

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Diplomová práce

2017

Bc. Jan Podroužek

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Četnost výskytu fertálních a sterilních populací
hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*)
s porovnáním jednotlivých cytotypů**

Diplomová práce

Bc. Jan Podroužek

Školitel: RNDr. Libor Ekrt, PhD.

České Budějovice 2017

Podroužek, J., 2017: Četnost výskytu fertálních a sterilních populací hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) s porovnáním jednotlivých cytotypů. [Frequency of occurrence of the bracken fern (*Pteridium aquilinum*) fertile and sterile populations and the comparison of its cytotypes., Mgr. Thesis, in Czech.] – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The data from public herbal collections were used to determine the frequency of the occurrence of fertile bracken populations. Samples of bracken were collected to assess the degree of fertility and also to reveal the frequency of both diploid and triploid cytotypes using flow cytometry. Collected samples were also used for SSR analysis to characterize the population structure of both cytotypes and the propagation of triploid plants of bracken.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 19. 4. 2017

.....
podpis

Rád bych tímto v první řadě poděkoval svému školiteli Liboru Ekrtovi za uvedení do problematiky a za veškerou pomoc s touto diplomovou prací a s přípravami k její kompletaci. Velký dík patří rovněž Petru Kouteckému za pomoc s analýzou na průtokovém cytometru a mnoho cenných rad při interpretaci dat získaných analýzou mikrosatelitů. Za přípravu veškerého potřebného materiálu k analýze mikrosatelitů, za navržení primerů a za pomoc při praktické práci v Laboratoři molekulární biologie rostlin PřF JU patří obrovský dík Jiřímu Košnarovi. Josefu Juráňovi děkuji za přípravu kultivačního média a poskytnutí prostoru pro kultivaci.

Zároveň bych chtěl poděkovat panu Zdeňku Kaplanovi za poskytnutí aktuální verze mapy rozšíření hasivky orličí vygenerované z databáze PLADIAS. Děkuji také panu Jiřímu Vaněčkovi za umožnění využití elektronového mikroskopu v Laboratoři elektronové mikroskopie BC AVČR podpořené projektem *MEYS CR (LM2015062 Czech-BioImaging)*. V neposlední řadě děkuji Barboře Jonášové za poskytnutí dat z její bakalářské práce k porovnání s daty vlastními. Na závěr bych rád poděkoval všem, kteří mi pomohli se sběry hasivky orličí v terénu. Jmenovitě Liboru Ekrtovi za sběry v Německu, Dánsku, Norsku, Švédsku a Chorvatsku, Petru Kouteckému za sběry v Portugalsku, Ondřeji Hornychovi za sběry v Rakousku a České republice, Ondřeji a Vojtěchu Holickým za pomoc při sběrech v Beskydech a svým rodičům Petře a Vítu a bratrům Danielu a Vojtěchu Podroužkovým za pomoc při sběrech po celé České republice.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce.....	2
3 Metodika.....	3
3.1 Rozšíření <i>Pteridium aquilinum</i> v ČR.....	3
3.2 Míra fertility <i>Pteridium aquilinum</i>	3
3.3 Četnost výskytu jednotlivých cytotypů.....	4
3.4 Velikosti průduchů a spor.....	4
3.5 Míra fertility jednotlivých cytotypů.....	5
3.6 Genetická struktura populací.....	5
4 Výsledky.....	8
4.1 Rozšíření <i>Pteridium aquilinum</i> v ČR.....	8
4.2 Míra fertility <i>Pteridium aquilinum</i>	9
4.3 Četnost výskytu jednotlivých cytotypů.....	12
4.4 Velikost průduchů a spor.....	16
4.5 Míra fertility jednotlivých cytotypů.....	18
4.6 Genetická struktura populací.....	20
4.6.1 AMOVA.....	21
4.6.2 Neighbour-network.....	22
4.6.3 PCoA.....	23
4.6.4 Genotypová diverzita.....	26
5 Diskuze.....	29
5.1 Rozšíření a fertilita <i>Pteridium aquilinum</i> v ČR.....	29
5.2 Četnost výskytu jednotlivých cytotypů.....	30
5.3 Velikost průduchů a spor.....	30
5.4 Míra fertility jednotlivých cytotypů.....	31
5.5 Genetická struktura populací.....	34
6 Závěr.....	38
7 Seznam použitých zdrojů.....	39
7.1 Literatura.....	39
7.2 Internetové zdroje.....	45
7.3 Software.....	45
8 Přílohy.....	46

1 Úvod

Pteridium aquilinum ssp. *aquilinum* sensu Der et al. (2009) je evropská subspecie hasivky orličí v rámci Laurasijko-afrického cladu severní polokoule. Patří do čeledi Dennstaedtiaceae. Pro svůj ekologický význam a dopad se stal celý rod *Pteridium* hojně studovaným napříč celým spektrem vědeckých oborů.

Tato diplomová práce částečně navazuje na bakalářskou práci Barbory Jonášové (Jonášová 2015), která byla zaměřená především na zjištění ekologických faktorů ovlivňujících fertilitu hasivky orličí. Hasivka se totiž, na rozdíl od většiny ostatních kapradin, které plodí víceméně každoročně, vyskytuje fertilní spíše vzácně (Jonášová 2015). Protože závislost fertility na všech zkoumaných faktorech vyšla neprůkazně, byl pro tuto diplomovou práci výrazně rozšířen dataset a byly sledovány další z potenciálních faktorů ovlivňujících fertilitu hasivky orličí.

Během zpracování vzorků sbíraných v rámci bakalářské práce B. Jonášové (Jonášová 2015) byl v České republice poprvé objeven triploidní cytotyp hasivky orličí. Hasivka se vyskytuje ve třech ploidních, přičemž základní chromozomové číslo je $x = 52$ (Manton 1950). Základní ploidní stupeň je $2x$, byly ale objeveny i rostliny tetraploidní (Jarret et al. 1968, Tan et Thomson 1990) a vzácně i triploidní (Sheffield et al. 1993, Jonášová 2015).

Protože primárním cílem bakalářské práce B. Jonášové bylo zjištění ekologických faktorů ovlivňujících fertilitu hasivky orličí, byly analyzovány pouze čtyři triploidní rostliny. Smyslem této práce tedy bylo mimo jiné i rozšířit sampling a pokusit se získat co největší podíl triploidních rostlin pro relevantní srovnání s rostlinami diploidními.

Při bližším zkoumání fertilních triploidních rostlin bylo zjištěno B. Jonášovou velmi vysoké procento vyvinutých výtrusů (více než 95%), což je pro triploidní cytotyp velice neobvyklé (Reichstein 1981, Otto et Whitton 2000). Kromě velkého množství vyvinutých výtrusů byla nápadná i jejich velikost v porovnání s výtrusy diploidních rostlin. Z toho důvodu byly považovány za neredukované výtrusy (tj. diplospory). Pro porovnání s jinými fertilními triploidními jedinci bylo opět potřeba zajistit větší množství materiálu a to bylo dalším z cílů této práce.

Protože je triploidní cytotyp hasivky orličí poměrně vzácný, není dosud uspokojivě popsán jeho vznik a šíření. Pro zjištění genetické variability triploidního cytotypu v porovnání s diploidním byla v rámci této práce provedena analýza mikrosatelitů. Smyslem této analýzy bylo určit, zda triploidní rostliny v našem prostředí vznikají na daných lokalitách opakovaně z přítomných diploidů, nebo naopak vznikají vzácně a šíří se pak především klonálně.

2 Cíle práce

Na základě výše uvedených skutečností byly pro tuto diplomovou práci vytyčeny následující cíle.

- 1) Zpracování rozšíření hasivky orličí na území České republiky s využitím školitelem revidovaných herbářových položek s rozlišenými fertilními a sterilními sběry (v rámci projektu PLADIAS).
- 2) Zhodnocení fertility populací hasivky orličí na základě dat z vlastních sběrů, údajů z veřejných herbářových sbírek a dat bakalářské práce Barbory Jonášové (Jonášová 2015).
- 3) Korelace výskytu fertilních populací hasivky orličí s klimatickými daty Českého hydrometeorologického ústavu.
- 4) Zjištění četnosti výskytu jednotlivých cytotypů hasivky orličí.
- 5) Porovnání míry fertility diploidního a triploidního cytotypu hasivky orličí a zjištění výskytu diplospor.
- 6) Analýza mikrosatelitů pro odhalení struktury vybraných populací a porovnání genetické variability diploidního a triploidního cytotypu.

3 Metodika

3.1 Rozšíření *Pteridium aquilinum* v ČR

Pro zpracování výskytu hasivky orličí na území České republiky byla využita data z herbářových dokladů z 32 herbářových sbírek: BRNM, BRNU, CB, CESK, FMM, GM, HR, CHOM, LIM, LIT, MJ MMI, MP, MZ, NJM, OL, OLM, OMJ, OP, OSM, PL, PR, PRC, ROZ, SOB, SOKO, SUM, VM, VYM, ZMT (akronymy podle Thiers 2017), herb. L. Ekrt a herb P. Zdvořák. Dále byly do tohoto datasetu zahrnuty i vlastní sběry a sběry Barbory Jonášové pořízené v rámci její bakalářské práce (Jonášová 2015). Každá z položek byla georeferencována za použití serveru Mapy.cz, u položek jejichž popis to umožňoval byla též zaznamenána nadmořská výška a expozice. Všechna získaná data byla zahrnuta do databáze PLADIAS (www.pladias.org).

3.2 Míra fertility *Pteridium aquilinum*

Pro zhodnocení relativní míry fertálních populací v České republice, byly využity revidované herbářové sběry *P. aquilinum* školitelem, které byly v době revize rozlišeny na sterilní a fertální. K těmto údajům byly zahrnuty vlastní sběry a sběry B. Jonášové (Jonášová 2015). Rostlina na herbářové položce byla považována za fertální, pokud byly na okraji listu patrné výtrusnice. Kritérium fertility populace nebylo podmíněno přítomností vyvinutých výtrusnic u všech exemplářů dané populace, naopak zcela běžně bylo fertální pouze menší procento rostlin. Pro přesné stanovení přítomnosti nebo absence sporangií a výtrusů byly všechny rostliny prohlédnuty pod světelným mikroskopem a bylo počítáno procento abortovaných spor (SAI).

Po vytvoření mapy s odlišenými sterilními a fertálními výskyty byly tyto údaje korelovány s třemi typy dat Českého hydrometeorologického ústavu – průměrnými ročními teplotami, srážkami a počtem mrazových dnů v rozpětí let 1961–2000. Průkaznost byla ověřena t-testem. Dále byly vytvořeny histogramy četností výskytu fertálních a sterilních populací na různých expozicích a v různých nadmořských výškách (byly vytvořeny kategorie po 100 výškových metrech).

3.3 Četnost výskytu jednotlivých cytotypů

Ploidie všech rostlin z vlastních sběrů byla zjištěna za použití průtokového cytometru Partec PA II (Partec GmbH., Münster, Germany). Z každé lokality bylo standardně odebráno 10 vzorků (listů nebo jejich částí) hasivky orličí v rozestupu 5–10 m ve vegetačních sezónách 2015 a 2016 (opakované sběry několika lokalit byly provedeny detailněji, viz příloha 1).

Příprava vzorků proběhla na základě protokolu podle Doležela et al. (2007). Přibližně 2 cm² listové tkáně *Pteridium aquilinum* bylo společně s cca 0,25 cm² standardu (*Vicia faba* „Inovec“, 2C=26,90 pg; Doležel et al., 1992) homogenizováno žiletkou v Otto I pufru (0,1 M kyselina citrónová, 0,5% Tween-20). Kapalná složka směsi byla oddělena filtrem s velikostí otvorů 42 μm a inkubována po dobu pěti minut při pokojové teplotě. Poté byla ke vzorku přidána barvicí směs: Otto II pufr (0,4 M Na₂HPO₄·12H₂O), 2-merkptoethanol (finální koncentrace 2 μLmL⁻¹) a fluorochrom DAPI (finální koncentrace 4 μLmL⁻¹). Nejméně po jedné minutě barvení vzorku byla zahájena samotná analýza průtokovým cytometrem. Bylo měřeno 1000–3000 jader.

Vzorky byly připravovány vždy z pěti rostlin, při nejednoznačném výsledku byl vzorek rozdělen po jednotlivých rostlinách. Naprostá většina vzorků byla měřena v živém stavu. Pokusně byly provedeny analýzy průtokovým cytometrem i na vzorcích vysušených silikagelem. V programu FloMax 2.6 (Partec GmbH, Münster, Germany) byly odečteny hodnoty relativní fluorescence 1123 rostlin hasivky orličí.

3.4 Velikosti průduchů a spor

Velikost průduchů i spor byla měřena na světelném mikroskopu při zvětšení 1000x za použití softwaru QuickPHOTO MICRO 3.1 (Promicra). Pro zjištění velikosti průduchů bylo zkoumáno deset rostlin každého cytotypu a na každé rostlině bylo změřeno 20 průduchů. Výsledky osmi diploidních rostlin (lokality Přímělkov, Tři Studně, Dolní Město, Rejčkov, Starý Kancelář, Kosky, Byňov – Jakule a Ostrov) a jedné triploidní rostliny (lokality Vlčí jezero) získané za použití stejné metodiky byly převzaty od Jonášové (Jonášová 2015). Diploidní rostliny z vlastního datasetu pochází z lokalit č. 26 a 100, triploidi z lokalit č. 11, 26, 30, 32, 69, 79, 97 a 99 (viz příloha 1).

Z důvodu nedostatku fertálních triploidních rostlin byly při měření velikosti spor analyzovány jen čtyři triploidní rostliny (lokality č. 26 a 99, viz příloha 1). Diploidních rostlin bylo měřeno deset (lokality č. 11, 19, 21, 29, 52, 55, 93 a 104, viz příloha 1).

Na každé rostlině bylo měřeno 20 spor. Vzhledem k výskytu diplospor (u triploidních rostlin) s řádově většími rozměry, byla pro tyto diplospory vytvořena samostatná kategorie (nebyly tedy průměrovány s haplosporami). K dalším výpočtům v programu Statistica 13.0 (StatSoft, Inc.) byl použit pro každou rostlinu (v případě diplospor kategorii) průměr z naměřených hodnot.

3.5 Míra fertility jednotlivých cytotypů

Zhodnocení fertility konkrétních rostlin bylo provedeno na základě porovnání míry abortovanosti výtrusů – SAI (Hornych et Ekrt 2017). Pro zhodnocení SAI u diploidů bylo použito pět rostlin (lokality č. 11, 19, 21, 52, 93, viz příloha 1) a pro triploidy pouze jediná rostlina (lokality č. 26, viz příloha 1). Kvůli nízkému počtu spor u triploida (většina spor již byla vypadaná) bylo počítáno 500 spor na rostlinu. Výsledky byly porovnány s hodnotami zjištěnými B. Jonášovou (2015).

Pro orientační zjištění životaschopnosti spor byl proveden kultivační experiment s rostlinami obou cytotypů. Na kultivační agarové médium připravené podle Baslerové a Dvořákové (Baslerová et Dvořáková 1962) bylo přeneseno v řádu stovek spor z jedné diploidní rostliny a dvou triploidních rostlin. Několik diplospor bylo též vybráno selektivně a kultivováno samostatně.

3.6 Genetická struktura populací

Pro zjištění míry klonality, genetické diverzity a diferenciací populací v populacích hasivky orličí byla provedena analýza mikrosatelitů. Osm markerů pro tuto metodu publikoval Chen et al (2008). Data získaná u většiny těchto markerů se ale v následující studii ukázala jako neinterpretovatelná, resp. nedostatečně variabilní (Zhou et al. 2014) a stejně tomu bylo i u vzorků sebraných v rámci této práce. Z toho důvodu byly z práce Chen et al (2008) použity pouze dva markery, a na základě transkriptomových dat z práce Der et al (2011) byly pomocí programu Primer3 (Koressaar et al 2007, Untergasser et al 2012) navrženy Jiřím Košnarem primery na pět markerů nových (viz tab I).

Celkem bylo analyzováno 237 vzorků ze 17 populací v 9 regionech. Populací bylo 6 diploidních, 8 směsných a 3 triploidní. Celkem 118 vzorků pochází z diploidního cytotypu, 119 vzorků z cytotypu triploidního.

Tab. I: Základní charakteristiky molekulárních markerů použitých pro analýzu mikrosatelitů *Pteridium aquilinum*. Primery markerů AC1, AG3, TGA7, TTC8 a TG12 navrhl J. Košnar (molekulární laboratoř PŘF JU v Č. Budějovicích), markery Pt12cp a Pt04 byly převzaty od Chen et al. (2008). Pt12cp je chloroplastový marker, ostatní markery jsou jaderné.

název markeru	sekvence primerů (5' → 3')	T _a – teplota nasedání primerů (°C)	fluorescenční značení	velikost (bp)	počet lokusů	motiv
AC1	F: GCTCAAAACACGGACACACA R: GGGTGAAGGTATGGAAGAGG	57	VIC	307-321	7	(CA) ₁₀₋₁₈
AG3	F: ATTGACGGCAGTAGCGGTAT R: ATCGAAGACCCCATCTACCC	57	6-FAM	374-392	8	(AG) ₁₀₋₁₉
TGA7	F: GATGAGGACGGTCTCTTTGC R: CTGATCATCGGAGCAGCTTA	57	PET	167-191	9	(TGA) ₁₄₋₂₂
TTC8	F: CGGCTTGAACACCTCCATAA R: CAGTGCCCATACCTTACCAA	57	PET	297-312	6	(TTC) ₁₂₋₁₇
TG12	F: ATGAGCGAGCAGAAGCTAGG R: TGCTGCAGAGTGTGTCTAGAGTG	57	VIC	191-212	12	(TG) ₁₃₋₂₄
Pt12cp	F: TGGTGAAGTTGTGATGCCTAC R: TATCGGTGGAAAAGAAAGAGTG	57	NED	379-389	3	(AT) ₁₅₋₂₁
Pt04	F: ATCAAGCCAAGGTCAC R: AACCCATGATTGCTAAT	48	6-FAM	231-233	2	(CA) ₁₄₋₁₅
celkem					47	

DNA vzorků byla izolována pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH, Germany) a izoláty byly naředěny 1:20 sterilní vodou. PCR amplifikace byla provedena podle Schuelke (2000) ve směsi obsahující 0,15 µl sterilní vody, 0,6 µl fluorescenčně značeného M13 forward primeru (2,5 pmol/µl), 0,15 µl specifického forward primeru - „tailed“ (2,5 pmol/µl), 0,6 µl specifického primeru (2,5 pmol/µl), 2,5 µl 2x Plain PP Master Mixu (Top-Bio) a 1 µl izolované DNA. PCR reakce probíhala v termocyclerech TC-XP Bioerg a Biometra T3000. PCR produkty daného vzorku byly smíchány (u slabších amplifikací bylo použito větší množství produktu) a výsledná směs byla poslána na fragmentační analýzu firmě SEQme.

Výsledky fragmentační analýzy byly vyhodnocovány v programu GeneMarker 1.8 (SoftGenetics, LLC.). Z důvodu analýzy polyploidních vzorků a nekonzistentního počtu lokusů obou ploidii (až čtyři lokusy u diploidů a až pět lokusů u triploidů) mohla být data odečítána pouze jako dominantní. Základní charakteristiky datasetu jako podíl polymorfních lokusů, počet genotypů, genotypová diverzita atd. byly vypočítány s využitím programů GenoType/GenoDive 1.2 (Meirmans et van Tiender 2004) a FAMD 1.2 (Schlüter et Harris 2006). Pro potřeby této práce jsou porovnány výsledky Stepwise mutation modelu vypočítaného v programu GenoType 1.2 (Meirmans et van Tiender 2004) s hodnotou thresholdu 0 a 4. Threshold 4 byl vybrán proto, že dával v míře klonality nejshodnější výsledky s ostatními výpočty. Missing data byla v základním nastavení programu nahrazena průměrnou hodnotou daného markeru (jiné operace s missing data, jako jejich vyřazení

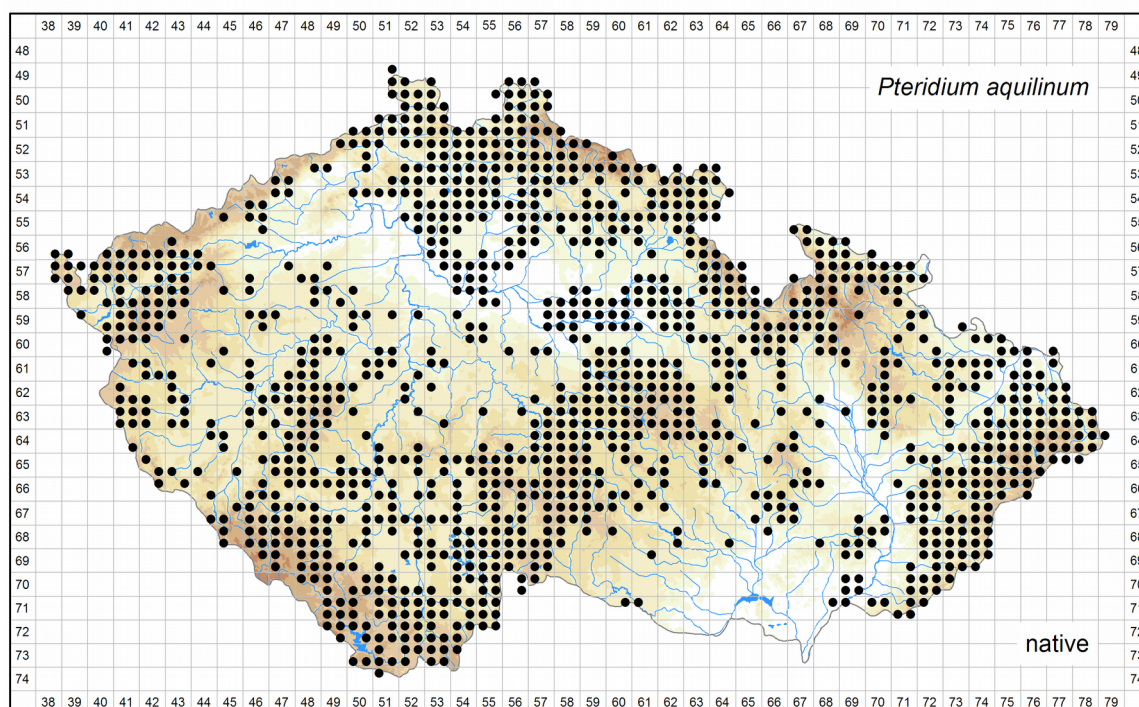
z výpočtu či nahrazení za určitý počet mutačních změn, vedly k nesmyslným výsledkům). AMOVA byla vypočítána v programu FAMD 1.2 (Schlüter et Harris 2006). Neighbour-network byla vytvořena za použití simple-matching koeficientu v programu SplitsTree4 V4.14.4 (Huson et Bryant 2006). PCoA vypočítaná také za použití simple-matching koeficientu byla provedena v programu Canoco 5.00 (ter Braak et Šmilauer 2012). K úpravě formátů vstupních dat byl použit AFLPdat package (Ehrich 2006) v programu R 3.2.4 (www.R-project.org).

4 Výsledky

4.1 Rozšíření *Pteridium aquilinum* v ČR

Na základě revize (L. Ekrť) 32 herbářových sbírek bylo získáno 1001 údajů k výskytu a fertilitě hasivky orličí v České republice (viz tab. II). Tento dataset byl doplněn vlastními daty autora této práce (viz příloha 1) a údaji z diplomové práce B. Jonášové (Jonášová 2015). Celkové rozšíření druhu (obr. 1) bylo pro úplnost doplněno o relevantní literární/databázové údaje obsažené v databázi PLADIAS (provedl L. Ekrť).

Obr. 1 ukazuje rozšíření hasivky orličí na území ČR. Ta je vázána především na střední a vyšší polohy. Nejhojnější je hasivka v jižních Čechách a západní Moravě, dále pak ve východních Čechách a východní části severních Čech a také v širší oblasti Moravskoslezských Beskyd. Naopak zcela chybí v oblastech termofytika a jen řídce se vyskytuje na území Krušných hor, Plzeňské pahorkatiny, Středočeské pahorkatiny a Hornomoravského úvalu. Samozřejmě je nutné brát v úvahu i možnou absenci údajů, přestože hasivka v dané oblasti roste.



Obr. 1: Mapa rozšíření hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) na území ČR vytvořená na základě údajů z veřejných herbářových sbírek, vlastních údajů a s doplněním literárních/databázových údajů přítomných v databázi Pladius. Připravili: L. Ekrť & J. Podroužek (nepublikováno). Ze systému databáze Pladius vygeneroval Z. Kaplan.

4.2 Míra fertility *Pteridium aquilinum*

Ke stanovení míry fertility hasivky orličí byla využita vlastní data, data Jonášové (2015) a školitelem revidované údaje veřejných herbářových sbírek. Konkrétní výčet fertálních sběrů s porovnáním se sběry sterilními je uveden v tab. II. Největší část fertálních sběrů připadá na herbářové sbírky Jihočeského muzea (CB), botanického oddělení Národního muzea (PR) a herbáře Katedry botaniky Univerzity Karlovy (PRC). Z celkového počtu 1001 údajů je 153 fertálních.

Tab. II: Přehled revidovaných herbářových sbírek s podílem revidovaných fertálních a sterilních položek *Pteridium aquilinum* (akronymy podle Thiers 2017).

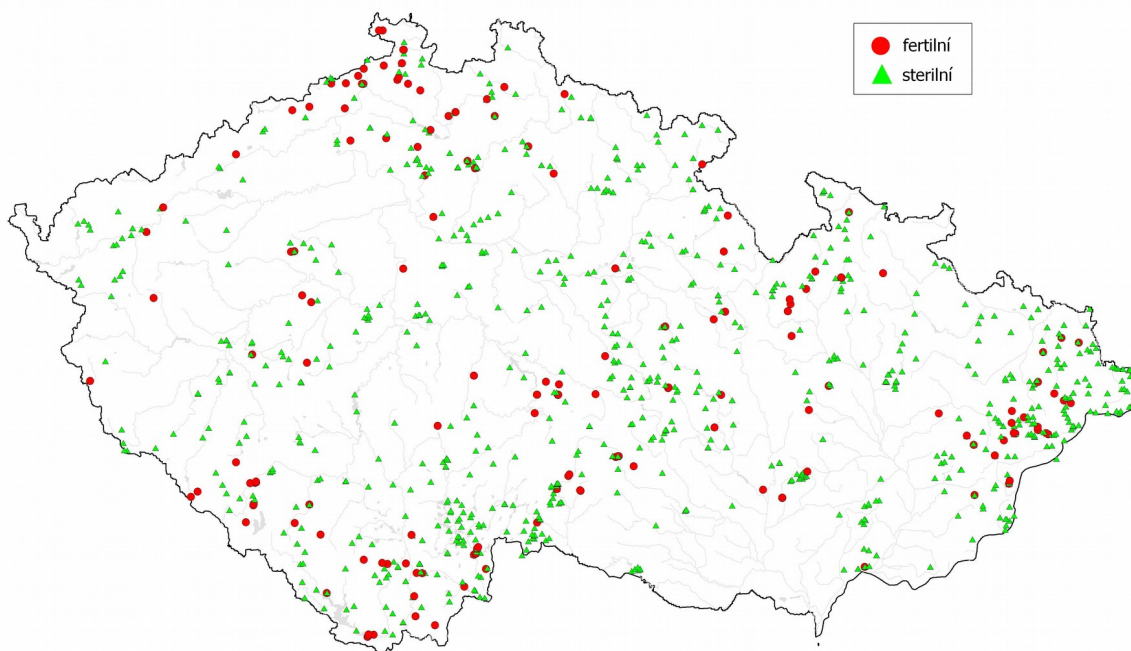
zkratka herbáře	instituce	město	sterilní položky	fertální položky
BRNM	Moravské zemské muzeum	Brno	60	11
BRNU	Masarykova univerzita	Brno	82	9
CB	Jihočeské muzeum	České Budějovice	31	24
CESK	Muzeum Těšínska	Český Těšín	11	1
FMM	Muzeum Beskyd	Frýdek-Místek	42	2
GM	Muzeum jihovýchodní Moravy	Zlín - Jaroslavice	19	1
HR	Muzeum východních Čech	Hradec Králové	11	0
CHOM	Okresní muzeum Chomutov	Chomutov	2	1
LIM	Severočeské muzeum	Liberec	2	0
LIT	Okresní vlastivědné muzeum	Litoměřice	16	7
MJ	Muzeum Vysočiny	Jihlava	22	6
MMI	Regionální muzeum	Mikulov	7	0
MP	Východočeské muzeum	Pardubice	38	5
MZ	Jihomoravské muzeum	Znojmo	2	1
NJM	Okr. vlastivědné muzeum v N. Jičíně	Přibor	10	1
OL	Univerzita Palackého	Olomouc	21	0
OLM	Vlastivědné muzeum	Olomouc	29	4
OMJ	Okresní muzeum a galerie	Jičín	5	0
OP	Slezské zemské muzeum	Opava	33	3
OSM	Ostravské muzeum	Ostrava	15	2
PL	Západočeské muzeum	Plzeň	23	3
PR	Národní muzeum, botanické oddělení	Praha	45	38
PRC	Karlova univerzita	Praha	27	21
ROZ	Středočeské muzeum	Roztoky u Prahy	22	2
SOB	Husitské muzeum Tábor	Soběslav	12	0
SOKO	Okresní muzeum a knihovna	Sokolov	7	0
SUM	Okresní vlastivědné muzeum	Šumperk	1	0
VM	Okresní vlastivědné muzeum Vsetín	Valašské Meziříčí	6	1
VYM	Muzeum Výškovska	Výškov	3	0
ZMT	Muzeum Vysočiny	Třebíč	1	2
herb. Libor Ekrt	-----	-----	30	8
herb P. Zdvorač	-----	-----	1	0
celkem			848	153
			1001	

Fertilita hasivky orličí byla vyjádřena jako procento fertálních populací/rostlin ze všech zjištěných zdrojů – herbáře, vlastní údaje, údaje Jonášové 2015 (tab. III). Procento fertility herbářových dokladů je nižší než procento fertility vlastních sběrů a sběrů Jonášové. Důvodem je cílené vyhledávání fertálních exemplářů pro potřeby této práce a práce B. Jonášové (2015).

Tab. III: Přehled sterálních a fertálních populací/rostlin *Pteridium aquilinum* z jednotlivých použitých zdrojů dat.

původ údajů	sterální populace/rostliny	fertální populace/rostliny	procento fertility
herbáře	848	153	15,3%
sběry B. Jonášové	36	12	25,0%
vlastní sběry	76	22	22,4%
celkem	960	187	16,3%
	1147		

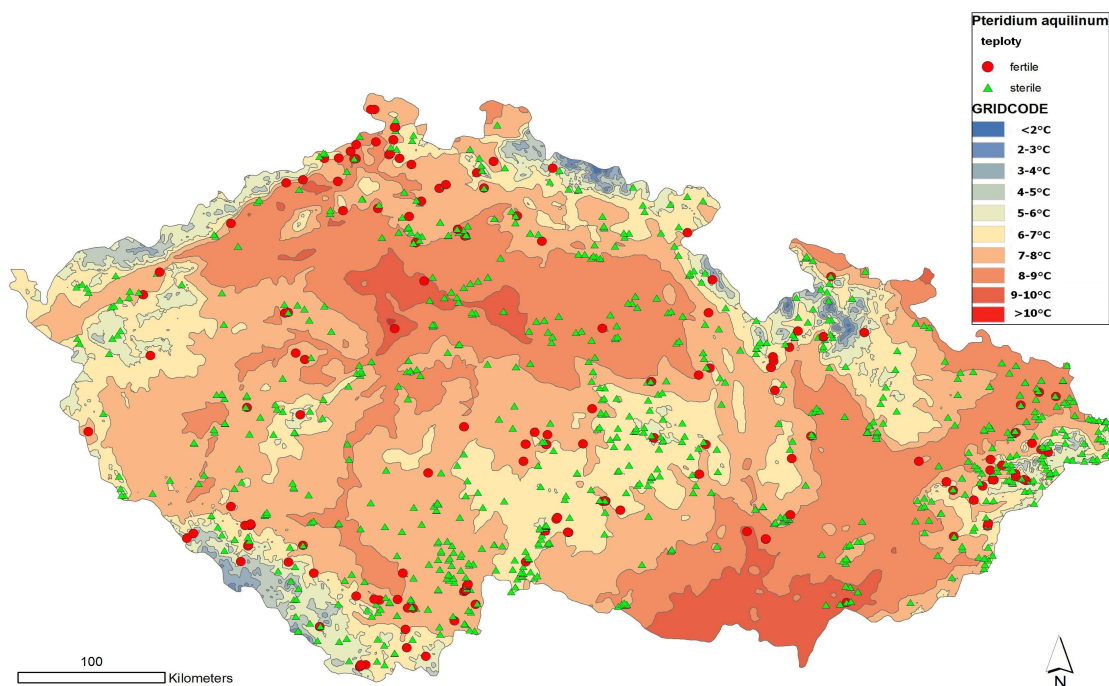
Výskyt fertálních a sterálních rostlin zjištěných z herbářů a vlastních sběrů byl promítnut podle geografických souřadnic na mapu České republiky (Obr. 2.). Výskyt fertálních rostlin je na území ČR rovnoměrný, v některých regionech je jejich koncentrace vyšší (například oblast Českého Švýcarska, jižní Čechy nebo Beskydy), v některých oblastech naopak zase nižší (Třeboňsko). Z celkového pohledu se zdá, že v rozložení patrně není žádný jasný trend.



Obr. 2: Mapa výskytu fertálních a sterálních rostlin hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) v České republice s použitím vlastních dat, dat Jonášové (2015) a dat z revize herbářových sbírek (viz tab. II, příloha 1).

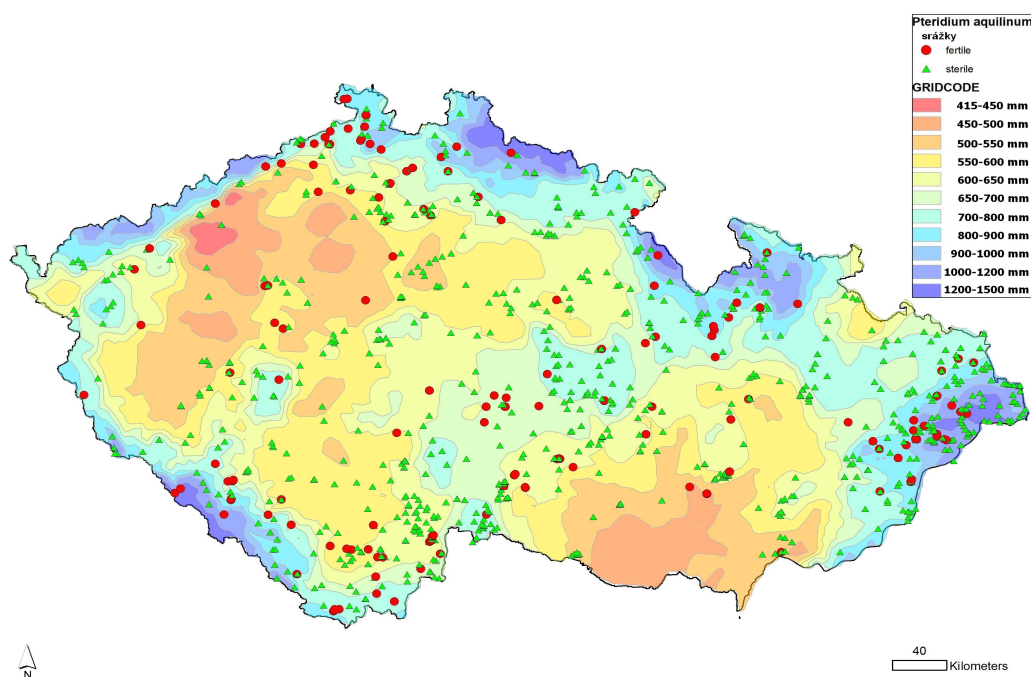
Dále byly za použití GIS na tuto mapu promítnuty klimatické vrstvy hodnot teplot, srážek a mrazových dnů získané z Českého hydrometeorologického ústavu odpovídajících průměrným teplotám, srážkám a počtu mrazových dnů zaznamenaných mezi lety 1961–2000 (obr. 3–5). Korelace fertility s těmito daty byla testována t-testem.

Pro průměrné roční teploty (obr. 3) vyšel test na 95% hladině významnosti neprůkazně s dosaženou hladinou významnosti $p = 0,857$, s hodnotou testového kritéria $t = -0,180$ a to při 1106 stupních volnosti.



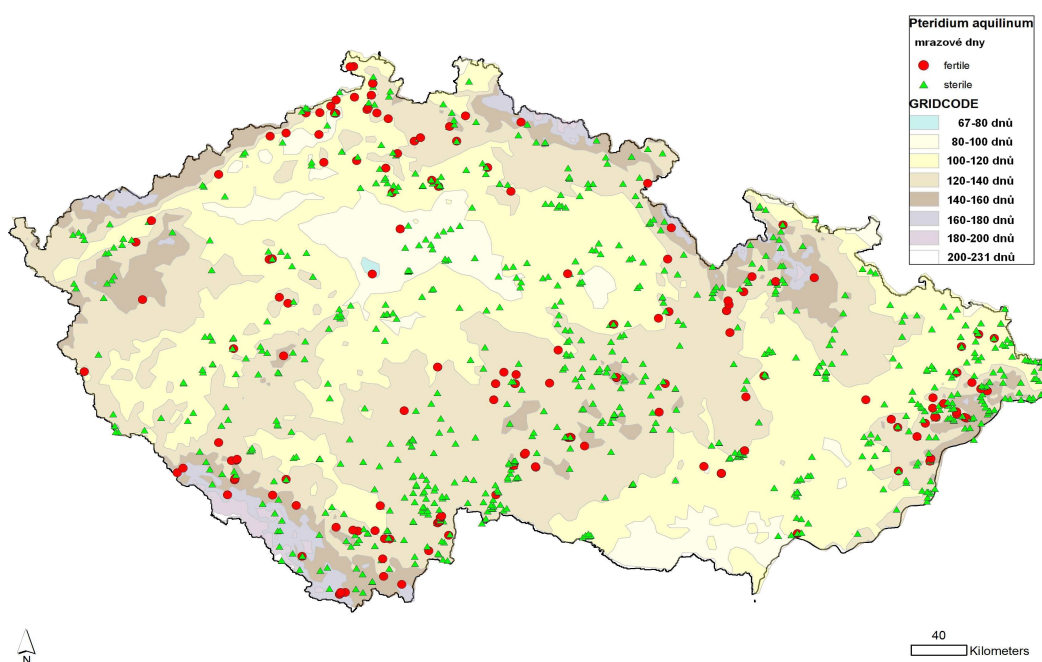
Obr. 3: Rozložení fertálních a sterilních sběrů na mapě ČR s podkladem teplotních vrstev.

Pro průměrné roční srážky (obr. 4) vyšel test rovněž neprůkazně s dosaženou hladinou významnosti $p = 0,696$, s hodnotou $t = 0,391$ také při 1106 stupních volnosti.



Obr. 4: Rozložení fertálních a sterilních sběrů na mapě ČR s podkladem srážkových vrstev.

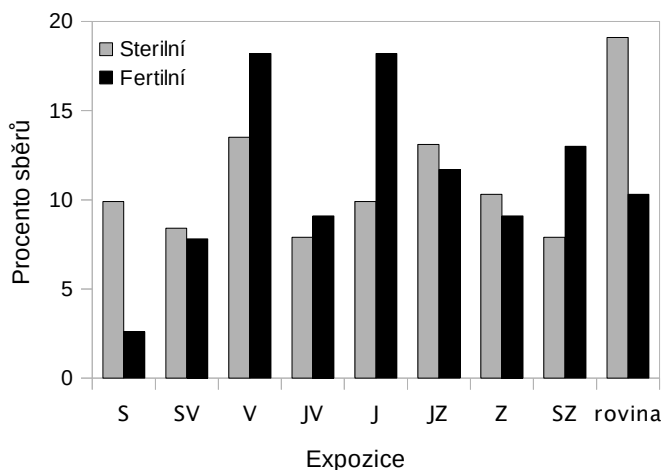
Pro mrazové dny (obr. 5) vyšel test opět neprůkazně s hladinou významnosti $p = 0,137$, hodnotou kritéria $t = -1,487$ při 1106 stupních volnosti.



Obr. 5: Rozložení fertálních a sterilních sběrů na mapě ČR s podkladem vrstev mrazových dnů.

Pro zjištění, zda fertilita populací může záviset na expozici lokality nebo nadmořské výšce, byly vytvořeny histogramy četností obou charakteristik jak u fertálních, tak u sterilních populací. Počet populací využitých pro grafické znázornění vychází z přesnosti popisu lokality herbářových údajů. Expozici bylo možné odečíst v menším procentu případů než nadmořskou výšku.

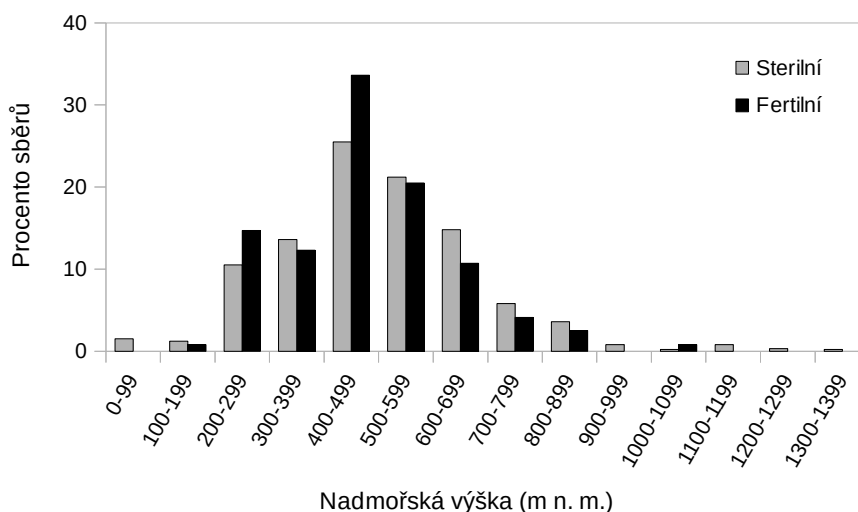
První graf (obr. 6) ukazuje procentuální zastoupení pro fertální (77 lokalit) a sterilní (252 lokalit) sběry podle jednotlivých expozičních směrů.



Obr. 6: Procentuální zastoupení fertálních a sterilních sběrů podle expoziční lokality.

V orientaci lokalit na různé světové strany nelze u sterilních populací najít žádný konkrétní trend. Fertální rostliny byly častěji zaznamenány na východních a jižních svazích. Charakter rozmístění je ale v obou případech podobný, závislost fertility na expozici tedy nelze předpokládat.

Další graf (obr. 7) znázorňuje četnost výskytu fertálních (122 lokalit) a sterilních (589 lokalit) sběrů v různých nadmořských výškách.



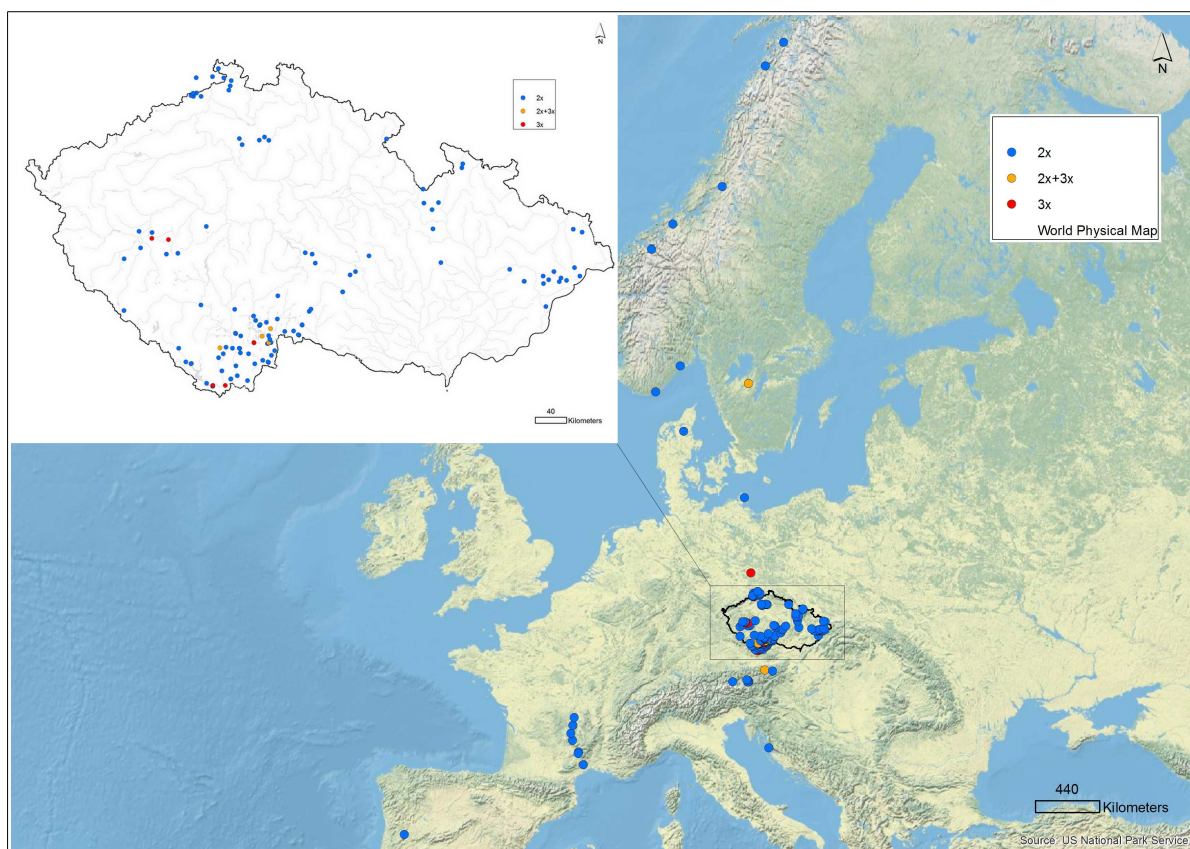
Obr. 7: Procentuální zastoupení fertálních a sterilních sběrů podle nadmořské výšky lokality.

Rozdělení četností u obou typů sběrů má identický trend s nejčastějším výskytem okolo 500 m n. m. Jedná se tedy také o charakteristiku nezávislou na fertilitě.

Z celkového počtu 1147 údajů o výskytu hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) bylo stanoveno procento fertility na 16,3%. Nebyla zjištěna korelace fertility s žádným ze zkoumaných faktorů (průměrná roční teplota, průměrné roční srážky, průměrný počet mrazových dnů za rok, expozice lokality, nadmořská výška lokality).

4.3 Četnost výskytu jednotlivých cytotypů

Z celkového počtu 98 analyzovaných lokalit (viz příloha 1) pochází 66 z území České republiky a 32 je zahraničních (jmenovitě Rakousko, Německo, Chorvatsko, Francie, Portugalsko, Dánsko, Norsko a Švédsko). Na následující mapě (obr. 9) jsou barevně rozlišeny populace diploidní (modře), směsné (oranžově) a triploidní (červeně). V mapě jsou zahrnuté i údaje B. Jonášové (2015), konkrétně jde o 44 populací diploidních, 1 směsnou a 3 triploidní. Výskyt směsných a triploidních populací v obou zmíněných datasetech je z geografického pohledu náhodný.

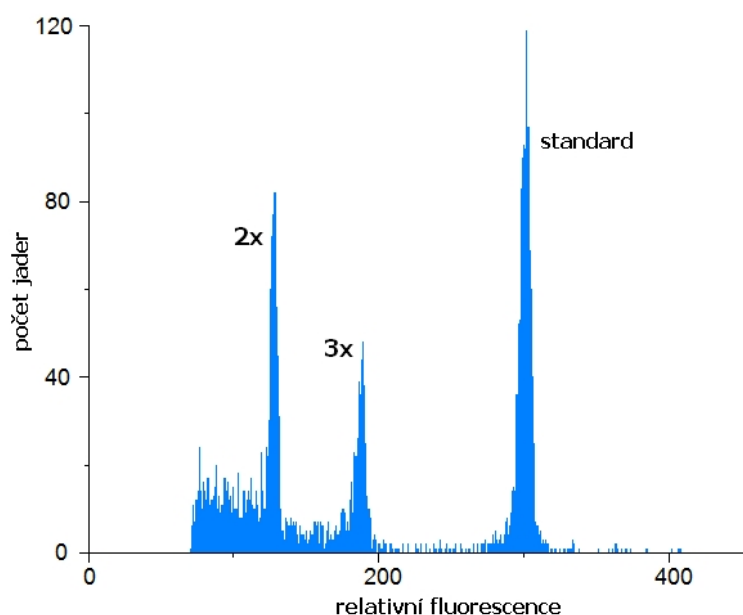


Obr. 8: Mapa rozmístění analyzovaných populací hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) pořízených pro účely této práce.

Z těchto 98 lokalit byl průtokovou cytometrií odhadnut stupeň ploidie 1123 rostlin hasivky orličí. Diploidních rostlin bylo 86,3%, triploidních 13,7% (relativní velikosti genomu viz tab. IV, příklad histogramu analýzy směšného vzorku 2x a 3x obr. 8).

Tab. IV: Odhadnutí stupně ploidie pomocí průtokové cytometrie u 240 vzorků *Pteridium aquilinum*.

ploidie	počet vzorků	průměr poměrů relativní fluorescence vzorek/standard	min.	max.	SD
2x	200	0,418	0,383	0,440	0,012
3x	40	0,616	0,601	0,650	0,024



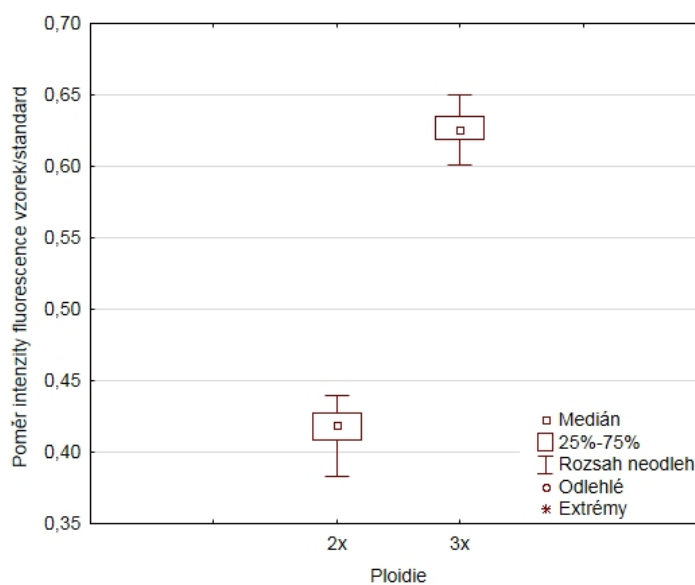
Obr. 9: Analýza směšného vzorku diploidní a triploidní rostliny na průtokovém cytometru. Při nastavení peaku standardu (*Vicia faba* „Inovec“, $2C=26,90$ pg; Doležel et al., 1992) na hodnotu relativní fluorescence 300 se diploidní vzorky zobrazují na hodnotě cca 125 a triploidní vzorky přibližně na 190.

Výsledky měření z pohledu populací shrnuje tab. V. Převážná většina populací je tvořena pouze diploidními rostlinami, směšných populací bylo detekováno osm a čistě triploidní pouze tři.

Tab. V: Zastoupení ploidii v datasetu vlastních sběrů z 98 lokalit.

ploidie populace	počet populací	procento populací
2x	87	88,78%
směšná	8	8,16%
3x	3	3,06%

Porovnání výsledků pro oba cytotypy bylo znázorněno diagramem Box and whisker plot (obr. 10). Poměr relativní fluorescence diploidních vzorků se pohybuje mezi hodnotami 0,383–0,440, u triploidních rostlin bylo zjištěno rozmezí 0,601 – 0,650 (viz tab. IV). Výsledky získané měřením vzorků vysušených silikagelem měly výrazně nižší hodnoty a nebyly proto zahrnuty do souborných dat společně s rostlinami, které byly analyzovány živé. V případě vzorků analyzovaných ze silikagele bylo 5 diploidních a 11 triploidních rostlin.



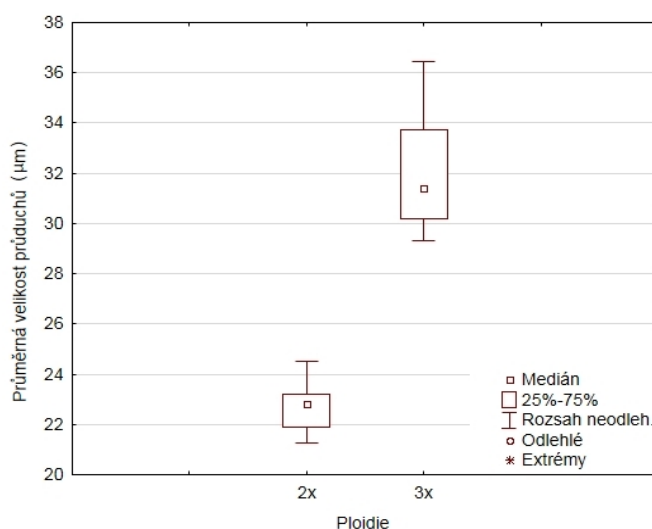
Obr. 10: Poměr relativní fluorescence diploidních a triploidních vzorků ke standardu (*Vicia faba* „Inovec“, $2C=26,90$ pg; Doležel et al., 1992).

Průkaznost rozdílnosti poměrů relativní fluorescence vzorku ke standardu u obou ploidii byla potvrzena t-testem na 95% hladině významnosti s dosaženou hladinou významnosti $p < 0,001$ a hodnotou testového kritéria $t = -106,230$ při 244 stupních volnosti.

4.4 Velikost průduchů a spor

Zvyšování stupně ploidie je spjato se zvětšováním buněk organismu (Barrington et al. 1986). Obecně se proto průměrné velikosti průduchů, u výtrusných rostlin též spor, využívají pro determinaci různých cytotypů (Beck et al. 2010). Pro potřeby morfologického odlišení cytotypů byla průměrná velikost průduchů zjištěna u deseti rostlin obou cytotypů a průměrná velikost spor u deseti diploidních a čtyř triploidních rostlin (z příčiny nedostatku fertálních triploidů).

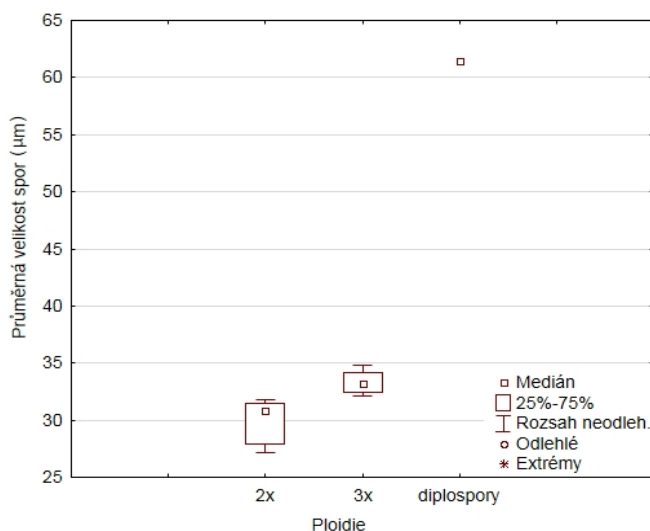
Porovnání průměrné velikosti průduchů diploidů a triploidů ukazuje následující Box and whisker plot (obr. 11). Rozmezí naměřených hodnot je u diploidů 21,3 – 24,5 μm , u triploidů 29,3 – 36,5 μm .



Obr. 11: Průměrná velikost průduchů rostlin diploidního a triploidního cytotypu (kombinovaná data autora této práce a Jonášové (2015)).

Potvrzení rozdílnosti průměrných velikostí průduchů diploidních a triploidních rostlin dokládají výsledky t-testu při 95% hladině významnosti s dosaženou hladinou významnosti $p < 0,000$ a hodnotou $t = -11,266$ při 18 stupních volnosti.

Stejnými metodami byly zpracovány průměrné hodnoty velikosti spor rostlin obou ploidii. Průměrná velikost spor diploidních rostlin se pohybuje mezi 27,2 – 31,9 μm , spory triploidních rostlin vykazují rozpětí 32,2 – 34,9 μm . Speciální kategorií v diagramu Box and whisker plot jsou diplospory původem z triploidních rostlin s průměrnou velikostí 61,5 μm (rozmezí 52 – 80 μm).

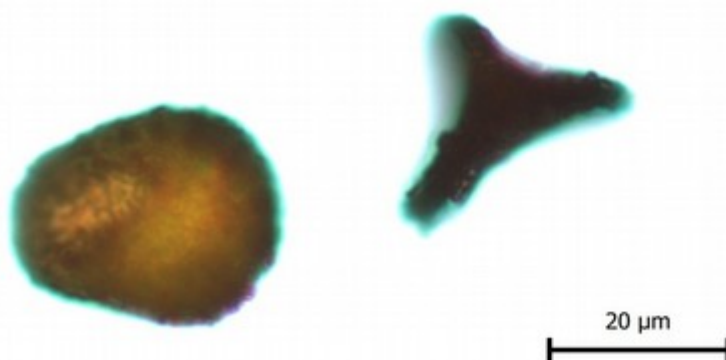


Obr. 12: Průměrná velikost výtrusů rostlin diploidního a triploidního cytotypu.

T-testem zde byla testována rozdílnost v průměrné velikosti „normálních“ spor obou cytotypů (diplospory pro svou výraznou odlišnost nebyly do testu zahrnuty, jejich odlišnost je zjevná). Na 95% hladině významnosti s dosaženou hodnotou $p = 0,006$ a hodnotou testového kritéria $t = -3,306$ při 12 stupních volnosti byla vyšší průměrná velikost spor triploidních rostlin potvrzena.

4.5 Míra fertility jednotlivých cytotypů

Samotná tvorba výtrusnic a výtrusů není ještě zárukou reálné možnosti sexuálního rozmnožování. Směrodatným faktorem je zde vyvinutost/abortovanost výtrusů vyjádřená jako procento abortovaných výtrusů neboli spore abortion index – SAI (Hornych et Ekr 2017). U lichých ploidii bývá tento index řádově vyšší než u ploidii sudých, může se blížit až 100% (Otto et Whitton 2000). Vysoké hodnoty SAI tedy byly předpokládány i u triploidní hasivky orličí. Porovnání vzhledu vyvinuté a abortované spory diploidní hasivky orličí při zvětšení 1000x pod světelným mikroskopem ukazuje obr. 13.



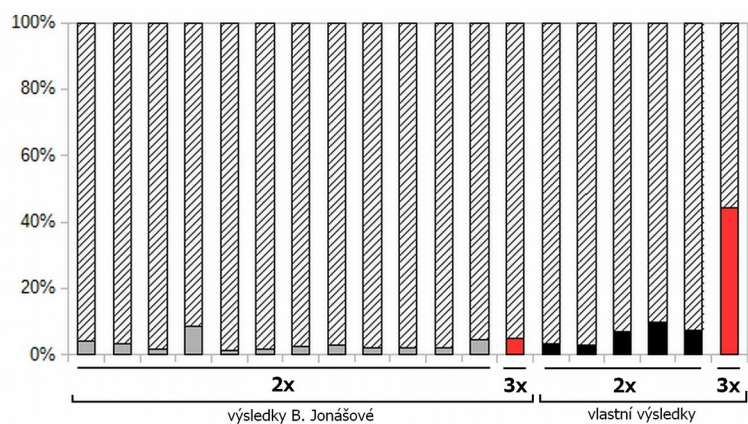
Obr. 13: Ukázka vyvinutého a abortovaného výtrusu hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*).

Tab. VI obsahuje údaje o procentuálním zastoupení fertálních rostlin obou cytotypů *Pteridium aquilinum* v rámci sběrů provedených pro účely této práce. Procento fertálních triploidních rostlin je zřetelně nižší než procento fertálních diploidních rostlin.

Tab. VI: Množství fertálních rostlin hasivky orličí v datasetu vlastních sběrů autora této práce.

ploidie	sterilní rostliny	fertální rostliny	procento fertility
2x	874	95	9,80%
3x	149	5	3,25%
celkem	1023	100	8,90%
	1123		

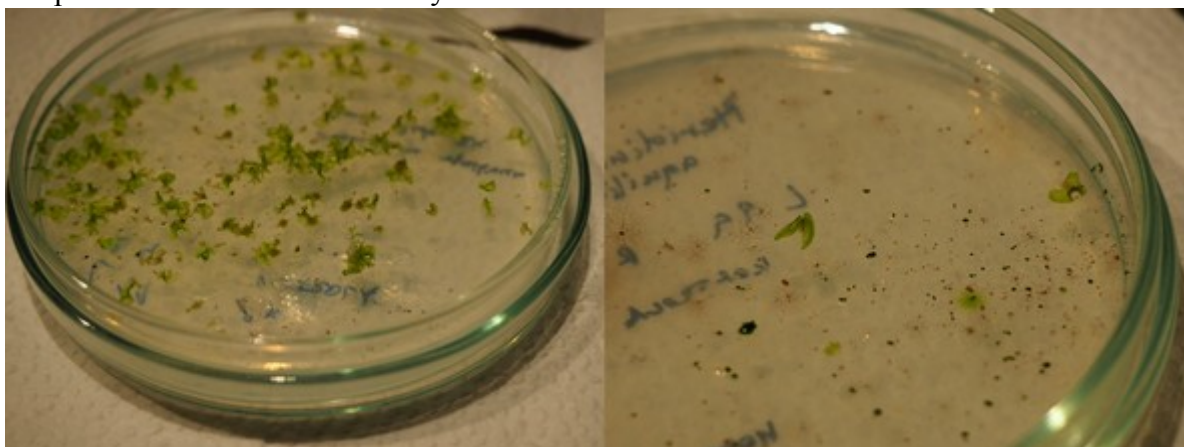
Výsledky výpočtu spore abortion index pro pět diploidních a jednu triploidní rostlinu (lokalita č. 26, viz příloha 1) v porovnání s výsledky B. Jonášové (2015) ukazuje graf na obr. 14. Rozmezí hodnot všech diploidních vzorků je 1,3 – 9,6%, triploidní vzorky se zásadně liší hodnotami 4,9% a 44,2%.



Obr. 14: Porovnání hodnot SAI z práce Jonášové (2015) a z vlastních výsledků.

Výpočtem SAI u pěti diploidních rostlin bylo potvrzeno, že lze data navzájem porovnávat. Velmi zajímavý výsledek poskytlo určení SAI u triploidních rostlin. Zatímco triploid z měření B. Jonášové se hodnotou SAI neliší od rostlin diploidních, triploidní vzorek z vlastního měření vykazuje hodnotu SAI daleko vyšší. Rozdíl je pravděpodobně způsoben přítomností triletých spor u jedné a monoletních spor u druhé rostliny (viz sekce Diskuze).

Během kultivačního experimentu byl zjištěn výrazný rozdíl v klíčivosti spor diploidních (cca 75%) a triploidních rostlin (cca 10 %). Zatímco spory z diploidního vzorku klíčily v naprosté většině případů, spory triploidní hasivky z této práce (lokalita č. 26, viz příloha 1) klíčily jen v řádu jednotek případů (obr. 15) a spory triploida B. Jonášové (lokalita Vlčí jezero, Jonášová 2015) měly klíčivost dokonce nulovou. Selektivně vybrané diplospory z triploidních rostlin také neklíčily.



Obr. 15: Gametofyty vzniklé ze spor diploidní (levá část obrázku) a triploidní rostliny (pravá část obrázku) hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*).

Vzrostlé gametofyty diploidního původu daly po určitém čase vzniknout sporofytům. Gametofyty z triploidní rostliny tvořily plně vyvinutá gametangia (viz obr. 16) a zhruba po dvojnásobné době z nich také vyrostly sporofyty. Tyto sporofyty zatím nedosáhly dostatečné velikosti, aby mohly být proměřeny na průtokovém cytometru.



Obr. 16: Sporofyty vyvíjející se z gametofytů vzniklých z výtrusů diploida (levá část obrázku) a gametofyt tvořící gametangia vzniklý ze spory triploida (pravá část obrázku).

4.6 Genetická struktura populací

Pro analýzu mikrosatelitů bylo vybráno šest diploidních, osm směsných a tři triploidní populace. Celkový počet zkoumaných rostlin je 237. Poměr analyzovaných diploidních a triploidních rostlin je vyrovnaný, a to v poměru 118:119 ks. Pro porovnání byly analyzovány populace z 9 různých regionů v rámci ČR (Lipensko, Budějovicko, Třeboňsko, Plzeňsko, České Švýcarsko) a v rámci zahraničí (Rakousko, Německo, Francie, Norsko) (viz tab. VII). V následující tabulce je kromě základních údajů vybraných populací uveden také celkový počet lokusů v populaci, podíl polymorfních lokusů v dané populaci, průměrný počet lokusů na jeden marker v rámci populace a průměrný počet lokusů ve všech markerech na jedince.

Tab. VII: Seznam a základní informace o vzorcích hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) vybraných pro analýzu mikrosatelitů. Populace s více číselným označením byly opakovaně sbírány ve dvou následujících vegetačních sezónách 2015 a 2016 (viz příloha 1).

č. populace	lokalita	region	ploidie	počet vzorků	počet lokusů	podíl polymorfních lokusů	průměrný počet lokusů na marker	průměrný počet lokusů na jedince
L11	Mříč	Budějovicko	2x+3x	10	27	0,89	3,9	11,9
L21	Chřibská	Č. Švýcarsko	2x	10	9	0,22	1,3	8,0
L30	Settichen	Německo	3x	5	17	0,12	2,4	15,8
L31	Lietzow	Německo	2x	5	14	0,57	2,0	10,2
L32	Skövde	Norsko	2x+3x	5	19	0,79	2,7	9,8
L34	Hemsjoen	Norsko	2x	5	16	0,75	2,3	10,2
L44	St. Guilhem	Francie	2x	5	13	0,54	1,9	9,2
L48	Laveissière	Francie	2x	5	14	0,50	2,0	11,0
L68	Kokotský ryb.	Plzeňsko	2x	10	18	0,94	2,6	9,7
L69	Čilina	Plzeňsko	3x	10	13	0,00	1,9	12,5
L79	Dobřív	Plzeňsko	3x	10	17	0,65	2,4	11,2
L26+95+96	Pernek	Lipensko	2x+3x	35	32	0,97	4,6	13,7
L99	Loučovice	Lipensko	2x+3x	22	25	0,88	3,6	12,2
L97	Walcherbauer	Rakousko	2x+3x	10	24	1,00	3,4	10,9
L7	Mladošovice	Třeboňsko	2x+3x	10	20	0,75	2,9	10,3
L10+102	rybník Kukla	Třeboňsko	2x+3x	40	28	0,96	4,0	14,4
L9+103	Holičky	Třeboňsko	2x+3x	40	30	0,93	4,3	13,0
celkově				237	47	---	6,7	12,3

Velmi rozdílný podíl polymorfních lokusů jednotlivých populací ukazuje na vysokou variabilitu datasetu. Vedle čistě klonálních populací (nejjasnějším příkladem je populace L69 z Plzeňska s nulovým podílem polymorfních lokusů) byly odhaleny i populace o mnoho variabilnější a tato variabilita, jak je vidět ve výše uvedené tabulce, nemusí nutně záviset na množství vzorků z dané lokality (viz norské populace). Vysoký podíl polymorfních lokusů u některých populací je způsoben přítomností nepříbuzných genotypů.

4.6.1 AMOVA

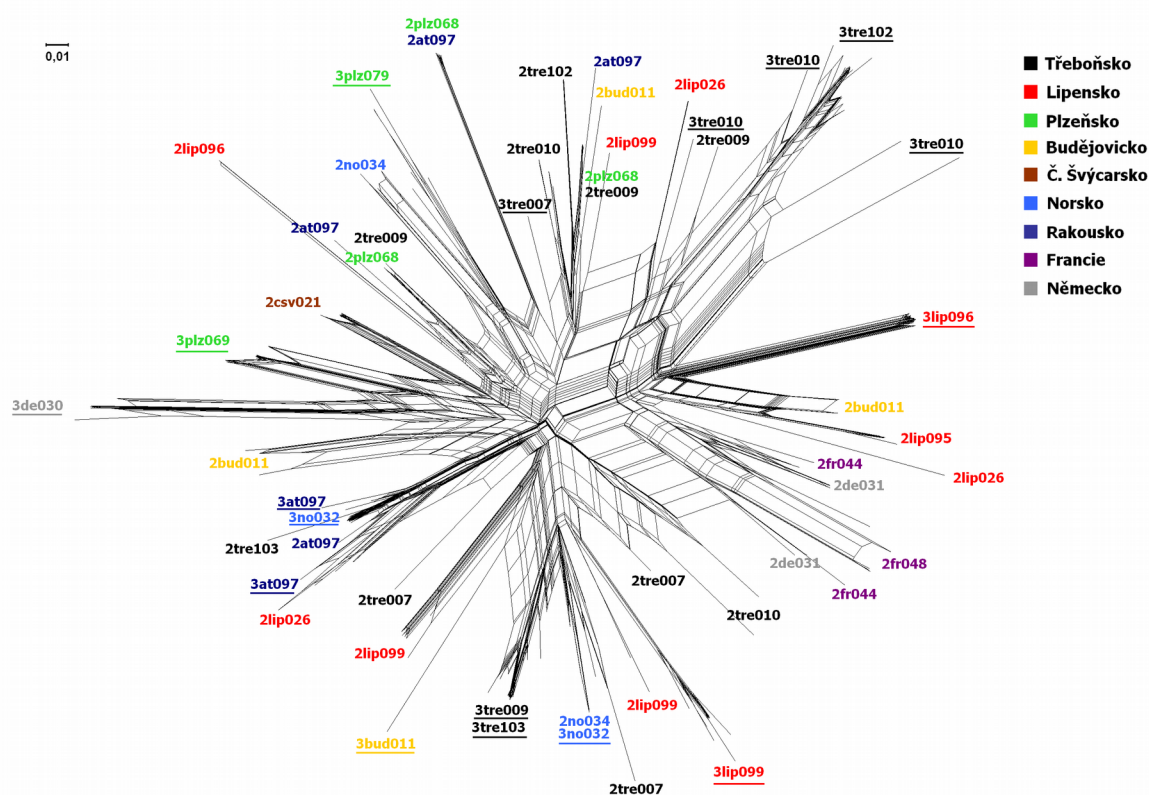
Pro zjištění variability mezi ploidiemi a mezi příslušnými populacemi byla v programu FAMD 1.2 (Schlüter et Harris 2006) vypočítána hierarchická AMOVA (byli zahrnuti i jedinci s missing data). Hlavní skupiny tvořily obě ploidiie, podskupiny pak populace rozdělené na příslušné ploidiie. Největší část variability, 75,98%, připadá na mezi-populační variabilitu v rámci ploidií, 23,17% na vnitro-populační variabilitu a pouze 0,85% na variabilitu mezi oběma ploidiemi. Tyto výsledky ukazují, že jednotlivé populace jsou si často navzájem

nepříbuzné, ale i uvnitř populací je variabilita poměrně vysoká. Jednotlivé ploidy nelze odlišit, což dokazuje necelé procento variability mezi ploidiemi.

4.6.2 Neighbour-network

Grafické znázornění podobnosti zkoumaných jedinců na základě párových distancí vypočítaných jako simple-matching coefficient v programu SplitsTree4 V4.14.4 (Huson et Bryant 2006) uvádí Neighbour-network na obr. 17 (jedinci s missing data v celém markeru jsou vyřazeni, viz příloha 2). Vysoká variabilita datasetu je zjevná, populace jednotlivých regionů ji většinou pokrývají poměrně široce. Z charakteru rozložení je patrné, že převážná část populací se skládá z několika odlišných genotypů. Mezi jednotlivými genotypy však nejsou výrazné rozdíly, spíše se jedná o celé kontinuum různě odlišných genotypů.

Zároveň jsou ale některé populace zjevně silně klonální, což dokazuje například cluster triploidních rostlin z lipenské populace (3lip096) v pravé části obrázku sestávající z 18 rostlin zcela identického genotypu. Byly zjištěny i celé populace vytvářející jednotné clustery všech jedinců, jako příklad opět poslouží plzeňská triploidní populace L69 (zde 3plz069) nebo diploidní populace z Českého Švýcarska L21 (2csv021).

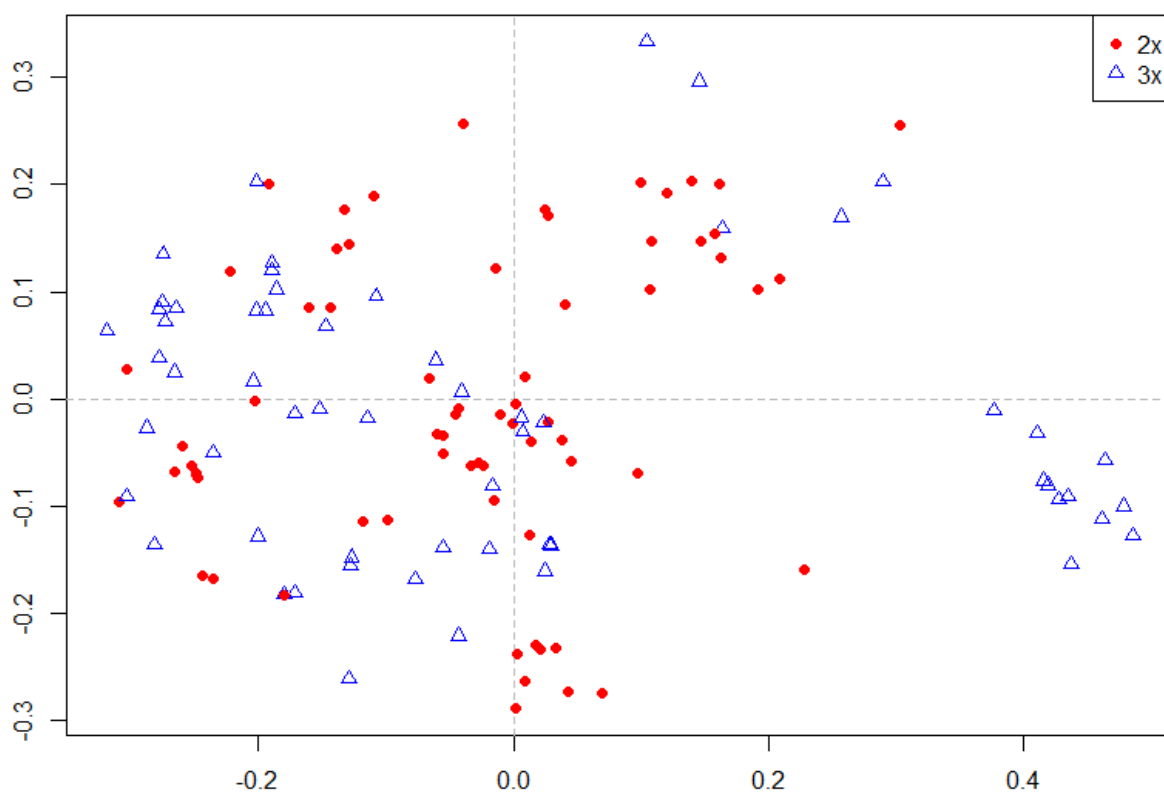


Obr. 17: Neighbour-network vytvořená z dat získaných analýzou mikrosatelitů. Jedinci s missing data v celém markeru byly z výpočtu vyřazeny (jedná se o 20 rostlin, viz příloha 2). První číslice v názvu určuje ploidii, následuje zkratka regionu a trojčíselný kód odkazující na číslo lokality (viz tab. VII nebo příloha 1). Triploidní jsou zvýrazněni podtržením.

Další pozoruhodnou skutečností je časté oddělení ploidií v rámci jedné populace a jejich umístění na oddělených větvích sítě (například lip096, tre007, no034 a další). Taková situace napovídá nezávislému vzniku triploidního cytotypu a jeho následnému setkání s jinou diploidní populací. Příímý vznik triploidních rostlin z již přítomných diploidů lze tušit kupříkladu v lipenské populaci lip099 (dolní část sítě). Rozdíl mezi takovými diploidy a triploidy pak může odrážet vyšší počet lokusů u triploidů.

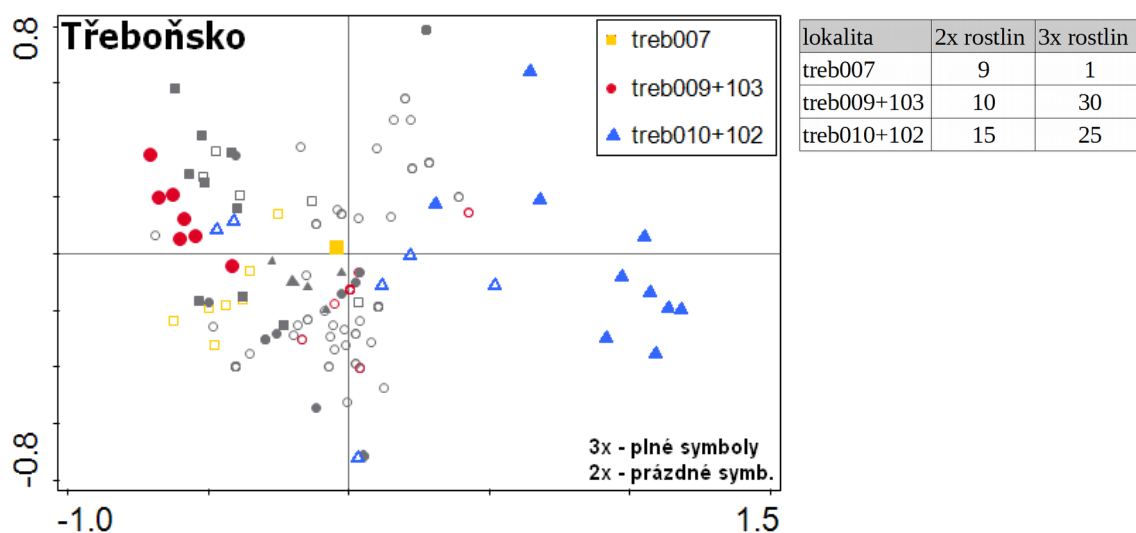
4.6.3 PCoA

Převládající nezávislost a genotypovou nepodobnost obou cytotypů přítomných v konkrétních populacích dokládá analýza hlavních koordinát založená na párových distancích vypočítaných jako simple-matching coefficient v programu Canoco 5.00 (ter Braak et Šmilauer 2012). Obr. 18 ukazuje výsledek PCoA se zobrazením první a druhé ordinační osy při zahrnutí všech vzorků s rozlišením diploidních a triploidních jedinců. Tento obrázek odpovídá výsledkům AMOVY a potvrzuje stejnou míru variability obou ploidií. Výsledky analýzy všech vzorků se zvýrazněním jednotlivých regionů a se zobrazením první a druhé ordinační osy jsou na obr. 19–23.



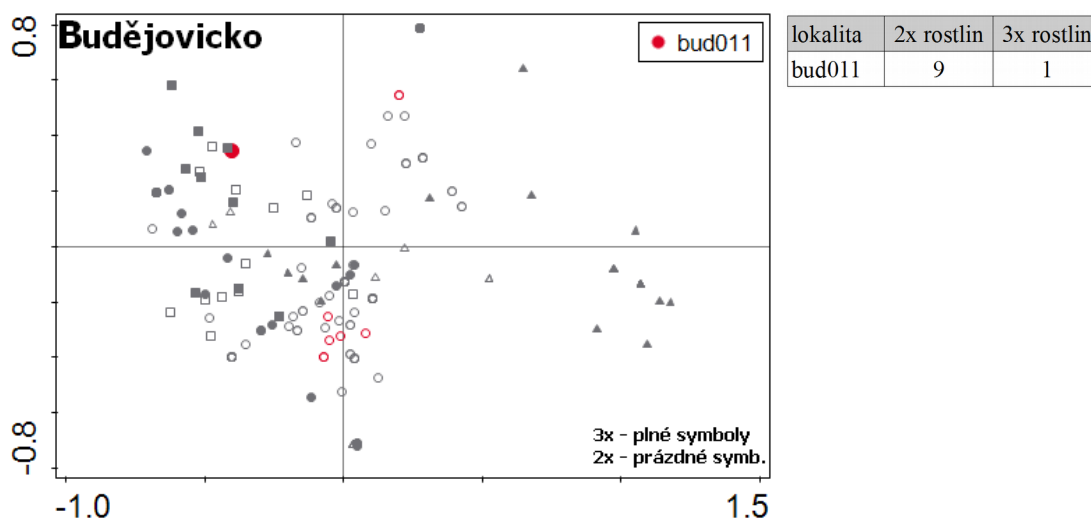
Obr. 18: PCoA všech vzorků s rozlišením obou ploidií stupňů.

Třeboňskému regionu náleží v součtu největší počet vzorků. Oddělená pozice diploidních a triploidních rostlin je zřetelná u každé z lokalit (obr. 19). Zatímco populace z lokality treb007 je velmi variabilní (osm různých pozic na deset rostlin), u dalších dvou lokalit se podařilo zachytit opakovaný výskyt téhož genotypu (tedy klonalitu), což je nejlépe vidět na 30 triploidních rostlinách z lokality treb009+103, které na diagramu zaujímají dohromady sedm pozic.



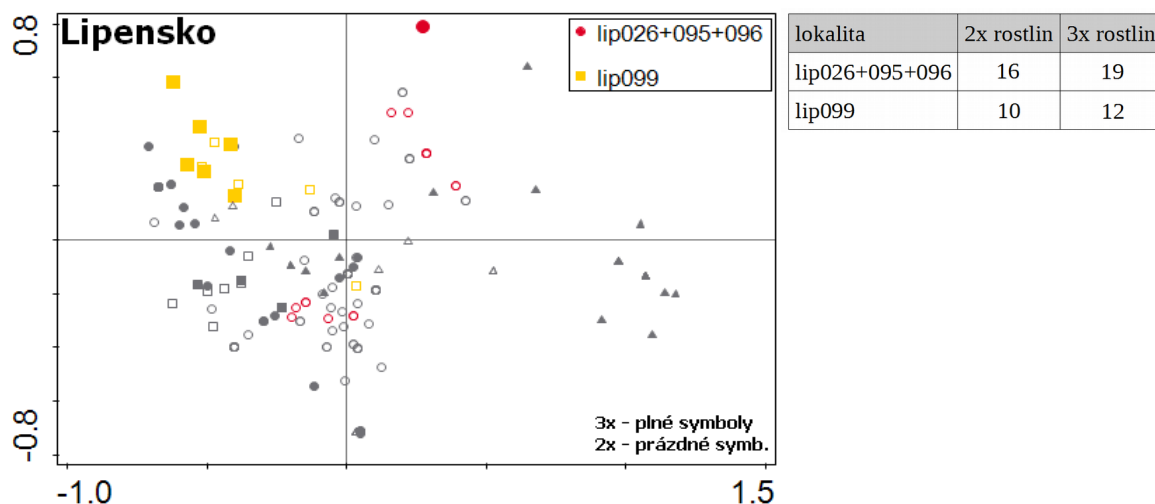
Obr. 19: PCoA populací z třeboňského regionu.

Budějovická populace (obr. 20) znovu ukazuje nepřibuznost triploidního cytotypu vůči ostatním diploidním jedincům. Můžeme zde ale také pozorovat stejné „odskočení“ jednoho diploidního genotypu v horní části obrázku.



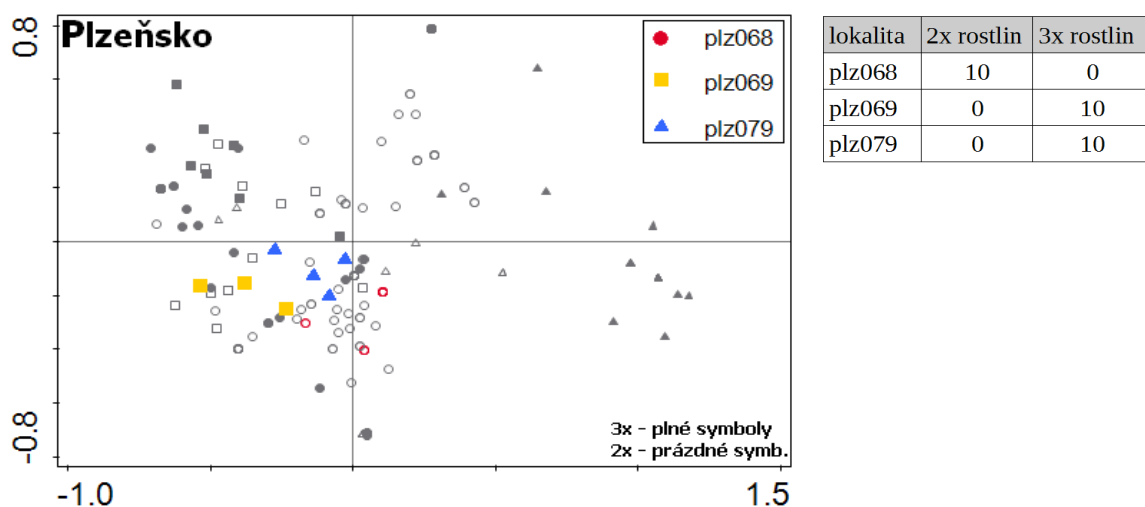
Obr. 20: PCoA populace z budějovického regionu

Lipenská populace (obr. 21) označená jako lip026+095+096 vykazuje podobný pattern, jaký bylo možné pozorovat u populací třeboňských, tj. triploidní cytotyp je separovaný od diploidního a tvoří uniformní klon 19 rostlin. Diploidní cytotyp je tvořen dvěma výrazně odlišnými skupinami genotypů. Druhá populace, lip099, by podle výsledků PCoA (ale také podle Neighbour-network, obr. 17) mohla posloužit jako příklad vzniku triploidních rostlin z již přítomných rostlin diploidních. V této populaci byl také nalezen genotyp daleko bližší populaci lip026+095+096, což může dokládat vzájemný kontakt obou populací vzdálených necelých 30 km vzdušnou čarou přes vodní nádrž Lipno.



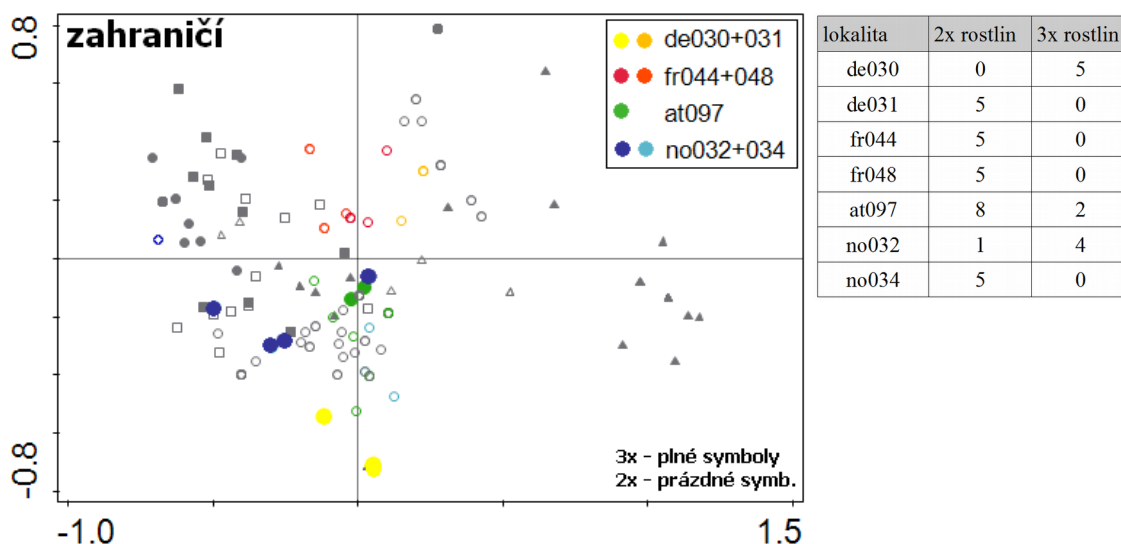
Obr. 21: PCoA populací z lipenského regionu.

Plzeňský region (obr. 22) je příkladem zachycení méně variabilních populací. Jednak jsou jednotné v ploidní úrovni, jednak jsou si genotypy vyskytující se v nich velmi podobné. Rostliny z populace s označením plz069 náleží podle absence polymorfních lokusů pravděpodobně k jednomu klonu, tři různé pozice v PCoA na obr. 21 jsou způsobeny přítomností missing data, které nemusejí nutně znamenat genetické rozdíly (viz příloha 2).



Obr. 22: PCoA populací z plzeňského regionu.

Německá populace de030 je složená z pěti triploidních rostlin, de031 z pěti diploidních rostlin. Jejich variabilita je nízká (obr. 23). Francouzské populace jsou obě čistě diploidní, opět s nevýraznou variabilitou. Variabilita rostlin z rakouské populace je lépe než na PCoA vidět na Neighbour-network (viz obr. 17). Norská populace no032 je směsná, sestává z jednoho diploida a čtyř triploidů, populace no034 je čistě diploidní.



Obr. 23: PCoA zahraničních populací.

4.6.4 Genotypová diverzita

U klonálních organismů obecně není snadné rozhodnout jednoznačně o počtu genotypů a příslušnosti zkoumaných jedinců k nim. Zavádí se proto hodnota tzv. thresholdu udávající počet změn v genotypu, který je ještě možné přisuzovat jednomu klonu (Douhovnikoff et Dodd 2003). Zahrnutí vzorků s mírně odlišnými genotypy do jednoho klonu může být opodstatněno dvěma důvody. Celková variabilita může být nadhodnocena kvůli technickým chybám, tj. zjištění např. dvou různých lokusů, přestože reálně je přítomen pouze jeden. Druhým důvodem mohou být somatické mutace daného markeru, které zapříčiní vznik odlišných genotypů i přes absenci sexuálního rozmnožování.

Threshold 4 byl vybrán proto, že popisem klonů nejlépe odpovídal předešlým analýzám a teprve při jeho aplikaci počet genotypů populace L69 klesl na jeden, což odpovídá absenci polymorfních lokusů (viz tab. VII). Zároveň u ostatních populací nedošlo k žádnému dramatickému propadu a poměr diverzity zůstal podobný.

Následující tabulky uvádí pro oba thresholdy počty genotypů, efektivní počty genotypů (analogie k efektivnímu počtu alel), genotypovou diverzitu podle Nei (1987), Shannonův index diverzity a index klonální diverzity R.

Tab. VIII: Základní informace o počtu a diverzitě genotypů analyzovaných vzorků hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) při hodnotě thresholdu 0.

threshold = 0; number of genotypes = 109							
population	ploidy	number of samples	number of genotypes	effective number of genotypes	Nei's genotypic diversity	Shannon-Wiener index	R - clonal diversity
L11	2x+3x	10	8	7,14	0,96	0,88	0,78
L21	2x	10	2	1,22	0,20	0,14	0,11
L30	3x	5	3	2,27	0,70	0,41	0,50
L31	2x	5	3	2,27	0,70	0,41	0,50
L32	2x+3x	5	4	3,57	0,90	0,58	0,75
L34	2x	5	4	3,57	0,90	0,58	0,75
L44	2x	5	3	2,27	0,70	0,41	0,50
L48	2x	5	3	2,27	0,70	0,41	0,50
L68	2x	10	4	2,38	0,64	0,47	0,33
L69	3x	10	4	2,38	0,64	0,47	0,33
L79	3x	10	8	7,14	0,95	0,88	0,78
L26+95+96	2x+3x	35	9	3,25	0,71	0,70	0,24
L99	2x+3x	22	13	8,07	0,92	1,01	0,57
L97	2x+3x	10	8	7,14	0,96	0,88	0,78
L7	2x+3x	10	7	4,55	0,87	0,76	0,78
L10+102	2x+3x	40	19	5,33	0,83	1,01	0,46
L9+103	2x+3x	40	13	4,42	0,79	0,84	0,31

Při použití nulového thresholdu bylo rozeznáno 109 genotypů. Nejvariabilnější populace jsou třeboňská směsná populace L7 a rakouská směsná populace L97 s počtem sedmi genotypů na 10 rostlin. Naopak nejméně variabilní je diploidní populace z Českého Švýcarska se dvěma genotypy na 10 rostlin.

Aplikace thresholdu s hodnotou 4 se projevila ve snížení počtu genotypů ze 109 na 86. Analogicky poklesla i variabilita populací v uvedených indexech diverzity. Důležitým faktem je, že u plzeňské populace L69 došlo ke snížení počtu genotypů na jeden. Tato hodnota již koresponduje s výše zmíněnou absencí polymorfních lokusů a vytvořením klonálního clustru v Neighbour-network. Zdánlivě vysoký počet genotypů této populace při nulovém thresholdu je pravděpodobně artefaktem způsobeným přítomností většího počtu missing data (viz příloha 2).

Tab. IX: Základní informace o počtu a diverzitě genotypů analyzovaných vzorků hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) při hodnotě thresholdu 4.

threshold = 4; number of genotypes = 86							
population	ploidy	number of samples	number of genotypes	effective number of genotypes	genotypic diversity	Shannon-Wiener index	R - clonal diversity
L11	2x+3x	10	7	5,56	0,91	0,80	0,67
L21	2x	10	2	1,22	0,20	0,14	0,11
L30	3x	5	2	1,47	0,40	0,22	0,25
L31	2x	5	2	1,47	0,40	0,22	0,25
L32	2x+3x	5	4	3,57	0,90	0,58	0,75
L34	2x	5	3	2,78	0,80	0,46	0,50
L44	2x	5	3	2,27	0,70	0,41	0,50
L48	2x	5	3	2,27	0,70	0,41	0,50
L68	2x	10	3	1,52	0,38	0,28	0,22
L69	3x	10	1	1,00	0,00	0,00	0,00
L79	3x	10	8	7,14	0,96	0,88	0,78
L26+95+96	2x+3x	35	8	3,22	0,71	0,67	0,21
L99	2x+3x	22	10	4,25	0,80	0,79	0,43
L97	2x+3x	10	7	5,56	0,91	0,80	0,67
L7	2x+3x	10	7	4,55	0,87	0,76	0,67
L10+102	2x+3x	40	14	2,86	0,67	0,74	0,33
L9+103	2x+3x	40	11	3,23	0,71	0,71	0,26

U 20 rostlin došlo ke ztrátě celého markeru (pravděpodobně z důvodu chyby při PCR nebo samotné fragmentační analýze) a u 50 rostlin byla zaznamenána missing data v jednom až dvou lokusech (zde z důvodu nejistoty při odečítání).

5 Diskuze

5.1 Rozšíření a fertilita *Pteridium aquilinum* v ČR

V současném pojetí sensu Der et al. (2009) již není hasivka orličí uvažována jako jeden kosmopolitní druh (Page 1976), ale rozpadá se na dvě hlavní linie a několik samostatných druhů. Rostliny zkoumané v této práci náleží skupině vázané primárně na severní polokouli, konkrétně jde o evropskou *P. aquilinum* ssp. *aquilinum*. Z celkového rozšíření této subspecie lze vyčíst preferenci spíše (sub)oceanického klimatu. Patrně z tohoto důvodu je na území České republiky hasivka vázána především na střední a vyšší polohy, podobně jako je tomu i u jiných oceanicky laděných druhů kapradin, např. druhu *Blechnum spicant* (Ekrt in Kaplan et al. 2017). Podobný charakter výskytu hasivky orličí lze najít v kontinentální části Německa, kde je výskyt hasivky orličí soustředěn především do oceaničtější části, kde se navíc vyskytuje i v polohách nižších (www.floraweb.de).

Prvotním impulzem studia fertility hasivky orličí byla zkušenost školitele aj., že fertilitní rostliny se v přírodě vyskytují velmi vzácně. Po provedení zevrubné revize herbářového materiálu 32 herbářových sbírek s doplněním vlastních údajů z terénu se potvrdilo, že fertilitní rostliny jsou vzácné a představují pouze 16% zkoumaného datového souboru. Navíc fertilita konkrétních jedinců často nebyla plně v optimu, naopak poměrně velké množství fertilitních rostlin bylo odhaleno až při detailnějším studiu pod binolupou. Přesto lze předpokládat, že sexuální rozmnožování i v našich podmínkách hraje důležitou roli.

Pokusy o vysvětlení geografického rozmístění fertilitních populací hasivky na škále celé České republiky na základě vybraných klimatických faktorů (teploty, srážky, mrazové dny) v této práci byly statisticky neprůkazné a je tedy pravděpodobné, že druh je fertilitní náhodně nebo nebyly dosud postihnuty patřičné faktory, které by toto mohly ovlivňovat. Podobně negativní výsledky z pohledu faktorů na jemnější ekologické škále zjistila Jonášová (2015).

Aktuální údaje o distribuci hasivky orličí na území ČR vzhledem k nadmořské výšce zjištěné pro databázi PLADIAS odpovídají údajům, které udává Květena České republiky (Hejný et Slavík 1997). Minimální nadmořská výška výskytu hasivky orličí je 190 m n. m. – Brandýs nad Labem a les Důbrava u Hodonína (viz Hejný et Slavík 1997), Labská Stráň a Nymburk (www.pladias.org). Maximální nadmořská výška se pohybuje okolo 1350 m n. m. – Malá Kotelná jáma v Krkonoších (www.pladias.org), Hejný et Slavík (1997) uvádí cca 1340 m n. m. v kotlině Moravy na Kralickém Sněžníku.

5.2 Četnost výskytu jednotlivých cytotypů

Většina rostlin hasivky orličí analyzovaných v této práci odpovídá diploidnímu cytotypu, v menší míře lze ale narazit na cytotyp triploidní. Četnost výskytu triploidů byla v datasetu této práce stanovena na 13,7% ze všech sebraných rostlin. 87% triploidních rostlin pochází ze směsných populací, zbylých 13% ze tří čistě triploidních populací. Vzhledem k malému počtu odhalených triploidních nebo směsných populací v rámci této práce je obtížné hledat nějakou zákonitost v jejich výskytu. Z dosavadních výsledků se však spíše zdá, že zde žádná zákonitost není a výskyt triploidních jedinců je náhodný.

Sheffield et al. (1993) při prvním objevu triploidního cytotypu *Pteridium aquilinum* v Anglii připouští, že jeho výskyt může být vázán na lidskou činnost často narušovaná stanoviště. Nižší stupeň tolerance narušení diploidních rodičů oproti autopolyloidnímu potomstvu uvádí například i Rabe et Haufler (1992). Situace je ale komplikována skutečností, že už samotný diploidní cytotyp hasivky orličí běžně kolonizuje lidmi narušovaná stanoviště (Sheffield et al. 1993). Podobný překryv nik diploidního a autotriploidního cytotypu, ovšem v rámci krytosemenných rostlin, u druhu *Lilium lancifolium* dokumentuje Chung et al. (2015).

Haufler et al. (1985) při zkoumání autotriploidního puchýřníku *Cystopteris protrusa* zjistil rovněž jeho společný výskyt s diploidním rodičem. Četnost triploidních rostlin uvádí 10%, což je velice podobný výsledek jako u hasivky zjištěný v této práci. Vznik triploidního cytotypu autoři vysvětlují na základě analýzy chromosomů jako nedokončené dělení po meióze I, tedy podobným mechanismem jako Braithwaithe (1964) u *Asplenium aethiopicum*, který takto popsal speciální typ apomiktického rozmnožování kapradin. Obecně lze tedy tyto případy, považovat, za splynutí gamet z gametofytů vzniklých z redeukovaného a neredukovaného výtrusu (Haufler et al. 1985).

Vznik autotriploida u *Pteridium aquilinum* však podle Sheffield et al. (1993) sleduje jinou cestu. Křížení gametofytů z redukované a neredukované spory zde považuje za méně pravděpodobné z důvodu velice vzácného výskytu diplospor u diploidních rostlin hasivky (Wolf et al. 1987), který byl potvrzen i v rámci této práce. Jako možnou alternativu uvádí Sheffield et al. (1993) proces aposporie.

5.3 Velikost průduchů a spor

Velikost průduchů a spor může být jedním ze způsobů, jak od sebe odlišit různé ploidie v rámci jednoho druhu nebo skupiny příbuzných druhů (Dyer et al. 2012). Ploidie je totiž jedním

z faktorů, které ovlivňují velikost buněk organismu (Barrington et al. 1986). U reprezentativního počtu rostlin obou zkoumaných cytotypů *Pteridium aquilinum* byly naměřeny a statisticky průkazně vyhodnoceny jako odlišné velikosti průduchů, tak i velikosti spor. Sheffield et al. (1993) uvádí průměrnou délku průduchů diploida 41,6–43,0 μm , triploida 46,5–48,0 μm a průměrnou velikost spor diploida 31,2 μm , triploida 34,1 μm . Je zajímavé, že zatímco hodnoty průduchů naměřené u rostlin z Walesu (Sheffield et al. 1993) vycházejí trendově výrazně větší než u rostlin měřených v této práci, hodnoty délky výtrusů jsou víceméně obdobné.

Délka těchto mikroznaků je však trendová, tedy diploidní rostliny vykazují menší hodnoty než triploidní rostliny. Proto se tedy tyto znaky dají použít vedle stanovení ploidní stupně i pro morfologickou determinaci obou cytotypů. Příklady takového použití (délka průduchů též u semenných rostlin) jsou studie Beck et al. (2010), Sigel et al (2011) nebo Przywara et al. (2011).

Následující klíč k rozlišení diploidního a triploidního cytotypu hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) je sestaven na základě vyvinutosti výtrusů a průměrné velikosti průduchů a výtrusů naměřených v této práci:

- a. průduchy 21,3–24,5 μm dl., výtrusy zpravidla vyvinuté, jednoho typu, v průměru 27,2–31,9 μm dl. **diploidní cytotyp**
- b. průduchy 29,3–36,5 μm dl., výtrusy z 45% abortované, vyvinuté výtrusy dvou typů, menší v průměru 32,2–34,9 μm dl., vzácněji se vyskytující diplospory v průměru 61,5 μm dl. **triploidní cytotyp**

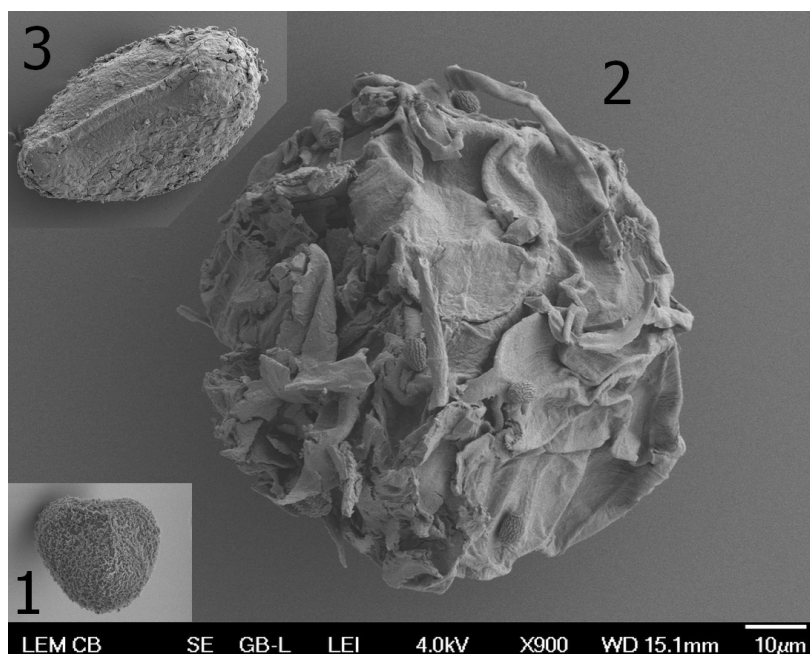
5.4 Míra fertility jednotlivých cytotypů

U diploidního i triploidního cytotypu *Pteridium aquilinum* byly nalezeny fertilmí rostliny. Diploidní cytotyp bývá častěji fertilmí (9,8%), zatímco triploidní méně (3,3%). Fertilmí diploidní rostliny mají zpravidla vyvinuté výtrusy (SAI = 1,3–9,6%), zatímco triploidní rostliny obsahují větší podíl abortovaných výtrusů (SAI = 44,2%). U aneuploidních (zpravidla triploidních) jedinců sexuálně reprodukcujících rodičů je uváděná omezená až prakticky nulová fertilita (Reichstein 1981, Otto et Whitton 2000). Tvorbu abortovaných spor u triploidních hybridů popisují například Schneller et Rasbach (1984) u rodu *Athyrium*, Bennert et al. (2005) u rodu *Equisetum*, procento abortovanosti u autotriploidního *Cystopteris protrusa* dokonce vyšší než 95% uvádí Haufler et al. (1985). Snížené fertilitě tedy

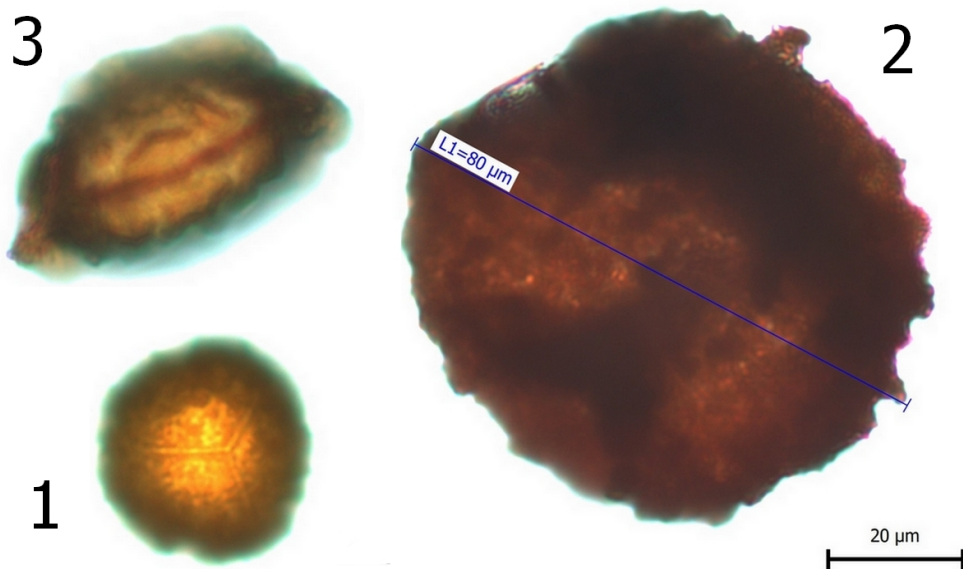
odpovídá i výsledek měření v rámci této práce (SAI = 44,2%) a také procento klíčivosti spor triploidní hasivky stanovené Sheffieldovou na 23–53% (Sheffield et al. 1993), ačkoliv ta spory popisuje jako z naprosté většiny vyvinuté. B. Jonášovou byl zjištěn SAI triploidní rostliny 4,9% (Jonášová 2015), což je hodnota odpovídající běžným diploidním jedincům (klíčivost spor však byla nulová). Vysoká míra fertility je u triploidních jedinců výjimečná, v rámci krytosemenných ji popisuje Matsuoka et al. (2007) v F1 generaci během křížení pšenice.

Při detailnějším porovnání jedinců hodnocených B. Jonášovou a autorem této práce byla odhalena přítomnost dvou naprosto odlišných typů spor. Zatímco rostlina studovaná v rámci této práce obsahuje klasické triletní spory (výjimečně též triletní diplospory několikanásobné velikosti), rostlina z práce Jonášové (Jonášová 2015) má spory monoletní, mírně větší než jsou klasické triletní spory (viz obr. 24 a 25). V řádu jednotek se u ní vyskytují rovněž triletní spory a stejně tak u triploidní rostliny z této práce lze ojediněle najít spory monoletní.

Přítomnost takto diametrálně odlišných spor v rámci jedné rostliny je zcela unikátní úkaz. Tato situace byla u kapradin popsána pouze u dvou konkrétních rostlin druhu *Lindsaea pallida*, spadajících rovněž do čeledi Dennstaedtiaceae, stejně jako *Pteridium aquilinum* (Tryon 1991). V rámci rodu se triletní a monoletní spory u jednotlivých druhů vyskytují méně vzácně – např. *Gleichenia*, *Odontosoria*, *Lindsaea*, u různých rodů v rámci čeledi pak ještě častěji – Marattiaceae, Gleicheniaceae, Schizeaceae, Vittariaceae, Dennstaedtiaceae (Tryon 1991).

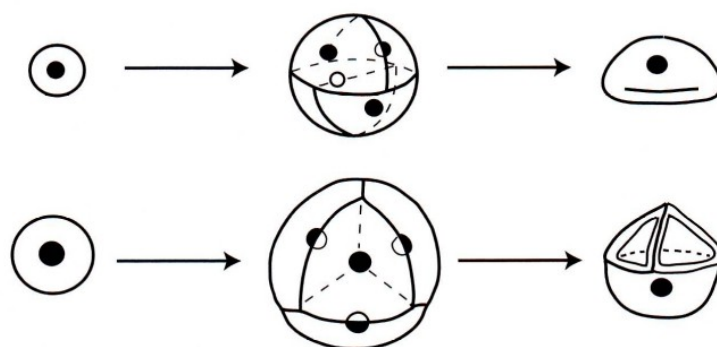


Obr. 24: Tři typy výtrusů nalezené u fertálních rostlin *Pteridium aquilinum*. 1 - běžná triletní spora 2x rostliny, 2 - abortovaná diplospora 3x rostliny, 3 - monoletní spora 3x rostliny. Měřítko 10 µm shodné pro všechny obrázky. Fotografie byly pořízeny v laboratoři elektronové mikroskopie BC AVČR za podpory projektu MEYS CR (LM2015062 Czech-BioImaging).



Obr. 25: Tři typy výtrusů nalezené u fertilních rostlin *Pteridium aquilinum*. 1 - běžná triletní spora 2x rostliny, 2 - abortovaná diplospora 3x rostliny, 3 - monoletní spora 3x rostliny. Měřítko 20 μm shodné pro všechny obrázky. Fotografie ze světelného mikroskopu.

Triletní výtrusy vznikají v tetradách, odkud získávají svou charakteristickou triletní jizvu. Uspořádání monoletních výtrusů má ovšem dvě možnosti, podle toho, zda tyto výtrusy tvoří tetrády nebo v krajním případě diády. Tetráda monoletních výtrusů je tvořena dvěma páry výtrusů, jejichž osa je vzájemně pootočena o 90° (viz obr. 26). Monoletní výtrusy v diádách vznikají u apomiktických druhů kapradin jako důsledek nedokončené meiózy (Raghavan 1989).



Obr. 26: Schéma uspořádání monoletních (horní část) a triletních (spodní část) spor v tetradách (převzato z Øllgaard et Tind 1993).

Spory triploidní hasivky z práce Sheffield et al. (1993) tvořily tetrády. Při bližším zkoumání výtrusnic triploidní rostliny z této diplomové práce byl zjištěn počet spor blízký se 32, přičemž výtrusnice obsahovala vyvinuté i různě abortované triletní spory. Pro nedostatek neporušených výtrusnic nebylo ovšem možné provést relevantní počet pozorování. Patrně však jde o apomiktický proces popsáný jako schéma Döpp-Mantonové (Raghavan 1989).

Triletní a monoletní spory by se navzájem neměly funkčně lišit (Tryon 1991). Přesto byla během kultivačních pokusů klíčivost monoletních spor triploida B. Jonášové nulová. Negativní byly též výsledky při kultivaci selektivně vybraných diplospor triploidů. Na druhou stranu výtrusy simultánně kultivovaných diploidů dobře klíčily a dále byla zaznamenána alespoň částečná klíčivost spor triploidních rostlin. Nelze však s jistotou říci, z jakého typu výtrusů „triploidní“ gametofyty vznikly (pravděpodobně však půjde o normální triletní spory, podle nulové klíčivosti selektivně kultivovaných diplospor a monoletních spor). Následný vznik sporofytů triploidních rostlin z experimentálně kultivovaných gametofytů dokazuje možnost sexuálního rozmnožování tohoto cytotypu. Sheffield et al. (1993) uvádí procento plně vyvinutých gametofytů ze spor triploidní rostliny 0,009–0,2%. Velmi zajímavou otázkou však je, jaké ploidie jsou produkovány výtrusy triploidů. Sheffield et al. (1993) při kultivaci triploidů zjistila vznik euploidních gametofytů, větší část jich však byla aneuploidní. Sporofyty z triploida napěstované v rámci této práce jsou v současné době příliš mladé a do odevzdání této diplomové práce nebylo možné je na průtokovém cytometru zanalyzovat.

5.5 Genetická struktura populací

Hasivka orličí (*Pteridium aquilinum*) je obecně považována za klonální rostlinu (Wolf et al. 1988). Wolf et al. (1990) nebo Parks et Werth (1993) na základě analýzy isoenzymů potvrdili výskyt nepříbuzných genet v rámci konkrétních populací *Pteridium aquilinum*. Charakteristika populací *Pteridium aquilinum* tak odpovídá tzv. „guerrilla“ typu, kdy se jednotlivé genety rychle šíří na velké vzdálenosti (Lovett Doust 1981). Tato vlastnost v kombinaci s častým výskytem hasivky vede k promixování různých genet.

Analýza mikrosatelitů v této práci měla osvětlit, jaká je struktura populací diploidního a triploidního cytotypu hasivky orličí a jaká je genetická podobnost obou cytotypů. Na základě takových dat je pak možné určit, zda triploidní rostliny vznikají opakovaně na dané lokalitě z přítomných diploidů, nebo vznikají vzácně a pak se šíří klonálně.

Studium 17 populací diploidních, triploidních i směsných ukázala, že naprostá většina populací se skládala z dvou a více genet různých velikostí, což koresponduje s výsledky analýzy isoenzymů na diploidních populacích *Pteridium aquilinum* (Wolf et al. 1990, Parks et Werth 1993). Rovněž byla odhalena triploidní populace (L69, viz příloha 1) tvořená pravděpodobně pouze jediným klonem. Velikost genet hasivky orličí bývá proměnlivá od velmi malých až po ty s maximálním rozsahem přes 1000 m (Parks et Werth 1993). U *Cystopteris protrusa* zjistil Haufler et al. (1985) podobný pattern. Vedle směsných populací diploidních a autotriploidních rostlin našel také čistě triploidní populaci složenou z rostlin jednoho klonu.

Šíření genotypů na větší vzdálenosti lze u kapradin jednoduše vysvětlit disperzí spor (Wolf 1991). V rámci zkoumaného datasetu 1147 rostlin z území ČR bylo zaznamenáno pouze 16% fertálních rostlin. Je však otázkou, zda je vůbec možné, aby zdejší fertální rostliny obsáhly celý prostor státu. Problém nastává především u triploidního cytotypu, který je už sám o sobě poměrně vzácný a jeho fertilita je navíc oproti diploidům nižší. Nabízí se pravděpodobnější vysvětlení, a to přísun spor z atlantské oblasti (odkud proudí převládající větry potenciálně přinášející výtrusy), kde může být hasivka plodná ve větší míře.

Podle výsledků této práce má většina triploidních rostlin odlišný genotyp od okolních diploidních rostlin. Zároveň je triploidní cytotyp geneticky stejně variabilní jako cytotyp diploidní. To napovídá opakovanému vzniku triploidů a jejich úspěšnému šíření. Lze předpokládat, že v šíření triploidního cytotypu hasivky mají významnější úlohu neredukované spory triploidů než diploidů, jejichž vzácnost popisuje Wolf et al. (1987). Ke vzniku triploidního sporofytu je zapotřebí křížení diploidního a haploidního gametofytu. Zatím ale zůstává otázkou, zda triploidní hasivka může produkovat dostačující množství diploidních spor. Sheffield et al. (1993) popisuje při kultivaci spor z triploidní hasivky vznik euploidních a aneuploidních gametofytů, přičemž stupeň aneuploidie není specifikován.

Vznik triploidního cytotypu lze také vysvětlit aposporií, kdy je přeskočena fáze spory a gametofyt vzniká přímo ze sporofytu. Křížením aposporického diploidního gametofytu s normálním haploidním gametofytem pak vzniká triploidní sporofyt. K aposporii se u hasivky přiklání i Sheffield et al. (1993). Protože ale během aposporie vzniká neredukovaný gametofyt nutně na místě svého diploidního rodiče a dědí od něj dvě z budoucích třech sádek chromosomů, museli by se triploidi jevit z větší části příbuzní některému z přítomných diploidů. Triploidi analyzovaní v této práci však byly často velmi odlišné od diploidů ze stejné populace. Aposporie u hasivky je doložena prací Steil (1949), přesto tento proces v našich podmínkách patrně nebude stát za vznikem triploidního cytotypu.

Pro naše podmínky se tedy jeví pravděpodobnější takové vysvětlení, že triploidní cytotyp vzniká na jiném místě a na naše území migruje ve formě spor. Alternativní vysvětlení, že by původní diploidní cytotyp, ze kterého triploidní rostliny vznikly, postupně ustoupil, a to téměř ve všech detekovaných případech, se zdá nepravděpodobné.

Zhodnotit celkovou genotypovou diverzitu datasetu klonálního druhu není triviální záležitostí. Klon je v botanickém pojetí charakterizován jako „geneticky jednotný soubor jedinců asexuálně vzniklých původně z jednoho jedince“ (Cook 1985). Během jeho vegetativního šíření ovšem může docházet ke vzniku somatických mutací, čímž se sice část klonu geneticky odliší, avšak její příslušnost ke zbytku klonu by měla být zachována. Proto, aby míra klonality nebyla takovým způsobem podhodnocena, lze výsledky molekulárních analýz korigovat zavedením thresholdu, tj. počtu neshodných lokusů, který je ještě možné přisoudit náhodnému vzniku mutací v rámci jednoho klonu (Douhovnikoff et Dodd 2003). Na druhou stranu je třeba s touto hranicí zacházet opatrně, jinak hrozí smazání genotypové variability mezi skutečně odlišnými jedinci a jejich sloučení do neexistujícího klonu. Kromě somatických mutací mohou k nesprávné interpretaci klonality přispět navíc i chyby v průběhu čtení a přepisování genotypů (Bonin et al. 2004).

Situace v souvislosti s výsledky této práce je navíc komplikována samotným charakterem dat získaných analýzou mikrosatelitů. Přesto, že analyzované rostliny náležely buďto diploidnímu nebo triploidnímu cytotypu, nežádka se u triploidních rostlin vyskytovaly v jednom markeru čtyři lokusy (výjimečně až pět lokusů). Podobná situace vyvstávala i u rostlin diploidních, kde byly detekovány markery se třemi až čtyřmi lokusy. S přihlédnutím k tomuto faktu posléze ani nebylo možné určit, je-li některý z lokusů například duplikován. Dalším následkem byla nutnost upustit od kodominantního charakteru dat a odečítat je pouze jako dominantní.

Přístup ke stanovení hodnoty thresholdu je v různých pracích odlišný a je závislý především na typu zkoumaných dat. Bienau et al. (2016) například využívá dvě metody – průměrnou vzdálenost (mean genotypic distance) klonálních jedinců a minimální hodnotu bimodálního rozložení párových distancí vzorků. Při aplikaci na daná data se ukázalo, že první z metod míru klonality nadhodnocuje, zatímco druhá ji podhodnocuje. Ve finále Bienau et al. (2016) používá hodnoty vycházející z obou metod a diskutuje jejich rozdíly. Threshold získaný na základě četnosti rozložení párových distancí doporučují i další, například Gitzendanner et al. (2011), Arnaud-Haond et al. (2007) nebo přímo na SSR datech Meloni et al. (2013).

Výsledky této práce pro hodnotu thresholdu 0 potvrzují výsledky jiných prací na populační struktuře hasivky orličí (Wolf et al. 1990, Parks et Werth 1993), tj. vysokou genetickou variabilitu, nejsou však zcela ve shodě s použitými vizualizačními metodami, především Neighbour-network (obr. 17). Pro hodnotu thresholdu 4 zůstává vysoká variabilita datasetu zachována (stále 86 různých genotypů na 237 vzorků), ale výsledky různých metod výpočtů jsou si již bližší. S vědomím všech problémů spojených s datasetem této práce samozřejmě nelze přímo říci, že zvolený threshold přesně popisuje reálnou situaci, v současném stavu je to však zřejmě nejvěrohodnější výsledek, který byl získán.

Douhovnikoff et Dodd (2003) ve své studii uvádějí i konkrétní vzorec, podle kterého lze, po dosazení průměrů a standardních odchylek párových podobností klonálních a neklonálních jedinců, vypočítat konkrétní hodnotu thresholdu. Všechny tyto postupy ale předpokládají možnost předchozího fyzického rozlišení klonálních a neklonálních vzorků v datasetu, což pro jejich aplikaci v této práci představuje zásadní překážku.

6 Závěr

- 1) Byla vytvořena aktuální mapa rozšíření hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) na území České republiky, která bude výhledově publikována v souborném příspěvku „Rozšíření cévnatých rostlin v České republice. Část 6.“ v časopise Preslia.
- 2) Hasivka orličí je na území ČR velmi omezeně fertilní. V rámci zkoumaného datasetu 1147 rostlin bylo zaznamenáno pouze 16,3% rostlin fertilních. Ani přes korelace tohoto datasetu s klimatickými faktory (srážky, teplota, mrazové dny) nebyl zjištěn žádný faktor, který by statisticky průkazně vysvětloval rozšíření fertilních populací hasivky na našem území. Zásadní roli ve výskytu fertilních populací zřejmě nehraje ani nadmořská výška, ani expozice populace v terénu.
- 3) Z celkového počtu 997 analyzovaných rostlin průtokovým cytometrem byl zaznamenán převažující výskyt diploidů (86%) a menší podíl triploidů (14%). Z pohledu celých populací (98 analyzovaných populací) bylo zaznamenáno 89% čistě diploidních, 3% populací čistě triploidních a 8% populací směsných ($2x+3x$).
- 4) Průměrná velikost průduchů a spor koreluje statisticky průkazně se stupněm ploidie rostlin. Lze je tedy využít jako morfologický determinační znak pro rozpoznání obou ploidí.
- 5) U rostlin hasivky orličí byly nalezeny čtyři typy spor – triletní spory, neredukované diplospory, monoletní spory a abortované spory. Neredukované diplospory a monoletní spory byly nalezeny pouze u triploidního cytotypu. Procento abortovaných spor (SAI) bylo u diploidních jedinců zjištěno v rozmezí 1,3–9,6% a tomu přibližně odpovídala i klíčivost. U jedné triploidní rostliny s triletními sporami byl vypočítán SAI roven 44,2%. Klíčivost zde byla výrazně nižší, nikoliv však nulová, jako u spor monoletních.
- 6) Populační struktura hasivky orličí je podobně variabilní u obou ploidí. V naprosté většině případů se v jedné populaci vyskytuje více genet společně, ale byla zaznamenána i triploidní populace tvořená pouze jedním genetickým klonem. V rámci konkrétní promíchané populace lze vysledovat klonálně vzniklé jedince všech přítomných genet. Triploidní cytotyp patrně vzniká opakovaně, zřejmě však nikoliv na území ČR. Pravděpodobně se na naše území dostává vzdušnými proudy z jiných oblastí.

7 Seznam použitých zdrojů

7.1 Literatura

ARNAUD-HAOND, S., DUARTE, C. M., ALBERTO, F., SERRÃO, E. A. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, 2007, vol. 16, p. 5115–5139.

BARRINGTON, D. S., PARIS, C. A., RANKER, T. A. Systematic inferences from spore and stomate size in the ferns. *American Fern Journal*, 1986, vol. 76, p. 149–159.

BASLEROVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, J. Algarum, Hepaticarum Muscurumque in cultiris collectio. NCSAV, Praha, 1962. 59 p.

BECK, J. B., WINDHAM, M. D., YATSKIEVYCH, G., PRYER, K. M. A diploids-first approach to species delimitation and interpreting polyploid evolution in the fern genus *Astrolepis* (Pteridaceae). *Systematic Botany*, 2010, vol. 35, p. 223–234.

BENNERT, W., LUBIENSKI, M., KÖRNER, S., STEINBERG, M. Triploidy in *Equisetum* subgenus *Hippochaete* (Equisetaceae, Pteridophyta). *Annals of Botany*, 2005, vol. 95, p. 807–815.

BIENAU, M. J., ECKSTEIN, R. L., OTTE, A., DURKA, W. Clonality increases with snow depth in the arctic dwarf shrub *Empetrum hermaphroditum*. *American Journal of Botany*, 2016, vol. 103, no. 12, p. 2105–2114.

BONIN, A., BELLEMAIN, E., BRONKEN-EIDENSEN, P., POMPANON, F., BROCHMANN, C., TABERLET, P. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies?. *Molecular Ecology*, 2004, vol. 13, p. 3261–3273.

BRAITHWAITE, A. F. A new type of apogamy in ferns. *New Phytologist*, 1964, vol. 63, p. 293–305.

CHEN X., WANG J., TIAN H., ZHANG X., WEN J., ZHOU S. Development of microsatellite markers for the bracken fern, *Pteridium aquilinum*. *Molecular Ecology Resources*, 2008, vol. 8, p. 1491-1493.

CHUNG, M. Y., LÓPEZ-PUJOL, J., CHUNG, J. M., KIM, K. J., PARK, S. J., CHUNG, M. G. Polyploidy in *Lilium lancifolium*: Evidence of autotriploidy and no niche divergence between diploid and triploid cytotypes in their native ranges. *Flora*, 2015, vol. 213, p. 57–68.

COOK, R. E. *Population Biology and Evolution of Clonal Organisms*. New Heaven and London: Yale University Press, 1985.

DER, J. P., BARKER, M. S., WICKETT, N. J., DE PAMPHILIS, C. W., WOLF, P. G. De novo characterization of the gametophyte transcriptome in bracken fern, *Pteridium aquilinum*. *BMC Genomics*, 2011, vol. 12, no.1, p. 99.

DER, J. P., THOMSON, J. A., STRATFORD, J. K., WOLF, P. G. Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany*, 2009, vol. 96, no. 5, p. 1041–1049.

DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, p. 2233–2244.

DOLEŽEL, J., SGORBATI, S., LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 1992, vol. 85, p. 625–631.

DOUHOVNIKOFF, V., DODD, R. S. Intra-clonal variation and a similarity threshold for identification of clones: application to *Salix exigua* using AFLP molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, vol. 106, p. 1307–1315.

DYER, R. J., SAVOLAINEN, V., SCHNEIDER, H. Apomixis and reticulate evolution in the *Asplenium monanthes* fern complex. *Annals of Botany*, 2012, vol. 110, p. 1515–1529.

GITZENDANNER, M. A., WEEKLEY, C. W., GERMAIN-AUBREY, C. C., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S. Microsatellite evidence for high clonality and limited genetic diversity in *Ziziphus celata* (Rhamnaceae), an endangered, self-incompatible shrub endemic to the Lake Wales Ridge, Florida, USA. *Conservation Genetics*, 2011, vol. 13, no. 1, p. 223–234.

HAUFLER, C. H., WINDHAM, M. D., BRITTON, D. M., ROBINSON, S. J. Triploidy and its evolutionary significance in *Cystopteris protrusa*. *Canadian Journal of Botany*, 1985, vol. 63, p. 1855–1863.

HEJNÝ, S., SLAVÍK, B. *Květena České republiky 1*. 2nd ed. Academia, 1997. reprint 1st ed. from 1988. ISBN 80-200-0643-5.

HORNYCH, O., EKRT, L. Spore abortion index (SAI) as a perspective tool of evaluation of spore fitness in ferns: An insight into sexual and apomictic species. *Plant Systematics and Evolution*, 2017, vol. 303, no. 4, p. 497–507.

JARRET, F., MANTON, I., ROY, S. Cytological and taxonomic notes on a small collection of living ferns from Galapagos. *Kew Bulletin*, 1968, vol. 22, p. 475–480.

JONÁŠOVÁ, B. *Faktory ovlivňující fertilitu hasivky orličí (Pteridium aquilinum): bakalářská práce*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, 2015.

KAPLAN, Z., DANIHELKA, J., KOUTECKÝ, P., ŠUMBEROVÁ, K., EKRT, L., GRULICH, V., ŘEPKA, R., HROUDOVÁ, Z., ŠTĚPÁNKOVÁ, J., DVOŘÁK, V., DANČÁK, M. DŘEVOJAN, P., WILD, J. Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 4. *Preslia*, 2017, vol. 89 (in press).

LOVETT DOUST, L. Population and localized specialization in a clonal perennial (*Ranunculus repens*) I. The dynamics of ramets in contrasting habitats. *Journal of Ecology*, 1981, vol. 69, p. 743–755.

MANTON, I. *Problems of cytology and evolution in Pteridophyta*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1950.

MATSUOKA, Y., TAKUMI, S., KAWAHARA, T. Natural variation for fertile triploid F1 hybrid formation in allohexaploid wheat speciation. *Theoretical Applied Genetics*, 2007, vol. 115, p. 509–518.

MELONI, M., REID, A., CAUJAPÉ-CASTELLS, J., MARRERO, Á., FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. M., MESA-COELO, R. A., CONTI, E. Effects of clonality on the genetic variability of rare, insular species: the case of *Ruta microcarpa* from the Canary Islands. *Ecology and Evolution*, 2013, vol. 3, no. 6, p. 1569–1579.

NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 1987.

OTTO, S. P., WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, 2000, vol. 34, p. 401–437.

PAGE, C. The taxonomy and phytogeography of bracken – a review. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1976, vol. 73, p. 1–34.

PARKS, J. C., WERTH, C. R. A study of spatial features of clones in a population of bracken fern, *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany*, 1993, vol. 80, no. 5, p. 537–544.

PRZYWARA, L., PANDEY, K. K., SANDERS, K. M. Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*. *New Zealand Journal of Botany*, 2011, vol. 26, p. 179–182.

RABE, E. W., HAUFLER, C. H. Autopolyploidy and its contribution to fern genetics and evolution: evidence from a Maidenhair mutant. In *Fern horticulture: past, present and future perspectives*. UK: Andover, 1992, p. 189–193.

RAGHAVAN, V. *Developmental biology of fern gametophytes*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. ISBN-13 978-0-521-33022-0.

REICHSTEIN, T. Hybrids in European Aspleniaceae (Pteridophyta). *Botanica Helvetica*, 1981, vol. 91, p. 89–139.

SCHULKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 2000, vol. 18, p. 233–234.

SHEFFIELD, E., WOLF, P. G., RUMSEY, F. J., ROBSON, D. J., RANKER, T. A., CHALLINOR, S. M. Spatial distribution and reproductive behaviour of a triploid bracken (*Pteridium aquilinum*) clone in Britain. *Annals of Botany*, 1993, vol. 72, p. 231–237.

SIGEL, E. M., WINDHAM, M. D., HUIET, L., YATSKIEVYCH, G., PRYER, K. M. Species relationships and farina evolution in the Cheilanthoid fern genus *Argyrochosma* (Pteridaceae). *Systematic Botany*, 2011, vol. 36, p. 554–564.

STEIL, W. N. A study of Apospory in *Pteridium aquilinum*. *American Fern Journal*, vol. 39, p. 19-22.

TAN, M. K., THOMSON, J. A. Variation of genome size in *Pteridium*. In THOMSON, J. A., SMITH, R. T. (ed.). *Bracken biology and management*. Sydney, Australia: Australian Institute of Agricultural Science, 1990, p. 87–93.

TRYON, A. F., LUGARDON, B. *Spores of the Pteridophyta*. New York: Springer-Verlag, 1991. ISBN-13 978-1-4613-8993-4.

WOLF, P. G., HAUFLER, C. H., SHEFFIELD, E. Electrophoretic evidence for genetic diploidy in the bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Science*, 1987, vol. 236, p. 947–949.

WOLF, P. G., HAUFLER, C. H., SHEFFIELD, E. Maintenance of genetic variation in the clonal weed *Pteridium aquilinum* (bracken). *SAAS Bulletin of Biochemistry and Biotechnology*, 1988, vol. 1, p. 46–50.

WOLF, P. G., SHEFFIELD, E., HAUFLER, C. H. Estimates of gene flow, genetic substructure and population heterogeneity in bracken (*Pteridium aquilinum*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 1991, vol. 42, p. 407–423.

WOLF, P. G., SHEFFIELD, E., HAUFLER, C. H. Genetic attributes of bracken as revealed by enzyme electrophoresis. In THOMSON, J. A., SMITH, R. T. (ed.). *Bracken Biology and Management*. Hawthorn, Victoria: Australian Institute of Agriculture and Science, 1990, p. 71–78.

ZHOU, S., DONG, W., CHEN, X., ZHANG, X., WEN, J., SCHNEIDER, H. How many species of bracken (*Pteridium*) are there? Assessing the Chinese brackens using molecular evidence. *Taxon*, 2014, vol. 63, no. 3, p. 509-521.

7.2 Internetové zdroje

FloraWeb, Bundesam für Naturschutz. www.floraweb.de (accessed April 14, 2017).

Mapy.cz, map server. <https://mapy.cz> (accessed April 14, 2017).

PLADIAS: Plant Diversity Analysis and Synthesis Centre. Vegetation science group, Masaryk University Brno. www.pladias.org (accessed April 14, 2017).

THIERS, B. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff, 2017. NYBG. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>, New York Botanical Garden's Virtual Herbarium (accessed April 14, 2017).

7.3 Software

EHRICH, D. AFLPDAT: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes*, 2006, vol. 6, p. 603–604.

HUSON, D. H., BRYANT, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Molecular Biology and Evolution*, 2006, vol. 23, no. 2, p. 254–267. Software available from www.splitstree.org (accessed April 13, 2017).

KORESSAAR, T., JÖERS, K., REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 2007, vol 23, p. 1289–1291.

MEIRMANS, P. G., VAN TIENDEREN, P. H. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*, 2004, vol. 4, p. 792–794.

Partec FloMax Operating and Analysis Software for Partec Flow Cytometry Particle Analysing Systems, version 2.4d, Partec GmbH, Münster, Germany, 2003, Internet access: <http://www.sysmex-partec.com> (accessed April 16, 2017).

Promicra s r. o., QuickPHOTO MICRO, version 3.1, 2004, Internet access: www.promicra.com (accessed April 15, 2017).

R Foundation for Statistical Computing, R: A Language and Environment for Statistical Computing, version 3.2.4, 2016, Vienna, Austria, Internet access: <https://www.R-project.org> (accessed April 16, 2017).

SCHLÜTER, P. M., HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes*, 2006, vol. 6, p. 569–572.

SoftGenetics, LLC., GeneMarker, version 1.8, Internet access: <http://www.softgenetics.com> (accessed April 14, 2017).

StatSoft CR s r. o., STATISTICA, version 13.0, Internet access: <http://www.statsoft.cz> (accessed April 14, 2017).

TER BRAAK, C. J. F., ŠMILAUER, P. CANOCO reference manual and user's guide: software for ordination (version 5.0). *Wageningen: Biometris*, 2012.

UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M., ROZEN, S. G. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 2012, vol. 40, no. 15, p. e115.

8 Přílohy

Příloha 1: Seznam lokalit hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*), na kterých byly provedeny sběry vzorků pro tuto práci.

označení	lokality	okres/stát	nadm. výška	souřadnice	datum	ploidie	fertilita
L1	Rožnov pod Radhoštěm	Vsetín	484	49°29'24.500"N, 18°10'07.300"E	2015-08-02	2x	S
L2	Stáj	Jihlava	680	49°27'55.800"N, 15°49'27.700"E	2015-08-04	2x	S
L3	Rajnochovice	Kroměříž	497	49°25'01.500"N, 17°49'33.700"E	2015-08-06	2x	S
L4	Valtínov	Jindřichův Hradec	650	49°05'23.300"N, 15°16'19.800"E	2015-08-10	2x	S
L5	Valtínov	Jindřichův Hradec	670	49°05'15.500"N, 15°16'17.500"E	2015-08-10	2x	S
L6	Zell am See	Německo	1250	47°19'37.900"N, 12°45'43.700"E	2015-08-21	2x	S
L7	Mladošovice	České Budějovice	487	48°57'11.600"N, 14°43'10.500"E	2015-08-25	2x+3x	S
L8	Borek	České Budějovice	441	49°01'26.900"N, 14°30'28.700"E	2015-08-26	2x	S
L9	Třeboň Holičky	Jindřichův Hradec	454	49°00'13.900"N, 14°48'42.700"E	2015-08-29	2x+3x	S
L10	Hamr	Jindřichův Hradec	459	48°57'07.800"N, 14°53'14.700"E	2015-09-03	2x+3x	F
L11	Mříč	Český Krumlov	574	48°54'52.100"N, 14°19'38.600"E	2015-09-02	2x+3x	F
L12	Rudolfov	České Budějovice	560	49°00'20.900"N, 14°33'59.400"E	2015-09-05	2x	S
L13	Nová Ves	České Budějovice	482	48°54'46.000"N, 14°32'54.000"E	2015-09-16	2x	S
L14	Pořešín	Český Krumlov	563	48°46'43.400"N, 14°30'35.800"E	2015-09-20	2x	S
L15	Plav	České Budějovice	419	48°54'45.000"N, 14°28'11.900"E	2015-09-20	2x	F
L16	Königstein	Německo	303	50°55'09.400"N, 14°03'14.100"E	2015-09-28	2x	S
L17	Leichtenhain	Německo	193	50°55'40.500"N, 14°14'27.600"E	2015-09-28	2x	S
L18	Hinterhermsdorf	Německo	397	50°55'08.500"N, 14°22'13.300"E	2015-09-28	2x	F
L19	Dolní Poustevna	Děčín	379	50°59'09.100"N, 14°18'28.100"E	2015-09-28	2x	F
L20	Doubice	Děčín	417	50°53'55.900"N, 14°27'20.300"E	2015-09-28	2x	S
L21	Chřibská	Děčín	320	50°51'39.600"N, 14°26'42.300"E	2015-09-28	2x	F
L22	Lipnice	Děčín	409	50°49'43.400"N, 14°25'38.700"E	2015-09-28	2x	S
L23	Jaroměř	Český Krumlov	602	48°42'10.500"N, 14°31'34.400"E	2015-10-03	2x	F

označení	lokality	okres/stát	nadm. výška	souřadnice	datum	ploidie	fertilita
L24	Pohorská Ves	Český Krumlov	786	48°39'59.000"N, 14°38'34.700"E	2015-10-03	2x	F
L25	Suchdol	Český Krumlov	659	48°40'45.900"N, 14°27'06.300"E	2015-10-03	2x	S
L26	Pernek	Český Krumlov	835	48°47'43.600"N, 13°59'40.100"E	2015-10-04	2x+3x	F
L27	Stožec	Prachatice	803	48°48'32.800"N, 13°56'00.300"E	2015-10-04	2x	S
L28	Frymburk	Český Krumlov	740	48°38'45.100"N, 14°10'20.400"E	2015-10-04	2x	S
L29	Hojsova Stráž	Klatovy	835	49°11'50.700"N, 13°13'17.900"E	2015-10-18	2x	F
L30	Settinchen	Německo	135	51°41'48.700"N, 13°54'07.100"E	2015-08-21	3x	S
L31	Lietzow	Německo	2	54°29'20.300"N, 13°30'03.700"E	2015-08-22	2x	S
L32	Skövde	Švédsko	280	58°24'06.400"N, 13°45'37.500"E	2015-08-23	2x+3x	S
L33	Asphaugen	Norsko	80	64°03'13.500"N, 11°29'40.700"E	2015-08-24	-----	S
L34	Hemsjoen	Norsko	135	64°14'04.900"N, 12°07'01.900"E	2015-08-25	2x	S
L35	Vestre Loding	Norsko	45	67°17'55.500"N, 14°47'55.000"E	2015-08-26	2x	S
L36	Innhavet	Norsko	75	67°51'41.800"N, 15°56'24.500"E	2015-08-30	2x	S
L37	Eide	Norsko	130	63°12'38.700"N, 09°04'58.800"E	2015-09-02	2x	S
L38	Marstein	Norsko	40	62°29'18.200"N, 07°45'35.600"E	2015-09-03	2x	S
L39	Feset	Norsko	80	58°58'25.700"N, 09°31'23.400"E	2015-09-04	2x	S
L40	Kristiansand	Norsko	15	58°07'58.500"N, 08°00'43.900"E	2015-09-04	2x	S
L41	Arestrup	Dánsko	50	56°48'35.200"N, 09°44'02.300"E	2015-09-05	2x	S
L42	Ostrov Pag	Chorvatsko	10	44°28'24.200"N, 15°00'36.200"E	2016-05-01	2x	S
L43	Quinta das Cegonhas	Portugalsko	595	40°31'11.300"N, 07°32'29.300"E	2016-05-01	2x	S
L44	St. Guilhem le Desert	Francie	446	43°44'01.900"N, 03°32'07.000"E	2016-06-04	2x	S
L45	kaňony řek Tarn a Jonte	Francie	578	44°17'41.400"N, 03°14'34.100"E	2016-06-05	2x	S
L46	kaňony řek Tarn a Jonte	Francie	589	44°13'13.300"N, 03°13'40.200"E	2016-06-05	2x	S
L47	Les Vergnes de Mazes	Francie	994	44°48'38.700"N, 02°52'46.000"E	2016-06-07	2x	S
L48	Monts du Cantal	Francie	1193	45°06'44.700"N, 02°46'08.500"E	2016-06-08	2x	S
L49	Compains	Francie	1224	45°28'00.800"N, 02°53'16.000"E	2016-06-09	2x	S
L50	Puy Pariou	Francie	987	45°48'06.200"N, 02°58'51.400"E	2016-06-11	2x	S

označení	lokality	okres/stát	nadm. výška	souřadnice	datum	ploidie	fertilita
L51	Přísečná	Český Krumlov	702	48°50'23.600"N, 14°18'41.700"E	2016-06-25	2x	S
L52	Kokořínský Důl	Mělník	250	50°25'50.800"N, 14°34'54.100"E	2016-07-11	2x	F
L53	Dobřeň	Mělník	365	50°28'29.300"N, 14°33'00.600"E	2016-07-11	2x	S
L54	Bělá pod Bezdězem	Mladá Boleslav	300	50°27'48.800"N, 14°46'48.900"E	2016-07-11	2x	S
L55	Bělá pod Bezdězem – Čistá	Mladá Boleslav	292	50°29'13.400"N, 14°50'17.200"E	2016-07-11	2x	F
L56	Bítouchov	Mladá Boleslav	297	50°27'45.500"N, 14°53'21.300"E	2016-07-11	2x	S
L57	Riesachsee	Rakousko	1358	47°19'49.100"N, 13°46'22.400"E	2016-07-13	2x	S
L58	Riesachsee	Rakousko	1028	47°21'11.600"N, 13°43'20.600"E	2016-07-13	2x	S
L59	Duisitzkarsee	Rakousko	1195	47°18'30.700"N, 13°42'06.400"E	2016-07-13	2x	S
L60	Schladming	Rakousko	813	47°24'04.000"N, 13°41'30.400"E	2016-07-15	2x	S
L61	Ramsau – Vorberg	Rakousko	1120	47°24'25.700"N, 13°38'17.300"E	2016-07-15	2x	S
L62	Dvorce	České Budějovice	482	48°52'12.500"N, 14°39'23.000"E	2016-07-17	2x	S
L63	Nové Hrady – Žárský rybník	České Budějovice	530	48°47'38.900"N, 14°43'35.100"E	2016-07-17	2x	S
L64	Ražice	Písek	427	49°14'17.700"N, 14°06'25.700"E	2016-07-18	2x	S
L65	Rožmitál pod Třemšínem – Sobenský ryb.	Příbram	568	49°37'37.200"N, 13°50'34.100"E	2016-07-18	2x	S
L66	Brdy – Míšov	Plzeň-jih	621	49°37'14.900"N, 13°42'39.500"E	2016-07-18	2x	S
L67	Plzeň–Bolevec – PP Doubí	Plzeň-město	380	49°47'26.000"N, 13°23'42.400"E	2016-07-19	2x	S
L68	Bušovice – Kokotský rybník	Rokycany	462	49°46'51.700"N, 13°32'42.400"E	2016-07-19	2x	S
L69	Rokycany – vrchol Čilina (523 m n. m.)	Rokycany	505	49°44'14.900"N, 13°32'31.900"E	2016-07-19	3x	S
L70	Štěnovice	Plzeň-jih	450	49°39'58.300"N, 13°24'51.300"E	2016-07-19	2x	S
L71	Přestavky	Plzeň-jih	412	49°35'07.500"N, 13°13'24.900"E	2016-07-19	2x	S
L72	Štěkře	Český Krumlov	540	48°52'11.600"N, 14°21'55.100"E	2016-07-31	2x	S
L73	Přídolí	Český Krumlov	623	48°44'25.000"N, 14°20'56.600"E	2016-07-31	2x	S
L74	Výprachtice	Ústí nad Orlicí	709	49°59'58.600"N, 16°40'26.400"E	2016-08-08	2x	S
L75	Vápenná	Jeseník	458	50°15'37.200"N, 17°06'33.100"E	2016-08-08	2x	S
L76	Žulová – Vycpálkův lom	Jeseník	470	50°17'25.700"N, 17°07'14.700"E	2016-08-08	2x	S
L77	Štíty	Šumperk	430	49°57'03.300"N, 16°45'58.500"E	2016-08-09	2x	F

označení	lokality	okres/stát	nadm. výška	souřadnice	datum	ploidie	fertilita
L78	Maletín	Šumperk	535	49°48'30.600"N, 16°46'40.600"E	2016-08-09	2x	F
L79	Dobřív	Rokycany	504	49°43'42.500"N, 13°44'01.300"E	2016-08-03	3x	S
L80	Mrákotín	Jihlava	580	49°11'28.800"N, 15°21'10.100"E	2016-08-11	2x	S
L81	Konice, Jednov	Prostějov	550	49°33'26.100"N, 16°52'09.100"E	2016-08-11	2x	S
L82	Týn nad Bečvou	Přerov	430	49°30'21.900"N, 17°39'36.600"E	2016-08-12	2x	F
L83	Pulčínské skály	Vsetín	590	49°13'37.400"N, 18°04'39.600"E	2016-08-12	2x	S
L84	Malá Bystřice – Zezulka	Vsetín	450	49°24'00.500"N, 18°02'55.800"E	2016-08-12	2x	F
L85	Valašská Bystřice – Na Horách	Vsetín	540	49°25'42.800"N, 18°06'31.400"E	2016-08-12	2x	F
L86	Hutisko-Solanec	Vsetín	560	49°24'50.000"N, 18°13'49.300"E	2016-08-13	2x	S
L87	Horní Bečva	Vsetín	560	49°25'25.300"N, 18°18'51.300"E	2016-08-13	2x	F
L88	Střítež nad Bečvou	Vsetín	400	49°27'21.300"N, 18°02'39.800"E	2016-08-13	2x	S
L89	Haviřov, Pežgovský les	Ostrava-město	270	49°48'21.100"N, 18°23'28.500"E	2016-08-13	2x	S
L90	Albrechtice – Velký les	Karviná	300	49°47'04.800"N, 18°29'36.200"E	2016-08-13	2x	S
L91	Ostravice – vodní nádrž Šance	Frýdek-Místek	470	49°31'08.800"N, 18°24'22.900"E	2016-08-14	2x	S
L92	Staré Hamry	Frýdek-Místek	530	49°27'20.700"N, 18°28'02.900"E	2016-08-14	2x	S
L93	Prostřední Bečva – Bácov	Vsetín	480	49°26'28.500"N, 18°15'05.000"E	2016-08-14	2x	F
L94	Rožnov pod Radhoštěm	Vsetín	485	49°29'24.200"N, 18°10'06.100"E	2016-08-14	2x	F
L95	Pernek	Český Krumlov	835	48°47'43.600"N, 13°59'40.100"E	2016-08-25	2x	S
L96	Pernek	Český Krumlov	835	48°47'43.600"N, 13°59'40.100"E	2016-08-25	2x+3x	S
L97	Hollenstein	Rakousko	645	47°49'10.800"N, 14°44'48.600"E	2016-08-20	2x+3x	S
L98	Mariazell	Rakousko	855	47°46'52.700"N, 15°14'35.800"E	2016-08-25	2x	S
L99	Loučovice	Český Krumlov	690	48°37'23.900"N, 14°14'32.000"E	2016-09-18	2x+3x	F
L100	Loučovice	Český Krumlov	690	48°37'23.900"N, 14°14'32.000"E	2016-09-18	2x	F
L101	Mladošovice	České Budějovice	480	48°57'20.000"N, 14°43'02.300"E	2016-09-20	3x	S
L102	Hamr	Jindřichův Hradec	459	48°57'07.800"N, 14°53'14.700"E	2016-09-20	2x+3x	S
L103	Třeboň Holičky	Jindřichův Hradec	454	49°00'13.900"N, 14°48'42.700"E	2016-09-20	2x+3x	S
L104	Žďárky	Náchod	525	50°28'23.474"N, 16°14'36.829"E	2016-09-17	2x	F

Příloha 2: Výsledky analýzy mikrosatelitů, dominantní skórování. Označení lokalit: L – číslo lokality, R – číslo rostliny. Lokusy jsou označeny délkou (bp). Pro přehlednost je značena přítomnost lokusu jako 1, nepřítomnost jako prázdné pole, otazník značí missing data (konkrétní lokus nebo celý marker). Stejně tak je u ploidie označen pouze triploidní cytotyp, prázdné pole značí cytotyp diploidní.

marker		AC1					AG3					TGA7					TTC8					TG12					Pt12cp		Pt04																					
lokality	ploidie	307	309	313	315	317	319	321	374	380	382	384	386	388	390	392	167	170	173	176	179	182	185	188	191	297	300	303	306	309	312	191	193	195	197	199	201	203	205	206	208	210	212	379	383	389	231	233		
L7R1				1							1								1							1		1														1		1						
L7R2				1	1						1								1								1		1															1		1				
L7R3				1											1	?			1								1		1															1		1				
L7R4				1					1							1			1								1		1															1		1				
L7R5				1	1						1				1	?			1								1		1																1		1			
L7R6				1	1						1				1				1								1		1																	1		1		
L7R7				1	1							1		1	1				1								1		1																	1		1		
L7R8				1	1										1				1								1		1																	1		1		
L7R9				1	1						1				1				1								1		1																	1		1		
L7R10	3x			1							1		1		1				1							1		1		1	1	1				?									1		1			
L11R1				1	1				1		1								1								1		1																1		1			
L11R2				1	1				1		1								1								1		1																1		1			
L11R3	3x	1		1						1		1				1			1							1	1			1	1	1														1		1		
L11R4				1					1		1								1						1		1		1																	1		1		
L11R5			?	1				?	?	?	?	?	?	?	?	1			1							?	?	?	?	?	?	1	1													1		1		
L11R6				1	1				1		1								1							1		1																		1		1		
L11R7			1	1					1	1	1					1			1								1	1	1																	1		1		
L11R8			1	1					1	1	1					1			1								1	1	1																	1		1		
L11R9				1	1				1		1								1						1		1		1																	1		1		
L11R10		1									1								1	1							1		1																	1		1		
L21R1				1							1								1										1																	1		1		
L21R2				1							1								1										1																	1		1		
L21R3				1							1								1									1																		1		1		
L21R4				1							1								1									1																		1		1		
L21R5				1							1								1									1																		1		1		

marker		AC1										AG3							TGA7									TTC8							TG12							Pt12cp			Pt04										
lokality	plodidie	307	309	313	315	317	319	321	374	380	382	384	386	388	390	392	167	170	173	176	179	182	185	188	191	297	300	303	306	309	312	191	193	195	197	199	201	203	205	206	208	210	212	379	383	389	231	233							
L21R6				1							1								1									1												1			1				1								
L21R7				1							1								1										1												1			1				1							
L21R8				1							1								1											1							1				1			1				1							
L21R9				1							1								1										1												1			1				1							
L21R10				1							1								1										1											1			1				1			1					
L30R1	3x	1		1					1		1		1				?	1	1						1		1	1			1					1		1				1		1			1			1					
L30R2	3x	1		1					1		1								1	1					1		1	1			1						1		1				1		1			1			1				
L30R3	3x	1		1					1		1		1						1	1					1		1	1			1						1		1				1		1			1			1				
L30R4	3x	1		1					?		1		1						1	1					1		1	1			1						1		1			1		1			1			1					
L30R5	3x	1		1					1		1		1						1	1					1		1	1			1						1		1				1		1			1			1				
L31R1				1			1				1	1								1									1	1			1								1					1			1			1			
L31R2				1			1				1	1								1									1	1			1								1				1			1			1				
L31R3			1				1				1									1										1							1					1			1				1			1			
L31R4				1			1				1									1									1	1			1								1				1				1			1			
L31R5				1			1				1	1								1									1	1			1								1				1			1			1				
L32R1			1								1	1					1			1										1												1			1				1			1			
L32R2	3x			1	1						1						1			1								1	1	1		1											1			1			1			1	1		
L32R3	3x			1									1				1										1			1	1						1								1			1			1				
L32R4	3x			1							1		1				1										1			1	1															1			1			1			
L32R5	3x			1							1						1										1			1	?															1			1			1			
L34R1				1									1				1										1			1	1														1			1			1				
L34R2				1									1				1											1			1	1															1			1			1		
L34R3			1	1			?				1								1										1		1	1												1			1			1			1		
L34R4			1				?				1								1										1		1	1															1			1			1		
L34R5			1	1			1				1								1										1		1	1															1			1			1		
L44R1					1	1					1									1									1										1						1			1			1				
L44R2							1				1									1									1																	1			1			1			
L44R3							1				1									1										1																		1			1			1	

marker		AC1										AG3							TGA7								TTC8							TG12								Pt12cp		Pt04										
lokaita	ploidie	307	309	313	315	317	319	321	374	380	382	384	386	388	390	392	167	170	173	176	179	182	185	188	191	297	300	303	306	309	312	191	193	195	197	199	201	203	205	206	208	210	212	379	383	389	231	233						
L79R2	3x					1						1		1					1								1		1	1		1											1		1									
L79R3	3x		1			?		?	?	?	?	?	?	?	?				1								1		1	1		1		1												1		1						
L79R4	3x		1			1						1	1		1					1							1		1	1		1		1													1		1					
L79R5	3x		1			?		?	?	?	?	?	?	?	?					1							1		1	1		1		1													1		1					
L79R6	3x		1									1	?		1					1							1		1	1		1		1													1		1					
L79R7	3x		1			1						1	?		1					1									1	1		1															1		1					
L79R8	3x		1			1						1	1		1					1							1		1	1		1		1													1		1					
L79R9	3x		1			?		?	?	?	?	?	?	?	?	?					1								1	1		1		1														1		1				
L79R10	3x		1						?	?	?	?	?	?	?	?					1							1			1	?		1		1													1		1			
L26R1				1					1								1			1								1	1		1														1		1	1						
L26R2				1					1			1					1			1								1	1		1																1		1	1				
L26R3				1		1						1		1			1			1						1		1	1				1												1			1						
L26R4				1		1						1		1			1			1							1	1	1					1													1			1				
L26R5	3x	1			1				?	?	?	?	?	?	?	?	1			1								1		?	1	1		1			1	1											1		1			
L26R6				1		1			?	?	?	?	?	?	?	?	1				1							1	1	1				1															1		1			
L26R7			1		1						1						1			1								1																					1		1	1		
L26R8				1					1			1					1			1									1	1		1																	1		1	1		
L26R9				1					1			?					1			1								1	1		1																		1			1		
L26R10				1					1								1			1								1	1		1																		1		1	1		
L95R1			1		1				1			1					1			1									1	1		1						?										1		1	1			
L95R2			1		1				1			1					1			1									1	1		1																	1		1	1		
L95R3			1		1				1			1					1			1									1	1		1						1												1		1	1	
L95R4			1		1				1			1					1			1									1	1		1																		1		1	1	
L95R5			1		1				1			1					1			1									1	1		1						?												1		1	1	
L96R1	3x	1			1				1			1					1			1								1		1	1	1		1														1		1				
L96R2	3x	1			1				1			1					1			1								1		1	1	1		1															1		1			
L96R3	3x	1			1				1			1					1			1								1		1	1	1		1																1		1		
L96R4	3x	1			1				1			1					1			1								1		1	1	1		1																1		1		

marker	ploïdie	AC1					AG3					TGA7					TTC8					TG12					Pt12cp		Pt04																								
		307	309	313	315	317	319	321	374	380	382	384	386	388	390	392	167	170	173	176	179	182	185	188	191	297	300	303	306	309	312	191	193	195	197	199	201	203	205	206	208	210	212	379	383	389	231	233					
L96R5	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1								1		1							
L96R6	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1										1		1					
L96R7	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R8	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R9	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R10	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R11	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R12	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R13	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R14	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R15	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R16	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1											1		1				
L96R17				1		1					1			1		1			1							1	1		1			1						1							1		1		1				
L96R18	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1										1		1		1			
L96R19				1		1					1			1		1			1							1	1		1				1												1		1		1				
L96R20	3x	1		1				1			1					1			1							1	1	1	1		1				1	1										1		1		1			
L97R1			1			1					1			1				1								1	1	1		1				1											1		1		1				
L97R2			1			1					1			1				1								1	1	1		1				1												1		1		1			
L97R3			1								1								1							1	1						1														1		1		1		
L97R4			1			1					1			1					1							1	1	1		1				1													1		1		1		
L97R5			1		1						1			1					1								1	1		1																	1			1		1	
L97R6			1		1						1			1					1								1	1		1																		1		1		1	
L97R7			1								1					1			1							1	1	1		1																1		1		?	1		
L97R8	3x		1	1							1					1			1						?	1	1		1																	1		1		1			
L97R9	3x		1	1							1					1			1							?	1	1		1																?		1		?	1		
L97R10			1	1							1					1			1							1	1	1																		1		1		1			
L99R1	3x		?	1							1	1				1	1										1																			?		1		1			
L99R2	3x		1	1							1	1				1	1											1																			1		1		1		

marker		AC1							AG3					TGA7								TTC8						TG12								Pt12cp			Pt04													
lokality	ploidie	307	309	313	315	317	319	321	374	380	382	384	386	388	390	392	167	170	173	176	179	182	185	188	191	297	300	303	306	309	312	191	193	195	197	199	201	203	205	206	208	210	212	379	383	389	231	233				
L99R3	3x				1						1	1					1	1			1										1												1		?	?						
L99R4	3x				1						1	1					1	1			1											1													1		1					
L99R5		1			1					1		1					1			1																1			1						1		1					
L99R6		1			1					1		1					1			1								1	1							1				1						1		1				
L99R7		1			1					1		1					1			1							1	1								1				1						1		1				
L99R8		1			1					1		1					1			1							1	1								1				1						1		1				
L99R9		1			1					1		1					1			1							1	1					?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1		1	
L99R10		1	?		1					1		1					?	?	?	?	?	?	?	?	?		1									1				1							1		?	?		
L99R11		1	1		1					1		1					1			1							1	?					1			1				1						1		1				
L99R12			1								1	1					1			1							1						1								1					1		1		1		
L99R13	3x				1							1					1	1			1						1							1												1		?	?			
L99R14	3x				1						1	1					1	1			1						1							1			1									1		1				
L99R15	3x				1	1					1	1					1	1			1						1									1											1		1			
L99R16	3x				1	1					1	1					1	1			1						1											1									1		1			
L99R17		1			1					1		1					1			1							1	1									1				1						1		1			
L99R18	3x				1	1					1	1					1	1			1						1										1										1		1			
L99R19	3x				1	1					1	1					1	1			1						1																				1		1			
L99R20	3x				1	1					1	1					1	1			1						1	1																			1		1			
L99R21	3x				1	1					1	1					1	1			1						1																				1		1			
L99R22		?			1							1								1							1	1	1																	1		1				
L10R1					1	1					1		1				1			1			1			1		1	1																	1		1				
L10R2					1	1				?		1		1			1			1						1		1																			1		1			
L10R3	3x				1	1	1					1		1					1							?	1	1		1	1	?																1		1		
L10R4					1	1					?	?	1				1			1																			1		1						1		1			
L10R5					1	1					1	1								1									1								1	1									1		1			
L10R6	3x				1	1				?	?	?	?	?	?				1								1	?																			1		1	1		
L10R7	3x				1	1					1		1				1			1							1	1								1											1		1	1		
L10R8	3x				1	1					1						1			1							1		1	1	1							1									1		1	1		

marker		AC1						AG3						TGA7						TTC8						TG12						Pt12cp		Pt04																		
lokality	plodie	307	309	313	315	317	319	321	374	380	382	384	386	388	390	392	167	170	173	176	179	182	185	188	191	297	300	303	306	309	312	191	193	195	197	199	201	203	205	206	208	210	212	379	383	389	231	233				
L10R9	3x		1		1				?	?	?	?	?	?	?	1			1			1					1	1	1	1		1	?	?	1								1		1	1						
L10R10	3x		1		1						1		1						1				1				1	?	?	?	?	1	1		?	1								1				1				
L102R2	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																1			1	1			
L102R3	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																	1			1	1		
L102R4	3x	?	?	?	?	?	?	?			1		1						1				1				1	1	1																	1			1	1		
L102R5	3x			1	1		1				1		1						1				1				?	1	1																	1			1	1		
L102R6	3x			1	1		?				1		1						1				1				1	1	1																	1			1	1		
L102R7	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R8	3x			1	1		?				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R9	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R10	3x			1	1						1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R11	3x						1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R12	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R13	3x			?	1		?				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R14	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R15	3x			1			1				1		1						1				1				1	1	1																			1			1	1
L102R16			1				1		1		1		1						1				1				1	1	1																	1				1		
L102R17			1				1		1		1		1						1				1				1	1	1																		1				1	
L102R18			1				1		1		1		1						1				1				1	1	1																		1				1	
L102R19			1				1		1		1		1						1				1				1	1	1																		1				1	
L102R20	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R21	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R22	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R23	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R24	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R25	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R26	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	
L102R27	3x			1	1		1				1		1						1				1				1	1	1																		1			1	1	

marker		AC1						AG3						TGA7							TTC8						TG12						Pt12cp			Pt04																								
lokality	plodie	307	309	313	315	317	319	321	374	380	382	384	386	388	390	392	167	170	173	176	179	182	185	188	191	297	300	303	306	309	312	191	193	195	197	199	201	203	205	206	208	210	212	379	383	389	231	233												
L102R28	3x			1	1		1				1		1						1			1					1	1	1	1	1												1			1	1													
L102R29	3x			1	1		1				1		1						1			1						1	1	1		1	1											1			1	1												
L102R30					1		1				1		1							1			1					1		1	1	1	1												1			1												
L102R31					1		1				1		1							1			1					1		1	1	1	1													1			1											
L9R1				1			1				1									1								1				1														1			1											
L9R2				1	1						1						1		1	1								1	1	1		1													?			1			1									
L9R3				1	1						1						1		1	1								1	1	1		1														?			1			1								
L9R4			1				1				1		1		1					1								1		1	1		1		1														1			1								
L9R5			1	1			?				1									1									1		1		1	1																1			1							
L9R6	3x		1	1						?	?	?	?	?	?	?	1											1			1									1	1									1			1							
L9R7	3x		1	1	1					?	?	?	?	?	?	?				1								1																				?			1			1						
L9R8	3x		1	1	1						1								1		1								1				1		1																1			1						
L9R9	3x		1	1	1					?	?	?	?	?	?	?				1		1						1			1																			?			1			1				
L9R10	3x		1	1	1						1								1		1							1		1		?																				1			1					
L103R2	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																				1			1						
L103R3	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																					1			1					
L103R4	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																						1			1				
L103R5	3x		1		1						1	1							1		1							1			1																					1			1					
L103R6	3x		1		1						1	1							1		1							1			1																			?			1			1				
L103R7	3x		1		1						1	1							1		1							1			1																					?			1			1		
L103R8	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																							1			1			
L103R9	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																						1			1				
L103R10	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																							1			1			
L103R11	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																						?			1			1	
L103R12	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																						1			1				
L103R13	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																							1			1			
L103R14	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																							1			1			
L103R15	3x		1	1	1						1	1							1		1							1			1																							1			1			

marker		AC1							AG3							TGA7							TTC8							TG12							Pt12cp			Pt04										
lokalita	ploidie	307	309	313	315	317	319	321	374	380	382	384	386	388	390	392	167	170	173	176	179	182	185	188	191	297	300	303	306	309	312	191	193	195	197	199	201	203	205	206	208	210	212	379	383	389	231	233		
L103R16	3x		1	1	1						1	1				1			1							1			1			1	1										1		1	?				
L103R17	3x		1	1	1						1	1				1			1							1			1			1	1										1		1					
L103R18	3x		1	1	1						1	1				1			1							1			1			1	1										1		1					
L103R19	3x		1	1	1						1	1				1			1							1			1			1	1										1		1					
L103R20	3x		1	1	1						1	1				1			1							1			1			1	1										1		1					
L103R21	3x		1	1	1						?	1				1			1							1			1			1	1									1		1						
L103R22				1	1				1			1				1			1							1		1	1		1																			
L103R23				1	1				1			1				1			1							1		1	1		1																			
L103R24				1	1				1			1				1			1							1		1	1		1																			
L103R25				1	1				1			1				1			1							1		1	1		1																			
L103R26				1	1				1			1				1			1							1		1	1		1																			
L103R27				1	1				1			1	1	1		1			1							1		1	1		1																			
L103R28				1	1				1			1				1			1							1		1	1		1																			
L103R29				1	1				1			1				1			1							1		1	1		1																			
L103R30				1	1				1			1				1			1							1		1	1		1																			
L103R31				1	1				1			1				1			1							1		1	1		1																			