

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Jan Rydlo

**Ekologické důsledky polyploidizace u mokřadní rostliny šmelu
okoličnatého (*Butomus umbellatus*)**

Ecological consequences of polyploidization in populations of the wetland plant
Butomus umbellatus

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Tomáš Fér, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Martin Čertner, Mgr. Pavel Kúr

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 15. 8. 2016

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem lidem, kteří mi pomáhali během mého studia a umožnili mi tím zdárný průběh a dokončení této práce. Nejprve bych chtěl poděkovat svému školiteli Tomášovi Férovi, za poskytnutí velice zajímavého tématu ke studiu a za pomoc v terénu, dále bych chtěl poděkovat konzultantovi Martinovi Čertnerovi rovněž za pomoc v terénu, pomoc s cytometrickými analýzami a se statistickým vyhodnocováním vegetačních a morfometrických dat. Také bych rád poděkoval druhému konzultantovi Pavlovi Kúrovi za vydatnou pomoc při práci v DNA laboratoři a pomoc při zpracování a vyhodnocování molekulárních dat.

Velké díky patří také Zdence Hroudové, za četné rady a připomínky a za pomoc v terénu a pomoc s kultivacemi rostlin.

Další obrovský dík patří Matějovi Dudášovi z východního Slovenska, za vydatnou pomoc v terénu podpořenou vynikající znalostí tamního regionu.

V neposlední řadě bych rád poděkoval řidiči kamionu firmy *Siko koupelny* za převezení rostlin na kultivaci z východního Slovenska do Čech.

Nakonec bych chtěl poděkovat všem, kteří mě během studia podporovali a různě mi pomáhali, především své přítelkyni Šárce Mikátové a ostatním spolužákům a spolužačkám z fakulty.

Obsah

Abstrakt	3
<i>Klíčová slova</i>	3
Abstract	4
<i>Keywords</i>	4
1 Úvod	5
2 Polyploidizace	7
2.1 <i>Polyploidizace a mokřadní biotopy</i>	8
3 Šmel okoličnatý (<i>Butomus umbellatus</i>)	10
3.1 <i>Šmel okoličnatý ve střední Evropě</i>	10
3.2 <i>Invaznost šmelu v Severní Americe</i>	12
3.3 <i>Možnosti studia genetické diverzity</i>	12
4 Metodika	14
4.1 <i>Sběr vzorků a cytometrické analýzy</i>	14
4.1.1 Distribuce cytotypů a cytotypová struktura populací.....	14
4.1.2 Trvalé plochy.....	15
4.1.3 Průtoková cytometrie	15
4.1.4 Sběr vzorků pro vývoj mikrosatelitových primerů	17
4.2 <i>Srovnání stanovištních preferencí diploidů a triploidů</i>	17
4.2.1 Statistické zpracování vegetačních dat.....	17
4.3 <i>Morfometrika</i>	19
4.3.1 Zaznamenávání znaků a odběr rostlin v terénu	19
4.3.2 Srovnávací kultivace	20
4.3.3 Statistické zpracování morfologických dat	20
4.4 <i>Výsev semen a průtoková cytometrie semenáčků</i>	22
4.5 <i>Vývoj mikrosatelitových primerů</i>	22
4.5.1 Izolace dna.....	22
4.5.2 Vývoj mikrosatelitových primerů	23
4.5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
4.5.4 Fragmentační analýza a sekvenování mikrosatelitových lokusů	23

4.5.5	Genetická variabilita rostlin použitých pro vývoj makrerů.....	24
5	Výsledky	25
5.1	<i>Distribuce cytotypů v oblasti Východoslovenské nížiny</i>	25
5.1.1	Cytotypová struktura smíšených populací	30
5.2	<i>Stanovištní preference cytotypů</i>	35
5.3	<i>Morfometrika</i>	38
5.3.1	Vyhodnocení znaků rostlin z přirozeného prostředí	38
5.3.2	Vyhodnocení znaků rostlin z kultivace	40
5.3.3	Srovnání znaků rostlin v přírodě a v kultivaci	44
5.4	<i>Cytotypová variabilita semenáčků</i>	48
5.5	<i>Variabilní mikrosatelitové lokusy</i>	50
5.5.1	Genetická variabilita 14 rostlin šmelu okoličnatého	51
6	Diskuse	52
6.1	<i>Distribuce cytotypů a cytotypová struktura populací</i>	52
6.2	<i>Stanovištní preference cytotypů</i>	54
6.3	<i>Morfologické rozdíly mezi cytotypy a možnosti šíření</i>	55
6.4	<i>Možnosti vzniku triploidů de novo</i>	59
7	Závěr.....	60
8	Literatura.....	61
9	Přílohy	69
9.1	<i>Přehled lokalit</i>	69
9.2	<i>Protokoly</i>	72
9.2.1	Sorbitolová extrakce DNA	72
9.2.2	Tvorba knihovny pro sekvenování	74
9.2.3	Příprava vzorků pro sekvenování amplifikovaných lokusů	75
9.3	<i>Primární data</i>	76

Abstrakt

Cílem této práce bylo srovnat environmentální požadavky, morfologické a biologické vlastnosti diploidního a triploidního cytotypu mokřadní rostliny šmelu okoličnatého (*Butomus umbellatus*) v oblasti Východoslovenské nížiny, kde tento druh tvoří unikátní cytotypově smíšené populace, a vyvinout primery pro variabilní mikrosatelitové lokusy vhodné k dalším populačně genetickým studiím. Celkem bylo objeveno 72 populací šmelu okoličnatého. Pomocí analýzy relativní velikosti genomu (průtoková cytometrie, FCM) bylo odhaleno 34 populací tvořených pouze triploidním cytotypem, 8 bylo tvořeno pouze diploidním cytotypem a 30 populací bylo smíšených. Ve smíšených populacích jsou počty jedinců obou cytotypů často velmi vyrovnané a tvoří prorůstající se kompaktní porosty.

Na základě analýz environmentálních charakteristik lokalit cytotypů (PCA, RDA, ANOVA) nebyl prokázán rozdíl mezi stanovištními nároky diploidních a triploidních rostlin. Na základě morfometrických analýz (PCA, CDA) souboru znaků 36 diploidních a 54 triploidních rostlin byl ověřen rozdíl v morfologii obou cytotypů v přírodě. Po následném přesazení rostlin do kultivace a přeměření znaků se tento rozdíl ještě prohloubil. Nejspolehlivějším znakem, který odlišuje diploidní a triploidní rostliny je poměr šířky a délky vnitřního okvětního lístku, který se zpravidla pohybuje v rozmezí hodnot 0,5–0,7 u diploidních rostlin a 0,7–1,1 u triploidních rostlin. Přesto existují diploidní i triploidní rostliny se znaky odpovídajícími spíše opačné ploidii. Naopak nebyly pozorovány rozdíly mezi cytotypy ve znacích předurčujících úspěšnost vegetativního rozmnožování. Oba cytotypy tvoří přibližně stejně oddenkových pacibulek a téměř nikdy netvoří pacibulky v květenství. Analýzou ploidní úrovně semenáčků vyrostlých ze semen triploidní rostliny byl potvrzen značný podíl aneuploidů v potomstvu, ve kterém se vyskytovaly i semenáčky pravděpodobně čistě diploidní i čistě triploidní. Vzrostlí aneuploidní jedinci však nebyli v přírodě objeveni.

Pro umožnění populačně genetických studií bylo vyvinuto 14 specifických párů primerů pro variabilní jaderné mikrosatelitové lokusy. Mikrosatelitové primery jsou v této práci publikovány.

Klíčová slova

Butomus umbellatus, polyploidizace, mokřadní biotop, mikrosatelity, morfometrika, Východoslovenská nížina

Abstract

This thesis aimed on comparison of environmental requirements and morphological and biological traits of diploid and triploid cytotypes of wetland plant flowering rush (*Butomus umbellatus*), occurring in Eastern Slovak Lowland in unique mixed populations, and to develop primers for variable microsatellite loci suitable for further genetic studies. In total, 72 populations of *Butomus umbellatus* were found. The analysis of relative genome size by the flow cytometry (FCM) technique revealed 34 exclusively triploid cytotype populations, 8 exclusively diploid populations and 30 mixed populations of *Butomus umbellatus*. In mixed populations, the numbers of diploid and triploid individuals are quite equivalent and the plants create combined compact communities.

Analyses of environmental characteristics of sites with specific cytotypes (PCA, RDA, ANOVA) revealed no difference in site requirements of diploid and triploid *Butomus umbellatus* plants. Morphometric analyses (PCA, CDA) of traits of 36 diploid and 54 triploid plants confirmed differing morphology of both cytotypes occurring in the nature. Subsequent replanting of these plants into pots and cultivation further increased these differences. The ratio of width and length of internal perianthium is the most reliable parameter to distinguish diploid and triploid plants (0.5–0.7 and 0.7–1.1, respectively). Still, there are some individuals in either ploidy group that morphologically match rather the characteristics of the opposite cytotype. On the other hand, no differences in traits related to vegetative reproduction were found: both cytotypes create approximately the same number of rhizome buds and almost never form bulbils in inflorescences. The analysis of ploidy level of seedlings grown up from triploid plant's seeds confirmed high number of aneuploids among the descendants, alongside purely diploid or triploid seedlings. However, full-grown aneuploid individuals were not recorded in the nature.

To facilitate population-genetics analyses, 14 specific primer-pairs for variable nuclear microsatellite loci were developed. The microsatellite primers are published in this thesis.

Keywords

Butomus umbellatus, polyploidization, wetland biotope, microsatellites, morphometrics, Eastern Slovak Lowland

1 Úvod

Pro studium ekologie, morfologie, evoluce a dalších unikátních vlastností polyploidů a jejich diploidních předků, jsou nejvhodnější oblasti, kde se vyskytují oba dva cytotypy pospolu a ideálně tvoří smíšené populace. V této diplomové práci jsem se zaměřil na mokřadní rostlinu šmel okoličnatý (*Butomus umbellatus* L.), který se v Evropě vyskytuje v diploidním a triploidním cytotypu. Vzhledem k tomu, že v České republice se nikde smíšené populace obou cytotypů nevyskytují, rozhodl jsem se je hledat v oblasti s velkým zastoupením vhodných mokřadních biotopů a hojným výskytem populací této rostliny. Jako ideální se jevila oblast Východoslovenské nížiny v nivě řek Latorica, Ondava, Bodrog (vzniká soutokem Latorice a Ondavy) a Laborec, kde jsem již dříve pozoroval rozsáhlé populace šmelu, které by mohly být tvořeny oběma cytotypy. Tento region představuje jednu z posledních oblastí ve střední Evropě, kde extenzivní hospodaření člověka umožnilo kombinaci pestré škály přirozených, polopřirozených i umělých mokřadních biotopů udržujících si do značné míry svojí dynamiku (např. značné kolísání hladiny v průběhu roku).

Studium smíšených populací nabízí unikátní možnost nezkrusleného srovnání biologických vlastností obou cytotypů v přirozených podmínkách a podchycení značné morfologické i genotypové variability vznikající během možných reprodukčních interakcí mezi diploidními a triploidními rostlinami v rámci jednotlivých populací i na úrovni celého regionu.

Cílem této diplomové práce bylo detailně prozkoumat oblast Východoslovenské nížiny, odhalit rozšíření obou cytotypů a zjistit četnost populací smíšených. Poté srovnat vliv lokálního prostředí a ploidie na biologické vlastnosti obou cytotypů. Dále vyvinout primery pro variabilní jaderné mikrosatelitové lokusy, které by umožnily v budoucnu objasnit genetickou variabilitu a evoluční historii obou cytotypů šmelu okoličnatého kdekoli v jeho areálu rozšíření. *Butomus umbellatus* je rychle se šířící invazní rostlinou mokřadních biotopů Severní Ameriky. Poznatky o jeho biologii v přirozeném areálu výskytu, spolu s vyvinutím specifických sekvencí mikrosatelitových primerů mohou být následně využity k efektivnější kontrole jeho invaze.

Cílem diplomové práce bylo zodpovědět tyto otázky:**1. Jaký je charakter rozšíření cytotypů ve studované oblasti?**

- A) Vyskytují se triploidní populace častěji než diploidní?
- B) Jsou populace těchto cytotypů v zájmovém území rozmístěné náhodně?
- C) Jak běžné jsou populace obsahující oba dva cytotypy?

2. Vedla zde polyploidizace ke změně stanovištních preferencí?

- A) Rostou diploidi ve společenstvech tvořených jinými druhy, upřednostňují jiné hodnoty abiotických parametrů než triploidi (tj. liší se cytotypy vymezením své niky)?
- B) Osidlují triploidi širší spektrum různých biotopů (tj. liší se cytotypy v šíři své niky)?

3. Jaké je prostorové rozmístění di- a triploidních jedinců ve smíšených populacích?

- A) Je rozmístění jedinců stejné ploidie spíše náhodné nebo pravidelné? Liší se mezi jednotlivými plochami?

4. Liší se di- a triploidní jedinci velikostí či tvarem svých orgánů?

- A) Jsou triploidní rostliny mohutnější než jejich diploidní předci?
- B) Dají se cytotypy ve smíšených populacích od sebe morfologicky odlišit?
- C) Do jaké míry se na rozdílech mezi cytotypy mohou podílet drobné mikrostanovištní odlišnosti?

5. Jaké jsou parametry generativního a vegetativního rozmnožování rostlin?

- A) Který z cytotypů se dokáže efektivněji rozmnožovat?
- B) Stojí za častějším výskytem triploidního cytotypu schopnost intenzivnějšího vegetativního šíření?
- C) Může docházet k opakovanému vzniku nových triploidů z diploidních rostlin?

Fotografie použité v této práci jsou vlastní, pokud není uvedeno jinak.

2 Polyploidizace

Polyploidie, vlastnictví tří a více kompletních sad chromozomů, hraje stěžejní úlohu v evoluci rostlin (Husband et al. 2013). Podle molekulárně genetických analýz prošly v minulosti prakticky všechny krytosemenné rostliny alespoň jednou polyploidizační událostí, a to včetně druhů s malým genomem a nízkým počtem chromozómů, jako je např. modelový druh *Arabidopsis thaliana* (Soltis et al. 2009, Fawcett et al. 2013). Polyploidizace je považována za nejčastější způsob, jakým mohou u rostlin vznikat nové druhy v sympatrii s mateřskými liniemi, podílela se odhadem na 15 % všech speciálních událostí u krytosemenných (Wood 2009). Celá řada užitkových rostlin jsou polyploidi (např. pšenice, kukuřice, bavlník, brambor, tabák, jahodník), a mnoho diploidních plodin disponuje příbuznými polyploidními druhy využívanými ve šlechtitelství (Udall et Wendel 2006).

Zdvojení genomu je nezdědka doprovázeno změnami na mnoha úrovních: od biochemických syntéz (např. nové obsahové látky, zvýšená produkce sekundárních metabolitů), přes fyziologické pochody (např. účinnost fotosyntetické aktivity, hospodaření s vodou) a ontogenetické procesy (např. rychlost růstu) až k změnám tělní stavby rostlin (např. velikost buněk a rostlinných orgánů; Levin 2002, Ramsey et Schemske 2002, Weiss-Schneeweiss et al. 2013). Řada z těchto změn má adaptivní význam a zvyšuje tak evoluční potenciál polyploidních linií. Změny spuštěné duplikací genomu mohou následně umožnit polyploidním liniím osídlení nových, druhem doposud nekolonizovaných typů stanovišť (Lumaret 1987, Husband et Schemske 1998, Hülber et al. 2009, Sonnleitner et al. 2010, Manzaneda et al. 2012). Polyploidní rostliny mohou mít zvýšenou toleranci k množství živin v substrátu (Levin 2002, Šmarda et al. 2013), k vlhkosti stanoviště (Maherali et al. 2009, Treier et al. 2009, Hao et al. 2013) nebo k teplotním výkyvům (Liu et al. 2011), která se často odráží i ve větší ekologické amplitudě polyploidů ve srovnání s příbuznými diploidními druhy (Parisod et al. 2010). Důsledkem morfologických i fyziologických změn spjatých s polyploidizací je nezdědka i vyšší konkurenceschopnost polyploidů (Maceira et al. 1993, Collins et al. 2011, Hahn et al. 2012).

Fenotypové odlišnosti v kombinaci s novým, doposud neosídleným prostředím, mohou preadaptovat některé druhy či genotypy, aby se staly invazními (van Kleunen et al. 2010). Polyploidizace byla v mnoha případech označena za proces potenciálně předurčující rostlinné invaze (te Beest et al. 2011, Pandit et al. 2011). Hahn et al. (2012) například poukázali na vyšší produkci semen a úspěšnější přežívání semenáčků u tetraploidních rostlin ze severoamerických invazních populací druhu *Centaurea stoebe*. Vyšší tolerance tetraploidního

cytotypu chrpy *Centaurea maculosa* k suchu a iteroparie (produkce semen více než $1\times$ za život) jsou pravděpodobnými příčinami rychlé invaze tetraploidů v Severní Americe, přestože sem byly zřejmě zavlečeny rostliny obou cytotypů (Treier et al. 2009).

Polyploidizace je proces, ke kterému v přírodě dochází opakovaně, a to někdy i v rámci stejných rostlinných linií (Soltis et Soltis 1999, Tayalé et Parisod 2013). V některých případech tak mohou vznikat polyploidi s ustálenými vlastnostmi. Kupříkladu u druhu *Achillea borealis* rostou hexaploidi na pobřežních dunách, zatímco tetraploidi osidlují mezofilní trávníky. Již první generace hexaploidů nově vzniklých z tetraploidních rodičů v trávnících však byly preadaptovány k úspěšnějšímu přežívání na dunách (Ramsey 2011). Častěji však polyploidi vznikají nezávisle z diploidních rodičů s různým genetickým pozadím, genetická konstituce jednotlivých polyploidních linií se pak do různé míry liší, což se může projevit i na jejich biologických vlastnostech (Segraves et al. 1999, Kao 2008, Soltis et Soltis 2009).

Duplikace genomu bývá často spojena s výkyvy podmínek prostředí, které mohou zvyšovat pravděpodobnost vzniku nových polyploidních linií tím, že podněcují chyby v meiotickém dělení gamet (Parisod et al. 2010, Tayalé et Parisod 2013). Mokřadní biotopy, které se nachází na rozhraní suchozemského a vodního prostředí, jsou příkladem stanoviště s oscilujícími podmínkami, na kterém by k polyploidizaci mohlo docházet podstatně častěji.

2.1 Polyploidizace a mokřadní biotopy

Mokřadní biotopy jsou specifické mnoha svými vlastnostmi. Jednou z vlastností zásadních pro rostliny je jejich relativní ostůvkovitost v krajině (Soomers et al. 2013). Rostliny musí být přizpůsobeny k překonávání někdy i značných vzdáleností mezi nejbližším dalším vhodným stanovištěm. Další pro rostliny zásadní vlastností mokřadních biotopů je jejich značná dynamika během roku. Mokřady jsou typické výrazným kolísáním výšky vodního sloupce během krátké doby, což může být pro rostliny limitující (Sosnová et al. 2010, 2011). Druhy rostlin obývajících tyto biotopy proto mají mnoho různých specifických přizpůsobení, která jim umožňují i za těchto podmínek prosperovat.

Jednou z nejzásadnějších adaptací mokřadních rostlin je schopnost přizpůsobit svoje dispersní mechanismy specifickým vlastnostem mokřadních biotopů. Hlavním přizpůsobením vodních a mokřadních rostlin je značná schopnost klonálního šíření a jeho kombinování s šířením generativním podle aktuálních podmínek prostředí (Polux et al. 2007). Mokřadní rostliny mohou být často vystaveny nepříznivým podmínkám (např. dlouhé období sucha), kdy nejsou schopny tvořit semena, a tak je vegetativní šíření jejich jedinou možností k

rozmnožování i za nepříznivých podmínek (Klekowski 2003, Loxdale et Lushai 2003). Poměr vegetativního a generativního rozmnožování do značné míry ovlivňují aktuální podmínky prostředí a může se měnit (Polux et al. 2007, Triest et al. 2010). Vodní a mokřadní rostliny vegetativní diaspory využívají hlavně k šíření na již obsazené lokalitě (tomu odpovídá nízká genetická diverzita uvnitř populace, Santamaría 2002) a šíření semeny využívají k osidlování nových lokalit na velké vzdálenosti (Santamaría 2002, Clausen et al. 2002), čemuž odpovídá vysoká genetická diverzita mezi různými populacemi. To je typické hlavně pro invazní druhy vodních a mokřadních rostlin, které mají značnou schopnost klonálního růstu (Wang et al. 2005, Li et al. 2006, Okada et al. 2009).

3 Šmel okoličnatý (*Butomus umbellatus*)



Obr. 1: Květenství šmelu okoličnatého (*Butomus umbellatus*) je nejnápadnějším útvarem na celé rostlině.

3.1 Šmel okoličnatý ve střední Evropě

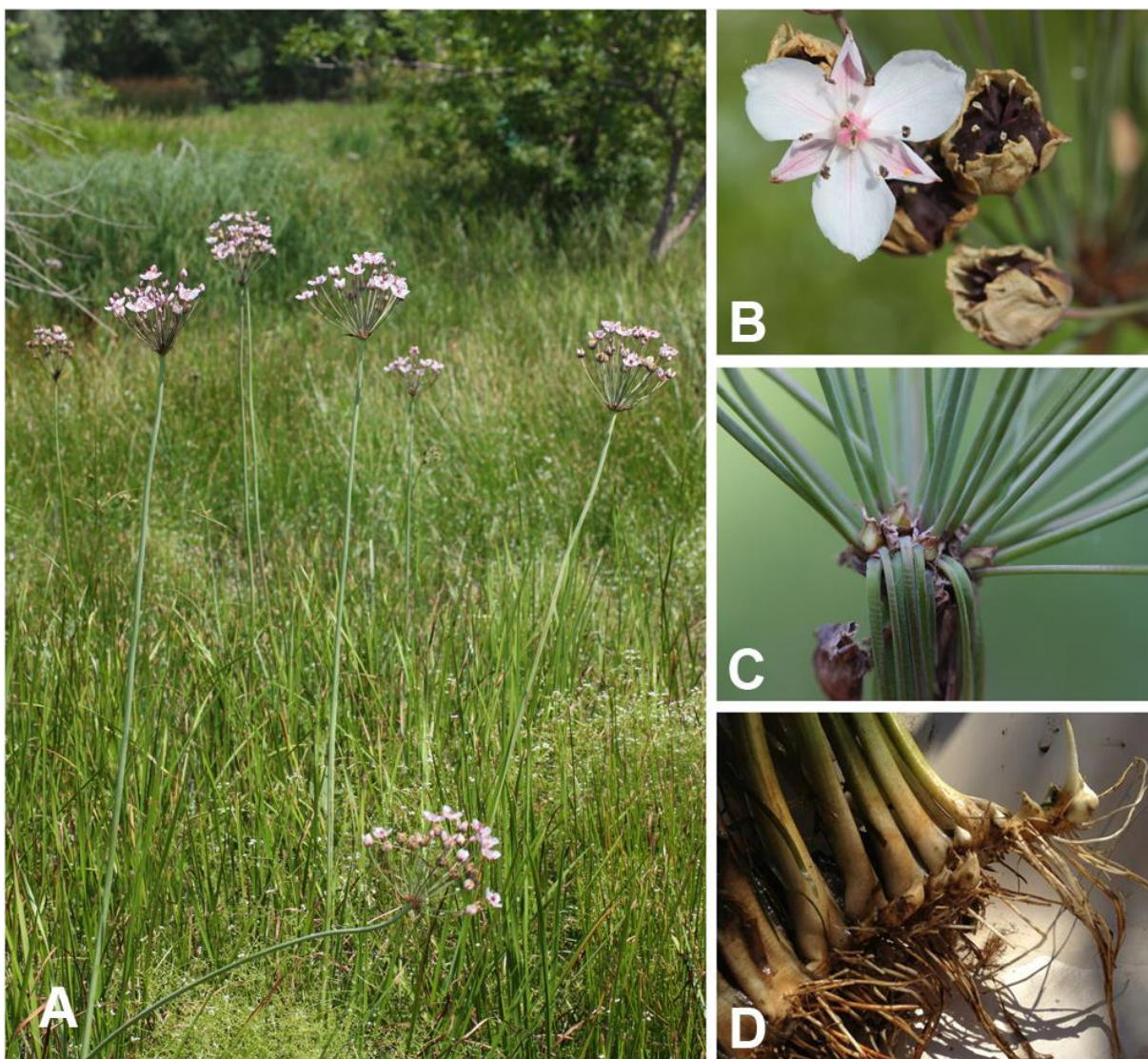
Příkladem mokřadní rostliny, u které za odlišným zastoupením a kombinacemi řady dispersních mechanismů stojí kromě jiného také polyploidizace, je relativně běžný druh *Butomus umellatus* (obr. 1 a 2).

Šmel okoličnatý (*Butomus umbellatus* L.), jediný zástupce monotypické čeledi *Butomaceae* Mirbel, je druhem široce rozšířeným v mokřadních biotopech temperátní Eurasie (Heywood 1980). Dle popisu v Květeně České republiky (Slavík et Hroudová 2010) se jedná se o vytrvalou jednoděložnou rostlinu vysokou až 150 cm s vodorovným plazivým oddenkem. Listy vyrůstají z oddenku střídavě ve dvou řadách, jsou čárkovité 3hranné až zploštělé. Stvol je zakončen zdánlivým okolíkem (obr. 1) složeným ze 3 šroubelů. Květy jsou oboupohlavné, pravidelné se 6 okvětními lístky ve dvou kruzích. Tyčinek je devět (6 ve vnějším kruhu, 3 ve vnitřním). Gyneceum je apokarpní složené ze 6 plodolistů. Plodem je měchýřek. V rámci druhu jsou rozlišovány dva cytotypy: diploidní ($2n = 2x = 26$) a triploidní ($2n = 3x = 39$). Ve střední Evropě převládají populace triploidního cytotypu, diploidi jsou podstatně vzácnější a cytotypově smíšené populace nebyly známy (Hroudová et Zákravský 1993b). Srovnáním populací diploidního a triploidního cytotypu z různých částí střední Evropy byly odhaleny

3 Šmel okoličnatý (*Butomus umbellatus*)

odlišnosti ve stanovištních preferencích cytotypů. Triploidi lépe snášeli eutrofizaci stanovišť a měli širší ekologickou amplitudu (Hroudová et Zákřavský 1993b, Hroudová et al. 1996).

U druhu *Butomus umbellatus* je proces polyploidizace dle literatury (Hroudová et Zákřavský 1993a, Hroudová et Zákřavský 1993b, Eckert et al. 2000, Kirschner et al. 2004, Eckert et al. 2003, Brown et Eckert 2005, Bailey et Preston 2011) zjevně spjat i se změnami disperzních strategií. Druh ke svému šíření využívá kombinace vegetativních (pacibulky v květenství, oddenkové pacibulky, fragmenty oddenku) a generativních diaspor (semena), jejichž poměrné zastoupení a kvantita se liší mezi oběma cytotypy (Hroudová et Zákřavský 1993a, Hroudová et al. 1996, Brown et Eckert 2005). Triploidní jedinci jsou schopni tvořit pacibulky v květenství a investují více do oddenkových pacibulek, naproti tomu diploidi jsou charakterističtí především ohromnou produkcí semen. U triploidů byl vývin semen zaznamenán jen vzácně v experimentálních podmínkách během kontrolovaných opylení (Krahulcová et Jarolímová 1993). K produkci semen triploidních rostlin vedlo opylení pylem diploidů nebo nepříbuzných triploidních jedinců (kvůli autoinkompatibilitě). Vegetativní rozmnožování je u šmelu patrně mnohem významnější než generativní reprodukce (Kirschner et al. 2004).



Obr. 2: Šmel okoličnatý (*Butomus umbellatus*). A – celkový habitus rostliny, B – detail květu, C – vegetativní pacibulky v květenství, D – oddenek (Foto M. Čertner).

3.2 Invaznost šmelu v Severní Americe

Druh byl koncem 19. století zavlečen do Severní Ameriky, kde se posléze rychle rozšířil a v současnosti je považovaný za invazní (Brown et Eckert 2005, Marko et al. 2015). Zajímavé však je, že v invazních amerických populacích dominují diploidní rostliny (Eckert et al. 2003), které kromě semen produkují hojně i pacibulky v květenství a oddenkové pupeny (Lui et al. 2005, Bailey et Preston 2011), intenzitou produkce vegetativních diaspor by byly srovnatelné spíše s evropskými triploidy.

3.3 Možnosti studia genetické diverzity

Možnosti studia genetické diverzity u druhu *Butomus umbellatus* byly doposud značně omezené. Molekulární markery byly využity zatím pouze ve třech studiích (Fernando et Cass 1996, Eckert et al. 2003, Kirschner et al. 2004). Ve všech studiích to byly pouze Allozymy a

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). Mnohem vhodnější pro analýzy na populační úrovni jednoho druhu a na malé regionální škále jsou mikrosatelity (Mandák 2011).

Mikrosatelity jsou repetitivní sekvence DNA, které jsou tvořeny opakováním většinou mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidů (vzácně i penta- nebo hexanukleotidů). Většinou se označují jako repetice jednoduchých sekvencí (simple sequence repeats, SSRs). Délka lokusu činí obvykle 5 až 40 opakování mikrosatelitového motivu. Alela je definována počtem opakování konkrétního motivu. Délku alely zjistíme amplifikací daného lokusu během PCR pomocí dvojice primerů, jejichž sekvence jsou kompatibilní se sekvencemi z obou stran mikrosatelitového lokusu a následnou kapilární elektroforézou v automatickém sekvenátoru (Weising et al. 2005).

Mikrosatelity jsou velmi početné a pravidelně rozmístěné v celém genomu, převážně v nekódujících oblastech. Jsou vysoce polymorfni díky své vysoké mutační rychlosti (10^{-3} až 10^{-6} mutací na lokus za 1 generaci) což generuje velké množství alel, které se liší délkou v závislosti na počtu opakování dané repetice (Schlötterer 2000, 2004). Mikrosatelity jsou kodominantní markery, díky čemuž můžeme rozlišit heterozygoty od homozygotů. Mikrosatelity jsou také vysoce druhově specifické (Selkoe et Toonen 2006; Mandák 2011). To poskytuje značnou výhodu v omezení možnosti amplifikace jiného organismu při kontaminaci studované DNA (Selkoe et Toonen 2006; Mandák 2011). Naopak je značně nevýhodné, že je třeba pro téměř každý studovaný druh vyvinout specifický pár primerů pro jednotlivé mikrosatelitové lokusy, abychom je mohli amplifikovat při PCR, což je velmi finančně i časově náročné (Zane et al. 2002).

Mikrosatelity lze využít například k analýze rodičovství a k identifikaci klonů v populaci (Queller et al. 1993; Ellegren 2004). Pomocí mikrosatelitové analýzy můžeme s vysokou pravděpodobností určit rodiče daného jedince a poměr klonálního a generativního šíření v populacích rostlin. U mokřadních a vodních rostlin mikrosatelity ke studiu genetické a klonální diverzity úspěšně využili např. Zeisek (2011), Fuxová (2012) nebo Mašterová (2013).

Pro šmel okoličnatý byly v nedávné době publikovány mitochondriální mikrosatelitové primery (Cuenca et al. 2013), které však nemají příliš velkou využitelnost bez kombinace jadernými markery (z důvodu uniparentální dědičnosti a možné nízké variability). Proto jsem se rozhodl vyvinout jaderné mikrosatelitové primery, které umožní detailní studium genetické variability šmela okoličnatého v populacích a pomohou objasnit vtahy mezi jedinci v populaci, genový tok mezi ploidiemi, umožní genotypování jedinců a objasní vazby biologických znaků na konkrétní genotypy.

4 Metodika

4.1 *Sběr vzorků a cytometrické analýzy*

Prvním cílem bylo co nejdůkladnější prosbírání oblasti Východoslovenské nížiny o rozloze přibližně 500 km². Oblast jsem se snažil systematicky projet a navštívit většinu potenciálních lokalit, kde by se šmel mohl vyskytovat. Pokud byla populace pouze sterilní, bylo její objevení velmi problematické, protože nevýrazné čárkovité listy šmelu zanikaly v porostu ostatních mokřadních rostlin. Objevení sterilních jedinců v zapojeném porostu bylo proto velmi náhodné. Zvláště v letech 2014 a 2015, během značného sucha v této oblasti, byla většina populací (i ty, které v roce 2013 kvetly) sterilních nebo pouze v oddencích, což výrazně ztěžovalo jejich nalezení. U každé nalezené populace jsem zaznamenal pozici pomocí GPS (souřadnicový systém WGS 84) a zaznamenal jsem její charakter (tůň, odvodňovací kanál, vlhká deprese, mokré pole). Za dvě různé populace jsem považoval ty populace, které od sebe byly alespoň 150 m vzdáleny a nebyly propojeny souvislými porosty šmelu (např. v odvodňovacích kanálech). Pokud však byly populace od sebe odděleny nějakou překážkou (např. protipovodňová hráz), považoval jsem je za dvě různé, i když byly od sebe vzdáleny méně než 150 m. Dále jsem zaznamenal všechny druhy cévnatých rostlin, které se na lokalitě také vyskytovaly.

Oblast východoslovenské nížiny jsem za účelem sběru vzorků navštívil celkem 6 krát v letech 2013, 2014 a 2015. V první sezóně v roce 2013 jsem sbíral rostliny hlavně pro ověření výskytu populací obou cytotypů a nalezení smíšených populací. V dalších dvou letech jsem se věnoval hledání všech dalších potenciálních populací a detailnějšímu sběru rostlin ve smíšených populacích a také jsem odebral rostliny do srovnávacích kultivací pěstovaných v experimentální zahradě Botanického ústavu Akademie věd ČR.

4.1.1 **Distribuce cytotypů a cytotypová struktura populací**

V každé nalezené populaci jsem se snažil nasbírat reprezentativní vzorek jedinců na průtokovou cytometrii. Pro účely průtokové cytometrie jsem sbíral část listu, kterou jsem uložil do igelitového sáčku s trochou vody. Listy pro cytometrické analýzy musely zůstat živé. U malých populací jsem odebral listy od všech jedinců (za jedince jsem považoval jeden trs, kde všechny listy evidentně vyrůstaly z jednoho větveného oddenku). U rozsáhlých populací jsem se snažil odebrat listy z 30–40 jedinců, pravidelně rozmístěných v populaci. Celkem jsem nasbíral a zanalyzoval průtokovou cytometrií přes 1200 jedinců.

4.1.2 Trvalé plochy

Pro detailnější zjištění cytotypové struktury rozsáhlých smíšených populací jsem se rozhodl vytvořit 3 trvalé plochy a v nich v pravidelných rozestupech odebírat jedince na cytometrickou analýzu. Dvě plochy se nacházejí na lokalitě č. 37 (sloupec **GPS-kód** v tab. 7 v přílohách, kapitola 9.1) u obce Ladmovce. Jedná se o vlhkou depresi v záplavové zóně řeky Bodrog. Plocha 1 je situovaná do sušší části této deprese, plocha 2 do vlhčí části. Třetí trvalá plocha se nachází v odvodňovacím kanále na lokalitě č. 51 (sloupec **GPS-kód** v tab. 7 v přílohách, kapitola 9.1) u obce Velké Raškovce. Všechny trvalé plochy jsou v rozích označeny kovovým hřebem s platovým víčkem a jsou tedy detekovatelné i v budoucnu.

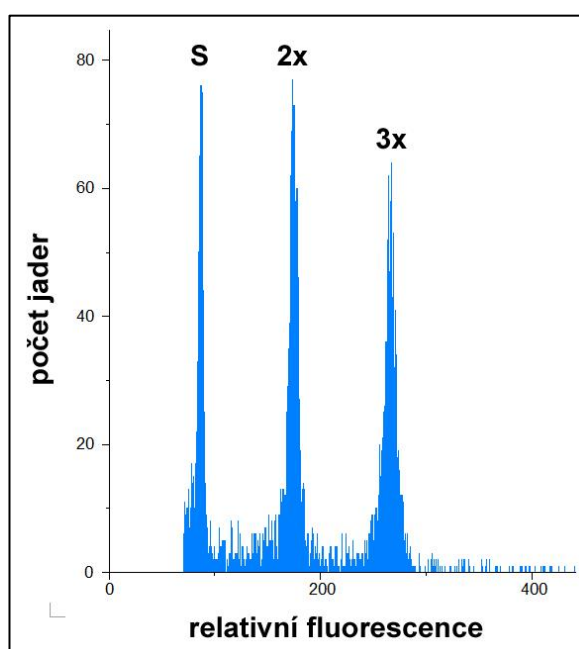
Plocha č. 1 má rozměry 17×10,5 m a rostliny zde byly odebírány v půlmetrových intervalech. Plocha č. 2 má rozměry 10×10 m a rostliny byly odebírány v metrových intervalech. Plocha č. 3 je dlouhá 30 m a široká 5,2 m a rostliny zde byly odebírány v metrových intervalech v délce (na ose y) a na ose x (napříč vodním tokem) byly odebrány a analyzovány všechny rostliny (samostatné trsy).

U všech tří ploch jsem poté testoval v programu R ver. 3.3.1 pomocí Mantelova testu prostorové rozmístění diploidních a triploidních rostlin.

4.1.3 Průtoková cytometrie

K určení ploidní úrovně rostlin šmelu okolíčnatého jsem využil průtokovou cytometrii (flow cytometry, FCM). Tato metoda umožňuje rychle zpracovávat velké množství vzorků a ke spolehlivému zjištění obsahu DNA stačí jen malá část rostlinného orgánu (v mém případě listu) a můžeme ji použít i na již diferencovaná pletiva (Suda et al. 2007). Vzorky jsem připravoval a analyzoval z části v laboratoři průtokové cytometrie Botanického ústavu Akademie věd v Průhonicích a z části v laboratoři průtokové cytometrie Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze na přístrojích Partec PA-II (Partec GmbH, Münster, Německo) vybaveným UV rtuťovou výbojkou. Přípravu vzorků jsem prováděl metodou, kterou vynalezl Otto (1990) a pro rostlinná pletiva upravil Doležel et al. (2007). Do plastové Petriho misky jsem napipetoval 550 ml extrakčního pufru Otto I (0,1 M monohydrát kyseliny citronové, 2,5 μ l 0,5% detergentu Tween 20). D misky jsem poté přidal část listu šmelu (asi 4×4 mm) a stejně velkou část listu standardu. V mém případě se jednalo o sedmikrásku (*Bellis perennis*, $2C = 3,96$ pg DNA, Schönswetter et al. 2007). Pletiva jsem důkladně nasekal žiletkou a vzniklou suspenzi jsem přefiltroval do plastové zkumavky přes ústrižek nylonové sítě (průměr ok 42 μ m) Poté jsem přidal 1 ml barvicího roztoku obsahujícího pufr Otto II (0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), barvivo DAPI (4',6-diamidino-2-

fenylinol; 4 μg) a antioxidant β - merkaptoethanol (2 μl). Analyzoval jsem vždy 3000 jader, pokud jich byl dostatek. Pro účely odhalení smíšených populací jsem mohl analyzovat až 8 vzorků současně, protože vysoká citlivost metody umožňovala odhalení i jednoho jedince s odlišnou ploidií ve smíšeném vzorku z 8 jedinců. Pro detekci ploidií jedinců v trvalých plochách a pro molekulární analýzy, jsem vždy dával pouze jednoho jedince na vzorek, abych každému jedinci mohl přesně stanovit jeho ploidní úroveň. Výstupem průtokové cytometrie je histogram zobrazující relativní fluorescenci jader na ose x a jejich množství na ose y (obr. 3). Ke správnému zhodnocení výsledků průtokové cytometrie je zapotřebí znát počet chromozomů jednotlivých cytotypů analyzovaného druhu. Pro šmel okolíčnatý jsou karyologická data dostupná v např. v práci Krauhlová et Jarolímová (1993).



Obr. 3: Výstup cytometrické analýzy. Histogram relativní fluorescence smíšeného vzorku několika rostlin šmelu okolíčnatého (*Butomus umbellatus*) ze smíšené populace diploidního (**2x**) a triploidního (**3x**) cytotypu s interním standardem *Bellis perennis* (**S**). Barveno DAPI, celkem analyzováno 3000 částic.

4.1.4 Sběr vzorků pro vývoj mikrosatelitových prumerů

Vzorky pro vývoj mikrosatelitových prumerů a jsem sbíral převážně v roce 2015. Snažil jsem se rovnoměrně pokrýt celou oblast a různé typy biotopů, kde se šmel vyskytoval, abych co nejvíce zamezil možnému sběru blízké příbuzných jedinců. Vzhledem ke značnému suchu v tomto roce byly rostliny alespoň ve sterilním stavu převážně v tůních s vodou a odvodňovacích kanálech. Na místech, která byla v roce 2013 vlhká (např. vlhké deprese a mokrá pole), kvůli suchu v roce 2015 nevyrostly rostliny vůbec. Kvůli tomu se mi nepodařilo docílit rovnoměrného zastoupení různých typů biotopů ve svých sběrech.

U nasbíraných vzorků jsem nejprve stanovil ploidii pomocí průtokové cytometrie, poté jsem každý list označil kódem populace a písmenem označujícím jedince v populaci a dal jsem ho v čajovém sáčku sušit do silikagelu. Z každé populace jsem dal sušit více jedinců, ale pro následný vývoj mikrosatelitových prumerů jsem použil pouze jednoho jedince z každé populace, abych omezil možnost, že bude více vzorků tvořeno jedním klonem.

4.2 *Srovnání stanovištních preferencí diploidů a triploidů*

Za účelem srovnání stanovištních preferencí obou cytotypů jsem na každé populaci udělal detailní soupis všech druhů cévnatých rostlin, které se na dané lokalitě vyskytovaly (tab. 9 v kapitole 9.3 v přílohách). Zaznamenával jsem pouze přítomnost druhů, nikoli jejich pokryvnost. Vodní a mokřadní prostředí je značně dynamické a pokryvnosti jednotlivých druhů se mohou během sezóny výrazně měnit (Sosnová et al. 2010, 2011) a samotná informace o přítomnosti konkrétních druhů je dostatečná. Dále jsem u každé lokality zaznamenal její charakter (tůň, odvodňovací kanál, vlhká deprese, mokré pole). Na vyhodnocení dat sem se rozhodl využít lineární ordinační metody (Lepš et Šmilauer 2003).

4.2.1 Statistické zpracování vegetačních dat

Získaná vegetační data jsem analyzoval několika způsoby. Použil jsem jednak samotný seznam druhů z každé lokality, abych porovnal, zda se lokality diploidů, triploidů a smíšené liší počtem a přítomností konkrétních druhů. Dále jsem si v programu JUICE 7.0 (Tichý 2002) přiřadil ke každému druhu Borhiniho indikační hodnoty, které jsou vytvořené pro panonskou oblast, a jsou tedy pro oblast Východoslovenské nížiny více vhodné než klasické Ellenbergovy hodnoty. Na základě přítomných druhů jsem poté v programu JUICE 7.0 vypočítal průměry Borhiniho indikačních hodnot pro 6 různých složek prostředí na každé lokalitě (tab. 8 v kapitole 9.3 v přílohách). U všech proměnných jsem zajišťoval předpoklady pro provedení analýz v programu R ver. 3.3.1. Pokud nebyla u některé proměnné splněna

normalita, použil jsem logaritmickou transformaci, abych normální rozložení dat zajistil (nutné pouze u proměnné *počet druhů*).

4.2.1.1 Testování vlivu složek prostředí pomocí analýzy rozptylu (ANOVA)

V programu R ver. 3.3.1 jsem postupně testoval vlastnosti jednotlivých lokalit (diploidních, triploidních a smíšených) pomocí analýzy rozptylu (ANOVA, Analysis of variance). Testoval jsem postupně 7 proměnných. Použil jsem jednak počet druhů na každé lokalitě a dále hodnoty jednotlivých složek prostředí vypočítané na základě Borhiniho indikačních hodnot přítomných druhů (světlo, teplota, kontinentalita, vlhkost, půdní reakce, živiny). Výstupem byly 3 krabicové grafy pro každou proměnnou v závislosti na typu populace (diploidní, triploidní, smíšená).

4.2.1.2 Analýza hlavních komponent (PCA)

Analýzu hlavních komponent (nepřímá ordinační technika) jsem prováděl v programu Canoco for Windows 5 (Ter Braak et Šmilauer 2012) Zjišťoval jsem odlišnosti lokalit na základě přítomnosti konkrétních druhů. Z analýzy jsem musel vyřadit 9 lokalit, na kterých se vyskytovalo jen málo druhů, často vyhraněných. Tyto lokality byly v ordinačním diagramu značně odlehle a rozmístění zbylých 63 lokalit bylo proto velmi nepřehledné.

4.2.1.3 Redundanční analýza (RDA)

Redundanční analýzu (přímá ordinační technika) jsem také prováděl v programu Canoco for Windows 5. Pomocí této metody jsem se snažil zjistit, zda výskyt některých druhů koreluje s ploidií šmelu. V této analýze jsem sloučil diploidní a smíšené lokality (z důvodu malého počtu čistě diploidních lokalit). Na rozdíl od předchozí metody jsem se tak snažil zjistit, zda vzácnější diploidní cytotyp nedoprovázejí nějaké specifické druhy. Výstupem této techniky je dvourozměrný graf, kde je v první kanonické ose testován vliv ploidní úrovně permutačním testem (99 999 opakování).

4.3 Morfometrika



Obr. 4: Detail květů triploidní (vlevo) a diploidní (vpravo) rostliny rostoucí ve smíšené populaci těsně vedle sebe. Tyto rostliny reprezentují spíše extrémní případy rozpětí velikosti květu.

4.3.1 Zaznamenávání znaků a odběr rostlin v terénu

Abych mohl posoudit do jaké míry má na fenotyp diploidních a triploidních rostlin vliv prostředí, ve kterém se vyskytují, rozhodl jsem se udělat srovnávací experiment. V přírodě jsem změřil znaky na 90 rostlinách (36 diploidních a 54 triploidních), které jsem následně odebral pro kultivace. Kompletní přehled měřených znaků je v tab. 1. Vzhledem k tomu, že všechny důležité části rostliny mají jednoduchý tvar, nebylo třeba využívat geometrické morfometrie, ale stačila pouze morfometrika klasická.

Z vegetativních znaků jsem měřil délku, šířku a tloušťku nejdelšího listu, který byl součástí části oddenku s květonosným stvolem. Dále jsem zaznamenával délku oddenku s květonosným stvolem (délka oddenku byla měřena od místa, kde vyrůstaly první listy v sezóně, až po růstový vrchol oddenku) a také jsem zaznamenával počet oddenkových pacibulek. U květonosného stvolu jsem zaznamenával výšku a tloušťku v jeho polovině, počet květů v okolíku a případnou přítomnost vegetativních pacibulek v květenství známých z literatury (např. Hroudová et Zákavský 1993a). U jednotlivých květů jsem poté zaznamenával délku a šířku vnitřních okvětních lístků. U každé rostliny jsem takto změřil tři květy a na každém květu jeden okvětní lístek.

Tab 1: Přehledová tabulka znaků měřených na rostlinách v terénu a následně v kultivaci.

Vegetativní znaky		Generativní znaky	
<i>List (v polovině délky)</i>	<i>Oddenek</i>	<i>Květonosný stvol</i>	<i>Vnitřní okvětní lístek (3 květy)</i>
délka	délka	výška	délka
šířka	počet pacibulek na 1 cm délky	šířka v polovině	šířka
tloušťka		počet květů	poměr průměrné šířky a délky
poměr šířky a délky		poměr šířky a výšky	
poměr tloušťky a šířky			

4.3.2 Srovnávací kultivace

Všech 90 změřených rostlin z terénu jsem dovezl na další kultivaci do Experimentální zahrady Botanického ústavu Akademie věd ČR v Průhonicích. Zde jsem rostliny zasadil do čtvercových květináčů o velikosti 20×20 cm. Do květináčů jsem použil substrát namíchaný z písku a propařené hlíny v poměru 2:1 (2 díly písku a 1 díl propařené hlíny). Oddenek jsem dával přibližně do 5 cm hloubky a květináče jsem dal do vody, která dosahovala povrchu substrátu. Každou rostlinu jsem poté označil plastovým štítkem s kódem populace a pořadím rostliny v kultivaci. U každé rostliny jsem analyzoval ploidní úroveň pomocí průtokové cytometrie. V kultuře jsem poté u rostlin, které znovu vykvetly, přeměřil totožné znaky, které jsem zaznamenával v terénu. Pouze délku oddenku jsem u rostlin v kultuře změřil celkovou i s přírůstkem během kultivace, nikoli pouze část oddenku s květonosným stvolem. Proto jsem tento znak nezahrnul do souboru pro srovnání posunu znaků po přesazení rostlin do kultury.

4.3.3 Statistické zpracování morfologických dat

Pro vyhodnocení zaznamenaných morfologických znaků jsem se rozhodl použít analýzu hlavních komponent (PCA) a kanonickou diskriminační analýzu (CDA). Těmito analýzami jsem ověřoval, do jaké míry má na fenotyp vliv prostředí, ve kterém rostliny rostou a do jaké míry má vliv ploidní úroveň. Díky tomu, že jsem měl znaky měřené v přírodě na stejných rostlinách, které jsem poté přesazoval do kultivace, má tato analýza relativně velkou výpovědní hodnotu i přes poměrně malé množství měřených jedinců. V analýzách jsem použil znaky uvedené v tab. 1. Hodnoty znaků pro každou rostlinu jsou uvedeny v tab. 10 a 11 v přílohách (kapitola 9.3).

Pro zajištění předpokladů pro provedení analýz jsem provedl transformace některých proměnných. V souboru znaků rostlin pouze z terénu jsem provedl logaritmickou

transformaci u znaků: *poměr šířky a výšky stvolu, poměr šířky a délky listu, délka oddenku a poměr průměrné šířky a délky okvětního lístku*. Odmocninovou transformaci jsem provedl u znaků: *počet pacibulek na 1 cm délky oddenku a počet květů*.

V souboru dat pro srovnání znaků rostlin měřených v přírodě a poté v kultivaci jsem provedl logaritmickou transformaci těchto znaků: *šířka stvolu, poměr výšky a šířky stvolu, délka listu, délka oddenku, počet květů a délka okvětního lístku*. Odmocninovou transformaci jsem provedl u těchto znaků: *tloušťka listu, poměr šířky a délky listu, počet pacibulek na 1 cm délky oddenku a poměr průměrné šířky a délky okvětního lístku*. Každého jedince jsem měl unikátně označeného identifikačním číslem, ploidní úrovní a kódem označujícím měření z terénu nebo z kultivace. Dále jsem si v programu R ver. 3.3.1 vytvořil korelační matice znaků obou souborů dat, pomocí kterých jsem mohl ověřit, zda některé znaky spolu nejsou korelované (absolutní hodnota korelačního koeficientu vyšší než 0,95).

Pomocí skriptu Morphotools (Koutecký 2015) v programu R ver. 3.3.1 jsem získal tabulku se skóry pro všechny znaky, které jsem mohl dále analyzovat v programu Canoco for Windows 5.

4.3.3.1 Analýza hlavních komponent (PCA)

Touto metodou jsem nejprve analyzoval morfologické rozdíly mezi diploidními a triploidními rostlinami pouze na rostlinách z přírody. Poté jsem analyzoval soubor dat, ve kterém jsem měl znaky totožných jedinců z přírody a z kultivace. V tomto souboru jsem vynechal znak určující délku oddenku, protože v kultivaci měly rostliny díky růstu oddenek vždy mnohem delší. V posledním souboru dat jsem srovnával rostliny pouze z kultivace, abych viděl, zda se prohloubí morfologické rozdíly mezi ploidiemi, pokud se eliminuje efekt prostředí.

4.3.3.2 Kanonická diskriminační analýza (CDA)

Touto metodou jsem testoval rozdíly na stejných souborech dat, které jsem analyzoval pomocí PCA. Nejprve na souboru dat rostlin pouze z přírody, poté z přírody a z kultivace a nakonec pouze z kultivace. V souboru dat pouze z přírody a pouze z kultivace jsem testoval vliv ploidie na morfologické znaky v jedné ose permutačním testem (99 999 opakování). Výsledný histogram jsem poté vytvořil v programu STATISTICA (StatSoft. Inc.).

V případě srovnání rostlin z kultivace jsem ve dvou osách testoval vliv ploidie kombinovaný s vlivem kultivace vs. příroda permutačním testem (99 999 opakování). Výstupem je dvourozměrný graf.

4.4 Výsev semen a průtoková cytometrie semenáčků

Výsevy a analýzy potomstva byly doposud prováděny pouze u semen vytvořených rostlinami v experimentálních podmínkách (Krauhlová et Jarolímová 1993, Hroudová et Zákravský 1993a, Hroudová et Zákravský 2003). Proto jsem se rozhodl ověřit, jaké potomstvo může vznikat ze semen vytvořených v přirozených populacích, kde se vyskytují obě ploidie.

V terénu jsem odebral semena z diploidních i triploidních rostlin (tvorba semen triploidy byla dříve dokázána v experimentálních podmínkách, Krauhlová et Jarolímová 1993). Semena jsem poté nechal stratifikovat ve zkumavkách s vodou v lednici při 4 °C po dobu 6 měsíců. Poté jsem je vysel na Petriho misky do vlhkého zahradnického substrátu a nechal klíčit při pokojové teplotě. Vyrostlé semenáčky (při velikosti alespoň 3 cm) jsem poté analyzoval průtokovou cytometrií. Úspěšnost klíčení semen šmelu v různých podmínkách byla již zjištěna v dřívějších experimentech (např. Hroudová et Zákravský 2003), proto jsem ji pouze využil jako informaci pro úspěšné vyklíčení svých semen a skutečnou procentuální úspěšnost klíčení jsem nezaznamenával a pouze jsem analyzoval ploidní úroveň potomstva.

4.5 Vývoj mikrosatelitových primerů

4.5.1 Izolace dna

Izolaci DNA jsem prováděl v DNA laboratoři Katedry botaniky PřF UK. K izolaci DNA jsem použil přibližně 0,5 g sušeného listu, který jsem vkládal do 2 ml eppendorfek spolu se dvěma wolfram-karbidovými kuličkami. Materiál jsem drtil 5–7 minut (podle pevnosti materiálu) při 27 otáčkách za sekundu (mlýnek Mixer Mill 200, Retsch), dokud nebyl materiál rozdrčen na prášek).

K vlastní izolaci DNA jsem použil sorbitolovou metodu podle protokolu uvedeného v přílohách (kapitola 9.2). Úspěšnost izolace jsem ověřil elektroforézou na 0,8% agarózovém TAE gelu v TAE pufru. DNA na gelu jsem vizualizoval pomocí UV transluminátoru (Herolab UVT-20M) a pomocí dokumentačního systému Kodak Gel Logic 100 a softwaru 1D Image Analysis (Kodak) jsem ho nasnímal do počítače. Poté jsem změřil koncentraci a čistotu extrahované DNA pomocí spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Podle naměřených hodnot jsem DNA naředil na pracovní koncentraci 10 ng/μl v množství 100 μl. Naředěnou DNA jsem dále používal pro PCR (*Polymerase chain reaction*).

4.5.2 Vývoj mikrosatelitových primerů

Pro vývoj mikrosatelitových primerů jsem použil sekvenční zisky získané sekvenováním podle protokolu uvedeného v příloze (kapitola 9.2). V programu BioEdit Sequence Alignment editor (Hall 1999) jsem hledal sekvenční zisky s vhodnými mikrosatelitovými repeticemi. Preferoval jsem co mikrosatelity s co největším počtem opakování repetice a také s delšími motivy. Dále jsem preferoval lokusy, ve kterých už byla viditelná variabilita v rámci několika sekvencí.

Konsensus vytvořený z podobných sekvencí v programu BioEdit jsem vložil do programu Primer 3 na internetové adrese <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>, který je určený k tvorbě primerů. Jako délku primeru jsem zadal 18–23 párů bází a jako délku výsledného produktu jsem zadal 100–1000 párů bází. V tomto programu jsem vytvořil primery pro 48 mikrosatelitových lokusů, které jsem dále testoval.

4.5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přípravu i samotnou PCR jsem prováděl v DNA laboratoři Katedry botaniky PřF UK. Všechny 48 párů primerů jsem testoval nejprve na 1 diploidním a 1 triploidním jedinci, abych ověřil amplifikaci lokusu pomocí PCR. Primery jsem nařadil na pracovní 2,5 pikomolární koncentraci a poté jsem připravil PCR reakci. Smíchal jsem si reakční směs tak, aby každá zkumavka obsahovala 1,8 µl sterilní vody, 3,75 µl PCR Master Mixu (QIAGEN), 0,6 µl forward primeru, 0,6 µl reverse primeru a 0,75 µl DNA.

Výsledný produkt (v množství 1,5 µl) jsem obarvil 1,5 µl barvičky a nanesl na 1,8% TBE gel v TBE pufru. Jako žebřík jsem použil O'GeneRuler 100bp Ladder Plus (Fermentas) také v množství 1,5 µl a spustil jsem elektroforézu. Výsledný gel jsem vizualizoval na UV transluminátoru. Poté jsem vybral lokusy, které se amplifikovaly u obou vzorků a netvořily příliš nespecifických produktů a ty jsem použil pro další analýzy.

4.5.4 Fragmentační analýza a sekvenování mikrosatelitových lokusů

Vybrané lokusy jsem poté amplifikoval pomocí PCR na 16 vzorcích (8 diploidů a 8 triploidů). Při PCR jsem již použil univerzální značené primery M13 ve 4 fluorescenčních barvách (modrá, zelená, žlutá a červená). Reakční PCR směs se značeným primerem byla odlišná a skládala se z 0,82 µl sterilní vody, 2,72 µl PCR Master Mixu (QIAGEN), 0,65 µl univerzálního značeného M13 primeru, 0,16 µl forward primeru, 0,65 µl reverse primeru a 0,5 µl DNA na jeden vzorek. Značený primer se během PCR vázal na ocásek (*tail*) na forward primeru. Pro každý vzorek jsem zvolil tři testovací teploty annealingu v PCR cyklech (50, 55 a 60°C). Výsledné produkty jsem vizualizoval na gelu z elektroforézy pomocí UV

transluminátoru. Lokusy, které se konzistentně amplifikovaly u všech vzorků, jsem dále použil pro fragmentační analýzu.

Ke každému vzorku (0,5 µl) smíchaného až ze 4 odlišně fluorescenčně značených PCR produktů, jsem přidal 10 µl formamidu a 0,25 µl standardu LIZ 600 (Applied Biosystems). Tento standard obsahuje fragmenty o předem definované délce, díky kterým jsem mohl zjistit délku svých amplifikovaných lokusů. Dále jsem mohl smíchat pokaždé 4 produkty s primery značenými odlišnými barvami do 1 zkumavky. Takto připravené vzorky jsem odnesl do sekvenační laboratoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7 (<http://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>), kde byla provedena fragmentační analýza na šestnáctikapilárovém sekvenátoru 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), během které byly jednotlivé mikrosatelitové alely rozděleny podle délky.

Výsledky z fragmentační analýzy jsem jsou zasílány ve formátu .fsa, který jsem prohlížel a analyzoval v programu GeneMarker ver. 1.80 (Soft Genetics). U každého vzorku jsem hodnotil variabilitu konkrétního mikrosatelitového lokusu a překryvy jednotlivých alel s nespecifickými produkty. Poté jsem vybral variabilní lokusy, které v rozmezí délek jednotlivých alel neobsahovaly nespecifické produkty, které by znemožnily skórování alel.

Celkem se mi podařilo vybrat 14 variabilních lokusů, které jsem nechal osekvenovat v sekvenační laboratoři (SEQme, <https://www.seqme.eu/cs>), abych mohl ověřit, zda se skutečně amplifikují lokusy s konkrétními mikrosatelity. Pro sekvenování jsem vybral vždy jednoho diploidního a jednoho triploidního jedince pro každý lokus. PCR reakce probíhala bez značených primerů a výsledný produkt jsem přesrážel octanem podle protokolu uvedeného v přílohách (kap. 9.2).

4.5.5 Genetická variabilita rostlin použitých pro vývoj makrerů

Variabilní lokusy s mikrosatelitovými repeticemi jsem vyvíjel na 14 jedincích (6 diploidních a 8 triploidních) ze 14 různých populací relativně rovnoměrně rozmístěných v oblasti. Po obdržení výsledků z fragmentační analýzy jsem jednotlivé alely identifikoval v programu GeneMarker ver. 1.80 (Soft Genetics) a zjistil jejich délku v párech bází. Délky alel jednotlivých lokusů u heterozygotů se musely lišit o násobky délky motivu repetice (např. u tetranukleotidu o násobky 4). Pro všechny jedince jsem udělal skórovací tabulku s alelami pro všech 14 lokusů (tab. 12) a spočítal jsem genetické vzdálenosti mezi jedinci pomocí knihovny POLYSAT (Clark et Jaseniuk 2011) v programu R ver. 3.3.1. Genetické vzdálenosti jsem poté analyzoval pomocí PCA v programu Canoco for Windows 5.

5 Výsledky

5.1 Distribuce cytotypů v oblasti Východoslovenské nížiny

V oblasti Východoslovenské nížiny se mi podařilo objevit celkem 72 populací šmelu okoličnatého (obr. 5 a 6, tab. 7). Populace se značně lišily svojí velikostí. Některé byly tvořeny pouze jedním sterilním jedincem, některé mnoha sty kvetoucími jedinci. Populace se podle charakteru biotopu daly rozdělit do 4 hlavních skupin (tůň, odvodňovací kanál, vlhká deprese, mokré pole). Za tůň byla považována slepá ramena, kde po značnou část sezony bývá vodní sloupec s otevřenou hladinou. Tůně (obr. 7) jsou velmi časté hlavně v prostoru mezi protipovodňovými hrázemi. V tůních se vyskytovala většina populací, celkem 37.

Odvodňovací kanály (obr. 8 a 9) jsou v oblasti také velmi časté a v mnoha z nich bývá vodní sloupec po celou sezónu často s proudící vodou. V odvodňovacích kanálech se vyskytovalo 23 populací.

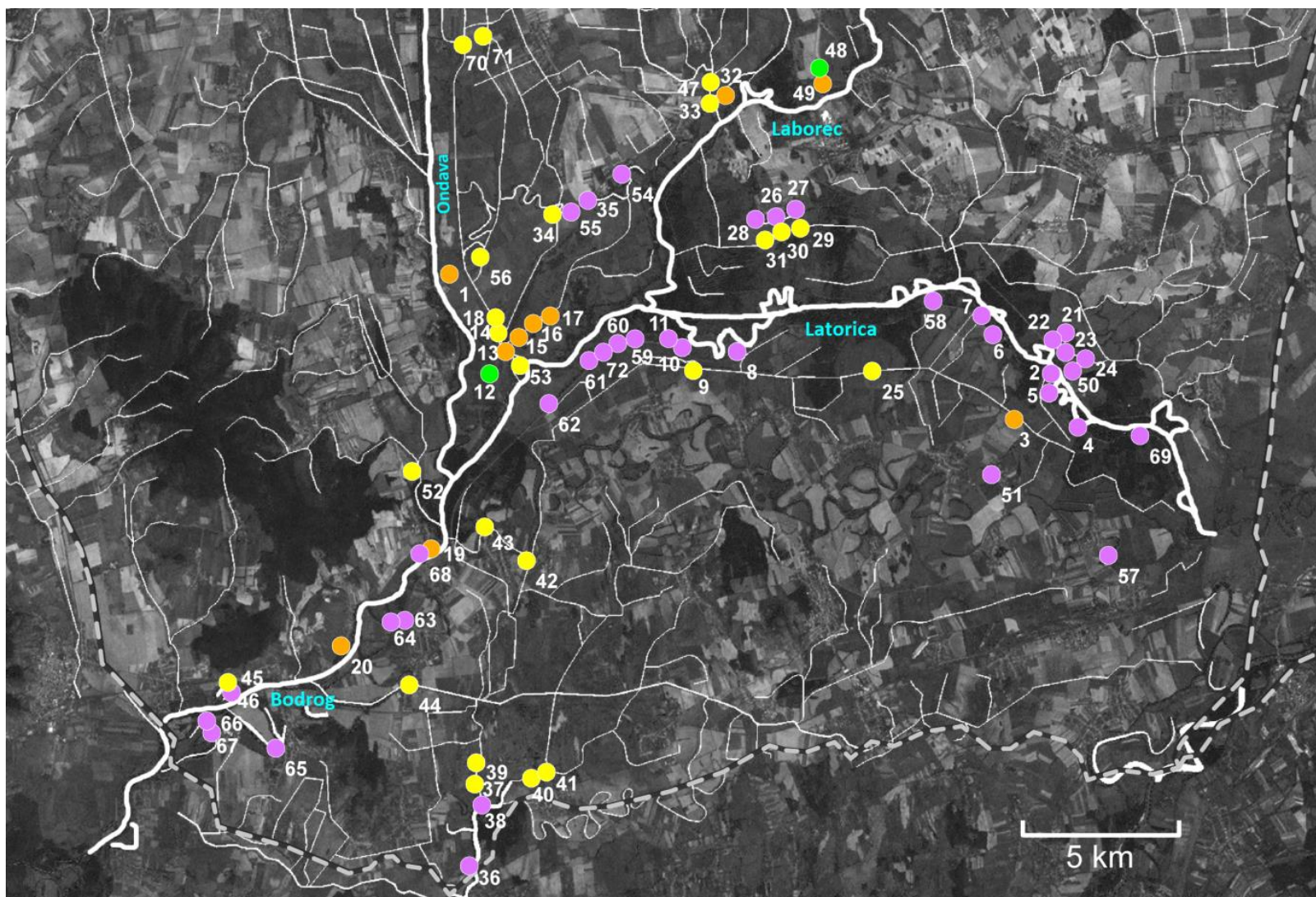
Za vlhkou depresi (obr. 10) jsem považoval místa např. v pastvinách, kde už se nevyskytoval vodní sloupec ani otevřená hladina. Vlhké deprese byly převážně zarostlé bohatou mokřadní vegetací a šmel se zde dal najít zpravidla pouze za květu. V tomto biotopu se vyskytovalo 10 populací. Posledním typem biotopu byla mokrá pole (obr. 11), zde jsem objevil pouze 2 populace.

Dále se daly populace rozdělit podle jejich umístění vzhledem k protipovodňovým hrázím. Celkem 30 populací se nacházelo v prostoru mezi hrázemi, 17 populací jižně od jižní hráze a 25 populací severně od severní hráze.

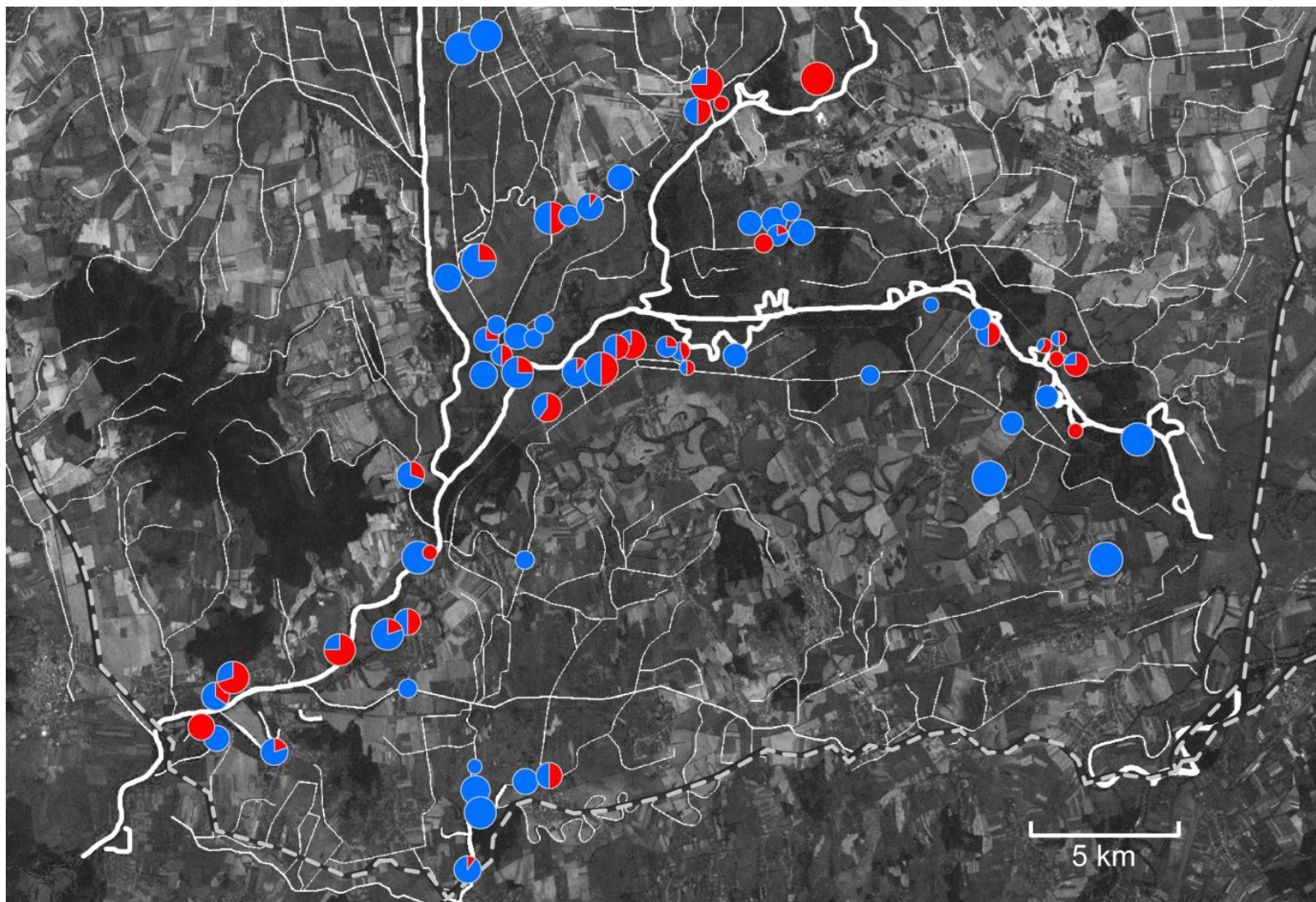
Z celkem 72 populací bylo čistě triploidních 34, 30 populací bylo smíšených a čistě diploidních bylo pouze 8. Triploidní cytotyp je v oblasti hojnější (stejně jako v České republice, Hroudová et Zákřavský 1993b), vyskytoval se téměř na 90 % všech objevených lokalit. Diploidní cytotyp se vyskytuje mnohem častěji ve smíšených populacích než uniformních. A ty jsou většinou tvořeny pouze několika málo jedinci. Celkové počty populací a jejich ploidií napříč biotopy jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2: Přehledová tabulka distribuce lokalit mezi 4 biotopy s uvedeným počtem jednotlivých typů populací (cytotypově uniformní a smíšené).

Biotop	2x	3x	2x+3x	Celkem
Mokré pole	1	1	0	2
Vlhká deprese	3	5	2	10
Odvodňovací kanál	1	11	11	23
Tůň	3	17	17	37



Obr. 5: Distribuce populací v oblasti Východoslovenské nížiny obarvených podle typu biotopu (fialově – tůň, žlutě – odvodňovací kanál, oranžově – vlhká deprese, zeleně – mokré pole). Číslo u lokality je dlesloupce pořadí v tabulce 7 v přílohách (kapitola 9.1)



Obr. 6: Distribuce populací obarvených podle přítomnosti diploidního (červeně), nebo triploidního (modře) cytotypu. U smíšených populací je zastoupení jednotlivých cytotypů znázorněno proporčně v koláčovém diagramu. Velikost kruhu odpovídá logaritmu velikosti populace.



Obr. 7: Triploidní cytotyp šmelu (*Butomus umbellatus*) ve vysychající tůni na lokalitě u obce Kapoňa (sloupec **GPS-kód** č. 72; sloupec **pořadí** č. 51 v tab. 7, kapitola 9.1) v roce 2014.



Obr. 8: Sterilní smíšená populace šmelu společně se šípatkou (*Sagittaria sagittifolia*) v odvodňovacím kanále v roce 2013. Lokalita: sloupec **GPS-kód** č. 51; sloupec **pořadí** č. 33 v tab. 7, kapitola 9.1. Foto M. Čertner.



Obr. 9: Totožná populace jako na obr. 8 po dvou suchých sezónách (rok 2015). Odvodňovací kanály byly jedeny z mála biotopů, kde byl dostatek vláhy, který umožňoval bohaté kvetení populace a převážení vegetace šmelu nad ostatními druhy.



*Obr. 10: Diploidní rostlina šmelu okoličnatého na vysychající vlhké depresi na pastvině u obce Zemplín v roce 2013. (sloupec **GPS-kód** č. 36; sloupec **pořadí** č. 19 v tab. 7, kapitola 9.1); Foto M. Čertner.*



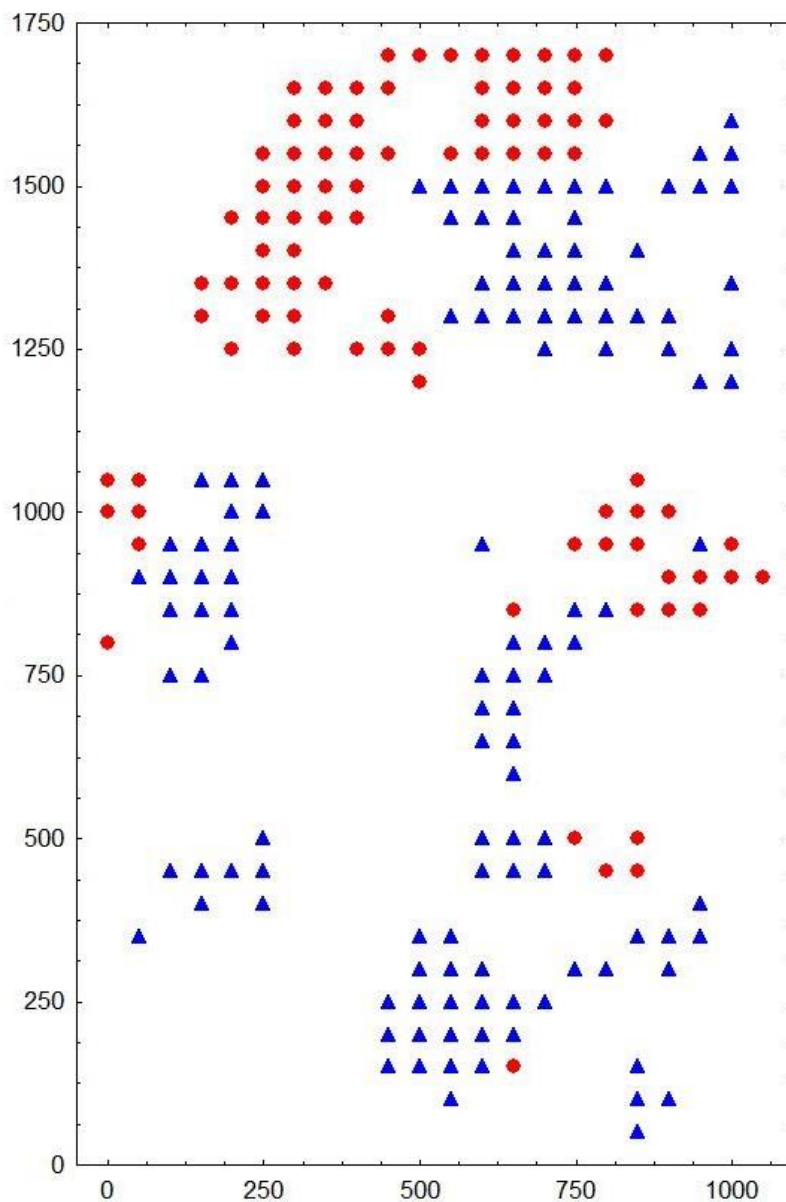
Obr. 11: Lokalita triploidního šmelu okoličnatého na mokrém poli u obce Brehov (sloupec GPS-kód č. 29; sloupec pořadí č. 12 v tab. 7, kapitola 9.1). Rostlina z této lokality vytvořila velké množství semen, která byla použita pro analýzu semenáčků (kapitola 5.4). Foto M. Čertner.

5.1.1 Cytotypová struktura smíšených populací

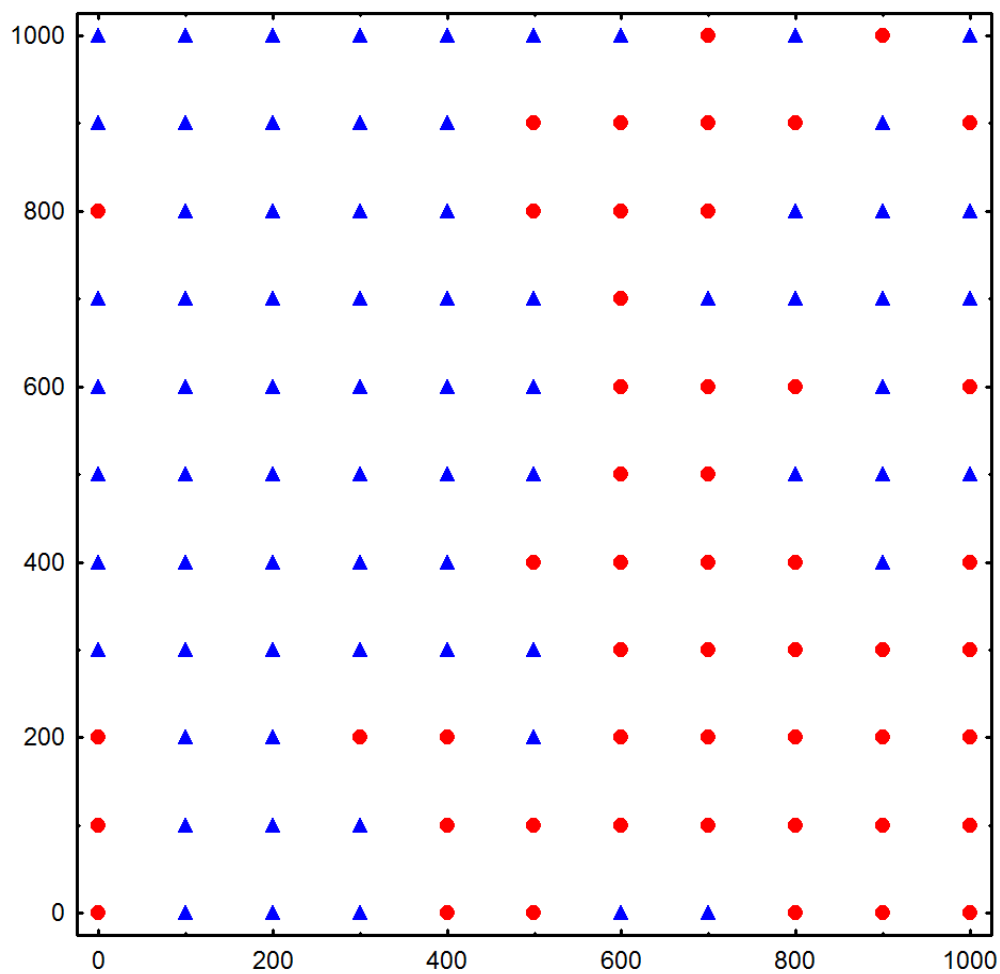
Ke zjištění cytotypové struktury populací jsem využil dvě velké smíšené populace, kde jsem vytyčil trvalé plochy. Plochy 1 a 2 (obr. 12 a 13) jsou na jedné lokalitě u obce Ladmovce ve vlhké depresi a 3. plocha (obr. 14 a 15) je v odvodňovacím kanále u obce Velké Raškovce.

Rostliny na plochách 1 a 2 byly v době měření v roce 2014 téměř všechny sterilní. Plocha 1 byla v sušší části deprese rostliny šmelu zde byly všechny sterilní malého vzrůstu. Plocha 2 byla ve vlhčí části deprese a populace zde měla charakter hustého zapojeného porostu, ve kterém bylo minimální množství kvetoucích jedinců. Plocha 3 v odvodňovacím kanálu díky dostatku vody obsahovala mnoho kvetoucích jedinců. Šmel zde ale převážně tvořil jednotlivé trsy nebo řídké porosty (pravděpodobně kvůli proudění vody).

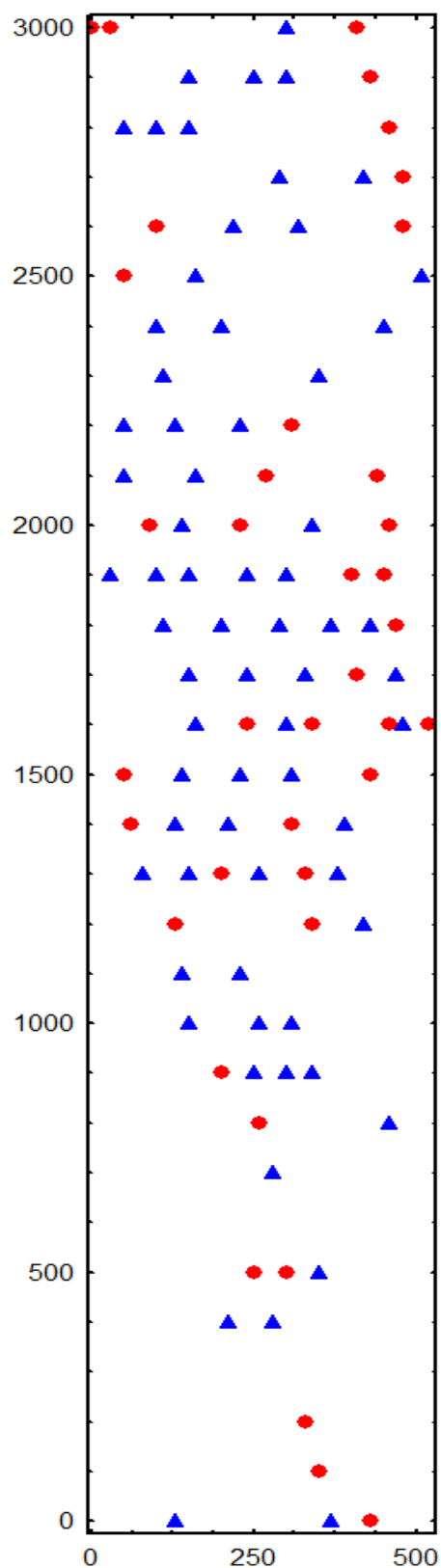
Na všech 3 plochách bylo zastoupení diploidů a triploidů překvapivě poměrně vyrovnané. Pomocí prostorové statistiky (Mantelův test) v programu R ver. 3.3.1 jsem otestoval shlukovitost jedinců obou ploidí ve všech třech plochách. Na ploše č. 1 a 2 jsou jedinci průkazně shlukovitě uspořádáni v rámci stejných ploidí. Naopak na ploše č. 3 jsou jedinci uspořádáni náhodně a jedinci odlišné ploidie jsou značně promíseny. To může být pravděpodobně způsobeno disturbancemi způsobenými proudící vodou při zvýšené vodní hladině.



Obr. 12: Distribuce diploidních (červeně) a triploidních (modře) rostlin na ploše č. 1. Na obou osách jsou uvedeny vzdálenosti v centimetrech. Plocha se nachází v sušší části vlhké deprese u obce Ladmovce.



Obr. 13: Distribuce diploidních (červeně) a triploidních (modře) rostlin na ploše č. 2. Na obou osách jsou uvedeny vzdálenosti v centimetrech. Plocha se nachází ve vlhčí části deprese u obce Ladmovce.



Obr. 14: Distribuce diploidních (červeně) a triploidních (modře) rostlin na ploše č. 3. Na obou osách jsou uvedeny vzdálenosti v centimetrech. Plocha se nachází v odvodňovacím kanále u obce Velké Raškovce.

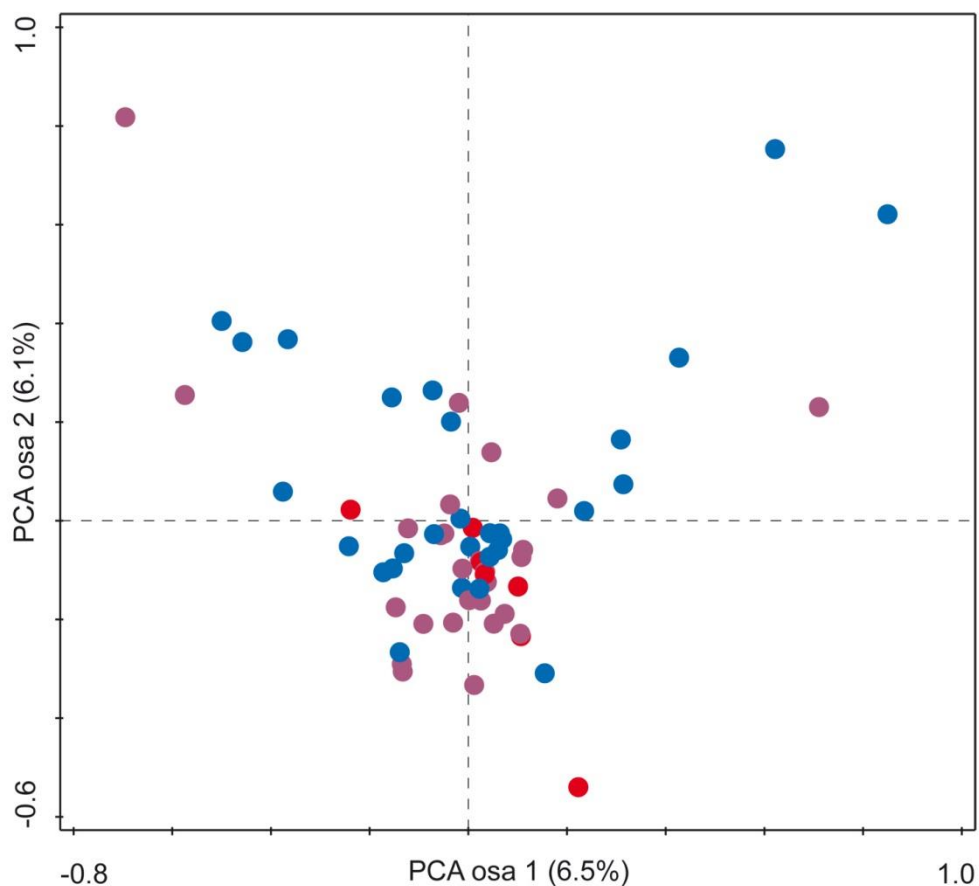


Obr. 15: Odvodňovací kanál, ve kterém se nachází plocha č. 3. Na březích se pase stádo skotu s převahou maďarského (též uherského) stepního plemene. Foto je z roku 2015, rok po založení plochy. Porosty šmelu jsou zde již mnohem rozsáhlejší než v roce 2014, kdy byl proveden cytotypový screening této plochy.

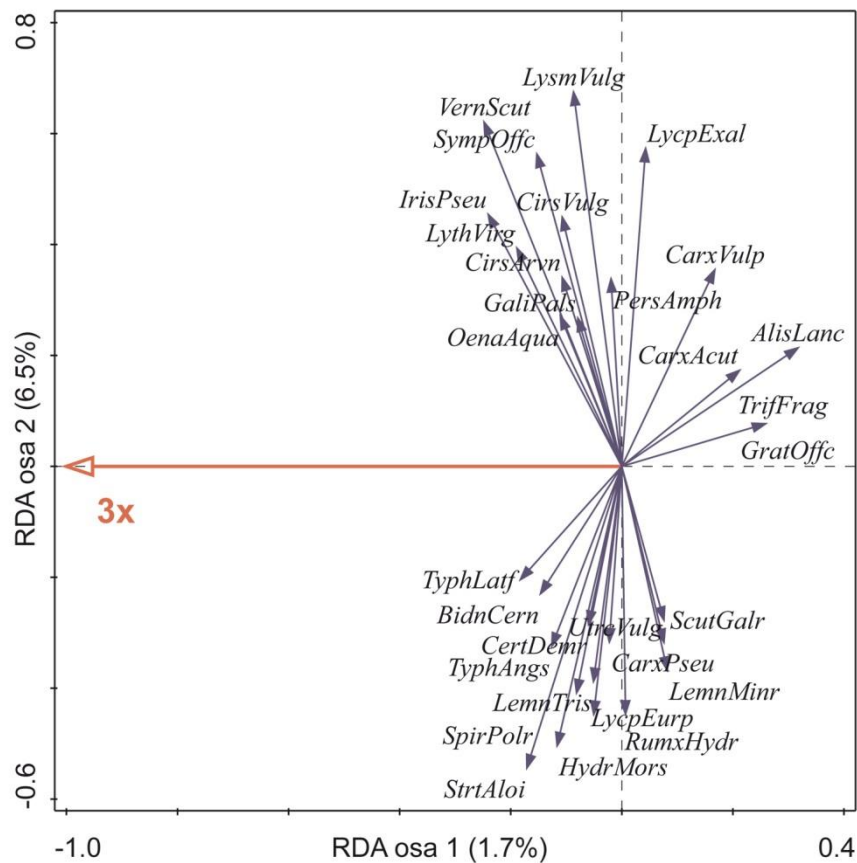
5.2 Stanovištní preference cytotypů

Z ordinačního diagramu analýzy PCA (obr. 15) není patrná žádná zřetelná separace mezi lokalitami diploidními, triploidními ani smíšenými na základě soupisu druhů cévnatých rostlin. První osa vysvětlila pouze 6,5 % celkové variability a druhá osa 6,1 % celkové variability. V analýze není zahrnuto 9 lokalit (1 diploidní, 3 smíšené a 5 triploidních), které byly z nějakého důvodu extrémní (téměř žádné přítomné druhy, zcela odlišné doprovodné druhy apod.) a v ordinačním diagramu tvořily výrazně odlehlé hodnoty.

Následně jsem použil redundantní analýzu (RDA, obr. 16) která ploidní úrovní na první kanonické ose vysvětlila pouze 1,7 % variability a druhá ordinační osa vysvětlila 6,5 % variability ($p = 0,32$, 99 999 permutací). Téměř všechny druhy všechny druhy byly rozloženy podél druhé osy. Nepodařilo se tedy prokázat, že by na lokalitách, kde roste pouze triploidní cytotyp a kde diploidní cytotyp, rostly odlišné doprovodné druhy cévnatých rostlin a lokality se tedy v tomto ohledu neliší.



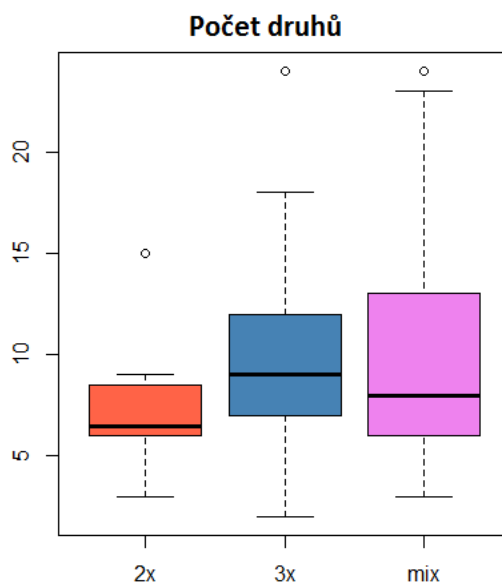
Obr 15: Analýza hlavních komponent na základě soupisu druhů cévnatých rostlin z diploidních (červeně), triploidních (modře) a smíšených (fialově) lokalit.



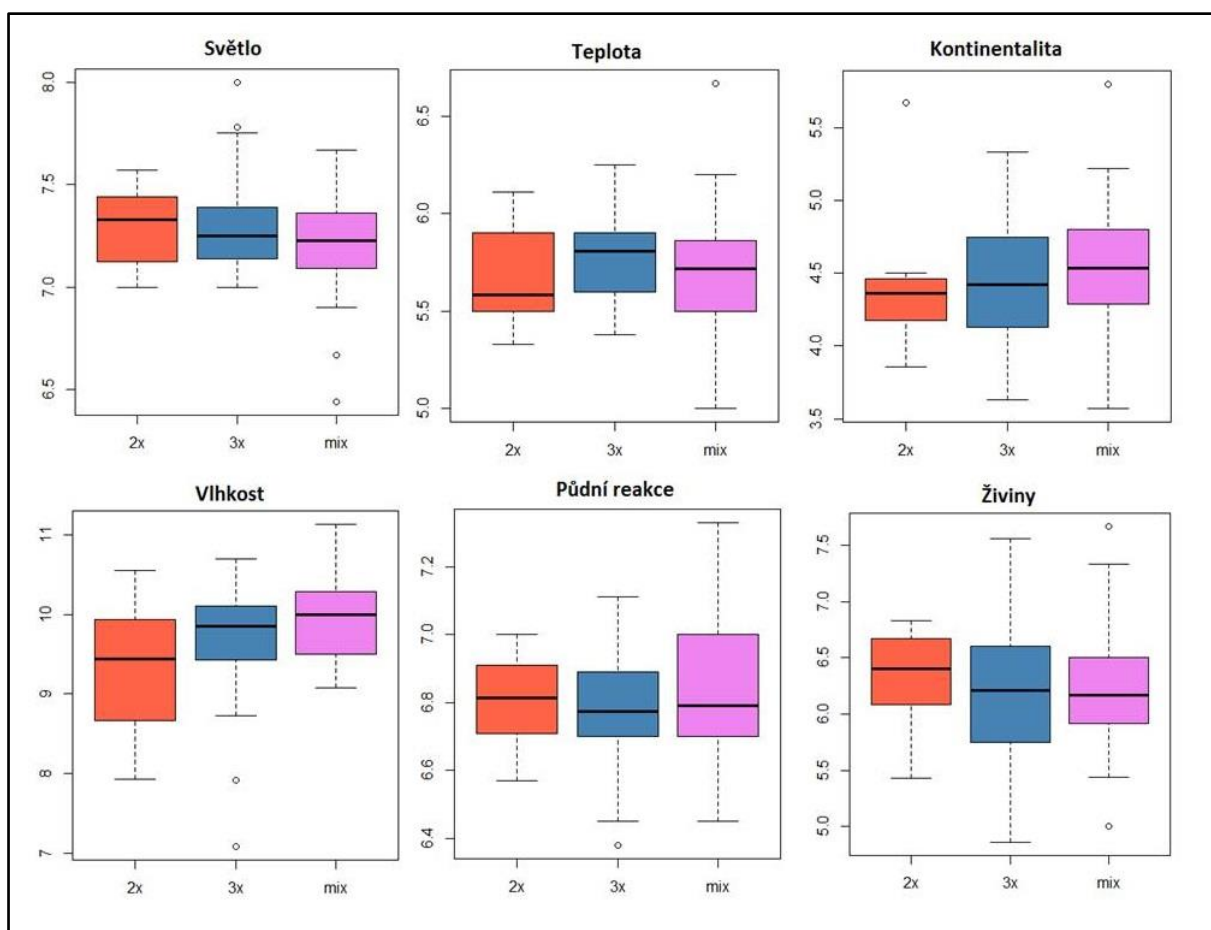
Obr. 16: Redundanční analýza (RDA) na základě soupisu druhů z lokalit, kde se vyskytovali pouze triploidní jedinci a kde i diploidní jedinci (diploidní a smíšené populace byly sloučeny). Vliv ploidní úrovně byl neprůkazný ($p = 0,32$, 99 999 permutací). Šipky reprezentují jednotlivé druhy zapsané na lokalitách.

Dále jsem pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) testoval další charakteristiky jednotlivých lokalit. Lokality se průkazně neliší v počtu druhů ($p = 0,58$, obr 17), malý počet druhů u diploidních lokalit v krabicovém grafu je způsoben hlavně malým počtem čistě diploidních lokalit vzhledem k lokalitám triploidním a smíšeným.

Průkazně se lokality neodlišují ani v následně testovaných charakteristikách prostředí přepočítaných z průměrů Borhiniho indikačních hodnot (obr. 18). Marginálně průkazně ($p = 0,0508$) se lokality odlišují pouze ve vlhkosti lokalit. Jedná se ale pravděpodobně o artefakt, protože smíšené lokality by měly být na vlhčích místech než čistě diploidní i čistě triploidní, což je velice nepravděpodobné. Je to způsobeno pravděpodobně nerovnoměrným rozdělením lokalit mezi jednotlivé biotopy (tůň, odvodňovací kanál, vlhká deprese a suché pole) v kombinaci s relativně malým počtem lokalit. Žádné další odlišnosti mezi diploidními, triploidními a smíšenými populacemi již nebyly průkazné.



Obr 17: Srovnání průměrného počtu druhů v diploidních (červeně) triploidních (modře) a smíšených (fialově) populacích.



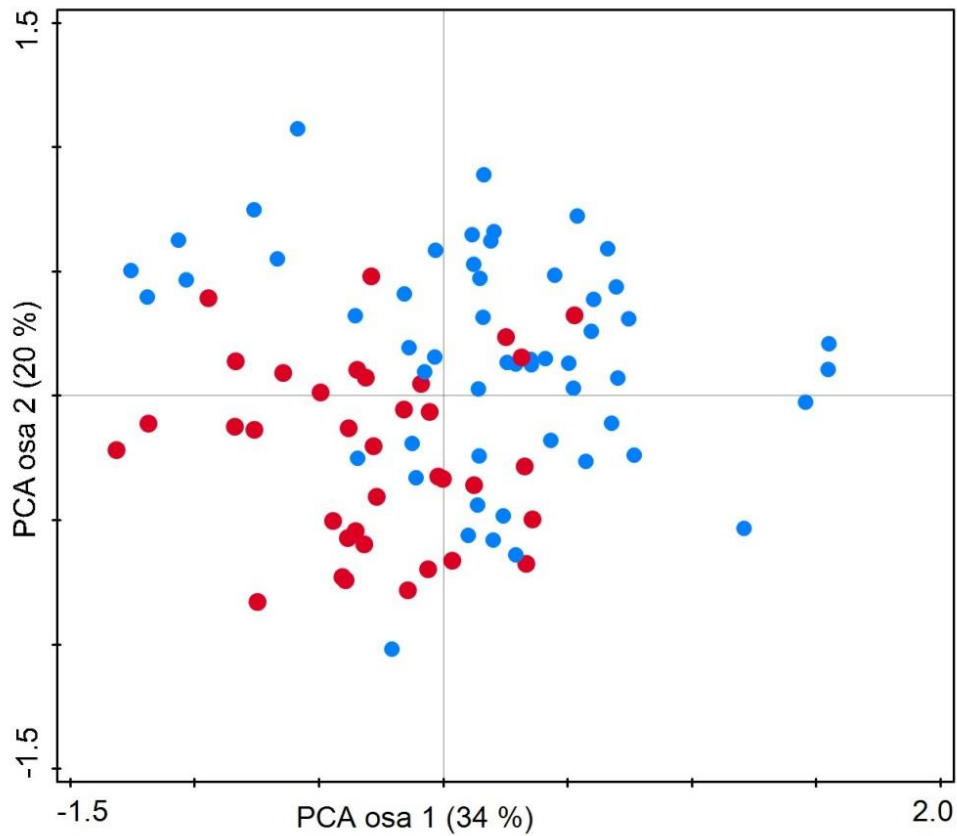
Obr. 18: Srovnání průměrných Borhiniho indikačních hodnot pro šest parametrů prostředí vypočtených na základě soupisu druhů porůzených v diploidních (červeně), triploidních (modře) a smíšených (fialově) populacích. Průměr nebyl při výpočtu vážen pokryvnostmi jednotlivých druhů.

5.3 Morfometrika

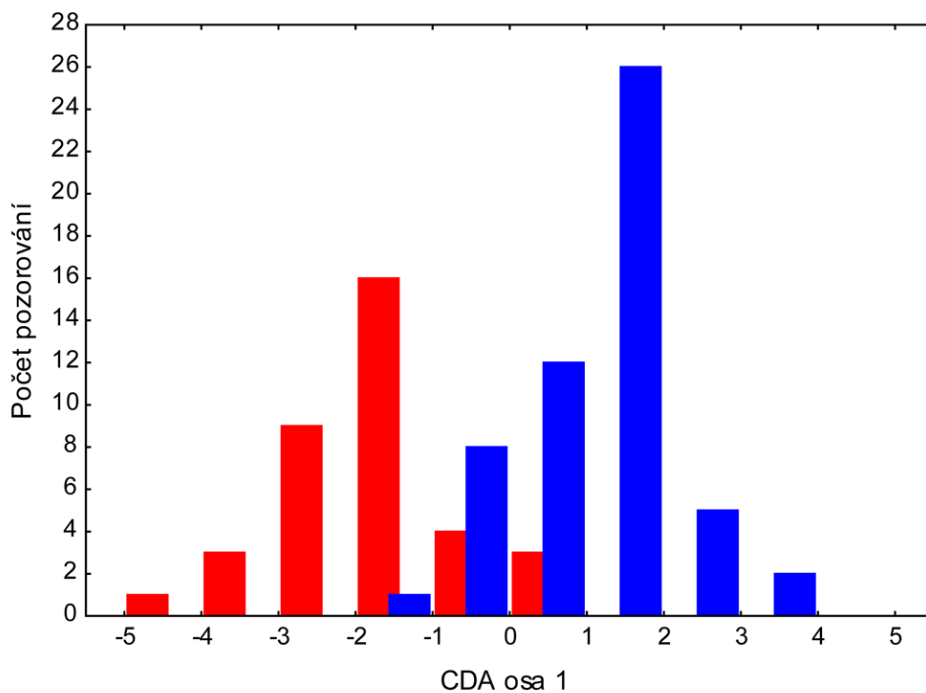
5.3.1 Vyhodnocení znaků rostlin z přirozeného prostředí

V ordinačním diagramu analýzy hlavních komponent (PCA, obr. 19) můžeme vidět relativně velkou separaci diploidních a triploidních rostlin podél první ordinační osy, která vysvětluje 34 % variability i podél druhé osy, která vysvětluje 20 % variability. Diploidní a triploidní rostliny se tedy do určité míry liší ve svých morfologických znacích.

Následná kanonická diskriminační analýza (CDA, obr. 20) rozdělila rostliny s odlišnou ploidií podle jedné osy ($p = 0,00001$, 99 999 permutací) V histogramu můžeme vidět relativně velký rozdíl v morfologických znacích. V tabulce 3 jsou uvedeny kanonické diskriminační koeficienty ke každému analyzovanému znaku. Čím vyšší je absolutní hodnota koeficientu, tím větší má tento znak vliv na odlišnost cytotypů. Z uvedené tabulky je zřejmé, že nejdůležitějším znakem pro rozlišení diploidní a triploidní rostliny v přírodě je poměr šířky a délky okvětního lístku, který mají triploidní rostliny větší než diploidní. Druhým nejdůležitějším znakem je samotná šířka okvětního lístku, která je menší u diploidních rostlin. Další znaky s ještě poměrně velkou vypovídající hodnotou jsou šířka listu, šířka stvolu a poměr šířky a výšky stvolu. Všechny tyto hodnoty mají opět větší triploidní rostliny.



Obr. 19: Analýza hlavních komponent (PCA) souboru morfologických znaků pořizovaných na 36 diploidních (červeně) a 54 triploidních (modře) rostlinách v terénu.



Obr. 20: Kanonická diskriminační analýza souboru znaků naměřených na 36 diploidních (červeně) a 54 triploidních (modře) rostlinách v terénu rozdělila jedince podle jedné osy ($p = 0,00001$, 99 999 permutací). Na ose y je počet jedinců pro dané rozmezí kanonického skóre.

Tab. 3: Kanonické diskriminační koeficienty pro každý měřený znak rostlin v terénu. Čím vyšší je absolutní hodnota koeficientu, tím hrál zásadnější roli při odlišení cytotypů.

Znak	Koeficient
Výška stvolu	-0.1747
Šířka stvolu	-0.4329
Poměr šířky a výšky stvolu	-0.3743
Délka listu	-0.051
Šířka listu	-0.4103
Tloušťka listu	-0.2169
Poměr šířky a délky listu	-0.1855
Poměr šířky a tloušťky listu	0.1464
Délka oddenku	-0.0796
Počet pacibulek na 1 cm oddenku	-0.1638
Počet květů	-0.198
Průměrná délka okvětního lístku	-0.0485
Průměrná šířka okvětního lístku	-0.5738
Poměr šířky a délky okvětního lístku	-0.6811

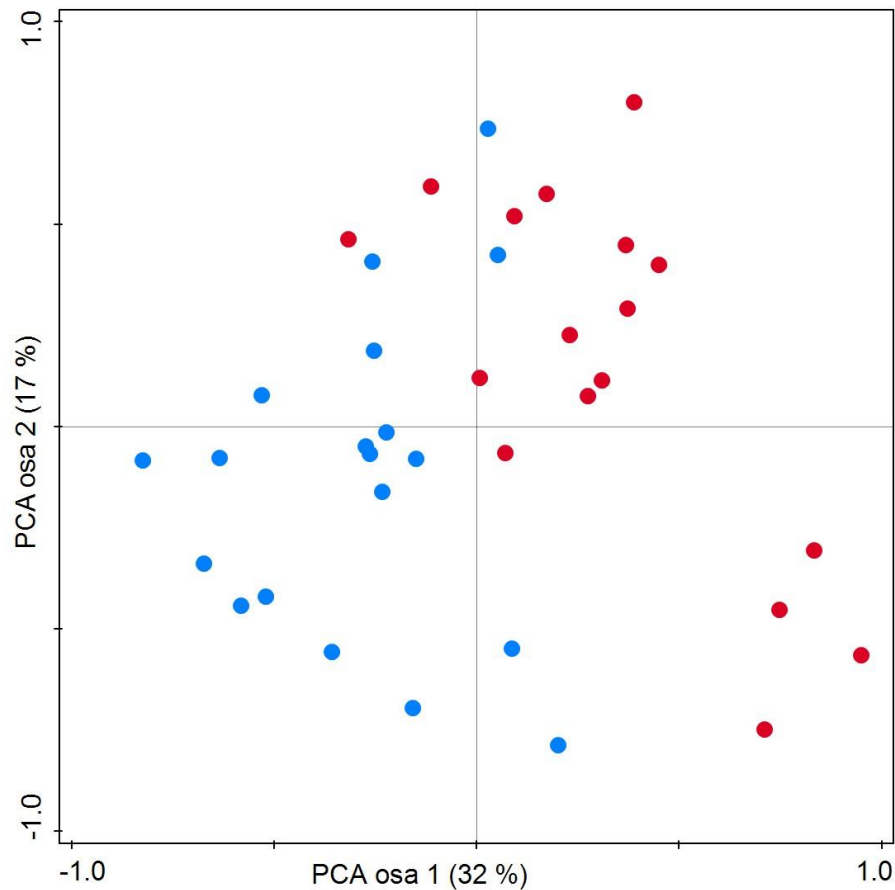
5.3.2 Vyhodnocení znaků rostlin z kultivace

Stejně analýzy jsem využil i ke srovnání diploidních a triploidních rostlin vykvetlých v kultivaci. Celkem znovu vykvetlo v kultivaci 36 rostlin z 90. Z ordinačního diagramu PCA (obr. 21) je i zde patrná separace diploidních i triploidních rostlin, která se zdá být zřetelnější než u rostlin v přírodě. Celkově se zmenšily extrémy ve všech znacích a body jsou ordinačním prostoru rozmístěny na menší ploše. První osa vysvětluje 32 % variability a druhá osa 17 %. Hodnoty jsou tedy podobně analýze rostlin z přírody.

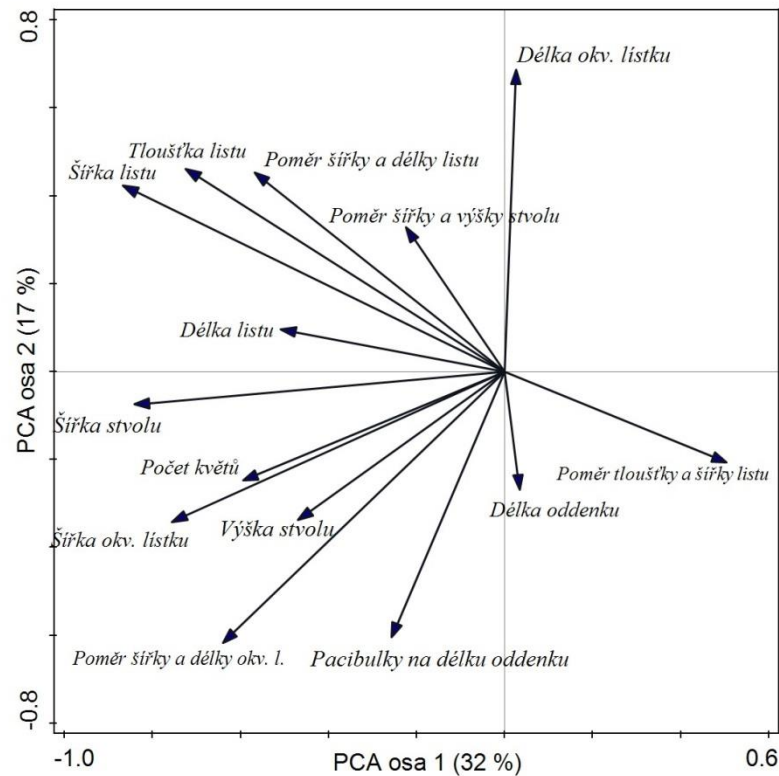
Na obr. 22 je totožný graf, do kterého je promítnuto pouze rozložení znaků v ordinačním prostoru. Z grafu je patrné, že s druhou osou koreluje délka okvětního lístku a ve směru většiny triploidů se zvětšuje poměr šířky a délky okvětního lístku, šířka okvětního lístku, šířka a výška stvolu a počet pacibulek na délku oddenku.

Následná diskriminační analýza v jedné ose rozdělila diploidní a triploidní rostliny bez překryvu, jak je vidět v histogramu (obr. 23, $p = 0,00001$, 99 999 permutací). Rostliny v kultivaci by tedy měly být snáze odlišitelné na základě morfologických znaků. V tab. 4 jsou opět uvedeny diskriminační korelační koeficienty. I v tomto případě hraje v odlišnosti diploidních a triploidních rostlin největší roli poměr šířky a délky okvětního lístku následovaný šířkou okvětního lístku, která v kultuře hraje daleko zásadnější roli než v přírodě. Dalšími ještě relativně významnými znaky jsou šířka stvolu a šířka listu. Další znaky již zde příliš velkou roli nehrají.

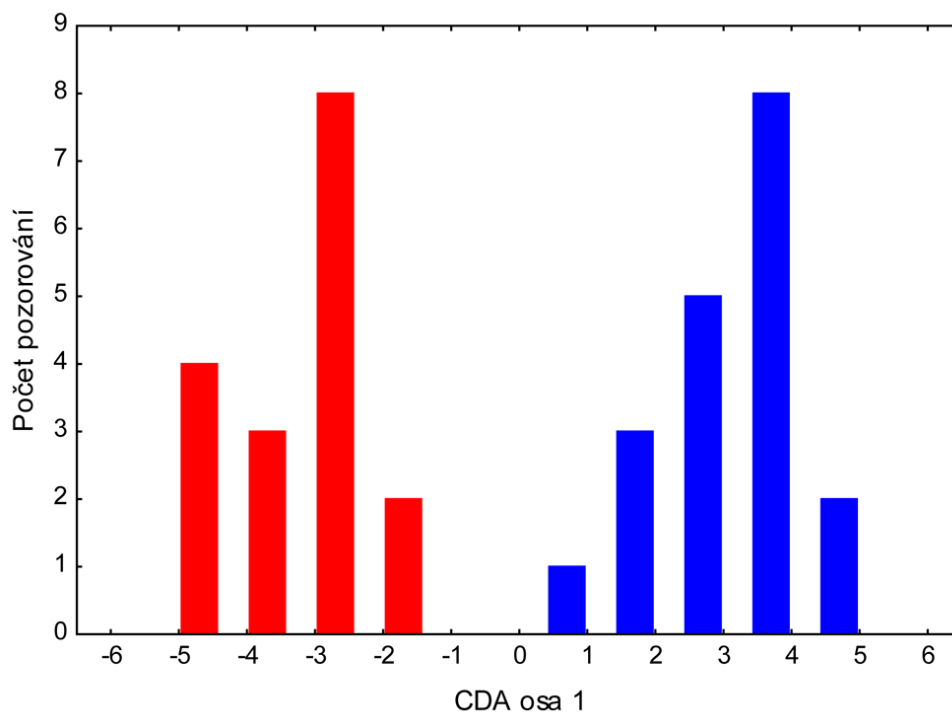
Rostliny v kultuře by tedy měly být ještě snáze odlišitelné pomocí poměru šířky a délky okvětního lístku než v přírodě (absolutní hodnota korelačního koeficientu tohoto znaku je zde vyšší, než případě rostlin z přírody). Téměř totožný korelační koeficient zde má i šířka okvětního lístku, která v případě rostlin z přírody nehrála téměř žádnou roli. Je to pravděpodobně způsobené absencí značné části variability díky totožným podmínkám prostředí v kultivaci.



Obr. 21 Analýza hlavních komponent (PCA) souboru morfologických znaků diploidních (červeně) a triploidních (modře) rostlin měřených v kultivaci.



Obr. 22: Totožná analýza hlavních komponent (PCA), tentokrát s promítnutým vlivem jednotlivých znaků.



Obr. 23: Kanonická diskriminační analýza souboru morfologických znaků diploidních (červeně) a triploidních (modře) rostlin měřených v kultivaci. Analýza rozdělila rostliny dle ploidie v první ose ($p = 0,00001$, 99 999 permutací). Na ose y je počet jedinců pro dané rozmezí kanonického skóre.

Tab. 4: Kanonické diskriminační koeficienty pro každý měřený znak rostlin v kultivaci. Čím vyšší je absolutní hodnota koeficientu, tím hrál zásadnější roli při odlišení cytotypů.

Znak	Koeficient
Výška stvolu	-0.2452
Šířka stvolu	-0.6536
Poměr šířky a výšky stvolu	-0.323
Délka listu	-0.2563
Šířka listu	-0.4622
Tloušťka listu	-0.2795
Poměr šířky a délky listu	-0.2995
Poměr šířky a tloušťky listu	0.3856
Délka oddenku	-0.149
Počet pacibulek na 1 cm oddenku	-0.3062
Počet květů	-0.2638
Průměrná délka okvětního lístku	0.3112
Průměrná šířka okvětního lístku	-0.8191
Poměr šířky a délky okvětního lístku	-0.826

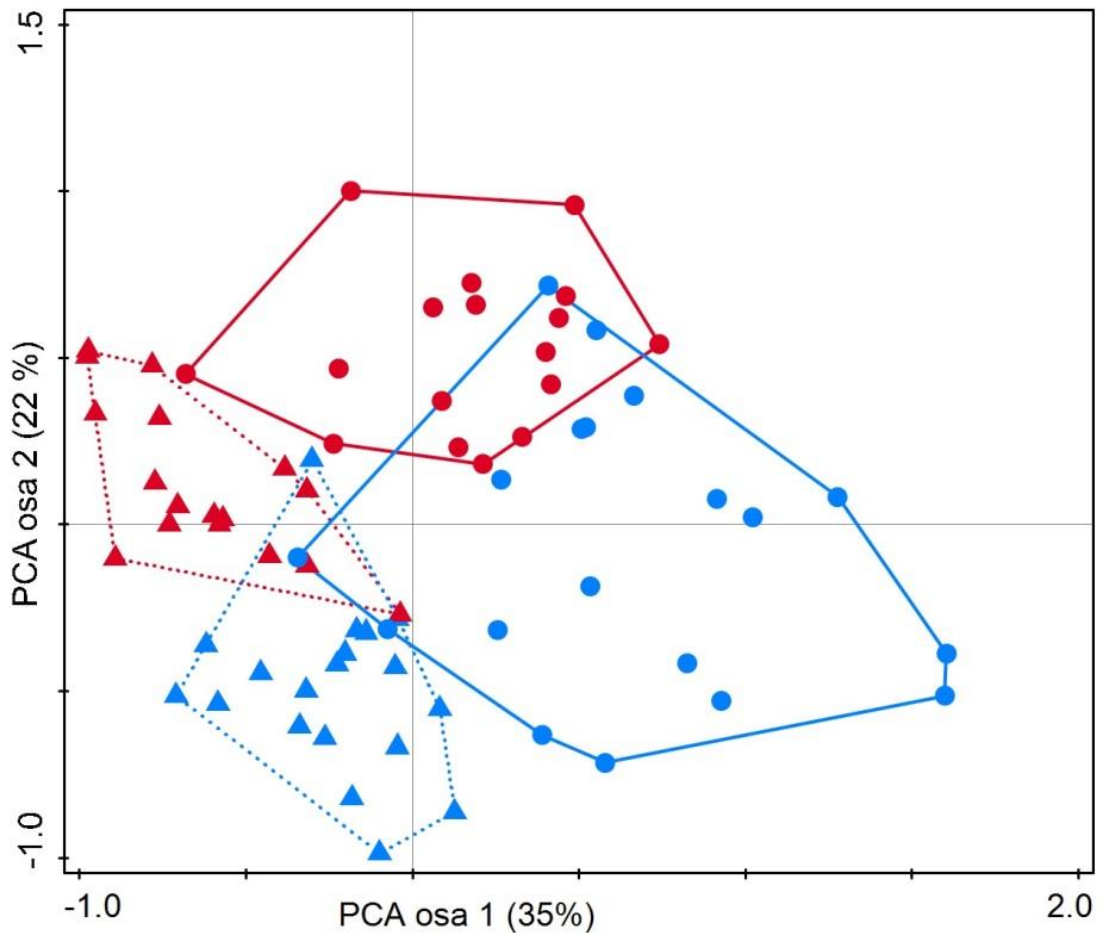
5.3.3 Srovnání znaků rostlin v přírodě a v kultivaci

Pro srovnání rostlin v kultuře a v přírodě jsem využil opět PCA a CDA. Na ordinačním diagramu PCA (obr. 24) je znázorněna variabilita v morfologických znacích diploidních rostlin v přírodě (červená kolečka, plná čára ohraničuje extrémy) a totožných rostlin v kultivaci (červené trojúhelníky, tečkovaná čára ohraničuje extrémy) a variabilita triploidních v přírodě (modrá kolečka, plná čára ohraničuje extrémy) a totožných rostlin v kultivaci (modré trojúhelníky, tečkovaná čára ohraničuje extrémy). Z grafu je patrné, že rostliny se morfologicky neliší pouze mezi ploidiemi, ale také se značně mění po přesazení do kultury. Po přesazení se zmenšuje morfologická variabilita znaků u diploidů a triploidů díky uniformitě prostředí v kultuře a znaky se stabilizují.

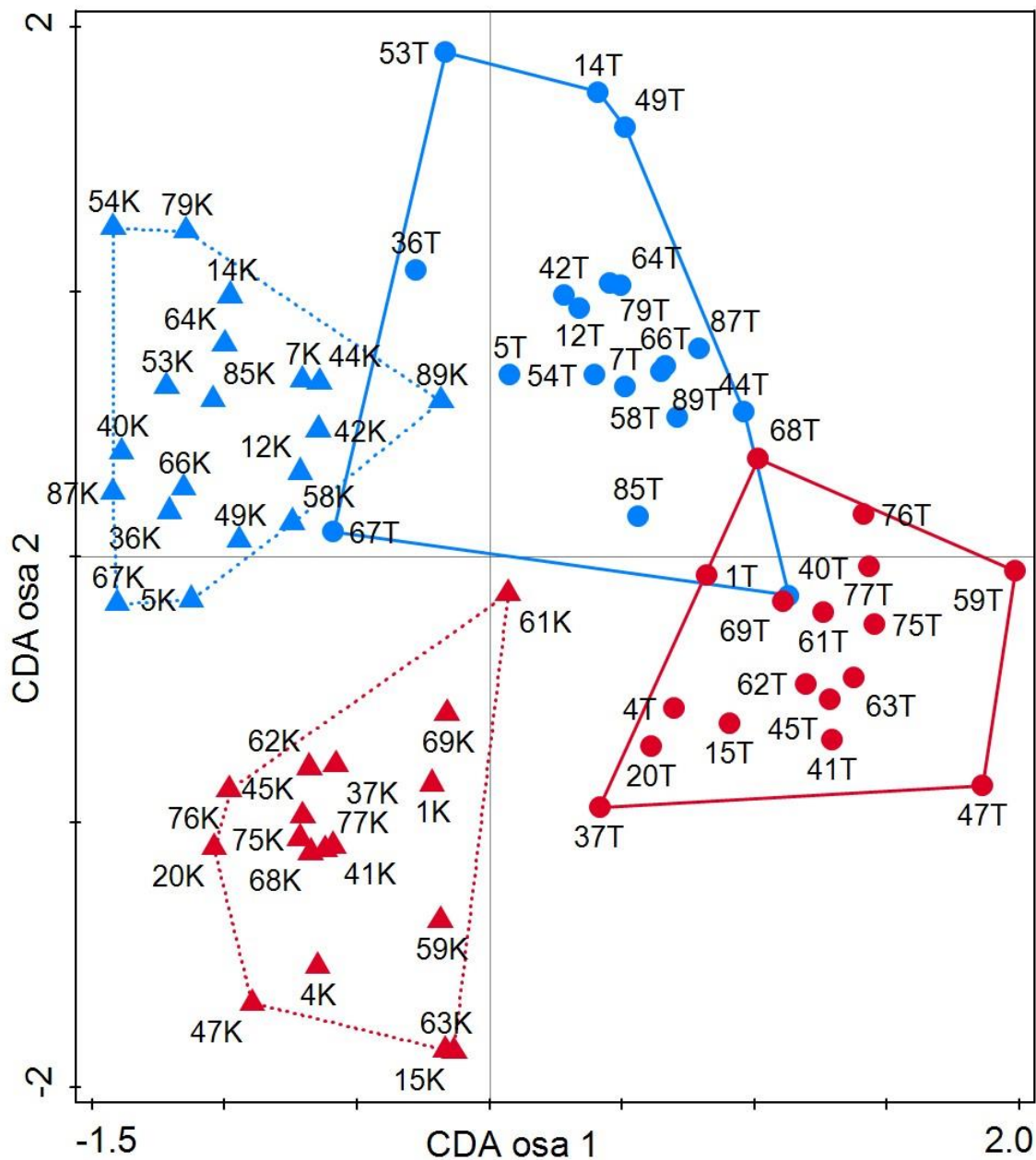
Diskriminační analýza dále prohloubí rozdíly mezi jednotlivými skupinami rostlin (obr. 25) V grafu jsem ponechal identifikační čísla jednotlivých rostlin, aby bylo možné dohledat posun ve znacích každého jedince po přesazení do kultury.

V tab. 5 jsou kanonické korelační koeficienty obou os diskriminační analýzy. V první ose jsou rostliny rozděleny do skupin podle toho, zda byly měřeny v terénu, nebo v kultivaci. Podle koeficientů je zřejmé, že se rostliny nejvíce změnily v délce listu, počtu květů a výšce a šířce stvolu. U všech těchto znaků se v kultivaci zmenšila jejich hodnota. Rostliny byly nižší, měly kratší listy a méně květů a celkově byly méně robustní.

Druhá osa rostliny rozděluje podle ploidní úrovně. Zde opět hraje, podobně jako v předchozích měřeních, největší roli poměr šířky a délky okvětního lístku i samotná šířka okvětního lístku. I ostatní znaky jsou podobně významné jako v samostatných analýzách rostlin z přírody a z kultury.



Obr. 24: Analýza hlavních komponent (PCA) kombinace souborů znaků měřených na rostlinách v přírodě a poté znovu v kultivaci. Červeně jsou znázorněny diploidní rostliny, modře rostliny triploidní. Kolečky jsou znázorněny rostliny měřené v terénu, trojúhelníky ty samé rostliny přeměřené znovu v kultivaci. Plná čára ohraničuje extrémy ve znacích rostlin v přírodě a tečkovaná čára u rostlin v kultivaci.



Obr. 25: Kanonická diskriminační analýza (CDA) kombinace souborů znaků měřených na rostlinách v přírodě a poté znovu v kultivaci. Červeně jsou znázorněny diploidní rostliny, modře rostliny triploidní. Kolečky jsou znázorněny rostliny měřené v terénu, trojúhelníky totožné rostliny přeměřené znovu v kultivaci. Plná čára ohraňuje extrémy ve znacích rostlin v přírodě a tečkovaná čára u rostlin v kultivaci. Čísla znázorňují kódy jednotlivých jedinců, aby bylo možné dohledat posun ve znacích konkrétních jedinců po přesazení do kultivace. První osa rozděluje jedince podle posunu znaků mezi terénem a kultivací a druhá osa podle ploidie ($p = 0,00001$, 99 999 permutací).

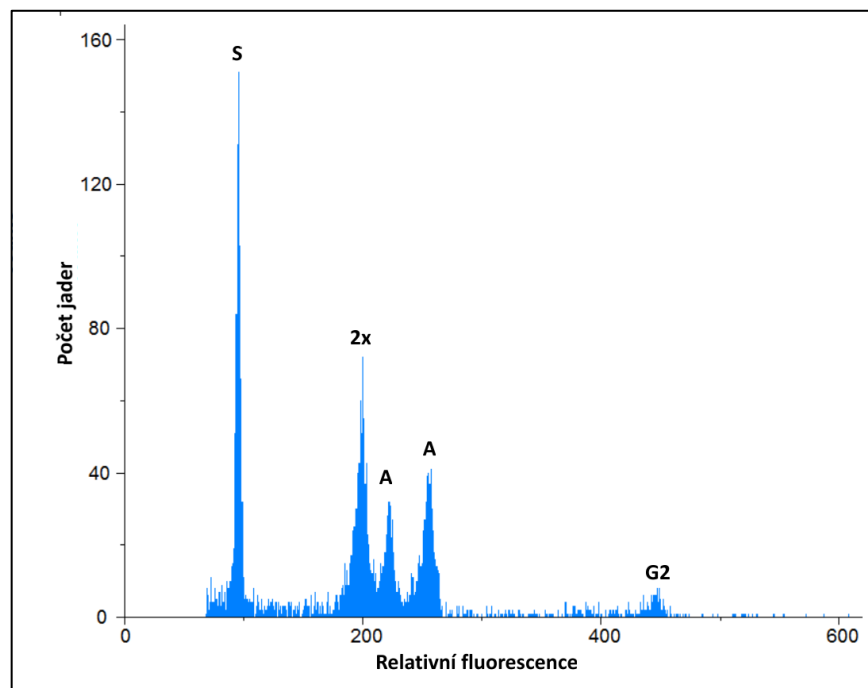
Tab. 5: Kanonické diskriminační koeficienty pro každý měřený znak rostlin v kultivaci. Čím vyšší je absolutní hodnota koeficientu, tím hrál zásadnější roli při odlišení cytotypů. 1. osa rozděluje rostliny podle posunu znaků po přesazení do kultivace, 2. osa podle ploidní úrovně.

Znak	Koeficient 1. osa	Koeficient 2. osa
Výška stvolu	0.4753	0.458
Šířka stvolu	0.4438	0.6206
Poměr šířky a výšky stvolu	-0.079	0.2896
Délka listu	0.7416	0.4042
Šířka listu	-0.0308	0.4992
Tloušťka listu	0.3015	0.3183
Poměr šířky a délky listu	-0.7281	-0.0462
Poměr šířky a tloušťky listu	0.4316	-0.0972
Počet pacibulek na 1 cm oddenku	0.0531	0.3491
Počet květů	0.5627	0.4316
Průměrná délka okvětního lístku	-0.2574	-0.0926
Průměrná šířka okvětního lístku	-0.4769	0.6129
Poměr šířky a délky okvětního lístku	-0.3756	0.6702

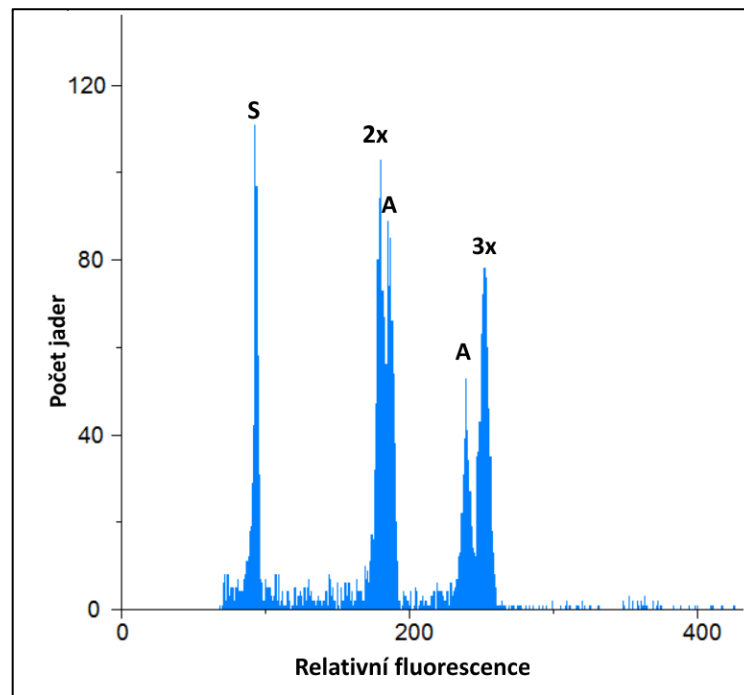
5.4 Cytotypová variabilita semenáčků

Celkem jsem zanalyzoval 20 semenáčků vyrostlých ze semen triploidní rostliny (obr. 28) a stejný počet semenáčků diploidní rostliny. Nízký počet analyzovaných semenáčků je dán především malým množstvím semenáčků z triploidní rostliny, které vyrostly do stadia, ve kterém měly již alespoň centimetrový pravý list. Cytometrie děložního lístku nebyla možná, pravděpodobně kvůli velkému množství obsahových látek, které narušovaly analýzy.

Mezi semenáčky vzrostlých ze semen diploidní rostliny jsem našel pouze diploidní cytotyp. Naopak semenáčky z triploidní rostliny byly velmi variabilní v relativní velikosti genomu (obr. 26 a 27). Bylo mezi nimi mnoho aneuploidů o různé velikosti genomu. Tvorba aneuploidních semen triploidy již byla dokázána v experimentálních podmínkách, jak již bylo řečeno v předchozích kapitolách. Některé semenáčky vypadaly, že jsou to i čistí diploidní nebo triploidní jedinci, ale přesný počet chromozomů jsem nemohl pouze na základě průtokové cytometrie stanovit. Je tedy možné, že triploidní rostliny mohou zpětně pomocí semen generovat diploidy, nebo se dále šířit semeny jako triploidy. Aneuploidní jedince jsem mezi dospělými rostlinami neobjevil, je proto pravděpodobné, že aneuploidie je pro ně v určitém stadiu ontogeneze letální. Mně se dopěstovat aneuploidy do více než 4 cm velikosti listu nepodařilo z důvodu napadení rostlin i substrátu plísní, která je zahubila.



Obr. 26: Analýza průtokové cytometrie (FCM) vzorku vytvořeného ze 3 semenáčků ze semen triploidní rostliny. **S** značí interní standard (*Bellis perennis*), **2x** pravděpodobného čistého diploida a **A** aneuploidní jedince. **G2** značí pík buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Analyzováno bylo 3000 jader.



Obr. 27: Analýza průtokové cytometrie (FCM) vzorku vytvořeného ze 4 semenáčků ze semen triploidní rostliny. **S** značí interní standard (*Bellis perennis*), **2x** pravděpodobného čistého diploida, **A** aneuploidní jedince a **3x** pravděpodobného čistého triploida. Analyzováno bylo 3000 jader.



Obr. 28: Detail semen 2 z triploidní rostliny (vlevo) a 2 semen diploidní rostliny (vpravo). Nápadný je rozdíl v barvě a velikosti semen, který ale může být čistě náhodný.

5.5 Variabilní mikrosatelitové lokusy

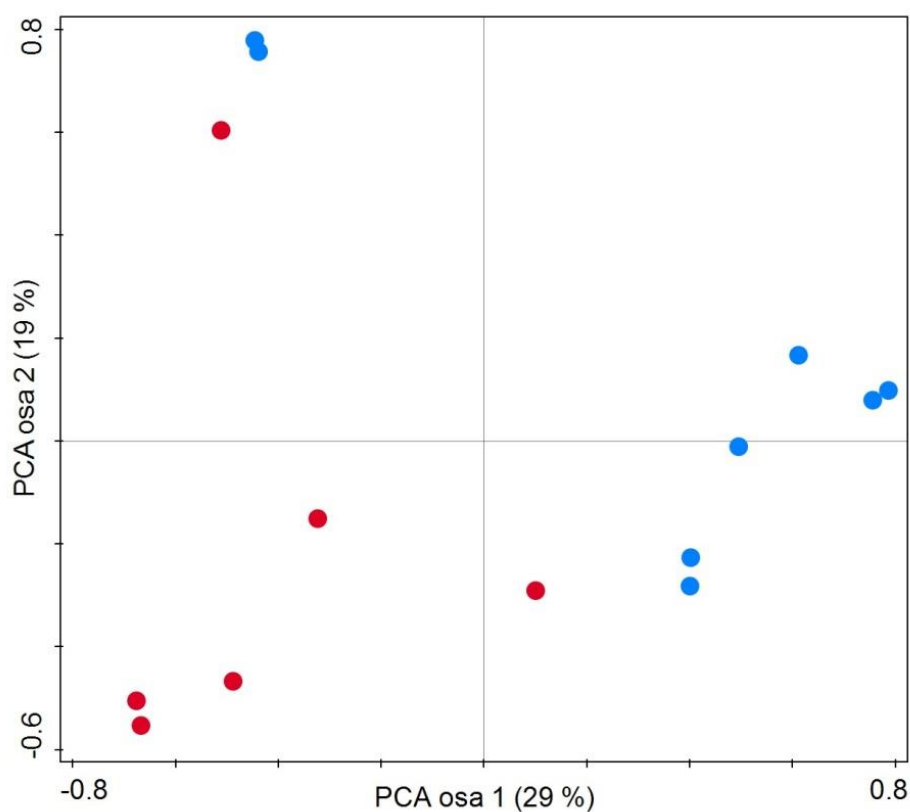
Celkem se mi podařilo vytvořit primery pro 14 variabilních mikrosatelitových lokusů (tab. 6) obsahujících di- tri- a tetranukleotidové motivy repetice. Délky výsledných produktů se pohybují od 100 do přibližně 450 párů bází. Tyto délky jsou uvedeny i ocáskem pro univerzální fluorescenčně značený M13 primer. Délky produktů s již značeným forward primerem budou tedy přibližně o 20 párů bází kratší. Všechny tyto lokusy se dobře amplifikují při teplotě annealingu PCR 55 °C.

Tab. 6: Přehledová tabulka primerů ke 14 variabilním mikrosatelitovými lokusům. Ke každému páru primerů je uveden motiv repetice mikrosatelitu, délka motivu a rozmezí délek produktů.

Název lokusu	Sekvence forward primeru	Sekvence reverse primeru	Motiv	Délka motivu	Rozmezí délek produktu
BUT4	CAGCAGATCAATCATGGACA	TGAAAACGATGTGCAAGTCT	CTTT	4	180–215
BUT6	TCATTCAGTCGAGCACCT	TGCAGAAACGGATTGCTGAG	CTT	3	105–130
BUT14	TGATAATGAGAACGACCAGTC	CCATGCATCAAACCACAAACA	TC	2	100–145
BUT15	TTGTGGGATTGTGTAGGCCT	ATCCTCCTCTGCTGCCTTTT	GAA	3	195–220
BUT28	TCTTCGTAAAACACCCCGCA	GAAAGCAGGCATTTCACTTGT	CA	2	290–310
BUT29	GCAAAACTCCAGCACGAAATCA	AGGATTCCATGAGCTTCCCG	GA	2	185–220
BUT31	GAAGGAGGGGATGGAGAGGT	TGATGTGATTGCAAATACTCT	GA	2	220–270
BUT32	GTTTCCTGTTGCCCTCTCA	TTGTGCATCCCTTCCCTCAC	TC	2	100–130
BUT34	AGGTTTGTATCCCAGCATTTCT	TGATGAACCGGGTCGAAAGG	GA	2	255–300
BUT37	TGGTTCTTCACTAGGCCACA	TGTCATCTTTAACATGGCCACG	TTCC	4	365–445
BUT39	CCTTGAAAGAATCCCGAATGTGT	CCCTTCTCCTTGCCCTTTCC	TCT	3	200–240
BUT41	ACCTTCACCACGGGATCCTA	GCCTTGCATTATGGTGAGAGA	AAAG	4	290–320
BUT42	ATGGACGCATGCCCTTCAA	GCCATGGTGCCTTAAGAACG	GAAA	4	231–371
BUT45	ACGGATTGCTAAGACCCACG	TGCAGGAGATAAGGCAGCAC	GAA	3	150–215

5.5.1 Genetická variabilita 14 rostlin šmelu okoličnatého

Z grafu (obr. 29) je patrné, že diploidní a triploidní jedinci (i přes malý počet vzorků) netvoří dvě výrazně oddělené skupiny ale je zde náznak blízké příbuznosti některých diploidních a triploidních rostlin, což by mohlo být způsobeno opakovaným vznikem triploidního cytotypu. Mezi triploidy i diploidy je také zřetelná blízká vzdálenost několika dvojic jedinců, pravděpodobně se bude jednat o klony. Vzhledem k nízkému počtu a specifickému výběru vzorků nelze tyto výsledky genetické variability zobecnit pro celou oblast Východoslovenské nížiny, ale je pravděpodobné, že se zde bude nacházet velké množství specifických genotypů.



Obr. 29: Analýza hlavních komponent (PCA) genetických vzdáleností 6 diploidních (červeně) a 8 triploidních (červeně) jedinců použitých pro vývoj mikrosatelitových primerů.

6 Diskuse

6.1 Distribuce cytotypů a cytotypová struktura populací

Během hledání všech populací šmelu jsem se snažil rovnoměrně pokrýt celé území a všechny typy biotopů, ve kterých by se mohly populace šmelu vyskytovat. V roce 2013, kdy jsem byl pouze ověřovat výskyt obou cytotypů a hledat smíšené populace byl ještě relativně vlhký rok. Sezóna 2014 byla již značně suchá a sezóna 2015 byla nejsušší. Bohužel většinu sběrů vzorků jsem měl naplánovanou na roky 2014 a 2015, kdy bylo vlhko prakticky pouze v hlubokých tůních a některých odvodňovacích kanálech. Proto je zastoupení jednotlivých biotopů u nalezených populací tak nerovnoměrné. V oblasti se vyskytuje obrovské množství vlhkých depresí a hodně polí s mokřými částmi, takže výskyt šmelu v těchto biotopech zde bude mít pravděpodobně mnohem větší zastoupení, než to vypadá z mých dat. U vlhkých depresí je také nalezení šmelu v zapojeném porostu značně náhodné pokud je sterilní, což při nedostatku vody často bývá. Sám jsem několik lokalit, které byly v roce 2013 velmi vlhké navštívil opakovaně a v roce 2014 a 2015 byly vyprahlé a šmel jsem zde již nenašel. Příkladem může být lokalita č. 37 (sloupec GPS-kód v tab. 7, kapitola 9.1) u obce Ladmovce, kde jsem v r. 2014 vytyčil 2 trvalé plochy. V roce 2013, kdy jsem tuto lokalitu objevil, zde kvetlo velké množství jedinců obou cytotypů šmelu (obr. 30). Další rok v době založení trvalých ploch již byla lokalita téměř suchá, šmel byl ještě častý ale převážně sterilní (kvetlo kolem 5 jedinců). Následující rok byla již lokalita značně vyprahlá, obehnaná elektrickým ohradníkem a pásly se zde krávy (obr. 31). Šmel jsem zde v roce 2015 již vůbec nenašel.

Je pravděpodobné, že šmel přečkává suché sezóny pouze v oddencích, aniž by mu to nějak výrazně uškodilo. Podle písemného sdělení (M. Dudáš) letos (2016) šmel na lokalitě č. 37 opět kvete, protože je v celé oblasti dostatek vláhy. Bylo by velmi zajímavé plochu znovu prosbírát a zjistit, jaký vliv měly dvě suché sezóny a pasení krav na cytotypovou strukturu populace.

Stejně tak je pravděpodobné, že zde bude ještě výrazně větší zastoupení smíšených populací. Jak je vidět z cytotypové struktury smíšených populací (obr. 12, 13 a 14), mohou oba cytotypy prorůstat vzájemně dohromady (trvalá plocha č. 2 obr. 13, vypadala jako jeden souvislý téměř sterilní porost). Při prosbírání např. 30 rostlin v populaci a při malém zastoupení některé ploidie, je dosti pravděpodobné, že tato ploidie nebude objevena. Sám jsem u několika opětovně navštívených lokalit po důkladnějším prosbírání zjistil, že jsou smíšené, i když jsem je měl vedené jako cytotypově uniformní. Je proto otázkou, zda se skutečně jinde v Evropě smíšené populace nevyskytují, nebo zatím unikají pozornosti kvůli

nedokonalému prosbírání populací. Nenáhodnost rozmístění jedinců obou ploidí na ploše 1 a 2 může být způsoben dlouhodobějším nerušeným vegetativním růstem, zatímco plocha 3 je v proudící vodě (odvodňovací kanál), kde často intenzivně proudí velké množství vody a zamezuje vzniku kompaktního porostu vegetativním růstem.



Obr. 30: Rozkvetlá smíšená populace šmely ve vlhké depresi u obce Ladmovce (sloupec **GPS-kód** č 37, sloupec **Pořadí** č. 20 v tab. 7) v roce 2013. Na lokalitě se nachází plocha 1 a 2. V době založení plochy v r. 2014 zde byly již téměř všechny rostliny sterilní. Foto M. Čertner



Obr. 31: Stejná lokalita jako na obr. 30 v roce 2015 rok po založení ploch. Na vyprahlé lokalitě se nacházela pastvina pro krávy a šmel zde tento rok již vůbec nevyrostl.

6.2 Stanovištní preference cytotypů

V oblasti Východoslovenské nížiny jsem nepozoroval žádné významné rozdíly mezi stanovištními preferencemi obou cytotypů. Je to do značné míry dáno tím, že triploidní cytotyp je zde hojnější a diploidní cytotyp roste daleko častěji ve smíšených populacích, než v cytotypově uniformních populacích. Čistě diploidní populace čítaly většinou několik málo jedinců a nebyly nikterak stanoviště odlišné od ostatních populací.

Na mokřem poli se vyskytovaly pouze dvě populace, jedna čistě diploidní a jedna čistě triploidní. Stejně tak o něco více rozšířenější vlhké deprese hostily populace cytotypově uniformní, ale také již populace smíšené. Smíšené populace se hojně vyskytovaly v odvodňovacích kanálech i v tůňkách. V obou případech bylo smíšených populací stejně jako čistě triploidních. Čistě diploidních bylo minimum (1 resp. 3). Tyto rozdíly v zastoupení populací v jednotlivých biotopech mohou být dány několika skutečnostmi. O přehlédnutelnosti sterilních populací a vlivu suchých sezón jsem diskutoval v předcházející kapitole. Další možností je ještě nějaký další skrytý faktor, který předurčuje větší rozšíření triploidního cytotypu.

Triploidní cytotyp může mít větší ekologickou amplitudu než diploidní cytotyp, jak bylo experimentálně dokázáno na rostlinách z České republiky (Hroudová et Zákřavský 1993b). Pro účely těchto experimentů však byly použity rostliny z různých oblastí. Z tohoto důvodu mohly být pozorované rozdíly v ekologických nárocích obou cytotypů dány vlastnostmi konkrétní populace, potažmo konkrétních genotypů. Pro komplexní zhodnocení vlivu ploidie na ekologické nároky a morfologické vlastnosti by bylo vhodné přiřadit konkrétní genotypy k daným rostlinám. Díky tomu bychom mohli posoudit, zda má větší vliv ploidie, nebo konkrétní genotyp na studované znaky.

Dalším důvodem většího rozšíření triploidního cytotypu v oblasti je může být existence specifických adaptací k rychlejšímu a úspěšnějšímu šíření triploidního cytotypu. Tyto adaptace byly popsány v pracích (Krahulcová et Jarolímová 1993, Hroudová et Zákřavský 1993a, Eckert. et al. 2003). O morfologických adaptacích obou cytotypů je pojednáno v následující kapitole.

6.3 Morfologické rozdíly mezi cytotypy a možnosti šíření

Na základě výsledků analýz je zřejmé, že se dají diploidní a triploidní rostliny odlišit na základě morfologických znaků. Během pozorování v terénu jsem byl schopen na základě vzhledu rozpoznat ploidní úroveň odhadem asi 80 % procent kvetoucích rostlin (sterilní rostliny se rozpoznat nedají). Hlavním morfologickým rozdílem mezi ploidiemi je už na první pohled poměr délky a šířky okvětních lístků (obr. 32). Diploidní rostliny mají okvětní lístky zřetelně užší, což je na rostlině nejnápadnější. Diploidní rostliny dle vlastního pozorování mají méně intenzivně růžově zbarvené květy a často jsou téměř bílé. Hodnocení intenzity barevnosti květů jsem měl původně také v plánu, ale kvůli problematickému vyhodnocování barvy každého jedince jsem se rozhodl toto měření vynechat.

Některé znaky na květech se mění podle stáří květu a pozici v okolíku. Nejdříve vykvetlé květy bývají největší, avšak zachovávají si poměrné znaky shodné (což neplatí pouze pro květy). Proto jsem do morfometrických analýz zařadil několik poměrných znaků, které měly eliminovat extrémy absolutních znaků. Květy rozkvetlé později již bývají menší a během odkvétání ztrácejí intenzitu barvy (platí pro všechny květy). Triploidní rostliny mají květy často velké a okvětní lístky mohou být i širší než delší. Toto jsem u diploidů nikdy nepozoroval. Je otázkou, k čemu jsou triploidům velké barevné květy, když netvoří téměř žádná semena a šíří se pravděpodobně hlavně vegetativně. Může se pravděpodobně jednat pouze o náhodné zvýraznění tohoto znaku způsobené polyploidizací bez zásadního evolučního významu.

Další znaky jsou už méně spolehlivé a ploidní úroveň se podle nich detekuje obtížně. Ještě je možné se orientovat šířkou listu a šířkou stvolu, kterou mívají větší triploidní jedinci, ale v terénu to lze využít jen omezeně.

Všechny tyto znaky jsou mnohem výraznější na smíšených lokalitách, kde lze odlišit téměř každého kvetoucího jedince (někdy i sterilního, podle šířky listu a jeho poměru k délce, ale nespolehlivě). Na ostatních lokalitách se uplatňují již mikrostanovištní rozdíly a rostliny bývají špatně rozpoznatelné. Zvláště absolutní velikosti znaků bývají velmi variabilní. Na suchých místech bývají rostliny obecně menší a na velmi vlhkých mnohem mohutnější.

V literatuře udávaná častá tvorba pacibulek v květenství triploidními rostlinami (Hroudová et Zákavský 1993a, Bailey et Preston 2011) se v této oblasti neuplatňuje. Našel jsem pouze jedinou rostlinu (triploidní), která tyto pacibulky tvořila. Stejně tak udávaný rozdíl v tvorbě oddenkových pacibulek (pupenů) jsem nepozoroval, diploidní i triploidní rostliny jich netvořily výrazně jiný počet. Naopak z experimentů udávanou tvorbu semen triploidy jsem pozoroval, zvláště na smíšených populacích. Většinou bylo pouze několik desítek semen na jednu tobolku. Diploidní jedinci měly vždy plné tobolky (měchýřky) semen (obr. 33). Pouze jednou jsem našel triploidní rostlinu s výrazně velkým počtem semen (několik set) v tobolkách. Tato lokalita sice byla cytotypově uniformní ale nedaleko smíšených populací, takže mohla být opylena diploidním jedincem, což je jeden z předpokladů pro tvorbu semen triploidy (Krahulcová et Jarolímová 1993). Semena této rostliny jsem využil v experimentu s měřením ploidie semenáčků (kap. 5.4).

Zajímavá je rovněž změna znaků po přesazení rostlin do rovnocenných podmínek v kultuře. Rostliny (diploidní i triploidní) se téměř ve všech svých znacích (vegetativních) zmenšily. Průměrná délka listu se zmenšila na polovinu své původní hodnoty i všechny ostatní znaky na listu se zmenšily, poměrné znaky se nezměnily. Zmenšila se také šířka i výška stvolu. Značně klesl i průměrný počet květů v okolíku (u diploidů o třetinu a u triploidů téměř o polovinu). Naopak mírně narostla velikost květů. Nejvíce se projevil nárůst délky okvětních lístků u diploidů (v průměru o 2 mm). I přes to jsou květy orgánem s nejvíce konstantními hodnotami znaků, tedy jen málo závislé na charakteru prostředí a poměry znaků jsou v tomto ohledu nejvhodnější pro morfologické zhodnocení. Zmenšení hodnot mnoha znaků po přesazení do kultury může být způsobeno dvěma hlavními faktory:

1) Podmínky v kultuře byly pro rostliny nevhodné (i přes dostatek vláhy celou sezónu) např. z důvodu malého množství živin v substrátu, nebo

2) rostliny byly oslabeny oddělením pouze malé části oddenku, kterou jsem přesazoval do kultury, a vykvetly pouze rostliny, které měly nahromaděných nejvíce zásobních látek, ale i tak nemohly investovat tolik energie do tvorby svých orgánů.

I přes uvedené morfologické rozdíly mezi ploidiemi jsem našel několik jedinců diploidů i triploidů, které v mnoha znacích připomínaly opačnou ploidií a jejich identifikace byla možná pouze na základě průtokové cytometrie. Je tedy zřejmé, že spoléhat pouze na morfologii není vhodné.

Na základě neprokázaných rozdílů v množství vytvořených vegetativních oddenkových pacibulek a absence významné tvorby pacibulek v květenství je tedy záhadou, proč jsou v oblasti rozšířenější triploidní rostliny, když se diploidi mohou navíc šířit semeny, kterých většinou vytváří 1 rostlina tisíce. Pravděpodobně v tom budou hrát roli nějaké další faktory, které by byly vhodné k dalšímu studiu. Je také možné, že se šíření pomocí semen v této oblasti uplatňuje velmi zřídka. Pomocí nově vytvořených jaderných mikrosatelitových markerů v kombinaci s analýzou chloroplastové DNA by bylo možné zmapovat genotypovou variabilitu a historii šmelu okoličnatého v této oblasti (potažmo v celé Evropě) a objasnit procesy, vedoucí k prolínání různých znaků mezi diploidními a triploidními rostlinami, které jinde nebylo pozorováno v takové míře. Příkladem může být chování rostlin v sekundárním areálu v Severní Americe, kde diploidní a triploidní rostliny vykazují odlišné chování v parametrech vegetativního šíření než rostliny evropské (Eckert et al. 2003, Lui et al. 2005, Bailey et Preston 2011) a můžeme tedy přepokládat vazbu znaků nejen na ploidií ale v různé míře i na konkrétní genotyp. Zvláště i z důvodu výskytu rostlin v morfologických znacích odpovídajícím americkým jedincům v oblasti Východoslovenské nížiny.

Stejně tak zajímavá je otázka, zda se zde mohou triploidní jedinci skutečně šířit pomocí semen. Na základě analýzy ploidní úrovně potomstva triploidní rostliny jsem ověřil, že semena mohou normálně vyklíčit, ale potomstvo je převážně výrazně aneuploidní. Dospělé aneuploidy jsem nikde v přírodě neobjevil, a je tedy pochyb o jejich dlouhodobější životaschopnosti. Přesto jsem objevil i semenáčky této rostliny, které byly zjevně čistě diploidní i čistě triploidní, což může znamenat i možnost zpětného generování diploidů triploidní rostlinou i rozšiřování triploidů semeny. Jak se toto uplatňuje ve skutečnosti, není jasné a bylo by to vhodné ověřit opět molekulárními metodami.



Obr. 32: Srovnání květů v terénu 4 diploidních a 3 triploidních rostlin odebíraných do kultivace ze smíšené lokality (sloupce **GPS-kód** č. 51, sloupec **Pořadí** č. 33 v tab. 7, kapitola 9.1).



Obr. 33: Srovnání tobolek diploidní (vlevo) a triploidní (vpravo) rostliny. Tobolky (méchýřky) diploidů jsou větší a plné semen, tobolky (méchýřky) triploidních rostlin se při zasychání zmenšují a zpravidla obsahují velmi málo, nebo žádná semena.

6.4 Možnosti vzniku triploidů *de novo*

Je zajímavou otázkou, zda triploidní cytotyp vznikl v evoluční historii pouze jednou a následně se prosadil na úkor diploidního předka, nebo zda triploidní rostliny vznikají opakovaně. Pro první hypotézu může mluvit fakt, že jsou jedinci morfologicky odlišní, což by mohlo odpovídat dlouhé izolovanosti obou linií a také fakt, že se tento druh šíří velmi snadno vegetativně, což může také dobře konzervovat náhodně vzniklé triploidy, kteří nemají schopnost generativního rozmnožování.

V oblasti Východoslovenské nížiny se vyskytuje mnoho smíšených populací a někteří jedinci mají fenotyp podobný opačné ploidii. To by naopak mohlo odpovídat opakovanému vzniku triploidů ve smíšených populacích. Proto jsem se rozhodl vyvinout jaderné mikrosatelitové markery, pomocí kterých by bylo možné objasnit genotypovou strukturu populací a příbuznost jedinců.

Z grafu genetických vzdáleností mezi 14 jedinci (obr. 28, kapitola 5.5.1) je patrný náznak blízké příbuznosti některý, což by mohlo naznačovat jejich nedávnou společnou evoluční historii. Pro jistý důkaz. Pro bezpečný důkaz opakovaného vzniku triploidů z diploidů a stejně tak pro ověření možného zpětného generování diploidů triploidními rostlinami by bylo nutné molekulárně zanalyzovat velké množství vzorků ze smíšených populací a zkombinovat analýzu jaderných mikrosatelitových markerů s analýzou chloroplastové DNA, která by nám díky uniparentální dědičnosti v kombinaci s jadernými markery pomohla s jistotou detekovat rodiče a evoluční historii každého jedince

7 Závěr

V oblasti Východoslovenské nížiny jsem objevil celkem 72 populací šmelu okoličnatého (*Butomus umbellatus*). Triploidní cytotyp je zde častější a nejčastěji tvoří uniformní populace (34). Diploidní cytotyp mnohem častěji roste ve smíšených populacích (30) než v uniformních (8). Ve třech plochách vytyčených ve dvou smíšených populacích bylo zastoupení obou cytotypů poměrně vyrovnané. Na obou trvalých plochách z lokality 37 (GPS-kód) ve vlhké depresi bylo rozmístění jedinců stejné ploidie nenáhodné, pravděpodobně z důvodu převažujícího nerušeného vegetativního růstu. Naopak na lokalitě 51 (GPS-kód) v odvodňovacím kanále bylo rozmístění jedinců náhodné, pravděpodobně z důvodu častých disturbancí způsobených proudící vodou.

Na základě soupisů druhů cévnatých rostlin provedených na každé lokalitě a následných analýz jsem neobjevil žádné odlišnosti ve stanovištních preferencích obou cytotypů, ani v preferencích určitého typu biotopu (tůň, vlhká deprese, odvodňovací kanál, mokré pole).

Podle morfologických analýz souboru znaků na rostlinách v přírodě a na stejných rostlinách v následné kultivaci, jsem ověřil morfologickou odlišnost obou cytotypů v přírodních podmínkách. Odlišnosti se ještě více projeví při následné kultivaci, která eliminuje extrémní způsobené stanovištními podmínkami. Nejdůležitějším znakem pro odlišení diploidní a triploidní rostliny je poměr šířky a délky a šířky vnitřního okvětního lístku, který se u diploidů pohybuje zpravidla v rozmezí hodnot 0,5–0,7 a u triploidů 0,7–1,1. Mezi rostlinami lze najít i jedince, kteří svými morfologickými znaky odpovídají spíše opačné ploidii. Naopak jsem nepozoroval z literatury známé rozdíly v možnostech vegetativního šíření. Triploidní rostliny v této oblasti zpravidla netvoří vegetativní pacibulky v květenství a diploidní rostliny naopak tvoří přibližně stejně oddenkových pacibulek jako rostliny triploidní. To může poukazovat na možnou vazbu těchto znaků spíše na konkrétní genotyp než na ploidní úroveň.

Analýzou ploidní úrovně semenáčku vyrostlých ze semen triploidní rostliny jsem potvrdil značný podíl aneuploidů v potomstvu známý z experimentálních podmínek (citace), kteří se však v přírodě jako dospělci pravděpodobně nevyskytují. V potomstvu se také vyskytovaly pravděpodobně čistě diploidní i triploidní jedinci, což by mohlo poukazovat na možné šíření triploidů pomocí semen i zpětné generování diploidů triploidními rostlinami.

Aby bylo možné analyzovat genetickou variabilitu a evoluční historii diploidních a triploidních rostlin ve smíšených populacích a celých regionech, vyvinul jsem primery pro 14 variabilních jaderných mikrosatelitových lokusů, které umožní ještě komplexnější zhodnocení vazby znaků na konkrétní genotypy a cytotypy. Po vynesení genetických vzdáleností 14 analyzovaných jedinců do PCA grafu je nápadná genetická blízkost některých diploidních jedinců s triploidními.

8 Literatura

- Abdelkrim J., Robertson B., Stanton J. A., Gemmill N. (2009): Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. – *Biotechniques*, 46: 185–192.
- Bailey J. P. et Preston Ch. D. (2011): Spatial separation of diploid and triploid *Butomus umbellatus* in Britain and Ireland. – *New Journal of Botany*, 1 (1): 28–32.
- Brown J. S. et Eckert C. G. (2005): Evolutionary increase in sexual and clonal reproductive capacity during biological invasion in an aquatic plant *Butomus umbellatus* (Butomaceae). – *American Journal of Botany*, 92: 495–502.
- Buehler D., Graf R., Holderegger R., Gugerli F. (2011): Using the 454 pyrosequencing-based technique in the development of nuclear microsatellite loci in the alpine plant *Arabis alpina* (Brassicaceae). – *American Journal of Botany*, 98: 103–105.
- Clark L. V., Jasieniuk M. (2011): Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. – *Molecular Ecology Resources*, 11: 562–566.
- Clausen P., Nolet B. A., Fox A. D. et Klaassen M. (2002): Long-distance endozoochorous dispersal of submerged macrophyte seeds by migratory waterbirds in northern Europe – a critical review of possibilities and limitations. – *Acta Oecologica*, 23: 191–203.
- Collins A. R., Naderi R., Mueller-Schaerer H. (2011): Competition between cytotypes changes across a longitudinal gradient in *Centaurea stoebe* (Asteraceae). – *American Journal of Botany*, 98: 1935–1942.
- Cuenca A., Petersen G. et Seberg O. (2013): The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of *Butomus umbellatus* – A Member of an Early Branching Lineage of Monocotyledons. – *Plos One* 8(4).
- Doležel J., Greilhuber J et Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Natural Protocols*, 2: 2233–2244.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nature Protocols*, 2: 2233–2244.
- Doyle J. J. et Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. – *Phytochem. Bulletin* 19: 11–15.
- Eckert Ch. G., Lui K., Bronson K., Corradini P. et Bruneau A. (2003): Population genetic consequences of extreme variation in sexual and clonal reproduction in an aquatic plant. – *Molecular Ecology*, 12: 331–344.

- Eckert Ch. G., Lui K., Bronson K., Corradini P. et Bruneau A. (2003): Population genetic consequences of extreme variation in sexual and clonal reproduction in an aquatic plant. – *Molecular Ecology*, 12: 331–344.
- Eckert Ch. G., Massonnet B. et Thomas J. J. (2000): Variation in sexual and clonal reproduction among introduced populations of flowering rush, *Butomus umbellatus* (Butomaceae). – *Canadian Journal of Botany*, 78 (4): 438–446.
- Ellegren H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. – *Nature Reviews Genetics* 5: 435–445.
- Ellenberg H. (1991): *Zeigenverte der Gefässpflanzen Mitteleuropas*. – *Scripta Geobotanica*, 18: 1–248.
- Fawcett J. A., Van de Peer Y., Maere S. (2013): Significance and Biological Consequences of Polyploidization in Land Plant .Evolution. – In: *Plant Genome Diversity Volume 2*, 277–293.
- Fernando D. D. et Cass D. D. (1996): Genotypic differentiation in *Butomus umbellatus* (Butomaceae) using isozymes and random amplified polymorphic DNAs. – *Canadian Journal of Botany*, 74 (5): 647–652.
- Fuxová G. (2011): Ovlivnění genetické diverzity rákosových porostů strukturou říčních systémů. – Diplomová práce, depon in knihovna Katedry botaniky PřF UK v Praze.
- Hahn M. A., Buckley Y. M., Müller-Schärer H. (2012): Increased population growth rate in invasive polyploid *Centaurea stoebe* in a common garden. *Ecol. Lett.*, 15: 947–954.
- Hall T .A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hao G. Y., Lucero M. E., Sanderson S. C., Zacharias E. H., Holbrook N.M. (2013): Polyploidy enhances the occupation of heterogeneous environments through hydraulic related trade-offs in *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae). – *New Phytol.* 197: 970–978.
- Heywood V. H. (1980): CLXXI. Butomaceae. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. [eds.]. *Flora Europaea*. Volume 5: 3.
- Hroudová Z. et Zákřavský P. (1993a): Ecology of two cytotypes of *Butomus umbellatus*. II. Reproduction, growth and biomass production. – *Folia Geobot. Phytotax.*, 28: 413–424.
- Hroudová Z. et Zákřavský P. (1993b): Ecology of Two Cytotypes of *Butomus umbellatus* III Distribution and Habitat Differentiation in the Czech and Slovak Republics. – *Folia Geobot. Phytotax.*, 28: 425–435.

- Hroudová Z. et Zákavský P. (2003): Germination responses of diploid *Butomus umbellatus* to light, temperature and flooding. – *Flora*, 198: 37–44.
- Hroudová Z., Krahulcová A., Zákavský P., Jarolímová V. (1996): The biology of *Butomus umbellatus* in shallow waters with fluctuating water level. – *Hydrobiologia*, 340: 27–30.
- Hülber K., Sonnleitner M., Flatscher R., Berger A., Dobrovsky R., Niessner S., Nigl T., Schneeweiss G. M., Kubešová M., Rauchová J., Suda J., Schoenswetter P. (2009): Ecological segregation drives fine-scale cytotype distribution of *Senecio carniolicus* in the Eastern Alps. – *Preslia*, 81: 309–319.
- Husband B. C., Baldwin S. J. et Suda J. (2013): The Incidence of Polyploidy in Natural Plant Populations: Major Patterns and Evolutionary Processes. In: *Plant Genome Diversity Volume 2*, 25–276.
- Husband B. C., Schemske D. W. (1998): Cytotype distribution at a diploid-tetraploid contact zone in *Chamerion (Epilobium) angustifolium* (Onagraceae). – *American Journal of Botany*, 85: 1688–1694.
- Kao R. H. (2008): Origins and widespread distribution of co-existing polyploids in *Arnica cordifolia* (Asteraceae). – *Annals of Botany*, 101: 145–152.
- Kirschner J., Bartish I., Hroudová Z., Kirschnerová L., Zákavský P. (2004): Contrasting patterns of spatial genetic structure of diploid and triploid populations of the clonal aquatic species, *Butomus umbellatus* (Butomaceae), in Central Europe. – *Folia Geobotanica*, 39: 13–26.
- Klekowski E. J. (2003): Plant clonality, mutation, diplontic selection and mutational meltdown. – *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 61–67.
- Koutecký P. (2015): MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. – *Plant Systematics and Evolution*, 301: 1115–1121.
- Krahulcová A. et Jarolímová V. (1993): Ecology of Two Cytotypes of *Butomus umbellatus* I. Karyology and Breeding Behaviour. – *Folia Geobot. Phytotax.*, 28: 395–411.
- Krahulcová A. et Jarolímová V. (1993): Ecology of Two Cytotypes of *Butomus umbellatus* I. Karyology and Breeding Behaviour. – *Folia Geobot. Phytotax.*, 28: 395–411.
- Lepš J. et Šmilauer P. (2003): *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. – Cambridge: Cambridge University Press.
- Levin D. A. (2002): *The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution*, Oxford, Oxford University Press.

- Li W., Wang B. et Wang J. (2006): Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. – *Aquatic Botany*, 84: 176–180.
- Liu S. Y., Chen S. M., Chen Y., Guan Z. Y., Yin D. M., Chen F. D. (2011): In vitro induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. – *Sci Horticult* 127: 411–419.
- Loxdale H. D. et Lushai G. (2003): Rapid changes in clonal lines: the death of a ‘sacred cow’. – *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 3–16.
- Lui K., Faye L. et Eckert Ch. G. (2005): Causes and consequences of extreme variation in reproductive strategy and vegetative growth among invasive populations of a clonal aquatic plant, *Butomus umbellatus* L. (Butomaceae). – *Biological Invasions*, 7: 427–444.
- Lui K., Faye L. et Eckert Ch. G. (2005): Causes and consequences of extreme variation in reproductive strategy and vegetative growth among invasive populations of a clonal aquatic plant, *Butomus umbellatus* L. (Butomaceae). – *Biological Invasions*, 7: 427–444.
- Lumaret R., Guillerm J. L., Delay J., Loutfi A. A. L, Izco J. et Jay M. (1987): Polyploidy and habitat differentiation in *Dactylis glomerata* L. from Galicia (Spain). – *Oecologia*, 73: 436–446.
- Maceira N. O., Jacquard P. et Lumaret R. (1993): Competition between diploid and derivative autotetraploid *Dactylis glomerata* L. from Galicia – Implications for the establishment of novel polyploid populations. – *New Phytol.*, 124: 321–328.
- Maherali H., Walden A. E. et Husband B. C. (2009): Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. – *New Phytol*, 184: 721–731.
- Malausa T., Gilles A., Megléczy E., Blanquart H., Duthoy S., Costedoat C., Dubut V., Pech N., Castagnone-Sereno P., Délye C., Feau N., Frey P., Gauthier P., Guillemaud T., Hazard L., Le Corre V., Lung-Escarment B., Malé P. J., Ferreira S. et Martin J. F. (2011): High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. – *Molecular Ecology Resources*, 11: 638–644.
- Mandák B. (2011): Mikrosatelity - jejich funkce, význam a použití v současné biologii. *Zprávy České Botanické Společnosti* 25: 79–94.
- Manly B. J. F. (1991): *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. London: Chapman and Hall.
- Manzaneda A. J., Rey P. J., Bastida J. M., Weiss-Lehman C., Raskin E. et Mitchell-Olds T. (2012): Environmental aridity is associated with cytotype segregation and polyploidy occurrence in *Brachypodium distachyon* (Poaceae). – *New Phytologist*, 193: 797–805.

- Marko M. D., Madsen J. D., Smith R. A., Sartain B. et Olson C. L. (2015): Ecology and phenology of flowering rush in the Detroit Lakes chain of lakes, Minnesota. – *J. Aquat. Plant Manage*, 53: 54–63.
- Mašterová H. (2013): Hybridizace orobinců *Typha latifolia* a *T. angustifolia*. – Diplomová práce, depon in knihovna Katedry botaniky PrF UK v Praze.
- Okada M., Grewell B. J. et Jasieniuk M. (2009): Clonal spread of invasive *Ludwigia hexapetala* and *L. grandiflora* in freshwater wetlands of California. – *Aquatic Botany*, 91: 123–129.
- Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. – In: Crissman HA, Darzynkiewicz Z. eds. *Methods in Cell Biology*, Vol. 33. New York: Academic Press, 105–110.
- Pandit M. K., Pockock M. J. O. et Kunin W. E. (2011): Ploidy influences rarity and invasiveness in plants. – *J. Ecol.*, 99: 1108–1115.
- Parisod C., Holderegger R. et Brochmann C. (2010): Evolutionary consequences of autopolyploidy. – *New Phytologist*, 186: 5–17.
- Pollux B. J. A., De Jong M., Steegh A., Verbruggen E., Van Groenendael J. M., et 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.
- Queller D. C., Strassmann J. E. et Hughes C. R. (1993): Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution* 8: 285–288. In: Selkoe K. A. & Toonen R. J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. – *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Ramsey J. (2011). Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow. – *PNAS*, 108: 7096–7101.
- Ramsey J. et Schemske D. W. (2002): Neopolyploidy in flowering plants. – *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33: 589–639.
- Ripley B. D. (1977): Modelling spatial patterns. – *Journal of the Royal Statistical Society B*, 39: 172–192.
- Santamaría L. (2002): Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. – *Acta Oecologica*, 23: 137–154.
- Segraves K. A., Thompson J. N., Soltis P. S. et Soltis D. E. (1999): Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossulariifolia*. – *Molecular Ecology*, 8: 253–262.

- Selkoe K. A. et Toonen R. J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. – *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Shaw J., Lickey E. B., Beck J. T., Farmer S. B., Liu W. S., Miller J., Siripun K. C., Winder C. T., Schilling E. E. et Small R. L. (2005): The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. – *American Journal of Botany*, 92: 142–66.
- Schlötterer C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. – *Chromosoma* 109: 365–371.
- Schlötterer C. (2004): The evolution of molecular markers: just a matter of fashion?. – *Nature Reviews Genetics* 5: 63–69.
- Schönswetter P., Suda J., Popp M., Weiss-Schneeweiss H. et Brochmann C. (2007): Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 92–103.
- Schuelke M. (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. – *Nature Biotechnology*, 18: 233–234.
- Slavík B. et Hroudová Z. (2010): Butomaceae Mirbel – šmelovité. – In Štěpánková J., Chrtek J. jun. et Kaplan Z.[red.]: *Květena České republiky* 8, p. 293–296.
- Soltis D. E. et Soltis P. S. (1999): Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. – *Trends in Ecology & Evolution*, 14: 348–352.
- Soltis D. E., Albert V. A., Leebens-Mack J., Bell C. D., Paterson A. H., Zheng C. F., Sankoff D., dePamphilis C. W., Wall P. K. et Soltis P. S. (2009): Polyploidy and angiosperm diversification. – *American Journal of Botany*, 96: 336–348.
- Soltis P. S. et Soltis D. E. (2009): The role of hybridization in plant speciation. – *Annual Review of Plant Biology*, 60: 561–588.
- Sonnleitner M., Flatscher R., García P. E., Rauchová J., Suda J., Schneeweiss G. M., Hülber K., Schönswetter P. (2010): Distribution and habitat segregation on different spatial scales among diploid, tetraploid and hexaploid cytotypes of *Senecio carniolicus* (Asteraceae) in the Eastern Alps. – *Annals of Botany*, 106: 967–977.
- Soomers H., Karssenberg D., Soons M. B., Verweij P. A., Verhoeven J. T. A. et Wassen M. J. (2013): Wind and Water Dispersal of Wetland Plants Across Fragmented Landscapes. – *Ecosystems*, 16: 434–451.
- Sosnová M., van Diggelen R. et Klimešová J. (2010): Distribution of clonal growth forms in wetlands. – *Aquatic Botany*, 92: 33–39.

- Sosnová M., van Diggelen R., Macek P. et Klimešová J. (2011): Distribution of clonal growth traits among wetland habitats. – *Aquatic Botany*, 95: 88–93.
- Stock M., Ustinova J., Lamatsch D. K., Schartl M., Perrin N. et Moritz C. (2010): A vertebrate reproductive system involving three ploidy levels: hybrid origin of triploids in a contact zone of diploid and tetraploid Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup). – *Evolution*, 64: 944–959.
- 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*. Weinheim: Wiley-VCH, 103–130.
- Šmarda P., Hejcman M., Březinová A., Horová L., Steigerová H., Zedek F., Bureš P., Hejcmanová P., Schellberg J. (2013): Effect of phosphorus availability on the selection of species with different ploidy levels and genome sizes in a long-term grassland fertilization experiment. – *New Phytol.*, 200(3): 911–921.
- Tayalé A., Parisod C. (2013): Natural Pathways to Polyploidy in Plants and Consequences for Genome Reorganization. – *Cytogenet. Genome Res.*, 140: 79–96.
- te Beest M., Le Roux J. J., Richardson D. M., Brysting A. K., Suda J., Kubešová M. et al. (2011): The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. – *Ann. Bot.*, 109, 19–45.
- Ter Braak C. J. F. et Šmilauer P. (2012): *Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0*. – Microcomputer Power, Ithaca, USA, 496 pp.
- Tichý L. (2002): JUICE, software for vegetation classification. – *Journal of Vegetation Science*, 13: 451–453.
- Treier, U. A., Broennimann, O., Normand, S. et Guisan, A. (2009): Shift in cytotype frequency and niche space in the invasive plant *Centaurea maculosa*. – *Ecology*, 90 (5): 1366–1377.
- Triest L., Thi V. T., Thi D. L., Sierens T. et Geert A. V. (2010): Genetic differentiation of submerged plant populations and taxa between habitats. – *Hydrobiologia*, 656: 15–27.
- Udall J. A., Wendel J. F. (2006): Polyploidy and crop improvement. – *Crop Sci* 46:3–14.
- van Kleunen M., Weber E. et Fischer M. (2010): A meta-analysis of trait differences between invasive and non-invasive plant species. – *Ecol. Lett.*, 13, 235–245.
- Wang B., Li W. et Wang J. (2005): Genetic diversity of *Alternanthera philoxeroides* in China. – *Aquatic Botany*, 81: 277–283.

- Weising K. et al. (2005): DNA fingerprinting in plants. Principles, methods, and applications. – CRC Press Taylor & Francis Group, USA.
- Weiss-Schneeweiss H., Emadzade K., Jang T. S. et Schneeweiss G. M. (2013): Evolutionary Consequences, Constraints and Potential of Polyploidy in Plants. – Cytogenet. Genome Res., 140, 137–150.
- Wood T. E., Takebayashi N., Barker M. S., Mayrose I., Greenspoon P. B., Rieseberg L. H. (2009): The frequency of polyploid speciation in vascular plants. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 13875–13879.
- Zane L., Bargelloni L. et Patarnello T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: review. – Molecular Ecology 11: 1–16.
- Zeisek V. (2009): Fylogeografie a šíření stulíku žlutého (*Nuphar lutea*). – Diplomová práce, depon in knihovna Katedry botaniky PrF UK v Praze.

9 Přílohy

9.1 Přehled lokalit

Tab. 7: Přehled všech nalezených lokalit šmelu okoličnatého. Podle sloupce pořadí jsou označeny lokality na obr. 5. U fotografií je uvedeno číslo ze sloupce **GPS-kód** i ze sloupce **Pořadí**. Latituda je uvedena ve stupních severní zeměpisné šířky a longituda ve stupních východní zeměpisné délky v souřadnicovém systému WGS 84. Jako lokalita je uvedena nejbližší obec (v závorce je u každé obce jednou uveden maďarský název). Poměr ploidii je odhadnut podle cytometrických analýz z každé populace.

GPS-kód	Pořadí	Latituda (°N)	Longituda (°E)	Lokalita	Biotop	Poměr ploidii (%)	
						2x	3x
18	1	48.5118	21.81711	Sirník (Szürnyeg)	vlhká deprese	0	100
19	2	48.49032	22.07101	Leles (Lelesz)	tůň	0	100
20	3	48.47723	22.05628	Leles	vlhká deprese	0	100
21	4	48.47571	22.08299	Kapoňa (Kaponya)	tůň	100	0
22	5	48.48494	22.07043	Leles	tůň	0	100
23	6	48.50183	22.045	Leles	tůň	50	50
24	7	48.50587	22.04108	Leles	tůň	0	100
25	8	48.49326	21.93903	Boľ (Boly)	tůň	0	100
26	9	48.4893	21.91894	Zatín (Zétény)	odvodňovací kanál	50	50
27	10	48.49384	21.91593	Zatín	tůň	45	55
28	11	48.49491	21.91006	Zatín	tůň	25	75
29	12	48.48634	21.83553	Brehov (Imreg)	mokré pole	0	100
30	13	48.49079	21.84098	Brehov	vlhká deprese	50	50
31	14	48.49149	21.83979	Brehov	odvodňovací kanál	25	75
32	15	48.49492	21.84729	Brehov	vlhká deprese	0	100
33	16	48.49631	21.85048	Brehov	vlhká deprese	0	100
34	17	48.49922	21.85734	Brehov	vlhká deprese	0	100
35	18	48.49258	21.83959	Brehov	odvodňovací kanál	0	100
36	19	48.43503	21.81408	Zemplín (Zemplén)	vlhká deprese	100	0
37	20	48.40695	21.77791	Ladmovce (Ladmóc)	vlhká deprese	75	25
38	21	48.50126	22.07462	Kapušiánské Kľačany (Magyarkelecsény)	tůň	50	50
39	22	48.49977	22.07125	Kapušiánské Kľačany	tůň	60	40
40	23	48.49508	22.07581	Kapušiánské Kľačany	tůň	100	0

41	24	48.49531	22.07862	Kapušíanské Kľačany	tůň	75	25
43	25	48.48917	21.99597	Pol'any (Pólyán)	odvodňovací kanál	0	100
44	26	48.53123	21.95324	Beša (Bés)	tůň	0	100
45	27	48.5315	21.95575	Beša	tůň	0	100
46	28	48.53037	21.94751	Beša	tůň	0	100
47	29	48.52808	21.957	Beša	odvodňovací kanál	0	100
48	30	48.5271	21.9549	Beša	odvodňovací kanál	20	80
49	31	48.52602	21.95265	Beša	odvodňovací kanál	100	0
50	32	48.56438	21.92725	Velké Raškovce (Nagyráska)	vlhká deprese	100	0
51	33	48.56276	21.9237	Velké Raškovce	odvodňovací kanál	50	50
55	34	48.52954	21.85931	Kucany (Mészpest)	odvodňovací kanál	50	50
56	35	48.53038	21.86716	Kucany	tůň	0	100
57	36	48.3471	21.83509	Velký Kamenec (Nagykövesd)	tůň	10	90
58	37	48.36934	21.83704	Velký Kamenec	odvodňovací kanál	0	100
59	38	48.36428	21.83937	Velký Kamenec	tůň	0	100
60	39	48.3759	21.8364	Velký Kamenec	odvodňovací kanál	0	100
61	40	48.37228	21.85969	Strážne (Örös)	odvodňovací kanál	0	100
62	41	48.37413	21.86593	Strážne	odvodňovací kanál	50	50
63	42	48.43277	21.85406	Hrušov (Magasmajtény)	odvodňovací kanál	0	100
64	43	48.44171	21.83607	Pavlovo (Pálfölde)	odvodňovací kanál	0	100
65	44	48.39689	21.80708	Somotor (Szomotor)	odvodňovací kanál	0	100
66	45	48.39274	21.73285	Viničky (Szöllöske)	tůň	35	65
67	46	48.3955	21.73111	Viničky	odvodňovací kanál	70	30
68	47	48.5649	21.92383	Velké Raškovce	odvodňovací kanál	75	25
69	48	48.57001	21.97058	Vojany (Vaján)	vlhká deprese	100	0
70	49	48.5712	21.96916	Vojany	mokré pole	100	0
71	50	48.4931	22.07796	Kapušíanské Kľačany	tůň	0	100
72	51	48.46164	22.04756	Kapoňa	tůň	0	100

74	52	48.456389	21.804722	Zemplín	odvodňovací kanál	30	70
75	53	48.49072	21.84236	Brehov	odvodňovací kanál	25	75
76	54	48.54146	21.8879	Oborín (Abara)	tůň	0	100
77	55	48.53178	21.8703	Kucany	tůň	10	90
78	56	48.51685	21.82982	Sirník	odvodňovací kanál	25	75
79	57	48.44024	22.09769	Bořany (Battyán)	tůň	0	100
80	58	48.50937	22.02047	Leles	tůň	0	100
81	59	48.49513	21.89514	Zatín (Zétény)	tůň	80	20
82	60	48.49425	21.88894	Zatín	tůň	50	50
83	61	48.48923	21.87708	Zatín	tůň	10	90
84	62	48.47674	21.86093	Rad	tůň	60	40
85	63	48.4148	21.80414	Véč (Bodrogvécs)	tůň	50	50
86	64	48.41422	21.80025	Véč	tůň	20	80
87	65	48.377778	21.752222	Streda nad Bodrogom (Bodrogszerdahely)	tůň	20	80
88	66	48.381389	21.725139	Klin nad Bodrogom (Bodrogszög)	tůň	0	100
89	67	48.383333	21.723056	Klin nad Bodrogom	tůň	100	0
91	68	48.43351	21.8093	Zemplín	tůň	0	100
92	69	48.47392	22.10923	Bořany	tůň	0	100
93	70	48.57581	21.81899	Hradištská Mořva	odvodňovací kanál	0	100
94	71	48.57838	21.82727	Malčice (Málca)	odvodňovací kanál	0	100
95	72	48.49096	21.88015	Zatín	tůň	50	50

9.2 Protokoly

9.2.1 Sorbitolová extrakce DNA

1. připravit si vzorky ze silikagelu
2. nadepsat si dle názvů vzorků 2 ml eppendorfky
3. vložit do eppendorfek kousek lístku rostliny
4. do každé eppendorfky přidat 2 wolfram-karbidové kuličky
5. eppendorfky zavřít a dát do drtiče – tak, aby byly vzorky víceméně vyvážené, nastavit drcení: 27/sek 5–7 minut
6. mezitím si připravit extakční pufr – toho se dává 1300 μ l na vzorek (1,3 ml) + 300 μ l na vzorek + přidat pro 1 vzorek navíc = 1600 μ l x počet vzorků = 38 400 μ l + 1 vzorek navíc 1600 μ l = 40 000 μ l
7. poté pracovat v digestoři – přidá se 1 000x méně markaptoetanolu (ke 40 ml přidat 40 μ l merkaptoetanolu)
8. zkumavky si dát do digestoře a do každé přidat špetku PVP
9. do každé zkumavky přidat 1300 μ l EP – vzít modrou pipetu a 2x do každé zkumavky nabrat 650 μ l. (pokud je tam příliš biomasy – tak to udělá s EP gel – pak je dobré trochu EP přidat)
10. do každé zkumavky přidat ještě 4 μ l RNAsy
11. každou zkumavku lehce zvortexovat a proklepat v ruce – nesmí na dně zkumavky zůstat zelený pelet
12. nechat zkumavky stát 20 minut (na stole – nedávat do lednice)
13. v pauzách popsat nové 1,5 ml eppendorfky
14. zapnout termoblok (65°C)
15. zkumavky centrifugovat 5 minut/7000 rpm (pokud se na dně nevytvořil sediment – tak ještě jednou s více otáčkami – ale ne víc než 9000)
16. odpipetovat supernatant ze zkumavek – nechat jen zelené na dně – vzorky přesunout do digestoře
17. ke každé zkumavce k peletu přidat 300 μ l extrakčního pufru – pak proklepnout v ruce, aby zelený pelet nezůstal na dně
18. přidat 300 μ l Sorbitol lysis (LP)
19. všechny zkumavky několikrát překlápět
20. zkumavky dát do termobloku a nechat 15 minut při 65°C a třepat 300 rpm
21. zkumavky dát do digestoře – přidat ke každé 600 μ l chloroformu-isoamylalkoholu – zkumavky několikrát překlápět – alespoň 1 minutu

22. zkumavky zcentrifugovat 10 minut/9000 rpm
23. odebrat horní vodnou fázi – nejlépe 600 μ l – těchto 600 μ l přepipetovat do nových 1,5 μ l eppendorfek
24. do každé zkumavky přidat 400 μ l vychlazeného isopropanolu z mrazáku
25. zkumavky několikrát převrátit
26. zkumavky uložit na nejméně 30 minut do mrazáku (-20°C)
27. vzít si kádinku a ještě v digestoři do kádinky vylít staré zkumavky (2 ml) – kádinku vyplachovat několikrát vodou
28. dát vychladit centrifugu na 4°C (tlačítkem Fast Temp)
29. mezitím si také udělat gel (0,8% TAE)
30. vzorky z mrazáku centrifugovat 15 minut/13000 rpm/4°C
31. pomalu odlít ze zkumavek supernatant – nesmí se odlít pelet na dně, zkumavky otřít o kapesníček, aby byly co nejsušší
32. k peletu přidáme 700 μ l 80% etanolu
33. poté zkumavky 2 minuty převracet
34. centrifugovat 2 minuty/13000 rpm
35. opět opatrně slít supernatant a zkumavky okapat o kapesníček a nechat je tam dnem vzhůru, aby vyschly (nechat je tak 1–2 minuty)
36. dát vzorky znovu do termobloku – nechat je úplně vyschnout (nesmí tam zůstat žádný etanol) maximálně 10 minut
37. přidat 50 μ l TE pufru – proklepnout v ruce, ale také sklepnout – TE musí zůstat na dně – kde je i pelet DNA, DNA se musí v TE pufru rozpustit
38. vzorky nechat s TE pufrům ještě v termobloku minimálně 10 minut při 60°C
39. lehce zvortexovat a stočit

9.2.2 Tvorba knihovny pro sekvenování

1. 200–900 ng extrahované DNA byla naštípána na přístroji S220 sonicator (Covaris, Woburn, MA, USA) s použitím programu pro fragmentaci na 1,000 párů bází.
2. Sekvenační knihovna byla připravena s použitím NEBNext Ultra DNA Library Prep (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) protokolu pro přístroj Illumina následujícími modifikacemi:
 - (i) Délková selekce (~400–600 párů bází) byla provedena na 1% agarózovém gelu
 - (ii) byly přidány další 2 přečišťovací kroky, jeden po ligaci adaptorů s použitím QIAquick PCR Purification kitu (Qiagen, Venlo, Netherlands), druhý po extrakci z gelu s použitím QIAquick Gel Extraction kitu (Qiagen).
 - (iii) Obohacené PCR produkty byly přečištěny pomocí QIAquick PCR Purification kitu a následně pomocí Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, USA).
3. Amplifikace ligovaných, velikostně vybraných fragmentů byla provedena s použitím 8 cyklů PCR, pomocí NEBNext Multiplex Oligos for Illumina Index Primers Set 1 a 2 (New England Biolabs).
4. DNA koncentrace knihovny byla změřena přístrojem Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).
5. Knihovna byla sekvenována na přístroji Illumina MiSeq v laboratoři Genomics Core Facility v CEITEC (Masarykova Universita, Brno) s použitím 600 cyklového kitu (v3) pro obdržení 300 bp paired-end readů.

9.2.3 Příprava vzorků pro sekvenování amplifikovaných lokusů

1. produkt sekvenační reakce přepipetujeme do popsaných 0.5 ml eppendorfek
2. ke 20 μ l produktu přidáme 2 μ l 3M NaOAc (acetát sodný) a 50 μ l 96% ethanolu
3. promícháme a necháme stát při laboratorní teplotě 10-15 minut
4. centrifugujeme v chlazené centrifuze 30 minut při 13 200 rpm a 22 °C
5. opatrně odpipetujeme supernatant (precipitát není vidět)
6. přidáme 250 μ l 70% ethanolu, promícháme a centrifugujeme v chlazené 15 minut při 13 200 rpm a 22 °C
7. zopakujeme předchozí dva body
8. otevřené zkumavky s odpipetovaným supernatantem necháme 5 minut stát při laboratorní teplotě
9. vysušíme 5–10 minut při 65 °C (na termobloku), ubrouskem otřeme zbytky ethanolu ze svrchní části zkumavky

9.3 Primární data

Tab. 8: Přehled průměrů Borhiniho indikačních hodnot pro šest různých složek prostředí pro každou lokalitu na základě soupisu druhů z každé lokality. Sloupce GPS-kód a Pořadí se shodují s tabulkou lokalit v přílohách (Tab. 7).

GPS-kód	Pořadí	Počet druhů	Světlo	Teplota	Kontinentalita	Vlhkost	Půdní reakce	Živiny
18	1	24	7.22	5.7	4.26	9.17	6.7	5.61
19	2	9	7.22	5.89	4.22	9.33	6.78	5.22
20	3	11	7.18	5.73	4.45	8.73	6.45	6.09
21	4	6	7	5.8	4.4	10.2	6.8	6
22	5	9	7	6.14	3.86	10.14	6.71	6.71
23	6	7	7.14	6.14	3.57	11.14	6.71	6.43
24	7	4	8	5.5	3.75	10.5	6.5	5.75
25	8	7	7.17	5.83	5.33	10	6.83	6.17
26	9	6	7.17	5.5	4.5	9.5	6.83	6.17
27	10	5	7	5.2	5.2	9.6	6.8	5
28	11	8	7	5.86	4.57	10.57	6.71	6
29	12	14	7.62	6.15	4.46	7.92	6.85	6.15
30	13	8	7.29	5.86	4.29	9.29	6.86	7.14
31	14	3	6.67	5.67	4	11	7.33	7
32	15	13	7.08	5.54	3.92	8.92	6.38	5.69
33	16	10	7.3	5.5	4.6	9.5	6.6	4.9
34	17	8	7.25	5.75	3.63	9.5	6.5	5.75
35	18	12	7.33	5.67	4.92	9.5	6.75	6.5
36	19	7	7.57	6	4.43	8	6.57	5.43
37	20	13	7.09	5.55	4.64	9.36	6.45	5.45
38	21	7	7.17	5.5	5.17	9.17	6.5	6.17
39	22	3	7.33	5.67	5	10	7	7
40	23	6	7.33	5.33	4.5	9.67	6.83	6.83
41	24	9	7.25	5.75	5.13	9.38	6.75	6.5
43	25	2	7	6	5	10	6.5	5
44	26	4	7.5	5.5	4.5	10	6.75	6.25
45	27	8	7.75	5.38	4.75	9.5	6.75	7.13
46	28	5	7.2	5.6	4.8	10	6.8	6.6
47	29	7	7.29	5.43	5	9.43	6.57	4.86
48	30	5	7	6.2	5.8	10	6.8	5.8
49	31	6	7.5	5.5	5.67	9.5	7	6.17
50	32	3	7.33	5.67	4.33	9.33	6.67	6.67
51	33	7	7.14	5	4.57	10.29	6.71	5.71
55	34	24	7	5.75	4.67	9.08	6.71	5.92
56	35	13	7.62	5.69	4.62	7.08	6.77	6.54
57	36	3	7.67	6.67	5	10.67	6.67	7.33
58	37	13	7.25	6.25	4.42	10.17	7	6.58
59	38	11	7.4	5.9	4.9	10.1	6.9	7.2
60	39	18	7.39	5.78	4.22	10.11	6.89	6.11
61	40	12	7.17	6.17	4.5	10.25	7.08	6.25
62	41	18	7.24	6	4.35	10.35	6.88	6.53

GPS-kód	Pořadí	Počet druhů	Světlo	Teplota	Kontinentalita	Vlhkost	Půdní reakce	Živiny
63	42	8	7.13	5.88	4	9.88	6.75	5.88
64	43	9	7.33	5.89	4	10.11	6.78	6.56
65	44	9	7.33	5.89	3.89	10.67	7.11	6.78
66	45	11	7.5	5.5	4.4	9.6	6.7	6.4
67	46	6	7.17	5.5	4.67	10.17	6.5	6.33
68	47	17	6.44	5.88	4.31	10.75	7.06	5.94
69	48	8	7.38	5.5	4.13	9.38	6.75	6.38
70	49	15	7.14	5.5	3.86	7.93	6.93	6.43
71	50	3	7	5.67	4.33	10.67	7	6
72	51	6	7.17	5.83	5.17	9.5	7	7
74	52	9	7.25	5.88	4.5	9.75	7	6.13
75	53	10	6.9	5.8	4.6	10.5	7.1	6.4
76	54	6	7.33	6	4.33	9.83	6.83	7.17
77	55	10	7.67	5.78	5.22	9.22	6.67	7.67
78	56	23	7.23	5.73	4.36	9.45	6.91	5.91
79	57	9	7.78	5.89	4.89	9.11	6.89	7.56
80	58	7	7.29	5.43	4.43	9.57	6.86	6.43
81	59	7	7.14	5.71	4.29	10.29	6.71	6
82	60	10	7.22	5.44	4.78	9.89	6.78	5.44
83	61	14	7.36	5.71	4.29	10.07	7	6
84	62	5	7.6	5.2	4.8	10	6.6	5.8
85	63	13	7.46	5.62	4.15	10.23	6.62	6.31
86	64	13	7.31	5.85	4.15	10.15	7	6.15
87	65	5	7.5	5.75	3.75	9.5	7	6.5
88	66	7	7.14	6	4.57	10.43	7	6.43
89	67	9	7.11	6.11	4.22	10.56	6.89	6.67
91	68	16	7	5.87	4.2	10	6.93	5.47
92	69	11	7	6	3.9	10.7	6.7	6.7
93	70	8	7.13	5.75	4.13	9.75	6.75	5.63
94	71	8	7.5	5.38	4.38	9.38	6.63	6
95	72	8	7.63	5.5	4	10.13	7	6.63

Tab. 9: Přehled druhů vyskytujících se na každé lokalitě. Jako číslo lokality je uveden GPS-kód z tabulky přehledu lokalit v přílohách (tab. 7)

<p style="text-align: center;">18</p> <p><i>Alisma lanceolatum</i> <i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Batrachium</i> sp. <i>Bidens frondosus</i> <i>Carex pseudocyperus</i> <i>Carex riparia</i> <i>Cirsium arvense</i> <i>Cirsium brachycephalum</i> <i>Galium palustre</i> <i>Glyceria fluitans</i> <i>Lemna minor</i> <i>Leonurus marrubiastrum</i> <i>Lycopus exaltatus</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Persicaria amphibia</i> <i>Scutellaria galericulata</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i> <i>Solanum dulcamara</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Stachys palustris</i> <i>Teucrium scordium</i> <i>Veronica scutellata</i> <i>Xanthium italicum</i></p> <p style="text-align: center;">22</p> <p><i>Alisma lanceolatum</i> <i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Eleocharis mamillata</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Persicaria amphibia</i> <i>Populus alba</i> juv. <i>Salvinia natans</i> <i>Sium latifolium</i></p>	<p style="text-align: center;">19</p> <p><i>Carex riparia</i> <i>Carex vesicaria</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Lysimachia vulgaris</i> <i>Lythrum virgatum</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Veronica scutellata</i></p> <p style="text-align: center;">23</p> <p><i>Alisma lanceolatum</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Potamogeton lucens</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Trapa natans</i> <i>Utricularia australis</i></p> <p style="text-align: center;">26</p> <p><i>Carex riparia</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Solanum dulcamara</i> <i>Stellaria palustris</i> <i>Typha latifolia</i></p> <p style="text-align: center;">29</p> <p><i>Agrostis stolonifera</i> <i>Alisma lanceolatum</i> <i>Ambrosia artemisiifolia</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Bolboschoenus planiculmis</i> <i>Carex hirta</i> <i>Echinochloa cruss-galli</i> <i>Eleocharis palustris</i> <i>Lythrum virgatum</i> <i>Persicaria amphibia</i> <i>Plantago uliginosa</i> <i>Rorippa austriaca</i> <i>Rumex crispus</i> <i>Xanthium italicum</i></p>	<p style="text-align: center;">20</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Cirsium vulgare</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Lycopus exaltatus</i> <i>Lysimachia vulgaris</i> <i>Lythrum virgatum</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Symphytum officinale</i> <i>Typha latifolia</i> <i>Veronica scutellata</i></p> <p style="text-align: center;">24</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Utricularia australis</i></p> <p style="text-align: center;">27</p> <p><i>Bolboschoenus</i> sp. <i>Carex acuta</i> <i>Lemna minor</i> <i>Lysimachia vulgaris</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i></p> <p style="text-align: center;">30</p> <p><i>Alisma lanceolatum</i> <i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Persicaria maculosa</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Stachys palustris</i> <i>Xanthium italicum</i></p>	<p style="text-align: center;">21</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Eleocharis mamillata</i> <i>Lemna minor</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Salvinia natans</i></p> <p style="text-align: center;">25</p> <p><i>Carex acuta</i> <i>Eleocharis mamillata</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lythrum virgatum</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Trapa natans</i></p> <p style="text-align: center;">28</p> <p><i>Carex acuta</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Eleocharis acicularis</i> <i>Eleocharis mamillata</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Trapa natans</i></p> <p style="text-align: center;">31</p> <p><i>Carex</i> sp. <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Persicaria amphibia</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i></p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

32	33	34	35
<i>Alisma plantago-aquatica</i>	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	<i>Alisma plantago-aquatica</i>
<i>Carex riparia</i>	<i>Carex acuta</i>	<i>Carex riparia</i>	<i>Alopecurus aequalis</i>
<i>Cirsium arvense</i>	<i>Carex riparia</i>	<i>Glyceria fluitans</i>	<i>Carex acuta</i>
<i>Galium palustre</i>	<i>Eleocharis palustris</i>	<i>Iris pseudacorus</i>	<i>Hydrocharis morsus-ranae</i>
<i>Iris pseudacorus</i>	<i>Glyceria maxima</i>	<i>Persicaria amphibia</i>	<i>Lemna trisulca</i>
<i>Lysimachia vulgaris</i>	<i>Lysimachia vulgaris</i>	<i>Sparganium erectum</i>	<i>Myosotis palustris</i>
<i>Lythrum salicaria</i>	<i>Lythrum salicaria</i>	<i>Veronica scutellata</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>
<i>Oenanthe aquatica</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>	<i>Xanthium italicum</i>	<i>Rumex maritimus</i>
<i>Schoenoplectus lacustris</i>	<i>Sparganium erectum</i>		<i>Sagittaria sagittifolia</i>
<i>Sium latifolium</i>	<i>Veronica scutellata</i>	38	<i>Salvinia natans</i>
<i>Sparganium erectum</i>		<i>Agrostis stolonifera</i>	<i>Sparganium erectum</i>
<i>Symphytum officinale</i>	37	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	<i>Stachys palustris</i>
<i>Veronica scutellata</i>	<i>Alisma lanceolatum</i>	<i>Bidens frondosus</i>	
36	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	<i>Carex acuta</i>	39
<i>Agrostis stolonifera</i>	<i>Bidens frondosus</i>	<i>Iris pseudacorus</i>	<i>Leersia oryzoides</i>
<i>Alisma lanceolatum</i>	<i>Bidens frondosus</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>
<i>Carex acuta</i>	<i>Bolboschoenus laticarpus</i>	<i>Rorippa amphibia</i>	<i>Rorippa amphibia</i>
<i>Gratiola officinalis</i>	<i>Carex acuta</i>		
<i>Potentilla anserina</i>	<i>Carex vulpina</i>	43	44
<i>Trifolium fragiferum</i>	<i>Eleocharis mamillata</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>	<i>Alisma plantago-aquatica</i>
<i>Xanthium italicum</i>	<i>Galium palustre</i>	<i>Sparganium erectum</i>	<i>Glyceria maxima</i>
	<i>Iris pseudacorus</i>		<i>Oenanthe aquatica</i>
40	<i>Lycopus exaltatus</i>	45	<i>Sparganium erectum</i>
<i>Alisma plantago-aquatica</i>	<i>Lysimachia vulgaris</i>	<i>Agrostis stolonifera</i>	
<i>Carex acutiformis</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	46
<i>Glyceria maxima</i>	<i>Persicaria amphibia</i>	<i>Bidens cernuus</i>	<i>Alisma plantago-aquatica</i>
<i>Rorippa amphibia</i>		<i>Glyceria maxima</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>
<i>Solanum dulcamara</i>	41	<i>Oenanthe aquatica</i>	<i>Rorippa amphibia</i>
<i>Sparganium erectum</i>	<i>Agrostis stolonifera</i>	<i>Rorippa amphibia</i>	<i>Schoenoplectus lacustris</i>
	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	<i>Schoenoplectus lacustris</i>	<i>Sparganium erectum</i>
47	<i>Bidens frondosus</i>	<i>Typha latifolia</i>	
<i>Bidens tripartitus</i>	<i>Carex acuta</i>		49
<i>Carex acuta</i>	<i>Glyceria maxima</i>	48	<i>Bidens tripartitus</i>
<i>Eleocharis acicularis</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>	<i>Carex acuta</i>	<i>Bolboschoenus sp.</i>
<i>Eleocharis palustris</i>	<i>Persicaria lapathifolia</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>	<i>Carex acuta</i>
<i>Gnaphalium uliginosum</i>	<i>Rorippa amphibia</i>	<i>Rorippa amphibia</i>	<i>Oenanthe aquatica</i>
<i>Oenanthe aquatica</i>	<i>Salvinia natans</i>	<i>Salvinia natans</i>	<i>Rorippa amphibia</i>
<i>Sparganium erectum</i>		<i>Sparganium erectum</i>	<i>Schoenoplectus lacustris</i>

<p>50</p> <p><i>Glyceria maxima</i> <i>Persicaria lapathifolia</i> <i>Sparganium erectum</i></p>	<p>51</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Carex acuta</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Lemna minor</i> <i>Potamogeton natans</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Sparganium erectum</i></p>	<p>55</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Carex acuta</i> <i>Carex riparia</i> <i>Cirsium arvense</i> <i>Galium palustre</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lemna trisulca</i> <i>Lycopus europaeus</i> <i>Lysimachia vulgaris</i> <i>Mentha arvensis</i> <i>Myosotis palustris</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Phragmites australis</i> <i>Rorippa austriaca</i> <i>Rumex hydrolapathum</i> <i>Rumex maritimus</i> <i>Salix alba</i> <i>Salix cinerea</i> <i>Salix triandra</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Scutellaria galericulata</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Veronica anagallis-aquatica</i></p>	<p>56</p> <p><i>Alopecurus aequalis</i> <i>Alopecurus pratensis</i> <i>Atriplex patula</i> <i>Carex riparia</i> <i>Cirsium arvense</i> <i>Cirsium vulgare</i> <i>Galium aparine</i> <i>Glyceria fluitans</i> <i>Lactuca seriola</i> <i>Lycopus europaeus</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Rumex maritimus</i> <i>Typha latifolia</i></p>
<p>57</p> <p><i>Stratiotes aloides</i> <i>Trapa natans</i> <i>Typha latifolia</i></p>	<p>58</p> <p><i>Bidens frondosus</i> <i>Carex riparia</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lemna trisulca</i> <i>Myosotis palustris</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Rumex hydrolapathum</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Sium latifolium</i> <i>Stratiotes aloides</i> <i>Typha angustifolia</i> <i>Typha latifolia</i></p>	<p>59</p> <p><i>Alopecurus aequalis</i> <i>Bidens cernuus</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Phragmites australis</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Stratiotes aloides</i> <i>Trapa natans</i> <i>Typha latifolia</i></p>	<p>60</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Carex acuta</i> <i>Carex riparia</i> <i>Eleocharis palustris</i> <i>Elodea canadensis</i> <i>Epilobium hirsutum</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Juncus articulatus</i> <i>Juncus effusus</i> <i>Lemna trisulca</i> <i>Lycopus europaeus</i> <i>Potamogeton lucens</i> <i>Rumex hydrolapathum</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Typha angustifolia</i></p>
<p>61</p> <p><i>Carex riparia</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lemna minor</i> <i>Lycopus europaeus</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Rumex hydrolapathum</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Stratiotes aloides</i></p>	<p>62</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Carex riparia</i> <i>Hydrocharis morsus ranae</i> <i>Lemna minor</i> <i>Lemna trisulca</i> <i>Lycopus europaeus</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Rumex hydrolapathum</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i> <i>Sium latifolium</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Stratiotes aloides</i> <i>Typha angustifolia</i> <i>Typha latifolia</i> <i>Utricularia vulgaris</i></p>	<p>63</p> <p><i>Carex pseudocyperus</i> <i>Galium palustre</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lycopus europaeus</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Rumex hydrolapathum</i> <i>Stratiotes aloides</i></p>	<p>63</p> <p><i>Carex pseudocyperus</i> <i>Galium palustre</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lycopus europaeus</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Rumex hydrolapathum</i> <i>Stratiotes aloides</i></p>
<p>64</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Galium palustre</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Nymphaea alba</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Stratiotes aloides</i> <i>Typha latifolia</i></p>			

<p style="text-align: center;">65</p> <p><i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Lemna minor</i> <i>Lemna trisulca</i> <i>Nuphar lutea</i> <i>Phragmites australis</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Spirodela polyrhiza</i></p> <p style="text-align: center;">69</p> <p><i>Alisma lanceolatum</i> <i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Alopecurus aequalis</i> <i>Bidens tripartitus</i> <i>Glyceria fluitans</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Sparganium erectum</i></p> <p style="text-align: center;">74</p> <p><i>Bidens frondosus</i> <i>Bolboschoenus laticarpus</i> <i>Carex riparia</i> <i>Equisetum fluviatile</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Phalaris arundinacea</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Rumex hydrolapathum</i></p> <p style="text-align: center;">79</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bidens cernuus</i> <i>Echinochloa cruss-galli</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Phalaris arundinacea</i> <i>Rumex maritimus</i> <i>Typha angustifolia</i> <i>Typha latifolia</i></p>	<p style="text-align: center;">66</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Carex acuta</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Persicaria amphibia</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i> <i>Typha latifolia</i> <i>Xanthium italicum</i></p> <p style="text-align: center;">70</p> <p><i>Alopecurus aequalis</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Carex riparia</i> <i>Carex vesicaria</i> <i>Galium aparine</i> <i>Glyceria fluitans</i> <i>Chenopodium album</i> <i>Chenopodium polyspermum</i> <i>Persicaria hydropiper</i> <i>Persicaria minor</i> <i>Poa trivialis</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Tripleurospermum inodorum</i> <i>Veronica scutellata</i></p> <p style="text-align: center;">75</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bolboschoenus laticarpus</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Lemna minor</i> <i>Persicaria hydropiper</i> <i>Potamogeton crispus</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Sparganium erectum</i></p>	<p style="text-align: center;">67</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Carex acuta</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lemna minor</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Typha latifolia</i></p> <p style="text-align: center;">71</p> <p><i>Lemna minor</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Spirodela polyrhiza</i></p> <p style="text-align: center;">76</p> <p><i>Calystegia sepium</i> <i>Lemna minor</i> <i>Potentilla arenaria</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Typha latifolia</i></p> <p style="text-align: center;">72</p> <p><i>Glyceria maxima</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Persicaria lapathifolia</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Rumex palustris</i> <i>Sparganium erectum</i></p> <p style="text-align: center;">77</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bidens cernuus</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Bolboschoenus laticarpus</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Ranunculus sceleratus</i> <i>Rumex maritimus</i> <i>Rumex palustris</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Typha latifolia</i></p>	<p style="text-align: center;">68</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Carex acuta</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Elodea canadensis</i> <i>Chara sp.</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Myriophyllum spicatum</i> <i>Najas marina</i> <i>Najas minor</i> <i>Nuphar lutea</i> <i>Potamogeton crispus</i> <i>Potamogeton nodosus</i> <i>Potamogeton pusillus</i> <i>Rorippa sylvestris</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Sparganium erectum</i></p> <p style="text-align: center;">78</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Carex hirta</i> <i>Carex otrubae</i> <i>Cirsium arvense</i> <i>Glyceria fluitans</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lemna minor</i> <i>Lemna trisulca</i> <i>Lythrum virgatum</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Persicaria hydropiper</i> <i>Phragmites australis</i> <i>Plantago major</i> <i>Potamogeton crispus</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Teucrium scordium</i> <i>Typha angustifolia</i> <i>Utricularia vulgaris</i> <i>Veronica anagallis-aquatica</i></p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>80</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Juncus effusus</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Persicaria lapathifolia</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i></p>	<p>81</p> <p><i>Alisma lanceolatum</i> <i>Carex acuta</i> <i>Nuphar lutea</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Potamogeton lucens</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i> <i>Sparganium erectum</i></p>	<p>82</p> <p><i>Carex acuta</i> <i>Eleocharis acicularis</i> <i>Eleocharis mamillata</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Nuphar lutea</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i> <i>Sparganium erectum</i></p>	<p>83</p> <p><i>Alisma lanceolatum</i> <i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Carex acuta</i> <i>Eleocharis acicularis</i> <i>Eleocharis palustris</i> <i>Glyceria fluitans</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Nuphar lutea</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Rorippa amphibia</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i></p>
<p>84</p> <p><i>Carex acuta</i> <i>Equisetum fluviatile</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Sparganium erectum</i></p>	<p>85</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bidens cernuus</i> <i>Carex pseudocyperus</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Lemna minor</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Persicaria hydropiper</i> <i>Scutellaria galericulata</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Stratiotes aloides</i> <i>Typha latifolia</i> <i>Utricularia australis</i></p>	<p>86</p> <p><i>Carex acuta</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Glyceria fluitans</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Lemna trisulca</i> <i>Nuphar lutea</i> <i>Nymphaea alba</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Persicaria hydropiper</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Sparganium erectum</i></p>	<p>87</p> <p><i>Bidens forndosus</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Juncus inflexus</i> <i>Typha latifolia</i></p>
<p>88</p> <p><i>Carex acuta</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Lemna trisulca</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Nuphar lutea</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Sium latifolium</i></p>	<p>89</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Lemna trisulca</i> <i>Lythrum salicaria</i> <i>Nuphar lutea</i> <i>Rumex hydrolapathum</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Spirodela polyrhiza</i></p>	<p>92</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Eleocharis acicularis</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Nuphar lutea</i> <i>Potamogeton crispus</i> <i>Potamogeton natans</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Trapa natans</i></p>	<p>93</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Carex riparia</i> <i>Mentha aquatica</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Phalaris arundinacea</i> <i>Phragmites australis</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Typha angustifolia</i></p>
<p>91</p> <p><i>Alisma lanceolatum</i> <i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Bidens frondosus</i> <i>Bolboschoenus planiculmis</i> <i>Eleocharis palustris</i> <i>Glyceria fluitans</i> <i>Lemna minor</i> <i>Mentha aquatica</i> <i>Najas minor</i> <i>Oenanthe aquatica</i> <i>Potamogeton natans</i> <i>Ranunculus repens</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Salvinia natans</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Spirodela polyrhiza</i> <i>Xanthium italicum</i></p>	<p>94</p> <p><i>Carex acuta</i> <i>Carex acutiformis</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Iris pseudacorus</i> <i>Myosotis palustris</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i> <i>Sparganium erectum</i> <i>Typha latifolia</i></p>	<p>95</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Eleocharis palustris</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i> <i>Trapa natans</i></p>	<p>95</p> <p><i>Alisma plantago-aquatica</i> <i>Eleocharis palustris</i> <i>Glyceria maxima</i> <i>Hydrocharis morsus-ranae</i> <i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Schoenoplectus lacustris</i> <i>Trapa natans</i></p>

Tab. 10: Přehled znaků měřených na rostlinách v terénu. V tabulce je uvedena lokalita, ze které rostlina pochází, pořadí odebírané rostliny v populaci, ploidie rostliny a informace, zda rostlina vykvetla v kultivaci. Dále jsou již uvedeny hodnoty jednotlivých znaků.

Pořadí jedince	Lokalita (GPS kód)	Pořadí jedince v populaci	Ploidie	Kvetení v kultivaci	Výška stvolu (cm)	Šířka stvolu (mm)	Poměr šířky a výšky
1	51	1	2x	Ano	97	6.4	0.066
2	51	2	2x	Ne	76	6.5	0.086
3	51	3	3x	Ne	106	7.6	0.072
4	51	4	2x	Ano	91	5.5	0.060
5	51	5	3x	Ano	103	6.1	0.059
6	59	1	3x	Ne	111	6.2	0.056
7	59	2	3x	Ano	103	9	0.088
8	59	3	3x	Ne	132	9.6	0.073
9	59	4	3x	Ne	104	7	0.068
10	59	5	3x	Ne	123	8	0.065
11	67	1	2x	Ne	110	6	0.055
12	67	2	3x	Ano	120	7.4	0.062
13	67	3	2x	Ne	96	6	0.063
14	67	4	3x	Ano	144	9.1	0.063
15	67	5	2x	Ano	112	5.2	0.046
16	68	1	2x	Ne	80	4.8	0.060
17	68	2	2x	Ne	99	5	0.051
18	68	3	2x	Ne	109	6.4	0.059
19	68	4	2x	Ne	121	7	0.058
20	68	5	2x	Ano	78	4.6	0.059
21	37	1	3x	Ne	81	5.8	0.072
22	37	2	3x	Ne	66	4.5	0.068
23	37	3	3x	Ne	50	6.2	0.124
24	37	4	3x	Ne	65	5.2	0.080
25	37	5	3x	Ne	64	5.1	0.080
26	72	1	3x	Ne	82	6.2	0.076
27	72	2	3x	Ne	101	8	0.079
28	72	3	3x	Ne	94	7.2	0.077
29	72	4	3x	Ne	93	6.5	0.070
30	72	5	3x	Ne	118	8	0.068
31	91	1	3x	Ne	79	6.2	0.078
32	91	2	3x	Ne	73	6.9	0.095
33	91	3	3x	Ne	79	7.6	0.096
34	91	4	3x	Ne	86	8.4	0.098
35	91	5	3x	Ne	90	8.3	0.092
36	67	6	3x	Ano	105	7.4	0.070
37	67	7	2x	Ano	70	3.9	0.056
38	67	8	2x	Ne	86	5	0.058
39	67	9	2x	Ne	78	4.8	0.062
40	74	1	3x	Ano	114	6.9	0.061
41	74	2	2x	Ano	77	4.4	0.057
42	74	3	3x	Ano	124	8.5	0.069
43	74	4	3x	Ne	128	9.5	0.074

Pořadí jedince	Lokalita (GPS kód)	Pořadí jedince v populaci	Ploidie	Kvetení v kultivaci	Výška stvolu (cm)	Šířka stvolu (mm)	Poměr šířky a výšky
44	74	5	3x	Ano	138	9.9	0.072
45	74	6	2x	Ano	84	5.6	0.067
46	74	7	2x	Ano	127	5.7	0.045
47	74	8	2x	Ano	117	6.6	0.056
48	74	9	3x	Ne	40	5.1	0.128
49	39	1	3x	Ano	152	12.1	0.080
50	39	2	3x	Ne	120	7	0.058
51	39	3	2x	Ne	94	6	0.064
52	28	1	2x	Ne	125	8	0.064
53	28	2	3x	Ano	153	11.5	0.075
54	28	3	3x	Ano	164	10.5	0.064
55	28	4	3x	Ne	143	8.4	0.059
56	28	5	3x	Ne	148	9.7	0.066
57	81	1	3x	Ne	152	7.7	0.051
58	81	2	3x	Ano	147	7.2	0.049
59	81	3	2x	Ano	119	8.4	0.071
60	82	1	3x	Ne	130	9.4	0.072
61	82	2	2x	Ano	115	6.3	0.055
62	82	3	2x	Ano	90	6.4	0.071
63	82	4	2x	Ano	93	5.1	0.055
64	82	5	3x	Ano	136	7.4	0.054
65	82	6	3x	Ne	153	8.6	0.056
66	78	1	3x	Ano	83	7.5	0.090
67	78	2	3x	Ano	61	5.8	0.095
68	51	6	2x	Ano	134	6.5	0.049
69	51	7	2x	Ano	110	6.7	0.061
70	51	8	3x	Ne	107	7.4	0.069
71	51	9	3x	Ne	143	10.7	0.075
72	51	10	2x	Ne	105	5.5	0.052
73	51	11	2x	Ne	89	5.4	0.061
74	51	12	3x	Ne	121	8.2	0.068
75	95	1	2x	Ano	91	8	0.088
76	95	2	2x	Ano	107	8	0.075
77	95	3	2x	Ano	127	9.3	0.073
78	95	4	3x	Ne	131	7.6	0.058
79	95	5	3x	Ano	97	6.8	0.070
80	83	1	2x	Ne	116	7.5	0.065
81	83	2	2x	Ne	99	6.5	0.066
82	83	3	2x	Ne	101	5.8	0.057
83	83	4	2x	Ne	106	7.8	0.074
84	57	1	3x	Ne	104	6	0.058
85	57	2	3x	Ano	110	6.8	0.062
86	57	3	3x	Ne	106	6	0.057
87	57	4	3x	Ano	130	9.3	0.072
88	75	1	2x	Ne	126	7.8	0.062
89	75	2	3x	Ano	128	6.8	0.053
90	75	3	3x	Ne	139	9.3	0.067

Pořadí jedince	Délka listu (cm)	Šířka listu (cm)	Tloušťka listu (mm)	Poměr šířky a délky	Poměr tloušťky a šířky	Délka oddenku (cm)	Počet pacibulek	Pacibulky na 1 cm
1	84	7.2	4.5	0.086	0.625	31	26	0.84
2	84	10.3	4.9	0.123	0.476	14	7	0.50
3	105	10	6.4	0.095	0.640	30	11	0.37
4	80	7.6	5.4	0.095	0.711	22	13	0.59
5	79	8	2.2	0.101	0.275	17	30	1.76
6	109	9	4	0.083	0.444	40	33	0.83
7	102	12.6	3.4	0.124	0.270	32	30	0.94
8	111	11.1	4	0.100	0.360	25	24	0.96
9	109	9.3	4.3	0.085	0.462	32	32	1.00
10	95	8.6	4	0.091	0.465	21	22	1.05
11	92	7.4	2.2	0.080	0.297	16	16	1.00
12	90	7.9	2	0.088	0.253	12	13	1.08
13	91.5	9.1	2.9	0.099	0.319	19	22	1.16
14	116	9.4	3	0.081	0.319	13	20	1.54
15	103	6	4.2	0.058	0.700	10	5	0.50
16	70	7.3	2.9	0.104	0.397	11	10	0.91
17	81	7	3.6	0.086	0.514	23	10	0.43
18	77	8.4	5.5	0.109	0.655	25	15	0.60
19	99	11	4	0.111	0.364	29	21	0.72
20	76	7.9	4.6	0.104	0.582	17	11	0.65
21	58	6.2	2.4	0.107	0.387	10	10	1.00
22	60	6.6	2.1	0.110	0.318	9	1	0.11
23	76	8.5	3.3	0.112	0.388	15	10	0.67
24	55	7	3	0.127	0.429	8	7	0.88
25	64	7.3	2.8	0.114	0.384	6	3	0.50
26	63	10.2	7	0.162	0.686	25	23	0.92
27	64	11.9	7.8	0.186	0.655	22	17	0.77
28	71	11.1	6	0.156	0.541	17	9	0.53
29	67	8.9	5	0.133	0.562	18	15	0.83
30	87	10	6.2	0.115	0.620	20	14	0.70
31	93	7.6	5.7	0.082	0.750	16	8	0.50
32	95	8.2	5.3	0.086	0.646	18	10	0.56
33	89	8	4.6	0.090	0.575	24	10	0.42
34	95	8.5	5.8	0.089	0.682	18	8	0.44
35	104	9.4	6.6	0.090	0.702	21	14	0.67
36	71	9.8	4.9	0.138	0.500	20	36	1.80
37	59	5	2.9	0.085	0.580	10	13	1.30
38	78	6.9	3.2	0.088	0.464	12	7	0.58
39	65	5	3.1	0.077	0.620	6	9	1.50
40	106	9.4	8	0.089	0.851	14	10	0.71
41	86	7.5	4.7	0.087	0.627	11	14	1.27
42	112	12.5	6.5	0.112	0.520	15	28	1.87
43	98	11.6	6.8	0.118	0.586	17	22	1.29
44	111	11.2	7.1	0.101	0.634	14	20	1.43
45	72	7.7	5.6	0.107	0.727	13	11	0.85

Pořadí jedince	Délka listu (cm)	Šířka listu (cm)	Tloušťka listu (mm)	Poměr šířky a délky	Poměr tloušťky a šířky	Délka oddenku (cm)	Počet pacibulek	Pacibulky na 1 cm
46	101	8.6	5.7	0.085	0.663	11	11	1.00
47	85	6.6	3.8	0.078	0.576	12	12	1.00
48	92	9.2	5.6	0.100	0.609	9	15	1.67
49	120	11.5	8.4	0.096	0.730	24	52	2.17
50	82	9.5	6.7	0.116	0.705	16	17	1.06
51	89	9	6	0.101	0.667	21	20	0.95
52	124	7.4	5.8	0.060	0.784	14	3	0.21
53	139	11.4	10.2	0.082	0.895	23	9	0.39
54	139	9	6.4	0.065	0.711	14	0	0.00
55	119	6.8	5	0.057	0.735	8	1	0.13
56	141	9.3	5.7	0.066	0.613	19	8	0.42
57	124	8	4.9	0.065	0.613	14	16	1.14
58	139	6	4	0.043	0.667	6	4	0.67
59	139	7.5	6.3	0.054	0.840	14	6	0.43
60	115	9.5	6.3	0.083	0.663	11	1	0.09
61	107	6.2	5.4	0.058	0.871	15	2	0.13
62	100	8.5	5.6	0.085	0.659	18	5	0.28
63	104	4.1	3.2	0.039	0.780	11	1	0.09
64	115	7.5	4.7	0.065	0.627	10	15	1.50
65	123	8.9	5.2	0.072	0.584	17	13	0.76
66	92	6	4.2	0.065	0.700	20	7	0.35
67	60	7.4	4.4	0.123	0.595	14	2	0.14
68	118	6	4.3	0.051	0.717	15	12	0.80
69	96	7.2	5.4	0.075	0.750	17	12	0.71
70	120	9	4.8	0.075	0.533	15	2	0.13
71	153	10.6	7.3	0.069	0.689	26	7	0.27
72	128	6	4.8	0.047	0.800	12	11	0.92
73	83	4.8	4	0.058	0.833	8	4	0.50
74	12.6	8.3	5.9	0.659	0.711	14	2	0.14
75	124	7.8	5.7	0.063	0.731	17	2	0.12
76	115	5.4	3.5	0.047	0.648	12	3	0.25
77	134	8.5	6	0.063	0.706	20	5	0.25
78	127	6.9	5	0.054	0.725	13	2	0.15
79	97	8.5	5.5	0.088	0.647	20	16	0.80
80	123	7.3	5	0.059	0.685	18	4	0.22
81	94	5.9	4.7	0.063	0.797	8	0	0.00
82	107	5.7	3.9	0.053	0.684	12	4	0.33
83	123	8.4	6.5	0.068	0.774	25	8	0.32
84	92	6.2	3.5	0.067	0.565	11	15	1.36
85	98	7.5	6.9	0.077	0.920	9	10	1.11
86	100	9.1	5.4	0.091	0.593	8	7	0.88
87	106	8	6.2	0.075	0.775	12	16	1.33
88	105	11.8	5.5	0.112	0.466	13	11	0.85
89	100	5.8	5.5	0.058	0.948	16	6	0.38
90	116	9.8	6.4	0.084	0.653	16	17	1.06

Pořadí jedince	Počet květů	Vnitřní okvětní lístky								
		1. délka (mm)	1. šířka (mm)	2. délka (mm)	2. šířka (mm)	3. délka (mm)	3. šířka (mm)	Průměrná délka (mm)	Průměrná šířka (mm)	Poměr prům. šířky a délky
1	37	12	7.9	11	8.1	13	7.2	11.9	7.7	0.65
2	21	12	9	13	7.5	12	7	12.2	7.8	0.64
3	38	12	12	13	13	14	14	12.9	12.9	1.00
4	35	14	7.4	12	8	13	8.1	12.9	7.8	0.61
5	29	12	9.6	13	8.1	12	9	12.5	8.9	0.71
6	34	14	7.8	14	9	12	9	13.3	8.6	0.65
7	52	16	10	15	10	18	9.4	16.2	9.8	0.60
8	50	15	10	14	11	14	11	14.4	10.5	0.73
9	36	14	8.7	15	9.2	15	9.5	14.6	9.1	0.63
10	43	13	9.5	14	9.4	12	10	13.3	9.6	0.73
11	45	13	6.6	13	7.6	15	7.4	13.8	7.2	0.52
12	46	13	9.9	14	9.9	12	9.4	12.7	9.7	0.77
13	41	12	6.1	13	6.2	12	6.8	12.3	6.4	0.52
14	59	11	10	11	10	13	11	11.7	10.4	0.89
15	29	16	7.4	12	7	14	7.4	13.6	7.3	0.53
16	21	10	7.3	13	6.9	12	6.7	11.7	7.0	0.60
17	30	12	7.1	13	7.8	13	8.2	12.5	7.7	0.62
18	43	12	10	12	12	13	10	12.3	10.5	0.85
19	39	16	10	16	13	15	12	15.9	11.6	0.73
20	24	11	6.5	10	6.5	10	6.2	10.3	6.4	0.62
21	17	7.8	6.4	7.7	7.1	7	6	7.5	6.5	0.87
22	19	7	5.3	7.3	6.8	7.9	6.3	7.4	6.1	0.83
23	20	8	9	9.3	8.4	7.5	8.8	8.3	8.7	1.06
24	19	6.5	6.2	7.5	6.4	8.2	7.2	7.4	6.6	0.89
25	14	7	6	6.2	5.1	6.6	5.6	6.6	5.6	0.84
26	28	10	8	13	8.6	13	8	11.8	8.2	0.69
27	34	16	9.6	15	11	12	12	14.2	10.7	0.76
28	30	12	11	13	11	14	9.7	13.1	10.4	0.80
29	28	12	7.8	12	9.4	13	9	12.4	8.7	0.70
30	41	14	9	13	8.4	12	8.2	12.9	8.5	0.66
31	29	12	9.4	9.9	8.8	11	8.9	10.9	9.0	0.83
32	32	12	11	12	11	11	12	11.9	11.3	0.95
33	27	9.2	11	13	12	13	11	11.5	11.5	1.00
34	27	9.7	10	11	10	11	9	10.8	9.9	0.92
35	32	12	12	12	12	12	10	12.0	11.2	0.93
36	33	13	11	14	10	13	12	13.1	10.7	0.82
37	19	11	6.4	11	5.2	9.8	6.1	10.5	5.9	0.56
38	26	12	5.7	11	6.1	12	6.6	11.6	6.1	0.53
39	18	8.5	4.8	8.6	4.2	7.7	4.6	8.3	4.5	0.55
40	36	12	7.2	10	6.7	9.6	6.7	10.6	6.9	0.65
41	23	9.9	5.2	9	5.7	9.4	5	9.4	5.3	0.56
42	41	13	10	11	9.6	13	10	12.1	9.9	0.82
43	45	12	8.6	12	7.9	13	8.8	12.3	8.4	0.69
44	47	10	6.8	9.9	6.5	11	7.3	10.1	6.9	0.68
45	36	9.5	5.6	10	5.6	8.8	6	9.4	5.7	0.61

Pořadí jedince	Počet květů	Vnitřní okvětní lístky								
		1. délka (mm)	1. šířka (mm)	2. délka (mm)	2. šířka (mm)	3. délka (mm)	3. šířka (mm)	Průměrná délka (mm)	Průměrná šířka (mm)	Poměr prům. šířky a délky
46	37	8.7	5.6	8.3	5.5	9.8	6.2	8.9	5.8	0.65
47	46	11	4.5	11	5	11	4.9	10.7	4.8	0.45
48	15	8.6	5.9	8.8	6.6	8.8	7.5	8.7	6.7	0.76
49	71	16	11	14	13	13	12	14.4	11.9	0.82
50	43	13	10	13	9.5	13	10	12.9	9.9	0.77
51	20	9.1	7	10	5.5	10	6.2	9.9	6.2	0.63
52	41	16	8	15	7.7	15	8.1	15.2	7.9	0.52
53	45	13	15	13	12	11	13	12.1	13.1	1.08
54	69	14	12	15	12	15	11	14.7	11.4	0.78
55	36	11	9.3	13	8.6	12	9.6	11.9	9.2	0.77
56	47	12	9.8	12	8.9	12	10	11.8	9.6	0.82
57	39	12	7.5	13	8.8	11	7.9	11.7	8.1	0.69
58	25	14	7.2	13	7	13	7.4	13.0	7.2	0.55
59	23	12	4.2	9.8	3.8	9.7	5.2	10.4	4.4	0.42
60	41	11	13	13	13	13	10	12.3	12.1	0.99
61	45	13	8.6	12	7.3	12	7.5	12.4	7.8	0.63
62	40	12	7.1	11	6.6	12	7.7	11.5	7.1	0.62
63	25	11	6	11	6.1	11	6.2	10.9	6.1	0.56
64	27	11	8.1	10	8.2	9.6	7	10.4	7.8	0.75
65	45	8.4	8.7	9.7	8.2	9.8	8.5	9.3	8.5	0.91
66	34	11	8.8	12	9	12	9.4	11.9	9.1	0.76
67	18	10	6.9	10	7.7	10	8.5	10.2	7.7	0.75
68	36	12	7.8	12	7.7	12	7.4	11.9	7.6	0.64
69	40	11	7.6	13	6.9	13	7.6	12.4	7.4	0.60
70	35	13	12	14	12	12	13	13.1	12.4	0.95
71	63	15	13	13	13	13	13	13.7	13.0	0.95
72	30	11	5.7	9.4	6.7	11	6	10.5	6.1	0.59
73	26	13	6.7	12	7.1	12	7	12.2	6.9	0.57
74	41	13	12	13	10	12	11	12.9	11.0	0.86
75	31	12	6.2	12	6.4	13	6.4	12.4	6.3	0.51
76	27	11	6.3	11	6.1	12	5.3	11.1	5.9	0.53
77	39	12	6.7	12	6.2	12	6	12.1	6.3	0.52
78	46	13	8.6	12	8.7	14	8.8	13.1	8.7	0.67
79	40	10	9.7	9.8	9.8	10	10	10.0	9.9	0.98
80	31	12	8.1	13	8.9	12	8.2	12.3	8.4	0.68
81	33	14	7.7	13	7.9	12	6.5	13.1	7.4	0.56
82	28	13	9.1	14	7.5	13	6.8	13.1	7.8	0.60
83	31	14	7.6	15	8.2	14	8.2	14.1	8.0	0.57
84	30	15	8.5	13	9	13	7.9	13.6	8.5	0.62
85	30	17	8.9	17	9.9	16	8.7	16.5	9.2	0.56
86	32	13	9.2	14	8.2	14	7.5	13.8	8.3	0.60
87	49	16	9.1	16	10	14	9.7	15.1	9.6	0.63
88	33	13	8.5	15	9.3	12	9	13.3	8.9	0.67
89	37	12	8.2	11	9.5	12	9	11.7	8.9	0.76
90	47	13	9.2	14	9.9	14	8.9	13.4	9.3	0.70

Tab. 11: Přehled znaků naměřených na rostlinách, které vykvetly kultivaci. Číslo ve sloupci Pořadí jedince odpovídá stejnému číslu (jedinci) v předcházející tabulce

Pořadí jedince	Výška stvolu (cm)	Šířka stvolu (mm)	Poměr šířky a výšky	Délka listu (cm)	Šířka listu (mm)	Tloušťka listu (mm)	Poměr šířky a délky	Poměr šířky a tloušťky	Délka oddenku (cm)	Pacibulky na 1 cm
1	65	3.8	0.0585	44	3.5	2.5	0.080	0.714	87	0.8
4	71	4	0.0563	40	2.9	1.5	0.073	0.517	53	0.9
5	79	4.4	0.0557	35	5	2.5	0.143	0.500	64	1
7	95	6	0.0632	59	7.5	4.3	0.127	0.573	85	0.6
12	93	6.1	0.0656	52	3.5	2.5	0.067	0.714	81	0.4
14	70	5	0.0714	55	6.1	3.1	0.111	0.508	78	1
15	63	2.9	0.0460	50	4.2	2.5	0.084	0.595	89	0.4
20	63	4	0.0635	32	2.6	2.1	0.081	0.808	56	0.4
36	84	5.3	0.0631	43	7.2	3.3	0.167	0.458	50	0.3
37	73	4.5	0.0616	46	5.7	3.5	0.124	0.614	47	1
40	81	5.7	0.0704	48	8.4	4.2	0.175	0.500	84	0.3
41	64	4.2	0.0656	39	6.6	4.3	0.169	0.652	87	0.8
42	111	6	0.0541	58	9.8	4.3	0.169	0.439	77	1.2
44	100	6.4	0.0640	49	9.1	4.5	0.186	0.495	76	1
45	84	4.7	0.0560	37	6.6	4.2	0.178	0.636	62	0.9
47	78	4.6	0.0590	30	6.6	4.5	0.220	0.682	64	0.3
49	94	5.2	0.0553	54	8	5.1	0.148	0.638	70	0.4
53	91	5.8	0.0637	53	10.6	6	0.200	0.566	70	0.8
54	80	5.4	0.0675	53	10	4.7	0.189	0.470	39	0.6
58	87	5.7	0.0655	54	7.7	4.4	0.143	0.571	53	0.4
59	79	4.8	0.0608	56	7.7	4.8	0.138	0.623	42	0.1
61	52	5.3	0.1019	94	9.5	4.9	0.101	0.516	49	0.3
62	86	4.5	0.0523	46	7.9	4.7	0.172	0.595	76	0.3
63	77	4.2	0.0545	50	6.1	3	0.122	0.492	45	0.2
64	104	5.8	0.0558	58	11.2	5	0.193	0.446	44	1
66	51	5.1	0.1000	55	8.6	5	0.156	0.581	96	0.2
67	62	4.4	0.0710	45	8.5	3.5	0.189	0.412	70	0.2
68	77	3.9	0.0506	46	6.5	3.2	0.141	0.492	47	0.5
69	88	4.8	0.0545	58	6.5	4	0.112	0.615	33	1
75	77	4.8	0.0623	50	8.1	4.4	0.162	0.543	51	0.1
76	65	4.6	0.0708	44	6.5	2.5	0.148	0.385	35	0.2
77	90	5.2	0.0578	58	8.7	4.4	0.150	0.506	61	0.1
79	91	5.6	0.0615	43	9.6	4.1	0.223	0.427	69	1.5
85	89	5.5	0.0618	50	7.2	4.2	0.144	0.583	23	1
87	35	4.7	0.1343	57	9.4	4.2	0.165	0.447	47	0.5
89	52	4.8	0.0923	92	8.5	3.6	0.092	0.424	45	0.8

Pořadí jedince	Počet květů	Vnitřní okvětní lístky								
		1. délka (mm)	1. šířka (mm)	2. délka (mm)	2. šířka (mm)	3. délka (mm)	3. šířka (mm)	Průměrná délka (mm)	Průměrná šířka (mm)	Poměr prům. šířky a délky
1	20	10	7.6	10	7.1	9.4	5.8	9.8	6.8	0.70
4	19	13.5	7.4	11.9	7.9	13.5	7.5	13.0	7.6	0.59
5	26	14	11.4	11	10	14.1	10.2	13.0	10.6	0.81
7	24	9.8	9.9	10.9	9.1	10.9	10.2	10.5	9.7	0.92
12	21	12.4	10	11.6	9.6	11.1	10	11.7	9.9	0.84
14	22	11.4	11.3	11.8	11	10.2	11.8	11.1	11.4	1.02
15	20	10.6	6.1	12.2	6.8	12.1	7.3	11.6	6.7	0.58
20	16	10	7.1	10.4	7.3	10.6	7.3	10.3	7.2	0.70
36	22	11.9	9.9	12	11	12.5	9.3	12.1	9.9	0.82
37	21	14.6	8.7	15	8	15.1	8.2	14.9	8.3	0.56
40	18	13	9.5	13.1	11	15.3	12.2	13.8	10.8	0.79
41	20	13.9	6.8	14	6.2	13.3	6.9	13.7	6.6	0.48
42	31	12.2	10.2	14	10	12.6	9.4	12.9	10.0	0.77
44	27	9.2	7.9	11	8.3	10	8.5	10.1	8.2	0.82
45	21	14.9	8.7	14.3	6.2	14.4	6.3	14.5	7.1	0.49
47	22	17.2	6.1	16.8	6	16.7	6	16.9	6.0	0.36
49	22	12.6	10.1	13.9	11	13.8	11	13.4	10.7	0.80
53	19	12.5	10.9	12.3	11	11.9	9	12.2	10.1	0.83
54	22	12.3	12.9	12.8	12	11.4	13	12.2	12.7	1.04
58	24	12.3	9.6	13.2	10	12.6	9.7	12.7	9.9	0.78
59	24	12.8	7.4	13.7	7.3	13.4	6.7	13.3	7.1	0.54
61	27	13	8.4	13	8.7	13	8.9	13.0	8.7	0.67
62	23	12.1	7.8	13.1	8.5	12.7	8.1	12.6	8.1	0.64
63	21	13.3	5.8	14.5	6.1	13.8	6.5	13.9	6.1	0.44
64	28	12.9	12.4	14.3	11	13	11.5	13.4	11.6	0.87
66	23	15.3	11.5	13.6	10	13.8	11.7	14.2	11.1	0.78
67	17	11.9	8.7	13.3	9.2	13.7	9.5	13.0	9.1	0.70
68	20	13	7.7	13.4	8.2	13.5	7.7	13.3	7.9	0.59
69	23	13	8.3	13.8	8.3	13.6	7.6	13.5	8.1	0.60
75	17	13.1	6.3	12.2	7.7	13.2	7.1	12.8	7.0	0.55
76	16	12.2	7.9	13.5	6.7	12.4	7	12.7	7.2	0.57
77	23	16.6	8.1	15.3	8.7	15.7	8.6	15.9	8.5	0.53
79	26	10.2	10.2	10.3	10	12	9.5	10.8	10.0	0.92
85	20	13.2	10.9	13.1	11	11.7	10.1	12.7	10.6	0.84
87	16	11.9	7.5	11	7.1	12.7	8	11.9	7.5	0.63
89	23	10.7	8.6	12.1	9.1	12.1	10.4	11.6	9.4	0.81

Tab. 12: Přehled skórovaných alel 14 mikrosatelitových lokusů na 14 vzorcích, které byly použity pro testování variability, ve formátu pro knihovnu POLYSAT. V prvním sloupci je název vzorku, ve druhém název lokusu. U každé alely je uvedena její délka v párech bází (-9 znamená chybějící alelu).

Sample.Name	Marker	Allele.1	Allele.2	Allele.3
B39	BUT6	109	112	
B39	BUT4	192	212	
B39	BUT14	143		
B39	BUT15	195	201	219
B39	BUT29	190	192	200
B39	BUT28	291	303	311
B39	BUT31	240	250	252
B39	BUT45	149	152	155
B39	BUT34	259	277	287
B39	BUT32	104	112	122
B39	BUT39	259	277	286
B39	BUT37	436	440	
B39	BUT42	231	259	
B39	BUT41	288	300	
B40	BUT6	109	112	
B40	BUT4	200	220	
B40	BUT14	127		
B40	BUT15	210	213	
B40	BUT29	190	218	
B40	BUT28	299	301	
B40	BUT31	240	268	
B40	BUT45	185		
B40	BUT34	269	285	
B40	BUT32	104		
B40	BUT39	268	283	
B40	BUT37	424	436	
B40	BUT42	315	371	
B40	BUT41	288	300	
B42	BUT6	109		
B42	BUT4	200	204	
B42	BUT14	121	135	
B42	BUT15	204	213	
B42	BUT29	200	206	
B42	BUT28	299	303	
B42	BUT31	240	256	
B42	BUT45	155	158	
B42	BUT34	259	273	
B42	BUT32	112		
B42	BUT39	259	271	
B42	BUT37	412	440	
B42	BUT42	299	319	
B42	BUT41	288	304	
B43	BUT6	109	112	115
B43	BUT4	192	212	
B43	BUT14	131	143	
B43	BUT15	195	201	207
B43	BUT29	200		
B43	BUT28	299		
B43	BUT31	246	250	252
B43	BUT45	170	179	185
B43	BUT34	259	267	273

B43	BUT32	112		
B43	BUT39	259	268	271
B43	BUT37	412	432	440
B43	BUT42	231	259	303
B43	BUT41	296	308	320
B44	BUT6	109	112	
B44	BUT4	192	212	
B44	BUT14	129	143	
B44	BUT15	201	207	219
B44	BUT29	190	200	
B44	BUT28	291	301	311
B44	BUT31	234	250	252
B44	BUT45	152	167	
B44	BUT34	259	275	287
B44	BUT32	112	118	122
B44	BUT39	259	274	286
B44	BUT37	436	440	
B44	BUT42	231	255	259
B44	BUT41	300		
B45	BUT6	-9		
B45	BUT4	192	212	
B45	BUT14	131	143	
B45	BUT15	195	201	207
B45	BUT29	200		
B45	BUT28	299		
B45	BUT31	246	250	252
B45	BUT45	170	176	185
B45	BUT34	259	269	273
B45	BUT32	110	114	
B45	BUT39	259	268	271
B45	BUT37	412	432	440
B45	BUT42	231	259	303
B45	BUT41	296	308	320
B47	BUT6	-9		
B47	BUT4	204		
B47	BUT14	123	129	
B47	BUT15	204		
B47	BUT29	182	184	
B47	BUT28	299		
B47	BUT31	228	252	
B47	BUT45	149	170	
B47	BUT34	-9		
B47	BUT32	112	126	
B47	BUT39	-9		
B47	BUT37	432	440	
B47	BUT42	299	331	
B47	BUT41	288	316	
B52	BUT6	109		
B52	BUT4	200	204	
B52	BUT14	121	135	
B52	BUT15	204	213	
B52	BUT29	200	206	
B52	BUT28	299	303	
B52	BUT31	240	256	
B52	BUT45	155	158	
B52	BUT34	259	273	
B52	BUT32	110	112	
B52	BUT39	259	271	
B52	BUT37	412	440	

B52	BUT42	299	319	
B52	BUT41	288	304	
B53	BUT6	112	115	
B53	BUT4	196		
B53	BUT14	127	147	
B53	BUT15	207	216	
B53	BUT29	188	218	
B53	BUT28	297	299	
B53	BUT31	240	252	
B53	BUT45	170		
B53	BUT34	259	275	
B53	BUT32	112	118	
B53	BUT39	259	274	
B53	BUT37	412	440	
B53	BUT42	307	315	
B53	BUT41	288		
B57	BUT6	-9		
B57	BUT4	200	212	
B57	BUT14	129		
B57	BUT15	210	222	
B57	BUT29	194	200	
B57	BUT28	299	311	
B57	BUT31	236	252	
B57	BUT45	149		
B57	BUT34	259	277	
B57	BUT32	112		
B57	BUT39	259	277	
B57	BUT37	436	440	
B57	BUT42	255	311	
B57	BUT41	288	300	
B58	BUT6	109	112	
B58	BUT4	192	212	
B58	BUT14	129	143	
B58	BUT15	201	207	219
B58	BUT29	190	200	
B58	BUT28	291	301	311
B58	BUT31	236	252	
B58	BUT45	148	152	167
B58	BUT34	259	275	287
B58	BUT32	112	118	122
B58	BUT39	259	274	286
B58	BUT37	436	440	
B58	BUT42	231	255	259
B58	BUT41	300		
B66	BUT6	106	109	112
B66	BUT4	204		
B66	BUT14	121	127	135
B66	BUT15	195	204	216
B66	BUT29	186	200	
B66	BUT28	297	301	
B66	BUT31	224	252	254
B66	BUT45	182		
B66	BUT34	259	269	277
B66	BUT32	104	110	118
B66	BUT39	259	268	277
B66	BUT37	424	440	444
B66	BUT42	327	339	
B66	BUT41	292	296	
B80	BUT6	106	109	112

B80	BUT4	192	204	212
B80	BUT14	127	143	
B80	BUT15	201	210	219
B80	BUT29	190	200	
B80	BUT28	291	299	311
B80	BUT31	234	248	250
B80	BUT45	152	167	
B80	BUT34	259	275	
B80	BUT32	112	116	118
B80	BUT39	259	274	
B80	BUT37	412	436	440
B80	BUT42	231	259	
B80	BUT41	288	300	
B98	BUT6	106	109	112
B98	BUT4	204		
B98	BUT14	121	127	135
B98	BUT15	195	204	216
B98	BUT29	186	200	
B98	BUT28	297	301	
B98	BUT31	224	252	254
B98	BUT45	185		
B98	BUT34	259	269	277
B98	BUT32	104	110	118
B98	BUT39	259	268	277
B98	BUT37	424	440	444
B98	BUT42	327	339	
B98	BUT41	292	296	