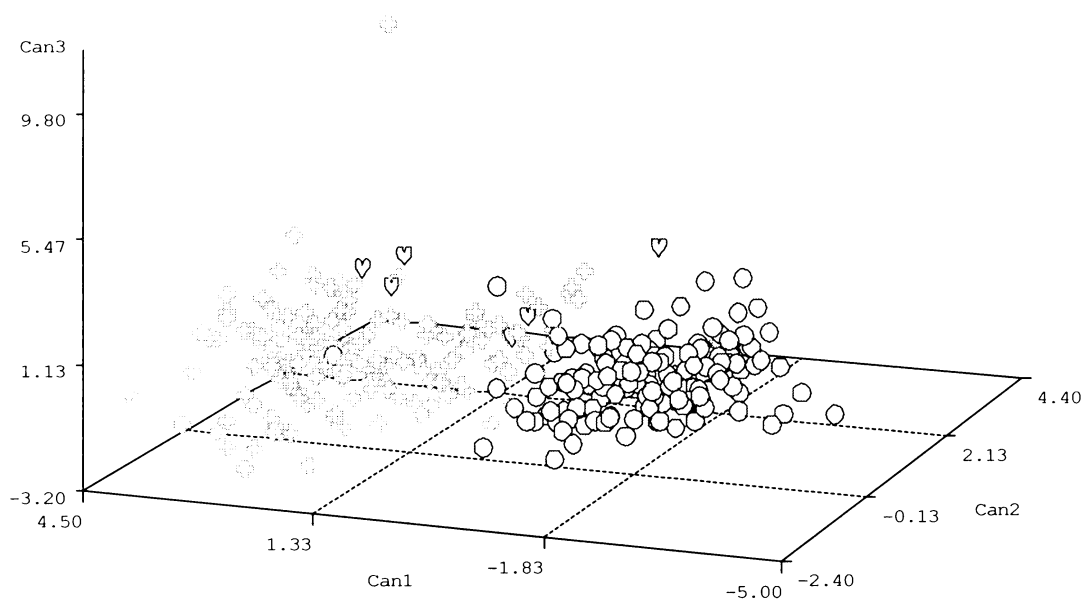
Kanonické korelační koeficienty vypočítané jen pro tetraploidní a diploidní cytotyp vykazovaly stejnou tendenci jako koeficienty souboru s triploidy. Pětice nejtěsněji korelovaných znaků byla stejná i co do pořadí významnosti.

U souboru s triploidy byly hodnoty korelačních koeficientů první osy nepatrně nižší (viz tab. 6.18), nicméně první čtyři z oné pěti nejtěsněji korelovaly i s druhou osou, tudíž byl tento rozdíl vykompenzován.

Rozdíl byl v korelaci znaků s druhou osou.

U souboru bez triploidů má při druhé ose význam znak v29.

Obr. 6.27: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých plodných úrovní na základě charakteristik samčích květních částí a listů (○ 2x, 4x, ♥ 3x)



Kanonická diskriminační funkce pomocí vypočtených koeficientů velmi úspěšně oddělila jednotlivé cytotypy především podél první osy. Jen několik málo objektů se objevilo mimo svůj shluk. Rozmístění objektů podél první osy ovlivňují nejvíce znak v30 – šířka kališního lístku.

Tab. 6.20: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy kvetoucích rostlin *E. nigrum* (2x) a *E. hermaphroditum* (4x) pro znaky na listu a květu [(v1-)-v4-v17,v21-v34]

Z cytotypu	Zařazeno k cytotypu		
	2x	4x	Celkem
2x	262 97,40	7 2,60	270 100
4x	40 4,44	215 95,56	226 100
Celkem	272 55,04	222 44,96	496 100
Chybně zařazených (%)	2,60	4,44	3,44

S použitím uvedených znaků na souboru dat kvetoucích rostlin a s znaky na listech se podařilo zpětně zařadit **96,56%** analyzovaných rostlin ke správnému cytotypu. Pokud byly klasifikační funkce počítány i pro triploidy, snížila schopnost správného rozdělení cytotypů na 83,63%.

Hledáním nejmenšího počtu znaků, které by byly schopny dobře rozlišit jednotlivé cytotypy, bylo zjištěno, že vyloučením více než jednoho znaku z 26 hodnocených dochází k zhoršení rozlišovací schopnosti. Za použití trojice nejkorelovanějších znaků (v30 - šířka kališního lístku, v33 - šířka korunního lístku, v24 - šířka největšího listenu) s první osou diskriminační analýzy bylo dosaženo úspěšnosti 88,91% a po přidání znaků v4, v21 a v32 se úspěšnost zvedla na pouhých 89,68%. Hodnocením znaků v4, v7, v21, v23, v24, v30, v32, v33 byla úspěšnost klasifikační funkce 91,1%.

Přestože byla úspěšnost klasifikační funkce nejlepší, potřebujeme pro stanovení cytotypu mnohem více znaků, abychom přesáhli 90% hranici úspěšnosti, nežli u předchozích dvou datových souborů. Tento jev je způsoben faktem, že je hodnoceno větší množství jedinců a navíc byl prokázán rozdíl ve variabilitě nejdůležitějších květních obalů (především mezi délkou a šířkou korunního lístku) mezi diploidními ♀ a ♂ rostlinami. Mírný rozdíl variability diploidních jedinců ve výše uvedených znacích (viz tab. 6.21), způsobuje při současném hodnocení celého datového souboru zhoršení schopnosti rozlišit jednotlivé cytotypy. Nicméně i tak je výsledek, kdy lze za pomoci 4 znaků bez využití pohlavnosti květu určit správně 89% jedinců, velmi uspokojivý.

Při odlišování cytotypu podle samičího pohlaví květu se jako důležité znaky jeví šířka a délka korunního lístku (v33, v32), neboť diploidní jedinci, ať už mají ♀ nebo oboupohlavné květy, mají výrazně menší květní obaly a v hodnotách znaku v33 se nejméně prolínají s tetraploidy (viz tab. 6.21). Diploidní samečci jsou větší než diploidní samičky. Svými velikostmi znaků v32 a v33 jsou na středu variability mezi diploidními samičkami a tetraploidy (viz. tab. 6.21), proto se při hodnocení jedinců všech pohlavností dohromady přesune význam ze znaků na korunních lístcích na znak v30 - šířku kališního lístku (viz tab. 6.21).

Tab. 6.21 : Přehled průměrů, minim, maxim, 5% a 95% kvantilů znaků v32, v33, pro diploidní ♂ a ♀ a tetraploidní cytotyp

	znak	průměr	min	max	5%	95%
2x	v32 ♂ (mm)	2,23	1,20	3,06	1,86	2,73
	v32 ♀ (mm)	1,95	0,95	2,84	1,21	2,40
	v33 ♂ (mm)	1,01	0,71	2,41	0,766	1,31
	v33 ♀ (mm)	0,88	0,38	1,48	0,66	1,09
4x	v32 (mm)	2,63	1,37	3,28	2,19	3,12
	v33 (mm)	1,26	0,82	2,02	1,04	1,48

7. Fytocenologické snímkování

Fytocenologické snímky byly provedeny ve velikosti 2x2 m na všech lokalitách a 30x30 cm na smíšených lokalitách v Krkonoších. Jednotlivé druhy byly určovány a jejich jména sjednocena pomocí určovací literatury: Klíč k určování evropských druhů rodu *Sphagnum* (Daniels 1990), Key to northern boreal and arctic species of *Sphagnum*, based on characteristics of the stem leaves (Lange 1982), Mechorosty České republiky (Kučera 2007), Klíč ke květeně České republiky (Kubát 2002). Zástupci rodu *Sphagnum* byli sjednoceni na základě prvního z uvedených určovacích klíčů. Pomoc s určování poskytla Mgr. Eva Mikulášková.

Na ploše každého fytoecenologického snímku byl odhadem stanoven sklon svahu a pomocí busoly určena jeho orientace. Pokryvnost keřového patra, bylinného, mechového patra a stařiny byla zaznamenána v procentech. K určení pokryvnosti jednotlivých druhů bylin byla využita kombinovaná devítičlenná Braun-Blanquetovu stupnice (r, +, 1, 2m, 2a, 2b, 3, 4, 5). Keřové patro bylo rozděleno na dvě skupiny. Keře větší než 1m byly zapisovány v rámci stromového patra, aby došlo k odlišení od nižších keřů z řádu *Ericales*. Tento případ se týkal druhu *Pinus mugo*, jehož pokryvnost byla zaznamenávána v rámci stromového patra.

Snímky o velikosti 2x2 m mohou pomoci při hodnocení stanovištních preferencí jednotlivých cytotypů v rámci celého území České republiky.

Mikrosnímky ze smíšených krkonošských lokalit (30x30cm) slouží ke zkoumání, zdali má distribuce cytotypů ve smíšených populacích určité zákonitosti.

7.1 Statistické zpracování dat

Vzhledem k tomu, že snímky byly získávány ve dvou různých velikostech (2x2 m a 30x30cm), byly vytvořeny dva datové soubory, které byly hodnoceny samostatně.

Snímků o velikosti 30x30 cm bylo v analýzách hodnoceno 40, z toho 20 snímků bylo s prokázaným růstem diploidního cytotypu, 15 snímků s tetraploidním cytotypem a 5 snímků s triploidním cytotypem. Vybrány a zkoumány byly snímky ze smíšených krkonošských lokalit, kde byl počet druhého méně početnějšího z cytotypů významnější a kde byl významnější výskyt triploidních jedinců. Zkoumané lokality byly: Hraniční louka

(lok. 10), Lubošská planina (lok. 11), Pančavské rašeliniště (lok. 7), Úpské rašeliniště (lok. 2) (lokality jsou seřazeny od nejvyššího počtu zahrnutých snímků).

Fytcenologické snímky byly uloženy do databázového programu Turboveg for Windows (Hennekens et Saminée 2001), následně převedeny do programu Juice 6.3 (Tichý 2002). Pomocí programu Juice byly opraveny chyby vzniklé přepisem do Turbovegu. Poté byla data hodnocena v programu Canoco for Windows 4.5 (Te Braak et Šmilauer 2002) a v programu NCSS (Hintze 2001).

Proměnné: faktory stanoviště (sklon svahu, orientace svahu) a pokryvnosti jednotlivých vegetačních pater byly statisticky otestovány jednocestnou analýzou variance (One - Way Anova v NCSS). Vzhledem ke skutečnosti nesplnění podmínky normálního rozdělení jednotlivých proměnných, byl použit neparametrický Kruskal – Wallisův test.

7.2 Výsledky

7.2.1 Mikrosnímky z krkonošských lokalit (30x30 cm)

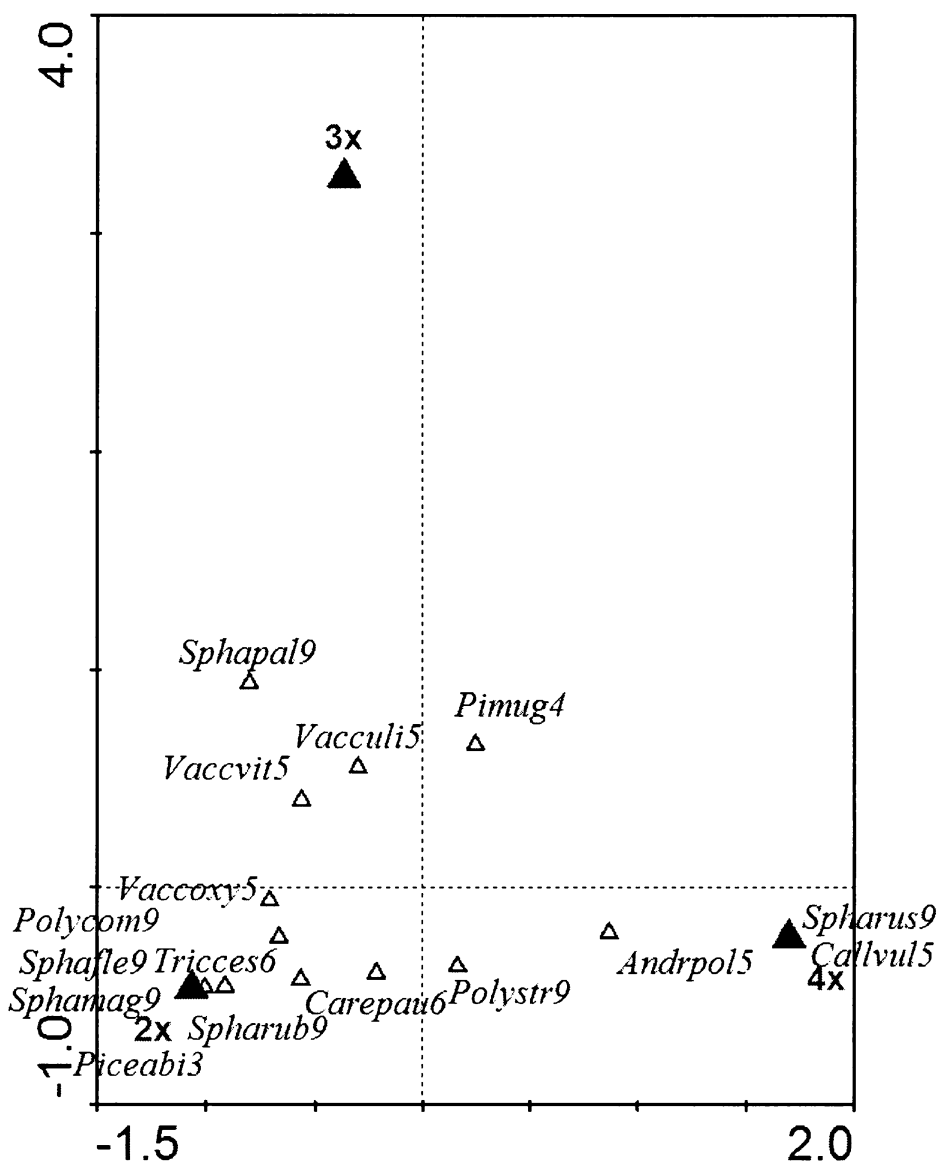
Faktory stanoviště a pokryvnosti vegetačních pater

Proměnné (faktory stanoviště + pokryvnosti pater) byly rozděleny do třech skupin podle příslušnosti k jednotlivým cytotypům (2x, 3x, 4x). Následně byly zkoumány rozdíly mezi skupinami pomocí výše uvedené metody One - Way Anova. Ani jedna z proměnných nebyla průkazná, tudíž nebylo další hodnocení tohoto souboru provedeno a nejsou ve výsledcích výstupy zobrazeny.

Vztah cytotypů k vegetaci

Provedením nepřímé metody DCA byla stanovena délka gradientu, která byla pro první osu 3.974 a pro druhou 3.165. Vzhledem k tomu, že délka gradientu první osy dosahuje téměř hodnoty 4, byly dále jako přímé metody použity unimodální techniky, tedy CCA.

Obr. 7.1: Vztah cytotypů k vegetaci (CCA, vysvětleno 6,16% celkové variability, test průkaznosti všech kanonických os: $p=0,002$, $F=2,58$, Zobrazeno je 16 druhů, které nejvíce odráží variabilitu (zkratky druhů viz Příloha 4). Čísla za zkratkami druhů jsou čísla vegetačních pater přiřazených programem Turboveg.



.Obr

Z výsledků CCA lze usoudit, že vztah mezi cytotypy rodu *Empetrum* a vegetací s nimi rostoucí je mírně průkazný. Diploidní cytotyp vykazuje největší variabilitu v množství druhů s nimi rostoucí a výrazně s nimi v asociaci neroste žádný druh. Zvýšená korelace je s druhem *Sphagnum rubellum*. Z 20 hodnocených diploidních jedinců se tento druh vyskytoval u 9 z nich (45% snímků) a jen 1x rostl v asociaci s jiným cytotypem než diploidním cytotypem a to s tetraploidním. Triploidní cytotyp nevykazoval zvýšenou asociaci s žádným druhem.

Tetraploidní cytotyp byl nejlépe separován. S tímto cytotypem jsou úzce vázané 2 druhy: *Calluna vulgaris* a *Sphagnum russowi*. Tyto druhy charakterizovaly 73,3% tetraploidních snímků. Druh *Calluna vulgaris* rostl ve všech případech s tetraploidy a druh *Sphagnum russowii* rostl na 7 snímcích z toho jen jeden nerostl s tetraploidním cytotypem, ale s triploidním cytotypem.

Dva druhy rodu *Sphagnum*, které jsou výše uvedeny jako separační pro jednotlivé cytotypy na smíšených lokalitách, jsou například oba na území Šumavy na základě snímků 2x2 m zcela běžné pro diploidní cytotyp. V Krušných horách druh je *Sphagnum russowii*, který v Krkonoších charakterizuje tetraploidy, velmi často v asociaci s místními diploidními populacemi, zatímco *Sp. rubellum* se zde téměř nezaznamenal. Nelze tedy výsledky z Krkonoš aplikovat u jiných pohoří.

Více méně má každé naše pohraniční pohoří charakteristické rysy, které by s největší pravděpodobností ovlivnily výsledky analýz.

Během sběrů v terénu bylo vypracováno velké množství snímků jak o rozměrech 30x30cm tak 2x2 m. Nicméně vzhledem k značné náročnosti určování velkého množství bezcevnatých rostlin rostoucích na zkoumaných snímcích a předpokladu, že by analýzy kopírovaly spíše rozdíly mezi pohořími než mezi ploidiemi, byly analýzy provedeny jen u 40 snímků (30x30 cm) a to z nejbohatších a nejzajímavějších krkonošských lokalit.

8. Diskuze

Tato diplomová práce si kladla za cíl zhodnotit morfologickou a fytoecenologickou variabilitu zástupců rodu *Empetrum* v ČR, kterými jsou diploidní cytotyp (*E. nigrum*), tetraploidní cytotyp (*E. hermaphroditum*) a nedávno objevený triploidní cytotyp.

Kritické taxonomické hodnocení tohoto rodu je vlivem velké variability značně problematické a vyžaduje kombinaci různých dat, proto bylo uskutečněno nejen zkoumání fenotypových projevů, ale v menší míře i zkoumání stanovištních preferencí, které byly mnohými botaniky považované za více méně striktní.

Ještě poměrně v nedávné době byl růst cytotypů *E. nigrum* a *E. hermaphroditum* považován za striktně oddělený a možnost existence smíšených lokalit byla popírána (Velluti 1995). Především díky rozvoji molekulárních technik a hojnému využívání průtokové cytometrie botanice, která dokáže rychle a snadno odhalit ploidní stupeň u velkého množství rostlin, dochází k častějšímu objevení smíšených lokalit.

Již dříve byla objevena existence smíšených lokalit například v severovýchodních Alpách (Teppner 1987), později byly nalezeny další smíšené lokality v Norsku a Švédsku. Také byli objeveni první triploidní jedinci v rámci čeledi *Empetraceae* [nyní zahrnuté v čeledi *Ericaceae* (Kron 1997)] na 1 Norské lokalitě (Suda 2002). Záhy došlo i k objevení prvních triploidních jedinců v rámci *Ericaceae* pro střední Evropu a to v našich Krkonoších (Suda 2002).

Významnost této studie spočívala ve skutečnosti, že všichni zkoumaní jedinci byli nejdříve podrobeni metodě průtokové cytometrie. Ta umožnila jednoznačné definování ploidního stupně všech rostlin, u kterých byla poté sledována variabilita morfologických a fytoecenologických charakteristik.

Průtokovou cytometrií byl stanoven DNA ploidní stupeň u 1606 jedinců z 39 lokalit z území České republiky. Diploidního cytotypu bylo nasbíráno přibližně o 120 jedinců více než tetraploidního, který se kromě území Krkonoš a Jeseníků nevyskytuje na našem území tak hojně jako diploidní cytotyp. Na 19 lokalitách byl ověřen diploidní cytotyp, na 10 lokalitách byl ověřen tetraploidní cytotyp. Na zbylých 10 byl nalezen smíšený růst diploidního a tetraploidního cytotypu. Na čtyřech z těchto 10 smíšených lokalit byl ověřen dokonce i triploidní cytotyp.

Na území Jizerských hor je nyní karyologicky potvrzen výskyt jak diploidního cytotypu, tak existence 1 lokality tetraploidního cytotypu, což odpovídá údajům dřívější

literatury (Slavík 1990). Z území Krušných hor je udáván výskyt tetraploidního taxonu (Slavík 1990), nicméně karyologický průzkum této diplomové práce potvrdil z tohoto území jen existenci diploidního taxonu. Podle dřívějších údajů (Kláštorský 1960, Slavík 1990) se na území Šumavy vyskytuje tetraploidní taxon poněkud hojněji, nicméně ani práce z let 2000-2002 (Suda 2004a), ani tato práce nepotvrdila hojnější výskyt. V současnosti jsou karyologicky ověřeny z území Šumavy pouze 3 velmi malé, izolované lokality. Na území Jeseníků je udáván dle literatury (Slavík 1990) jak diploidní tak tetraploidní taxon. Bohužel v současnosti není doposud diploidní taxon z tohoto území potvrzen.

Údaje v dřívější literatuře nebyly v drtivé většině podpořeny karyologickým stanovením hladiny ploidního stupně, což je zřejmě příčina rozdílu mezi karyologicky ověřenými údaji současnosti a dřívějšími údaji (Kláštorský 1960, Slavík 1990). V rámci výzkumu této diplomové práce byly často nalezeny velké výkyvy ve fenotypových projevech jedinců, někdy i celých lokalit od hodnot typických pro daný cytotyp. Pokud nebyl stanoven počet chromosomů, mohly být dříve právě tyto lokality považovány za lokality nesprávného cytotypu.

Tuto teorii podporuje například situace na území Šumavy v blízkosti Horské Kvildy, kde bylo provedeno podrobné sledování Mezilesní slati (Kláštorský 1960). Zde byla většina pozorovaných jedinců v letech 1951-1957 s oboupohlavnými květy, jen 27% mělo jednopohlavné květy. Kláštorský proto tuto populaci považoval za tetraploidní (Kláštorský 1960). Během studia této diplomové práce byla zkoumána lokalita Vydršího mostu, která je okrajovou částí Mezilesní slatě a byly zde karyologicky ověřeni jen diploidní jedinci, tak jako na blízkých slatích (Malý Polec lok. č. 30, Tetřevská slat', lok. č. 28). Z Vydršího mostu bylo odebráno na jaře roku 2006 8 kvetoucích jedinců a všichni vykazovali oproti výsledkům z let 1951-1957 jednopohlavnost.

Rozdíl ve výsledcích diplomové práce a výše uvedené studie může být způsoben odstupem 50 let souvisejících se změnou podmínek na lokalitě, se stářím populace nebo charakterem zimy. Rod *Empetrum* vykazuje značné kolísání v pohlavnosti květů, což výsledky této práce potvrzují. V pohlavnosti se lišilo 11% jedinců z celkového počtu sesbíraných kvetoucích jedinců, nicméně na území České republiky byla schopnost diploidního cytotypu změnit pohlavnost květů z jednopohlavné na oboupohlavné v letech 2005 a 2006 prokázána pouze v 1,1% jedinců. Většina variability v pohlavnosti květů se objevila u tetraploidních jedinců.

Kromě pohlavnosti, podle které dříve botanikové rozhodovali, o jaký jde cytotyp, mohly milné údaje ovlivnit fenotypové projevy, jak už bylo výše uvedeno. Zjevným příkladem je lokalita Tetřevská slat' (lok. č. 28). Díky velkým odchylkám v rozměrech některých znaků (například největší délka největšího listenu v rámci diploidních populací) byla tato lokalita shlukovací metodou dokonce vyřazena z větve diploidního cytotypu a umístěna do těsné blízkosti tetraploidní větve (viz. obr. 6.26). Shodou okolností je tato lokalita nedaleko Mezilesní slati, která byla, považována za tetraploidní (Klážerský 1960).

V současnosti - při spojení údajů této diplomové práce a výsledků výzkumu v letech 2000-2002 (Abazid 2004, Suda 2004a) - je v Krkonoších karyologicky ověřeno 13 lokalit. Jedním ze zajímavých výsledků této práce je skutečnost, že k již dříve ověřeným 3 lokalitám s výskytem triploidního cytotypu (Abazid 2004, Suda 2004a): Čertova louka (lok.č.3), Hraniční louka (lok. č.10), Lubošská planina (lok. č. 11) byly objeveny další dvě: Černohorské rašeliniště (lok. č.1) a Úpské rašeliniště (lok. č.2). Dále také došlo k potvrzení výskytu obou cytotypů na třech lokalitách ze čtyř, kde byl dříve udáván jen jeden z nich (Abazid 2004). Závěrem lze tedy konstatovat, že všech 13 významných krkonošských lokalit s výjimkou malého lesního rašeliniště SV od Černohorského rašeliniště vykazují společný růst diploidního a tetraploidního taxonu a na pěti z nich roste dokonce i triploidní cytotyp. Tento jev se nikde jinde na území České republiky nevyskytuje.

Dále byla potvrzena schopnost vzájemného prorůstání jednotlivých cytotypů (Abazid 2004, Suda 2004a), což dokazuje existence směsných vzorků. Na velmi malém úseku (30x30 cm) byl nalezen společný růst dvou cytotypů u 4 krkonošských lokalit. V zásadě šlo většinou o lokality, kde byly méně početné cytotypy zastoupeny více než třemi jedinci.

Již na základě výsledků metody průtokové cytometrie lze diskutovat vznik triploidních jedinců. Existuje předpoklad, že triploidní jedinci mohli vzniknout hybridizací mezi diploidním taxonem *E. nigrum* a tetraploidním taxonem *E. hermaphroditum* nebo pomocí redukované a neredukované gamety taxonu *E. nigrum* (Suda 2003). Vzhledem k tomu, že na všech lokalitách s výskytem triploidních jedinců rostli jak diploidní, tak tetraploidní jedinci, lze předpokládat, že reálnějším vznikem triploidních jedinců je spíše první z uvedených variant. Je tomu tak, i přestože se vznik triploidů pomocí neredukovaných gamet v rámci diploidních populací jeví jako docela častý jev (Tyagi 1988) a existence neredukovaných gamet je potvrzena například i u rodu

Vaccinium (Hancock & Whallon 1998), neboť dosavadním karyologickým studiím se nepodařilo najít jediného triploida, který by rostl v populaci pouze diploidních jedinců.

Dalším důvodem pro upřednostňování hybridizace je pohlavnost květů. Pravděpodobnost, že by vznikli triploidi splynutím redukované a neredukované gamety cytotypu *E. nigrum* (jednopohlavná) je téměř mizivá na základě výsledků této práce. V rámci diploidního cytotypu byli nalezeni jen 3 oboupohlavní jedinci z 269 jedinců, což činí 1,1%. Ze 7 triploidních kvetoucích jedinců byli 4 ♂ pohlavnosti květu a 3 oboupohlavní, z toho jeden jedinec s ♂ pohlavností měl dosti znatelný rudiment ♀ pohlaví. Je nepravděpodobné, že by se schopnost změnit pohlavnost z jednopohlavnosti na oboupohlavnost u diploidního cytotypu přidáním jedné sádky chromozómů zvýšila z 1% na téměř 50%.

Domnívám se, že triploidní cytotyp vznikl hybridizací a výsledné velikosti morfologických znaků jsou zřejmě ovlivněny tím, který z cytotypů poskytl svůj genom pylem.

Charakteristiky vegetativních znaků mohou být tak jako u rodičovských cytotypů samozřejmě značně ovlivněny ekologickými podmínkami. O pohlavnosti nejspíš velkým dílem rozhodují kromě toho, kdo byl dárce pylu a kdo poskytl mateřský genom, i ekologické podmínky či stáří jedince, nebo také větší variabilita v genomu zvýšená hybridizací. Pohlavnost triploidních jedinců se jeví jako dosti kolísavá, což odpovídá mnohým studiím, které poukazují na to, že kříženci mohou být mnohem variabilnější než jejich rodičovské taxony (Faulkner 1973). Příkladem je skutečnost, že 2 ze tří plodných triploidních jedinců měli následující rok květy pouze samčí pohlavnosti.

Na lokalitě Úpského rašeliniště a Černoorských rašelinišť byl výskyt diploidního cytotypu minoritní a triploidi se vyskytovali v bezprostřední blízkosti tetraploidů. Schopnost dálkového přenosu semen v rámci jedné lokality je nižší než schopnost pylu. Je známo, že plody rodu *Empetrum* jsou často konzumovány mnohými ptáky a savci. Ti mohou dálkový přenos plodu provést a tím ovlivnit šíření (Bell 1958). Nicméně se vzhledem k situacím na smíšených lokalitách nedomnívám, že by na území jedné lokality mohl mít tento způsob přesunu plodů vliv. Trend lokalizace triploidních jedinců je na všech lokalitách více méně stejný, domnívám se tedy, že se na lokalitě přenášet pyl než plod.

Je tedy možno předpokládat, že byl dárce pylu na výše uvedených lokalitách diploidní cytotyp. Navíc svými charakteristikami v nejdůležitějších znacích na květních obalech se triploidi podobali tetraploidům.

Většina triploidů je podle charakteristik květních obalů metodou PCA umístěna v rámci tetraploidního shluku. Na lokalitě Lubošská planina roste triploid, který je nejbližší diploidnímu shluku a zároveň zde roste triploid, který se velikostmi květních obalů vyrovná největším tetraploidním jedincům.

Na této lokalitě (jako na jediné), která je nejzápadnější lokalitou Krkonoš a zároveň má z této části nejnižší nadmořskou výšku (viz Tab. 4.1), je umožněn výskyt rovnoměrně oběma rodičovským druhům, což potvrzuje i největší výskyt vzorků s 2x a 4x cytotypem na úseku 30x30 cm. Místní podmínky zřejmě způsobují výše uvedené fenotypové projevy triploidů, kteří zde mnohou nabývají mnohem větší variability ve znacích.

Co se týče odhadu otcovství i zde by se dalo spíše přiklonit k teorii, že dárcem pylu byl diploidní cytotyp a mateřskou rostlinou byl tetraploidní cytotyp. Triploid s velikostmi květních obalů na pomezí mezi diploidním a tetraploidním cytotypem (viz obr. 6.22), měl oboupohlavný květ a byl předchozí rok dokonce plodný. Druhý kvetoucí jedinec byl sice samčí pohlavnosti, ale hodnoty znaků na květní obalech byly jasně tetraploidního rázu. Navíc jeden z fytoecologicky hodnocených triploidů této lokalitě rostl na místě, kde se nalézal druh *Sphagnum russowii*, což je druh velmi úzce vázaný s tetraploidním cytotypem. Zbylí dva triploidi volili prostředí s více méně neutrálními druhy.

Poslední lokalitou s objeveným kvetoucím triploidním jedincem v rámci této diplomové práce je lokalita Hraniční louka. Zvláštností této lokality oproti ostatním krkonošským lokalitám je převažující růst diploidních jedinců. Byl zde nalezen jen 1 klon tetraploidního cytotypu a 3 triploidními jedinci. Tato lokalita je necelé 2 km východně od Lubošské planiny. Je to druhá nejzápadnější lokalita a její nadmořská výška je vyšší jen o 25 m, než je Lubošské planiny. Bylo tedy možné očekávat, že i zde bude velké množství diploidních jedinců. To se potvrdilo, nicméně není jasné, proč zde téměř neroste tetraploidní cytotyp.

Tato lokalita je jako jediná z lokalit s výskytem triploidů typická svým mírně svažitém terénem. Část lokality, kde roste tetraploidní klon je rovinná a druhá polovina lokality se svažuje více méně na jih. Triploidní jedinci se nachází ve svazující se části a v těsném sousedství diploidního cytotypu. V morfometrických analýzách byli hodnoceni 2 jedinci, z toho jeden byl kvetoucí i plodný. Kvetoucí jedinec byl ve znacích na květních obalech podobný tetraploidům, plodem se však řadil k diploidním jedincům (viz Obr. 6.11). Následující rok měl květ samčí pohlavnosti. Znaky na listech se zařadil ve

výstupech PCA do oblasti prolínání obou rodičovských druhů blíže k diploidnímu cytotypu. Druhý nekvetoucí triploid se shodoval listovými charakteristikami s diploidy (viz Obr. 6.3). Vzhledem k tomu, že zde rostou triploidi v blízkosti diploidního cytotypu, mají pro růst podobné podmínky, tudíž ve vegetativních znacích by se dala očekávat větší podobnost s diploidním cytotypem, což se více méně potvrdilo.

Uvažováním, který z cytotypů by byl na této lokalitě dárce pylu, bych preferovala možnost, že dárce pylu byl tetraploid a mateřskou rostlinou diploidní cytotyp a to nejenom na základě poměru početnosti jednotlivých cytotypů. Pyl tetraploida se z horní části rašeliniště, kde se jeho klon nachází, dostane snadněji k níže položeným triploidům a diploidům, než jeho zralá peckovička. I přestože diploidní cytotyp roste v horní části rašeliniště, výskyt kříženců zde nebyl potvrzen. Předpokládám, že vítr zde vane ve směru svahu, což opět podporuje výše uvedenou variantu. Tuto možnost potvrzuje navíc skutečnost, že pokud by někde mohl vzniknout triploid, jehož mateřskou rostlinou by byl diploid, bylo by to nejpravděpodobněji na této lokalitě. Navíc svými znaky jsou místní triploidi diploidům nejvíce podobní.

Domnívám se tedy, že na lokalitách Černoorská rašeliniště, Úpské rašeliniště, Lubošská planina byl mateřskou rostlinou tetraploidní cytotyp a dárce pylu byl diploidní cytotyp. Na lokalitě Hraniční louka preferuji opačnou možnost. Zde by mohl být tetraploid dárce pylu.

Rozlišování triploidních jedinců od rodičovských je velmi problematické. Hodnoty znaků se většinou kryjí s hodnotami, ve kterých se i rodičovské druhy prolínají, nebo se více podobají tetraploidnímu cytotypu. Nejlépe by se dal triploidní cytotyp separovat podle procenta života schopných pylových zrn (znak v35 - vitalita pylu, viz obr 6.21). Triploidní jedinci mají menší vitalitu pylu. Procento vitality pylu u 90% triploidních jedinců nabývá hodnot v rozmezí 73% - 96% života schopných pylových zrn. Zatímco 90% rodičovských druhů má procento vitality pylu v rozmezí 96% až 100%.

Tento výsledek koresponduje s řadou prací, kde jako nejdůležitější znak k identifikaci hybridů sloužila životaschopnost pylu například ve studii rodu *Cardus* či při studiu životaschopnosti spor u rodu *Dryopteris* (Holubová 2006, Navrátilová 2002).

Velikost pylové tetrády není k separaci hybridů vhodná, neboť velikosti tohoto znaku (v36) dosahují značného překryvu s rodičovskými druhy (viz obr. 6.20). Skutečnost, že u řady rostlinných druhů vykazují hybridní rostliny vyšší variabilitu ve velikosti pylových zrn, než jejich rodičovské taxony (Faulkner 1973) se však také nepotvrdila. V zásadě jsou velikosti pylové tetrády u triploidního cytotypu mnohem

menšího rozsahu než rodičovské cytotypy. Zatímco u diploidního cytotypu se 90% hodnot velikosti pylové tetrády pohybuje v rozmezí 18 μm a u tetraploidního cytotypu v rozmezí 16 μm , triploidní cytotyp má velikosti kolísající jen v rozmezí 5 μm (viz. Příloha 3). Je však nutné nezapomenout, že velikost pylové tetrády byla měřena jen pro 7 triploidních jedinců. Kdyby bylo možno najít a zhodnotit větší množství kvetoucích hybridů, zřejmě by se variabilita v tomto znaku určitě mírně zvýšila.

Podle dřívější literatury lze znak velikosti pylové tetrády použít k separaci rodičovských druhů, neboť bylo udáváno, že tetraploidní *E. hermaphroditum* má větší pylové tetrády než diploidní cytotyp *E. nigrum* (Kim 1988, Warner 1990). V letech 1985, 1986 a 1989 bylo celkem nashromážděno a změřeno 277 kvetoucích jedinců cytotypu *E. nigrum* a *E. hermaphroditum* z Finska (10 lokalit), z Kanady (3 lokality) a Ruska (1 lokalita). Z výsledků bylo zřejmé, že se diploidní taxon a tetraploidní taxon překrývají svými rozměry pylové tetrády pouze v 1 μm (Warner 1990), tak jak je udáváno i v jiné literatuře (Čvančara 1990, Kubát 2002).

V rámci této diplomové práce bylo hodnoceno 341 jedinců a u každého 3 pylové tetrády, celkem 1023 pylových tetrád. Velikost pylových tetrád byla celkově větší, než bylo udáváno ve výše uvedené studii (Warner 1990). Byl také zjištěn mnohem větší překryv hodnot (viz Příloha 3), což může být ovlivněno velikostí zvětšení, při kterém byly hodnoty získávány. S použitím dostupného mikroskopu jsem využila celkového zvětšení 192x (20x9,6), zatímco při studiu finských lokalit využili badatelé 100x zvětšujícího objektivu za pomoci imersního oleje (zvětšení okuláru nebylo uvedeno). Díky většímu zvětšení bylo jejich měření přesnější a překryv nebyl tak značný, na druhé straně ale studie nezahrnovala smíšené lokality. Oproti území, z kterého pyl získávali, je území České republiky malé a s 25% výskytem smíšených lokalit. Pokud jsou v rámci tak malé země podmínky, k existenci tak vysokého procenta výskytu smíšených lokalit, je pravděpodobné, že i nesmíšené lokality mohou být ovlivněny a variabilita například ve velikosti pylové tetrády může dosáhnout většího prolnání.

Předpokládalo se, že velikost pylové tetrády koreluje s hladinou ploidie (Warner 1990), tak jako je tomu často i u jiných polyploidních komplexů (Chinnappa 1982).

Nicméně studium českých populací tento trend nepodporuje.

Velkým objevem této diplomové práce je vysoká korelace některých znaků na květních obalech.

Více než velikost pylových zrn či pohlavnost květů korelují s pohlavností u našich lokalit velikosti květních obalů. Nejdůležitějšími znaky jsou šířka kališního lístku, šířka

korunního lístku, šířka největšího listenu a délka korunního lístku. Pokud budeme kvetoucí rostliny hodnotit podle prvních třech uvedených znaků bez ohledu na pohlavnost květů, podaří se správně určit téměř 89% jedinců. Budeme-li porovnávat samčí květ oproti oboupohlavnému podaří se za pomoci délky a šířky korunního lístku určit více než 90,5% jedinců. Při porovnávání samiččího květu oproti oboupohlavnému květu, nám pohlavnost květu může pomoci výrazněji než v předešlých případech. V kombinaci s délkou korunního lístku se podaří správně určit více než 92% jedinců.

Velmi zajímavým zjištěním je skutečnost, že všech 130 diploidních jedinců se samičími květy měli staminodia a u 90% z nich byla jejich velikost v rozmezí 0,08-1,31 mm. Dřívější údaje uváděli, že přítomnost staminodií o velikosti cca 1mm je častý jev, nyní je však prokázáno, že alespoň miniaturní staminodia jsou přítomna vždy (viz Příloha 3).

Porovnáním rozměrů morfologických znaků udávaných v dřívější literatuře (Čvančara 1990) s výsledky mé diplomové práce lze konstatovat, že se mírně rozcházejí. Velký rozdíl je ve velikostech některých znaků na květních obalech. Dříve udávané velikosti pro délku korunního lístku byly u diploidního cytotypu 1,5-2,0(-2,5) mm. U 90% jedinců jsem naměřila hodnoty v rozmezí 1,5-2,6 mm. Je zřejmé, že korunní lístky nedosahují rozměru 2,5 mm jen vyjimečně, ale celkem běžně. Největší rozdíl je však v délce korunního lístku pro tetraploidní cytotyp. Dříve udávané hodnoty byly 1,5-2,2(-2,5) mm. Má měření ukázala, že 90% tetraploidů má velikosti v rozmezí 2,2-3,1 mm. Podobný jev se prokázal i u délky kališního lístku. Většina diploidních jedinců má kališní lístek dlouhý 1,7-1,9mm, zatímco dříve bylo udáváno 0,8-1,2(-1,5) mm. Tetraploidi nabývají také větší délky než bylo udáváno. Většina z nich má délku kališního lístku mezi 1,6-2,2 mm (dříve bylo udávané 1,3-1,6 mm).

Další značný rozdíl je ve znaku – počet semen v plodu, který dříve mnoho botaniků využívalo k separaci jednotlivých cytotypů (Zarzycki 1975). Výsledky analýz hodnotící znaky na plodech neprokázaly, že by znaky na plodech měly výraznou schopnost oddělit jednotlivé cytotypy. Toto dokazují i samotné hodnoty počtu semen v peckovičce. Zatímco dříve byl udáván pro většinu diploidů počet semen 8-9 a pro tetraploidy 6-7, většina diploidních jedinců hodnocených touto prací měla počet semen od 7 do 10 a tetraploidní jedinci od 6 do 9.

Stejně tak jako pro znaky na plodech nebyla ani pro znaky na vegetativních orgánech prokázána schopnost oddělit jednotlivé cytotypy. Dříve byla separace pomocí poměru délky ku šířce listu v mnohých případech možná, neboť bylo udáváno, že

diploidní jedinci mají většinou listy 3-5x delší než širší, zatímco tetraploidy 2-3x delší než širší (Čvančara 1990). U diploidních jedinců se výsledky mé práce shodovaly, ale 90% tetraploidních jedinců je 2,5-4x delší než širší. Tudíž ve znacích na listech dochází k mnohem většímu překryvu hodnot než se předpokládalo.

Určit sterilní jedince na základě listových charakteristik je velmi obtížné. Stanovištní preference cytotypů na nesmíšených lokalitách více méně odpovídají dříve publikovaným údajům (Čvančara 1990, Kubát 2002). Studium smíšených krkonošských lokalit bylo zjištěno, že cytotypy na lokalitách vykazují mírnou preferenci ve složení druhů. Diploidní cytotyp vykazoval největší variabilitu v množství druhů s ním rostoucích. Přesto lze konstatovat, že druh *Sphagnum rubellum* je s diploidním cytotypem ve vazbě, neboť z 10 snímků, na kterých byl tento druh zaznamenán, rostl v 9 případech s diploidem. Druh *Sphagnum rubellum* charakterizoval celkem 45% diploidních snímků.

Druhy *Calluna vulgaris* a *Sphagnum russowii* jsou úzce vázány s tetraploidním cytotypem. Tyto dva druhy charakterizovaly 73% tetraploidních snímků. Žádný s druhů nevykazoval vazbu s triploidním křížencem. Nicméně pokud by došlo k vyhodnocení většího množství snímků, mohly by se prokázat i jiné než výše uvedené vazby.

Výsledky této diplomové práce mohou odpovědět i na otázku oprávněnosti druhového ranku diploidního a tetraploidního cytotypu. Na území České republiky se vyskytuje 25% lokalit se smíšeným výskytem. Jedná se o 12 krkonošských lokalit. Na pěti z nich byl karyologicky prokázán i růst triploidních hybridních jedinců. Zdá se, že Krkonoše jsou svou různorodostí vysokého počty typů rašelinišť (Kociánová 2005) místem ekologicky velmi příhodným pro růst obou rodičovských cytotypů. Výskyt zástupců rodu *Empetrum* je ovlivněn teplotním režimem lokalit (Elvebakk 1995), vzhledem ke skutečnosti, že diploid *E. nigrum* nedosahuje tak vysokých nadmořských výšek (Čvančara 1990, Suda 2002), může koexistovat s tetraploidem spíše v okrajových částech Krkonoš. Na lokalitách západní a východní strany Krkonoš byl prokázán růst triploidů, zatímco v centrální části Krkonoš nebyli nalezeni. Zdá se tedy, že pokud to podmínky dovolí a diploid i na lokalitách, kde roste v minoritním množství, vykvete, pravděpodobnost křížení je vysoká (Př. na lokalitě Úpské rašeliniště byl nalezen 1 diploidní sterilní klon zatímco triploidní 3). Triploidi navíc, vykazují značnou schopnost tvorby květů a ploidů. Procento života schopných pylových zrn je sice menší, než u rodičovských druhů, nicméně ne zas tak drasticky, jako je tomu například u pentaploidů druhu *Oxyccocus palustris*, u kterého je vyvinuto méně než 50% pylových zrn (Suda 1998).

Podobně se chová vícero rostlinných druhů, pokud dojde k promíšení s blízkým příbuzným. Příkladem jsou studie druhů *Geum rivale* a *G. urbanum*, vytvářející velmi často křížence. (Marsden-Jones 1930). Tyto druhy jsou od sebe nicméně velmi dobře separované morfologicky, zatímco cytotypy rodu *Empetrum* jsou velmi podobné a často se svými fenotypovými znacích prolínají. Výsledky této práce prokázaly, že tetraploidní cytotyp *E. hermaphroditum* má větší rozměry květních obalů, a lze tento znak velmi dobře použít k separaci.

Nicméně, tento jev může souviset se zvětšením buněk vlivem zvětšení obsahu genomu buněk, což je častým efektem polyploidizace, i když nejčastěji prezentovaným na velikostech pylu či průduchu (Briggs 2001).

Pro ne vždy jednoduchou determinaci a vysokou pravděpodobnost vzniku kříženců při společném růstu rodičovských cytotypů se přikláním k teorii, že by měly být cytotypy *E. nigrum* a *E. hermaphroditum* odlišovány spíše jako poddruhy *E. nigrum* L než samostatné druhy.

9. Závěr

Studium této diplomové práce přispělo k zmapování a osvětlení výskytu zástupců rodu *Empetrum* na území České republiky. Z karyologicky ověřených lokalit je 25% smíšených a na více než 1/3 z nich rostou i triploidní jedinci.

Na základě výsledků lze diskutovat vznik triploidních jedinců. Triploidní jedinci mají často oboupohlavné květy a rostou vždy pospolu s diploidním a tetraploidním cytotypem. Vzhledem k zjištění, že oboupohlavnost charakterizuje v drtivé většině tetraploidní cytotyp, musí tuto vlastnost ovlivňovat především tetraploidní genom a lze tedy více méně vyloučit možnost vzniku triploidů splynutím redukované a neredukované gamety diploidního cytotypu. Triploidní cytotyp vznikl s největší pravděpodobností křížením mezi diploidním cytotypem *E. nigrum* tetraploidním cytotypem *E. hermaphroditum*.

Nížeji vitalita pylu triploidů ne však výrazně a vysoká pravděpodobnost vzniku triploidů na smíšených lokalitách napovídá, že reprodukční bariéry mezi rodičovskými taxony nejsou příliš silné. Při současném zohlednění vysoké variability vlivem blízké příbuznosti taxonů, je doporučováno spíše podruhové členění výše uvedených taxonů.

Pro odlišení taxonů *E. nigrum* a *E. hermaphroditum* byly nalezeny nové znaky, které úspěšně napomáhají jejich odlišení bez nutnosti stanovení ploidního stupně. Jsou to znaky délka, šířka kališního a korunního lístku a šířka největšího listenu. Korelace mezi pohlavností květu a ploidním stupněm byla potvrzena. Nicméně není tak striktní, jak bylo dříve udáváno.

Triploidní cytotyp lze odlišit jen stěží bez stanovení ploidního stupně. Jediným nápomocným znakem by mohla být snížená vitalita pylu.

Na smíšených lokalitách byla objevena vazba mezi tetraploidním cytotypem a druhy *Calluna vulgaris* a *Sphagnum russowii*. Diploid vykazoval mírnou vazbu s druhem *Sphagnum rubellum*.

10. Seznam použité literatury

- Abazid, D., Sudová, R., Suda, J (2004): Rod *Empetrum* (šicha) na rašeliništích Krkonoš. – Opera Corcontica 41: 148-152.
- Ahokaz, H. (1971): Notes on polyploidy and hybridity in *Vaccinium* species. - Annales Botanici Fennici 8: 254-256.
- Anderberg, A. A. (1992): The circumscription of Ericales, and their cladistic relationships to other families of higher dicotyledons. - Systematic Botany 17: 660-675.
- Anderberg, A. A. (1994): Phylogeny of Empetraceae, with special emphasis on character evolution in the genus *Empetrum*. - Systematic Botany 19: 35-46.
- Bell, J.N. & Tallis, J.H. (1958): Biological flora of the British Islands. *Empetrum nigrum* L. - Journal of Ecology 61: 289-305.
- Boratyński, A. & Vera de la Puente, M.L. (1995): The *Empetraceae* on the Iberian Peninsula. - Willdenowia 25: 39-53.
- Briggs, D. & Walter, S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. 3. ed., - Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Chinnappa, C.C. & Warner, B.G. (1982): Pollen morphology in the genus *Coffea* (Rubiaceae). II. Pollen polymorphism. – Grana 21: 29-37.
- Čvančara, A. (1990): *Empetraceae* Lindl. - In: Hejný, S. & Slavík B. (eds.), Květena ČR 2: 520-521, Academia, Praha.
- Daniels, R.E. & Eddy, A. (1990): Klíč k určování evropských druhů rodu *Sphagnum* - Handbook of European Sphagna, 2.ed. - Institute of Terrestrial Ecology, London.
- Deyl, M. (1955): Vývoj rostlin a systém jednoděložných. - Sborník Národního Musea v Praze: Vol. XI -B No. 6., Botanica No. 3, Praha.
- Doležel, J. (1997a): Application of flow cytometry for the study of plant genomes. - Journal of Applied Genetics 38(3): 285-302.
- Doležel, J. et al. (1997b): Analýza a třídění chromozomů rostlin pomocí průtokové cytometrie. - Biologické listy 62(2): 131-160.
- Elvebakk, A. & Spjelkavik, S. (1995): The ecology and distribution of *Empetrum nigrum* ssp. *hermanphroditum* on Svalbard and Jan Mayen. – Nordic journal of botany 15(5):541-552.
- Faulkner, J. S. (1973): Experimental hybridisation of north-west European species in *Carex section Acutae* (Cyperaceae). - Botanical Journal of the Linnean Society 67: 233-253.
- Galbraith D. W., Harkins K. R. Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P. and Firoozabady E. (1983): Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. - Science 220: 1049 – 1051.

- Hadač, E. (1959): Floristické poznámky z Čech, - Sborník Vyšší Pedagogické Školy v Plzni 2: 207-230.
- Hagerup, O. (1927): *Empetrum hermaphroditum* (Lge.) Hagerup. A new tetraploid, bisexual species. - Dansk Botanisk Arkiv 5(2):1-17.
- Hancock, L Qu, JF & Whallon JH (1998): Evolution in an autopolyploid group displaying predominantly bivalent pairing at meiosis: genomic similarity of diploid *Vaccinium darrowi* and autotetraploid *V. corymbosum* (Ericaceae). - American Journal of Botany 85(5): 698-703.
- Hennekens SM et Saminée JHJ (2001): Turboveg, a comprehensive database mynydement systém for vegetation data. - Journal of Vegetation Science 12: 589-591.
- Hintze, J. (2001): NCSS and PASS. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville, Utah. - WWW.NCSS.COM.
- Holubová, R. (2006): Cytotaxonomická a morfometrická studie okruhu *Dryopteris dilatata* v České republice s důrazem na České středohoří. - [Dipl. práce, depon. - In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Hultén, E. (1968): Flora of Alaska and neighboring Territories. - Stanford University Press, Stanford.
- Humphries, C. J. a Parenti, L. R. (1986): Cladistic biogeography. - Oxford monographs on biogeography 2, Oxford, Clarendon Press.
- IPNI (2004 onwards): The International Plant Names Index (2004). - Published on the Internet <http://www.ipni.org>.
- Klášterský, I. (1960): Taxonomická hodnota *Empetrum hermaphroditum* (Lange) Hagerup - Dendrologický Sborník 2 (1959/1960): 300-302.
- Klecka, W.R. (1980): Discriminant analysis. – (Sage University Papers, Series: Quantitative applications in the social science, no. 19), Sage Publications, Beverly Hills & London.
- Kociánová, M. et al. (1995): Kryogenní kopečky – pounus – ve Skandinávii a v Krkonoších. – Opera Corcontica, 42: 31-54.
- Kron, K. A. & Chase M. W. (1993): Systematics of *Ericaceae*, *Empetraceae*, *Epacridaceae*, and related taxa based upon rbcL sequence data. – Annals of the Missouri Botanical Garden 80: 735-741.
- Kron, K. A. (1997): Phylogenetic relations of Rhododendroideae (Ericaceae). – American Journal of Botany 84(7): 973-980.
- Kubát, K. (2002): Klíč ke květeně České republiky: 237 - Academia, Praha.
- Kučera, J. et al. (2004 pokračující): Mechorosty České republiky, on-line klíče, popisy a ilustrace. – [www.http://botanika.bf.jcu.cz/bryoweb/klic/](http://botanika.bf.jcu.cz/bryoweb/klic/).
- Lange, B. (1982): Key to northern boreal and arctic species of *Sphagnum*, based on characteristics of the stem leaves. – Lindbergia 8: 1-29.
- Lewis, W. H. (1980): Polyploidy. – Biological Relevance. New York: Plenum.

- Löve, A. & Löve, D. (1956): Cytotaxonomic conspectus of the Icelandic flora. - Acta Horti Gothob, 20(4): 65-291.
- Löve, A. & Löve, D. (1959): Biosystematics of the black crowberries of America. - Canadian Journal of Genetics and Cytology: 34-38.
- Löve, A. & Löve, D. (1961): Chromosome numbers of central and northern European plant species. - Opera Botanica Belgica. 5.
- Löve, A. & Löve, D. (1966): Cytotaxonomy of the alpine vascular plants of Mount Washington. - University of Colorado Studies, Series in Biology No. 24. 74pp., Boulder Colorado.
- Lyrene, P.M., Vorssa, N., Ballington, J.R. (2003): Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. - Euphytica, 133 (1), July 2003: 27-36(10).
- Marhold, K. & Suda, J (2002): Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). - Karolinum, Praha.
- Marsden-Jones, E. M. & Turrill, W. B. (1930): The genetics of *Geum intermedium* Willd. Haud Ehrh. and its back-cross. – Journal of Genetics, 23: 377-395.
- Meusel, et al. (1978): Verleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora II, Gustav Fischer Verlag, Jena 418pp + maps 326 a, 362 b.
- Navrátilová, Z. (2002): *Carduus crispus* L. a *Carduus personata* (L.) Jacq. v České republice a jejich hybridizace. - [Dipl. práce, depon. - In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Parisy, V. (2000): Genetic diversity of *Empetrum hermaphroditum* Hagerup populations from northern Sweden. - Examensarbete i Biologi/Skogsgenetik.
- Podani, J.: Syn-tax 2000. Computer programs for data analysis in ecology and systematics. User's manual. – Scientia Publishing, Budapešť.
- Polunin, N. (1959): Circumpolar Arctic Flora. - Clarendon Press, Oxford.
- Rosenbaumová, R. (2002): Taxonomická studie rodu *Galeobdolon* HUDSON. [Dipl. práce, depon. - In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Shapiro, H. M. (1995): Practical flow cytometry. 3rd ed - Wiley-Liss/John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Skalický, V. (1988): Fytogeografické regionální členění. In - Hejný, S. & Slavík B. (eds.), Květena ČR 1: 122-126, Academia, Praha.
- Slavík, B. (1990): Fytokartografické syntézy ČR 2:83.
- Stevens, P. F. (2001 onwards): Angiosperm Phylogeny Website. Version 7, May 2006.
- Suda, J. (1998): Taxonomická problematika rodu *Oxycoccus* v České republice se zvláštním zřetelem k území Šumavy. – Zprávy České Botanické Společnosti, 32: 189-1995.
- Suda, J. (2002): New DNA ploidy level in *Empetrum* (Empetraceae) revealed by flow cytometry. - Annales Botanici Fennici 39: 133-141.

- ▣ Suda, J. (2003): Šichy a jejich příbuzenstvo. - *Živa*, 59 (89): 110-114.
- ▣ Suda, J. (2004a): Cytotypes distribution in *Empetrum* (Ericaceae) at various Spatial Scales in the Czech Republic. - *Folia Geobotanica* 39: 161-171.
- ▣ Suda, J. (2004b): An employment of flow cytometry into plant biosystematics. – Ms. [Disert. práce, depon. In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- ▣ Suda, J. (2005): Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií - *Živa* 1: 46 – 48.
- ▣ Szmidt, A. E. et al. (2002): Establishment and genetic structure of *Empetrum hermaphroditum* populations in northern Sweden. - *Journal of Vegetation Science* 13: 627-634.
- ▣ Te Braak, C. J. F. & Šmilauer, P. (2002): Canoco Reference Manual and Canodraw for Windows User`s Guide. Software for Canonical Community Ordination, Version 4.5. Microcomputer Power. - Ithaca. New York.
- ▣ Teppner, H. (1987): *Empetrum nigrum* L s.str. – neu füt die Alpen. - *Botanische Jahrbücher für Systematik* 108: 355-362.
- ▣ Tichý L (2002): Juice, software for vegetation classification. - *Journal of Vegetation Science* 13: 451-153.
- ▣ Tyagi, B. R. (1988): The mechanism of 2n pollen formation in diploids of *Costus speciosus* (Koenig) J.E. Smith and role of sexual polyploidization in the origin of intraspecific chromosomal races. – *Cytologia* 53: 763 – 770.
- ▣ Uhríková, A. & Májovský, J. (1980): Reports, p. 725-726. – In: Löve, A. IOPB chromosome number reports LXIX, *Taxon* 29: 703-730.
- ▣ Uhríková, A. & Paclová, L. (1986): Karyotaxonomisches Studium einiger Arten der Flora der Slowakei. XIV. – *Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comen., Bot.* 33: 69-72.
- ▣ Vasilev, V. N. (1961): Rod *Empetrum*. - Izd-vo Akademii nauk SSSR, Moskva.
- ▣ Velluti, C. et al. (1995): Contributo alla citogeografia di *Empetrum nigrum* L. e di *E. hermaphroditum* (Lange) Hagerup (Empetraceae). - *Archivio Geobotanico* 1: 165-170.
- ▣ Warner, B.G. & Chinnappa, C.C. (1990): Pollen polymorphism in *Empetrum nigrum* (Empetraceae). - *Annales Botanici Fennici* 27: 231-234.
- ▣ Webb, D.A. (1972): *Empetrum* L. - In: Tutin, T.G. et al. (eds.), *Flora Europaea* 3: 14. Cambridge University Press, Cambridge.
- ▣ Zarzycki, K. & Guzik, J. G. (1975): The Crowberry – *Empetrum nigrum* L. and *Empetrum hermaphroditum* (Lange) Hagerup in Poland. - *Fragmenta Floristica et Geobotanika Ann.* XXI, Pars 4, Florystyka i systematyka roślin naczyniowych.
- ▣ Kim, K.H, Nilsson, S. & Pragłowski (1988): A note on the pollen morphology of the Empetraceae, *Grana* 27: 283-290
- ▣ SAS Institute Inc. 2007: SAS Procedures Guide, Version 9.1.3., Third Edition, SAS Institut Inc., Cary

11. Přílohy

11.1 Seznam obrázků

Obr. 2.1: Recentní dělení čeledi <i>Ericaceae</i> (Stevens 2006).....	4
Obr. 3.1: Vyobrazení zástupců rodu <i>Empetrum</i> , habitus, stavba květů, plodu, typy květů.....	5
Obr. 3.2: Mapa výskytu <i>E. nigrum</i> (Meusel et al. 1978).....	9
Obr. 3.3: Mapa výskytu <i>E. hermaphroditum</i> (Meusel et al. 1978).....	9
Obr. 3.4: Mapa výskytu druhů <i>Empetrum</i> v ČR (Slavík 1990).....	14
Obr. 3.5: Mapa karyologicky ověřených lokalit (Suda 2004a).....	16
Obr. 5.1: Výsledný graf a hodnoty analýzy diploidní rostliny z lokality č. 26.....	26
Obr. 5.2: Výsledný graf a hodnoty analýzy tetraploidní rostliny z lokality č. 2.....	26
Obr. 5.3: Výsledný graf a hodnoty analýzy triploidní rostliny z lokality č. 3.....	27
Obr. 5.4: Výsledný graf a hodnoty analýzy smíšeného vzorku diploidní a tetraploidní rostliny z lokality č. 11.....	27
Obr. 5.5: Výsledný graf a hodnoty analýzy smíšeného vzorku diploidní a triploidní rostliny z lokality č. 10.....	28
Obr. 6.1: Krabicový graf znaku v7-šířka listu.....	43
Obr. 6.2: Krabicový graf znaku v5-počet listů na lodyze.....	43
Obr. 6.3: Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě znaků na listu.....	44
Obr. 6.4: Shlukovací analýza provedená metodou UPGMA na souboru dat jedinců se znaky na listu.....	45
Obr. 6.5: Shlukovací analýza provedená centroidovou metodou na souboru dat jedinců se znaky na listu.....	46
Obr. 6.6: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých ploidních úrovní na základě charakteristik listu.....	48
Obr. 6.7: Krabicový graf znaku v40-počet semen v peckovičce.....	50
Obr. 6.8: Shlukovací analýza provedená metodou UPGMA na souboru dat jedinců se znaky na plodu.....	50
Obr. 6.9: Shlukovací analýza provedená metodou WPGMA na souboru dat jedinců se znaky na plodu.....	51
Obr. 6.10 : Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě znaků na plodu.....	52
Obr. 6.11: Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě znaků na plodu.....	53
Obr. 6.12: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých ploidních úrovní na základě charakteristik plodu.....	53
Obr. 6.13: Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě znaků na plodu a listu.....	55
Obr. 6.14: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých ploidních úrovní na základě charakteristik listu a plodu.....	57
Obr. 6.15:Krabicový graf znaku v29-délka kališního lístku [mm].....	58
Obr. 6.16:Krabicový graf znaku v32-délka korunního lístku [mm].....	59
Obr. 6.17:Krabicový graf znaku v33-šířka korunního lístku [mm].....	59
Obr. 6.18:Grafický výstup PCA všech tří ploid. úrovní na základě charakteristik listů, květních obalů a samičích částí květu.....	60
Obr. 6.19:Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých ploidních úrovní na základě charakteristik samičích květních částí a listů.....	62
Obr. 6.20: Krabicový graf znaku v36-velikost pylové tetrády [µm].....	64
Obr. 6.21: Krabicový graf znaku v35-vitalita pylu.....	65
Obr. 6.22: Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě charakteristik listu a samčích částí květu.....	66
Obr. 6.23:Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých ploidních úrovní na základě charakteristik samčích květních částí a listů.....	67
Obr. 6.24: Krabicový graf znaku v30-šířka kališního lístku [mm].....	71
Obr. 6.25 :Grafický výstup PCA všech tří ploidních úrovní na základě charakteristik listu a květu.....	72
Obr. 6.26: Shlukovací analýza provedená metodou WPGMA na souboru dat jedinců se znaky na listu a květních obalech.....	73
Obr. 6.27: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy jednotlivých ploidních úrovní na základě charakteristik samčích květních částí a listů.....	75
Obr. 7.1: Vztah cytotypů k vegetaci.....	79

11.2 Seznam tabulek

Tab. 3.1: Charakteristiky taxonů <i>E. nigrum</i> a <i>E. hermaphroditum</i> , (vytvořena podle Kazimierz 1975, Kubát 2002, Čvančara 1990).....	10
Tab. 4.1: souhrn lokalit, fytochorion podle literatury (Skalický 1988), geografická poloha a charakter lokality, nadmořská výška, GPS souřadnice (WGS-84).....	19
Tab. 5.1: Relativní fluorescence jader všech tří cytotypů.....	25
Tab. 5.2: Počty vzorků se stanoveným stupněm ploidie na jednotlivých lokalitách na základě výsledků cytometrické analýzy.....	29
Tab. 5.3: Počty jedinců pro lokality s výskytem pouze jednoho cytotypu.....	30
Tab. 5.4: Počty jedinců pro lokality se smíšeným výskytem.....	30
Tab. 6.1: Měřené znaky zahrnuté v morfometrických analýzách.....	34
Tab. 6.2: Přehled hodnocených statistických souborů naměřených dat.....	37
Tab. 6.3: Souhrn populací, s počtem jedinců a stupněm ploidie hodnocených shlukovací metodou pro charakteristiky plodu.....	39
Tab. 6.4: Souhrn populací, s počtem jedinců a stupněm ploidie zahrnutých v shlukovací analýze charakteristik listů a květních obalů.....	40
Tab. 6.5: Přehled průměrů, minimálních a maximálních hodnot, 5% a 95% kvantilů pro znaky na listech u všech cytotypů.....	47
Tab. 6.6: Kanonické korelační koeficienty pro charakteristiky listu všech tří ploidii.....	48
Tab. 6.7: Vlastní vektory hlavních komponent PCA.....	52
Tab. 6.8: Kanonické korelační koeficienty pro charakteristiky plodu u všech tří ploidii.....	54
Tab. 6.9: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy plodných rostlin <i>E. nigrum</i> (2x) a <i>E. hermaphroditum</i> (4x) na základě znaků v37, v38, v39, v40.....	54
Tab. 6.10: Vlastní vektory hlavních komponent PCA.....	56
Tab. 6.11: Kanonické korelační koeficienty pro charakteristiky plodu a listu u všech tří ploidii.....	56
Tab. 6.12: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy diploidního a tetraploidního cytotypu na základě listových charakteristik bez znaku v10.....	57
Tab. 6.13: Kanonické korelační koeficienty pro soubor rostlin všech tří ploidii se znaky samičího pohlaví a listů.....	61
Tab. 6.14: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy kvetoucích rostlin <i>E. nigrum</i> (2x) a <i>E. hermaphroditum</i> (4x) pro znaky na listech a samičích částech květu.....	63
Tab. 6.15: Kanonické korelační koeficienty souboru znaků na listu a samčích částech květu všech tří ploidii.....	67
Tab. 6.16: Kanonické korelační koeficienty souboru znaků na listu a samčích částech květu pro tetraploidní a diploidní cytotyp.....	68
Tab. 6.17: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy kvetoucích rostlin <i>E. nigrum</i> (2x) a <i>E. hermaphroditum</i> (4x) pro znaky na listech a samčích částech květu.....	69
Tab. 6.18: Kanonické korelační koeficienty pro soubor rostlin všech tří ploidii se znaky na květu a listu ..	74
Tab. 6.19: Kanonické korelační koeficienty pro soubor rostlin diploidního a tetraploidního cytotypu se znaky na květu a listu.....	74
Tab. 6.20: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy kvetoucích rostlin <i>E. nigrum</i> (2x) a <i>E. hermaphroditum</i> (4x) pro znaky na listu a květu [(v1-)v4-v17,v21-v34].....	75
Tab. 6.21 : Přehled průměrů, minim, maxim, 5% a 95% kvantilů znaků v32, v33, pro diploidní ♂ a tetraploidní cytotyp.....	76

11.3 Základní statistiky morfometrických analýz

Přehled průměrů, minimálních a maximálních hodnot, 5% a 95% kvantilů pro (makro - i mikro -) znaky na listech, plodech a kvetoucích rostlinách u všech cytotypů

CYTOTYP	Diploidní cytotyp (<i>E. nigrum</i>)			Tetraploidní cytotyp (<i>E. hermaphroditum</i>)			Triploidní cytotyp						
	průměr	min	max	5%	95%	průměr	min	max	5%	95%			
v5 (počet)	44,66	12	85	27	67	45,17	8	81	26	63	41	29	55
v6 (mm)	4,44	0,68	6,82	3,54	5,97	4,58	3,07	6,48	3,58	5,63	4,83	3,92	5,63
v7 (mm)	1,18	0,43	1,62	0,94	1,45	1,4	0,94	1,79	1,11	1,71	1,31	1,02	1,62
v8 (poměr)	3,80	2,22	5,71	2,87	5,00	3,30	2,14	5,42	2,55	4,13	3,75	3,13	5,25
v9 (mm)	0,182	0,063	0,284	0,111	0,253	0,190	0,079	0,316	0,111	0,268	0,178	0,110	0,268
v10 (mm)	0,116	0,000	0,221	0,156	0,190	0,113	0,008	0,253	0,016	0,205	0,105	0,016	0,189
znaky na listech													
v37 (mm)	7,43	5,43	9,4	6,04	8,88	8,15	5,17	10,44	6,47	9,40	6,49	5,95	7,07
v38 (mm)	6,34	3,80	9,49	4,66	7,85	6,72	3,45	9,92	4,74	8,63	6,15	5,26	7,50
v39 (poměr)	1,19	0,84	1,7	1	1,44	1,23	0,92	1,88	1,05	1,47	1,07	0,94	1,23
v40 (počet)	8	6	11	7	10	7	6	9	6	9	8,66	7	10
znaky na plodech													
v37 (mm)	7,43	5,43	9,4	6,04	8,88	8,15	5,17	10,44	6,47	9,40	6,49	5,95	7,07
v38 (mm)	6,34	3,80	9,49	4,66	7,85	6,72	3,45	9,92	4,74	8,63	6,15	5,26	7,50
v39 (poměr)	1,19	0,84	1,7	1	1,44	1,23	0,92	1,88	1,05	1,47	1,07	0,94	1,23
v40 (počet)	8	6	11	7	10	7	6	9	6	9	8,66	7	10

CYTOTYP	Diploidní cytotyp (<i>E. nigrum</i>)				Tetraploidní cytotyp (<i>E. hermaphroditum</i>)				Triploidní cytotyp						
	průměr	min	max	5%	95%	průměr	min	max	5%	95%	průměr	min	max	5%	95%
znaky kvetoucích rostlin															
v11 (počet)	5	1	35	1	15	3	1	9	1	7	3	1	4	1	4
v12 (počet)	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2
v13 (počet)	3	1	4	2	3	3	1	4	1	3	3	2	3	2	3
v14 (mm)	5,63	2,13	8,80	3,94	7,93	5,94	0,44	11,05	2,73	9,30	4,98	1,97	6,29	1,97	6,29
v15 (mm)	1,14	0,78	1,59	0,93	1,31	1,19	0,49	1,64	0,82	1,42	1,38	1,09	1,48	1,09	1,48
v16 (počet)	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2
v17 (poměr)	3,46	1,37	6,27	1,82	4,91	3,08	0,26	7,59	1,33	4,8	2,48	1,00	3,19	1,00	3,19
v18 (mm)	0,44	0,01	2,82	0,08	1,31	0,58	0,00	3,69	0,00	2,33	1,24	0,00	1,97	0,00	1,97
v19 (mm)	0,63	0,33	1,19	0,43	0,93	0,71	0,22	1,09	0,33	1,04	0,62	0,60	0,66	0,60	0,66
v20 (počet)	8	5	11	6	9	7	5	10	6	8	8	7	9	7	9
v21 (počet)	5	2	7	3	6	4	3	7	4	5	5	4	7	4	7
v22 (počet)	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
v23 (mm)	1,22	0,82	1,70	0,94	1,59	1,52	1,04	2,30	1,21	1,97	1,41	1,15	1,75	1,15	1,75
v24 (mm)	0,99	0,51	1,53	0,66	1,31	1,35	0,82	1,97	1,09	1,64	1,29	1,04	1,48	1,04	1,48
v25 (poměr)	1,27	0,82	2,33	0,96	1,82	1,43	0,70	2,33	0,89	1,52	1,10	0,81	1,33	0,81	1,33
v26 (mm)	0,96	0,44	1,59	0,60	1,20	1,24	0,44	2,13	0,82	1,59	1,23	1,09	1,37	1,09	1,37
v27 (mm)	0,66	0,27	1,09	0,38	0,88	0,88	0,22	1,53	0,55	1,09	0,81	0,55	0,98	0,55	0,98
v28 (poměr)	1,50	0,62	2,80	1,13	2,00	1,44	0,85	2,43	1,11	1,89	1,57	1,38	2,00	1,38	2,00
v29 (mm)	1,56	0,93	2,24	1,26	1,91	1,91	0,93	2,46	1,59	2,19	1,97	1,70	2,35	1,70	2,35
v30 (mm)	1,22	0,71	1,86	0,98	1,48	1,60	0,98	2,08	1,31	1,91	1,70	1,26	1,91	1,26	1,91
v31 (poměr)	1,29	0,93	1,81	1,06	1,58	1,21	0,55	1,84	1,00	1,54	1,17	1,03	1,39	1,03	1,39
v32 (mm)	♀1,95	0,95	2,84	1,21	2,40	2,63	1,37	3,28	2,19	3,12	2,82	2,46	3,28	2,46	3,28
v32 (mm)	♂2,23	1,20	3,06	1,86	2,73										
v33 (mm)	♀0,88	0,38	1,48	0,66	1,09	1,26	0,82	2,02	1,04	1,48	1,38	1,15	1,53	1,15	1,53
v33 (mm)	♂1,01	0,71	1,58	0,77	1,22										
v34 (poměr)	2,26	1,02	3,46	1,75	2,86	2,10	1,32	2,95	1,63	2,55	2,07	1,79	2,57	1,79	2,57
v35 (%)	96,13	82,26	100	87,87	100	96,6	84,62	99,74	90,50	99,31	87,46	72,58	96,33	72,58	96,33
v36 (µm)	40,7	30,8	58,4	32,8	51,2	48,8	34,8	61,5	41,0	57,4	42,9	40,0	45,1	40,0	45,1

11.4 Seznam zkratk zkoumaných druhů

Andropol5	<i>Andromeda polifolia</i>	Polycom9	<i>Polytrichum commune</i>
Avenfle6	<i>Avenella flexuosa</i>	Polyst9	<i>Polytrichum strictum</i>
Barbatt9	<i>Barbilophozia attenuata</i>	Rubucha5	<i>Rubus chamaemorus</i>
Bazztri9	<i>Bazzania trilobata</i>	S/Pimug4	<i>Pinus mugo</i>
Bryumar9	<i>Bryum marrattii</i>	Sphacom9	<i>Sphagnum compactum</i>
Callvul5	<i>Calluna vulgaris</i>	Sphacus9	<i>Sphagnum cuspidatum</i>
Carepau6	<i>Carex pauciflora</i>	Sphafle9	<i>Sphagnum flexuosum</i>
Clspe9	<i>Cladonia species</i>	Sphamag9	<i>Sphagnum magellanicum</i>
Dicrber9	<i>Dicranum undulatum (=D.bergeri)</i>	Sphamaj9	<i>Sphagnum majus</i>
Erioang6	<i>Eriophorum angustifolium</i>	Sphapal9	<i>Sphagnum palustre var. palustre</i>
Eriovag6	<i>Eriophorum vaginatum</i>	Spharub9	<i>Sphagnum rubellum</i>
Homoalp6	<i>Homogyne alpina</i>	Spharus9	<i>Sphagnum russowii</i>
Lycocann9	<i>Lycopodium annotinum</i>	Tricces6	<i>Trichophorum cespitosum</i>
Melasy16	<i>Melampyrum sylvaticum</i>	Vaccmyr5	<i>Vaccinium myrtillus</i>
Molicae6	<i>Molinia caerulea</i>	Vaccoxy5	<i>Vaccinium oxycoccos</i>
Myliano9	<i>Mylia anomala</i>	Vacculi5	<i>Vaccinium uliginosum</i>
Piceabi3	<i>Picea abies</i>	Vaccvit5	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>
Pleusch9	<i>Pleurozium schreberi</i>		

11.5 Abstrakt

Rod *Empetrum* L. (šicha) je v České republice zastoupen třemi cytotypy. Dva jsou nejčastěji označovány jako druhy a to diploidní taxon *E. nigrum* L. – šicha černá ($2n = 2x = 26$) a tetraploidní *E. hermaphroditum* Hagerup - šicha oboupohlavná ($2n = 4x = 52$). Jako třetí se u nás vyskytuje triploidní cytotyp, který je hybridogenního původu.

Diplomová práce je zaměřena na zjištění a hodnocení morfologické diferenciaci a stanovištních preferencí u jednotlivých cytotypů, které by měly významně přispět k řešení taxonomické problematiky studované skupiny (zejména oprávněnosti samostatného ranku pro diploidní a tetraploidní cytotypy). Narozdíl od všech předchozích studií byli začlenění výhradně jedinci se známým stupněm ploidie, získané výsledky jsou proto věrohodnější a objektivně odrážejí situaci ve skupině. Morfometrické analýzy hodnotily morfologické (makro- i mikro-) znaky pomocí PCA, shlukovacích a diskriminačních metod programů SAS a Syn-tax. Fytcenologické snímky byly hodnoceny korespondenčními metodami DCA a CCA programu Canoco a metodou One – Way Anova v NCSS.

Tato studie hodnotila rostliny z 39 lokalit z území Krkonoš, Šumavy, Krušných hor, Jizerských hor a Hrubého Jeseníku. Lokalit s výskytem jen jednoho cytotypu bylo 29. Na zbylých deseti z území Krkonoš byl prokázán smíšený výskyt diploidního a tetraploidního cytotypu a na čtyřech z nich se navíc vyskytoval i triploidní cytotyp.

Na základě morfometrických analýz se jako nejužitečnější znaky k odlišení diploidního od tetraploidního cytotypu ukázaly znaky na květních obalech. Největší přínos pro separaci mají znaky: délka korunního lístku, šířka korunního lístku a šířka kališního lístku. Pohlavnost květů je všeobecně považována za silně korelovanou s hladinou ploidie, nicméně její vliv na správné odlišení cytotypů je většinou menší než při využití výše uvedených znaků na květních obalech. Téměř 11% jedinců z celkového počtu kvetoucích jedinců hodnocených touto prací bylo jiné než předpokládané pohlavnosti květu.

Znaky na vegetativních orgánech a stanovištní preference mají pro odlišení jednotlivých cytotypů výrazně menší přínos vzhledem k jejich velké variabilitě. Určení sterilních jedinců je tudíž velmi problematické a často dokonce nemožné.

Klíčová slova: cytotyp, *Empetrum*, fytoocenologické snímkování, morfometrická analýza, ploidní úrovně, pohlavnost květů, průtoková cytometrie, triploid.

MORPHOLOGICAL AND PHYTOCENOLOGICAL DIFFERENTIATION OF THE GENUS OF *EMPETRUM*

The genus *Empetrum* L. in the Czech Republic occurs as three cytotypes. Two are usually regarded as species: the diploid *E. nigrum* L. ($2n = 2x = 26$) and the tetraploid *E. hermaphroditum* ($2n = 4x = 52$) Hagerup. The third is triploid and is of hybrid origin.

This thesis is focused on evaluating the morphological differentiation and habitat preferences of the individual cytotypes, which should significantly contribute to the taxonomic treatment of the studied group. In particular, it should shed light on whether treating diploid and tetraploid plants as separate taxa at the species rank is reasonable. Unlike in all previous studies, only individuals with a known ploidy level were included, yielding more trustworthy results that better reflect the situation in the group. Morphometric analyses examined macro- and micro-characters using PCA, cluster and discrimination analyses provided by the SAS and Syntax software. Phytocenological data were evaluated by correspondence analysis DCA and CCA in the Canoco package and analyse One – Way Anova in the NCSS package.

In this study, plants from 39 localities in the Krkonoše, Jizerské, Krušné, Šumava and Hrubý Jeseník mountains were examined. At 29 of the localities, only one of either diploid or tetraploid cytotype was present. At the remaining ten in the Giant Mountains, the occurrence of both diploid and tetraploid cytotypes was proved, at three of which the triploid cytotype was also present.

Based on morphometric analyses, the most useful characters for separating diploids and tetraploids turned out to be on the corolla and calyx. Petal length, petal width and sepal width had the highest contribution. Flower sexuality is commonly regarded as strongly correlated with ploidy level; however, its usefulness for distinguishing between diploids and tetraploids appeared to be inferior to the corolla and calyx characters mentioned above. Almost 11% of individuals of the total of plants flowering had a different-than-expected sexuality.

Characters on vegetative organs and habitat preferences have a significantly lower contribution due to their high variability. Identification of sterile individuals is therefore very problematic and often even impossible.

Key words: cytotype, *Empetrum*, floral sexuality, flow cytometry, morphometric analysis, phytocenology, ploidy level, triploid.

11.6 Klíč k určení zástupců rodu *Empetrum*

1a Pylových tetrad plně vyvinuto 72,5%-87,5%(-96%); karyologicky potvrzen výskyt v Krkonoších spolu s oběma podruhy *E. nigrum* L: Černohorská rašelina, Úpské rašeliniště, Čertova louka, Hraniční louka, Lubošská planina.....triploidní cytotyp

1b Pylových tetrad plně vyvinuto (82%-)88-100% *E. nigrum* L

01a K lístky (0,71-)0,98-1,48(-1,86) mm široké, C lístky (0,38-)0,72-1,16(-1,58) mm široké, největší listen (0,51-)0,66-1,31(-1,53) mm široký, C lístky (0,95-)1,54-2,57(-3,06)mm dlouhé, K lístky (0,93-)1,26-1,91(-2,24) mm dlouhé, rostliny mají v drtivé většině jednopohlavné květy, - Diploid, v peckovičce nejčastěji 7-10 semen, pylové tetrády nejčastěji 33-51 μ m.(Chf; V-VI;2n = 26);Vrchoviště, přechodová rašeliniště (H-Sa); roztr. V pohraničních pohořích; na smíšených lokalitách se často vyskytuje s druhem *Sphagnum rubellum*; karyologicky ověřené populace: Šumava, Krkonoše, Jizerské hory, Krušné hory;v Krkonoších společný růst s tetraploidním podruhem a často i s triploidním cytotypem. [*E. nigrum* L.] ...*E. n.* subsp.*nigrum*

01b K lístky (0,98-)1,31-1,91(-2,08) mm široké, C lístky (0,82-)1,04-1,48(-2,02) mm široké, největší listen (0,82-)1,09-1,64(-1,97) mm široký, C lístky (1,37-)2,19-3,12(-3,28)mm dlouhé, K lístky (0,93-)1,59-2,19(-2,46) mm dlouhé, rostliny mají většinou oboupohlavné květy, Tetraploid, v peckovičce nejčastěji 6-9 semen, pylové tetrády nejčastěji 41-57 μ m, (Chf; V-VI;2n = 52). Vrchoviště, subalpínské hole, skály (H-Sa); roztr., především v pohraničních pohořích, na smíšených lokalitách se často vyskytuje s druhem *Calluna vulgaris*, *Sphagnum russowii*; Karyologicky ověřené populace: Šumava, Jeseníky, Krkonoše Jizerské hory; v Krkonoších smíšený růst s diploidním podruhem a často i s triploidní cytotypem.(C2) [*E. hermaphroditum* Hagerup]*E. n.* subsp. *hermaphroditum* (Hagerup) Böcher

Mezi jednotlivými cytotypy České republiky existuje značná variabilita. Přestože byla prokázána vysoká korelace rozměrů kališních a korunních lístků s ploidií, i v těchto velikostech dochází k mírnému překryvu. Pokud zkoumaný jedinec bude v převažující většině velikostí květních obalů nabývat průměrných hodnot a ani ostatní znaky nepomohou k determinaci, lze využít níže uvedenou kanonickou klasifikační funkci. Jde o statistický postup, který kombinuje znaky tak, aby co nejlépe separovaly stanovené skupiny. Vyšší hodnota funkce určuje, do jaké skupiny zkoumaný jedinec nejpravděpodobněji patří, pokud je tato hodnota výrazně vyšší, lze jeho přiřazení ke skupině považovat za spolehlivé.

Diploidní cytotyp

$f = - 312,9425 + 2,52644 * \text{šířka největšího listenu} + 0,26333 * \text{délka kališního lístku} - 143,03550 * \text{šířka kališního lístku} + 473,44504 * \text{délka korunního lístku} - 182,68566 * \text{šířka korunního lístku}$

Tetraploidní cytotyp

$f = - 319,59758 + 5,63483 * \text{šířka největšího listenu} + 0,25708 * \text{délka kališního lístku} - 143,34042 * \text{šířka kališního lístku} + 473,92556 * \text{délka korunního lístku} + 183,04053 * \text{šířka korunního lístku}$

Triploidní jedinci nebyly při tvorbě kanonické klasifikační funkce zohledněni vzhledem k malému množství nalezených kvetoucích rostlin, u kterých bylo možno potřebné znaky stanovit. Výsledné hodnoty se nedají považovat za průkazné, lze pouze konstatovat, že ve většině znaků nabývají průměrných hodnot.