

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



## **Diplomová práce**

**Zhodnocení vnitrodruhové variability  
*Sparganium erectum* s využitím morfometrie,  
AFLP a průtokové cytometrie**

Soňa Píšová

Školitel: Mgr. Tomáš Fér, Ph.D.

Praha 2009



## Prohlášení

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

V Praze dne: .....

Podpis: .....

## **Poděkování**

Na prvním místě bych chtěla poděkovat Tomášovi Férovi za vedení této diplomové práce a za všechny jeho cenné rady a připomínky od prvopočátků až do finální verze.

Můj dík patří i vedení laboratoře průtokové cytometrie, Petru Vítovi a Tomášovi Urfusovi za dlouhodobou pomoc, připomínky a rady. Dále bych ráda poděkovala Veronice Kučabové za její velkou trpělivost, pomoc a rady při práci v DNA laboratoři. Chtěla bych poděkovat také Zdence Hroudové a Botanickému ústavu Akademie věd v Průhonicích za poskytnutí experimentálního bazénku a rady při zakládání experimentálních pokusů. Za rady, pomoc a cenné připomínky také patří můj dík i Janu Sudovi a Janu Štěpánkovi. Dále také děkuji za finanční podporu z výzkumného záměru MŠMT (MSM0021620828).

Velký dík patří i rodině a přátelům za trpělivost a podporu.

## Obsah:

<b>1. Úvod</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>6</b>
<b>3. Charakteristika rodu <i>Sparganium</i> L.</b> .....	<b>7</b>
3.1. Obecná charakteristika.....	7
3.2. Možnosti šíření .....	8
3.3. Ekologie.....	9
3.4. Ontogeneze .....	9
3.5. Význam.....	10
<b>3.6. Charakteristika druhu <i>Sparganium erectum</i> L.</b> .....	<b>11</b>
3.6.1. Obecná charakteristika.....	11
3.6.2. Rozšíření .....	11
3.6.3. Ekologie .....	12
<b>3.6.4. Charakteristika poddruhů <i>Sparganium erectum</i> L.</b> .....	<b>13</b>
3.6.4.1. subsp. <i>erectum</i> .....	13
3.6.4.2. subsp. <i>microcarpum</i> .....	14
3.6.4.3. subsp. <i>neglectum</i> .....	15
3.6.4.4. subsp. <i>oocarpum</i> .....	16
<b>4. Popis metod</b> .....	<b>17</b>
4.1. Morfometrické analýzy .....	18
4.1.1. Shlukovací metody .....	18
4.1.2. Analýza hlavních komponent.....	19
4.1.3. Diskriminační analýzy.....	19
4.2. Průtoková cytometrie – stanovení velikosti genomu.....	20
4.3. AFLP.....	21
4.4. Hybridizační experimenty a testy autogamie .....	25

<b>5. Metodika .....</b>	<b>26</b>
5.1. Sběr vzorků .....	26
5.2. Morfometrické analýzy .....	30
5.3. Průtoková cytometrie.....	32
5.4. AFLP.....	34
5.5. Hybridizační experimenty .....	37
<b>6. Výsledky .....</b>	<b>38</b>
6.1. Morfometrické analýzy.....	38
6.1.1. Základní statistiky .....	38
6.1.2. Korelace proměnných .....	38
6.1.3. Shlukovací metody.....	38
6.1.4. Analýza hlavních komponent .....	41
6.1.5. Diskriminační analýzy.....	44
6.2. Průtoková cytometrie.....	50
6.3. AFLP.....	53
6.4. Hybridizační experimenty a testy autogamie .....	58
<b>7. Diskuze .....</b>	<b>60</b>
<b>8. Závěr.....</b>	<b>71</b>
<b>9. Abstract.....</b>	<b>73</b>
<b>10. Citovaná literatura.....</b>	<b>74</b>
<b>11. Seznam obrázků a tabulek .....</b>	<b>84</b>
<b>12. Seznam příloh .....</b>	<b>86</b>

## 1. Úvod

Vodní prostředí je významným stanovištěm pro velké množství rostlinných a živočišných druhů. Zvláště u rostlin, vázaných na tato stanoviště, je pak patrná velká míra morfologické variability. Je to dáno proměnlivostí vodního prostředí jako takového, u kterého dochází k častému kolísání vodní hladiny, popř. hladiny spodní vody, teploty vody, propustnosti světla, obsahu živin a ke změnám dalších faktorů. Následkem pak je značná fenotypová plasticita vodních a mokřadních rostlin (Vretare et al. 2001, Clevering et al. 1998, Szmeja et Galka 2008). Determinace druhů založená jen na vegetativních částech rostlin může tak být obtížná (Kaplan 2002, Simpson 1988). Často se stává, že si mohou být sterilní mladé rostliny velmi mezi sebou podobné, i pokud se jedná o různé rody (Cook et Nicholls 1986), což s sebou přináší odlišné taxonomické pojetí, jako je tomu u rodu *Sparganium* L. Značná fenotypová plasticita zapříčinila u tohoto rodu taxonomické obtíže a autoři uvádí různý počet taxonů od variet po druhy (Cook 1980, Cook et Nicholls 1986, 1987; Graebner 1900). Taxonomií rodu *Sparganium* se u nás zabýval Čelakovský (1896). V klíči v Analytické květeně rozlišuje druhy podle znaků na plodech, listech, okvětních lístcích a současně i podle doby kvetení a zralosti plodů. Graebner (1900) popsal při celosvětové revizi rodu 12 nových taxonů a celý rod byl rozdělen do několika taxonomických ranků (např. sekce, variety). Velká část těchto nových taxonů jsou pravděpodobně ale jen fenotypové stavy taxonu jediného, což je způsobeno použitím nestálých znaků k odlišení taxonů. Jedinými spolehlivými determinačními znaky se zdají být znaky na generativních orgánech (Cook et Nicholls 1987, Haasová 1997) jenž jsou méně plastické než vegetativní. Ačkoliv znaky jako velikost a šířka plodů nemohou být pro odlišení taxonů použity samy o sobě pro svoji proměnlivost, lze k determinaci použít jejich poměry. Vhodným znakem se ukázala být také barva plodů (Cook et Nicholls 1987, Kubát et al. 2002)

Na našem území se nacházejí v současné době tři druhy tohoto rodu a to *Sparganium minimum* WALLR., *Sparganium emersum* REHMANN a *Sparganium erectum* L. (Kubát et al. 2002). Čtvrtý druh *Sparganium angustifolium* MICHX je již vyhynulý. Druh *Sparganium erectum* L. se dále taxonomicky člení na poddruhy. V minulosti byl u tohoto druhu uváděn různý počet subspecifických taxonů s odlišnou taxonomickou hodnotou (Čelakovský 1896, Graebner 1900, Dostál 1950, Hess et al. 1967, Haasová 1997).

Ucelený přehled počtu taxonů a jejich hodnot je shrnut v předchozí diplomové práci Haasová (1997). Většina studií používala pro odlišení pouze znaky na vegetativních orgánech a tak se vnitrodruhové členění druhu *Sparganium erectum* stalo neočekávaně problematické.

Současné členění tohoto druhu je založeno na morfologii plodů, a rozlišují se čtyři poddruhy: *S. erectum* subsp. *erectum* L., *S. e.* subsp. *oocarpum* (ČELAK.) DOMIN, *S. e.* subsp. *neglectum* (BEEDY) RICHTER, *S. e.* subsp. *microcarpum* (L.M. NEUMANN) DOMIN. (Cook 1961, Cook et Nicholls 1987, Dostál 1989, Krausch 1996, Kubát et al. 2002, Rothmaler 1988), které mají velmi podobné ekologické nároky i shodnou fyziologii (Cook et Nicholls 1987).

Determinaci jednotlivých poddruhů znesnadňuje i existence přechodných typů a směsných populací více poddruhů. Nejspíše tedy dochází ke křížení mezi jednotlivými poddruhy (Cook et Nicholls 1987). Zvláště u taxonu *Sparganium erectum* subsp. *oocarpum* se předpokládá jeho možný hybridní původ jako křížence subsp. *erectum* a subsp. *neglectum* (Haasová 1997, Cook et Nicholls 1987). Dále byla na základě studia herbářového materiálu a morfometrických analýz zjištěná u subsp. *neglectum* a subsp. *microcarpum* vysoká variabilita a přítomnost mnoha přechodných typů (Haasová 1997). Tyto poddruhy nelze tedy podle těchto analýz spolehlivě odlišit a proto je Haasová (1997) posuzuje jako společný taxon. Formy a variety udávané autory svědčí o velké variabilitě uvnitř tohoto druhu, kterou by bylo vhodné prověřit pomocí moderních biosystematických metod jako je průtoková cytometrie a molekulární analýzy, a získat tak přehled o této vnitrodruhové variabilitě.

Zatím nebyla taková studie s použitím molekulárních metod pro odlišení jednotlivých poddruhů realizována. S pomocí těchto metod lze určit i hybridní jedince a jejich původ. Je tak možné ověřit a doplnit předchozí diplomovou práci Haasová (1997) o metody, které nebyly dříve dostupné a porovnat jejich výsledky s klasickými metodami jako jsou morfometrické analýzy.

V současnosti se v systematicky a ekologicky zaměřených projektech velmi často uplatňuje studium genetické variability pomocí molekulárních markerů. Pro identifikaci druhově-specifických markerů, stanovení míry genového toku nebo zjištění příbuzenských vztahů lze velice dobře použít postupy, které detekují polymorfismus na úrovni celého genomu například metoda AFLP (Vos et al. 1995).

Pomocí AFLP je možné detekovat vysoké hladiny polymorfismu v jednotlivých vzorcích a nevyžaduje předchozí molekulární znalosti studovaného taxonu (Jones et al. 1997). Metodami jako je AFLP lze také prokázat klonalita populací (Pollux et al. 2007) a tím i převažující způsob reprodukce rostlin. Tato metoda byla úspěšně použita i při studiích hybridizace, protože její aplikací lze rozlišovat mezi blízké příbuznými rodičovskými genomy (Blleker 2003, Guo et al. 2005, 2006; Paun et al. 2006). Je tak možné prokázat jestli se jednotlivé poddruhy kříží nebo na společných lokalitách rostou po spolu a zachovávají si svoji identitu.

Součástí studie poddruhů je také analýza velikosti genomu typických a směsných populací pomocí průtokové cytometrie (Doležel 1997). Velikost genomu se stala velmi užitečným kvantitativním znakem v taxonomii a evoluci rostlin (Godelle et al. 1993, Zoldos et al. 1998). Rozdíly ve velikosti genomu lze pozorovat i na nižší úrovni než rodové a tak může být tento znak dobře využíván při studiích zabývajících se vnitrodruhovou variabilitou (Ohri 1998). Příprava vzorků pro tyto analýzy je velice jednoduchá a rychlá a lze analyzovat desítky až stovky vzorků během jednoho dne a sledovat tak variabilitu rozsáhlého souboru materiálu (Suda 2005). Vysoká přesnost analýz usnadňuje detekci i drobných odlišností jaderné DNA, a díky tomu lze detekovat blízké příbuzné taxony (Greilhuber 2005) i hybridní jedince za předpokladu, že mezi rodičovskými taxony je dostatečný rozdíl, min. 6-8 % (Suda et al. 2007).

Souhrn těchto molekulárních analýz poskytne lepší pohled na vnitrodruhovou diverzitu i na její úskalí v používání morfologických analýz. Lze pak všechny tyto použité metody propojit a získat tak pohled na členění druhu *Sparganium erectum* z více stran. Zároveň bylo vhodné ověřit možnost křížení mezi jednotlivými poddruhy a zda druh *Sparganium erectum* disponuje některým ze způsobů zabraňující samosprašení. V extrémních podmínkách, kde se tento druh běžně vyskytuje by byla nejvhodnějším způsobem reprodukce autogamie k zajištění zplození potomstva a udržení již dobře adaptovaným genotypů na stanovišti (Briggs et Walters 2001).



## 2. Cíle práce

Hlavním cílem práce je nalézt nejdůležitější morfologické znaky pro odlišení jednotlivých poddruhů a porovnat je s jednotlivými molekulárními metodami (AFLP, velikost genomu) a získat tak jak přehled vnitrodruhové variability, tak variability uvnitř uvažovaných poddruhů. Diplomová práce si klade následující otázky:

- (1) Má současné vnitrodruhové členění druhu *Sparganium erectum* L. na čtyři poddruhy opodstatnění v molekulárních rozdílech (AFLP, velikost genomu)? Lze rozlišit pomocí těchto metod jednotlivé poddruhy?
- (2) Korelují morfologické znaky na plodech s variabilitou zjištěnou technikou AFLP, popřípadě s velikostí genomu?
- (3) Je *Sparganium erectum* subsp. *oocarpum* opravdu hybridního původu? Které jsou rodičovské taxony?
- (4) Lze *S. erectum* subsp. *neglectum* a subsp. *microcarpum* považovat za jediný taxon nebo jsou to dva dobře definované taxony? Jaké znaky je možno použít pro jejich odlišení?
- (5) Je *Sparganium erectum* L. autoinkompatibilní?

### 3. Charakteristika rodu *Sparganium* L. (Brayshaw 1985, Cook et Nicholls 1986)

#### 3.1. Obecná charakteristika:

Rod *Sparganium* L. náleží do čeledi *Sparganiaceae* RUDOLPHI a je rozšířen po celém světě v temperátních a chladnějších klimatických zónách (Obr. 1). Nejvíce druhů se vyskytuje v severní boreální zóně a regiony s největší diverzitou jsou Severní Amerika a východní Asie. Nejsou známy žádné endemické taxony a většina druhů má kontinuální pattern rozšíření. Všechny fosilní nálezy, týkající se tohoto rodu jsou obsazeny i dnes, vyjma druhu *Sparganium erectum* L. (Cook et Nicholls 1986).

Jedná se o vodní, jednodomé, oddenkové vytrvalé rostliny se střídavými, přímými listy s pochvatými bázemi. Lodyhy mohou být vzpřímené nebo plovoucí. Listy nemají palisty, bývají dvouřadé a nejsou rozlišeny na čepel a řapík, pro růst ve vodním prostředí jsou vybaveny aerenchymatickým pletivem. Přímé listy ponořené nebo plovoucí, většinou bazální a vějířovitě uspořádané, více méně ploché až do tvaru V nebo trojúhelníkovité, občas kýlovité, s mnoha podélnými žilkami (anastamózami), celokrajné, na vrcholu kulaté nebo špičaté. Listy v dolní části květenství jsou listům podobné, postupně redukované a šupinám podobné ve střední části květenství, často pak chybějí v horní části.

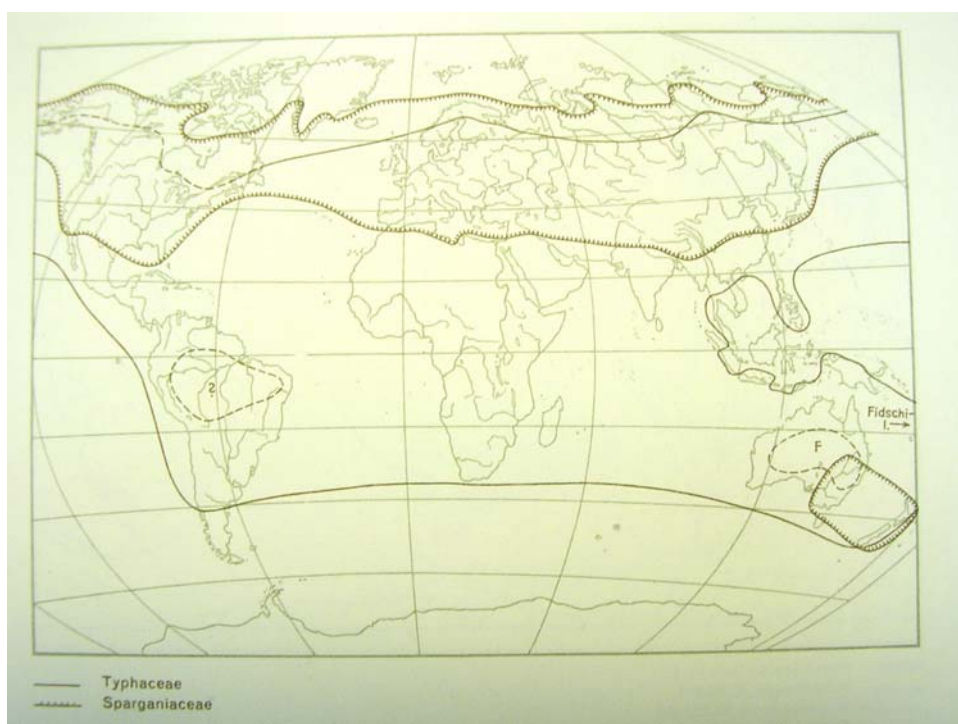
Samčí a samičí květy jsou oddělené v kulovitých hlávkách. Samičí květy se nacházejí ve spodní části květenství a samčí v horní části květenství v jednoduchých nebo větvených květenstvích. Samčí květy, obvykle podepřené nápadným listenem jsou pevně zhuštěné v hlávkách, tyčinek je 1-8, pistilodia a nektaria chybí. Samičí květy jsou u většiny druhů stopkaté, nemají tyčinky ani nektária. Semeník je svrchní s jedinou čnělkou, často na plodu vytrvávající, s 1-2 bliznami. Samičí květy mají až šest paprskovitých okvětních lístků, které jsou podobné šupinám a obvykle nahoře rozšířené, často nepravidelné v tvaru a uspořádání. Morfologie květních částí byla kompletně popsána v Müller-Doblies (1969) a Müller-Doblies et Müller-Doblies (1977).

Plody jsou přisedlé nebo krátce stopkaté, natěsnané v ježovité hlávce, ale uvolňující se jednotlivě. Hlávky jsou jasně proterogynické. Navzdory tomuto faktu mnoho publikací včetně Greabnera (1900) uváděli u rodu *Sparganium* protandrii. U některých velmi větvených rostlin se stává, že nejnižší samičí hlávka je receptivní před tím než začne první samčí hlávka pylit a toto je obzvláště nápadné u druhu *Sparganium erectum*.

U této čeledi se předpokládá přenos pylu větrem, ale druh *Sparganium erectum* občas navštěvují zástupci pestřenek ze skupiny Melanostoma-Platycheirus (Leereveld 1984), samičí hlávky jsou však navštěvovány velmi vzácně a na velmi krátkou dobu. Žádná agamospermie nebo autoinkompatibilita nebyla zjištěna (Cook et Nicholls 1986). U rodu *Sparganium* je diploidní počet chromosomů  $2n=30$  (Löve et Löve 1948).

### 3.2 Možnosti šíření:

Plody rodu *Sparganium* mohou zůstat plovoucí za experimentální podmínky více než rok (Guppy 1906, Praeger 1913). V přírodě plody vzácně zůstanou plovoucí více než 6 měsíců. Plovatelnost je zajištěna hydrofobní látkou, která pokrývá plod a je rozpustná v detergentu. Po zmrznutí v ledu se exokarp obvykle přetrhá a porézní mezokarp se brzy rozloží, na jaře jak pak endokarp volný a potopí se. Plovoucí plody mohou být šířeny vodním pohybem přivoleným gravitací nebo větrem. Hydrofobické plody se ochotně přilepí k objektům ve vodě a některé jsou pravděpodobně šířeny lodní dopravou nebo ptactvem na povrchu jejich těl nebo také uvnitř a zaživačím traktu, plody rodu *Sparganium* jsou totiž důležitou potravou pro vodní ptáky (Martin et Uhler 1939).



Obr. 1: Rozšíření čeledi *Sparganiaceae* (Meusel et al. 1965)

### 3.3. Ekologie:

Rozlišuje se okolo 20 druhů, ale některé sekce rodu mají prokazatelně obtížnou klasifikaci a množství druhů, poddruhů a variet se liší s různými taxonomickými přístupy. Druhy jsou velmi plastické a to, co se může zdát jako genetická variabilita jsou většinou pouze odpovědi rostlin na přírodní faktory jako je např.: nadmořská výška nebo hloubka vody. V některých druhových komplexech je tato variabilita příčinou taxonomických obtíží, ačkoliv se jedná o nepočtený rod. Vzhledem k silně vyvinutému vegetativnímu rozmnožování pomocí oddenků mohou tyto druhy tvořit značně rozsáhlé porosty, které však bývají po genetické stránce často pouze klonem a mohou původně pocházet z jedné mateřské rostliny. Přesto tu lze nalézt neočekávanou míru morfologické variability způsobenou právě vlivem okolního prostředí (Cook et Nicholls 1986).

Plasticita tvarů listů u některých druhů jim umožňuje okupovat místa vystavená rychlým změnám v hladině vody. Relativně hluboké kořeny, oddenky a stolony poskytují rostlinám velmi dobré ukotvení v substrátu a jsou tak schopné odolávat větším záplavám a přívalům vody. Druhy s vysokou fenotypovou plasticitou jsou obvykle špatní kompetitoři a vzácně tvoří velké kolonie (Cook et Nicholls 1986). Méně flexibilní druhy, buď vzpřímeno-vynořené, plovoucí nebo ponořené, jsou relativně silní kompetitoři a mohou se stát dominantou na velké ploše.

Zástupci rodu *Sparganium* jsou nalézáni ve stálých nebo sezónních vodních stanovištích. Fytocenologicky náleží do svazů *Glycerio-Sparganion* BR.-BL. ET SISSINGH in BOER 1942 a *Phragmition communis* KOCH 1926 (Dostál 1989). Díky oddenkům mohou některé druhy obývat bažiny nebo mokřiny bez stálé vody. U všech druhů listy umírají v zimě a rostliny hibernují zapaštěné v substrátu jako cibule nebo oddenky.

### 3.4 Ontogeneze:

Klíčení a vývoj semenáčků druhu *Sparganium erectum* je dobře zdokumentován a ilustrován v Cook (1962) a Cook et Nicholls (1986). Semeno je uzavřeno v pevném sklerenchymatickém endokarpu. Endokarp, je velmi jednotný ve struktuře v celém rodě a je dobře popsán v Dietz (1887) a Saccardo (1895). Klíčení probíhá ve vodě nebo plně nasycené atmosféře a zdá se být plně závislé na vytlačení mikropylové zátky nebo na rozlomení endokarpu. Žádná dormance nebyla pozorována (Cook et Nicholls 1986).

První stupeň klíčení se skládá z prodloužení stopky děložního lístku a je způsobený nasátím vody a může být demonstrován i na mrtvých semenech. Druhý stupeň růstu se pozná podle toho, že vrchol stopky děložního lístku zelená a že začalo bobtnat embryo. Semenáčky všech druhů se vyvíjejí ponořené ve vodě a mladé listy všech druhů netolerují vynoření nad vodní hladinu. Během této juvenilní fáze není možné odlišit jednotlivé druhy. Záleží pak na konkrétním druhu a místních ekologických podmínkách, zda listy zůstanou ponořené nebo později v ontogenezi, se stanou plovoucími nebo vynořenými (Cook et Nicholls 1986).

Druh *Sparganium natans* L. rozvíjí květy v juvenilní fázi a jde o ponořený druh. Další druhy jako *S. angustifolium* MICHAUX nebo *S. gramineum* GEORGI, rozvíjejí plovoucí listy po juvenilních ponořených s jasně odlišenu svrchní a spodní stranou. Tyto druhy kvetou ve fázi plovoucí. V poslední řadě druhy *Sparganium erectum* L. a *S. eurycarpum* ENGELM., rozvíjejí vzpřímené, vynořené listy přímo po juvenilních ponořených. Vzpřímené, vynořené listy mají také odlišenou svrchní a spodní stranu. Tyto druhy kvetou jen ve fázi vzpřímené, vynořené a jsou to zásadně terestrické rostliny, následně po jejich krátké vodní juvenilní fázi. Většina druhů obsazuje pozici mezi těmito třemi extrémy (ponořené, plovoucí, vynořené) a ukazují míru rozmanitosti vodních rostlin. Druhy jako *S. emersum* REHMANN, *S. fallax* GRAEBN. a *S. subglobosum* Morong ukazují značnou plasticitu a mohou kvést v plovoucí i vynořené fázi.

### 3.5 Význam:

*Sparganium* nemá žádnou významnou ekonomickou důležitost. V severozápadní Evropě se občas druhy *S. erectum* L. a *S. emersum* REHMANN považují za nevhodné plevele v malých řekách, kanálech nebo odvodňovacích stokách. Ačkoliv mají rostliny negativní dopad jako např.: redukci vodního proudu nebo blokaci vodního toku, mohou mít i pozitivní vliv v ochraně břehů před erozí. Rostliny jsou také hodnotnou potravou pro pernatou zvěř a nabízí úkryt mnoha vodním a mokřadním živočichům.

### 3.6 Charakteristika druhu *Sparganium erectum* L. - zevar vzpřímený

Synonymum: *Sparganium ramosum* HUDS.

#### 3.6.1. Obecná charakteristika:

Robustní vzpřímené, vynořené a jen zřídka plovoucí nebo ponořené rostliny. Listy široko vzpřímené se podobají vějíři, obvykle jsou vynořené a často narůžovělé na bázi, (30-)50-150(-350) cm dlouhé a (6-)10-20(-28) mm široké, trojúhelníkovité, kýlnaté od báze až k vrcholu. Květoucí lodyhy vzpřímené, 20-100(-150) cm dlouhé, skoro vždy větvené. Větvě v počtu (0-)2-5(-9), s (0-)1-3(-6) samičími hlávkami v dolní části a s (0-)6-9(16) samčími hlávkami v horní části květenství. Nejdolnější větev často nese jen 1 samičí hlávkou. Listeny jsou listům podobné, vzpřímené, kýlnaté od báze k vrcholu, podobné v horní části šupinám. Nejnížší listen obvykle přesahuje květenství.

Samičí hlávky vznikají u báze listenů a za plodu mají 15-32 mm v průměru. Samčí hlávky vznikají nad samičími na listenech nebo na vrcholové hlavní ose. Obvykle jsou tyto hlávky oddáleny. V době květu mají 10-12 mm v průměru.

Samičí květy s 3-6 okvětními lístky poněkud ztlustlými a tmavě hnědými až černými na vrcholu, neprůsvitnými, skoro celistvými na bázi. Vaječníky s 1, 2 nebo vzácně 3 plodolisty, ale nejméně polovina vaječnicků je jednoplodolistových. Blizny jsou (1,5-)2-4 mm dlouhé, poněkud nepravidelně ohnuté nebo svinuté. Více než polovina blizen je dvojklaných.

Samčí květy mají nitky 5 mm a prašníky 1,2- 1,5 mm dlouhé. Tyčinek je 3-8. Plody jsou velmi variabilní v tvaru, 4 -12 mm dlouhé a 2-7,5 mm široké. Stopka plodu chybí nebo je až 2 mm dlouhá. Plody se suchým pórovitým exokarpem a pevným endokarpem, mívají 6-10 podélných žebor, endosperm je moučný s velkým hladkým embryem . Oddenky jsou tenké, vodorovné až 60 cm dlouhé s (3-)6-9 mm v průměru.

#### 3.6.2. Rozšíření:

Druh *Sparganium erectum* je rozšířen v Evropě od polárního kruhu až po severní Afriku, Vyskytuje se také v jihovýchodní Austrálii, ale není jisté zda je introdukovaný nebo původní. Na území České republiky se vyskytuje roztroušeně od nížin do hor (Cook et Nicholls 1987).

### 3.6.3. Ekologie:

Ekologie *Sparganium erectum* je velmi podobná druhu *Sparganium emersum*, a pokud oba druhy rostlou spolu, pak *Sparganium erectum* obsazuje mělké vody nebo se omezuje na břehy. Vyskytuje se běžně podél vodních toků a v mělkých vodách okolo rybníků, tůní a jezer. Nicméně jen vzácně vytváří rozsáhlá stanoviště velmi podobná rákosinám. Je velmi tolerantní k disturbancím a může přežít i značné poškození. Optimální podmínky pro růst a tvorbu květů jsou uvolněné střednězrné náplavy v asi 10-20 cm nezastíněné, stojaté nebo pomalu tekoucí vodě. Rostliny rostoucí ve velmi hluboké nebo rychle tekoucí vodě mohou tvořit ponořené nebo částečně plovoucí listy, ale pak zůstávají obvykle sterilní.

Soliterní rostliny vytvářejí listy, které se rozvíjejí jako vějíř nad vodní hladinou, zatímco v hustém zápoji mají listy téměř svislé. Prostorová geometrie listů (Kaul 1973, *S. eurycarpum* EGELM.) zajišťuje vyšší asimilační plochu. Dykyjová et Ondok (1973) měřily celkovou sušinu včetně podzemních orgánů, překračující 2500g/m<sup>2</sup> v Československu, což je extrémně vysoká hodnota pro součást přírodního společenstva v temperátní zóně. Navzdory tomu je tento druh konkurenčně slabý a v relativně stabilních stanovištích může být přerůstán jinými vzpřímenými obojživelnými rostlinami jako např. *Glyceria*, *Typha* nebo *Phragmites*. Ve stojatých vodách může omezovat a nahrazovat menší vodní rostliny jako např. *Berula erecta*, *Elodea canadensis*, *Ranunculus sp.* nebo *Rorippa nasturtium-aquaticum*. Je enormně tolerantní a vyskytuje se v kyselých, téměř oligotrofních až brakických vodách nebo také ve znečištěných vodách vystavených odpadním splaškům. Neupevněné substráty a často špinavé eutrofní vody, kde dospělé rostliny prosperují jsou nejhorší podmínky pro mladé rostliny. Reprodukce semen je tak spíše důležitá pro kolonizaci nových vybagrovaných rybníků a kanálů, kde je voda čistá a není velký růst řas. V pomalu tekoucích vodách, kanálech a v pomalu proudících řekách, kde se akumuluje bahno, které může vést k zanášení toků se stává plevelem.

### 3.6.4. Charakteristika jednotlivých poddruhů (Cook et Nicholls 1987, Dostál 1958, 1989; Kubát 2002)

#### 3.6.4.1 *Sparganium erectum* subsp. *erectum* L. – zevar vzpřímený pravý

Synonymum: *Sparganium erectum* subsp. *polyedrum* (A. ET GR.) SCH. ET THELL.

Plody klínovitě-obpyramidální, (4-)6-10(-12) mm dlouhé a (3-)4-6(-7) mm široké, s odlišným ohbím mezi horní a dolní částí. Dolní část obpyramidální (4-)5-8(-10) mm dlouhá s odlišnými 3-6 žebry, světle hnědá. Horní část zploštělá, uhlazená, světle až tmavě hnědá nebo načernalá, matná (ne lesklá), hladká a velmi náhle zúžená do čnělky až 2 mm dlouhé. Semeník ze dvou plodolistů, ale pak je těchto semeníků méně než polovina. Endokarpy (3,5-)5,5-6(-7) mm dlouhé, 4-5 mm dosahující vrcholu plodu, stopky chybí nebo jsou velmi krátké. Okvětní lístky 4,5-7,5 mm dlouhé nejsou viditelné mezi plody na zralých hlávkách.

#### Rozšíření

Rozšířen je ve střední a jižní Evropě, ale z velké části chybí ve Skandinávii. V Británii je běžný jen jižně od Wash. Rozprostírá se směrem na východ ke Kavkazu a jižně do Turecka (Cook et Nicholls 1987).

#### Hybrid

*S. emersum* × *S. erectum* subsp. *erectum* = *S.* × *aschersonianum* (Hausknecht 1893)

Tento hybridní taxon je často citován v literatuře, ale jeho existence je sporná. Cook et Nicholls (1987) pochybují o tom, že tento hybrid vůbec existuje. Cook (1962) provedl experimentální křížení, které však bylo neúspěšné. Druh *Sparganium emersum* se často vyskytuje v zóně hlubší vody než *S. erectum*. Ačkoliv pyl musí být často přenášen od jednoho druhu ke druhému, tento kříženec není nikým jiným potvrzen a autentický herbářový materiál, který byl takto určen se vztahuje ke *Sparganium erectum* subsp. *microcarpum* (Cook et Nicholls 1987).



### 3.6.4.2 *Sparganium erectum* subsp. *microcarpum* (L.M. NEUMANN) DOMIN. – zevár vzpřímený drobnoplodý

Plody jsou náhle obpyramidální dole a kopulovité nahoře, (5,5-)6-7(-9) mm dlouhé a (2-)2,5-3,5(-4) mm široké, horní a dolní část se odlišuje tvarem a texturou s odlišeným ohbím mezi nimi. Dolní část je náhle obpyramidální, 4-6 mm dlouhá, se 3-6 žebry, světle hnědá až načervenalé hnědá. Horní část je klenutá a širší než dolní, s menším zaškrcením pod ohbím Barva je hnědá až černá, matná nebo trochu lesklá blízko ohbí, s nepravidelnými dlouhými záhyby nebo vráskami na bázi až 2 mm dlouhé čnělky. Semeník bývá dvouplodolistový jen vzácně. Endokarpy jsou (2,5-)4-5 mm dlouhé a 2,5-3 mm široké a nedosahující vrcholu plodu. Stopka je 1,5 mm dlouhá. Okvětní lístky, 4-6 mm dlouhé, jsou viditelné na zralých plodních hlávkách.

#### Rozšíření

Po Evropě, obzvláště je běžný ve Skandinávii, a sahá východně až do evropského části Ruska a Kavkazu (Cook et Nicholls 1987).

#### Hybrid

*S. erectum* subsp. *erectum* × *S. e.* subsp. *microcarpum*

Tento hybridní taxon byl zaznamenán Ostenfeldem Hansenem (1897) a je možná stejný jako *S. ramosum* var. *substerile* = *S. ramosum* subsp. *polyedrum* var. *substerile*. Plod je podobný *S.e.* subsp. *microcarpum*, ale hlávky jsou obvykle velmi sterilní (Cook et Nicholls 1987).

### 3.6.4.3 *Sparganium erectum* subsp. *neglectum* (BEEDY) RICHTER - zevar vzpřímený přehlížený

Synonymum: *Sparganium neglectum*, *S. ramosum* subsp. *neglectum*

Plody jsou větvenovité až elipsoidní, (6-)7-9(-10) mm dlouhé a 2-3,5(-5) mm široké, horní a dolní části bývají v podstatě podobné v tvaru, barvě i textuře, bez rozlišených žebor, jednotně světle hnědé až slámové. Dolní část je 3-5 mm dlouhá. Horní část bývá hladká (bez vrásek), postupně se zužující do (2-)2,5-3,5 mm dlouhé čnělky. Semeník je dvouplodolistový jen velmi vzácně. Endokarpy jsou (4-)5-6 mm dlouhé a až 3,5 mm široké, nedosahující vrcholu plodu. Stopky chybějí nebo jen velice krátké. Okvětní lístky jsou 5-6 mm dlouhé a mezi plody ve zralých hlávkách viditelné.

#### Rozšíření

Tento poddruh je rozšířen po většině Evropy, severně do Švédska a jižně k severnímu pobřeží Afriky. Také je zaznamenán z evropské části Ruska a jižně v Turecku a Řecku (Cook et Nicholls 1987).

.

#### Hybridi

*S. emersum*\**S. erectum* subsp. *neglectum*= *S. × englerianum* (Graebner 1897)

Tento hybrid pravděpodobně neexistuje. Autentický herbářový materiál odkazuje na nevyvinuté *S. erectum* subsp. *neglectum* (Cook et Nicholls 1987).

*S. erectum* subsp. *microcarpum* \* *S. erectum* subsp. *neglectum*

Jedná se pravděpodobně o stejný taxon jako je *S. ramosum* var *substerile* (Neumann 1897). Podobá se *S. erectum* subsp. *microcarpum*, ale plody jsou poněkud větší a protáhlejší a hlávky jsou částečně sterilní. Je příležitostně nalézán rostoucí spolu s rodiči (Cook et Nicholls 1987).

*S. erectum subsp. erectum*\* *S. erectum subsp. neglectum*

Několik autorů včetně Cook (in Stace 1975) poukázalo na skutečnost, že subsp. *oocarpum* je nejspíše tento hybrid, ačkoliv rostliny nejsou plně fertillní a je tedy možné, že by mohl být hybridního původu, ale je nanejvýš nepravděpodobné, že jde o křížence prvního stupně (Cook et Nicholls 1987).

#### **3.6.4.4 *Sparganium erectum subsp. oocarpum* – (ČELAK.) DOMIN. – zevar vzpřímený vejcoplodý**

Plody jsou široce vejčité až vejčité kulovité, 5-8 mm dlouhé a 4-7 mm široké, jednotně světle až středně hnědé a lesklé. Ohbí mezi dolní a horní části je nezřetelné. Dolní část je 2,5-5 mm dlouhá, skoro kruhovitá. Horní část se zužuje do čnělky a je občas vrásčitá nebo zmačkaná na bázi čnělky, ale jinak hladká. Čnělky jsou až 2 mm dlouhé a semeníky velmi často dvouplodolistové. Endokarpy bývají 3,5-4 mm dlouhé a až 4 mm široké, nedosahující vrcholu plodu. Stopky chybí nebo jsou jen velmi krátké. Okvětní lístky mezi plody ve zralých hlávkách jsou viditelné a 3-6 mm dlouhé.

#### Rozšíření

Izolované nálezy po téměř celé Evropě, Turecku a Iráku (Cook et Nicholls 1987).

#### Hybridní původ

Rostliny tohoto poddruhu vykazují velice malou fertilitu (Cook in Stace 1975) a je možné, že tento poddruh je hybridního původu. Po morfologické stránce jsou navrhovanými rodiči *S. e. subsp. erectum* a *S. e. subsp. neglectum*, ale je nepravděpodobné, že jde o křížence prvního stupně (jednoduchého křížení). Velké tlusté plody *S. e. subsp. oocarpum* mohly také vzniknout následkem přidělení zdrojů (způsobené např. slabým sprášením). U rostlin s málo plody na zralou hlávkou lze očekávat, že bude věnovat víc prostředků do zbylých plodů, které pak budou větší (tlustší).

Cook et Nicholls (1987) založily experimenty se *S. e. subsp. neglectum*, kde sprášení bylo upraveno tak, aby jen malé množství vajíček na hlávku bylo fertlních. Za těchto experimentálních podmínek *S. e. subsp. neglectum* také produkovalo tlustší plody a obojí šířka i váha plodu jsou silně korelovány s množstvím plodů na hlávku. Nicméně tyto plody jsou stále ještě rozlišitelné od plodů *S. e. subsp. oocarpum*, což vedlo zakladatele experimentů (Cook et Nicholls 1987) k upuštění od úvahy, že by mohl tento poddruh vzniknout na základě přerozdělování zdrojů.

## 4. Popis metod

### 4.1 Morfometrické analýzy

Porovnávací morfometrika jako jedna ze základních metod v taxonomických studiích je používána k odhalení variability ve skupině studovaných taxonů a je možné tento postup použít i na vnitrodruhové úrovni pro odlišení poddruhů (Ellison et al. 2004, Fici 2001, Kremer et al. 2002). Je vhodná pro studium většího počtu objektů nebo při větším množství znaků. S pomocí statistického zpracování lze ověřit znaky uváděné v určovacích klíčích, přidat nové znaky pro odlišení skupin nebo si položit otázku zda je vůbec možné na základě vybraných znaků dané objekty odlišit.

Pokud jsou součástí studie i přechodné typy mezi taxony nebo hybridy je nezbytné, aby analýzy také obsahovaly morfologicky typické jedince. Výsledkem měření znaků je primární matice (znaky jsou uspořádány ve sloupcích a jednotlivé objekty v řádcích). Pomocí koeficientů podobnosti je pak vypočtena sekundární matice, jejíž zpracování se liší s použitou metodou. K prvním výsledkům patří základní statistiky pro každý analyzovaný znak (minimum, maximum, kvantily, boxploty) a korelační matice znaků. Následují shlukovací a ordinační metody (Marhold et Suda 2002).

#### 4.1.1 Shlukovací metody

Metody shlukují objekty nebo skupiny objektů do nenáhodných skupin na základě jejich podobnosti. Metody se liší v definici podobnosti objektů. Metody začínají výpočtem hodnot podobnosti nebo nepodobnosti pomocí koeficientů, které tvoří sekundární matici a výsledkem analýzy je dendrogram.

Nejpoužívanějšími metodami jsou **jednospojivá** (single linkage, vzdálenost mezi skupinami je definována jako vzdálenost mezi jejich nejbližšími objekty), **všespojivá** (complete linkage, vzdálenost mezi skupinami je definována jako vzdálenost mezi jejich nejvzdálenější objekty), **průměrová** (average linkage, vzdálenost mezi skupinami je průměrem vzdáleností mezi všemi páry objektů), **centroidová** (UPGMC, vzdálenost v Euklidovském prostoru je definována vzdáleností mezi jejich centroidy, při shlukování se spojují skupiny, jejichž centroidy leží nejbližše)

a **mediánová metoda** (WPGMC, podobná se předchozí centroidové metodě, avšak její výhodou je její nezávislost na velikosti analyzovaných skupin, výsledek tak není zkreslen velikostí skupin oproti centroidové metodě) (Marhold et Suda, 2002).

#### 4.1.2. Analýza hlavních komponent (PCA)

Tato metoda slouží k redukci mnohorozměrného znakového prostoru na dvoj- nebo troj-rozměrný prostor, tak aby došlo co k možná nejmenším ztrátám informací obsažených ve znacích. Původní soubor pozorovaných znaků je nahrazen souborem novým, vzájemně nekorelovaných znaků, tak že první nová osa je vedena ve směru největší variability mezi objekty, druhá osa je pak kolmá na první osu a je vedena ve směru druhé největší variability mezi objekty. Relativní pozice objektů v původním znakovém prostoru zůstává stejná (Marhold et Suda, 2002).

#### 4.1.3. Diskriminační analýzy

Mezi další analýzy patří kanonická a klasifikační diskriminační analýza. Kanonická diskriminační analýza má interpretační funkci, je možné s její pomocí zjistit na kolik jsou předem stanovené skupiny odlišeny a které znaky nejvíce přispívají k tomuto odlišení. Kanonické osy jsou pak vedeny ve směru největší variability mezi těmito skupinami. Klasifikační diskriminační analýza pak slouží k identifikaci neznámých jedinců pomocí klasifikačního kritéria a určení úspěšnosti zařazení jedinců do příslušných předem stanovených skupin (Marhold et Suda, 2002).

## 4.2 Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) - stanovení velikosti genomu

Průtoková cytometrie je moderní a perspektivní metoda využívaná v molekulární biologii, systematice a ekologii (Bennett et al. 2000, Doležel 1997). Používá se ke stanovení obsahu jaderné DNA, určení ploidie a analýze buněčného cyklu. Hlavními přednostmi této metody je jednoduchá příprava vzorků, rychlost analýz, nedestruktivnost a nízké provozní náklady. Díky jednoduchosti a rychlosti této metody lze analyzovat desítky až stovky vzorků během jednoho dne a sledovat tak variabilitu rozsáhlého souboru materiálu (Suda 2005). Je to stále používanější metoda pro studium biodiverzity, která je jednodušší a rychlejší než zdoluhavé a na metodiku náročné metody jako je např.: počítání chromosomů.

Jeden z nejdůležitějších znaků, které lze pomocí průtokové cytometrie určit je velikost genomu, která se stala rychle velmi užitečným kvantitativním znakem v taxonomii a evoluci rostlin (Godelle et al. 1993, Zoldos et al. 1998). Základem je C hodnota definovaná jako množství DNA haploidního genomu jedince vyjádřená v pikogramech (pg) (Shift, 1950). Nereplikované somatické buňky pak mají hodnotu 2C (velikost genomu). Rozdíly ve velikosti genomu existují i na nižší úrovni než rodové a tak může být tento znak dobře využíván při ohraničení taxonů dokonce umožňuje odhalit skrytá taxonomické rozdíly i uvnitř druhů nebo skupin (např. agregátů) (Ohri 1998).

Ke stanovení velikosti genomu se používají jádra vyizolovaná většinou z listových pletiv ve vhodném izolačním pufru (Galbraith et al. 1983, Arumuganathan et Earle 1991). Vzorky s neznámou velikostí genomu je však možno analyzovat jen se standardem o známé velikosti genomu (Doležel 2005). K tomu se používá externí nebo interní standardizace. Při externí standardizaci jsou oba vzorky připraveny, barveny a změřeny zvlášť, oproti interní standardizaci, kdy jsou vzorky připraveny, barveny a změřeny společně. Nevýhodou externí standardizace jsou rozdíly mezi jednotlivými měřeními, které snižují jejich přesnost a tak neumožňují zjišťovat drobné rozdíly.

K barvení jader se používají fluorescenční barviva, chemické sloučeniny schopné absorbovat světlo o určité vlnové délce (např. 532nm) a následně vyzařovat fluorescenci odlišné vlnové délky, která je zaznamenávána optickými snímači. Používají se 3 základní typy fluorescenčních barviv (interkalační, AT specifická a fluorescenční antibiotika).

Pro určení množství jaderné DNA se používá většinou interkalační barvivo jako je propidium iodid, které se váže na DNA kvantitativně a intenzita fluorescence je pak přímo úměrná celkovému množství DNA (Doležel, 1997). Metoda je založená právě na měření optických vlastností (fluorescence) těchto obarvených izolovaných částic (jader) procházejících úzkou kapilárou. Výstupem je dvourozměrný graf, histogram, kde je na horizontální ose zobrazena intenzita fluorescence a na vertikální ose množství částic s daným rozsahem intenzity.

### **4.3 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)**

V současnosti se v systematicky a ekologicky zaměřených projektech velmi často uplatňuje studium genetické variability pomocí molekulárních markerů. Pro identifikaci druhově-specifických markerů, stanovení míry genového toku, zjištění příbuzenských vztahů nebo studium fylogeneze lze velice dobře použít postupy, které detekují polymorfismus v délce fragmentů na úrovni celého genomu – například AFLP (Vos et al. 1995).

Technika AFLP je považována za osvědčenou a efektivní metodu pro vyhodnocování genetické variability a taxonomické příbuznosti u mnoha planých i pěstovaných druhů rostlin (Sharma et al. 1996, Travis et al. 1996, Roa et al. 1997, Lerceteau et Szmidt 1999, Muluvi et al. 1999). Jednou z výhod je, že pro její použití není potřeba žádná předchozí molekulární znalost studovaných taxonů (Han et al. 2000; Ajmone-Marsan et al 2001).

Pomocí této metody AFLP lze studovat genetickou variabilitu mezi- i vnitropopulační, a to analyzováním mnoha míst rozmístěných v celém genomu (Folkertsma et al. 1996, Powell et al. 1995, Travis et al. 1996). Tímto můžeme získat i přehled o geografickém rozšíření (Sawkins et al. 2001), způsobu reprodukce (Piquot et al. 1998). Metodami jako je AFLP lze také prokázat klonalita populací (Pollux et al. 2007).

Tato metoda byla úspěšně použita při studiích hybridizace pro svou schopnost rozlišovat i mezi blízce příbuznými rodičovskými genomy (Bleker 2003, Guo et al. 2005, Paun et al. 2006). Je tak možné prokázat jestli se studované taxony kříží nebo na společných lokalitách rostou po spolu a zachovávají si svoji identitu.

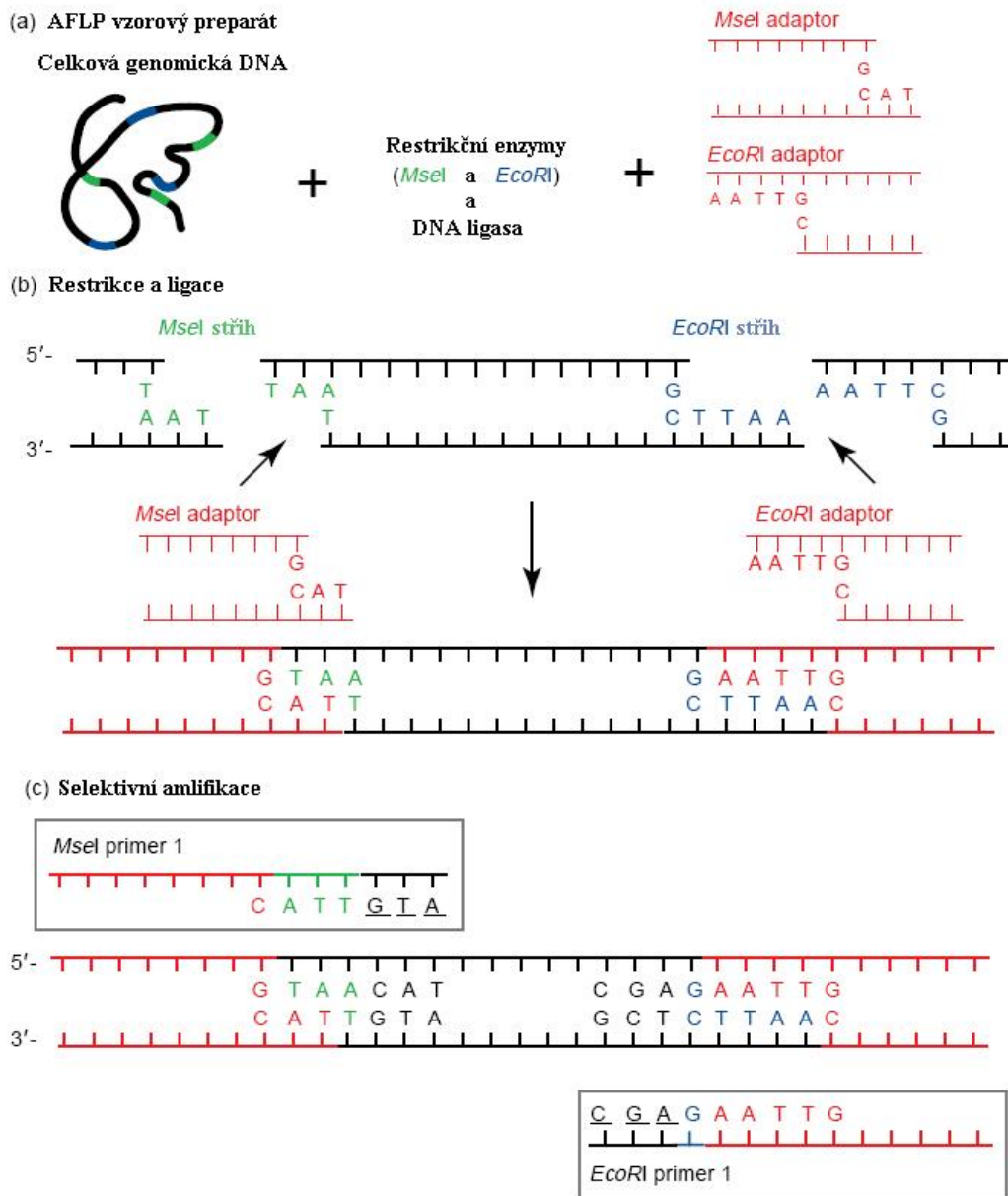


AFLP je metoda založená na selektivní amplifikaci restričních fragmentů z celkové genomu DNA pomocí dvojice restričních enzymů a následnou selektivní amplifikací specifických fragmentů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a může být použita pro analýzu DNA každého původu i složitosti (Vos et al. 1995). Spolehlivost, přesnost a síla této metody je zapříčiněna přísnými reakčními podmínkami, které musí být splněny při navázání (annealingu) primerů.

Metoda se skládá ze tří základních kroků (Obr. 2): (1) restrikce DNA a ligace oligonukleotidových adaptérů, (2) preselektivní a selektivní PCR amplifikace specifických restričních fragmentů a (3) analýzy amplifikovaných fragmentů na gelu. Při restrikci se používají dva restriční enzymy ke štěpení DNA na fragmenty (nejčastěji *EcoRI*, který specificky štěpí šestibázovou sekvenci a *MseI*, který specificky štěpí čtyřbázovou sekvenci). Na konce restričních fragmentů jsou pak pomocí T4 ligázy navázány adaptory se známou sekvencí. Vybrané fragmenty jsou pak amplifikovány pomocí a preselektivní a selektivní PCR s primery kompatibilními se sekvencí adaptorů a s jedním, resp. Třemi tzv. selektivními nukleotidy na 3'- konci. Fragmenty se následně oddělí podle délky na gelu nebo kapilárním elektroforetickém systému (Gort et al. 2006). Díky fluorescenčnímu značení jednoho ze selektivních primerů jsou amplifikované primery vizualizovány jako proužky gelu. Skórování výsledných proužků je dominantní, tj. určuje se jejich přítomnost nebo nepřítomnost (1 nebo 0). Výsledkem skórování je binární matice sloužící jako vstupní data pro vyhodnocování pomocí statistických metod. Vztahy mezi jedinci lze vyjádřit například pomocí analýzy hlavních koordinát (PCoA) s použitím Jaccardova koeficientu (Jaccard 1908), který je vhodný pro zpracování binárních dat. Dále je možné použít metody pro tvorbu stromů jako například neighbour-joining (Saitou et Nei 1987) s koeficientem genetické vzdálenosti Nei-Li (Nei et Li 1979). Podpora větví výsledného stromu lze otestovat pomocí bootstrapu (Efron 1979).

K výhodám molekulárních metod patří i možnost určení genetického vztahu mezi rodičovskými a potenciaálně hybridními taxony (Bensch et al. 2002, Guo et al. 2005). K identifikaci předpokládaných hybridních jedinců je možné použít např. modelové klastrovací metody založené na Bayesovském modelu v programu STRUCTURE (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003). Metoda vytváří model rozdělení jedinců do K skupin, z nichž každá je charakterizována specifickými frekvencemi alel. V rámci každé skupiny (K) se model snaží maximalizovat Hardy-Weinbergovu rovnováhu a vazebnou rovnováhu (linkage equilibrium). K získání odhadů posteriorního rozdělení program využívá metodu Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Nejoptimálnější množství skupin

(K) je pak určeno pomocí metody podle Evano et al. (2005). Výsledkem analýzy jsou pak pravděpodobnosti příslušnosti jednotlivých jedinců do každé z K skupin. U hybridních jedinců se předpokládá vysoká pravděpodobnost přiřazení jedinců do dvou skupin reprezentujících uvažované rodičovské taxony.



Obr. 2: Schéma jednotlivých kroků metody AFLP (Ulrich a Wolfenbarger 1999)

Legenda: DNA je na specifických místech štěpena dvěma restrikčními enzymy při restrikci (a) a AFLP adaptory jsou pak navázány (ligovány) na konce těchto úseků (b). Ligace adaptorů je provedena v přítomnosti restrikčních enzymů tak, že fragment k fragmentu je navázán ihned po odštěpení restrikčními enzymy. Adaptor je navržen tak, aby ligace fragmentu na adaptor neobnovila znovu restrikční místo. Koncové sekvence každého fragmentu po ligaci obsahují sekvenci adaptoru (červeně zobrazeno) a zbývající část restrikční sekvence. Tyto známé koncové sekvence slouží jako místa pro následnou preamplifikaci a selektivní amplifikaci. Při selektivní amplifikaci jsou primery prodlouženy do neznámých částí fragmentů (podtržená písmena), obvykle jeden až tři vybrané base za restrikčním místem (c, černě zobrazeno). Prodloužení primerů redukuje několika násobně počet amplifikovaných fragmentů (Ulrich a Wolfenbarger 1999).

#### 4.4. Hybridizační experimenty a testy autogamie

Hybridizace je důležitou evoluční událostí a porozumění tomuto procesu se stává jedním ze základních cílů při studiu evoluce, systematiky a fylogeneze určité skupiny organismů. Mezi hlavní otázky, které je potřeba zodpovědět je identita rodičovských druhů, směr a frekvence hybridizačních událostí, fitness a genetická variabilita hybridů a evoluční potenciál (Rieseberg et Carney 1998). Hybridní taxony se spíše vyznačují mozaikou rodičovských a intermediárních morfologických znaků než výhradně znaky intermediárními, přičemž vysoký podíl kříženců nese extrémní nebo zcela nové znaky (Rieseberg et Ellstrand 1993).

Pro ověření zda se určité taxony mezi sebou kříží se používají hybridizační experimenty (Zenkteler et Nitzsche 1984). K založení experimentů je potřeba mít k dispozici typické („čisté“) zástupce uvažovaných rodičovských druhů. Při křížení se zabráni opylení ze strany jedné z rostlin. První rostlina poslouží jako dárce pylu a druhá s odstraněnými samčími květy jako příjemce pylu. Zároveň musí být znemožněno opylení všemi ostatními jedinci.

Součástí experimentů bývá často i určení reprodukčního způsobu studované skupiny taxonů (allogamie, autogamie, apomixie). U rodu *Sparganium* není apomixie ani autoinkompatibilita zmiňována (Cook et Nicholls 1986). Předpokládaná autogamie sice ochuzuje genetickou variabilitu, ale na extrémních nebo okrajových biotopech, je výhodou udržení dobře adaptovaných genotypů bez větších změn. Autogamie se může uplatnit především tam, kde by opylování mezi různými jedinci mohlo být riskantní nebo nemožné a také je zaručenou metodou zplodění potomstva (Lloyd 1979). Vzhledem k jednopohlavnosti květů druhu *Sparganium erectum* nepředstavuje provedení experimentů žádný větší problém.

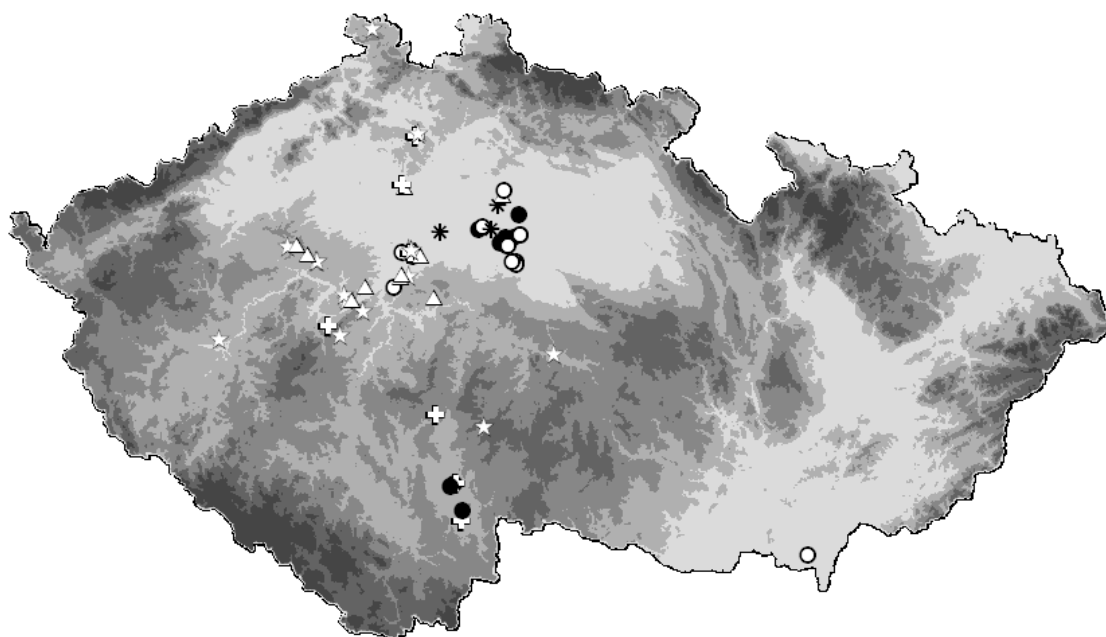
## 5. Metodika

### 5.1 Sběr vzorků:

Pro sběr rostlin jednotlivých poddruhů byly vybrány předem vhodné populace a to na základě předchozí diplomové práce Haasová (1997), která se také věnovala druhu *Sparganium erectum* na území České republiky. Součástí její práce byl i obsáhlý seznam herbářových dokladů plně postačující k zajištění sběru pro tuto práci. Ve výběru byly upřednostněny recentní lokality, aby byla zajištěna co největší pravděpodobnost, že se na dané lokalitě rostliny ještě vyskytují. Ale přesto některé údaje okolo 10 let staré již nebyly platné. Součástí práce byly i jedinci z nově nalezených lokality. Celkem bylo navštíveno 63 lokalit (Obr. 3, Tab. 1), tj. cca 15 typických populací pro každý uvažovaný poddruh a dalších 5 populací nezbytných pro studium směsných a přechodných populací. Pro zajištění reprezentativnosti populací byl stanoven sběr 5 vzorků pro každou typickou populaci a sběr 15 vzorků pro směsné populace. Ke standardním sběrům bylo ještě připočteno cca 30 rostlin pro potřeby hybridizačních experimentů a testů autogamie. Celkový počet je cca 350 vzorků. Jedinci byly značeni písmenem lokality a pořadovým číslem, např.: C1

Sběr vzorků proběhl v průběhu dvou let (2007-2008) a to v době plné zralosti plodů, tedy od července do září. První rok byl zaměřen pouze na typické populace jednotlivých poddruhů. V dalším roce byl pak sběr rozšířen o smíšené populace a jedince pro hybridizační experimenty.

Rostliny byly sbírány celé, a pak sušeny a herbářovány (kromě rostlin pro experimenty). Plody určené pro morfometrická měření se sušily odděleně, aby se tak předešlo deformacím při lisování. Z rostlin se také ihned po sběru odebraly vzorky listů pro potřeby analýz velikosti genomu (pomocí průtokové cytometrie) a pro AFLP. Pro hybridizační experimenty se rostliny udržovaly živé až do jejich umístění na experimentální plochu v Botanickém ústavu AVČR v Průhonicích.



Obr. 3: Mapa studovaných lokalit jednotlivých poddruhů *Sparganium erectum*

Legenda: ● *S.e.* subsp. *erectum*, ○ *S.e.* subsp. *oocarpum*, ⊕ *S.e.* subsp. *neglectum*,

☆ *S.e.* subsp. *microcarpum*, △ neurčené lokality, \* směsné lokality

Tab. 1: Seznam studovaných lokalit druhu *Sparganium erectum* se souřadnicemi GPS

Popis populací	Lokality	GPS souřadnice
C	Cidlina u silniční mostu v Libici nad Cidlinou, červená tur. značka	50°7'24.931"N, 15°10'50.394"E
D	Cidlina u žel. mostu poblíž obce Sány, u Velkého Oseka	50°7'42.408"N, 15°13'56.69"E
E	Dobšice n. Cidlinou, Steklá strouha u r. Žehuně	50°8'11.183"N, 15°16'29.164"E
Do	Dobšice nad Cidlinou, Cidlina u silničního mostu poblíž vlak.nádraží	50°8'14.553"N, 15°16'0.015"E
F	mokřina u statku, Císařský (Šluknov)	51°0'3.653"N, 14°25'56.91"E
G	Dolní Břežany, r.Pazderák	49°57'44.614"N, 14°27'43.795"E
H	Břeclav, Bruksa, poblíž Kančí obory	48°45'40.655"N, 16°52'5.838"E
I	Tábor, r. Malý Jordán	49°26'8.672"N, 14°40'4.887"E

J	Černovice, Loucký r.	49°22'42.474"N, 14°57'44.256"E
<b>Popis populací</b>	<b>Lokality</b>	<b>GPS souřadnice</b>
K	Karlštejn, rybníček za odbočkou na Krupnou	49°55'29.479"N, 14°9'54.144"E
L	Libice nad Cidlinou, požární nádrž	50°7'43.834"N, 15°10'43.942"E
M	potok pod silničním mostem pod Zámeckým r., Mníšek pod Brdy	49°52'7.413"N, 14°15'27.216"E
N	mokřina v louce u obce Nová Ves u Světlé nad Sázavou	49°38'55.453"N, 15°25'16.146"E
O, 14P, 16P, O15P, E23P	Oseček, Kupecká strouha	50°6'23.476"N, 15°8'31.692"E
P	v potoku Botiči pod mostem u zámku, Průhonice	50°0'6.033"N, 14°33'21.325"E
Q	Mirošovice, Štičí rybník	49°54'26.129"N, 14°42'24.589"E
R, 7P	Křinec, Mrlina u žel.mostu	50°15'45.766"N, 15°8'28.389"E
S	Sychrov u Dobříše, "Nad Sýkorkou", struha v louce	49°46'38.116"N, 14°6'24.673"E
T	Třebotov, požární nádrž	49°58'26.207"N, 14°17'37.249"E
U	Újezd nad Lesy, Blatovský r.	50°4'47.573"N, 14°38'23.011"E
V	Velký Osek, druhý r. vpravo u východu z Libického luhu, žlutá tur.z.	50°6'2.86"N, 15°11'0.688"E
W, H1P, H4P, H5P, H9P, H10P, N9P, N13P, N18P	Hledsebe, mokřina Pšovky, cca 1km JV od obce	50°21'24.014"N, 14°34'19.184"E
Z	Lhotka u Mělníka, Pšovka	50°22'11.76"N, 14°33'5.846"E
Ch, E5P, E9P	Městec Králové, Krčský r.	50°13'13.634"N, 15°16'10.26"E
Ro	Rožďalovice, Třebonický r.	50°17'50.803"N, 15°11'0.772"E
Rz	Rožďalovice, Bučický r.	50°18'56.276"N, 15°11'26.837"E
Po	Praha - Dol.Počernice, Počernický r.	50°5'5.04"N, 14°35'26.757"E
Ps	Praha - Dol.Počernice, struha podél Počernického r.	50°5'14.711"N, 14°35'5.589"E
VI	Vlkov nad Lužnicí, Vlkovský r.	49°8'43.185"N, 14°43'56.587"E
Ha	obec Hamr, r. Přední Saks	49°9'46.292"N, 14°45'36.242"E
Ne	obec Hamr, Nežárka pod splavem	49°9'26.423"N, 14°45'58.951"E
Vy	r. Výtopa, za Rožmberkem	49°3'3.964"N, 14°47'54.443"E
Tr	Třeboň, prostřebská struha u žel st. Třeboň lázně	49°0'23.39"N, 14°46'37.232"E
Za	Zadní třebáň, Berounka	49°55'9.36"N, 14°12'12.953"E
Ny	Nymburk, v Labi	50°11'0.982"N, 15°2'29.105"E
Km	Kostomlaty nad Labem, 55,5 říční km Labe	50°10'21.905"N, 15°0'19.607"E
Sa	Praha - Šeberov, Hrnčířský r.	50°0'17.267"N, 14°30'28.479"E
Vo	Velký Osek, potok Bačovka poblíž žel. Nádraží	50°6'3.667"N, 15°11'17.824"E
č	Čelákovice, v Labi u žel. Mostu poblíž žel. stanice Čelákovice Jiřina	50°10'19.809"N, 14°46'9.604"E
Ho	Praha - Vysočany, Hořejší r.	50°5'58.528"N, 14°31'36.414"E

Ko	Kolín, v Labi u žel.mostu	50°1'45.349"N, 15°12'44.698"E
<b>Popis populací</b>	<b>Lokality</b>	<b>GPS souřadnice</b>
K1	Kolín, první slepé rameno Labe	50°1'33.573"N, 15°13'31.262"E
K2	Kolín, druhé slepé rameno Labe	50°1'21.516"N, 15°13'53.997"E
Y	Černý most, potok u odbočky na Hradec Králové	50°6'6.824"N, 14°35'10.273"E
X	Černý most, potok pod obchodem IKEA	50°5'56.252"N, 14°35'37.671"E
Al	Praha - Dolní Počernice, r. Aloisov	50°6'18.246"N, 14°33'57.228"E
Ma	Praha - Černý most, struha z r. Martiňák	50°5'43.102"N, 14°34'19.768"E
Dk	Doksy, potok u viaduktu nedaleko žel.nádraží	50°34'12.065"N, 14°39'21.993"E
Ds	Doksy, potok pod Čepelským r.	50°33'40.426"N, 14°39'30.051"E
Jo	Doksy, struha z pramenu Jordán, silnice k Břehyni	50°34'15.954"N, 14°40'48.642"E
La	Lány, "prostřední r." u Panovy louky	50°6'30.172"N, 13°56'40.308"E
Re	Řevničov, Prameny Klíčavy, lesní rybník	50°8'53.963"N, 13°49'14.098"E
St	Nové Strašecí, Novostrašecký r.	50°9'7.121"N, 13°52'34.565"E
Sr	Srbsko, rybník na Budovickém potoce	49°56'38.605"N, 14°9'4.455"E
Br	Bratronice - rybníčky u hájovny Šarváš, první rybník	50°4'32.283"N, 13°59'41.231"E
Ba	Bratronice - rybníčky u hájovny Šarváš, druhý rybník	50°4'38.121"N, 13°59'57.41"E
Vb, Vz	Velké Zboží u silničního mostu přes Labe	50°9'56.596"N, 15°5'24.588"E
Vp	Praha - Šeberov, Kovářský r.	50°0'52.845"N, 14°30'57.863"E
Pl	Plzeň, mokřiny v lese u r. Strženka	49°47'16.91"N, 13°21'49.169"E
Hs	Hostimice, potok v obci	49°49'23.804"N, 14°2'37.149"E
Hp1	Praha - Horní Počernice (Svépravice), na koncem r. Eliška	50°5'56.96"N; 14°36'52.4"E
Hp2	Praha - Horní Počernice (Svépravice), r. Eliška	50°5'51.84"N; 14°36'40.42"E
Hp3	Praha - Horní Počernice (Svépravice), Starý r.	50°6'8.89"N, 14°35'49.923"E
Db	Praha - Dobřejovice	49°58'54.124"N, 14°34'45.15"E



## 5.2. Morfometrické analýzy:

Z každé rostliny bylo pro morfometrická měření náhodně odebráno 5 plodů a to z celého plodenství, tj. rozebráním všech plodních hlávek, zamícháním všech plodů a následným vybráním 5 plodů. Pro zjištění, které znaky jsou pro odlišení skupin (poddruhů) nejdůležitější se vytvořila základní skupina 50 jedinců obsahujících jen typické rostliny dobře reprezentující jednotlivé poddruhy. Na plodech z této skupiny se pak následně proměřilo 31 znaků (z literaturních údajů, květen a určovacích příruček, použity byly i znaky nové, viz Tab. 2).

Nejdříve byly vypočteny základní statistiky jako průměr znaků, směrodatná odchylka, medián, kvantily (procedura UNIVARIATE v programu SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) a korelace mezi znaky (procedura CORR), které by mohly negativně ovlivnit další analýzy.

Následovaly shlukovací metody (single link, complete link, UPGMA, UPGMC, WPGMC), které byly provedeny procedurou Hierarchical classification v programu SYNTAX 2000 (Podani, 2001) s použitím populačních průměrů, tedy s 63 objekty.

Za pomoci klasifikační diskriminační analýzy (procedura DISCRIM) byl pak zredukován počet znaků na ty nejdůležitější, v tomto případě na 14 znaků, které nejvíce přispívaly k oddělení určených skupin. Výběr probíhal tak, že každý znak byl zkušebně z analýzy odebrán. Podle procentuálního podílu chybně klasifikovaných jedinců pak byl znak vynechán z dalších analýz, pokud jeho odebrání z analýzy nezvýšilo podíl chybně klasifikovaných jedinců nebo byl znak v opačném případě ponechán (Marhold et Suda 2002). Vybrané znaky pak posloužily pro analýzu všech změřených plodů (celkem 1746 plodů u 350 jedinců).

Skupiny byly předem určeny pomocí metody AFLP, která jednoznačně definovala čtyři skupiny odpovídající předpokládaným poddruhům a tyto znaky nebyly použity v analýzách pro výběr znaků a hodnocení jejich významu pro odlišení skupin. Pomocí kanonické diskriminační analýzy (procedura CANDISC) pak byla zjištěna důležitost jednotlivých znaků pro odlišení předem určených skupin. K získání základního přehledu v datech byla použita analýza hlavních komponent PCA v programu SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Tab.2: Seznam 31 morfologických znaků na plodech druhu *Sparganium erectum* použitých v morfometrických analýzách.

Legenda: Vybrané znaky pro všechna další měření jsou označeny tučně a v závorkách je uvedeno odlišné značení pro 14 vybraných znaků.

Kodování znaků	Zkratky znaků	Popis znaků
v2	<b>STERL</b>	1 sterilita plodenství, 0 plně plodné
v3	<b>STOPKA</b>	1 přítomnost, 0 nepřítomnost plodní stopky
v4	DEL_OK	délka okvěti
v5	SIR_OK	šířka okvěti
v6	OKVETI	0 okvěti rovné, 1 na konci rozšířené s výčnělkem
v7	LEM_OK	světlý lem kolem okvěti 1 přítomnost, 0 nepřítomnost
v8	OK_B	1 hnědé skvrny jen konce okvěti, 0 skvrny po celé délce nebo nepřítomné
v9	OK_BB	1 hnědé skvrny po celé délce okvěti, 0 nepřítomnost
v10	OK_SKV	0 okvěti beze skvrn, 1 skvrny
v11	ZEB_B	1 žebra světlá (barevně odlišená), 0 barevně neodlišená
v12	SKV	1 hnědé čárkovité skvrny na plodu, 0 beze skvrn
v13 (v4)	<b>DEL_PL</b>	délka plodu
v14 (v5)	<b>DEL_DOL</b>	délka dolní části plodu
v15 (v6)	<b>DEL_HOR</b>	délka horní části plodu
v16 (v7)	<b>DEL_C</b>	délka čnělky
v17 (v8)	<b>OHBI</b>	1 ohbí výrazné, 0 ohbí nevýrazné
v18 (v9)	<b>SIR_OH</b>	šířka plodu na přelomu (ohbí)
v19 (v10)	<b>SIR_DOL</b>	šířka v polovině dolní části plodu
v20	SIR_HOR	šířka v polovině horní části plodu
v21 (v11)	<b>ZEBRA</b>	počet žeber
v22	SVR_C	svraskalost u čnělky 1 ano, 0 ne
v23	HOR_NAF	nafouklý v horní části 1 ano, 0 ne
v24 (v12)	<b>ZASK</b>	zaškrcení plodu 1 přítomné, 0 nepřítomné
v25	BARVA	barva horní a dolní části plodu stejná 0, odlišná 1
v26 (v13)	<b>DOL_OK</b>	délka okvěti/délka dolní části plodu
v27 (v14)	<b>DEL_SIR</b>	délka/šířka plodu (v ohbí)
v28 (v15)	<b>HOR_DOL</b>	délka horní části plodu/ délka dolní části plodu
v29	OK_DEL_S	délka/šířka okvěti
v30	C_PLOD	délka čnělky/délka plodu
v31	SIR_D_H	šířka dolní části plodu/šířka horní části plodu
v32	C_OHBI	délka čnělky/šířka plodu

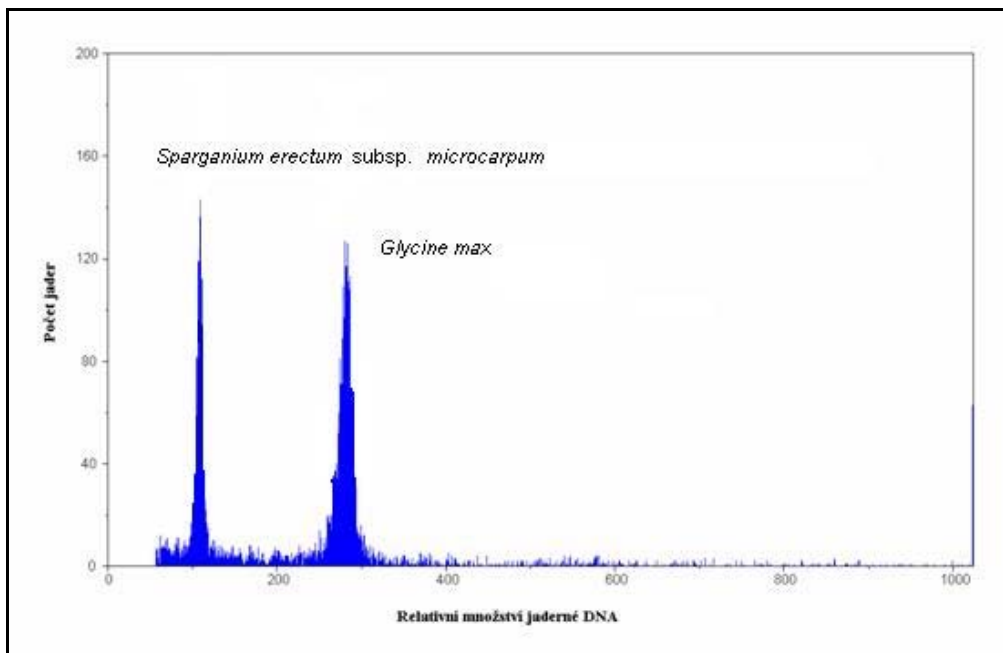
### 5.3. Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) - stanovení velikosti genomu:

Vzorky listů sebrané na vybraných lokalitách byly čerstvé ihned vloženy do narosených mikroténových sáčků, uchovávány v chladu a analyzovány v nejbližších dnech (maximálně do týdne). Výsledky vzorků analyzovaných v prvním dnu a dnech následujících byly podobné a nevykazovaly rozdíly větší než je odchylka měření. Rostliny sbírané později v říjnu, jejichž listy již nebyly vhodné pro analýzy byly pěstovány v umělých podmínkách a vzorky listů byly odebrány z nově vytvořených postranních výhonků. Tyto vzorky se nelišily ve velikosti genomu od rostlin analyzovaných během několika dní po návštěvě stejných lokalit odkud pěstované rostliny pocházely.

Ke stanovení velikost genomu byl použit přístroj CyFlow (Partec, světelný zdroj: laser s excitační vlnovou délkou 532 nm). Analýzy byly provedeny dle dvoustupňové techniky Otto (1990).

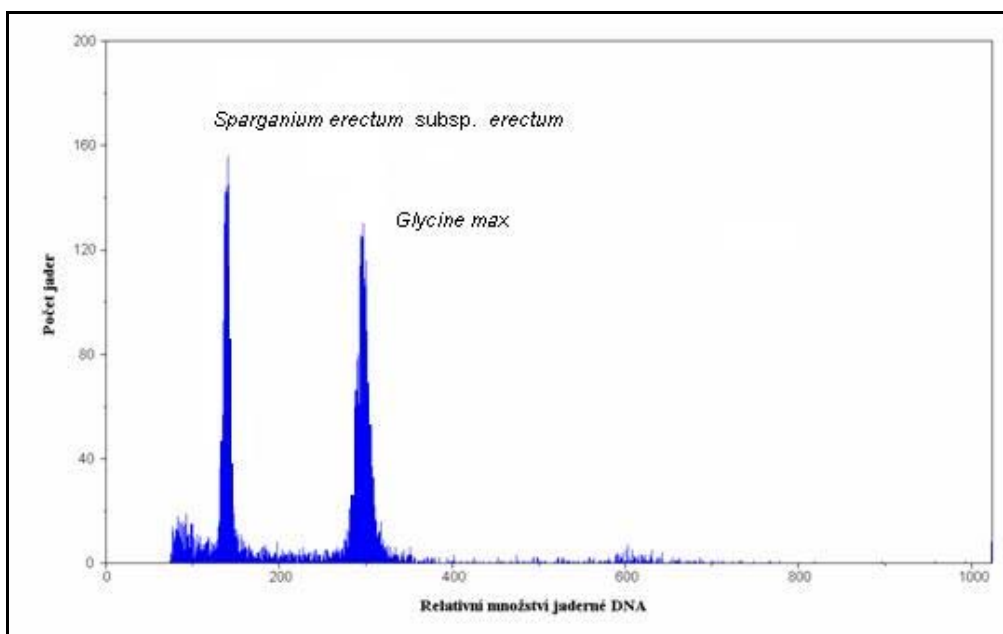
V Petriho misce, obsahující vychlazený hypotonický roztok Otto I (500 $\mu$ l, 0,1 M monohydrát kyseliny citrónové, 0,5% Tween 20), byla pomocí žiletky pečlivě rozsekána část čerstvého neporušeného listového pletiva vzorku (0,5-1 cm<sup>2</sup>) společně s obdobným množstvím pletiva příslušného interního standardu (*Glycine max* cv. Polanka, 2C = 2.50 pg). Suspense jader byla pak přefiltrována do zkumavky přes nylonovou síť (velikost oka 42  $\mu$ m) a obarvena 1ml barvicího roztoku (propidium iodid: 50 $\mu$ g/ $\mu$ l, Sigma; Otto II: 0.4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, RNáza IIA: 50 $\mu$ g/ $\mu$ l, Sigma;  $\beta$ -mercaptoethanol :2  $\mu$ l/ml, Sigma).

Po 10-15 min potřebných k působení barviva byl vzorek změřen. Analýza histogramů byla provedena pomocí programu FlowMax verze 2.4d (Partec) viz Obr. 4 a Obr.5. Velikost genomu byla pak vypočtena jako poměr průměrů píků vzorku a interního standardu (*Glycine max*)  $\times$  2,50 (velikost genomu *Glycine max*). Celkem bylo změřeno 362 jedinců (5 jedinců na populaci, 15 jedinců u přechodných nebo smíšených populací a cca 24 jedinců určených pro hybridizační experimenty). Pro počáteční analýzy byly všichni jedinci měřeni 3krát v různých dnech. Zjištěná velikost genomu nevykazovala výrazné rozdíly mezi jednotlivými měřeními a byla mezi jedinci v rámci populace velmi podobná, a tak následující měření probíhala tak, že byla změřena 3krát v různých dnech jedna rostlina z populace a ostatní byly měřeny jen jednou, za předpokladu stejných výsledků. Všech 24 rostlin určených pro hybridizační experimenty bylo změřeno 3krát.



Obr. 4: Grafický výstup cytometrické analýzy pro *Sparganium erectum* subsp. *microcarpum*.

Legenda: Poměr píků vzorku a standardu je 0,388 a zjištěná velikost genomu pro *Sparganium erectum* subsp. *microcarpum* je  $2C=0,97$  pg., CV standardu (2,95), CV vzorku (1,82)



Obr. 5: Grafický výstup cytometrické analýzy pro *Sparganium erectum* subsp. *erectum*.

Legenda: Poměr píků vzorku a standardu je 0,472 a zjištěná velikost genomu pro *Sparganium erectum* subsp. *erectum* je  $2C=1,18$  pg., CV standardu (2,06), CV vzorku (1,65)

#### 5.4. AFLP

Čerstvé vzorky listů potřebné na analýzy AFLP byly umístěny do sáčků se silikagelem, kde došlo k jejich rychlému vysušení. Z takto nasbíraných vzorků následně vyizolována celková DNA pomocí metody CTAB (Doyle et Doyle 1987). Pro rozdrcení rostlinného materiálu před extrakcí byl použit vibrační mlýnek Mixer Mill 200 (Retsch). Výsledný vysušený pellet byl rozpuštěn v 200 $\mu$ l 1 $\times$  TE pufru. Následující den pak byla stanovena koncentrace DNA pomocí fotometru BioPhotometer (Eppendorf) jako excitace při 260nm.

Metoda byla provedena pomocí kitu AFLP Core Reagent Kit I (Invitrogen). Získaná DNA byla štěpena na fragmenty pomocí dvou restrikčních enzymů *EcoRI* a *MseI*. Restrikce probíhala v termocykleru Mastercycler (Eppendorf) 3 hod při 37 $^{\circ}$ C a 15 minut při 75 $^{\circ}$ C, ligace pak 3 hod při 37 $^{\circ}$ C. Ověření správnosti průběhu restrikce a ligace bylo provedeno na 1.8% agarózovém gelu v 1 $\times$ TBE pufru. Preselektivní amplifikace s použitím AFLP Pre-amp Primer Mix I (Invitrogen) byla provedena v termocykleru Mastercycler ep S (Eppendorf) s následujícím programem:

72 $^{\circ}$ C	2:00	
94 $^{\circ}$ C	0:01	} 20 x
56 $^{\circ}$ C	0:30	
72 $^{\circ}$ C	2:00	
60 $^{\circ}$ C	30:00	
10 $^{\circ}$ C	hold	

Ověření preselektivní amplifikace bylo provedeno na 1.8% agarózovém gelu v 1 $\times$ TBE pufru. Pro zhodnocení genetické variability u všech testovaných jedinců byla zvolena pro selektivní amplifikaci dvojice primerů *EcoRI* a *MseI* v kombinaci B12 (*EcoRI* ACT, *MseI* CAT), G6 (*EcoRI* AAG, *MseI* CTC) a Y12 (*EcoRI* ACC, *MseI* CAT), která se ukázala jako nejvhodnější při předchozím testování (Fér et Pfosser, unpubl.).

Selektivní amplifikace proběhla v termocykleru Mastercycler ep S (Eppendorf) s následujícím programem:

94°C	2:00	
65°C	0:30	
72°C	2:00	
94°C	0:01	} 8 x
64°C	0:30 (v každém kroku -1°C)	
72°C	2:00	
94°C	0:01	} 23 x
56°C	0:30	
72°C	2:00	
60°C	30:00	
10°C	hold	

Produkty selektivní amplifikace byly následně přesráženy v 96% ethanolu s acetátem sodným (NaOAc) a následně přidán 0,25 µl standardu GeneScan ROX 500 (Applied Biosystems). Fragmentační analýza probíhala na automatickém kapilárním sekvenátoru ABI 3100 Avant (Applied Biosystems), v sekvenační laboratoři biologické sekce PřF UK v Praze (<http://www.natur.cuni.cz/~seqlab>), kde byly AFLP produkty elektroforeticky rozděleny podle délky. Všechna získaná data byla následně skórována v programu Genographer 2.0 beta (Benham 2001) a pak převedena do 1-0 matice, která poskytovala vstupní data pro další zpracování.

Pro zjištění základního pattern AFLP dat a detekci přechodných typů byla použita analýza hlavních koordinát s Jaccardovým koeficientem (PCoA v programu SYNTAX 2000, Podani 2001; Jaccard 1908). Stromy byly vytvořeny pomocí neighbour-joining (NJ, Saitou et Nei 1987; koeficient genetické vzdálenosti Jaccard, Jaccard 1908) v programu FAMD a k vizualizaci posloužil program Figtree 1.1.2. (Rambaut 2008). Výsledný strom pak byl následně testován pomocí bootstrapu (Efron, 1979) s opakováním 5000 (PAUP). Hodnoty bootstrapu překračující hodnotu 50% pak byly namapovány na původní neighbour-joining strom.

K odvození genetické struktury a odhalení předpokládaného hybridního jedince subsp. *oocarpum* byla použita modelová klastrovací metoda v programu STRUCTURE

version 2.2 software (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003). Program byl spuštěn na bioportálu v Oslu (<http://www.biportal.uio.no/>, Shalchian-Tabrizi et al. 2004). Analýza byla zadána pro počet skupin (K) 1-8 a pro každou skupinu (K) bylo tento výpočet proveden 10 krát. Všechny výsledky jsou založeny na 1 000 000 kroků MCMC řetězce s počáteční (burn-in) periodou 100 000 kroků. Výsledná data byla analyzována pomocí skriptu Structure-sum-2009.R (Ehrich et al. 2007) v prostředí programu R (R Development Core Team, 2008). Ke stanovení optimálního počtu skupin (K) byl použit postup podle Evano et al. (2005), který počítá rozdíly mezi skupinami pomocí tzv.  $\Delta K$ . Interpretovány byly pouze výsledky rozdělení do skupin s největším rozdílem ( $\Delta K$ ) a také rozdělení do skupin s relativně vysokým koeficientem podobnosti mezi jednotlivými výpočty pro dané K (similarity coefficient: Nordborg et al. 2005). Grafické zobrazení výsledků analýz bylo provedeno pomocí programu CLUMPP (Jakobsson et Rosenberg 2007) a DISTRUCT (Rosenberg 2004).

## 5.5. Hybridizační experimenty

Pro získání informací o reprodukčním způsobu a možnosti hybridizace mezi jednotlivými poddruhy druhu *Sparganium erectum* byly založeny hybridizační experimenty a testy autogamie na experimentální ploše v Botanickém ústavu AV ČR v Průhonicích. Z vybraných lokalit byly na experimentální plochu v květnu roku 2008 převezeny jedinci dobře reprezentující jednotlivé poddruhy. Rostliny byly zasázené do květníků a umístěné do bazénku s vodou pak posloužily k experimentům. Pro testy autogamie bylo celé květenství zakryto monofilovým sáčkem, aby se zabránilo sprášení pylem ze strany dalších rostlin.

Hybridizační experimenty byly provedeny jednoduše a to odstraněním všech samčích hlávek u jedné z uvažovaných rodičovských rostlin. Obě rodičovské rostliny pak byly zakryty monofilovým sáčkem, aby nedošlo k opylení ze strany ostatních rostlin v bazénku. Křížení bylo provedeno dvakrát oběma směry, detailnější přehled viz Tab.3. Po opylení pak byla sledována tvorba plodů, zda byly vytvořeny, případná sterilita a jestli vytvořené plody vyklíčily. V tabulce je přehled křížených rostlin. Příslušnost jednotlivých rostlin k danému poddruhu byla ověřena pomocí průtokové cytometrie a metodou AFLP.

Tab. 3: Seznam rostlin jednotlivých poddruhů druhu *Sparganium erectum* určených pro hybridizační experimenty a testy autogamie.

Legenda: Dárce pylu sloužil jak pro opylení rostlin s odstraněnými samčími hlávkami (příjemce pylu), tak i pro test autogamie. Pro každý poddruh byl test proveden dvakrát a to pro oba směry. Hybridizační experimenty zahrnují pouze 3 poddruhy a to subsp. *oocarpum*, jako uvažovaného hybrida a subsp. *erectum* a *neglectum*, jako uvažované rodiče. U subsp. *microcarpum* byla testována pouze autogamie. Původ sběrů je uveden v seznamu lokalit (Tab. 1)

Název dárce pylu	subsp.	Název příjemce pylu	subsp.
E5P	<i>erectum</i>	N9P	<i>neglectum</i>
E9P	<i>erectum</i>	N13P	<i>neglectum</i>
O15P	<i>erectum</i>	H1P	<i>neglectum</i>
18P	<i>erectum</i>	č13P	<i>oocarpum</i>
16P	<i>erectum</i>	č13P	<i>oocarpum</i>
14P	<i>erectum</i>	č4P	<i>oocarpum</i>
H10P	<i>neglectum</i>	č11P	<i>oocarpum</i>
H5P	<i>neglectum</i>	č2P	<i>oocarpum</i>
H10P	<i>neglectum</i>	16P	<i>erectum</i>
H4P	<i>neglectum</i>	E23	<i>erectum</i>
7P	<i>oocarpum</i>	N18P	<i>neglectum</i>
č3P	<i>oocarpum</i>	H9P	<i>neglectum</i>
č22P	<i>oocarpum</i>	E23P	<i>erectum</i>
č23P	<i>oocarpum</i>	E23P	<i>erectum</i>
M1P, M2P pouze test autogamie	<i>microc.</i>		



## 6. Výsledky

### 6.1. Morfometrické analýzy

#### 6.1.1. Základní statistiky

Výpočet základních statistik (průměr, směrodatná odchylka, kvantily) byl proveden pomocí procedury UNIVARIATE v programu SAS 9.1. Boxploty pro 14 měřených znaků jsou uvedeny v příloze A1. Výsledky pro počátečních 31 znaků i pro 14 následně vybraných znaků jsou uvedeny na přiloženém CD-ROMu (příloha B).

#### 6.1.2. Korelace proměnných

Před použitím dalších analýz byla zjištěna korelace znaků pomocí procedury CORR (SAS 9.1) se Spearmanovým korelačním koeficientem. Znaky s korelací vyšší jak 0,95 by měly být z dalšími analýzami vyloučeny (Marhold et Suda 2002). U všech 31 znaků nebyla korelace vyšší jak 0,95 nalezena a tak byly v klasifikační diskriminační analýze použity všechny znaky. Korelační koeficienty jsou uvedeny na přiloženém CD-ROMu (příloha B).

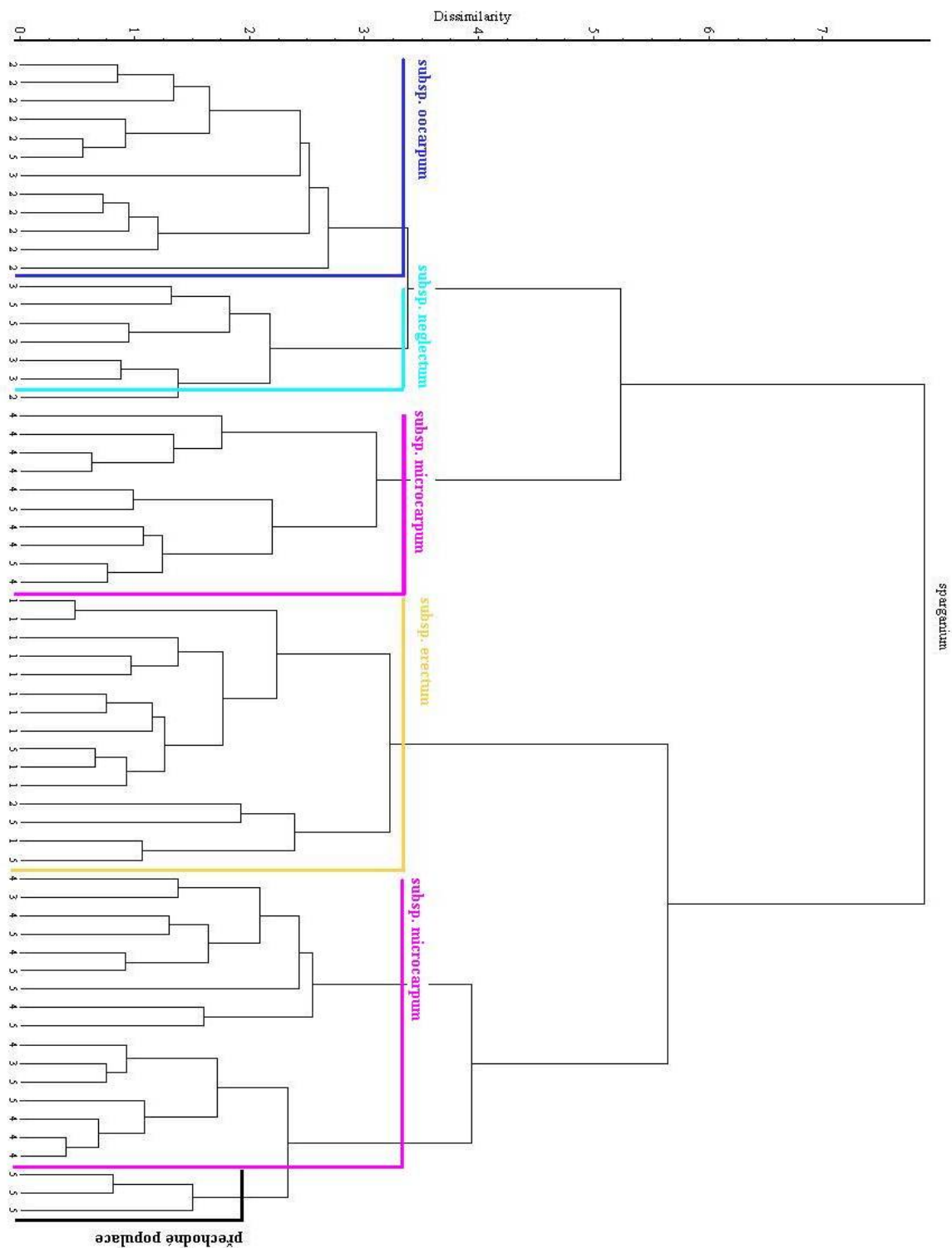
#### 6.1.3. Shlukovací metody

Pro výpočet všech shlukových metod bylo použito 63 objektů (populačních průměrů). V programu SYNTAX byly vypočteny následující analýzy (jednospojová metoda, všespojová metoda, průměrová metoda UPGMA, centroidová metoda UPGMC, a mediánová metoda WPGMC). Výsledné dendrogramy jsou si dosti podobné a kromě několika odlišně zařazených populací obecně odpovídají skupinám vytvořeným na základě výsledků získaných metodou AFLP.

Na grafickém výstupu (Obr. 6) všespojové metody lze až na několik výjimek odlišit jednotlivé skupiny (poddruhy). Jmenované výjimky se týkají jak populace subsp. *neglectum* (Ds), která je díky své částečné sterilitě členěna podle morfologie do subsp. *oocarpum*, tak přechodných populací (U, T, Za, Vp). Populace T je ve všech metodách řazena do subsp. *neglectum*. Zbylé tři přechodné populace jsou pak u některých metod uvedeny samostatně mimo skupiny reprezentující jednotlivé poddruhy.

Označení skupin je stejné jako u následujících metod: 1 - subsp. *erectum*, 2 – subsp. *oocarpum*, 3- subsp. *neglectum*, 4- subsp. *microcarpum*, 5 - neurčení a přechodní jedinci.

Grafické i textové výstupy všech shlukovacích metod včetně zdrojového souboru jsou na příloženém CD-ROMu (příloha B)

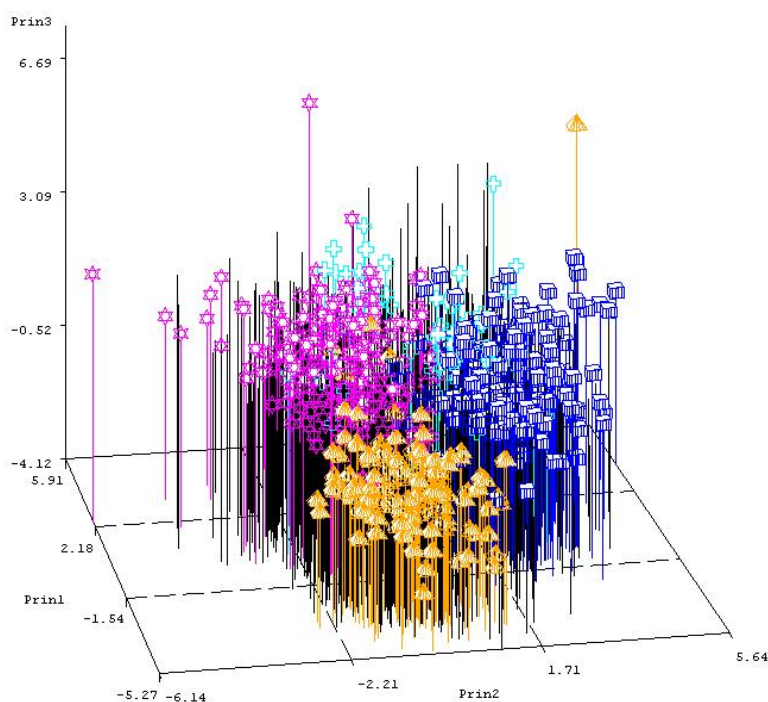


Obr. 6: Grafický výstup všespojové metody (complete link) pro 63 populací druh *Sparganium erectum*.

Dendrogram vytvořený v programu SYNTAX 2000 pro 63 studovaných populací na základě 14 morfologických znaků na plodech v celku dobře odděluje skupiny předem stanovené pomocí AFLP. Přechodné populace (U, Vp) jsou umístěny samostatně v pravé části dendrogramu.






#### 6.1.4. Analýza hlavních komponent (PCA, procedura PRINCOMP)

Analýza byla použita pro základní přehled v datech. Pro výpočet byly použity jak všechny naměřené plody (n=1746, Obr.7), tak i průměry na jedince (n=350, Obr.č.8) a populační průměry (n=63, Obr. 9). Všechna zdrojová data, texty i výstupy z analýz jsou k dispozici na přiloženém CD-ROMu (příloha B).

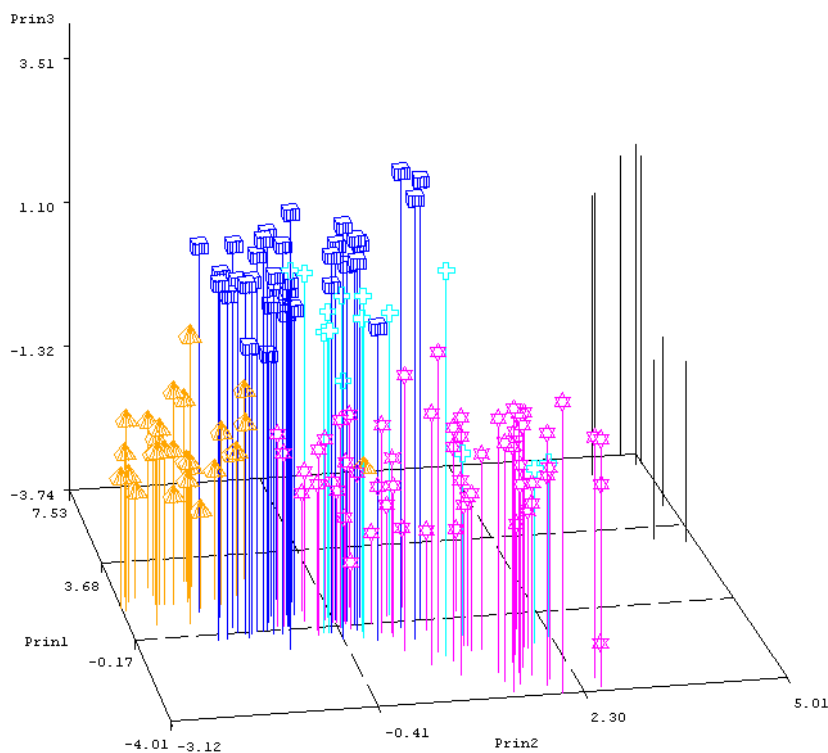


Obr. 7: Grafický výstup PCA měřených plodů pro *Sparganium erectum* s použitím 14 morfologických znaků pro 1746 plodů v programu SAS. Jednotlivé osy vysvětlují 35,97 %, 19,37 % a 13,34% variability.

Legenda:






- (1)  subsp. *erectum*, (2)  subsp. *oocarpum*, (3)  subsp. *neglectum*  
(4)  subsp. *microcarpum*, (5)  neurčení a přechodní jedinci

Výstup z analýzy PCA jednotlivých plodů (Obr.7) ukazuje na strukturu v datech, a to rozdělení na 3 skupiny (subsp. *erectum*, *oocarpum* a *microcarpum*), které jsou umístěné blízko sebe. Další skupina (subsp. *neglectum*) je odlišená méně a částečně se mísí se skupinami subsp. *microcarpum* a *oocarpum*. Podobné rozložení ukazují i analýzy jednotlivých jedinců (Obr. 8) a populací (Obr. 9).



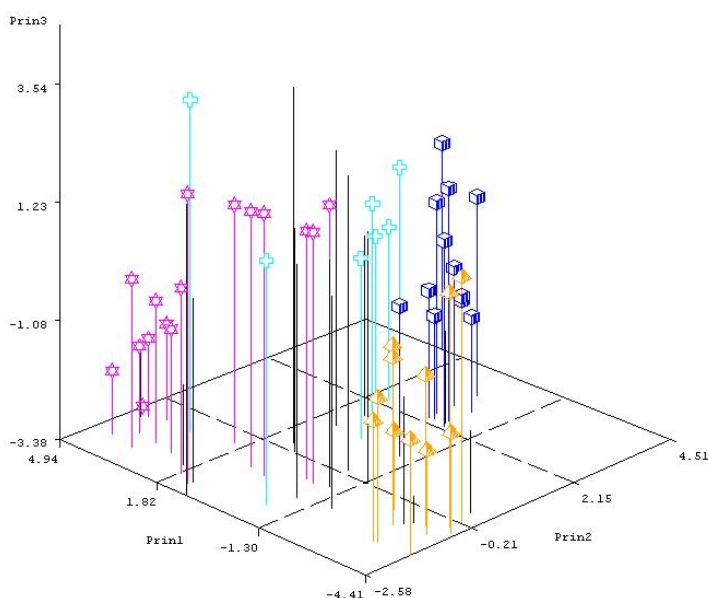
Obr. 8: Grafický výstup PCA zahrnující přechodné jedince pro *Sparganium erectum* s použitím 14 znaků pro 145 jedinců v programu SAS. Jednotlivé osy vysvětlují 33,18 %, 25,94 % a 17,08% variability.

Legenda:

- (1)  subsp. *erectum*, (2)  subsp. *oocarpum*, (3)  subsp. *neglectum*  
(4)  subsp. *microcarpum*, (5)  pouze přechodní jedinci (populace: U, T a Vp)

Pro zkoumání přechodných jedinců byly z jedné z analýz PCA odebráni všichni neurčení jedinci, kteří byly ve skupině 5 a ponecháno bylo jen 9 jedinců zastupující přechodné populace (Obr. 8; T, požární nádrž v Třebotově; U, Blatovský r. v Újezdu nad Lesy a Vp, Kovářský r. v Praze – Šeberov).






Tyto populace určené na základě AFLP lze, jak je z grafického výstupu analýzy hlavních komponent patrné, velmi dobře odlišit i podle morfologických znaků na plodech. Přechodní jedinci stojí samostatně mimo skupiny poddruhů a jsou tedy ještě lépe odlišeny než jednotlivé poddruhy samotné. Tato situace je nanejvýš zajímavá a k zjištění, které znaky oddělují přechodné jedince od všech čtyř poddruhů byly provedeny samostatné diskriminační analýzy.



Obr.9: Grafický výstup PCA pro jednotlivé populace *Sparganium erectum* s použitím 14 znaků pro 63 populací v programu SAS.

Jednotlivé osy vysvětlují 45,39 %, 21,88 % a 16,06% variability.

Legenda:

- (1)  subsp. *erectum*, (2)  subsp. *oocarpum*, (3)  subsp. *neglectum*  
(4)  subsp. *microcarpum*, (5)  neurčení a přechodní jedinci

### 6.1.5. Diskriminační analýzy

#### Klasifikační diskriminační analýza (procedura DISCRIM)

Analýza byla použita na posouzení souboru počátečního množství 31 morfologických znaků. Všech 50 jedinců bylo určeno správně do čtyř skupin. Následně bylo množství znaků redukováno na co nejnížší možný počet, v tomto případě 14 znaků, tak aby nedošlo k přílišnému nárůstu chybně určených jedinců. V tabulce (Tab.4) jsou uvedeny výsledky klasifikační diskriminační analýzy pro 136 jedinců s použitím 14 znaků.

Vzhledem k tomu, že jsou jednotlivé skupiny dobře definovány na základě výsledků metody AFLP, procentuální podíl správně určených jedinců vypovídá o podobnosti AFLP skupin s morfologickými. Zvláště u první skupiny se 100% správností určení je patrné, že morfologie plodů subsp. *erectum* plně koreluje s AFLP určením. Další skupiny mají také vysoký podíl správnosti určení (88,57% pro subsp. *oocarpum*, 71,43% pro subsp. *neglectum* a 98,31% pro subsp. *microcarpum*). Procento chybného určení (21,43%) u subsp. *neglectum* může být způsobeno překryvem v morfologických znacích a je částečně patrný už v analýze hlavních komponent.

Výsledky klasifikační diskriminační analýzy poukazují na to, že celkem bylo správně určeno 89,58% jedinců (n=136 jedinců, 14 měřených morfologických znaků), což také vypovídá o schodě morfologických a molekulárních znaků.

Pro posouzení přechodných populací (T, požární nádrž v Třebotově; U, Blatovský r. v Újezdu nad Lesy a Vp, Kovářský r. v Praze – Šeberov), které se oddělily již na základě předchozí analýzy hlavních komponent. Klasifikační diskriminační analýza byla provedena samostatně, aby nezkrusovala správnost určení jednotlivých poddruhů. Ukázalo se však, že správnost určení skupin reprezentující přechodné jedince byla 100% (Tab. 5).

Všechna vstupní data a výstupy z analýz jsou na přiloženém CD-ROMu (příloha B).

Tab.4: Výstup klasifikační diskriminační analýzy pro 136 jedinců druhu *Sparganium erectum* na základě 14 morfolických znaků na plodech.

	1 (erectum)	2 (oocarpum)	3 (neglectum)	4 (microcarpum)	Jiná skupina	Celkem
1	28	0	0	0	0	28
	100.0	00.00	0.00	0.00	0.00	100.00
2	0	31	3	0	1	35
	0.00	88.57	8.57	0.00	2.86	100.00
3	0	1	10	3	0	14
	0.00	7.14	71.43	21.43	0.00	100.00
4	0	0	1	58	0	59
	0.00	0.00	1.69	98.31	0.00	100.00
<b>Celkem</b>	28	32	14	61	1	136
	20.59	23.53	10.29	44.85	0.74	100.00
<b>Míra chyb</b>	0.0000	0.1143	0.2857	0.0169		0.1042

Tab. 5: Výstup klasifikační diskriminační analýzy pro 145 jedinců (včetně přechodných) druhu *Sparganium erectum* na základě 14 morfolických znaků.

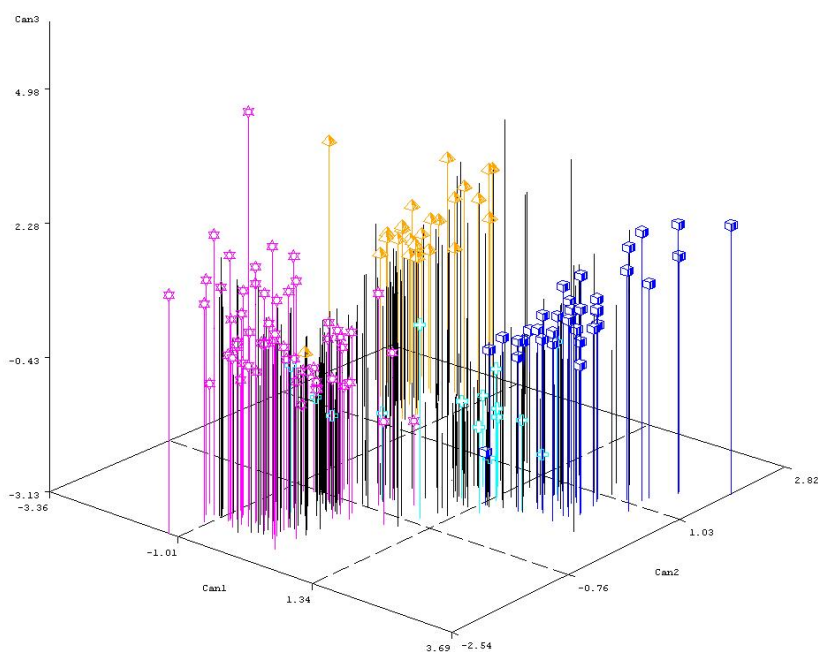
	1 (erectum)	2 (oocarpum)	3 (neglectum)	4 (microcarpum)	5 přechod. jed.	Jiná skupina	Celkem
1	28	0	0	0	0	0	28
	100.0	00.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
2	0	31	1	0	0	3	35
	0.00	88.57	2.86	0.00	0.00	8.57	100.00
3	0	1	10	3	0	0	14
	0.00	7.14	71.43	21.43	0.00	0.00	100.00
4	0	0	1	58	0	0	59
	0.00	0.00	1.69	98.31	0	0.00	100.00
5	0	0	0	0	9	0	9
	0.00	0.00	0.00	00.00	100.00	0.00	100.00
<b>Celkem</b>	28	32	12	61	9	3	145
	19.31	22.07	8.28	42.07	6.21	2.03	100.00
<b>Míra chyb</b>	0.0000	0.1143	0.2857	0.0169	0.0000		0.0834



## Kanonická diskriminační analýza (procedura CANDISC)

Důležitost jednotlivých znaků pro odlišení předem stanovených skupin byla zjištěna pomocí kanonické diskriminační analýzy a to jak pro všech 31 znaků tak i pro následně vybraných 14 znaků. Grafické výstupy a vstupní i výstupní data jsou na příloženém CD-ROMu (příloha B).






Na grafickém výstupu kanonické diskriminační analýzy 350 jedinců (Obr.č.10) je možno vidět velmi dobré odlišení první skupiny (subsp. *erectum*) od ostatních skupin reprezentujících poddruhy. Také skupiny subsp. *oocarpum* a *microcarpum* jsou od sebe dobře odlišeny. Stejně jako u analýzy hlavních komponent se zde mírně prolíná skupina subsp. *neglectum* se skupinami subsp. *oocarpum* a *microcarpum*. Poslední skupina zahrnující neurčené jedince se vyskytuje ve všech skupinách.



Obr. 10: Grafický výstup z kanonické diskriminační analýzy pro 350 jedinců druhu *Sparganium erectum* na základě 14 měřených znaků.

Kanonické osy vysvětlují 46,25 %, 39,43 %, 9,96 % variability.

Legenda:

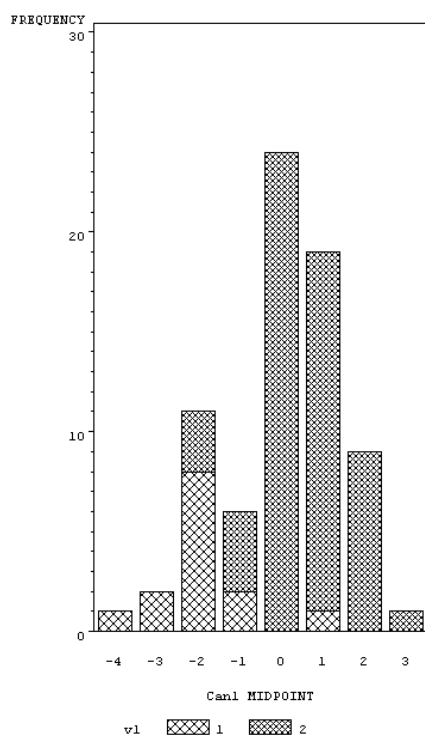
- (1)  subsp. *erectum*, (2)  subsp. *oocarpum*, (3)  subsp. *neglectum*  
(4)  subsp. *microcarpum*, (5)  neurčení a přechodní jedinci

Tab. 6: Kanonické korelační koeficienty pro 136 jedinců reprezentující poddruhy druhu *Sparganium erectum* a pro 14 měřených znaků.

Legenda: nejdůležitější korelace znaků s kanonickými osami jsou zvýrazněny tučně.

Znaky	Can1	Can2	Can3
v2 – sterilita	0.370016	<b>0.908001</b>	-0.029308
v3 - stopka	0.322860	<b>-0.607933</b>	0.012929
v4 – délka plodu	<b>-0.547484</b>	-0.064678	<b>-0.233657</b>
v5 - del_dol	<b>-0.748901</b>	-0.083289	0.026057
v6 – del_hor	0.542228	0.133222	<b>-0.320687</b>
v7 – del_c	0.256228	-0.082534	<b>-0.290522</b>
v8 - ohbí	<b>-1.000000</b>	0.000000	0.000000
v9 - šířka plodu	-0.509676	<b>0.679225</b>	<b>0.302002</b>
v10 - sir_dol	<b>-0.557812</b>	0.603982	0.191140
v11 - zebra	0.295371	-0.001218	-0.087330
v12 - zaškrvení	0.317063	<b>-0.626329</b>	0.091732
v13 - dol_ok	0.480621	-0.227547	-0.102518
v14 del_sir	0.225592	<b>-0.744436</b>	<b>-0.352051</b>
v15 hor_dol	<b>0.625897</b>	0.169379	-0.185716

Kanonické korelační koeficienty (Tab. 6) ukazují důležitost jednotlivých znaků pro odlišení poddruhů. Nejdůležitějším znakem oddělující subsp. *erectum* od ostatních poddruhů se ukázala být přítomnost (resp. znatelnost) ohbí (v8, korel. koef. 1,000 pro Can1). Z čehož vyplývá, že tento znak plně koreluje s určením tohoto poddruhu pomocí AFLP. Jeho odlišení je možné i na základě dalších znaků, např.: délka spodní části plodu (v5, korel. koef. 0,7489 pro Can1), délka plodu (v4, korel. koeficient 0,5475 pro Can1) a poměr délky okvětního lístku a délky spodní části plodu (v13, korel. koeficient 0,4806 pro Can1), poměr horní a dolní části plodu, vyjadřující minimální délku horní části plodu (v15, korel. koeficient 0,6259 pro Can1) a šířku dolní části plodu (v10, korel. koef. 0,5578).



Obr. 11: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy pro *Sparganium erectum* subsp. *neglectum* a *microcarpum*.

Legenda: (1) subsp. *neglectum* (n=14), (2) subsp. *microcarpum* (n=59)

Mezi důležité morfologické znaky patří i částečná sterilita plodenství (v2, korel.koeficient 0,9080 pro Can2), která odlišuje dobře subsp. *oocarpum*. K odlišení přispívá i poměrový znak délka plodu ku šířce plodu (v14, korel.koeficient 0,7444 pro Can2). Poddruh *microcarpum* je pak charakterizován přítomností plodní stopky (v3, korel.koeficient 0,6079 pro Can2) a společně se znakem zaškrčení ve střední části plodu (v24, korel.koeficient 0,6263 pro Can2).

Tab. 7: Kanonické korelační koeficienty pro 73 jedinců reprezentující *Sparganium erectum* subsp. *neglectum* a subsp. *microcarpum*.

Legenda: nejdůležitější korelace znaků s kanonickými osami jsou zvýrazněny tučně.

Znaky	Can1
<b>v3 - stopka</b>	<b>-0.379159</b>
v4 – délka plodu	0.147122
v5 - del_dol	-0.063492
<b>v6 – del_hor</b>	<b>0.373601</b>
v7 – del_c	0.166231
v8 - ohbí	0.000000
<b>v9 - šířka plodu</b>	<b>0.425889</b>
<b>v10 - sir_dol</b>	<b>0.424881</b>
v11 - zebra	0.041620
<b>v12 - zaškrčení</b>	<b>-0.508441</b>
v13 - dol_ok	-0.111082
v14 del_sir	-0.329501
v15 hor_dol	0.299655

Předešlé analýzy ukázaly částečný překryv subsp. *neglectum* se subsp. *microcarpum*. Pro lepší přehled o důležitých znacích oddělujících tyto dva poddruhy byla provedena kanonická diskriminační analýza zahrnující jen jedince těchto dvou poddruhů. Z analýz byl vyloučen znak sterilita plodenství, jenž nijak nevypovídá o morfologii plodů. Korelační koeficienty (Tab. 7) ukazují, že nejdůležitějšími znaky jsou: zaškrčení ve střední části plodu (v12), šířka plodu (v9), šířka v polovině dolní části plodu (v10), přítomnost stopky (v3) a délka horní části plodu (v6). Také znak poměr délky a šířky plodu (v14), popisují protáhlý tvar

subsp. *neglectum* má podíl na odlišení obou poddruhů. Z grafického výstupu kanonické diskriminační analýzy však také vyplývá částečný překryv (Obr .11).

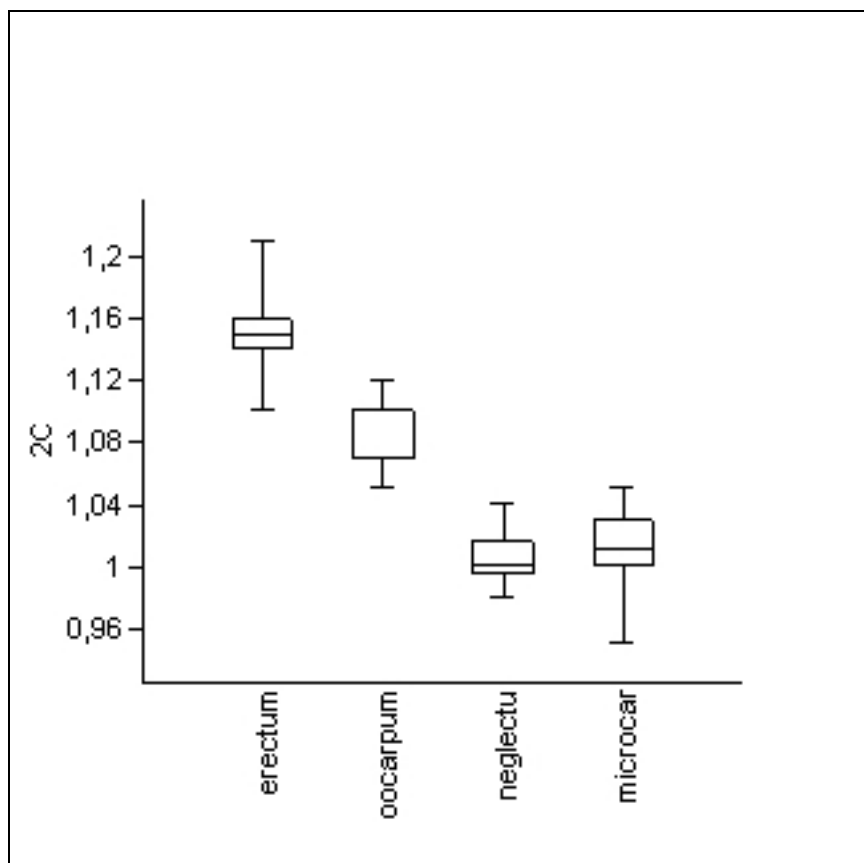
## 6.2. Průtoková cytometrie – stanovení velikosti genomu

Grafické zhodnocení velikosti genomu (Obr.12) jednotlivých podruhů je založeno pouze na jedincích předem určených podle metody AFLP. Nejlépe jsou zde odlišeny první dvě skupiny subsp. *erectum* a *oocarpum*, u kterých lze snadno rozlišit jednotlivé rostliny i ve smíšených populacích. Zbylé dvě skupiny subsp. *neglectum* a *microcarpum* od sebe nelze dobře odlišit, i když subsp. *neglectum* vykazuje o trochu nižší hodnotu velikosti genomu. V tomto případě se skupiny navzájem příliš prolínají, a proto nelze jednoznačně určit jen na základě velikosti genomu ke kterému poddruhu jednotlivé rostliny náleží. Oba však lze jasně odlišit od subsp. *erectum* a *neglectum*. Celkový přehled měření velikosti genomu u všech rostlin je uveden v příloze A2.

Základní charakteristiky jako průměrné, minimální a maximální hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab.8). Průměrné velikosti genomu (2C hodnoty) pro studované poddruhy jsou následující: subsp. *erectum*  $1,15 \pm 0,02$  pg, subsp. *oocarpum*  $1,08 \pm 0,02$  pg, subsp. *neglectum*  $1,00 \pm 0,02$  pg, subsp. *microcarpum*  $1,01 \pm 0,02$  pg. Rozložení hodnot odpovídá předpokladu, že by subsp. *oocarpum* mohl být hybrid, protože jeho velikost genomu 1,08 pg se nachází mezi hodnotami subsp. *erectum* 1,15 pg a subsp. *neglectum* 1,00 pg, jakožto uvažovanými rodiči, rozdíl činí 7-8%).

Tab.8: Základní charakteristiky velikosti genomu jednotlivých podruhů druhu *Sparganium erectum* pro 338 jedinců.

subsp.	2C průměr (pg)	směrodatná odchylka	min	max
<i>erectum</i>	1,15	0,02	1,1	1,21
<i>oocarpum</i>	1,08	0,02	1,05	1,12
<i>neglectum</i>	1	0,02	0,98	1,04
<i>microcarpum</i>	1,01	0,02	0,95	1,05



Obr. 12: Velikost genomu jednotlivých poddruhů druhu *Sparganium erectum*.

Boxplot reprezentující vnitrodruhové odlišnosti velikosti genomu u druhu *Sparganium erectum*. Pro zobrazení bylo použito 146 jedinců (subsp. *erectum*, n = 29, subsp. *oocarpum*, n = 37, subsp. *neglectum*, n = 24, subsp. *microcarpum* n= 56)

U smíšených populací subsp. *erectum* a subsp. *oocarpum*, kde rostliny každého poddruhu tvoří samostatné shluky několika rostlin, lze pomocí průtokové cytometrie snadno určit identitu jednotlivých rostlin. Pro příklad lze uvést například populace z Mrliny v Křinci (R) a z Labe u Velkého Zboží (Vb, subsp. *erectum*; Vz, subsp. *oocarpum*), Tab. 9. Tento postup však nelze použít u zbylých dvou subspecií, které nelze spolehlivě odlišit. může to být zapříčiněno tím, že rostliny se nevyskytují na lokalitách spolu, jak je uvedeno výše u subsp. *erectum* a subsp. *oocarpum*, ale jsou přítomny jen typičtí nebo přechodní jedinci s velikostí genomu obdobnou jako mají oba poddruhy (Tab.9, T populace v požární nádrží v Třebotově; U populace v Blatovském rybníce, Újezd nad Lesy,).

Tab.9: Seznam hodnot velikosti genomu u smíšených (R, Vb, Vz) a přechodných populací (T, U, Vp).

Legenda: V prvním sloupci u smíšených populací tučně zvýrazněné hodnoty náleží k subsp. *oocarpum*, ostatní pak subsp. *erectum*. V druhém a třetím sloupci jsou uvedeny hodnoty velikosti genomu u přechodných jedinců.

Označení rostlin	2C (pg)	Označení rostlin	2C (pg)	Označení rostlin	2C (pg)
R1	1,14	T2	0,97	Vp1	1,11
R2	<b>1,06</b>	T3	1,03	Vp2	1,12
R3	1,14	T4	1,02	Vp3	1,12
R4	1,14	T5	1,02	Vp4	1,11
R5	1,16	T6	1,03	Vp5	1,13
R7	1,17	T9	1,04	Vp6	1,09
R9	1,18	T11	1,04	Vp8	1,10
R11	1,18	T12	1,04	Vp9	1,10
R12	<b>1,09</b>	T	1,04	Vp10	1,08
R13	1,18			Vp11	1,09
R14	<b>1,08</b>	U1	1,03	Vp13	1,07
R15	<b>1,08</b>	U2	1	Vp14	1,08
R16	<b>1,07</b>	U3	1,05	Vp15	1,06
R17	1,16	U4	1,04	Vp17	1,08
		U5	1,02	Vp18	1,08
Vb1	1,12	U9	1,04		
Vb2	1,14	U10	1,03		
Vb3	1,13	U13	1,02		
Vb4	1,14	U15	1,04		
Vb5	1,2	U	1,03		
Vz1	<b>1,07</b>				
Vz3	<b>1,08</b>				
Vz4	<b>1,08</b>				
Vz5	<b>1,08</b>				

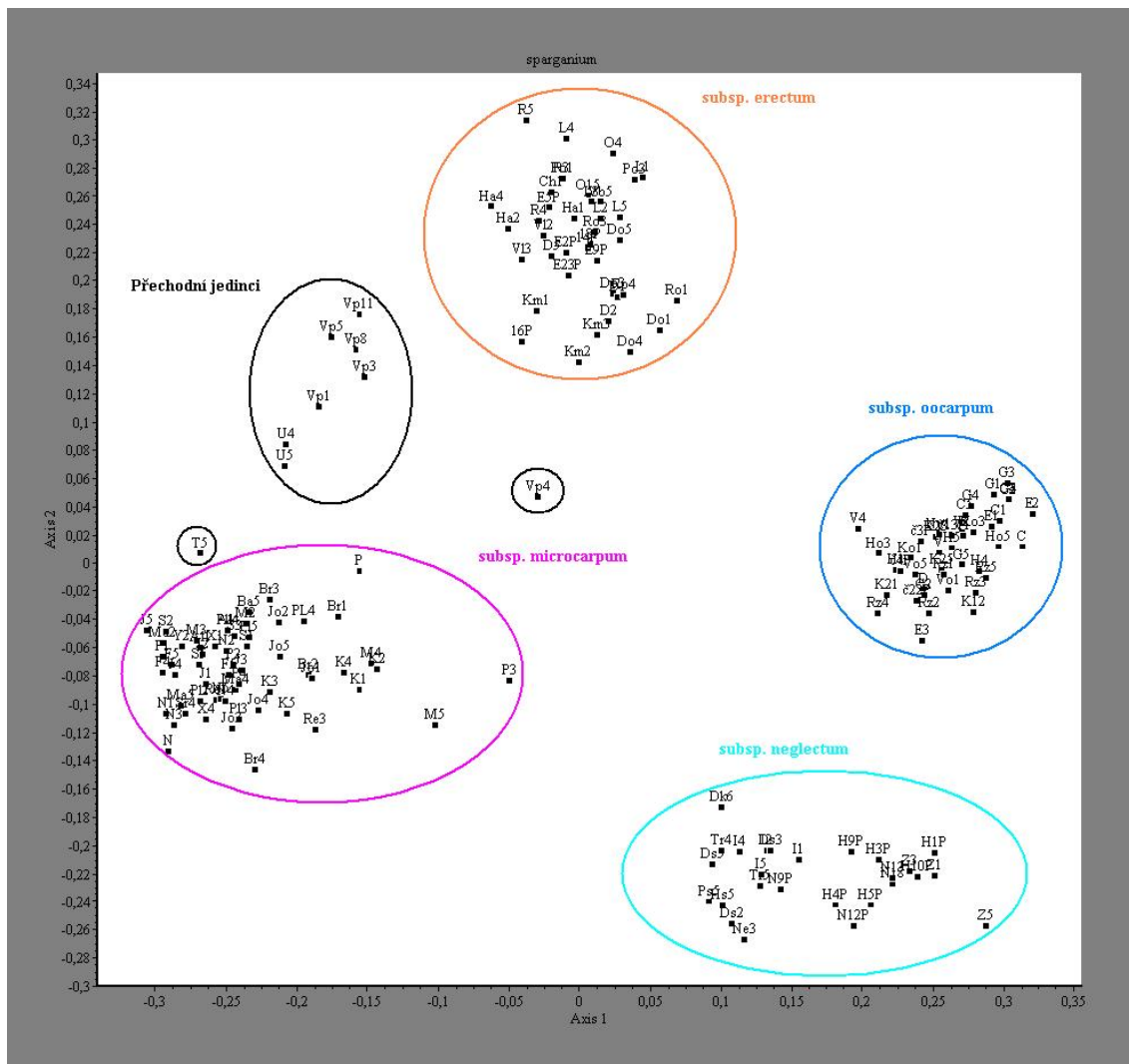
Ačkoliv byly přechodní jedinci v morfometrických analýzách (PCA, klasifikační a kanonické analýze) dobře odděleny, na základě velikosti genomu není možné je odlišit. Nejisté je postavení populace u Kovářského rybníka (Vp, Praha – Šeberov), jejíž vymezení je těžko interpretovatelné, neboť na základě sterility plodenství připomíná subsp. *oocarpum*, ale některé rostliny byly plně fertlní a připomínaly plody subsp. *neglectum*. Zjištěná velikost genomu poukazuje na subsp. *oocarpum* a *erectum*.

### 6.3. AFLP

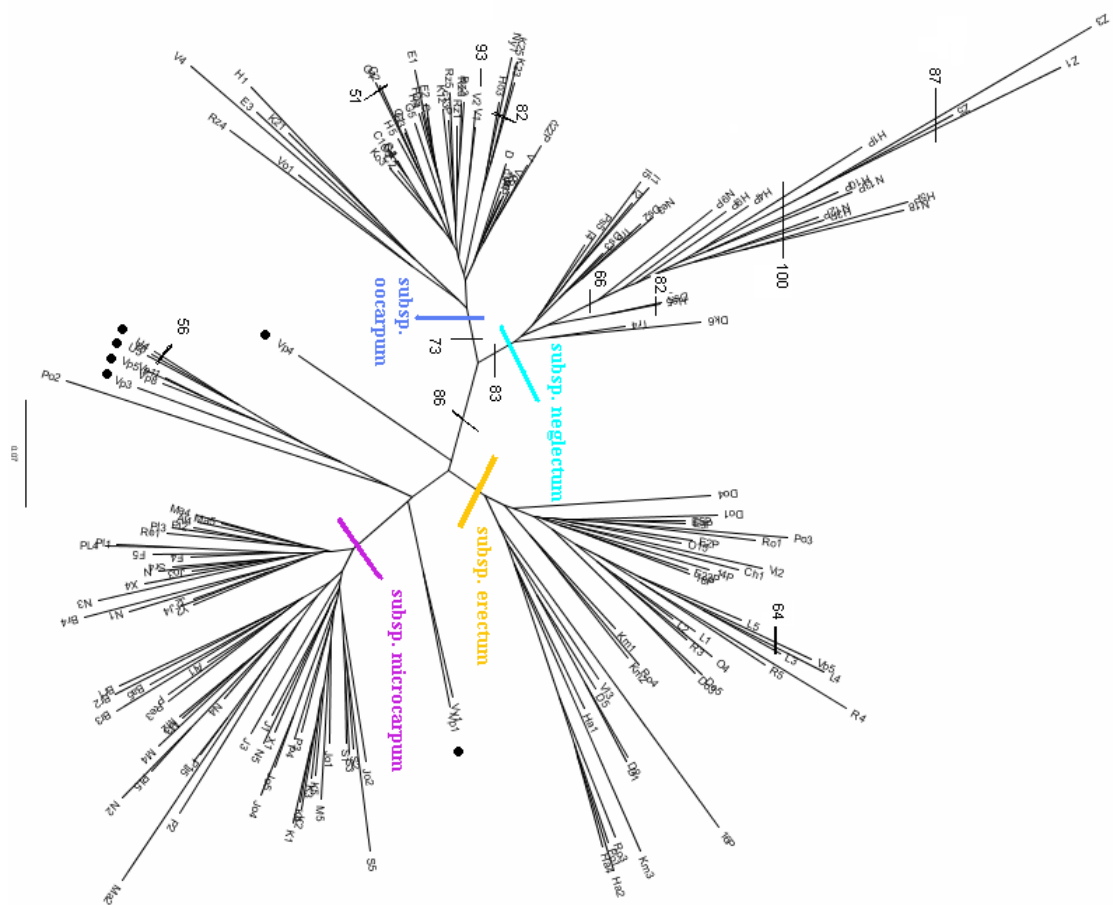
Pomocí metody AFLP bylo analyzováno 175 jedinců a to 39 jedinců subsp. *erectum*, 57 subsp. *microcarpum*, 26 subsp. *neglectum*, 42 subsp. *oocarpum* a 11 přechodných jedinců. Kombinace tří selektivních primerů B12 (*EcoRI* ACT, *MseI* CAT), G6 (*EcoRI* AAG, *MseI* CTC) a Y12 (*EcoRI* ACC, *MseI* CAT) poskytlo celkem 120 polymorfních lokusů (viz Příloha A4), které byly použity k vyhodnocování všech jedinců s pomocí programu Genographer 2.0beta. Pro základní přehled a rozdělení jedinců byla použita analýza hlavních koordinát (PCoA) v programu SYNTAX 2000 s pomocí Jaccardova koeficientu. Výsledný ordinační diagram (Obr. 13) zobrazuje celkem dobré odlišení jedinců do jednotlivých skupin. Zvláště odlišeni jsou i jedinci z přechodných populací (Vp, T a U; značení viz seznam lokalit, Tab.1).

Pro tvorbu stromu byla použita metoda Neighbour Joining v programu FAMD a následná vizualizace byla provedena v programu Figtree. Podpora stromu byla ověřena pomocí metody bootstrap (5000x). Výsledný nezakořeněný strom (Obr.14) zobrazuje obdobné skupiny jako analýza hlavních koordinát. Jsou dobře odlišeny čtyři skupiny odkazující na jednotlivé poddruhy a zvláště jsou tu také odlišeny přechodní jedinci. Na základě těchto výsledků byla určena příslušnost jedinců z těchto čtyř skupin k jednotlivým poddruhům. Jedinci s označením poddruhu a přechodní jedinci zařazené do páté skupiny (spolu s jedinci, pro které není k dispozici určení podle AFLP) byly následně použity v dalších analýzách (shlukovací metody, PCA, diskriminační analýzy) a k porovnání jednotlivých přístupů (porovnávací morfometrika, průtoková cytometrie) k zhodnocení vnitrodruhové variability.





Obr.13: Grafický výstup analýzy PCoA s použitím Jaccardova koeficientu v programu SYNTAX pro AFLP data u 175 jedinců druhu *Sparganium erectum*.



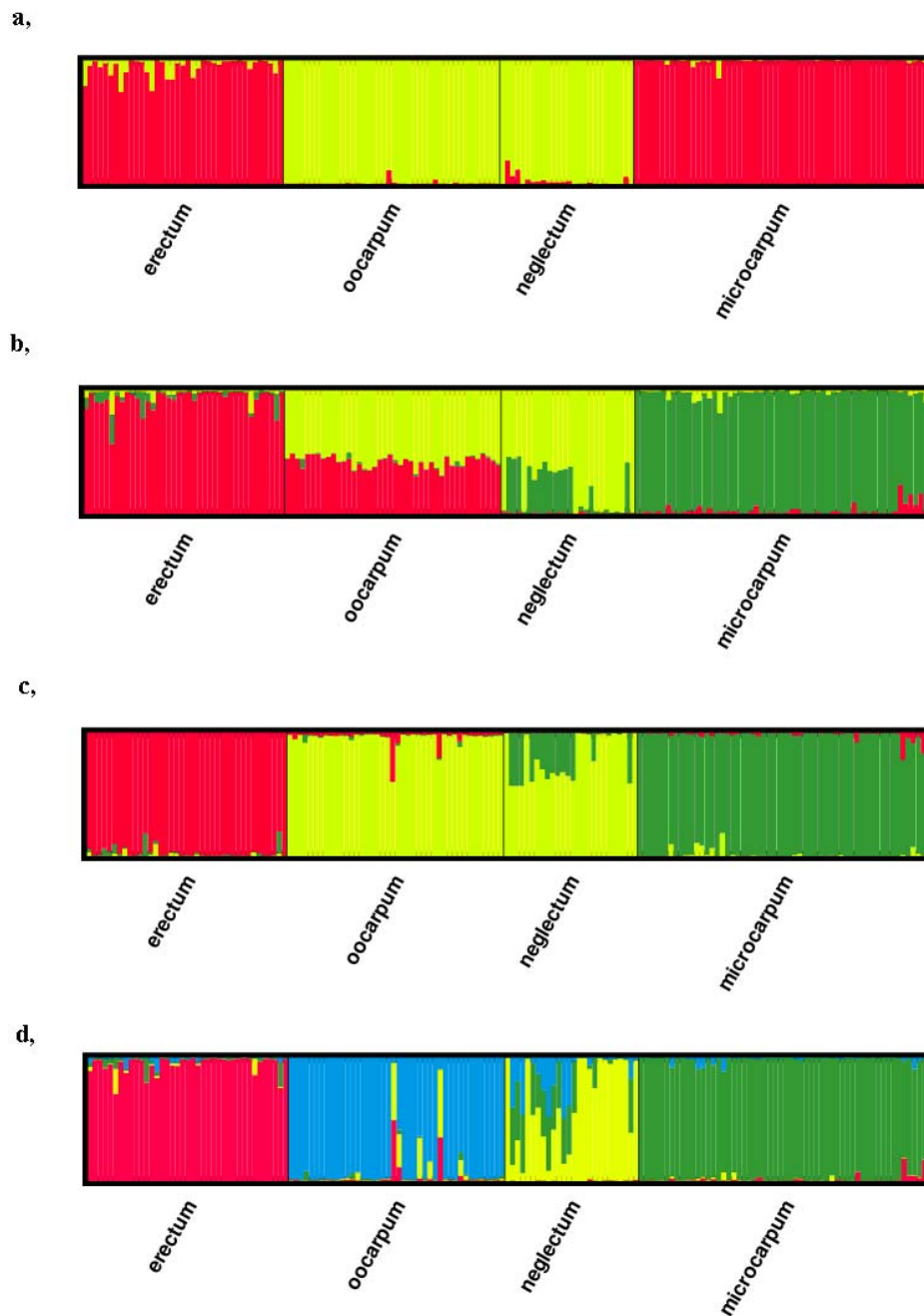
Obr.14: Nezakořeněný strom s hodnotami bootstrapu (5000, PAUP) na základě AFLP dat pro 175 jedinců druhu *Sparganium erectum*.

Ke zjištění promíchání genetické informace mezi jednotlivými poddruhy a to zvláště mezi předpokládaným hybridem subsp. *oocarpum* a jeho uvažovanými rodiči subsp. *erectum* a *neglectum* byla použita modelová klastrovací metoda v programu STRUCTURE 2.2. Jedinci byly přiřazovány podle pravděpodobností do určitého počtu skupin (K = 1-8). Nejvyšší rozdíl ( $\Delta K$ ) byl pro dvě skupiny (K=2, Obr.15a,) s koeficientem podobnosti, kde jsou subsp. *erectum* a *microcarpum* řazeny spolu do první skupiny a subsp. *oocarpum* a *neglectum* do skupiny druhé. Vysoký koeficient podobnosti je i u skupiny K=3 a K=4 (viz, Tab.10). Rozdělení do tří skupin má  $\Delta K =$ . Jedinci byly řazeny do skupin dvěma způsoby s pravděpodobností 50%. První rozdělení (Obr.č.: ) dobře vyjadřuje sdílení genetické informace mezi subsp. *oocarpum* a subsp. *erectum* a *neglectum*, které potvrzuje předpoklad hybridního původu subsp. *oocarpum*. Velmi dobře jsou tu odlišeny subsp. *erectum* a *microcarpum* od ostatních subspecií. Mezi další sdílení genetické informace dochází u subsp. *neglectum*, která má část genetické informace subsp. *microcarpum*, což vysvětluje podobnost obou subspecií popsané podle morfologických znaků na plodech v Haasová (1997). Druhé rozdělení (Obr.č.: c) poukazuje na mnohem menší vztah mezi subsp. *oocarpum* a *neglectum*. Interpretovat lze částečně ještě rozdělení na čtyři skupiny (K=4) s  $\Delta K=$  a koeficientem podobnosti (obr.č: d), které také popisuje dobře odlišitelné subspecie *erectum* a *microcarpum*. Další vztahy však již nejsou tak dobře interpretovatelné jako u rozdělení do tří skupin. Je tu také patrná podobnost některých jedinců subsp. *neglectum* se subsp. *microcarpum*. Vztah předpokládaného hybridního taxonu subsp. *oocarpum* s jeho rodičovskými taxony je zde mnohem méně patrný.

Na základě výsledků analýzy lze uvažovat o hybridním původu subsp. *oocarpum*, i když ne u všech rozdělení skupin (K). Další studie zaměřená na strukturu a sdílení genetické informace mezi subsp. *oocarpum* a jeho předpokládanými rodičovskými taxony (subsp. *erectum* a subsp. *microcarpum*) by pravděpodobně přinesla lepší přehled o genetických vztazích mezi těmito třemi taxony.

Tab.10 : Základní charakteristiky klastrovací analýzy pro jednotlivé skupiny (K=1-8)

počet skupin (K)	průměr ln P (D)	průměr koef. podobnosti	±SD	ΔK
2	-12744,54	1,00	0,00	297,
3	-11059,38	0,77	0,20	9,85
4	-10636,68	0,61	0,42	1,27
5	-10319,67	0,72	0,21	0,13
6	-10009,51	0,52	0,32	2,68
7	-10289,23	0,70	0,20	1,41
8	-9699,76	0,58	0,24	NA



Obr. 15: Grafický výstup modelové klastrovací metody v programu STRUCTURE

Pro výpočet bylo použito celkem 164 jedinců (subsp. *erectum*, n=39, označeno červenou barvou; subsp. *oocarpum*, n=42, označeno modrou barvou; subsp. *neglectum*, n=26, označeno žlutou barvou; subsp. *microcarpum*, n=57, označeno zelenou barvou). **a**, K=2, odlišení subsp. *erectum* a *microcarpum* od subsp. *oocarpum* a *neglectum*; **b**, K=3, odlišení samostatné subsp. *erectum* a také *microcarpum*, potvrzení hybridního původu subsp. *oocarpum* a blízkého vztahu mezi subsp. *neglectum* a *microcarpum*; **c**, K=3, odlišný případ rozdělení, subsp. *oocarpum* je mnohem podobnější subsp. *neglectum* a vztah k subsp. *erectum* je minimální; **d**, K=4, dobré odlišení subsp. *erectum* a *microcarpum*, obtížná interpretace subsp. *oocarpum* jako hybridního taxonu.

#### 6.4. Hybridizační experimenty

Pro zjištění, zda se mohou jednotlivé poddruhy křížit a jaký je jejich reprodukční způsob byly založeny hybridizační experimenty a testy autogamie. Výsledkem opylení rostlin pylem rostliny jiného poddruhu, nebyly zjištěny žádné zábrany proti opylení. Ačkoliv výsledná fertilita byla u některých jedinců nízká, všechny rostliny vytvořily aspoň nějaké plody. Rostliny sprášené vlastním pylem, byly v některých případech plně fertilmí (např. jedinci M1P a M2P, Obr. 16, zastupující subsp. *microcarpum*). Obecně lze říci, že všechny poddruhy si zachovaly při sprášení vlastním pylem jistou fertilitu. Rostliny podrobené hybridizačním experimentům jako příjemci pylu (jedinci bez samčích hlávek) měli nižší fertilitu, ale to může být způsobeno také různým načasováním doby zrání pylu, doby receptivnosti blizen a různou výškou rostlin. Největší sterilita byla podle očekávání pozorována u subsp. *oocarpum*.

Pro experimenty byly použity rostliny uvedené v metodice hybridizačních experimentů (Tab.3), které byly určeny na základě AFLP dat i velikosti genomu.

Z hybridizačních experimentů byly následně od rostlin odebrány všechny plody, které vytvořily ke sledování případného klíčení. Přes zimu byly plody stratifikovány chladem. Oproti předpokladu velmi brzy po ukončení stratifikace začaly plody klíčit (cca do druhého týdne, pokud byli vystaveny přímému slunečnímu záření) a klíčivost byla vysoká. Plody klíčily jak na vzduchu ve vlhčených Petriho miskách, tak ve vodním prostředí v umělohmotných zkumavkách.

Výsledné potomstvo bude dále sledováno pro zhodnocení jeho životaschopnosti a následně analyzováno pro zjištění velikosti genomu a genetické variability.

Obr. 16: Fotografie plně fertilmího plodenství jedince M2P (zastupujícího při testech autogamie poddruh *microcarpum*).





**a,**



**b,**

Obr. 17: Fotografie prvních klíčících plodů druhu *Sparganium erectum* získaných z hybridizačních experimentů.

**a,** prvních pár dnů po vyklíčení

**b,** velikost semenáčku zhruba po týdnu od vyklíčení

## 7. Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit morfologickou a genetickou vnitrodruhovou variabilitu druhu *Sparganium erectum* L. na území České republiky. Členěním tohoto druhu se již zabývala řada autorů a často bylo založeno na vegetativních orgánech (Čelakovský 1899; Greabner, 1990), ale až později se členění omezilo pouze na morfologické znaky na plodech, které nejsou na rozdíl od vegetativních orgánů tolik zatíženy fenotypovou plasticitou jako odpovědí na vnější ekologické podmínky (Cook et Nicholls 1987; Haasová 1997). V současné době se na našem území vyskytují čtyři poddruhy tohoto druhu (*Sparganium erectum* subsp. *erectum* L., subsp. *microcarpum* (L.M. Neumann) Domin., subsp. *oocarpum* (Čelak.) Domin., subsp. *neglectum* (Beedy) Richter). K zhodnocení morfologické i genetické vnitrodruhové variability byly použity klasické (morfometrické analýzy) i moderní biosystematické přístupy (průtoková cytometrie, AFLP). Začleněním těchto metod ke studiu jednotlivých poddruhů umožnilo si klást různé otázky včetně té, zda je vůbec možné a smysluplné jejich použití a jaký by byl jejich přínos. Pro studium vnitrodruhové variability druhu *Sparganium erectum* totiž bylo stanovení velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie a zhodnocení genetické variability pomocí metody AFLP použito vůbec poprvé. Při studium tohoto druhu si byly kladeny následující otázky:

**Má vnitrodruhové členění druhu *Sparganium erectum* L. opodstatnění v molekulárních rozdílech (AFLP, velikost genomu)? Lze rozlišit pomocí těchto metod jednotlivé poddruhy?**

Na základě předchozí diplomové práce Haasová (1997) bylo navštíveno cca 15 lokalit pro každý poddruh pro zajištění dostatečného množství vzorků pro analýzy. Ke stanovení velikosti genomu u všech vzorků bylo použito průtokové cytometrie s propidium iodidem jako fluorescenčním barvivem. Tuto charakteristiku je možné použít na vnitrodruhové úrovni a to i u taxonů se stejným počtem chromosomů (Suda, 2004). Ačkoliv se jedná o první použití průtokové cytometrie u tohoto druhu, byly nalezeny rozdíly použitelné pro odlišení mezi jednotlivých poddruhů. Zvláště u dvou poddruhů došlo k jasnému odlišení, a to u subsp. *erectum* s velikostí genomu  $2C = 1,15 \pm 0,02$  pg a subsp. *oocarpum*  $2C = 1,08 \pm 0,02$  pg. Spolehlivost odlišení těchto dvou taxonů je natolik vysoká, že je možné na smíšených lokalitách větších vodních toků jako je Cidlina, Mrlina a

Labe určit příslušnost každé jednotlivé skupinky rostlin i každého jedince k jednomu z poddruhů bez překryvu hodnot. Nejspíše je to způsobeno tím, že si rostliny zachovávají svoji identitu a tvoří jednotlivé shluky s jedinci jen jednoho poddruhu. Pravděpodobně jde o skupinky několika rostlin genetických klonů vytvořených ze stolonů. Rostliny lze totiž odlišit už při první návštěvě dané lokality podle morfologie plodů a případné sterility plodenství.

Zbylé dva poddruhy není možné odlišit tak snadno a ačkoliv existují lokality s typickými zástupci, které určit lze, tak existuje i mnoho jedinců se znaky kontinuálně přechodnými vytvářející velkou variabilitu vyplňující prostor mezi těmito taxony a odlišení těchto jedinců se tímto po morfologické stránce ztrácí. Navíc jedinci těchto dvou poddruhů netvoří směsné populace a na lokalitách se vyskytují jako jedinci s přechodnými znaky na plodech. Někdy jsou plody a plodenství ještě trochu podobné subsp. *erectum* a Haasová (1997) tyto lokality (požární nádrž v Třebotově a Blatovský r., Újezd nad Lesy) označuje jako subsp. *neglectum* s přechody k subsp. *microcarpum* a *erectum*. Velikost genomu je u subsp. *neglectum*  $2C = 1,00 \pm 0,02$  pg a u subsp. *microcarpum*  $2C = 1,01 \pm 0,02$  pg. Zástupci přechodných populací mají velikost genomu obdobnou a nejsou tudíž nijak odlišeni na základě velikosti genomu ani od jednoho z taxonů. Úplně mimo stojí populace z Kovářského rybníka (Praha – Šeberov), jejíž velikost genomu je mezi hodnotami subsp. *erectum* a *oocarpum* ( $2C = 1,06 - 1,13$  pg), a po morfologické stránce připomíná sterilní subsp. *oocarpum* s přechodem k subsp. *neglectum*, přičemž některé z rostlin sterilní vůbec nebyly. Závěrem k velikosti genomu je tedy možné říct, že je vhodnou charakteristikou k odlišení dvou subspecií a to subsp. *erectum* a *oocarpum*.

Vnitrodruhová variabilita a odlišení poddruhů bylo také zkoumáno pomocí metody AFLP, na jejímž základě byl přiřazeno 146 jedinců k jednotlivým poddruhům a všechny výsledky tak jsou srovnáním této metody s ostatními přístupy. Základní přehled variability poskytuje analýza hlavních koordinát a dendrogram vytvořený na základě metody neighbour - joining s hodnotami bootstrapu, které velmi dobře oddělily studované jedince do skupin reprezentující jednotlivé poddruhy. Díky této metodě došlo i k jasnému odlišení subsp. *neglectum* a *microcarpum*. Zvlášť mimo tyto čtyři skupiny (poddruhy) stála skupina pátá s přechodnými jedinci a jedná se právě o ty populace, jež nebylo možné na základě velikosti genomu možné odlišit (požární nádrž v Třebotově, Blatovský r., Újezd nad Lesy a Kovářský r., Praha - Šeberov).



Metoda AFLP je také dosti silným nástrojem k určení identity každého jedince i u smíšených populací a výsledky pro subsp. *erectum* a *oocarpum* z lokalit na Cidlině, Mrlině a Labi se shodují s určením na základě velikosti genomu. V podstatě je možné říci, že všichni jedinci těchto dvou podruhů určených na základě velikosti genomu se plně shodují s určením na základě výsledků metody AFLP.

Pokud se aplikovalo přiřazení jedinců na základě AFLP dat v morfometrických analýzách (analýza hlavních komponent, kanonická diskriminační analýza) jednotlivé poddruhy byly také celkem dobře odlišeny, i když výsledné skupiny, vzhledem k blízké příbuznosti, byly umístěny poblíž sebe. U subsp. *neglectum* a *microcarpum* pak došlo podle očekávání k mírnému překryvu. V případě, že byly do analýz zahrnuti i jedinci z přechodných populací z Třebotova, Újezdu nad Lesy a Prahy Šeberov, stály tyto jedinci pospolu mimo ostatní skupiny. Klasifikační diskriminační analýza určující procento správně zařazených jedinců ukázala 100% správně přiřazených jedinců k subsp. *erectum*, 88.57 % k subsp. *oocarpum*, 71.43 % k subsp. *neglectum* a 98.31% k subsp. *microcarpum*. Skupina přechodných jedinců byla určena se 100% správností a je tak pravděpodobné, že lze tyto přechodné jedince odlišit na základě morfologie plodů. Další studie těchto přechodných jedinců je velmi žádoucí.

K zhodnocení genetické variability a zjištění promíchání genetické informace byla použita modelová klastrovací analýza v programu STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Z výsledků jasně vyplývá odlišnost subsp. *erectum* a *microcarpum* jako samostatných taxonů s minimální příměsí genetické informace jiného poddruhu. Odlišná situace je však u subsp. *neglectum*, která sdílí část genetické informace se subsp. *microcarpum*. Také u subsp. *oocarpum* je viditelné sdílení genetické informace, i když ne u všech rozdělení do K skupin, s jeho uvažovanými rodiči subsp. *erectum* a *neglectum*. Tato záležitost je více popsána u problematiky pravděpodobného hybridního původu subsp. *oocarpum*.

## **Korelují morfologické znaky na plodech s variabilitou zjištěnou technikou AFLP, popřípadě s velikostí genomu?**

Pro zhodnocení morfologické variability a zjištění důležitosti jednotlivých znaků k odlišení poddruhů byla nejdříve určena základní skupina 50 jedinců pomocí metody AFLP. Morfologické znaky na plodech byly převzaty z prací Haasová (1997) a Cook et Nicholls (1987). Je zřejmé, že znaky jako je velikost nebo šířka plodů nemohou být použity samy o sobě, protože tyto charakteristiky jsou závislé na vnějších ekologických podmínkách. K odlišení jednotlivých poddruhů nejdříve byla stanovena základní sada 31 znaků, z nichž některé charakterizovaly konkrétní poddruh. U subsp. *erectum* patří k takovým znakům přítomnost ohbí (v17), poměrně malá velikost horní části plodu oproti dolní části plodu (v28) a kratší okvětní lístky než dolní část plodu, takže nejsou mezi plody viditelné dokud se plodenství nerozpadne (v28). Mezi další odlišující znaky charakteristické pro subsp. *oocarpum* patří částečná sterilita plodenství (v2) a poměr délky a šířky plodu vyjadřující vejcovitý tvar plodu (v27). Pro odlišení subsp. *neglectum* byly do počátečních analýz zahrnuty znaky jako délka čnělky (v16, čnělka u tohoto poddruhu by měla být delší než 2 mm) a poměr délky horní a dolní části plodu (v28). Poslední poddruh subsp. *microcarpum* bývá odlišován přítomností plodní stopky (v3), zaškrcením ve střední části plodu (v24), nafouknutou horní částí plodu (v23) a svraskalostí horní části plodu v blízkosti čnělky (v22).

Na základě klasifikační diskriminační analýzy pak byly tyto znaky postupně odebrány až na 14 nejdůležitějších znaků. K vyřazeným znakům patřily např. i znaky nové, které se zdály použitelné a byly zkušebně zařazené do analýz. Například: přítomnost skvrn na okvětních lístcích (v10) a jejich rozložení (v8, v9), tvar okvěti (v6), skvrny na plodu (v12) a také znaky jejichž změřené hodnoty byly obdobné a k odlišení skupin příliš nepřispívaly. K těmto znakům patří také několik znaků charakterizujících subsp. *microcarpum*, jak je uvedeno výše, a tak zachovány byly pouze znaky jako přítomnost plodní stopky (v3) a zaškrcení plodu v jeho střední části (v24).

Zhodnocení důležitosti jednotlivých 14 znaků pro odlišení předem stanovených skupin (poddruhů), na základě výsledků metody AFLP, bylo provedeno pomocí kanonické diskriminační analýzy pro 136 jedinců. Při analyzování 14 morfologických znaků došlo k výraznému rozdělení na základě znaku přítomnosti ohbí (v8). Hodnota korelačního koeficientu tohoto znaku pro první kanonickou osou byla 1,0000 a stává se tak nejspolehlivějším znakem pro odlišení subsp. *erectum* od ostatních poddruhů. Odlišení

tohoto poddruhu je možné i na základě znaků popisující velikost plodu: délka spodní části plodu (v5, korelační koeficient 0,7489 pro Can1), délka horní části plodu (v15, korel. koeficient 0,5422 pro Can1), délka plodu (v13, korel. koeficient 0,5475 pro Can1) a další charakteristiky: poměr délky okvětního lístku a délky spodní části plodu (v26, korel. koeficient 0,4806 pro Can1) a poměr horní a dolní části plodu (v28, korel. koeficient 0,6259 pro Can1) vyjadřující minimální délku horní části plodu. Správnost určení subsp. *erectum* je podle klasifikační diskriminační analýzy na základě těchto znaků rovna 100%. Je tedy nesporné, že morfologické odlišení subsp. *erectum* se plně shoduje v určení na základě AFLP dat.

Dalším velmi vhodným znakem je částečná sterilita plodenství (v2, korel. koeficient 0,9080 pro Can2) a odlišuje dobře subsp. *oocarpum*. Použitelnost znaku však závisí na tom, zda se sterilita plodenství nevyskytuje i u některých dalších jedinců. Tento jev se občas vyskytuje u subsp. *neglectum* a příslušní jedinci v grafických výstupech analýz (PCA, kanonická diskriminační analýza) stojí buď poblíž subsp. *oocarpum* nebo jsou s ní částečně promíchány. Výsledná správnost určení podle klasifikační diskriminační analýzy je proto nižší než u předchozího poddruhu je rovna 91,43 %. K odlišení přispívá i poměrový znak délka plodu ku šířce plodu (v27, korel. koeficient 0,7444 pro Can2) vystihující částečně jeho vejcovitý tvar.

Mezi dalšími znaky vhodnými pro odlišení jednotlivých poddruhů patří i znak přítomnost/nepřítomnost plodní stopky (v3, korel. koeficient 0,6079 pro Can2) a společně se znakem zaškrcení ve střední části plodu (v24, korel. koeficient 0,6263 pro Can2) charakterizují celkem dobře subsp. *microcarpum* a správnost určení tohoto taxonu pomocí klasifikační diskriminační analýzy je 98,31 %.

Délka čnělky plodu (v16, korel. koeficient 0,2905 pro Can3) je často popisována jako znak oddělující subsp. *neglectum* od ostatních poddruhů, avšak jeho důležitost se nepodařilo v této práci ověřit a k odlišení tento znak přispívá méně než by se očekávalo. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že u některých plodů dalších poddruhů je občas čnělka delší než 2 mm a dochází tak k překryvům znesnadňujícím jeho determinaci. Ani další znaky bohužel nenapomohly samy o sobě k jasnému odlišení. V grafických výstupech analýz je jeho poloha určena několika znaky u nichž také dochází k překryvům a skupinka jedinců tohoto poddruhu se částečně prolíná se subsp. *oocarpum* a *microcarpum*. Na základě výsledků metody AFLP je však tento poddruh vymezen celkem dobře. Výsledná správnost určení jedinců je nejnižší ze všech skupin a je rovna 71,43 %.

Součástí analýz byly i další znaky u nichž buď došlo k překryvům nebo reprezentovaly současně dva poddruhy a to: šířka v polovině dolní části plodu (v19), šířka plodu (v18), oddělující subsp. *erectum* a *oocarpum* od subsp. *neglectum* a *microcarpum* a počet žeber (v21).

Z výsledků klasifikační diskriminační analýzy vyplývá, že celkem bylo podle 14 měřených morfologických znaků na plodech správně určeno 89,58 % jedinců, což také vypovídá o schodě morfologických a molekulárních znaků. U subsp. *erectum* bylo dokonce dosaženo 100% správnosti určení. Na základě molekulárních znaků získaných metodou AFLP je možné jasně odlišit jednotlivé poddruhy, ale následkem fenotypové plasticity a tudíž i variability plodů není již možné dospět k takovému rozdělení s použitím morfologických znaků.

Odlišit jednotlivé poddruhy by bylo možné i na základě velikosti genomu, nebýt překryvu u subsp. *neglectum* a *microcarpum* znemožňující jejich jasné odlišení. Oproti tomu jsou subsp. *erectum* a *oocarpum* dobře odlišeny a jejich určení plně souhlasí s výsledky vyplývajícími z AFLP dat. Na základě velikosti genomu tak lze určit tři skupiny.

### **Je *Sparganium erectum* subsp. *oocarpum* opravdu hybridního původu? Které jsou rodičovské taxony?**

V rámci pozorování taxonu *S. erectum* subsp. *oocarpum* bylo několikrát zjištěno, že není plně fertillní. Tato částečná sterilita plodní hlávek naznačuje možný hybridní původ. Stejnou otázkou se zabývali i Cook et Nicholls (1987), Cook (1958) a Haasová (1997) ve své diplomové práci. Po morfologické stránce jsou navrhovanými rodičovskými taxony subsp. *neglectum* a *erectum*, ale je nepravděpodobné, že se jedná o křížence prvního stupně (F1 křížence). Cook et Nicholls (1987) také zvážili možnost, jestli tato částečná sterilita a velikost plodů není zapříčiněna slabším opylením a tudíž přerozdělováním zdrojů naznačující závislost mezi velikostí plodů a počet plodů na hlávku. Hypotézu testovaly na subsp. *neglectum*, které upravily tak, aby nebylo plně fertillní a následně vytvořené plody byly opravdu větší a z testu vyplývá silná korelace šířky i váhy plodu s množstvím plodů na hlávku. Výsledné plody, ačkoliv větší, byly však stále dobře rozeznatelné od plodů subsp. *oocarpum*, což vedlo ke snížení úvahy o přerozdělování zdrojů jako původu tohoto taxonu. Haasová (1997) se ve své diplomové práci zabývala i karyologickou studií prokazující u

subsp. *oocarpum*, na rozdíl od jeho uvažovaných rodičů, časově nesynchronizovaný rozchod chromosomů při meiozi. Tento jev se často vyskytuje u hybridních taxonů a tato nepravidelnost může být jednou z příčin částečné sterility plodných hlávek.

V rámci této diplomové práce bylo použito hned několika přístupů k odhalení původu subsp. *oocarpum* včetně studia genetických vztahů mezi tímto taxonem a jeho uvažovanými rodiči. Základním přístupem je klasická porovnávací morfometrika. K zhodnocení morfologické variability jednotlivých poddruhů bylo použito 14 morfologických znaků na plodech u 350 jedinců. Z výstupů morfometrických analýz vyplývá, že subsp. *erectum*, jeden z uvažovaných rodičovských taxonů je dobře odlišen a k překryvům se subsp. *oocarpum* nedochází, toto je nesporně patrné zvláště z výsledku klasifikační diskriminační analýzy, kdy bylo správně přiřazeno 100% jedinců k subsp. *erectum*. Naproti tomu jsou tu překryvy s druhým uvažovaným rodičovským taxonem subsp. *neglectum*. Jedinci tohoto poddruhu se částečně na grafických výstupech z analýz (PCA, kanonická diskriminační analýza) překrývají. Tento překryv vyplývá i z výsledků klasifikační diskriminační analýzy, kdy subsp. *oocarpum* je správně určena s pravděpodobností 88,57 % a dalších 8,57 % je přiřazeno ke subsp. *neglectum*. Následující zjištění je patrné i z druhé strany (71,43 % pro subsp. *neglectum* a 7,14% pro subsp. *microcarpum*). Celková situace je však ještě komplikovaná překryvem subsp. *neglectum* se subsp. *microcarpum*.

Dalším použitým přístupem bylo stanovení velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie. Tato metoda je velice rychlá, pohodlná a spolehlivá a je možno ji využít i pro studium vnitrodruhové variability, popřípadě i k určování jednotlivých jedinců (Ohri, 1998; Suda, 2005). Zjištěná velikost genomu pro subsp. *oocarpum* je  $2C = 1,08 \pm 0,02$  pg. Tato hodnota se nachází zhruba uprostřed hodnot velikosti genomu (7 - 8%) zjištěných u obou jeho uvažovaných rodičovských taxonů (subsp. *erectum*,  $2C = 1,15 \pm 0,02$  pg; subsp. *neglectum*,  $2C = 1,00 \pm 0,02$  pg), což souhlasí s úvahou o hybridním původu tohoto taxonu.

Vztah těchto tří poddruhů byl následně podroben i důkladné molekulární analýze k odhalení vnitrodruhové genetické variability a promíchání genetické informace mezi nimi s použitím metody AFLP. Tato metoda je často používána v současných biosystematických studiích ke zkoumání vztahů mezi hybridními a rodičovskými taxony (Guo et al., 2005, 2006; Valbuena-Carabaña et al., 2005).

Pro základní přehled byla použita analýza hlavních koordinát (PCoA) pro 175 jedinců. Z analýzy vyplývá, že každý poddruh je velmi dobře odlišen a nedochází zde

k překryvům jako u morfometrických analýz a stanovení velikosti genomu. Také dendrogram sestavený na základě metody neighbour-joining ukázal jasné odlišení všech poddruhů. Přechodní jedinci byly v obou případech odděleni zvlášť a nekomplikují tak vztahy mezi poddruhy.

Nejlépe je možné zodpovědět otázku předpokládaného hybridního původu subsp. *oocarpum* z výsledků modelové klastrovací metody provedené v programu STRUCTURE, běžně používané ke studiu genetické struktury populací nebo sdílení genetické informace mezi hybridními taxony a jejich rodiči (Pritchard et al., 2000; Valbuena-Carabaña et al., 2005). Analyzováno bylo 136 jedinců pro počet skupin  $K=1-8$  a to 10 krát pro každé  $K$ . Optimálního počet skupin ( $K$ ) byl stanoven podle Evano et al. (2005). Interpretovat mělo smysl jen skupiny s nejvyšším  $\Delta K$  a relativně vysokým koeficientem podobnosti mezi jednotlivými běhy, a to  $K=2$ ,  $K=3$  a  $K=4$ . Pro  $K=2$  byly poddruhy rozděleny na skupinu obsahující subsp. *erectum* a subsp. *microcarpum* a skupinu se subsp. *oocarpum* a *neglectum*. Z toho vyplývá větší podobnost subsp. *oocarpum* s uvažovaným rodičem subsp. *neglectum*, než se subsp. *erectum*. Běhu pro tři skupiny konverguje ke dvěma typům možného rozdělení. Pět z deseti běhů pro  $K=3$  ukázalo jasné téměř poloviční sdílení genetické informace u subsp. *oocarpum* s oběma uvažovanými rodičovskými taxony. U dalších pět běhů pro  $K=3$  je mnohem větší podíl genetické informace sdílené se subsp. *neglectum* než se subsp. *erectum*. Z rozdělení na čtyři skupiny ( $K=4$ ) pak je možno vyvodit dobré odlišení subsp. *erectum* a *microcarpum*. Vztah předpokládaného hybridního taxonu subsp. *oocarpum* s jeho rodičovskými taxony je zde však mnohem méně patrný.

Výsledky modelové klastrovací analýzy celkem podporují úvahu o hybridním původu tohoto taxonu, je však nezbytné tato zjištění ověřit na větším počtu jedinců, zvláště pak u subsp. *neglectum*. Další studie k potvrzení této hypotézy jsou tedy žádoucí a přinesly by s velkou pravděpodobností potvrzení této hypotézy.

**Lze *S. erectum* subsp. *neglectum* a subsp. *microcarpum* považovat za jediný taxon nebo jsou to dva dobře definované taxony? Jaké znaky je možno použít pro jejich odlišení?**

V minulosti byly tyto dva poddruhy různě hodnoceny a jejich taxonomická hodnota se pohybovala od variet až po druhy (Hess, 1967; Hegi, 1936). Z výsledků předchozí diplomové práce (Haasová 1997) vyplývá, že by mohly být subsp. *neglectum* a *microcarpum* považovány za jeden taxon a to na základě vysoké míry morfologické variability plodů, která způsobuje prolínání obou poddruhů (Haasová 1997). Jednotlivé poddruhy zkoumané v této práci byly určeny pouze na základě předpokladu a následně byla tato hypotéza testována klasifikační diskriminační analýzou. Pravděpodobnost správnosti přiřazení rostlin u subsp. *neglectum* byla 62,50 %. Zbylých 37,50 % představuje chybné zařazení a tyto jedince analýza přiřadila ke subsp. *microcarpum*. Správnost určení u subsp. *microcarpum* byla obdobná, a to 61,29 %. Dalších 25,81 % pak by mělo být spíše řazeno k subsp. *neglectum*.

Současné členění odlišuje tyto dva poddruhy na základě barvy plodů, výraznosti žeber, tvaru horní části plodu, přítomnosti plodní stopky, nafouknuté horní část plodu, zaškrcení ve střední části plodu a také podle délky čnělky, jenž by měla být u subsp. *microcarpum* kratší než 2 mm (Cook 1958, Cook et Nicholls 1987, Kubát et al. 2002). Kromě znaku výraznosti žeber, u něhož je riziko subjektivního hodnocení, byly všechny ostatní znaky zahrnuty do morfometrických analýz provedených v této diplomové práci. Ze základního počtu znaků, byl následně vyřazen znak nafouknutí horní části plodu (v23) a ponechán byl znak zaškrcení plodu (v24), neboť oba reprezentovaly subsp. *microcarpum* stejnou měrou a plody, jenž měly nafouknutou horní část plodu v drtivé většině případů byly i zaškrceny i ve střední části. Pravděpodobnosti správného určení podle klasifikační diskriminační analýzy nebyla odebráním tohoto znaku změněna. Z výsledků analýzy vyplývá, že 71,43 % jedinců subsp. *neglectum* bylo přiřazeno správně a dalších 21,43 % náleželo spíše k subsp. *microcarpum*. Ačkoliv je úspěšnost odlišení vyšší než u Haasové (1997), procento chybně zařazených jedinců je dosti značné a poukazuje na velkou variabilitu v morfologii plodů a prolínání hodnot měřených znaků. Zajímavé však je, že tomu tak není z opačného pohledu a u subsp. *microcarpum* je správnost určení 98,31 % a k subsp. *neglectum* je řazeno chybně jen 1,69 %. Všechny skupiny však jsou dobře podloženy na základě AFLP dat a jedinci přeřazení do jiných poddruhů, tak odrážejí pouze morfologickou variabilitu plodů, která je nejspíše zdrojem této chyby.

K zhodnocení, které znaky nejvíce odlišují tyto dva poddruhy byla použita kanonická diskriminační analýza zvláště jen pro tyto dvě skupiny. Nejvíce odlišujícím znakem byla sterilita plodenství, která nic nevyovídá o morfologii plodů, a tak byla z analýz vyjmuta. Následující analýza určila jako nejdůležitější odlišující znak zaškrčení ve střední části plodu (v24, korel. koef. 0,6382). K odlišení přispívá i šířka plodu (v18, korel. koef. 0,5346), šířka v polovině dolní části plodu (v19, korel. koef. 0,5333), přítomnost stopky (v3, korel. koef. 0,4759) a délka horní části plodu (v15, korel. koef. 0,4689). Analýza hlavních komponent a kanonická diskriminační analýza poukázaly na existenci struktury v datech. Skupiny reprezentující jednotlivé poddruhy jsou umístěné blízko sebe a u subsp. *neglectum* dochází k částečnému míšení se subsp. *microcarpum* a *oocarpum*.

Na odlišení těchto dvou poddruhů bylo pohlíženo i z hlediska velikosti genomu. Zjištěn byl výrazný překryv hodnot. Velikosti genomu jsou téměř shodné (subsp. *neglectum*,  $2C = 1,00 \pm 0,02$ ; subsp. *microcarpum*  $2C = 1,01 \pm 0,02$ ) a částečně připomínají rozdělení těchto dvou poddruhů na základě morfologie plodů (PCA, diskriminační analýzy). Pokud odhlédneme od prostého průměru hodnot velikost genomu, lze zjistit, že subsp. *neglectum* má tendenci k nižším hodnotám. Dokonce i na úrovni populací lze najít velikost genomu nižší jak 1,00 pg. Tento rozdíl, který by mohl snížit překryv hodnot je však už na hranici přesnosti měření.

Jasného odlišení jednotlivých poddruhů bez překryvu bylo dosaženo až při studiu genetické variability s použitím metody AFLP. Analýza hlavních koordinát posloužila k základnímu přehledu a z grafického výstupu vyplývá velmi dobré odlišení bez jakéhokoliv překryvu a nejasností. Tato analýza však neposkytla detailnější přehled o sdílení genetické informace mezi poddruhy.

Pro studium promíchání genetické informace mezi poddruhy bylo použito modelové klastrovací metody. U rozdělení do dvou skupin ( $K=2$ ) bylo zjištěno, že subsp. *microcarpum* má mnohem větší vztah k subsp. *erectum*, než k subsp. *neglectum*. Lépe je však možno interpretovat vztah jednotlivých poddruhů pro  $K=3$ . Zde je jasně patrné vymezení subsp. *microcarpum* a jeho odlišení od ostatních poddruhů. U subsp. *neglectum* je však možno pozorovat sdílení genetické informace se subsp. *microcarpum*. Pro potvrzení dobrého odlišení obou taxonů by byly za potřebí další analýzy, protože na základě AFLP dat jsou tyto poddruhy dobře odlišeny a není důvod je sdružovat do jednoho taxonu jak uvádí Haasová (1997).



### **Je *Sparganium erectum* L. autoinkompatibilní?**

Způsob reprodukce je důležitým faktorem v evoluci rostlin a přímo ovlivňuje další generace a jejich genetickou variabilitu. Na extrémních stanovištích jako jsou břehy velkých vodních toků, kde často dochází k velkým výkyvům výšky vodní hladiny by bylo nejvhodnější strategií pro přežití v těchto podmínkách udržování již dobře adaptovaných genotypů bez výraznějších změn pomocí autogamie. Tento způsob rozmnožování je zaručenou metodou zplození potomstva (Briggs et Walters 2001).

Tento druh je vzhledem k jednopohlavnosti květů velmi vhodným materiálem pro různé experimenty, ať už testující možnost křížení mezi jednotlivými poddruhy, nebo schopnost autogamie v rámci druhu. Předchozí studie se o reprodukčním způsobu tohoto druh příliš nezmiňují, jen podotýkají, že nebyla pozorována žádná autoinkompatibilita (Cook et Nicholls, 1986). Ke zjištění, zda druh *Sparganium erectum* disponuje některým ze způsobů zabraňujícím samosprášení byly provedeny testy autogamie. Pro každý poddruh byly vybrány 2 rostliny a jejich květenství byla zabalena, tak aby se zabránilo sprášení ze strany ostatních rostlin. U rostlin pak byla následně zkontrolována přítomnost plodů. Všechny testované rostliny vytvořily plody, avšak podle předpokladu nebyly všechny rostliny plně fertillní. U subsp. *oocarpum* pak byla samozřejmě sterilita plodenství mnohem větší a celé plodenství tak obsahovalo jen několik plodů. Tyto testy neprokázaly žádný mechanismus zabraňující samosprášení. Potomstvo z těchto experimentů bude dále analyzováno morfometricky, cytometricky a pomocí AFLP.

## 8. Závěr

- Jednotlivé poddruhy druhu *Sparganium erectum* L. lze částečně odlišit na základě morfologických znaků, avšak u subsp. *neglectum* dochází k mírným překryvům se subsp. *microcarpum* a subsp. *oocarpum*. Na základě hodnoty velikosti genomu je pak možné jasně odlišit subsp. *erectum* ( $2C = 1,15$  pg) a subsp. *oocarpum* ( $2C = 1,08$  pg). Od těchto dvou poddruhů lze odlišit i subsp. *neglectum* a *microcarpum*, které však nelze odlišit vzájemně. Další dva poddruhy však odlišit nelze, protože jejich velikost genomu je obdobná (subsp. *neglectum*,  $2C = 1,00$  pg; subsp. *microcarpum*,  $2C = 1,01$  pg).

Nejspolehlivější odlišení poddruhů bylo zjištěno základě AFLP dat podle analýzy hlavních koordinát a dendrogramu vytvořeného metodu neighbour-joining. Tato molekulární metoda poskytla základní kámen pro rozřazení jedinců do příslušných poddruhů a tak bylo možno přímo srovnávat jednotlivé přístupy použité ke studiu vnitrodruhové variability.

- Korelace jednotlivých znaků s výsledky AFLP byla zhodnocena kanonickou diskriminační analýzou. Nejdůležitějšími znaky k odlišení poddruhů jsou: přítomnost ohbí, délka dolní části plodu a šířka plodu (pro determinaci subsp. *erectum*), zaškrčení ve střední části plodu, přítomnost plodní stopky (pro subsp. *microcarpum*), sterilita plodenství a poměr mezi délkou a šířkou plodu (pro subsp. *oocarpum*). U poddruhu *neglectum* k dochází k mírnému překryvu se subsp. *microcarpum* (odlišovacími znaky jsou šířka plodu a délka horní části plodu). Celkové srovnání morfologické a genetické variability poukazuje na shodu 71,43 %.
- Předpokládaný hybridní původ subsp. *oocarpum* byl částečně ověřen s pomocí modelových klastrovacích metod poukazujících na sdílení genetické informace mezi subsp. *oocarpum* a jeho uvažovanými rodičovskými taxony subsp. *neglectum* a subsp. *erectum*. Hodnoty velikosti genomu těchto tří poddruhů také podporují tuto hypotézu, neboť hodnota velikosti genomu u subsp. *oocarpum* leží mezi hodnotami jeho rodičovských taxonů. Na základě hybridizačních experimentů bylo

prokázáno, že je možné jednotlivé poddruhy mezi sebou křížit a vytvořené plody neztrácejí tímto křížením klíčivost.

- U subsp. *neglectum* a *microcarpum* byly v morfometrických analýzách pozorovatelné částečné překryvy, které potvrzuje kontinuální přechod hodnot velikost genomu mezi oběma poddruhy. Na základě AFLP dat je však možné tyto poddruhy jasně odlišit a výsledky z modelové klastrovací metody poukazují na zřetelné vymezení subsp. *microcarpum*. Druhý poddruh pak vlastní část genetické informace subsp. *microcarpum*.
- V rámci testů autogamie nebyla zjištěná žádná autoinkompatibilita a všechny rostliny byly alespoň částečně fertillní.

## 9. Abstrakt

Tato diplomová práce pojednává o vnitrodruhové morfologické a genetické variabilitě druhu *Sparganium erectum* na území České Republiky. Ke studiu byly použity klasické (morfometrické analýzy) i moderní přístupy (průtoková cytometrie, AFLP). Morfometrické analýzy ukázaly existenci skupin, z nichž některé se částečně prolínají. Stanovení velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie přineslo odlišení tří poddruhů.

Molekulární marker AFLP spolehlivě odlišil jednotlivé poddruhy i přechodné jedince.

**Klíčová slova:** průtoková cytometrie, morfometrické analýzy, hybridy, AFLP, modelové klastrovací metody

## 9. Abstract

### **Evaluation of variability within *Sparganium erectum* using morphometrics, AFLP and flow cytometry.**

MSc. thesis is based on evaluation of intraspecific morphological and genetic variation of *Sparganium erectum* L. in the Czech Republic. Four intraspecific taxa were examined: *S. erectum* subsp. *erectum* L., *S. erectum* subsp. *oocarpum* (ČELAK.) DOMIN, *S. erectum* subsp. *neglectum* (BEEDY) RICHTER and *S. erectum* subsp. *microcarpum* (L.M. NEUMANN) DOMIN.

Various approaches such as multivariate morphometric analysis (PCA, discriminant analyses), estimation of genome size by propidium iodide flow cytometry and molecular analysis of total genomic DNA (AFLP) were applied for study close related subspecies.

Multivariate analysis of morphological characters of fruits (for 350 individuals from 63 native populations) presented some distribution to four closed groups. Partial overlapping was observed for *S. erectum* subsp. *neglectum* with subsp. *microcarpum* and subsp. *oocarpum*. Similar situation (overlapping subsp. *neglectum* a *microcarpum*) was observed within genome size. Remaining two taxa, *S. erectum* subsp. *erectum* and subsp. *oocarpum*, were well-differentiated using genome size data. Most important morphological characters on fruits useful for subspecies determination were: sterility of fruit heads, presence or absence of peduncle, distinct shoulder between upper and lower part, constriction below the shoulder, width of fruit and length of the lower part of fruit.

Molecular analysis of 176 individuals using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) provided 120 polymorphic loci. Diverse analytical methods (NJ tree, PCoA) confirmed recent classification of *Sparganium erectum*. Additionally, the hybrid origin of *S. erectum* subsp. *oocarpum* was partially checked using model-based clustering method.

**Key words:** flow cytometry, morphometric analysis, hybrid detection, AFLP, model-based clustering

## 10. Citovaná literatura

Ajmone-Marsan P., Negrini R., Crepaldi P., Milanese E., Gorni C., Valentini A., Cicogna M., (2001): Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. *Anim Genet.* 32: 281-288.

Arumuganathan K., Earle E. D. (1991): Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol Bio Rep* 9: 229-233.

Bensch S., Helbig A. J., Salomon M., Seibold I. (2002): Amplified fragment length polymorphism analysis identifies hybrids between two species of warblers. *Molecular Ecology* 11: 473 – 481.

Benham J. J. (2001): Genographer. Montana State University. Available from <http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer/>.

Bennett M. D., Bhandol P., Leitch I. J. (2000): Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses 807 new estimates. *Annals of Botany* 86: 859-909.

BLEEKER W. (2003): Hybridization and *Rorippa austriaca* (Brassicaceae) invasion in Germany. *Molecular Ecology*, 12: 1831–1841.

Brayshaw T.C. (1985): Pondweeds and bur-reeds, and their relatives: Aquatic families of Monocotyledons in British Columbia. B.C. Prov. Mus. Occas. Pap. Series No. 26. Victoria, BC.

Briggs D., Walters S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc. 148-190.

Clevering O. A., Hundscheid, M. P. J. (1998): Plastic and non-plastic variation in growth of newly established clones of *Scirpus (Bolboschoenus) maritimus* L. grown at different water depths. *Aquat. Bot.* 62, pp. 1–17.

Cook, C.D.K. (1961): Sparganium in Britain.- *Watsonia* 5 /1/: 1-46.

Cook C.D.K. (1962): Biological Flora of the British Isles. *Sparganium erectum* L. (*S. ramosum* Hudson, nom. illeg.). *Journal of Ecology* 50: 247-255.

Cook, C.D.K. (1980): *Sparganiaceae*. Pages 274-275 in T.G. Tutin et al., eds., *Flora Europaea*, Vol. 5. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.

Cook, C. D. K. and M. S. Nicholls. (1986): A monographic study of the genus *Sparganium* (*Sparganiaceae*). Part 1. Subgenus *Xanthosparganium* Holmberg. *Bot. Helv.* 96: 213--267.

Cook C. D. K. and M. S. Nicholls. (1987): A monographic study of the genus *Sparganium* (*Sparganiaceae*). Part 2. Subgenus *Sparganium*. *Bot. Helv.* 97: 1--44.

Čelakovský L. J. (1896): *Analytická květena Čech, Moravy a Rak. Slezka*. - Praha.

Dietz S. (1887). Ueber die Entwicklung der Bliithe and Frucht von *Sparganium* Tourn. und *Typha* Tourn. *Bibliotheca Botattica*, Heft. V, Cassel.

Dupouey J.L., Badeau V. (1993): Morphological variability of oaks (*Quercus robur* L., *Quercus petraea* (MATT.) LIEBL. and *Q. pubescens* WILLD) in northeastern France : preliminary results. *Ann. Sci. For.* 50: 35-40

Doležel J. (1997): Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, 38:285–302.

Doležel, J., Bartoš, J. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. – *Ann. Bot.* 95: 99–110.

Dostál J. (1950): *Květena ČSR*. – Praha (*Sparganium* p. 2127-2128).

Dostál J. (1958): *Klíč k úplné květeně ČSR*. Ed. 2. Academia, Praha.

Dostál J. (1989): *Nová květena ČSSR 2*. Academia, Praha.

Doyle J. J., Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.

Dykyjová D., Ondok J. P. (1973): Biometry and the productive stand structure of coenoses of *Sparganium erectum* L. - *Preslia*, Praha, 45: 19-30.

Efron B. (1979): Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann. Stat.* 7:1-26.

Ehrich M., et al. (2007): "A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment." *Nucleic Acids Res* 35(5): e29.

Ellison A. M., Buckley H. L., Miller T. E., Gotelli N. J. (2004): Morphological variation in *Sarracenia purpurea* (*Sarraceniaceae*): geographic, environmental, and taxonomic correlates. *American Journal of Botany*, 91: 1930-1935.

Evano G., Regnaut S., Goudet J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611–2620.

Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. (2003): Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567-1587

Fici S. (2001): Intraspecific variation and evolutionary trends in *Capparis spinosa* L. (*Capparaceae*), *Plant Systematics and Evolution*. 228: 123–141.

Folkertsma R. T., Rouppe van der Voort N. A. M., de Groot K. E., van Zandvoort, P. M., Schots A., Gommers F. J., Helder J., Bakker J., (1996): Gene pool similarities of potato cyst nematode populations assessed by AFLP analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 47-54.

Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P. & Firoozabady E. (1983): Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220:1049-1051.

Godelle B., Cartier D., Marie D., Brown S. C., Siljak-Yakovlev S. (1993): Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry* 14: 618–626.

Gort G., Koopman W.J.M., Stein A., (2006): Fragment length distributions and collision probabilities for AFLP markers. *Biometrics* 62: 1107-1115.

Graebner P. (1900): *Sparganiaceae*. – In: Engler A., Das Pflanzenreich IV/8 et 10: 1-24.- Leipzig.

Greilhuber J. (2005): Intraspecific variation in genome size in angiosperms - identifying its existence *Ann. Bot.* 95: 91–98.

Guo Y.P., Saukel J, Mittermayr R, Ehrendorfer F. (2005): AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae). *New Phytologist*, 166: 273–290.

Guo Y.P., Vogl C., Van Loo M., Ehrendorfer F. (2006): Hybrid origin and differentiation of two tetraploid *Achillea* species in East Asia: molecular, morphological and ecogeographical evidence. *Mol. Ecol*, 15: 133–144.

Guppy H. B. (1906): Observations of a Naturalist in the Pacific between 1896 and 1899. Vol. 2: Plant-Dispersal. London: Macmillan.

Haasová M. (1997): Variabilita druhu *Sparganium erectum* L. v České republice. Diplomová práce. Depon. in: Katedra botaniky PřF UK.

Han T. H., De Jeu M., Van Eck H. and Jacobsen E. (2000): Genetic diversity of Chilean and Brazilian *Alstroemeria* species assessed by AFLP analysis. *Heredity*, 84: 564-569.

Hegi G. (1936): Illustrierte Flora von Mittel-Europa Ed.2, Vol.1. – Carl Hanser Verlag München (*Sparganium*): 281-291.



Hess H. E., Landolt E., Hirzel R. (1967): Flora der Schweiz und angrenzender Gebiete. Band 1: Pteridophyta bis Caryophyllaceae.- Birkhäuser Verlag Basel. (*Sparganium*): 188-1922

Jaccard P. (1908): Nouvelles Recherches sur la Distribution Florale. Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences Naturelles 44: 223–270.

M. Jakobsson and N. A. Rosenberg (2007): CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801-1806

Jones, C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione et al. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European Laboratoriem. *Mol. Breed.* 3: 381-390.

Kaplan Z. (2002): Phenotypic plasticity in *Potamogeton* (Potamogetonaceae). *Folia Geobot.* 37: 141-170.

Kaul R.B. (1973): Development of foliar diaphragms in *Sparganium eurycarpum*, *Am. J. Bot.* 60, pp. 944–949.

Krausch H. D. (1996): Farbatlas der Wasser und Uferpflanzen.-eugen ulmer stuttgart (*Sparganium* p. 194).

Kremer A, Dupouey J.L., Deans J.D. et al. (2002): Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. *Annals of Forest Science*, 59, 777–787.

Kubát K. (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha. 877 - 878

Leereveld (1984): Anthecological relations between reputedly anemophilous flowers and syrphid flies. VI. Aspects of the anthecology of Cyperaceae and *Sparganium erectum* L., *Acta Botanica Neerlandica* [ACTA BOT. NEERL.]. Vol. 33, 4: 475-482.

Lerceteau, E. & A.E. Szmidt, 1999. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. *Heredity*, 82: 252–260.

Lloyd D. G. (1979): Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *Am. Nat* 113: 67–79.

Love A., Love D. (1948): Chromosome numbers of northern plant species. Appendix I. Nomenclatural notes. Iceland U Repts Dept Agric Inst Appl Sci Ser B 3, 1-131.

Marhold, K. & Suda, J. 2002: Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (fenetické metody) – Karolinum, Praha.

Martin A. C. and F. M. Uhler (1939): Food of game ducks in the United States and Canada. U. S. Department of Agriculture. Washington, DC, USA. Technical Bulletin No. 634.

Mueller U. G., Wolfenbarger L. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 389-394.

Meusel H., Jäger E. J., Weinert E. (1965) *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora* vol. 1.

Müller-Doblies U. (1969): Über die Blütenstände und Blüten sowie zur Embryologie von *Sparganium*. *Bot. Jahrb.* 89: 359-450.

Müller-Doblies U. & Müller-Doblies D. (1977): Über den geometrischen Zusammenhang der monochasialen Verzweigungen am Beispiel einiger Liliifloren. - *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 90: 351 – 362.

Muluvi, G. M., Sprint, J. I., Soranzo N., et al. (1999): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology*, 8: 463–470.

Nei M. Li, W.-H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of

restriction endonucleases, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5269 - 5273.

Nordborg, M., T. T. HU, Y. Ishino, J. Jhaveri, C. Toomajian et al. (2005): The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. PLoS Biol. 3: e196.

Ohri D. (1998): Genome Size Variation and Plant Systematics. Ann. Bot. 82: 75-83.

Ostenfeld – Hansen C. (1897): De i Danmark voxende ramose *Sparganium* – Arten. Bot. Tidsskrift Bot. For. Kjobenhavn 21 (1): V-IX.

Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. – In: Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. [eds.], Methods in Cell Biology, p. 105-110, Academic Press, New York.

Paun O, Stuessy TF, Hörandl E. (2006): The role of hybridization, polyploidization and glaciation in the origin and evolution of the apomictic *Ranunculus cassubicus* complex. New Phytologist, 171: 223–236.

Piquot Y., Valero M., Cuguen J. et al. (1998): Variation in sexual and asexual reproduction among young and old populations of the perennial macrophyte *Sparganium erectum*. Oikos, 82: 139–148.

Podani J. (2001): SYN-TAX 2000 Users Manual, Scientia, Budapest.

Pollux B. J. A., De Jong M., Steegh A., Verbruggen E., Van Groenendael, J. M. & Ouborg, N. J. (2007): Reproductive strategy, clonal structure and genetic diversity in populations of the aquatic macrophyte *Sparganium emersum* in river systems. Molecular Ecology, 16: 313–325.

Powell W., Orozco-Castillo C., Chalmers K.J., Provan J., Waugh R. (1995): Polymerase chain reaction-based assays for the characterisation of plant genetic resources. Electrophoresis, 16: 1726-1730.

- Praeger R.L. (1913): The buoyancy of the seeds of some Britannic plants. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.* 14
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rambaut A (2008): FigTree. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rieseberg L. H., Carney S. E. (1998): Plant hybridization. *New Phytologist* 140: 599-624.
- Rieseberg, L. H., Ellstrand N. C. (1993): What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences* 12: 213-241.
- Roa A. C., M. M. Maya, M. C. Duque, J. Tohme, A. C., Allem, and M. W. Bonierbale. (1997): AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 741–750.
- Rosenberg N.A. (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137-138.
- Rothmaler W. (1988): Exkursionsflora für die Gebiete der DDR und der BRD. Band 3. Atlas der Gefäßpflanzen. Volk und Wissen Volkseigener Verlag, Berlin, 753pp.
- Saccardo F. (1895): Ricerche sull'anatomia delle Typhaceae. *Malpighia*. (9): 1-30. *Sparganium*, *Typha* Seed anatomy, Fruit, *Typhaceae* \*\*, *Sparganiaceae* \*\*, Floral anatomy.
- Saitou N., Nei M. (1987): The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Ecology* , 4: 406 – 425.

Sawkins M. C., Maass B. L., Pengelly B. C., Newbury H. J., Ford-Lloyd B. V., Master N., Smith R. (2001): Geographic patterns of genetic variation in two species of *Stylosanthes* Sw. *Molecular Ecology*, 10: 1947–1958.

Sharma S. K., Knox M. R., Ellis T. H. N. (1996): AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 751-758.

Shalchian-Tabrizi K., Minge M.A., Cavalier-Smith T., Nedreklepp J.M., Klaveness D, Jakobsen K.S. (2006): Combined Hsp90 and rRNA sequence phylogeny supports multiple replacements of dinoflagellate plastids. *J Eukaryot Microbiol.* 53:217-24.

Schlüter P. M., Harris S. A. (2006): Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data, *Mol Eco Notes* 6: 569-572.

Simpson D. A. (1988): Phenotypic plasticity of *Elodea nuttallii* (PLANCH.) H. ST JOHN and *Elodea canadensis* MICHL. in the British Isles. *Watsonia* 17: 121-132.

Suda J. (2005): Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií? - *Živa* 53/1: 46-48.

Suda J., Kron P., Husband B. C., & Trávníček P. (2007): Flow Cytometry and Ploidy: Applications in Plant Systematics, Ecology and Evolutionary Biology. In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [eds.]: *Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, pp. 103-130. Wiley

Swift H. (1950): The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36: 643-654.

Szmeja J., Gałka A.: Phenotypic responses to water flow and wave exposure in aquatic plants. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2008 77(1): 59-65.

Travis S. E., Maschinski J., Keim P.. (1996): An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology*, 5: 735-745.

Valbuena-Carabaña M., González-Martínez S., Sork V. L., Collada C., Soto A., Goicoechea P. G., Gil L. (2005): Gene flow and hybridisation in a mixed oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd. and *Quercus petraea* (Matts.) Liebl.) in central Spain. *Heredity*, 95: 457–465.

Vretare V, Weisner SEB, Strand JA, Granéli W (2001) Phenotypic plasticity in *Phragmites australis* as a functional response to water depth. *Aquat Bot* 69:127-145.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van De Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M & Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.

Zenkteler M., Nitzsche W. (1984): Wide hybridization experiments in cereals. *Theor. Appl. Genet.* 68: 311-315.

Zoldos V., Papes D., Brown S.C., Panaud O. & Siljak – Yakovlev S. (1998): Geonome size and base composition of seven *Quercus* species – Inter- and intra-population variation. – *Genome* 41: S. 162-168.

## 11. Seznam obrázků a tabulek:

Obr. 1: Rozšíření čeledi *Sparganiaceae*

Obr. 2: Schéma jednotlivých kroků metody AFLP

Obr. 3: Mapa studovaných lokalit jednotlivých poddruhů *Sparganium erectum*

Obr. 4: Grafický výstup cytometrické analýzy pro *Sparganium erectum* subsp. *microcarpum*.

Obr. 5: Grafický výstup cytometrické analýzy pro *Sparganium erectum* subsp. *erectum*.

Obr. 6: Grafický výstup všespojové metody (complete link) pro 63 populací druh *Sparganium erectum*.

Obr. 7: Grafický výstup PCA měřených plodů pro *Sparganium erectum* s použitím 14 morfologických znaků pro 1746 plodů v programu SAS.

Obr. 8: Grafický výstup PCA zahrnující přechodné jedince pro *Sparganium erectum* s použitím 14 znaků pro 145 jedinců v programu SAS.

Obr. 9: Grafický výstup PCA pro jednotlivé populace *Sparganium erectum* s použitím 14 znaků pro 63 populací v programu SAS.

Obr. 10: Grafický výstup z kanonické diskriminační analýzy pro 350 jedinců druhu *Sparganium erectum* na základě 14 měřených znaků.

Obr. 11: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy pro *Sparganium erectum* subsp. *neglectum* a *microcarpum*.

Obr. 12: Velikost genomu jednotlivých poddruhů druhu *Sparganium erectum*.

Obr. 13: Grafický výstup analýzy PCoA s použitím Jaccardova koeficientu v programu SYNTAX pro AFLP data u 175 jedinců druhu *Sparganium erectum*.

Obr. 14: Nezakořeněný strom s hodnotami bootstrapu na základě AFLP dat pro 176 jedinců druhu *Sparganium erectum*.

Obr. 15: Grafický výstup modelové klastrovací metody v programu STRUCTURE

Obr. 16: Fotografie plně fertilního plodenství jedince M2P (zastupujícího při testech autogamie poddruh *microcarpum*).

Obr. 17: Fotografie prvních klíčících plodů druhu *Sparganium erectum* získaných z hybridizačních experimentů.

**a**, prvních pár dnů po vyklíčení

**b**, velikost juvenilní rostlinky zhruba po týdnu od vyklíčení

Tab. 1: Seznam studovaných lokalit druhu *Sparganium erectum* se souřadnicemi GPS

Tab. 2: Seznam 31 morfologických znaků na plodech druhu *Sparganium erectum* použitých v morfometrických analýzách.

Tab. 3: Seznam rostlin jednotlivých poddruhů druhu *Sparganium erectum* určených pro hybridizační experimenty a testy autogamie.

Tab. 4: Výstup klasifikační diskriminační analýzy pro 136 jedinců druhu *Sparganium erectum* na základě 14 morfologických znaků na plodech.

Tab. 5: Výstup klasifikační diskriminační analýzy pro 145 jedinců (včetně přechodných) druhu *Sparganium erectum* na základě 14 morfologických znaků.

Tab. 6: Kanonické korelační koeficienty pro 136 jedinců reprezentující poddruhy druhu *Sparganium erectum* a pro 14 měřených znaků.

Tab. 7: Kanonické korelační koeficienty pro 73 jedinců reprezentující *Sparganium erectum* subsp. *neglectum* a subsp. *microcarpum*.

Tab.8: Základní charakteristiky velikosti genomu jednotlivých poddruhů druhu *Sparganium erectum* pro 338 jedinců.

Tab.9: Seznam hodnot velikosti genomu u smíšených (R, Vb, Vz) a přechodných populací (T, U, Vp).

Tab.10 : Základní charakteristiky klastrovací analýzy pro jednotlivé skupiny (K=1-8).



## 12. Seznam příloh

### A: Tištěné přílohy

1. Boxploty jednotlivých 14 znaků pro 136 jedinců druhu *Sparganium erectum*)
2. Seznam hodnot měření velikosti genomu u všech studovaných jedinců druhu *Sparganium erectum*
3. Populační průměry 14 morfologických znaků na plodech pro 63 populací
4. Binární matice AFLP dat pro 175 jedinců

### B: Elektronické přílohy (CD-ROM)

#### 1. Soubor *Sparganium.xls* :

- a. Tab. 1: Seznam studovaných lokalit druhu *Sparganium erectum* se souřadnicemi GPS.
- b. Tab. 2: Seznam 31 morfologických znaků na plodech druhu *Sparganium erectum* použitých v morfometrických analýzách.
- c. Tab. 3: Seznam rostlin jednotlivých poddruhů druhu *Sparganium erectum* určených pro hybridizační experimenty a testy autogamie (+ seznam velikostí genomu všech pěstovaných rostlin).
- d. Tab.8: Základní charakteristiky velikosti genomu jednotlivých poddruhů druhu *Sparganium erectum* pro 338 jedinců.
- e. Morfometrická měření
- f. Seznam hodnot měření velikosti genomu u všech studovaných jedinců druhu *Sparganium erectum*

#### 2. Adresář Morfometrika

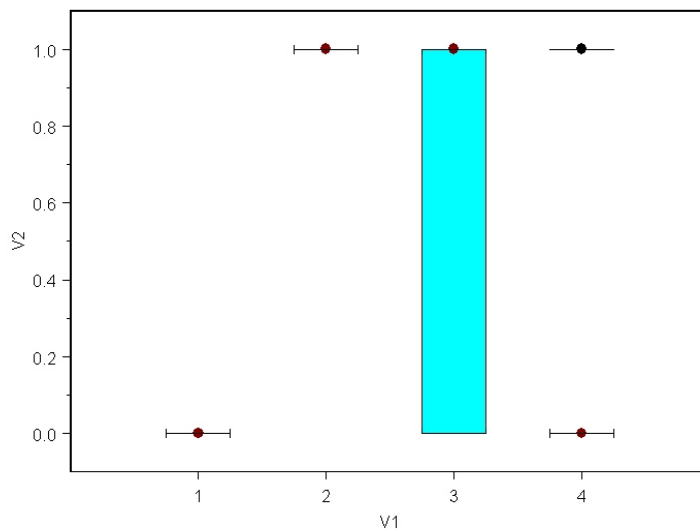
- a. Univariate - Základní statistiky, Boxploty

- b. CORR – Korelace proměnných
  - c. SYN-TAX – shlukovací metody
  - d. PCA – analýza hlavních komponent
  - e. DISCRIM- klasické a kanonické diskriminační analýzy
3. **FCM** – analýzy velikosti genomu
4. **AFLP**
- a. **PCoA** – analýza hlavních koordinát
  - b. **STRUCTURE** – klastrovací metody

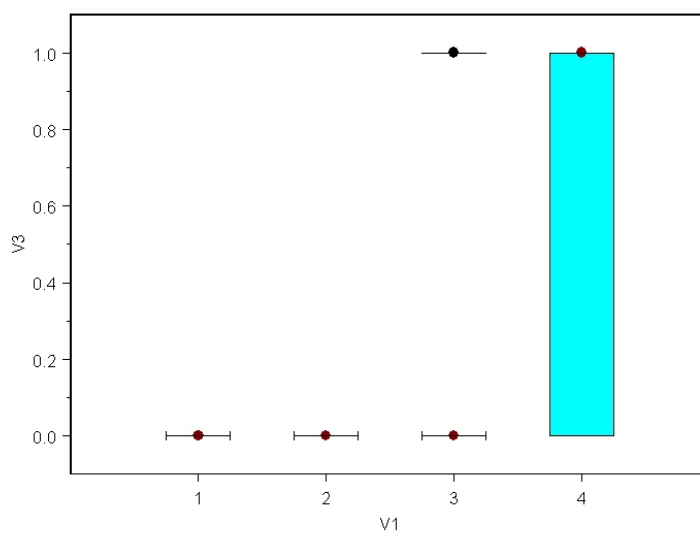
## Příloha A1: Boxploty jednotlivých 14 znaků pro 136 jedinců druhu

### *Sparganium erectum*

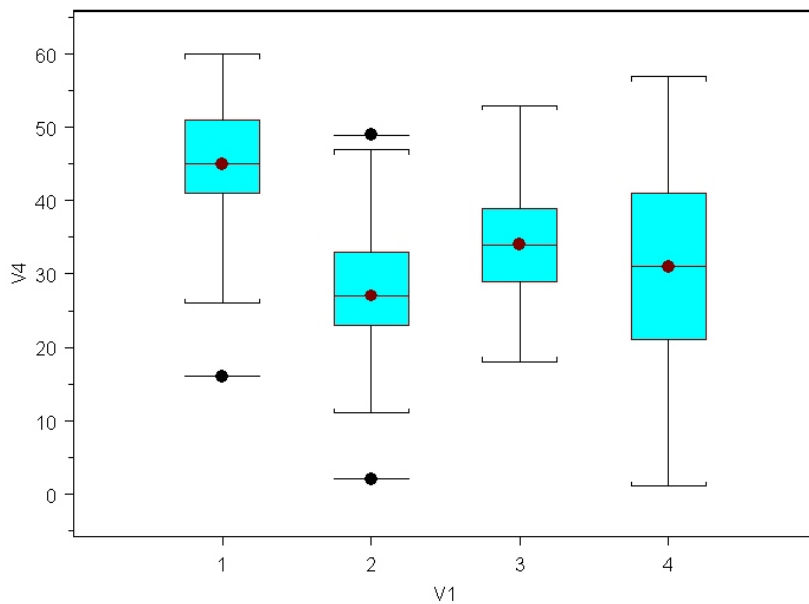
Společná legenda: 1, *S.e.* subsp. *erectum* 2, subsp. *oocarpum* 3, subsp. *neglectum* 4, subsp. *microcarpum*, znaky jsou řazeny po sobě od v2 do v15, v1 je rozřazovací znak určující poddruhy



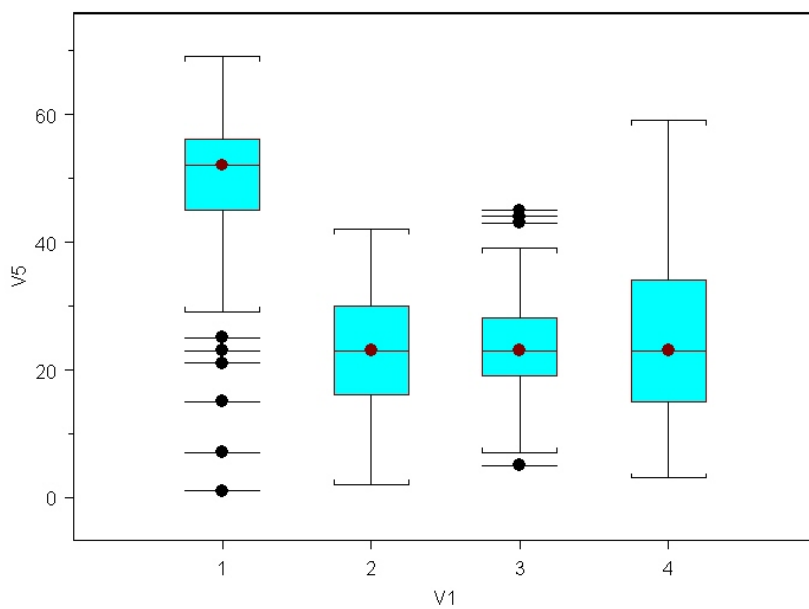
Znak v2: sterilita plodních hlávek



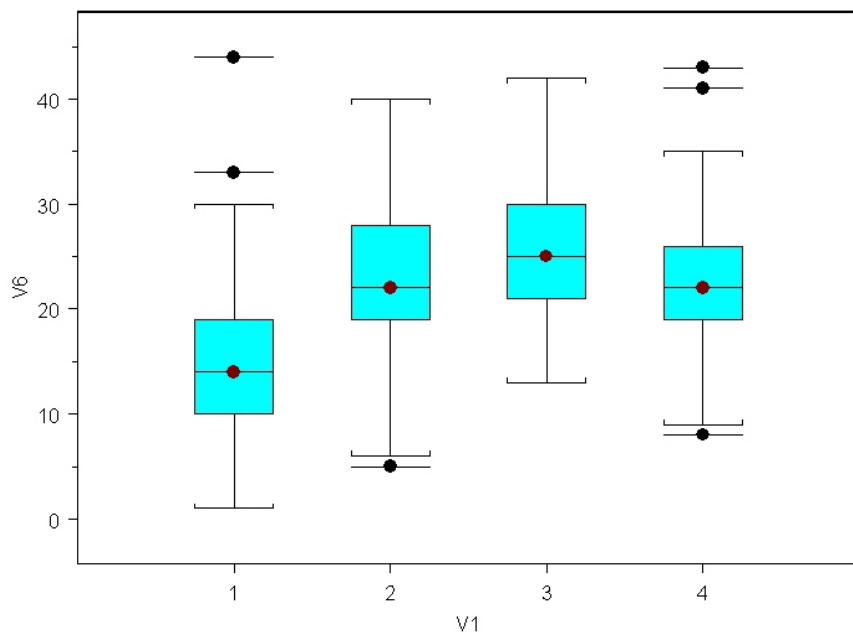
Znak v3: přítomnost plodní stopky



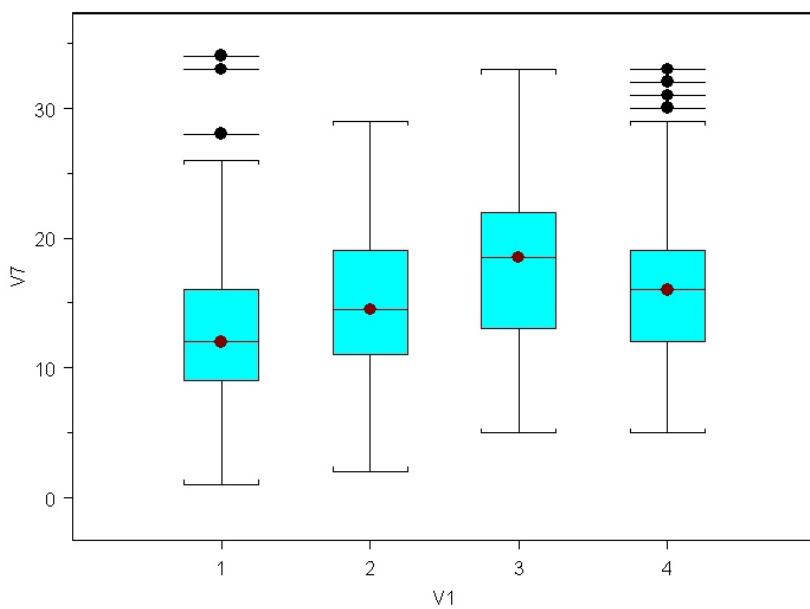
Znak v4: délka plodu



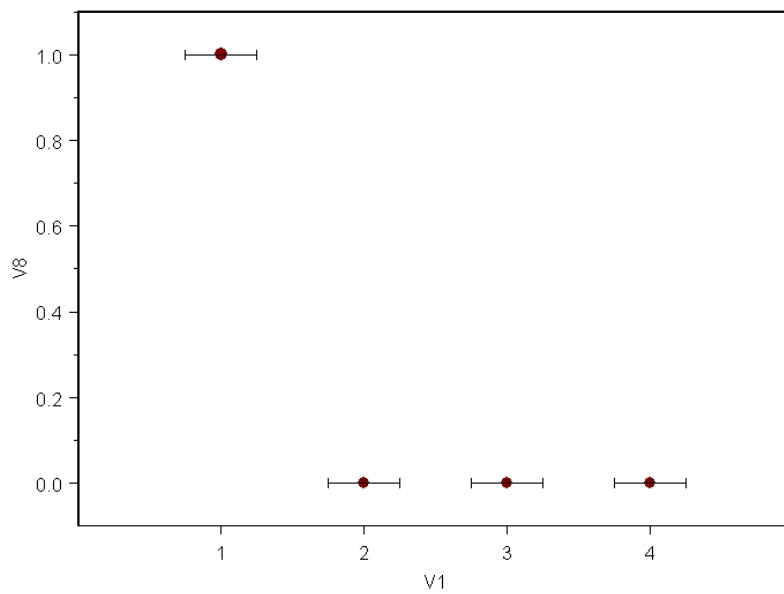
Znak v5: délka dolní části plodu



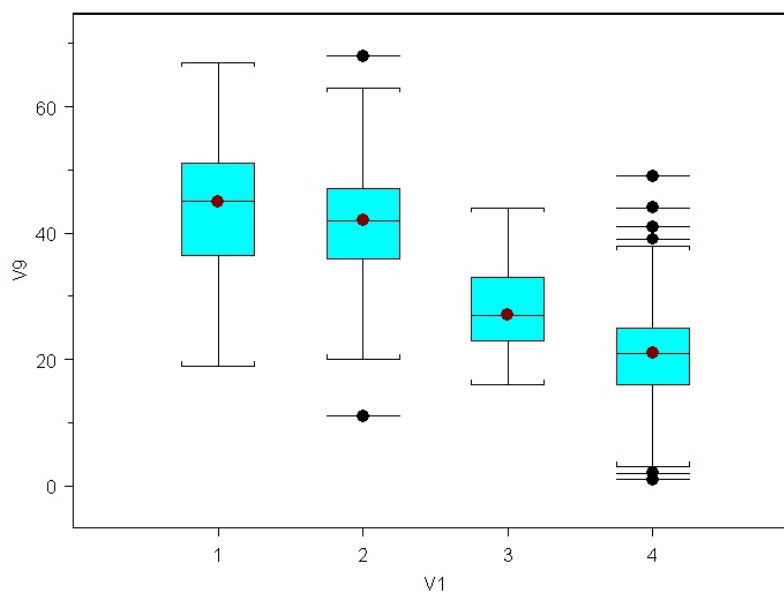
Znak v6: délka horní části plodu



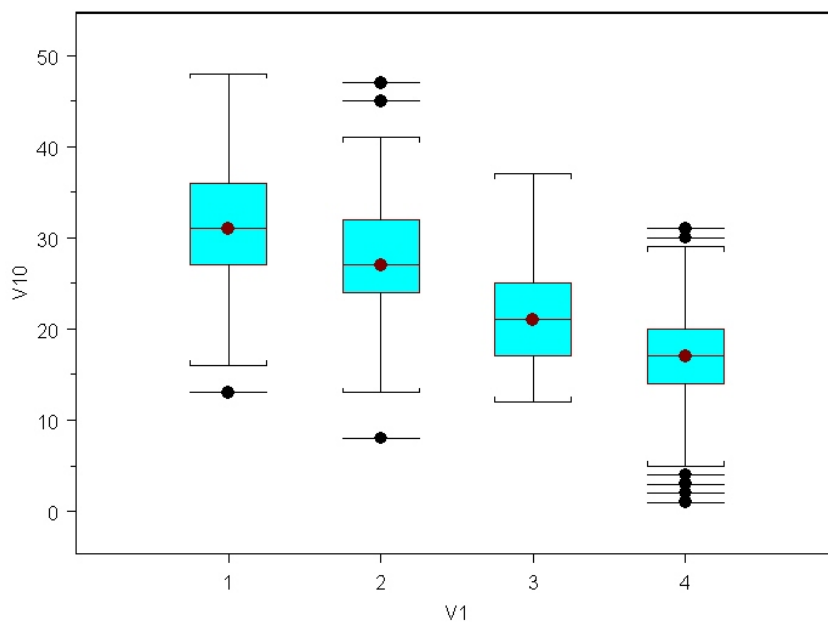
Znak v7: délka čnělky



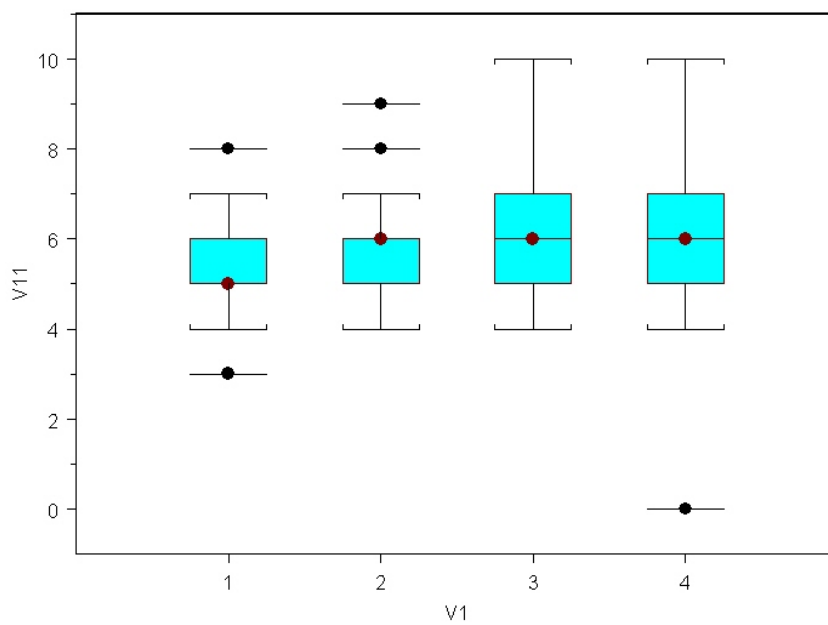
Znak v8: přítomnost ohbí



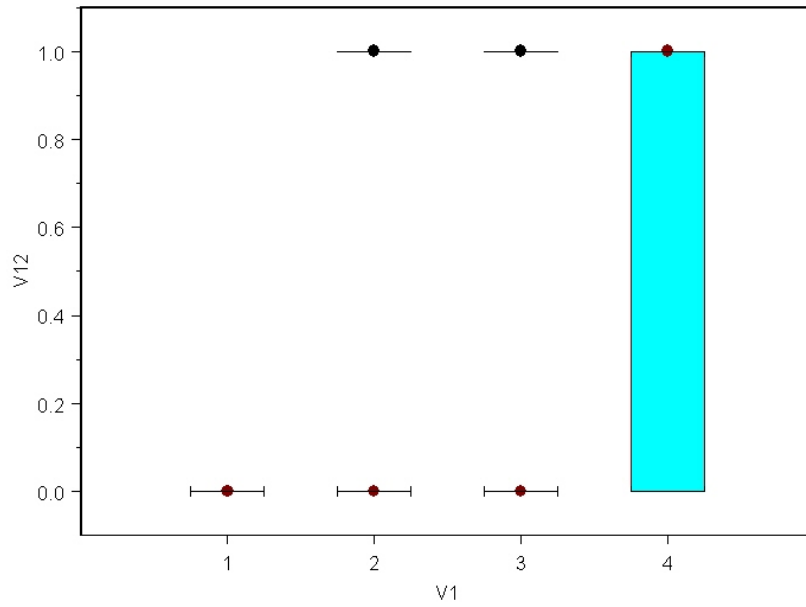
Znak v9: šířka ohbí (plodu)



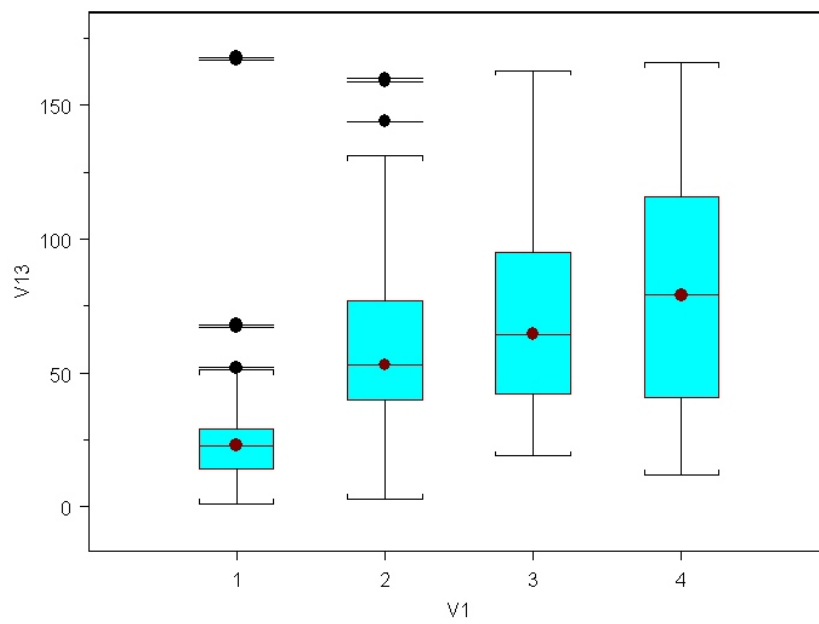
Znak v10: šířka v polovině dolní části plodu



Znak v11: počet žeber

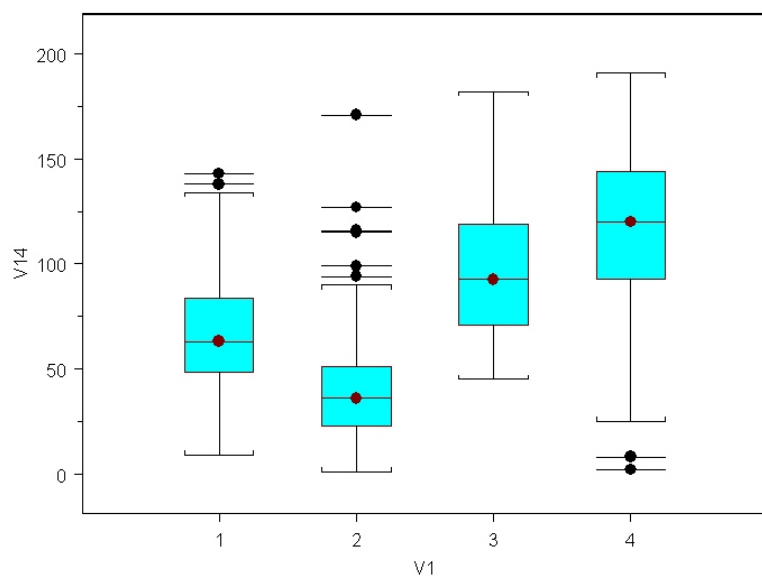


Znak v12: zaškrcení plodu

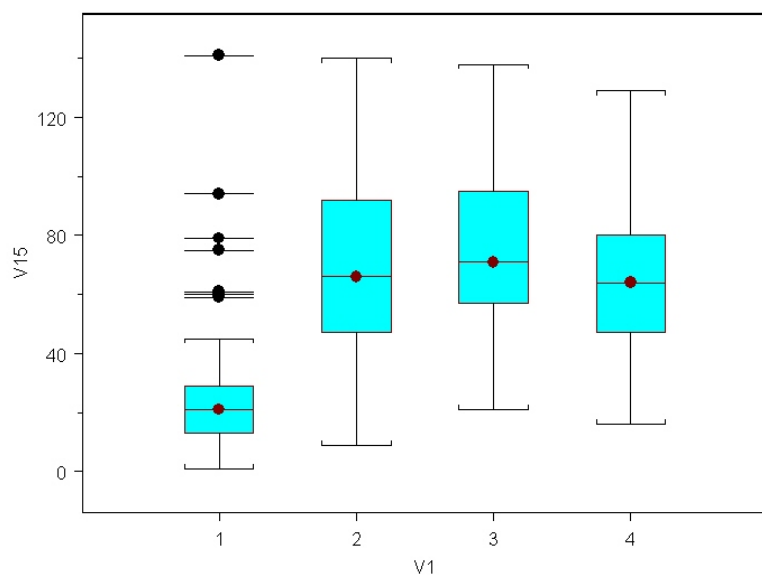


Znak v13: délka okvěti / délka plodu





Znak v14: délka / šířka plodu



Znak v15: délka horní části plodu / délka dolní části plodu

**Příloha A2: Seznam hodnot měření velikosti genomu u všech studovaných jedinců druhu *Sparganium erectum***

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>microcarpum</i>						
K1	31.8.2007	0,402	<b>1,01</b>	3,07	2,33	
K2	30.8.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,83	2,88	
K3	30.8.2007	0,406	<b>1,02</b>	2,38	1,89	
K4	30.8.2007	0,402	<b>1,01</b>	2,87	2,27	
K5	31.8.2007	0,390	<b>0,98</b>	2,53	2,74	
K6	30.7.2008	0,407	<b>1,02</b>	2,5	1,57	
	31.7.2008	0,406	<b>1,02</b>	2,58	1,72	<b>1,02</b>
J1	8.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,47	1,87	
	9.10.2007	0,404	<b>1,01</b>	2,35	1,7	<b>1,01</b>
J2	5.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,33	1,76	
	9.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,73	2,74	
	14.10.2007	0,409	<b>1,02</b>	2,19	2,46	<b>1,02</b>
J3	15.10.2007	0,401	<b>1,00</b>	3,06	2,86	
	19.10.2007	0,500	<b>1,04</b>	2,78	2,52	<b>1,02</b>
J4	8.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,34	1,83	
	9.10.2007	0,400	<b>1,00</b>	2,79	2,36	
	10.10.2007	0,400	<b>1,00</b>	2,7	2,93	<b>1,00</b>
J5	8.10.2007	0,406	<b>1,02</b>	2,53	1,72	
	9.10.2007	0,400	<b>1,00</b>	3,07	1,98	
	15.10.2007	0,404	<b>1,01</b>	2,73	2,46	<b>1,01</b>
M1	28.8.2007	0,404	<b>1,01</b>	2,82	3,09	
	5.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,81	2,5	
	9.10.2007	0,398	<b>1,00</b>	2,29	2,6	<b>1,01</b>
M2	30.8.2007	0,406	<b>1,02</b>	2,88	2,4	
	5.10.2007	0,413	<b>1,03</b>	2,82	2,81	
	14.10.2007	0,408	<b>1,02</b>	2,65	1,57	<b>1,02</b>
M3	30.8.2007	0,408	<b>1,02</b>	2,9	2,13	
	9.10.2007	0,404	<b>1,01</b>	3,03	2,57	
	15.10.2007	0,403	<b>1,01</b>	3,06	2,99	<b>1,01</b>
M4	30.8.2007	0,409	<b>1,02</b>	2,95	2,25	
	5.10.2007	0,408	<b>1,02</b>	2,85	1,63	
	9.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,64	2,15	<b>1,02</b>
M5	30.8.2007	0,403	<b>1,01</b>	2,18	1,88	
	8.10.2007	0,409	<b>1,02</b>	2,5	1,59	
	9.10.2007	0,417	<b>1,04</b>	2,38	2,78	<b>1,02</b>

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>microcarpum</i>						
N1	30.8.2007	0,411	<b>1,03</b>	2,52	1,94	
N2	30.8.2007	0,418	<b>1,05</b>	3,17	1,64	
	8.10.2007	0,420	<b>1,05</b>	2,78	2,46	
	15.10.2007	0,422	<b>1,06</b>	2,85	2,14	<b>1,05</b>
N3	30.8.2007	0,404	<b>1,01</b>	2,18	2,04	
	5.10.2007	0,400	<b>1,00</b>	2,67	2,86	<b>1,01</b>
N4	30.8.2007	0,410	<b>1,03</b>	2,13	1,96	
	5.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,62	1,47	
	15.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,73	2,32	<b>1,02</b>
N5	30.8.2007	0,407	<b>1,02</b>	3	2,73	
	5.10.2007	0,402	<b>1,01</b>	2,9	1,49	
	12.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,81	2,67	<b>1,01</b>
N	8.9.2008	0,412	<b>1,03</b>	2,23	1,93	
	9.9.2008	0,409	<b>1,02</b>	2,21	1,74	
	10.9.2008	0,410	<b>1,03</b>	3,12	1,69	<b>1,03</b>
P1	30.8.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,47	2,22	
P2	30.8.2007	0,401	<b>1,00</b>	2,77	2,43	
P3	30.8.2007	0,409	<b>1,02</b>	2,38	1,83	
P4	30.8.2007	0,403	<b>1,01</b>	3,13	2,85	
P	17.9.2008	0,413	<b>1,03</b>	1,58	1,31	
	18.9.2008	0,408	<b>1,02</b>	2,33	2,03	
	22.9.2008	0,416	<b>1,04</b>	2,67	2,8	<b>1,03</b>
S1	31.8.2007	0,396	<b>0,99</b>	2,52	2,26	
S2	30.8.2007	0,399	<b>1,00</b>	2,23	1,78	
S3	30.8.2007	0,400	<b>1,00</b>	2,77	2,48	
S4	30.8.2007	0,399	<b>1,00</b>	2,55	1,88	
S5	30.8.2007	0,401	<b>1,00</b>	2,31	1,78	
PI1	5.10.2007	0,402	<b>1,01</b>	2,32	1,45	
	11.10.2007	0,399	<b>1,00</b>	2,95	2,46	<b>1,00</b>
PI2	8.10.2007	0,386	<b>0,97</b>	2,82	2,02	
	15.10.2007	0,386	<b>0,97</b>	2,95	2,61	<b>0,97</b>
PI3	8.10.2007	0,386	<b>0,97</b>	2,74	2,11	
	15.10.2007	0,388	<b>0,97</b>	3,11	2,29	<b>0,97</b>
PI4	5.10.2007	0,408	<b>1,02</b>	2,13	1,66	
	9.10.2007	0,396	<b>0,99</b>	2,87	2,22	
	15.10.2007	0,396	<b>0,99</b>	3,18	2,21	<b>1,00</b>
PI5	5.10.2007	0,391	<b>0,98</b>	2,5	2,19	
	11.10.2007	0,399	<b>1,00</b>	2,89	2,59	<b>0,99</b>
Q1	8.10.2007	0,406	<b>1,02</b>	2,94	2,17	
	9.10.2007	0,398	<b>1,00</b>	2,73	1,77	
	15.10.2007	0,395	<b>0,99</b>	2,8	2,84	<b>1,00</b>
Q2	5.10.2007	0,411	<b>1,03</b>	2,11	1,61	
	10.10.2007	0,404	<b>1,01</b>	2,31	1,62	
	11.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,37	1,67	<b>1,02</b>
Q3	8.10.2007	0,417	<b>1,04</b>	2,7	1,41	

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>microcarpum</i>						
Q4	5.10.2007	0,408	<b>1,02</b>	2,44	1,8	
	10.10.2007	0,410	<b>1,03</b>	2,67	1,88	<b>1,02</b>
Q5	5.10.2007	0,404	<b>1,01</b>	2,63	1,54	
	10.10.2007	0,406	<b>1,02</b>	3,18	1,77	
	12.10.2007	0,400	<b>1,00</b>	2,67	2,11	<b>1,01</b>
Q6	5.10.2007	0,421	<b>1,05</b>	2,55	2,03	
	10.10.2007	0,419	<b>1,05</b>	2,75	2,44	
	12.10.2007	0,425	<b>1,06</b>	3,14	2,41	<b>1,05</b>
Y1	8.10.2007	0,400	<b>1,00</b>	2,49	2,34	
	15.10.2007	0,396	<b>0,99</b>	2,88	2,48	<b>1,01</b>
Y2	5.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,46	1,95	
	12.10.2007	0,412	<b>1,03</b>	2,86	2,78	<b>1,02</b>
Y3	5.10.2007	0,415	<b>1,04</b>	2,03	1,46	
	12.10.2007	0,400	<b>1,00</b>	2,76	2,68	<b>1,02</b>
Y4	5.10.2007	0,404	<b>1,01</b>	2,04	1,66	
Y5	8.10.2007	0,407	<b>1,02</b>	2,49	1,14	
	9.10.2007	0,401	<b>1,00</b>	2,46	1,57	
	15.10.2007	0,396	<b>0,99</b>	2,93	2,72	<b>1,00</b>
F1	5.10.2007	0,409	<b>1,02</b>	3,07	1,68	
	9.10.2007	0,418	<b>1,05</b>	2,66	1,29	<b>1,03</b>
F2	8.10.2007	0,407	<b>1,02</b>	2,49	1,99	
	12.10.2007	0,401	<b>1,00</b>	2,77	1,56	<b>1,01</b>
F3	5.10.2007	0,407	<b>1,02</b>	2,34	1,52	
F4	5.10.2007	0,413	<b>1,03</b>	2,98	1,44	
	9.10.2007	0,420	<b>1,05</b>	2,88	1,4	
	12.10.2007	0,410	<b>1,03</b>	2,61	2,7	<b>1,04</b>
F5	5.10.2007	0,405	<b>1,01</b>	2,53	1,6	
	8.10.2007	0,404	<b>1,01</b>	2,69	1,79	
	15.10.2007	0,406	<b>1,02</b>	3,08	2,23	<b>1,01</b>
X1	19.10.2007	0,480	<b>0,99</b>	2,27	1,92	
X2	8.10.2007	0,393	<b>0,98</b>	3,05	1,95	
	15.10.2007	0,397	<b>0,99</b>	2,46	2,32	
	19.10.2007	0,480	<b>0,99</b>	3,11	2,51	<b>0,99</b>
X3	8.10.2007	0,399	<b>1,00</b>	2,89	1,91	
	15.10.2007	0,402	<b>1,01</b>	2,69	1,73	
	19.10.2007	0,483	<b>1,00</b>	1,89	1,61	<b>1,00</b>
X4	8.10.2007	0,397	<b>0,99</b>	3,23	2,77	
	19.10.2007	0,490	<b>1,01</b>	3,14	2,25	<b>1,00</b>
X5	15.10.2007	0,415	<b>0,86</b>	2,49	1,82	
AI1	22.9.2008	0,416	<b>1,04</b>	2,03	2,43	
	26.9.2008	0,399	<b>1,00</b>	2,61	2,15	
	30.9.2008	0,410	<b>1,03</b>	2,84	2,48	<b>1,02</b>
AI2	5.11.2008	0,399	<b>1,00</b>	2,81	2,1	
AI3	6.10.2008	0,408	<b>1,02</b>	2,44	2,5	

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>microcarpum</i>						
<b>AI4</b>	26.9.2008	0,399	<b>1,00</b>	2,28	1,97	
<b>AI4</b>	5.11.2008	0,401	<b>1,00</b>	2,62	2,19	
<b>AI5</b>	5.11.2008	0,415	<b>1,04</b>	3,08	1,99	
<b>Ma1</b>	17.9.2008	0,414	<b>1,04</b>	1,83	1,4	
	18.9.2008	0,404	<b>1,01</b>	2,54	2,03	
	22.9.2008	0,416	<b>1,04</b>	2,83	2,26	<b>1,03</b>
<b>Ma2</b>	26.9.2008	0,408	<b>1,02</b>	2,72	1,93	
<b>Ma3</b>	26.9.2008	0,407	<b>1,02</b>	1,95	1,87	
<b>Ma4</b>	26.9.2008	0,411	<b>1,03</b>	2,43	2,02	
<b>Ma5</b>	26.9.2008	0,410	<b>1,03</b>	2,26	1,64	
<b>Jo1</b>	17.9.2008	0,414	<b>1,04</b>	2,05	1,36	
	18.9.2008	0,410	<b>1,03</b>	2,42	1,83	
	22.9.2008	0,417	<b>1,04</b>	2,5	2,9	<b>1,03</b>
<b>Jo2</b>	22.9.2008	0,414	<b>1,04</b>	2,89	1,97	
<b>Jo3</b>	22.9.2008	0,416	<b>1,04</b>	2,36	2,56	
<b>Jo4</b>	22.9.2008	0,415	<b>1,04</b>	2,37	2,39	
<b>Jo5</b>	17.9.2008	0,414	<b>1,04</b>	1,74	1,14	
<b>Re1</b>	5.11.2008	0,404	<b>1,01</b>	3,03	1,75	
	6.11.2008	0,400	<b>1,00</b>	2,5	1,38	
	20.11.2008	0,397	<b>0,99</b>	2,65	1,52	<b>1,00</b>
<b>Re2</b>	4.11.2008	0,413	<b>1,03</b>	3,04	1,39	
<b>Re3</b>	5.11.2008	0,406	<b>1,02</b>	2,24	1,46	
<b>Re4</b>	20.11.2008	0,400	<b>1,00</b>	2,92	1,61	
<b>St1</b>	2.2.2009	0,425	<b>1,06</b>	2,53	1,88	
	3.2.2009	0,429	<b>1,07</b>	2,82	1,58	
	4.2.2009	0,428	<b>1,07</b>	2,86	2,17	<b>1,07</b>
<b>St2</b>	8.12.2008	0,419	<b>1,05</b>	2	1,09	
<b>St3</b>	2.2.2009	0,411	<b>1,03</b>	2,49	1,77	
<b>Sr1</b>	20.11.2008	0,415	<b>1,04</b>	2,23	2,01	
	21.11.2008	0,416	<b>1,04</b>	2,51	1,59	
	28.1.2009	0,429	<b>1,07</b>	2,09	2,09	<b>1,05</b>
<b>Sr2</b>	28.1.2009	0,427	<b>1,07</b>	2,04	1,89	
<b>Sr3</b>	28.1.2009	0,422	<b>1,06</b>	2,68	1,43	
<b>Sr4</b>	20.11.2008	0,421	<b>1,05</b>	2,78	1,8	
<b>Sr5</b>	28.1.2009	0,426	<b>1,06</b>	1,88	1,49	
<b>Br1</b>	6.11.2008	0,391	<b>0,98</b>	2,09	1,68	
<b>Br2</b>	6.11.2008	0,378	<b>0,95</b>	3,1	1,7	
<b>Br4</b>	5.11.2008	0,416	<b>1,04</b>	2,41	1,76	

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>microcarpum</i>						
Ba1	20.11.2008	0,407	<b>1,02</b>	2,91	1,51	
Ba3	20.11.2008	0,407	<b>1,02</b>	2,23	1,42	
Ba4	20.11.2008	0,406	<b>1,02</b>	2,91	1,92	
Ba5	20.11.2008	0,412	<b>1,03</b>	2,5	2,08	
	21.11.2008	0,414	<b>1,03</b>	2,64	1,49	
<i>oocarpum</i>						
V1	31.8.2007	0,424	<b>1,06</b>	2,38	1,98	
V2	30.8.2007	0,423	<b>1,06</b>	2,67	2,09	
V3	30.8.2007	0,429	<b>1,07</b>	2,72	2,02	
V4	31.8.2007	0,429	<b>1,07</b>	3,14	2,68	
V5	30.8.2007	0,429	<b>1,07</b>	2,99	2,65	
V	8.9.2008	0,430	<b>1,08</b>	3,13	2,41	
	9.9.2008	0,438	<b>1,10</b>	1,95	1,96	
	10.9.2008	0,432	<b>1,08</b>	1,57	1,88	<b>1,08</b>
C1	30.8.2007	0,431	<b>1,08</b>	2,46	2,17	
C2	31.8.2007	0,424	<b>1,06</b>	3,12	2,8	
C3	30.8.2007	0,426	<b>1,07</b>	2,36	1,95	
C4	30.8.2007	0,428	<b>1,07</b>	2,8	2,44	
C5	30.8.2007	0,424	<b>1,06</b>	2,53	2,45	
C	8.9.2008	0,428	<b>1,07</b>	2,75	2,13	
	9.9.2008	0,428	<b>1,07</b>	2,01	1,71	
	10.9.2008	0,433	<b>1,08</b>	1,57	1,87	<b>1,07</b>
E1	31.8.2007	0,430	<b>1,07</b>	2,65	2,17	
E2	31.8.2007	0,423	<b>1,06</b>	2,96	2,28	
E3	30.8.2007	0,429	<b>1,07</b>	2,66	2,13	
E4	31.8.2007	0,428	<b>1,07</b>	2,31	1,86	
E5	30.8.2007	0,431	<b>1,08</b>	3,17	2,67	
E	8.9.2008	0,433	<b>1,08</b>	2,08	1,51	
	9.9.2008	0,437	<b>1,09</b>	2,19	1,82	
	10.9.2008	0,432	<b>1,08</b>	2,71	1,87	<b>1,08</b>
G1	5.10.2007	0,430	<b>1,08</b>	2,6	1,67	
	10.10.2007	0,439	<b>1,10</b>	2,98	2,3	
	11.10.2007	0,432	<b>1,08</b>	2,56	1,84	<b>1,08</b>
G2	8.10.2007	0,427	<b>1,07</b>	2,91	1,97	
	15.10.2007	0,425	<b>1,06</b>	2,52	2,27	<b>1,07</b>
G3	8.10.2007	0,426	<b>1,06</b>	2,66	1,67	
	9.10.2007	0,427	<b>1,07</b>	2,87	2	
	10.10.2007	0,421	<b>1,05</b>	2,98	3,06	<b>1,06</b>
G4	8.10.2007	0,429	<b>1,07</b>	2,8	1,91	
	15.10.2007	0,428	<b>1,07</b>	3,11	2	<b>1,07</b>
G5	8.10.2007	0,426	<b>1,06</b>	2,64	1,89	
	9.10.2007	0,426	<b>1,07</b>	2,59	2,2	
	15.10.2007	0,423	<b>1,06</b>	3,05	2,75	<b>1,06</b>

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>oocarpum</i>						
H1	8.10.2007	0,436	<b>1,09</b>	2,68	1,62	
	9.10.2007	0,426	<b>1,07</b>	2,89	1,59	
	15.10.2007	0,426	<b>1,07</b>	3,22	2,02	<b>1,07</b>
H2	5.10.2007	0,428	<b>1,07</b>	3,21	2,48	
H3	8.10.2007	0,424	<b>1,06</b>	3,2	2,31	
	15.10.2007	0,423	<b>1,06</b>	2,78	2,46	
H4	5.10.2007	0,428	<b>1,07</b>	2,7	1,99	
	9.10.2007	0,437	<b>1,09</b>	3,04	1,71	
	10.10.2007	0,437	<b>1,09</b>	2,42	1,75	
	15.10.2007	0,437	<b>1,09</b>	3,24	2,73	<b>1,09</b>
H5	5.10.2007	0,422	<b>1,06</b>	2,97	1,47	
	15.10.2007	0,421	<b>1,05</b>	1,53	1,73	<b>1,05</b>
Za1	5.11.2008	0,432	<b>1,08</b>	2,82	1,65	
Za2	5.11.2008	0,430	<b>1,08</b>	2,43	1,48	
Za3	4.11.2008	0,429	<b>1,07</b>	2,64	1,85	
	5.11.2008	0,429	<b>1,07</b>	2,19	1,46	
	6.11.2008	0,432	<b>1,08</b>	2,37	1,39	<b>1,08</b>
Za4	4.11.2008	0,432	<b>1,08</b>	2,83	1,94	
Za5	20.11.2008	0,430	<b>1,07</b>	2,25	1,78	
Rz1	25.7.2008	0,442	<b>1,11</b>	2,6	1,95	
Rz2	25.7.2008	0,449	<b>1,12</b>	3,11	2,39	
Rz3	25.7.2008	0,446	<b>1,12</b>	2,74	2,03	
Rz4	25.7.2008	0,446	<b>1,12</b>	2,74	2,48	
	30.7.2008	0,437	<b>1,09</b>	2,66	1,5	
	31.7.2008	0,437	<b>1,09</b>	2,65	1,99	<b>1,10</b>
Rz5	25.7.2008	0,443	<b>1,11</b>	2,59	2,16	
Ny1	8.9.2008	0,435	<b>1,09</b>	2,13	2,11	
	9.9.2008	0,436	<b>1,09</b>	2,07	1,96	
	10.9.2008	0,442	<b>1,11</b>	2,64	1,97	<b>1,09</b>
Ny2	9.9.2008	0,434	<b>1,09</b>	2,29	2,19	
Ny3	8.9.2008	0,436	<b>1,09</b>	3,1	2,2	
Ny4	9.9.2008	0,433	<b>1,08</b>	1,89	1,83	
Ny5	8.9.2008	0,434	<b>1,09</b>	2,61	2,51	
Vo1	8.9.2008	0,428	<b>1,07</b>	1,88	2,29	
	9.9.2008	0,427	<b>1,07</b>	2,31	1,39	
	10.9.2008	0,432	<b>1,08</b>	1,85	1,74	<b>1,07</b>
Vo2	8.9.2008	0,427	<b>1,07</b>	2,31	2,89	
Vo3	9.9.2008	0,428	<b>1,07</b>	1,72	1,75	
Vo4	8.9.2008	0,432	<b>1,08</b>	2,22	1,64	
Vo5	9.9.2008	0,425	<b>1,06</b>	2,39	2,05	

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>oocarpum</i>						
Ho1	30.9.2008	0,443	<b>1,11</b>	2,54	2,7	
Ho2	26.9.2008	0,426	<b>1,07</b>	2,5	2,16	
	30.9.2008	0,444	<b>1,11</b>	2,63	2,87	
Ho3	6.10.2008	0,446	<b>1,12</b>	3,01	3,21	
	21.10.2008	0,431	<b>1,08</b>	2,62	2,17	
	22.10.2008	0,426	<b>1,07</b>	2,58	1,85	<b>1,09</b>
Ho4	26.9.2008	0,430	<b>1,08</b>	2,2	2,46	
Ho5	26.9.2008	0,429	<b>1,07</b>	2	2,4	
K11	6.10.2008	0,432	<b>1,08</b>	2,22	1,98	
K12	6.10.2008	0,437	<b>1,09</b>	1,95	1,52	
	8.10.2008	0,437	<b>1,09</b>	1,37	1,43	
	9.10.2008	0,434	<b>1,09</b>	1,63	1,26	<b>1,09</b>
K13	1.10.2008	0,433	<b>1,08</b>	2,36	1,69	
K14	6.10.2008	0,435	<b>1,09</b>	2,83	1,98	
K15	6.10.2008	0,433	<b>1,08</b>	2,63	1,99	
K21	6.10.2008	0,440	<b>1,10</b>	2,2	2,74	
K22	6.10.2008	0,437	<b>1,09</b>	2,55	2,15	
K23	6.10.2008	0,436	<b>1,09</b>	2,43	2,91	
	8.10.2008	0,438	<b>1,10</b>	1,74	1,51	
	9.10.2008	0,435	<b>1,09</b>	2,07	1,49	<b>1,09</b>
K24	6.10.2008	0,436	<b>1,09</b>	2,78	1,94	
K25	6.10.2008	0,439	<b>1,10</b>	2,61	2,27	
Ko1	6.10.2008	0,445	<b>1,11</b>	2,82	2,16	
Ko2	6.10.2008	0,446	<b>1,12</b>	1,97	2,16	
	8.10.2008	0,446	<b>1,12</b>	1,98	1,46	
	9.10.2008	0,439	<b>1,10</b>	1,59	1,57	<b>1,11</b>
Ko3	6.10.2008	0,443	<b>1,11</b>	2,48	2,19	
Ko4	6.10.2008	0,453	<b>1,13</b>	1,57	2,02	
Ko5	6.10.2008	0,454	<b>1,14</b>	1,82	1,94	
<i>erectum</i>						
D1	31.8.2007	0,460	<b>1,15</b>	2,74	2,26	
D2	30.8.2007	0,461	<b>1,15</b>	2,95	2,18	
D3	31.8.2007	0,463	<b>1,16</b>	2,69	2,21	
D5	31.8.2007	0,467	<b>1,17</b>	2,92	2,45	
D6	31.8.2007	0,430	<b>1,08</b>	2,79	2,19	<i>oocarpum</i>
D	8.9.2008	0,451	<b>1,13</b>	2,76	1,76	
	9.9.2008	0,445	<b>1,11</b>	2,32	2,36	
	10.9.2008	0,448	<b>1,12</b>	2,08	1,61	<b>1,12</b>



Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>erectum</i>						
L1	30.8.2007	0,465	<b>1,16</b>	2,97	2,55	
L2	30.8.2007	0,461	<b>1,15</b>	2,35	2,12	
L3	31.8.2007	0,457	<b>1,14</b>	2,7	2,54	
L4	31.8.2007	0,458	<b>1,15</b>	2,62	2,59	
L5	30.8.2007	0,454	<b>1,14</b>	2,41	1,57	
L	16.3.2009	0,486	<b>1,15</b>	1,58	1,18	
	17.3.2009	0,484	<b>1,15</b>	2,29	2,59	
	18.3.2009	0,486	<b>1,15</b>	2,24	2,31	<b>1,15</b>
O1	8.10.2007	0,455	<b>1,14</b>	2,78	1,68	
	15.10.2007	0,461	<b>1,15</b>	2,96	2,23	
	19.10.2007	0,548	<b>1,13</b>	2,84	2,11	<b>1,14</b>
O2	8.10.2007	0,457	<b>1,14</b>	2,58	1,55	
	15.10.2007	0,454	<b>1,14</b>	2,79	2,07	
	19.10.2007	0,549	<b>1,14</b>	2,85	2,49	<b>1,14</b>
O3	8.10.2007	0,456	<b>1,14</b>	2,87	1,75	
	15.10.2007	0,455	<b>1,14</b>	2,08	2,02	
	19.10.2007	0,550	<b>1,14</b>	3,05	2,58	<b>1,14</b>
O4	8.10.2007	0,446	<b>1,12</b>	2,74	1,55	
	15.10.2007	0,450	<b>1,13</b>	2,29	2,35	
	19.10.2007	0,555	<b>1,15</b>	2,25	2,23	<b>1,13</b>
O5	8.10.2007	0,453	<b>1,13</b>	3,2	2,06	
	15.10.2007	0,458	<b>1,15</b>	2,36	2,54	
	19.10.2007	0,560	<b>1,16</b>	1,81	1,24	<b>1,15</b>
Ch1	17.7.2008	0,467	<b>1,17</b>	2,41	1,71	
Ch2	17.7.2008	0,469	<b>1,17</b>	2,08	1,74	
Ch3	17.7.2008	0,465	<b>1,16</b>	2,5	1,99	
Ch4	17.7.2008	0,472	<b>1,18</b>	3,07	2,14	
	18.7.2008	0,466	<b>1,16</b>	3,01	1,91	
	25.7.2008	0,466	<b>1,17</b>	2,77	1,82	<b>1,17</b>
Ch5	17.7.2008	0,468	<b>1,17</b>	2,46	1,88	
Do1	8.9.2008	0,464	<b>1,16</b>	2,76	2,13	
	9.9.2008	0,465	<b>1,16</b>	1,74	2,51	
	10.9.2008	0,466	<b>1,17</b>	2,09	1,83	<b>1,16</b>
Do2	9.9.2008	0,456	<b>1,14</b>	2,49	2,57	
Do3	8.9.2008	0,465	<b>1,16</b>	2,51	2,82	
Do4	8.9.2008	0,465	<b>1,16</b>	2,78	2,6	
Do5	8.9.2008	0,456	<b>1,14</b>	2,43	2,31	
Ro1	8.9.2008	0,460	<b>1,15</b>	2,67	1,64	
	9.9.2008	0,459	<b>1,15</b>	2,64	1,86	
	10.9.2008	0,457	<b>1,14</b>	1,69	1,23	<b>1,15</b>
Ro2	8.9.2008	0,452	<b>1,13</b>	2,91	2,22	
Ro3	8.9.2008	0,440	<b>1,10</b>	2,03	2,67	
Ro4	9.9.2008	0,448	<b>1,12</b>	2,78	2,54	
Ro5	8.9.2008	0,461	<b>1,15</b>	2,27	2,33	

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>erectum</i>						
Po1	17.9.2008	0,460	<b>1,15</b>	2,35	1,69	
	18.9.2008	0,456	<b>1,14</b>	2,69	2,2	
	8.12.2008	0,478	<b>1,20</b>	2,24	1,18	<b>1,16</b>
Po2	2.2.2009	0,480	<b>1,20</b>	2,29	1,55	
	3.2.2009	0,480	<b>1,20</b>	3,01	1,85	
	4.2.2009	0,473	<b>1,18</b>	2,19	1,54	<b>1,19</b>
Po4	8.12.2008	0,476	<b>1,19</b>	2,04	1,89	
Po5	16.10.2008	0,478	<b>1,20</b>	2,44	1,57	
VI1	4.11.2008	0,463	<b>1,16</b>	2,49	1,3	
VI2	16.10.2008	0,466	<b>1,17</b>	2,15	1,73	
VI3	5.11.2008	0,455	<b>1,14</b>	2,52	1,98	
VI4	16.10.2008	0,466	<b>1,17</b>	2,24	1,68	
	21.10.2008	0,457	<b>1,14</b>	2,51	2,3	
	22.10.2008	0,465	<b>1,16</b>	2,28	1,75	<b>1,16</b>
VI5	2.2.2009	0,479	<b>1,20</b>	2,46	1,64	
Km1	16.10.2008	0,460	<b>1,15</b>	2,03	2	
Km2	4.11.2008	0,453	<b>1,13</b>	2,53	2,01	
Km3	16.10.2008	0,461	<b>1,15</b>	2,29	2,48	
	21.10.2008	0,454	<b>1,14</b>	2,72	2,01	
	22.10.2008	0,460	<b>1,15</b>	1,99	1,52	<b>1,15</b>
Km4	4.11.2008	0,453	<b>1,13</b>	2,43	1,56	
Km5	4.11.2008	0,456	<b>1,14</b>	2,65	1,94	
	16.10.2008	0,457	<b>1,14</b>	2,56	2,24	
Ha1	16.10.2008	0,472	<b>1,18</b>	1,97	1,85	
Ha2	16.10.2008	0,473	<b>1,18</b>	2,7	1,74	
Ha3	16.10.2008	0,481	<b>1,20</b>	1,77	1,52	
Ha4	16.10.2008	0,483	<b>1,21</b>	2,11	1,56	
Ha5	16.10.2008	0,464	<b>1,16</b>	2,23	1,72	
	21.10.2008	0,449	<b>1,12</b>	2,73	1,82	
	22.10.2008	0,474	<b>1,19</b>	3,01	1,49	<b>1,16</b>
Sa1	2.2.2009	0,472	<b>1,18</b>	2,05	1,41	
Sa2	2.2.2009	0,468	<b>1,17</b>	2,32	1,68	
Sa3	5.11.2008	0,453	<b>1,13</b>	2,37	1,78	
	8.12.2008	0,469	<b>1,17</b>	2,3	1,95	
	9.12.2008	0,478	<b>1,19</b>	1,95	1,28	<b>1,17</b>
Sa4	2.2.2009	0,467	<b>1,17</b>	2,31	1,6	
Sa5	2.2.2009	0,473	<b>1,18</b>	2,67	1,93	

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>erectum</i>						
Vy1	16.10.2008	0,444	<b>1,11</b>	2,12	1,64	
Vy2	2.2.2009	0,450	<b>1,12</b>	2,58	1,57	
Vy3	16.10.2008	0,440	<b>1,10</b>	2,08	1,86	
	21.10.2008	0,431	<b>1,08</b>	2,88	1,49	
	22.10.2008	0,436	<b>1,09</b>	2,4	1,99	<b>1,09</b>
Vy4	21.10.2008	0,435	<b>1,09</b>	3,03	2,9	
Vy5	21.10.2008	0,431	<b>1,08</b>	2,87	2,38	
<i>neglectum</i>						
W1	5.10.2007	0,394	<b>0,99</b>	3,19	2,04	
	9.10.2007	0,392	<b>0,98</b>	3,16	1,86	
	15.10.2007	0,401	<b>1,00</b>	2,84	2	<b>0,99</b>
W2	5.10.2007	0,393	<b>0,98</b>	2,61	2,23	
	10.10.2007	0,391	<b>0,98</b>	2,75	2,4	
	11.10.2007	0,392	<b>0,98</b>	3,1	2,65	<b>0,98</b>
W3	5.10.2007	0,390	<b>0,97</b>	2,71	2,12	
	9.10.2007	0,389	<b>0,97</b>	2,9	2,67	
	15.10.2007	0,398	<b>1,00</b>	2,24	1,96	<b>0,98</b>
W4	5.10.2007	0,390	<b>0,98</b>	3,16	2,23	
	9.10.2007	0,391	<b>0,98</b>	2,47	1,38	
	15.10.2007	0,384	<b>0,96</b>	2,97	1,85	<b>0,97</b>
W5	5.10.2007	0,392	<b>0,98</b>	3,2	2,25	
	9.10.2007	0,388	<b>0,97</b>	3,16	2,09	
	14.10.2007	0,392	<b>0,98</b>	2,99	2,58	<b>0,98</b>
Z1	5.10.2007	0,399	<b>1,00</b>	2,98	1,88	
	9.10.2007	0,398	<b>1,00</b>	2,53	1,56	
	14.10.2007	0,397	<b>0,99</b>	2,99	2,48	<b>1,00</b>
Z2	5.10.2007	0,403	<b>1,01</b>	2,47	1,52	
	10.10.2007	0,400	<b>1,00</b>	2,96	2,12	
	12.10.2007	0,395	<b>0,99</b>	3,17	3,01	<b>1,00</b>
Z3	5.10.2007	0,394	<b>0,99</b>	2,16	1,63	
	10.10.2007	0,397	<b>0,99</b>	2,67	1,64	
	11.10.2007	0,393	<b>0,98</b>	2,92	2,19	<b>0,99</b>
Z4	8.10.2007	0,393	<b>0,98</b>	2,85	1,77	
	9.10.2007	0,391	<b>0,98</b>	2,79	1,36	
	15.10.2007	0,390	<b>0,98</b>	2,66	1,76	<b>0,98</b>
Z5	5.10.2007	0,393	<b>0,98</b>	2,99	2,06	
	9.10.2007	0,392	<b>0,98</b>	2,55	1,75	
	15.10.2007	0,390	<b>0,98</b>	2,75	1,43	<b>0,98</b>

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>neglectum</i>						
I1	8.10.2007	0,394	<b>0,98</b>	2,59	1,81	
	15.10.2007	0,395	<b>0,99</b>	3,19	2,48	<b>0,99</b>
I2	8.10.2007	0,394	<b>0,99</b>	2,77	1,96	
	15.10.2007	0,397	<b>0,99</b>	2,03	1,21	<b>0,99</b>
I3	8.10.2007	0,397	<b>0,99</b>	2,46	1,61	
	15.10.2007	0,398	<b>1,00</b>	3,04	2,62	<b>0,99</b>
I4	8.10.2007	0,403	<b>1,01</b>	2,86	1,61	
	9.10.2007	0,392	<b>0,98</b>	2,9	2,23	
	15.10.2007	0,391	<b>0,98</b>	3,17	2,46	<b>0,99</b>
I5	5.10.2007	0,400	<b>1,00</b>	2,55	1,56	
	8.10.2007	0,392	<b>0,98</b>	2,69	1,52	
	15.10.2007	0,410	<b>1,03</b>	3,14	2,11	<b>1,00</b>
Tr1	16.10.2008	0,407	<b>1,02</b>	2,22	2,46	
	21.10.2008	0,402	<b>1,01</b>	2,69	2,45	
	22.10.2008	0,406	<b>1,01</b>	1,8	1,65	<b>1,01</b>
Tr2	16.10.2008	0,409	<b>1,02</b>	2,09	2,06	
Tr3	16.10.2008	0,409	<b>1,02</b>	2,25	1,77	
Tr4	16.10.2008	0,411	<b>1,03</b>	2,34	2,13	
Tr5	16.10.2008	0,411	<b>1,03</b>	2,34	1,77	
Ps1	17.9.2008	0,406	<b>1,02</b>	2,23	1,81	
	18.9.2008	0,401	<b>1,00</b>	2,63	2,15	
	22.9.2008	0,412	<b>1,03</b>	2,76	2,27	<b>1,02</b>
Ps2	5.11.2008	0,396	<b>0,99</b>	2,22	1,64	
Ps3	5.11.2008	0,407	<b>1,02</b>	2,54	1,56	
Ps4	4.11.2008	0,397	<b>0,99</b>	2,87	2,33	
Ps5	4.11.2008	0,398	<b>1,00</b>	2,34	1,59	
Ne1	16.10.2008	0,410	<b>1,03</b>	2,28	2,1	
Ne2	16.10.2008	0,404	<b>1,01</b>	2,54	2,59	
Ne3	5.11.2008	0,401	<b>1,00</b>	2,42	2,04	
Ne4	5.11.2008	0,406	<b>1,02</b>	2,28	1,92	
	20.11.2008	0,408	<b>1,02</b>	2,89	1,45	
	21.11.2008	0,420	<b>1,05</b>	2,19	0,86	<b>1,03</b>
Ne5	2.2.2009	0,420	<b>1,05</b>	2,53	1,89	
Dk1	17.9.2008	0,412	<b>1,03</b>	1,93	1,32	
	18.9.2008	0,398	<b>1,00</b>	2,27	2,28	
Dk2	22.9.2008	0,403	<b>1,01</b>	2,59	2,11	
Dk3	22.9.2008	0,411	<b>1,03</b>	2,79	2,11	
Dk4	22.9.2008	0,406	<b>1,02</b>	2	1,73	
Dk5						
Dk6	8.12.2008	0,413	<b>1,03</b>	2,27	2,17	
	28.1.2009	0,410	<b>1,03</b>	2,15	1,24	
	2.2.2009	0,414	<b>1,04</b>	2,41	1,77	
	3.2.2009	0,418	<b>1,04</b>	2,84	1,81	<b>1,03</b>

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<i>neglectum</i>						
Ds1	22.9.2008	0,403	<b>1,01</b>	2,46	2,31	
	26.9.2008	0,413	<b>1,03</b>	1,9	2,03	
	30.9.2008	0,416	<b>1,04</b>	3,06	2,38	<b>1,03</b>
Ds2	22.9.2008	0,409	<b>1,02</b>	2,57	2,31	
Ds3	22.9.2008	0,402	<b>1,01</b>	2,71	2,41	
Ds4	22.9.2008	0,409	<b>1,02</b>	2,55	2,21	
Ds5	22.9.2008	0,400	<b>1,00</b>	2,9	2,5	
Db3	16.3.2009	0,425	<b>1,01</b>	2,44	1,7	
Db4	16.3.2009	0,427	<b>1,01</b>	2,36	1,47	
Db5	16.3.2009	0,430	<b>1,02</b>	1,94	1,43	
Db6	16.3.2009	0,418	<b>0,99</b>	2,45	2,01	
	17.3.2008	0,415	<b>0,98</b>	2,8	2,43	
	18.3.2008	0,419	<b>0,99</b>	2,47	1,9	<b>0,99</b>
Hs1	17.3.2009	0,416	<b>0,99</b>	2,24	1,63	
Hs2	17.3.2009	0,429	<b>1,02</b>	2,27	1,44	
Hs5	16.3.2009	0,424	<b>1,01</b>	2,57	2,21	
	17.3.2008	0,427	<b>1,01</b>	2,04	1,39	
	18.3.2008	0,428	<b>1,02</b>	2,13	1,47	<b>1,01</b>
Hp11	16.3.2009	0,431	<b>1,02</b>	2,48	2,11	P
Hp21	17.3.2009	0,421	<b>1,00</b>	2,12	1,76	P
Hp22	16.3.2009	0,425	<b>1,01</b>	2,26	1,84	P
Hp23	16.3.2009	0,422	<b>1,00</b>	2,62	1,94	P
	17.3.2009	0,419	<b>1,00</b>	2,23	1,48	P
	18.3.2009	0,419	<b>0,99</b>	2,37	1,67	<b>1,00</b>
Hp31	17.3.2009	0,418	<b>0,99</b>	2,39	1,86	P
Hp32	16.3.2009	0,425	<b>1,01</b>	2,48	2,07	P
Hp33	17.3.2005	0,426	<b>1,01</b>	2,24	1,46	P
Hp34	16.3.2009	0,415	<b>0,99</b>	2,54	2	P
Hp35	16.3.2009	0,419	<b>0,99</b>	2,43	1,96	P
	17.3.2009	0,413	<b>0,98</b>	2,54	1,89	P
	18.3.2009	0,413	<b>0,98</b>	2,42	1,71	<b>0,99</b>
La1	16.3.2009	0,424	<b>1,01</b>	2,39	1,91	
	17.3.2009	0,422	<b>1,00</b>	2,23	1,71	
	18.3.2009	0,423	<b>1,00</b>	2,74	1,98	<b>1,00</b>
La2	16.3.2009	0,419	<b>1,00</b>	2,72	2,82	
La	16.3.2009	0,423	<b>1,00</b>	2,89	2,33	

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<b>Přechodné a smíšené populace</b>						
T2	31.8.2007	0,386	<b>0,97</b>	2,89	2,21	
T3	31.8.2007	0,412	<b>1,03</b>	2,41	2,07	
T4	31.8.2007	0,409	<b>1,02</b>	2,28	2,25	
T5	30.8.2007	0,406	<b>1,02</b>	2,84	2,35	
T6	31.8.2007	0,410	<b>1,03</b>	2,8	2,7	
T9	16.3.2009	0,436	<b>1,04</b>	2,64	1,38	
T11	16.3.2009	0,437	<b>1,04</b>	2,82	1,79	
T12	17.3.2009	0,436	<b>1,04</b>	2,28	1,93	
T	8.9.2008	0,423	<b>1,06</b>	2,57	2,04	
	9.9.2008	0,414	<b>1,04</b>	2,28	1,76	
	10.9.2008	0,415	<b>1,04</b>	2,31	1,63	<b>1,04</b>
U1	30.8.2007	0,412	<b>1,03</b>	2,77	2,29	
U2	30.8.2007	0,398	<b>1,00</b>	2,66	1,93	
U3	30.8.2007	0,418	<b>1,05</b>	2,19	1,63	
U4	30.8.2007	0,417	<b>1,04</b>	3,22	3,01	
U5	30.8.2007	0,406	<b>1,02</b>	2,61	1,95	
U9	17.3.2009	0,439	<b>1,04</b>	2,16	1,54	
U10	16.3.2009	0,436	<b>1,03</b>	2,83	1,88	
U13	17.3.2009	0,431	<b>1,02</b>	2,62	1,97	
U15	17.3.2009	0,438	<b>1,04</b>	2,4	1,38	
U	8.9.2008	0,411	<b>1,03</b>	2,24	2,04	
	9.9.2008	0,416	<b>1,04</b>	2,78	1,76	
	10.9.2008	0,410	<b>1,03</b>	2,33	1,5	<b>1,03</b>
Vb1	2.2.2009	0,449	<b>1,12</b>	2,47	1,94	
Vb2	2.2.2009	0,454	<b>1,14</b>	2,61	2,13	
Vb3	2.2.2009	0,450	<b>1,13</b>	2,5	2,47	
	3.2.2009	0,450	<b>1,13</b>	2,49	2,43	
	4.2.2009	0,450	<b>1,13</b>	2,76	2,31	<b>1,13</b>
Vb4	2.2.2009	0,455	<b>1,14</b>	2,78	1,96	
Vb5	2.2.2009	0,482	<b>1,20</b>	2,29	1,93	
Vz1	17.3.2009	0,453	<b>1,07</b>	2,43	1,4	
Vz3	17.3.2008	0,458	<b>1,09</b>	2,09	1,36	
	18.3.2008	0,459	<b>1,09</b>	2,13	1,57	
	4.5.2009	0,452	<b>1,07</b>	2,32	1,73	<b>1,08</b>
Vz4	17.3.2008	0,453	<b>1,08</b>	2,78	2,04	
Vz5	17.3.2009	0,455	<b>1,08</b>	2,28	1,67	

Označení jedinců	datum měření	1/index	2C (pg)	CV vzorku	CV standardu	2C průměr (pg)
<b>Přechodné a smíšené populace</b>						
Vp1	2.2.2009	0,445	<b>1,11</b>	2,57	1,64	
Vp2	2.2.2009	0,450	<b>1,12</b>	2,25	1,58	
Vp3	2.2.2009	0,448	<b>1,12</b>	2,64	2,25	
Vp4	2.2.2009	0,444	<b>1,11</b>	3	2,2	
Vp5	2.2.2009	0,453	<b>1,13</b>	2,92	1,68	
	3.2.2009	0,454	<b>1,13</b>	2,78	1,32	
	4.2.2009	0,452	<b>1,13</b>	2,26	1,6	<b>1,13</b>
Vp6	4.5.2009	0,458	<b>1,09</b>	1,99	1,36	
Vp8	17.3.2008	0,464	<b>1,10</b>	2,63	1,7	
Vp9	4.5.2009	0,463	<b>1,10</b>	1,82	1,24	
Vp10	17.3.2009	0,456	<b>1,08</b>	2,59	2,04	
Vp11	4.5.2009	0,459	<b>1,09</b>	2,14	1,64	
Vp13	17.3.2009	0,450	<b>1,07</b>	2,68	2,52	
Vp14	16.3.2009	0,454	<b>1,08</b>	2,89	2,17	
Vp15	16.3.2009	0,447	<b>1,06</b>	2,83	1,6	
Vp17	17.3.2009	0,455	<b>1,08</b>	2,53	1,51	
Vp18	16.3.2009	0,456	<b>1,08</b>	2,49	1,65	
R1	8.10.2007	0,453	<b>1,13</b>	2,81	1,83	
	15.10.2007	0,457	<b>1,14</b>	2,21	1,69	
	19.10.2007	0,556	<b>1,15</b>	2,56	2,16	<b>1,14</b>
R2	8.10.2007	0,415	<b>1,04</b>	2,97	1,94	<i>oocarpum</i>
	15.10.2007	0,423	<b>1,06</b>	2,97	2,8	
	19.10.2007	0,525	<b>1,09</b>	3,07	2,07	<b>1,06</b>
R3	8.10.2007	0,455	<b>1,14</b>	2,28	2,27	
	15.10.2007	0,455	<b>1,14</b>	2,64	2,64	
	19.10.2007	0,554	<b>1,15</b>	2,11	2,04	<b>1,14</b>
R4	8.10.2007	0,449	<b>1,12</b>	2,99	2,19	
	12.10.2007	0,455	<b>1,14</b>	2,44	2,64	
	19.10.2007	0,556	<b>1,15</b>	2,21	1,98	<b>1,14</b>
R5	8.10.2007	0,464	<b>1,16</b>	2,75	1,87	
	15.10.2007	0,469	<b>1,17</b>	2,46	2,03	
	19.10.2007	0,554	<b>1,15</b>	2,19	1,81	<b>1,16</b>
R7	16.3.2009	0,492	<b>1,17</b>	2,16	1,67	
R9	16.3.2009	0,497	<b>1,18</b>	2,15	1,93	
R11	17.3.2009	0,498	<b>1,18</b>	1,87	1,6	
R12	17.3.2009	0,457	<b>1,09</b>	2,03	1,4	<i>oocarpum</i>
R13	16.3.2009	0,496	<b>1,18</b>	2,01	1,87	
R14	17.3.2009	0,454	<b>1,08</b>	1,89	1,75	<i>oocarpum</i>
R15	16.3.2009	0,453	<b>1,08</b>	2,82	1,61	<i>oocarpum</i>
R16	16.3.2009	0,451	<b>1,07</b>	2,18	1,47	<i>oocarpum</i>
R17	16.3.2009	0,489	<b>1,16</b>	2,77	2,27	

**Příloha A3: Populační průměry 14 morfologických znaků na plodech pro 63 populací**

Populační průměry															
	v1	v2	v3	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v21	v24	v26	v27	v28
Popis	skupina	STERL	STOPKA	DEL_PL	DEL_DOL	DEL_HOR	DEL_C	OHBI	SIR_OH	SIR_DOL	ZEBRA	ZASK	DOL_OK	DEL_SIR	HOR_DOL
C	2	1	0	5,11	3,20	2,19	1,81	0	5,37	3,42	5,70	0	1,33	0,97	0,80
D	1	0	0	7,86	6,55	2,22	2,34	1	6,24	4,25	5,08	0	0,85	1,30	0,34
E	2	1	0	6,03	3,56	2,78	1,94	0	5,16	3,23	5,37	0	1,31	1,18	0,82
F	4	0	1	4,28	2,23	1,82	1,50	0	2,63	2,05	7,64	1	2,02	1,66	0,85
G	2	1	0	4,90	2,09	3,13	2,13	0	5,31	3,17	5,50	0	1,86	0,93	1,54
H	2	1	0	6,10	3,34	3,09	1,98	0	5,77	3,89	5,92	0	1,31	1,07	0,99
I	3	1	0	6,58	3,75	2,99	1,95	0	4,43	3,10	5,12	0	1,23	1,55	0,83
J	4	0	1	5,85	3,70	2,52	2,19	0	3,36	2,47	5,12	0	1,58	1,80	0,78
K	4	0	1	4,24	2,58	1,61	1,66	0	2,28	1,83	6,32	1	1,82	2,03	0,66
L	1	0	0	7,25	6,59	0,87	1,46	1	5,24	3,75	4,88	0	0,89	1,41	0,14
M	4	0	1	5,66	2,86	2,34	1,91	0	3,16	2,51	7,28	1	1,83	1,84	0,87
N	4	0	0	6,69	4,80	2,36	2,04	0	3,30	2,38	5,44	0	1,32	2,04	0,54
O	1	0	0	7,58	6,30	1,77	1,23	1	4,82	3,32	5,12	0	0,88	1,61	0,28
P	4	0	0	7,12	4,76	2,77	2,03	0	2,99	2,30	4,88	1	1,33	2,43	0,62
PI	4	0	1	5,98	3,64	2,44	2,14	0	2,77	2,18	6,64	1	1,52	2,20	0,70
Q	5	0	1	5,03	2,91	2,42	1,66	0	2,68	2,12	7,64	1	1,75	1,91	0,86
R	5	0	0	7,21	5,72	1,66	1,42	1	5,25	3,59	5,45	0	0,97	1,42	0,32
S	4	0	1	4,91	2,57	2,24	1,56	0	2,82	1,99	6,48	1	1,94	1,77	0,93
T	5	0	1	5,92	3,90	1,93	1,51	0	3,34	2,69	6,39	1	1,42	1,85	0,52
U	5	0	0	7,22	5,08	2,10	1,91	0	4,32	3,00	5,58	0	1,18	1,71	0,46
V	2	1	0	6,48	3,93	2,86	2,08	0	5,34	3,54	5,43	0	1,22	1,25	0,77
W	5	0	0	7,41	4,18	3,58	2,25	0	3,70	2,71	4,92	0	1,50	2,04	1,00
X	4	0	1	5,88	3,41	2,33	1,77	0	3,05	2,30	5,80	1	1,81	1,94	0,76
Y	4	0	1	5,27	2,96	2,12	1,59	0	2,74	2,11	6,48	1	1,81	1,95	0,78
Z	3	0	1	6,69	3,20	2,99	2,66	0	3,02	2,30	5,00	0	1,86	2,27	0,98
Za	5	0	0	7,18	5,55	1,70	1,74	0	4,28	2,96	5,16	0	0,99	1,72	0,32
La	5	0	0	6,63	4,53	2,26	2,58	0	4,36	3,10	5,04	0	1,07	1,57	0,54
Vy	1	0	0	7,26	5,63	1,86	1,55	1	5,10	3,28	4,96	0	0,92	1,44	0,34
Ds	3	1	0	6,19	2,94	2,74	1,84	0	4,30	2,97	7,20	0	1,67	1,46	1,00
Dk	5	1	0	5,40	3,02	2,33	1,74	0	3,71	2,63	5,56	0	1,32	1,49	0,82
Ko	2	1	0	4,90	2,42	2,15	1,53	0	5,45	3,76	6,05	0	1,63	0,91	0,93



<b>Ma</b>	4	0	1	6,41	3,67	2,33	1,65	0	3,31	2,54	6,32	1	1,60	1,95	0,70
<b>VI</b>	1	0	0	7,40	6,15	1,92	1,54	1	5,64	3,69	5,32	0	0,86	1,34	0,32
<b>Ha</b>	1	0	0	6,80	5,81	1,58	1,91	1	4,85	3,52	4,92	0	0,98	1,42	0,28
<b>Km</b>	1	0	0	8,14	6,54	2,10	2,10	1	6,12	4,09	4,92	0	0,93	1,36	0,41
<b>Ny</b>	2	1	0	7,09	4,84	2,02	1,70	0	5,69	3,80	5,80	0	1,05	1,28	0,44
<b>Jo</b>	4	0	0	6,96	4,23	2,55	1,93	0	4,12	2,86	4,92	0	1,12	1,72	0,63
<b>Ho</b>	2	1	0	6,00	3,69	2,24	2,11	0	5,19	3,70	5,84	0	1,19	1,26	0,61
<b>Tr</b>	3	1	0	6,04	3,60	2,53	2,05	0	3,87	2,96	5,80	0	1,30	1,58	0,76
<b>Ne</b>	3	1	0	5,58	2,90	2,65	1,82	0	4,16	2,94	6,20	0	1,40	1,36	0,94
<b>K1</b>	2	1	0	5,33	2,97	2,02	1,51	0	4,83	3,26	5,33	0	1,41	1,12	0,71
<b>K2</b>	2	1	0	5,76	3,30	2,18	1,52	0	5,78	3,86	6,40	0	1,34	1,01	0,72
<b>Do</b>	1	0	0	7,40	6,00	1,24	1,53	1	6,08	4,18	5,56	0	0,93	1,25	0,21
<b>Vo</b>	2	1	0	6,14	4,19	1,73	1,58	0	4,47	3,00	5,40	0	1,13	1,39	0,42
<b>Al</b>	4	0	1	6,80	4,14	2,52	1,74	0	3,39	2,56	5,40	1	1,26	2,03	0,63
<b>Ch</b>	1	0	0	6,20	4,71	1,48	1,20	1	5,01	3,36	5,36	0	0,98	1,35	0,34
<b>Ro</b>	5	0	0	6,21	5,21	0,95	1,13	1	5,48	3,37	5,93	0	0,86	1,16	0,19
<b>Ps</b>	3	1	0	6,55	3,94	2,48	1,55	0	3,80	2,94	6,08	0	1,22	1,76	0,67
<b>Sa</b>	5	0	0	7,45	5,41	1,94	1,16	1	6,47	4,32	6,00	0	0,90	1,22	0,37
<b>Re</b>	4	0	0	6,39	3,82	2,58	1,74	0	2,96	2,16	5,32	0	1,10	2,20	0,72
<b>Ba</b>	4	0	0	6,88	4,38	2,35	1,84	0	3,79	2,72	5,12	0	1,14	1,84	0,54
<b>Po</b>	1	0	0	7,72	6,10	1,19	1,36	1	4,98	3,44	5,28	0	1,17	1,61	0,26
<b>Br</b>	4	0	0	6,88	4,65	2,32	1,93	0	3,94	2,62	5,25	0	1,00	1,77	0,50
<b>Hs</b>	3	0	0	6,84	5,09	1,77	1,89	0	3,34	2,37	5,16	0	1,02	2,10	0,36
<b>Db</b>	5	0	0	6,61	4,68	2,10	2,06	0	2,46	1,88	5,37	0	1,13	2,77	0,48
<b>Rz</b>	2	1	0	5,79	3,37	2,08	1,59	0	5,19	3,39	6,64	0	1,25	1,17	0,67
<b>Vz</b>	5	1	0	5,39	3,37	1,83	1,64	0	5,21	3,45	6,47	0	1,14	1,05	0,57
<b>Vp</b>	5	1	0	8,01	5,83	2,18	1,94	0	4,33	3,03	5,59	0	1,11	1,89	0,40
<b>Vb</b>	1	0	0	6,79	5,81	0,89	1,59	1	5,61	3,75	5,60	0	0,84	1,22	0,16
<b>Hp1</b>	5	0	1	6,57	4,42	2,10	1,60	0	3,01	2,27	5,68	0	1,33	2,22	0,51
<b>Hp2</b>	5	0	0	6,15	3,85	2,52	1,81	0	3,54	2,56	5,48	0	1,38	1,78	0,72
<b>Hp3</b>	5	0	0	6,24	3,22	3,07	2,20	0	4,05	2,86	5,36	0	1,33	1,56	1,00
<b>St</b>	5	0	0	7,00	5,11	1,93	1,93	0	3,64	2,82	5,60	0	0,98	1,97	0,39







