

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA EKOLOGIE

Populačně genetická struktura, genetická diverzita
a historie druhu *Amenone sylvestris* (*Ranunculaceae*)
detekovaná pomocí analýzy mikrosatelitových dat

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Diplomant: Bc. Eliška Halbichová

2019



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Autorka práce: Bc. Eliška Halbichová
Studijní program: Inženýrská ekologie
Obor: Ochrana přírody
Vedoucí práce: prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.
Garantující pracoviště: Katedra ekologie
Jazyk práce: Čeština
- Název práce: **Populačně genetická struktura, genetická diverzita a historie druhu *Anemone sylvestris* (*Ranunculaceae*) detekovaná pomocí analýzy mikrosatelitových dat**
- Název anglicky: **Population genetic structure, genetic diversity and natural history of *Anemone sylvestris* (*Ranunculaceae*) inferred from nuclear microsatellite data**
- Cíle práce: Diplomová práce bude zaměřena na vzácný druh sasanku lesní (*Anemone sylvestris*). *Anemone sylvestris* je druhem výslunných xerotermních strání, lesních lemů a světlin převážně na vápenci. Přestože v minulosti byla v některých oblastech poměrně hojná, dnes je na území ČR druhem vzácným. Cílem diplomové práce bude popsat populačně-genetickou strukturu populací *Anemone sylvestris* na území ČR pomocí analýzy variability mikrosatelitových markerů. Sbírány budou rostliny z celého území ČR tak, aby bylo možné (1) ukázat jakým způsobem jsou populace tohoto druhu na území ČR strukturované, (2) do jaké míry probíhá mezi jednotlivými populacemi genetický tok, (3) z kolika zdrojových populací pocházejí současné populace tohoto druhu v ČR a (4) z jakých oblastí jsou odvozené populace vyskytující se mimo hlavní oblasti rozšíření sasanky lesní v ČR.
- Metodika: Ke studiu populačně genetické struktury budou využity vysoce variabilní mikrosatelitové markery, které byly pro tento druh vyvinuty v naší laboratoři. Předpokládáme, že analýza bude provedena na cca 15 lokalitách na území ČR. Na každé lokalitě budou odebrány vzorky z minimálně 20 rostlin, ty budou uskladněny v silikagelu, převezeny do laboratoře, kde z nich bude vyizolována DNA a vzorky následně vyšetřeny na variabilitu v mikrosatelitových markerech.
- Doporučený rozsah práce: 60 stran
- Klíčová slova: *Anemone sylvestris*, fylogeografie, ochránářská genetika, mikrosatelity, genetická diverzita
- Doporučené zdroje informací:
1. Avise J. C. 2001. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Mass.: Harvard University Press. ISBN 0674666380
 2. Beebee T. J. C. & Rowe G. 2004. An introduction to molecular ecology. 1st pub. New York: Oxford University Press. ISBN 0199248575.
 3. Freeland J. 2005. Molecular ecology. Chichester: John Wiley & Sons. ISBN 0470090626.
 4. Hartl D. L. & Clark A. G. 2007. Principles of population genetics. 4th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. ISBN 9780878933082.

Předběžný termín obhajoby: 2018/19 LS - FŽP

Elektronicky schváleno: 28. 3. 2018
doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.
Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno: 28. 3. 2018
prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.
Děkan

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. Mgr. Bohumila Mandáka, Ph.D. Další informace mi poskytli Ing. Kateřina Machynková a Mgr. Karol Krak, Ph.D. A že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

Prohlašuji, že tištěná verze se shoduje s verzí odevzdanou přes Univerzitní informační systém.

V Praze

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. Mgr. Bohumilu Mandákovi, Ph.D. za možnost zpracovávat pro mě velmi zajímavé téma, za jeho nápomocnou ruku zejména při statistickém vyhodnocování dat a ochotné řešení vzniklých problémů. Nemenší dík patří Ing. Kateřině Machynkové, která mi byla velmi nápomocná při všech laboratorních analýzách, a Mgr. Karolu Krakovi, Ph.D., s nímž byly konzultovány vzniklé nejasnosti. Velké poděkování patří rovněž všem zaměstnancům AOPK, oblastních muzeí a magistrátů, zejména Ing. Radimu Pauličovi, kteří mi velmi ochotně poskytli tipy na lokality výskytu sasanky lesní. Bez nich by práce zůstala jen ve fázi zadání. Velký dík patří mojí rodině, zejména babičkám a dědečkům, kteří ochotně hlídali vnoučata, mému tatínkovi také za korektury a kamarádce Janě Procházkové za pomoc s mapkami. Největší dík patří mým malým dvojčatům Matějovi a Vítovi, že vše skvěle zvládali a jezdili se mnou na lokality sběru a mému muži Honzovi, který se mnou ochotně vyrážel do terénu a staral se o děti, když jsem pracovala v laboratoři a psala práci.

V Praze

Abstrakt

Práce se zaměřuje na ohrožený druh sasanku lesní *Anemone sylvestris*. *Anemone sylvestris* je druhem suchých trávníků a prosvětlených lesních lemů, v současnosti velmi ohrožených stanovišť. Pro účinná ochranná opatření je nezbytná znalost genetické diverzity populací. Cílem práce je proto popsat populačně-genetickou strukturu tohoto druhu na území České republiky, včetně stanovení míry příbuznosti jednotlivých populací a jejich potenciálního genetického původu. Všechny tyto charakteristiky byly stanoveny pomocí mikrosatelitových DNA markerů.

Prostřednictvím molekulárních analýz bylo ukázáno, že populace v České republice jsou ve srovnání se zahraničními populacemi velmi geneticky chudé. Zároveň jsou však navzájem výrazně odlišné, a tedy nedochází zde k žádné nebo velmi malé výměně genů mezi populacemi. Především v populacích v České republice hraje významnou roli vegetativní rozmnožování, které umožnilo fixaci převážné části lokusů v heterozygotní podobě a zamezilo tak absolutní ztrátě genetické diverzity vlivem genetického driftu. Zároveň naprostá převaha jediného klonálního genotypu vlivem kompetice v každé populaci ještě více posílila vzájemnou odlišnost i velmi geograficky blízkých populací. Téměř každá populace je tak tvořena samostatnou genetickou linií.

Naprostá odlišnost populací spolu se zcela náhodnou fixací alel v populacích jsou pravděpodobně pozůstatky velké genetické diverzity původně velké populace *Anemone sylvestris* v minulosti. Její jednotlivé části byly fixovány právě prostřednictvím klonů.

Klíčová slova: *Anemone sylvestris*, ohrožený druh, populační struktura, genetická diverzita, klonalita, mikrosatelity.

Abstract

This thesis focuses on an endangered species of *Anemone sylvestris*. *Anemone sylvestris* is found in dry grasslands and bright woodland edges, both of which are currently at high risk. Knowledge of genetic diversity of populations is essential for the application of effective conservation measures. The aim of this thesis is to describe the population-genetic structure of this species in the Czech Republic, including the determination of the degree of affinity of individual populations and their potential genetic origin. All of these characteristics were determined by microsatellite DNA markers.

Molecular analyses have shown that populations in the Czech Republic are genetically poor in comparison to foreign populations. At the same time they are entirely different from each other and therefore there is no or very little gene flow between populations. Particularly in populations in the Czech Republic, vegetative reproduction plays an important role, allowing the majority of loci to be fixed in heterozygous form, thus preventing the complete loss of genetic diversity due to genetic drift. Simultaneously, an overwhelming dominance of the single clonal genotype due to competition in each population has reinforced the distinction between geographically close populations. Thus almost every population is a separate genetic line.

The vast diversity of populations along with the random allele fixation in populations are probably the remnants of the great genetic diversity of the large *Anemone sylvestris* population in the past. Its individual parts were fixed by clones.

Key words: *Anemone sylvestris*, rare species, population structure, genetic diversity, clonality, microsatellites.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Historie vývoje otevřené krajiny.....	2
1.1.1 Eemský interglaciál.....	2
1.1.2 Würmský glaciál.....	3
1.1.3 Holocén	7
1.1.4 Role člověka ve formování postglaciální krajiny	9
1.1.5 Vývoj stepních lokalit a šíření stepních druhů	11
1.2 Ohrožení a ochrana stepních a lučních společenstev	13
1.3 Modelový druh <i>Anemone sylvestris</i>	15
1.3.1 Popis.....	15
1.3.2 Ekologie	17
1.3.3 Rozšíření	17
1.3.4 Ochrana druhu	18
1.3.5 Ohrožení a management.....	18
1.4 Molekulární markery v ochraně přírody	21
1.4.1 Ohrožení populací.....	21
1.4.2 Jednotky ochrany	23
1.4.3 Molekulární markery	24
1.5 Cíle práce.....	28
2. Metodika	29
2.1 Sběr vzorků	29
2.2 Molekulární analýzy.....	37
2.2.1 Izolace DNA.....	38
2.2.2 PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů.....	40
2.3 Analýza molekulárních dat.....	43
2.3.1 Analýza mikrosatelitových dat	43
2.4 Vyhodnocení molekulárních dat.....	48
2.4.1 Základní populačně-genetické charakteristiky	48
2.4.2 Klonální struktura uvnitř populací.....	49
2.4.3 Prostorová struktura populací.....	49
2.4.4 Kryptická struktura populací	52
3. Výsledky	54

3.1	Základní populačně-genetické charakteristiky	54
3.2	Klonální struktura uvnitř populací	62
3.3	Prostorová struktura populací.....	65
3.3.1	Analýza molekulární variance	65
3.3.2	Genetický tok a analýza hlavních koordinát (PCoA)	66
3.3.3	Izolace vzdáleností.....	73
3.4	Kryptická struktura populací.....	74
4.	Diskuze	81
4.1	Základní populačně-genetické charakteristiky	81
4.2	Klonální struktura uvnitř populací	83
4.3	Prostorová struktura populací.....	86
4.3.1	Analýza molekulární variance	86
4.3.2	Genetický tok a analýza hlavních koordinát PCoA.....	87
4.3.3	Izolace vzdáleností.....	89
4.4	Kryptická struktura populací.....	89
5.	Závěr	94
6.	Literatura.....	96
7.	Přílohy	106
7.1	Příloha č. 1.....	106

1. Úvod

Stepní a luční společenstva reprezentují převážnou část primárního a sekundárního bezlesí středoevropské krajiny. Jedná se přitom o společenstva velmi druhově bohatá s vysokou mírou diverzity jak rostlin, tak živočichů (Denisow & Wrzesień 2015). Tyto lokality jsou útočištěm většiny xerothermních druhů, které často nebývají vázány tak pevně na vyšší teploty, jako spíše na otevřená stanoviště s dostatkem světla. Zde jsou schopny tolerovat nízké úhrny srážek. V současnosti jsou tato společenstva ohrožena mnoha faktory, a to jak postupující sukcesí a tím vzrůstajícím zástínem keřů a dřevin, tak nevhodnými způsoby využívání krajiny a ústupem od tradičního způsobu hospodaření. Postupující sekundární sukcese a stále se zvyšující fragmentace krajiny rozděluje větší populace do malých vzájemně izolovaných nepočtených populací s vyšším rizikem extinkce a dlouhou dobou obnovy (Bornkamm 2006). Ochrana těchto biotopů se stává klíčovou pro udržení vysoké biodiverzity jinak původně přirozeně lesnaté krajiny (Cremene et al. 2005).

Pro smysluplné zacílení ochrannářských snah na celá společenstva, ale i konkrétní druhy, je nezbytná znalost jak populačně genetické struktury těchto druhů, tak především historie vývoje populací a druhů samotných. Pohled do historie vzniku, existence a postupného vývoje celých společenstev poskytuje představu o nutnosti aktivního přístupu k managementu těchto lokalit a klíčové roli působení člověka v holocenním vývoji krajiny (Hejzman et al. 2013; Ložek 1973).

1.1 Historie vývoje otevřené krajiny

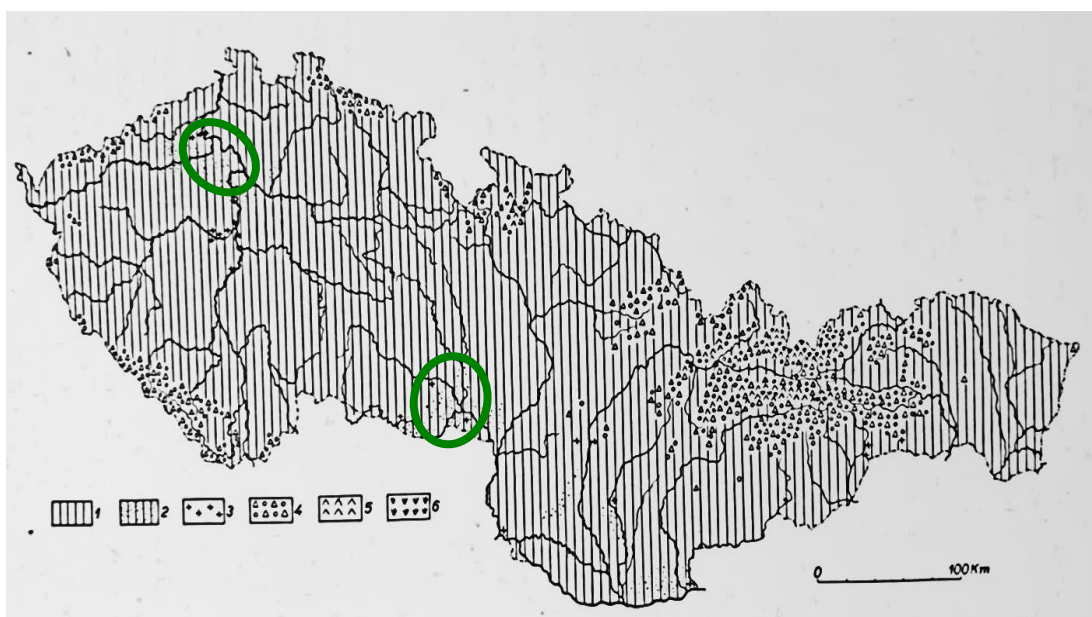
Tvář středoevropské krajiny předurčují především lesy. Jejich existence a rekonstrukce šíření v teplejších obdobích a naopak ústup do mikroklimaticky příhodnějších stanovišť v chladných výkyvech byla dlouhou dobu středem zájmu (Magri et al. 2006; Petit et al. 2002). O refugiích stepních druhů a jejich šíření je známo však velmi málo. Problematika je patrně o to složitější, že si pod stepním druhem můžeme představit jak druhy vázané na teplé podnebí, tak druhy snášející drsné kontinentální klima (Listl et al. 2017; Schmitt & Varga 2012). Společným jmenovatelem těchto druhů je tolerance k nedostatku či fluktuaci srážek a často k dalším extrémním podmínkám (velké výkyvy teplot, nedostatečně vyvinuté půdy, extrémní oslunění stanovišť, zasolení, a dalších). S tímto se pojí i schopnost obývat otevřená stanoviště či přímo vazba na bezlesí díky slabé konkurenceschopnosti (Ložek 2004). Každá z uvedených skupin stepních druhů by tak měla jiný vzorec šíření a jiné možnosti přečkání poslední doby ledové.

Kde a jak tedy tyto druhy přečkávaly uplynulé klimatické změny a nakolik a v jaké míře je jejich výskyt dnes přirozený zůstává otázkou. Odpověď je možné nalézt pomocí analýzy fosilních zbytků. Problémem však je různá vypovídací hodnota. Zatímco pyl se zachovává převážně v kyselém a vlhkém prostředí rašelinišť vyšších poloh, schránky měkkýšů a kosti obratlovců jsou dobře konzervovány ve vápnatých sedimentech suchých oblastí nížin. Navíc pyl šířený větrem pokryje daleko větší krajinnou plochu, než je skutečná rozloha míst, kde se daný druh vyskytuje. Pylový záznam tak odpovídá výskytu převládajícího společenstva v krajině (Chytrý et al. 2010b).

1.1.1 Eemský interglaciál

Pohled do poslední doby meziledové před více než 100 000 lety poskytuje dobrou představu o pravděpodobném vývoji vegetace holocenní krajiny bez vlivu člověka. Přestože bylo klima přibližně o 5°C teplejší než v Holocénu, dominoval středoevropskému prostoru les, a to i v nejteplejších suchých oblastech. Ač v tomto období hojně žili velcí býložravci neohrožení člověkem, kteří mohli udržovat otevřenou parkovitou krajinu, podmínky pro sekundární sukcesí, a tím rozvoj lesa, byly natolik vhodné, že došlo k zatlačení xerothermních druhů do suchých teplých stanovišť extrémních poloh. Jednalo se o velmi omezená místa ploškovitého

charakteru jižně orientovaných skal a vrcholových hran (viz obr. 1.1) (Ložek 2011). Pro řadu druhů kontinentálních stepí představovala tato stanoviště interglaciální refugia, z nichž se mohly v následujícím glaciálu šířit (Bennett & Provan 2008). Na druhou stranu druhy vázané na teplé podmínky čekal v glaciálu přesun do refugií v oblasti mediteránu stejně tak jako druhy lesní (Listl et al. 2017; Magri et al. 2006; Petit et al. 2002; Urbaniak et al. 2018).



Obr. 1.1: Území České a Slovenské republiky v období vrcholného Eemského interglaciálu (převzato z Ložek 1973). Z mapky je patrná naprostá dominance teplých smíšených lesů (svislé šrafování). Zelená barva vyznačuje jediné okrsky s výskytem lesa s drobnými stepními ostrůvky a okrsky skalních stepí, tedy refugia stepních druhů během interglaciální sekundární sukcese s naprostou dominancí a expanzí dřevin.

Legenda: 1 – teplé smíšené lesy, 2 – les s drobnými stepními ostrůvky, 3 – okrsky skalních stepí, 4 - smíšené horské lesy, 5 – horské jehličnaté lesy, 6 – alpské hole.

1.1.2 Würmský glaciál

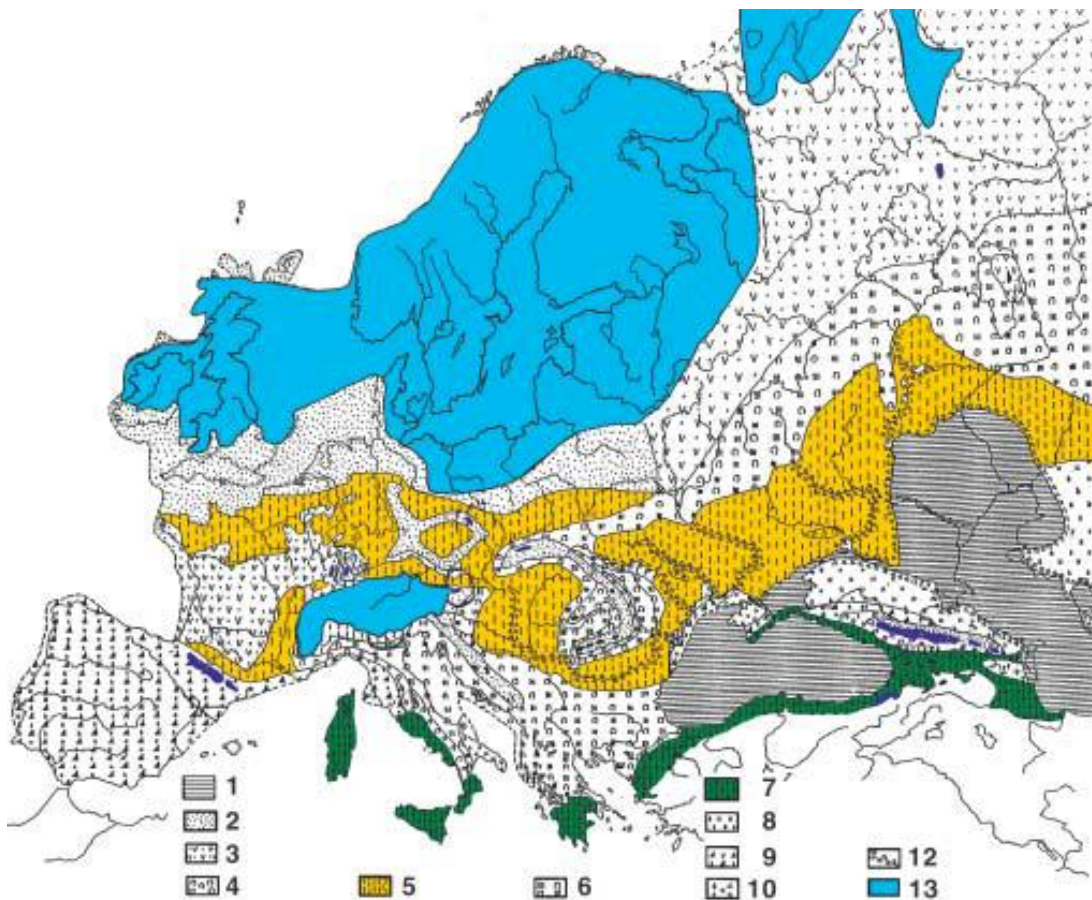
Pro počátek poslední doby ledové přibližně před 110 000 lety je charakteristické postupné ochlazování a vysoušení s několika teplejšími výkyvy. Nastupující drsně kontinentální suché klima s velkými rozdíly zimních a letních teplot, ochlazením až o 14°C a krátkou vegetační dobou, výrazně omezuje výskyt keřů a stromů a krajina se začíná otevírat (Pokorný et al. 2014; Taberlet et al. 1998). V teplejších obdobích se objevuje kontinentální černozemní step typická pro dnešní oblast Uralu. Ta přechází spolu s nástupem vrcholného glaciálu a největšího ochlazení ve sprašovou step (Ložek 2011).

Většina lesních druhů vyžadujících vlhko a teplo se stáhla do jižních glaciálních refugií – Iberského, Balkánského a Apeninského (Magri et al. 2006; Petit et al. 2002; Taberlet et al. 1998; Urbaniak et al. 2018). Ve střední Evropě však existovala i kryptická refugia. Místa, kde lokální příznivé mikroklima umožňovalo existenci drobných zalesněných enkláv, které potom sloužily jako zdrojové (spolu s jižními refugii) při kolonizaci během teplých období (Juříčková et al. 2014; Magri et al. 2006; Stewart et al. 2009). Kryptická refugia potom mohla zásadně ovlivnit rychlost holocenní migrace dřevin do otevřených stanovišť. Šíření řady těchto druhů, především dřevin, je hojně studováno a jednotlivé migrační trasy a hybridní zóny jsou dobře známé (Hewitt 1999).

Kolik stepních druhů však bylo schopno existovat v drsných podmínkách sprašové stepi, však není dosud známo. Některé druhy se stáhly k jihu podobně jako druhy lesní, tak tomu bylo např. u *Sedum album* (Listl et al. 2017). Existují však analogie ke glaciální krajině, které v současnosti ukazují na možnost existence a velkého rozšíření stepních druhů právě v glaciální sprašové stepi. Taková společenstva lze nalézt v současnosti v horské soustavě Altaje a Sajanu na jižní Sibiři (Chytrý et al. 2010b). Společenstva zde pravděpodobně existují kontinuálně od doby ledové, kdy byla pohoří zaledněná, ale podhorské oblasti zůstaly nezaledněné (Chytrý et al. 2010b). Stepní druhy se současným těžištěm výskytu na jižní Sibiři a typické pro kontinentální stepi, tak mohly docela dobře nejen setrvávat v glaciální krajině, ale se i velmi dobře na sprašové stepi šířit (Roleček et al. 2014).

Sprašová step byla specifickým ekosystémem nejnižších poloh do 350 někdy i 400 m n. m. (viz obr. 1.2) (Ložek 2010). Průměrné roční teploty se zde pohybovaly pod bodem mrazu, ale v krátkém létě mohly být teploty srovnatelné s dnešními (Ložek 2010). Vzhledem ke specifickým vlastnostem spraší, které sice daly základ současným černozemním půdám a stepním společenstvům, je složité usuzovat na jejich druhovou skladbu. Spraš si lze představit jako surové půdy s dostatkem dostupných živin a velkým obsahem uhličitanu vápenatého, kde se usazoval navátý materiál v řídké, bylinami bohaté, stepní vegetaci (Chuman 2013; Ložek 2004). V současnosti jsou takové ekosystémy pozorovatelné jen ve zmíněných jiho-Sibiřských analogiích (Chytrý et al. 2010b). Jednalo se často o velmi nesourodou kombinaci druhů s často protichůdnými nároky na teplotu a vlhkost,

typická pro ně byla pouze vazba na bezlesí či schopnost v něm přežít (Ložek 2010).

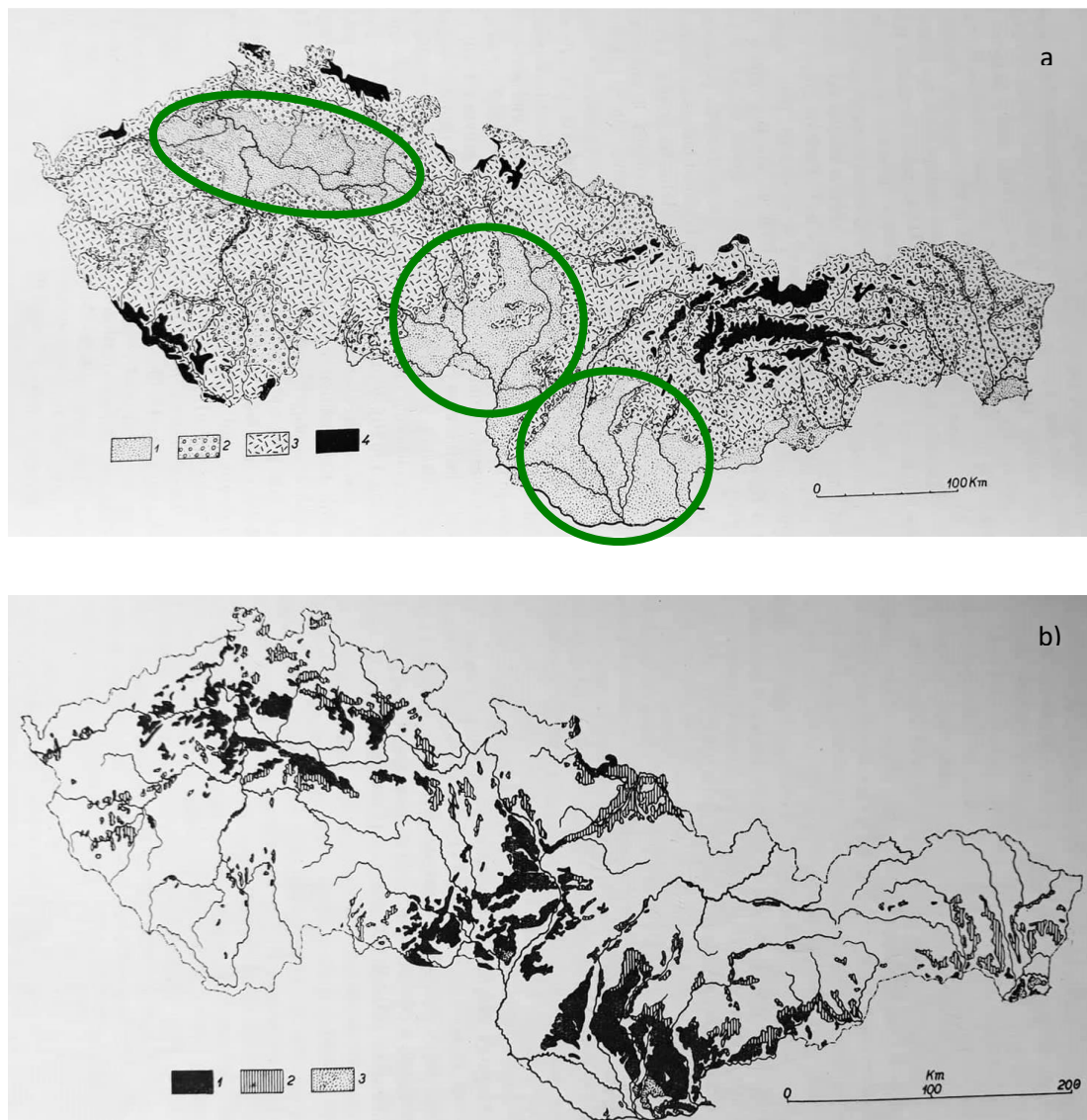


Obr. 1.2: Vegetační mapa Evropy posledního vrcholného glaciálního zalednění. Ukazuje pás sprašové stepi (žlutá barva), nejvýznamnější biot periglaciální oblasti (převzato z Ložek 2004).

Legenda: 1 – jezera a vnitrozemská moře, 2 – převážně keříčková tundra, 3 – subarktické stepi s tundrovými společenstvy, 4 – parková tundra s křovinami a stepními okrsky, 5 – sprašová step, 6 - lesostep až lesotundra, 7 – přímořský smíšený les, 8 – step, většinou s tvorbou sraše, 9 – lesostep, 10 – poušť, 12 – galeriové lesy, 13 ledovce.

Území České republiky se v historickém kontextu rozšíření sraší a poloze mezi severským pevninským zaledněním a jižním alpským ledovcem jeví jako velmi unikátní (viz obr. 1.3) (Chuman 2013). Poskytovalo totiž kryptická glaciální refugia jak lesním druhům (Willis & Andel 2004), tak teplomilným stepním druhům jako je např. *Sedum album* (Listl et al. 2017; Schmitt & Varga 2012). Jisté tedy je, že se na našem území vyskytovaly stepní druhy, pro něž byly podmínky sprašové stepi ideální a mohly se tedy velmi dobře šířit, spolu s teplomilnějšími stepními druhy, které zde obývaly pouze omezené mikroklimaticky příhodné oblasti. Ty jim sloužily

jako takzvaná kryptická refugia, z nichž se mohly při oteplení na konci glaciálu úspěšně hojně šířit (Schmitt & Varga 2012).



Obr. 1.3: a) Území České a Slovenské republiky v období posledního vrcholného glaciálu. Členění je oproti současným poznatkům zavádějící (již existují doklady o setrvání některých dřevin ve středoevropském prostoru), avšak dobře poslouží pro ilustraci rozšíření sprášových stepí (znázorněny zeleně), izolovanosti české části a dobré konektivity jihomoravské oblasti s oblastí panonských stepí (převzato z Ložek 1973).

Legenda: 1 – sprášová step, 2 – sprášová tundra, 3 – horská kamenitá tundra, 4 – mrazové pustiny

b) Rozložení spraší (1) a příbuzných uloženin (vápnité a sprašové písky, 2 a 3) dobře korespondující s rozložením sprášových stepních lokalit v období holocénu, ale i se současnou distribucí stepí a suchých luk (převzato z Ložek 1973).

Stručně lze tedy říci, že měla krajina v době ledové podobu stepo-tundry s velmi heterogenní mozaikou různých stanovišť. Jejich zastoupení bylo ovlivněno dostupnou vlhkostí, která umožňovala růst odolných stromů a keřů. Ve vyšších

srážkových oblastech se jednalo o lesotundru s borovicí limbou a smrkem, nižší a sušší oblasti pokrývala lesostep s modřínem a borovicí lesní a plynule přecházela ve sprašovou step s nejextrémnějšími podmínkami a řadou druhů vázaných na bezlesí. V nejmraznějších výkyvech došlo k zatlačení lesa do malých ploch např. říčních niv divočících toků s příznivým mikroklimatem stejně tak jako přesunu teplomilných druhů do menších mikroklimaticky vhodných lokalit (Chytrý et al. 2010b; List et al. 2017). Na druhou stranu v teplejších a vlhčích výkyvech docházelo k propojování jednotlivých fragmentů lesní vegetace (Horsák & Chytrý 2010). Díky této pestré mozaice a téměř chybějícímu sněhovému pokryvu, umožňujícímu zimní pastvu, mohla žít v krajině společenstva velkých býložravců (Chytrý et al. 2018).

1.1.3 Holocén

Koncem pozdního glaciálu a začátkem Holocénu před 12 000 lety přechází sprašová step do stepí a praluk, počátečních biocenóz otevřené krajiny (Ložek 1973). V této době dosahují letní teploty vyššího maxima, než je tomu v současnosti, stále přetrvává výrazná sezonalita a navíc jsou srážky ještě poměrně nízké a půdní vlhkost také. Všechny tyto faktory vedou k maximální expanzi stepních společenstev a suchých luk (Feurdean et al. 2018). Zároveň se otevírá prostor pro rychlé šíření klimaticky náročnějších stepních druhů z refugií. Naopak dochází k ústupu některých vnitroasijských stepních prvků (Ložek 2010). V tomto období mohlo docházet i k propojení českých a moravských populací, kdy zalesnění teprve vzrůstalo a neizolovalo jednotlivé populace. Rostoucí teplota a úhrny srážek zároveň změnily sprašové stepi na černozemní step. Historická přítomnost spraší dodnes poskytuje vegetaci vápnitý substrát navzdory současné převaze okyselených půd (Hejcman et al. 2013; Ložek 2010). Louky a stepi s vysokým obsahem vápníku v půdě tak v současnosti vykazují neobyčejnou druhovou bohatost umocněnou stářím samotných společenstev (Hejcman et al. 2013).

Vyšší teploty a úhrny srážek na začátku Holocénu před 10 000 lety začínají podporovat migraci lesních druhů, která je urychlena přítomností kryptických refugií ve středoevropském prostoru (Juříčková et al. 2014; Magri et al. 2006; Stewart et al. 2009). Vzájemný poměr teploty a vlhkosti určoval podíl lesních a stepních ekosystémů (Ložek 1973). V první fázi Holocénu (Preboreál) dochází k ústupu prvků pozdního glaciálu a rozvoji březo-borových lesů, později s nástupem jilmu a lísky

(Hájek et al. 2015; Ložek 1973). Ochlazení a nárůst průměrných srážek v období středního Holocénu zvaného Atlantik, 9000 – 4500 tisíce let před naším letopočtem, vedou k výrazné expanzi lesa (Feurdean et al. 2018). Jedná se převážně o smíšené doubravy s jilmem a lípou, v okolí vodních toků se přidává olše (Ložek 1973).

Podobně jako v uplynulém interglaciálu má krajina tendence zarůstat lesem s drobnými enklávami bezlesí, které by se dle předešlého interglaciálního vývoje měly omezit na plošky výrazně extrémních stanovišť (Ložek 2011). Se vzrůstajícím zalesněním první fáze Holocénu došlo i k izolaci stepního bezlesí v České republice a to na část České kotliny, která se v tomto okamžiku stala izolovanou enklávou a část střední a jižní Moravy navazující na oblast Panonie a Vyškovskou a Moravskou bránou otevřenou do polských nížin (Ložek 1973). Sukcesi vedoucí směrem k zapojenému lesu na většině našeho území však výrazně zbrzdilo několik přírodních faktorů (Feurdean et al. 2018).

Za klíčový faktor pro udržení existence lučních a stepních společenstev jsou považováni velcí býložravci (Pokorný et al. 2015). Přestože na konci doby ledové vyhynuli hlavní zástupci tzv. megafauny jako mamut či srstnatý nosorožec, jejich roli přebrali velcí býložravci jako los, bizon, daněk či divoký kůň. Předpokládá se, že právě velcí býložravci dokázali udržet svým herbivorním tlakem více či méně rozvolněný krajinný pokryv, alespoň v níže položených sušších oblastech (Feurdean et al. 2018). Vyhynutí těchto savců vlivem člověka kolem 4000 let před naším letopočtem bylo následně nahrazeno pastvou domestikovaného dobytka. Z hlediska ochránářského je však nutné vzít v úvahu rozdílný způsob spásání odlišnými druhy domácí zvěře s ohledem na velikost těla, intenzitu a způsob spásání či selektivitu při pastvě (Tóth et al. 2016). Ne vždy je proto snadné simulovat tlak velkých herbivorů.

Ukazuje se však, že kromě velkých zvířat, měl významnou roli faktor přírodních požárů. Disturbance způsobené ohněm měly zásadní roli při zvyšování konkurenceschopnosti lučních a stepních společenstev před expandující dřevinnou vegetací (Feurdean et al. 2018).

Jak pastva, tak přírodní požáry umožňují existenci stepních a lučních společenstev i mimo plošky s extrémními podmínkami (skalnaté svahy, hrany a výchozy, zasolené či extrémně suché jižní svahy) v jinak expandující lesní vegetaci (Poschlod & Wallisdevries 2002). Tyto faktory umožňují vysvětlit současnou velkou

bohatost polo-přirozených luk. Je totiž těžko představitelné, že by se taková druhová bohatost uchovala a dokázala rozšířit pouze z omezeného množství izolovaných plošek (Feurdean et al. 2018; Pokorný & Chytrý 2015).

Nástup Atlantiku s příznivým klimatem pro expanzivní šíření dřevin (ochlazení a vyšší úhrn srážek) a maximální zapojení lesa se zdá být kritický a velmi dobře mohl vést k výraznému omezení stepních druhů na ploškovitá refugia, podobně jako tomu bylo v uplynulém interglaciálu. Jeho role omezila velikost populací řady stepních a lučních druhů a způsobila tak ztrátu jejich genetické diverzity (Bennett & Provan 2008). Zároveň k tomuto přispívá i začátek šíření buku, který vzhledem k opadu a zastínění umožňuje existenci pouze jarního aspektu bylin (Hájková et al. 2011). Ještě větší dopad měly podmínky na vápnomilné druhy. Větší množství srážek postupně vyplavovalo živiny a zásadité ionty z půd, což způsobilo jejich acidifikaci. Druhy náročné na živiny postupně začínaly nahrazovat druhy acidofilní (Hájková et al. 2011; Chuman 2013). Nejvýraznější „bottleneck“ pro středoevropské stepní druhy však do jisté míry dokázal zvrátit nástup neolitického osidlování krajiny spojený s počátky zemědělství, domestikací a pastvou dobytka (Feurdean et al. 2018; Hájková et al. 2011; Hejcman et al. 2013).

1.1.4 Role člověka ve formování postglaciální krajiny

Velmi diskutovaným tématem je podoba holocenní krajiny před začátkem neolitického osidlování, ve smyslu jakou krajinu měl neolitický člověk možnost osídlit. Právě ta totiž rozhoduje o tom, zda a v jaké podobě ranně holocenní stepní habitaty přežily kritické období atlantického „bottlenecku“, tedy maximálního zalesnění území (Pokorný et al. 2015). První možnou verzí je osidlování krajiny téměř výhradně porostlé lesem s bezlesím udržovaným na velmi omezených ploškách (Ložek 2011). Stepní druhy by v tomto případě z velké části z východu nově kolonizovaly zemědělstvím znovu otevřenou krajinu (Ložek 2011; Pokorný et al. 2015). Ve druhém scénáři osidluje neolitický zemědělec krajinu s různě velkými zbytky staroholocenních stepí, kde je bezlesí situováno především do nejsušších oblastí nížin (které jsou zároveň spjaty s vysokou intenzitou osídlení). Člověk si tedy pro osídlení vybírá již nezalesněné vhodné lokality, dosud udržované spolupůsobením požárů, tlaku velkých herbivorů a suššího mikroklimatu (Feurdean et al. 2018; Ložek; Pokorný et al. 2015). Fosilní nálezy podporují hypotézu druhou,

což odpovídá teorii, že vzhledem k aktuální druhové bohatosti lučních a stepních společenstev, nemohly být druhy v Atlantiku omezeny pouze na několik málo izolovaných bezlesých plošek (Feurdean et al. 2018; Pokorný et al. 2015). Zároveň tímto neolitičtí zemědělci zachránili velkou řadu původních stepních druhů před vymizením.

Ani lesní plochy však během osidlování nebyly tvořeny pouze uniformním zapojeným lesem. Lze si je představit jako mozaiku jednotlivých stadií regenerace lesa posílených mikroklimatickými odlišnostmi. Tímto vznikal kontrast mezi druhovým složením oblastí s bohatými srážkami a souvislým lesním pokryvem a suššími nížinami s otevřenou lesní vegetací s roztroušenými stepními trávničky (Pokorný et al. 2015). Spolu s nástupem prvního zemědělství a pastvy dobytka, které zpočátku díky nízké intenzitě pouze umožňovaly udržovat stávající nezalesněné plochy, napomáhaly rozšiřování bezlesí přírodní požáry. Ty zvětšovaly pastevní plochy a prostor pro pěstování plodin (Feurdean et al. 2018).

Vzhledem k tomu, že bylo osidlování situováno do oblasti nížin s otevřenými stepními lokalitami, je vysoce pravděpodobné, že holocenní kontinuita původních stepních a lučních společenstev (dříve udržovaná požáry a velkými býložravci) převládá právě v těchto oblastech. Vyšší nadmořské výšky s převážně zapojenými lesy, které umožňovaly existenci pouze stínomilných druhů, byly pravděpodobně kolonizovány ze vzdálenějších refugií, extrémních stanovišť a nížin. Což je upevněno i jejich pozdějším osidlováním v pozdním neolitu a době bronzové a až následným odlesněním (Hájková et al. 2011; Pokorný et al. 2015). Míra osídlení v době bronzové zároveň pokryla přibližné dnešní rozšíření polopřirozených luk sv. *Molinion*, jejichž současná druhová bohatost je důkazem dlouhodobé historie ve spojení s tradičním hospodářstvím (Hájková et al. 2011). Technologický pokrok doby bronzové a železné přinesl i možnost intenzivnějšího využití krajiny a jejího dalšího otevírání (Feurdean et al. 2018).

Poslední velké historické rozšíření bezlesí i ve vyšších nadmořských výškách proběhlo ve středověku (13. - 15. století) v rámci středověké kolonizace (Ložek 2004). Intenzivní využívání lesů pro dobytek a jako palivový zdroj přeměnilo husté zapojené lesy v prosvětlené lesy, které poskytovaly nová stanoviště pro část světlomilných druhů typických pouze pro bezlesí (Hájek et al. 2016; Hájková et al.

2011). V této době se formovala současná, na luční společenstva bohatá, krajina (Hájek et al. 2016).

Ještě do 19. století bylo bezlesí poměrně hojné, udržované zejména pastvou ovcí, koz a skotu či využíváním i velmi malých ploch k získávání píce (Ložek 2004). Tradiční hospodaření přinášelo nesporné výhody ve smyslu péče o drobná polička a louky s velkým počtem majitelů, kdy každý sklízel v jinou dobu a pouze částečně pro aktuální potřebu. To umožnilo existenci řady druhů s různou dobou kvetení. Industrializace a urbanizace na konci 19. století trávající až do současnosti však zcela změnila způsob využívání krajiny. Ustoupilo se od tradičního hospodaření, jako byla pastva a došlo k ustájení dobytka, zornování pastvin pro pěstování píce, zalesňování a celkové intenzifikaci využití bezlesých ploch (Hejcman et al. 2013). Pozdější nástup masivního hnojení, scelování polí, kontaminace bezlesých ploch nejen pesticidy, ale i přemírou živin vedoucí k zintenzivnění sekundární sukcese již jen prohloubila degradaci a ústup druhově bohatých stepních a lučních společenstev. Ta se omezila pouze na plochy nevhodné k orbě – vysoké meze, úvozy, strže a skalní výchozy (podobně jako tomu bylo s nástupem zalesnění v Atlantiku) (Ložek 2004). Otázkou je, zda druhy, které dokázaly překonat „bottleneck“ masivního zalesnění v období Atlantiku dokáží překonat i „bottleneck“, který jim přináší moderní intenzivní využití a fragmentace krajiny. Paradoxem zůstává, že to byl právě člověk, který v Atlantiku umožnil šíření a nárůst diverzity těchto druhů a v současnosti se stává hlavním faktorem omezujícím jejich výskyt.

1.1.5 Vývoj stepních lokalit a šíření stepních druhů

Vzhledem k uvedenému historickému vývoji krajiny je současné rozšíření stepních společenstev výsledkem několika možných scénářů. Stepní druhy kontinentálních stepí s těžištěm výskytu v oblasti jižní Sibíře se pravděpodobně mohly ve středoevropském prostoru hojně šířit v období posledního glaciálu, jak uvádí analogie na Altaji a Sajanech (Chytrý et al. 2010b). Druhy, pro něž nebyly podmínky poslední doby ledové vyhovující, se stáhly jak do jižních refugií či kryptických mikrorefugií v našem prostoru, typických pro druhy lesní, tak do východních refugií asijských stepí (Listl et al. 2017; Pokorný et al. 2015; Schmitt & Varga 2012). Expanze těchto druhů začala pravděpodobně v pozdním glaciálu a raném Holocénu, kdy se klima výrazně oteplilo a půdy byly živinami velmi bohaté (především velká

zásoba Ca díky glaciálním spraším), ale zároveň ještě nedošlo k masivní migraci dřevin z refugií. Od této chvíle docházelo k omezování stepních lokalit nastupujícím lesem směrem k období Atlantiku a šíření dalších druhů tak bylo velmi omezeno.

Výrazný „bottleneck“ pro stepní druhy v období Atlantiku ovlivnil genetickou skladbu přítomných velkých populací či došlo k ústupu či vymizení řady druhů, které tak velké populace neměly. Avšak míra ohrožení stepních druhů v tomto období je velice diskutabilní, vzhledem k perzistenci části bezlesí udržované býložravci a přírodními činiteli (Feuerdan et al. 2018). Po této izolaci bezlesí expandovalo společně s neolitickým osídlením člověkem, zemědělstvím a pastvou. Zároveň se opět otevřel prostor pro šíření nových druhů z východu spolu s postupným otevíráním krajiny a tedy i další možnou vlnu kolonizace a expanze druhů (Pokorný et al. 2015). Od tohoto období začíná dvoukolejný vývoj Holocénu, kdy v neosídlených územích pokračuje sukcese směrem k zapojeným lesním společenstvům, zatímco v trvale osídlených oblastech roste množství otevřených ploch s řadou starých holocenních populací stepních druhů (Hájková et al. 2011). Na plochách malých políček, extenzivních pastvin a úhorů dochází k rozšíření populací stepních druhů a případné možné migraci ze vzdálenějších míst (např. oblast jižní Moravy otevřená do panonských stepních oblastí a Moravskými branami do populací polských nížin) (Ložek 2011). V této době zároveň vznikají společenstva polopřirozených především pastevních luk přímo vázaná na člověka (Hájková et al. 2011).

1.2 Ohrožení a ochrana stepních a lučních společenstev

Současné bezlesé druhově bohaté plochy lze dělit na přirozená stepní společenstva na málo vyvinutých půdách perzistující po celé období Holocénu často na velmi extrémních stanovištích; původní primární luční společenstva na hlubších půdách udržovaná přírodními disturbancemi následně nahrazenými lidskou činností a polopřirozené extenzivně využívané louky vytvořené a udržované od doby neolitu člověkem (Feuerdan et al. 2018; Hejcman et al. 2013).

Ač stepi v minulosti existovali bez vlivu člověka i ve velmi lesnaté krajině, jejich současná existence již není zdaleka tak nezávislá. Vzhledem k hnojení půd a splachům z polí došlo k výraznému ovlivnění i živinami chudých lokalit a tím posílení zarůstání křovinami. Zároveň může rostoucí počet invazních druhů ovlivnit stávající společenstva. Dalším faktorem je fragmentace lokalit a tak zmenšení velikosti populací na často neživotaschopné celky ohrožené sebemenší klimatickou změnou či nemocí (Pokorný et al. 2015). Je zřejmé, že existence lučních a polopřirozených lučních společenstev je na člověka přímo vázaná vzhledem k nezbytnému udržování disturbancí, které zabraňují postupné sukcesi směrem k lesu (Hájková et al. 2011). Ve všech případech tedy hraje lidský faktor klíčovou roli v udržení a záchraně bezlesé krajiny včetně její druhové bohatosti a to jak v její ochraně, tak i v její degradaci.

Nezbytnost ochrany a péče o tato stanoviště je zakotvena i v soustavě Natura 2000, Směrnice č. 92/43/EHS ze dne 21. května 1992, Příloha č. I O ochraně přírodních stanovišť v zájmu společenství, kdy celým jedním velkým oddílem jsou vymezena právě přirozená a polopřirozená travinatá společenstva. Zde jsou uvedeny např. Panonské sprašové stepi zasahující na jižní Moravu či polopřirozená stanoviště na vápnitém podloží jako stanoviště vstavačovitých. Zmíněné jsou zároveň označeny jako prioritní typy přírodních stanovišť z hlediska ochrany.

Vzhledem k dlouhé době obnovy narušených či degradovaných stepních a lučních stanovišť s absencí managementu a nejvyšší druhové bohatosti právě nejstarších lokalit s historicky kontinuálním managementem, je zaměření ochrany na tyto stanoviště nezbytné (Bornkamm 2006; Hájková et al. 2011). Mezi takové nejbohatší evropské lokality patří suchá luční a stepní společenstva na vápnitých půdách (Hejcman et al. 2013). Pro udržení společenstev je důležitý nejen celkový

management lokalit, z něhož prosperuje více druhů najednou, ale i znalost stavu a historie rozšíření populací jednotlivých druhů. Jen tak může být management zacílen primárně právě na ty druhy a jejich populace, které jsou nejvíce ohroženy (Allendorf & Luikart 2007). Práce je zaměřena právě na druh ohrožených společenstev suchých a polosuchých trávníků sasanku lesní (*Anemone sylvestris*).

1.3 Modelový druh *Anemone sylvestris*

Anemone sylvestris L., sasanka lesní, náleží do čeledi *Ranunculaceae*. Rod *Anemone* zahrnuje desítky druhů, z nichž se v České republice vyskytují 4 druhy (běžné druhy *Anemone nemorosa* a *Anemone ranunculoides*, silně ohrožená *Anemone narcissiflora* a ohrožená *Anemone sylvestris*) spolu s kultivary šlechtěnými pro zahradnictví (Kubát 2002; Tutin et al. 1964).

1.3.1 Popis

Anemone sylvestris je vytrvalá jedovatá (obsah jedovatého protoanemoninu) klonální bylina. Vegetativní rozmnožování umožňuje silný šikmý oddenek. Rostlina je typická svou obvykle jednou nevětvenou 15 – 40 cm vysokou plstnatou lodyhou, která vyrůstá ze středu listové růžice. Dlanitě 5-ti dílné listy přizemní růžice jsou vyvinuty i za květu s dlouhými huňatými řapíky na bázi se rozšiřujícími v pochvu. Listeny jsou řapíkaté, podobné listům přizemní růžice složené v 3 – 4 čtném přeslenu na lodyze. Stonek obvykle nese jeden květ. Bílé květy jsou 5-ti čtné, mají 3 – 7 cm v průměru, vně jsou plstnaté a uvnitř lysé. Druh kvete od května do června v závislosti na klimatických podmínkách (teplé jaro může uspíšit dobu kvetení už na duben) (Hejný & Slavík 2003; Kubát 2002).

Opylení je zprostředkováváno jak větrem, tak hmyzem (vzhledem k absenci nektarií především brouky a dvoukřídlými) (Denisow et al. 2016). Rovněž je u druhu přítomna určitá míra autogamie závisící na vnějších podmínkách, zejména na počasí (Denisow et al. 2016). Příkladem může být uzavírání květů v případě příliš vysoké rychlosti větru, které způsobí samoopylení (Denisow et al. 2016). Produkce pylu není tak velká jako u jiných druhů rodu *Anemone* a je závislá na vnějších faktorech jako jsou míra zástinu křovinami, množství srážek a teplotní anomálie (Denisow et al. 2016). Plodem je souplodí hustě dlouze vlnatých nažek s krátkým zobánkem (viz obr. 1.4) (Hejný & Slavík 2003; Kubát 2002).

O míře vegetativního rozmnožování a jeho poměru vůči pohlavnímu rozmnožování (včetně poměru autogamie a alogamie a míry autoinkompatibility) nebyly dosud pro tento druh publikovány žádné práce s výjimkou zjištění, že autogamie u tohoto druhu existuje (Denisow et al. 2016). O jiných druzích rodu *Anemone* je toho v tomto smyslu známo mnohem více, například u *Anemone*

nemorosa byla studována jak míra autoinkompatibility, tak míra klonálního růstu a vzdálenosti odlišných genet (Holderegger et al. 1998; Müller et al. 2000; Stehlik & Holderegger 2000). Znalost těchto faktorů a především míra klonality je však klíčová. Variabilita investic do pohlavního či klonálního rozmnožování poskytuje ochranu před krátkodobou proměnlivostí podmínek, které by způsobily jinak lokální vyhynutí populace (Falk & Holsinger 1991).

Druh je diploidní ($2n=16$). Avšak vzhledem k polyploidnímu původu velkého množství druhů cévnatých rostlin a časté polyploidizaci v rámci druhů či mezidruhových kříženců nelze vyloučit existenci polyploidních populací v přírodě (Woodová et al. 2009). Tento proces by pravděpodobně umožnil efektivnější přežívání a šíření populací. Laboratorně indukovaná polyploidizace druhu vedla k tetraploidním rostlinám většího vzrůstu (i s větší listovou plochou), většími květy s více okvětními lístky a časnější dobou květu. Rovněž byly tetraploidní rostliny daleko odolnější vůči vnějším podmínkám a měly vyšší schopnost přežití do následující sezony, než diploidní jedinci (Zahumenická et al. 2018).



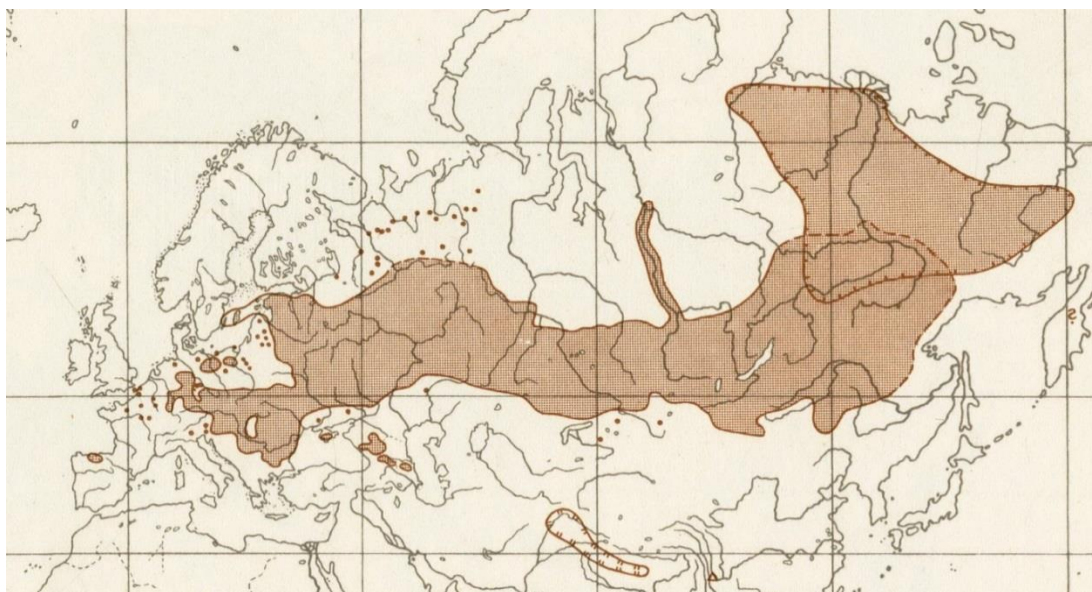
Obr. 1.4: *Anemone sylvestris* v době kvetení (obrázek vlevo), bezprostředně po dokvětu (obrázek uprostřed) a plodící s dlouze vlnatými nažkami (obrázek vpravo). Fotografie z terénního sběru.

1.3.2 Ekologie

Druh roste především na výslunných stráních v suchých širokolistých trávnících (zde je optimum výskytu), v trávnících skalních výchozů a porostech stepního charakteru, dále pak v suchých bylinných lemech a světlínách převážně teplomilných doubrav, lesostepních borech a místy i ve velmi světlých lesích a nízkých xerofilních křovinách s travinným podrostem (Hejný & Slavík 2003; Chytrý et al. 2010a). Kritická je pro něj především míra zastínění. Vyskytuje se na živinami chudších půdách s vápnitým podložím na suchých a světlých stanovištích. Naopak téměř chybí na vlhkých půdách. Roztroušeně se vyskytuje v oblastech nížin s velmi nízkými srážkami, ojediněle v podhůří vázaný pouze na vápence (Hejný & Slavík 2003; Kubát 2002; Pladias ©2014–2019). *Anemone sylvestris* je diagnostickým druhem pro pěchavové trávníky bílých strání (asociace *Cirsio pannonici-Seslerietum caeruleae*), prudké svahy s rozvolněným až zapojeným porostem pěchavy vápnomilné *Sesleria caerulea* (Chytrý et al. 2007).

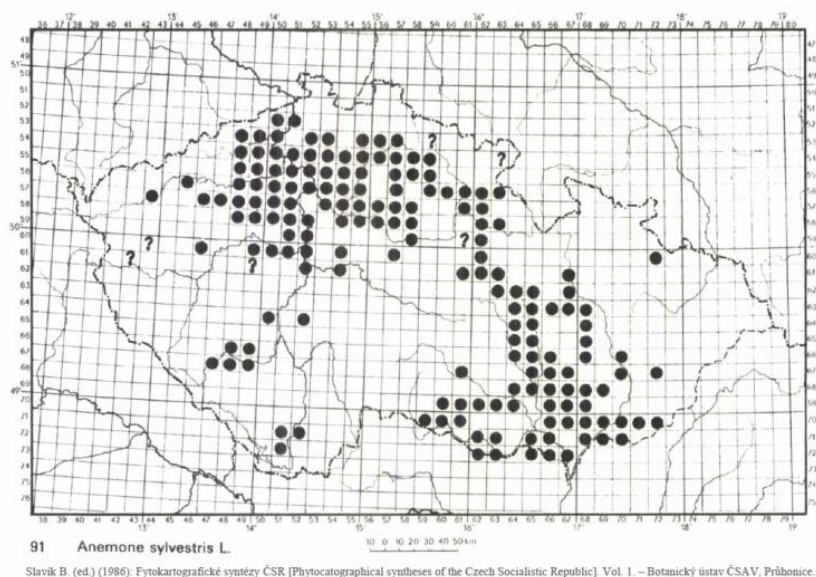
1.3.3 Rozšíření

Celkově je taxon rozšířen v mírných oblastech Asie a Evropy od středního Poamurí po Francii s těžištěm výskytu v chladných sibiřských stepích (viz obr. 1.7) (Hejný & Slavík 2003). Mimo souvislý areál sahají některé izolované populace až do oblasti Španělska (Hejný & Slavík 2003).



Obr. 1.5: Celosvětové rozšíření *Anemone sylvestris* s těžištěm výskytu v oblasti jižní Sibíře (převzato z Meusel et al. 1965: 160).

V České republice se vyskytuje především v oblasti českého a panonského termofytika s těžištěm výskytu v kolinním stupni, vzácně v mezofytiku na lokalitách na vápencovém podloží (viz obr. 1.6) (Hejný & Slavík 2003). Největší populace jsou soustředěny především na Jižní Moravu a oblast České tabule, avšak oproti minulosti populací druhu značně ubývá a populace se poměrně rapidním způsobem zmenšují. Výskyt má tedy spíše charakter izolovaných lokalit reliktního charakteru odkazujících na větší rozšíření druhu v minulosti (Hejný & Slavík 2003).



Obr. 1.5: Rozšíření *Anemone sylvestris* na území České republiky (převzato ze Slavík 1986).

1.3.4 Ochrana druhu

V České republice je *Anemone sylvestris* uvedena v Příloze č. II vyhlášky č. 395/1992 Sb. jako ohrožený druh a je tak chráněna zákonem č. 114/1992 Sb. (Zákon České národní rady o ochraně přírody a krajiny). Zároveň jsou některé typy stanovišť, kde se druh vyskytuje, uvedeny ve Směrnici č. 92/43/EHS ze dne 21. května 1992, Příloze č. I O ochraně přírodních stanovišť v zájmu společnosti. Jedná se o polopřirozené suché louky sv. *Festuco-Brometea* na vápnatých substrátech suchých a teplých oblastí Čech a Moravy, subkontinentální panonské křoviny na Jižní Moravě a ve středních Čechách a sarmatské stepní bory v části České tabule a na Česko Krumlovsku, Horažďovicku a Strakonicku (Chytrý et al. 2010a).

1.3.5 Ohrožení a management

Vzhledem k poměrně pestré škále biotopů, v nichž se druh vyskytuje, nelze stanovit zcela univerzální faktory, které populace ohrožují, ani jednotný management lokalit.

Širokolisté suché trávníky jsou ohroženy především nastupující sukcesí (zarůstání dřevinami), která byla blokována obhospodařováním pozemků. Dřeviny zvyšují kompetiční tlak na druh a ovlivňují jeho životaschopnost. Přítomnost dřevin zároveň negativně ovlivňuje míru opylení *Anemone* pylovými zrny. Výrazně tak omezuje šance na generativní šíření druhu. Snížení schopnosti generativního množení je způsobeno zejména změnou intenzity fotosyntézy a tím poškozením funkcí pylových zrn s následným snížením početnosti semen (Denisow & Wrzesien). Dalším negativním vlivem způsobeným lidskou činností je splach hnojiv, která umožní nástup konkurenčně silným travinám s velkou biomasou a minimální druhovou diverzitou, v závěrečné fázi s převládající třtinou křovištní *Calamagrostis epigejos*, která často blokuje další sukcesní stadia. Paradoxně však mírné navýšení některých druhů trav (např. *Brachypodium pinnatum*) a přítomnosti jejich opadu do 35 % může napomáhat existenci *Anemone sylvestris*, avšak jakékoli větší rozšíření traviny naopak umožní šíření stínomilných lesních druhů a rapidní pokles populační hustoty *Anemone sylvestris* (Denisow & Anton 2016). Klíčovým managementem těchto lokalit je pravidelné odstraňování dřevin a pastva především ovcí, případně koní (dříve udržovány pastvou divokých stepních tarpanů) či červencová seč (Kwiatkowska-Falinska & Falinski 2007). V případě, kdy bylo od managementu v minulosti upuštěno a došlo k degradaci stanoviště, je pro jeho obnovu naprosto klíčová existence nepoškozených ploch v bezprostřední blízkosti, odkud se mohou druhy zpět šířit. I tak je obnova poměrně dlouhodobou záležitostí (Bornkamm 2006; Chytrý et al. 2010a; Kwiatkowska-Falinska & Falinski 2007).

U nízkých xerofilních křovin je situace velmi podobná, zvyšující se eutrofizace snižuje druhovou diverzitu, zároveň hrozí zarůstání lokalit stromy či šíření ruderalních druhů. V případě primárních porostů extrémních stanovišť není management nutný, sekundární porosty naopak vyžadují odstranění náletů (Chytrý et al. 2010a).

Intenzivním obhospodařováním pozemků a snahou o využití co největší plochy až na hranici lesa jsou ohroženy především suché bylinné lesní lemy. Eutrofizace podporuje zarůstání lokality travami a dřevinami. Vhodné je umožnit spontánní vznik takové vegetace na nově uvolněných lesních světlinách či křoviny a stromy z lemů odstraňovat (Chytrý et al. 2010a; Kwiatkowska-Falinska & Falinski 2007).

Lesostepní bory jsou sekundárně vzniklými lokalitami z teplomilných doubrav, kde díky působení člověka převládla borovice. I přesto tyto lokality obývá řada ohrožených rostlin a živočichů. Pro údržbu těchto lokalit bylo zásadní tradiční hospodářství s lesní pastvou či sečením podrostu. S absencí těchto způsobů jsou však ohroženy zarůstáním křovinami, ruderálními druhy a lesnickou obnovou. Všechny tyto faktory způsobí ústup světlomilné vegetace a její nahrazení stínomilnou, vedoucí k zapojenému lesu. Vhodným managementovým opatřením je prořezávka listnatých dřevin a případná pastva či seč (Chytrý et al. 2010a).

Společným jmenovatelem všech zásahů je tedy prevence před zastíněním lokality způsobeným zarůstáním dřevinami. Blokace dalších sukcesních stadií však vzhledem k historickým vlivům člověka vyžaduje lidský zásah. Klíčovou tedy zůstává údržba a vhodný management lokalit, obvykle dobře viditelný v tradičních způsobech uplatňovaných v minulosti. Udržování lokality v dobrém stavu umožní navýšení velikosti populací druhů. Nezbytná je však znalost stavu současných populací, jejich velikostí, genetické diverzity a tím i míry ohrožení a jejich extinkce. Zároveň i vztahů mezi nimi a případnými možnostmi jejich záchrany. Jenom tak mohou být ochranné snahy zacíleny správně a skutečně udržet druhovou bohatost těchto lokalit.

1.4 Molekulární markery v ochraně přírody

Stav populací druhů ve společenstvu je možné sledovat jako měnící se početnost druhu či pomocí vnějších znaků vykazujících známky dobrého či špatného prospívání (jako např. počet kvetoucích jedinců, počet semen, velikost listové plochy). Často jsou však tato pozorování velmi zavádějící. Menší, geneticky však různorodá populace, bude mít pravděpodobně větší šanci na dlouhodobější existenci, než geneticky velmi chudá větší populace.

Genetická vnitropopulační variabilita je právě tím faktorem, který umožňuje populacím pružně reagovat na změny podmínek a přizpůsobit se jim, aniž by došlo k jejich lokálnímu vyhynutí. Proto je pro maximalizaci evolučního potenciálu druhu nezbytná ochrana více geneticky odlišných populací, která tak minimalizuje dlouhodobější riziko extinkce (Allendorf Luikart 2007). Zároveň je nezbytné určit stav genetické diverzity těchto populací a jejich vnitropopulační a mezipopulační strukturu. Podstatná je i identifikace jednotlivých populací a jejich původu, včetně historických událostí zaznamenaných v genomu (např. populační bottleneck) (Hewitt 1999). Nahlédnout do genetické úrovně populací a druhů umožňují molekulární markery.

1.4.1 Ohrožení populací

Skutečné ohrožení populací je obvykle zapříčiněno spolupůsobením několika faktorů. Obvykle prvotním vlivem jsou faktory spojené s člověkem, a to především ztráta habitatů, fragmentace populací, znečištění či zavlečení invazních druhů. Následkem je obvykle zmenšení populací či jejich rozdělení na malé nekomunikující subpopulace (Allendorf & Luikart 2007; Frankham et al. 2002). Rizika ztráty genetické diverzity jsou v malých populacích značná, jak bude zmíněno později (Falk & Holsinger 1991; Freeland et al. 2011).

Následnou další hrozbou jsou pro populace stochastické (náhodné) jevy. První skupinou je demografická stochasticita hrající větší roli v malých populacích (náhodný poměr pohlaví jedinců či náhodný úhyn některých jedinců). Druhou skupinu tvoří environmentální stochasticita způsobená srážkovými a teplotními fluktuacemi, přírodními katastrofami, dostupností zdrojů, hustotou predátorů. Na ni populace odpovídá měnícím se poměrem natality a mortality jedinců (Frankham

et al. 2002; Lande 1988). Spolupůsobením lidského a přírodního faktoru výrazně roste míra ohrožení populací. Důsledkem je, že např. malé fragmentované populace s vysokou mírou inbreedingu a ztrátou genetické diverzity mají sníženou schopnost se adaptovat na změny přírodních podmínek a často i sníženou schopnost reprodukce, což může vést k extinkci celé populace.

Malá populační velikost však nemusí být pouze důsledkem lidské činnosti. Mimo fragmentaci, která způsobí úbytek vhodných ploch pro výskyt druhu či jeho nemožnost se na velkou vzdálenost na takové plochy šířit, je to omezení nosnou kapacitou lokality, omezení lokality následnými sukcesními stadii či teprve počáteční kolonizace, kdy se druh ještě nestihl plně rozšířit (Falk & Holsinger 1991). Nutno dodat, že ale každý z uvedených faktorů může být výrazně posílen vlivem člověka.

Ať už dojde k náhlému zmenšení populační velikosti z jakéhokoli důvodu, snížení počtu jedinců způsobí výraznou ztrátu genetické diverzity, především vzácných alel (*bottleneck efekt*) (Falk & Holsinger 1991). Přitom její obnova je velmi dlouhodobý proces v řádu stovek i více generací v závislosti na mutační rychlosti DNA (Allendorf & Luikart 2007, Beebe & Rowe 2008). Naopak alespoň malá migrace jedinců mezi jednotlivými populacemi dokáže genetickou diverzitu částečně obnovit.

Komunikace mezi malými populacemi je důležitou prevencí ztráty genetické diverzity způsobenou genetickým driftem a inbreedingem (příbuzenským křížením). Zatímco genetický drift náhodně mění frekvence alel v populacích (některé fixuje, jiné úplně mizí) a tím snižuje diverzitu populace, zároveň působí značnou genetickou odlišnost izolovaných populací (v každé náhodným způsobem fixovány některé alely) (Allendorf & Luikart 2007; Lande 1988). Inbreeding snižuje individuální genetickou diverzitu zvýšením procenta homozygotních lokusů (Freeland et al. 2011). Především u rostlin je dopad inbreedingu velký vzhledem k jejich sedentaritě, zvýšeným rizikem samooplození a omezeným šířením semen (Falk & Holsinger 1991).

Obecně jsou populace z pohledu genetické úrovně nejvíce ohroženy ztrátou genetické diverzity a zvyšováním procenta homozygotních jedinců. To vše vede k poklesu fitness jedinců a omezení schopnosti přežívání populace. Jakékoli

environmentální změny, nové nemoci či akumulace škodlivých mutací tak mohou být pro populace fatální (Allendorf & Luikart 2007; Lande 1988).

1.4.2 Jednotky ochrany

Jak již bylo zmíněno, cílem ochrany by měly být geneticky co nejvíce odlišné populace, aby tak byla zachována co největší genetická diverzita druhu. Zároveň je při různých managementových zásazích, jako jsou např. transfery jedinců, důležitá znalost genetické skladby zdrojových a cílových populací, aby nedošlo k zanesení genů mezi izolovanými populacemi, jejichž nositelům umožnily přizpůsobení se úplně jiným podmínkám, než které cílová populace má. Mohlo by tak dojít k jejímu výraznému narušení (Allendorf & Luikart 2007; Falk & Holsinger 1991). Důležité proto je stanovení kritérií, podle nichž budou jednotlivé managementové zásahy probíhat a které dokáží zároveň ochránit genetickou jedinečnost a lokální adaptace jednotlivých populací. Z tohoto pohledu je významná především ochrana geneticky zdrojových populací (Falk & Holsinger 1991). Rovněž fylogeografie (modelování souvislostí mezi fylogenezí a geografickým rozšířením) umožňuje určit, které populace jsou izolované dlouho. Je totiž poměrně pravděpodobné, že při dlouhodobé izolaci těchto populací mezi nimi mohla vzniknout i případná reprodukční bariéra či by jejich křížením došlo ke ztrátě nezbytných lokálních adaptací (Allendorf & Luikart 2007).

Jedním z možných konceptů umožňujících vylišit skupiny, k nimž by se měly upírat ochranné snahy je koncept evolučně významných jednotek ESU (*evolutionary significant units*). Jedná se od jednotky pod úrovní druhu často právě postihující reprodukční izolaci a lokální adaptace (Green 2005). Jejich vylišení je poměrně problematické, závisí na druhu použitého genetického markeru, a nejlépe funguje pro diskrétní geograficky oddělené jednotky (Allendorf & Luikart 2007). ESU je tvořena populací nebo skupinou populací, které si zaslouží odlišný či zvláštní management či prioritu ochrany díky vysoké genetické či ekologické odlišnosti. Je podmíněna dlouhodobou reprodukční izolací (např. linie v odlišných refugiích) a odlišností v ekologických vlastnostech vycházejících z adaptací na odlišné prostředí (genetická a fenotypová variabilita pro budoucí evoluční potenciál) (Allendorf & Luikart 2007).

ESU jsou významné především z dlouhodobého hlediska. Pro nastavení krátkodobého managementu je výhodný koncept tzv. MUs (*management units*). Předpokladem zde není dlouhodobá nezávislá evoluce populací, ale jedná se zde o populace, které si vymění s jinými tak málo migrantů, že jsou od nich geneticky odlišné. Zastupuje tak dílčí populace v rámci jedné ESU a vylišení těchto jednotek není zdaleka tak obtížné (Freeland et al. 2011).

1.4.3 Molekulární markery

Jak již bylo řečeno, výběr molekulárního markeru závisí na studované tematice, ať už se jedná o stanovení ESU, míru populační diferenciace, mezidruhovou hybridizaci či vývoj druhů, rodů či celých čeledí. Společnou výhodou všech molekulárních markerů je však nedestruktivní vzorkování jedinců, kdy ke sběru vzorků pro molekulární analýzy není nutné studovaný organismus fatálně poškodit (Beebee & Rowe 2008). Především u ohrožených druhů je to důležitý fakt.

Výběr markeru pro analýzy může být ovlivněn více faktory, jako je např. cena analýz pro daný marker, pravděpodobnost kontaminace vzorku jiným genetickým materiálem či úroveň, na níž variabilitu studujeme. Jiné molekulární markery budou vhodné na úrovni vyšších taxonů, než jdou rody a druhy a jiné např. pod úroveň druhu a v rámci vnitropopulačních charakteristik (Allendorf & Luikart 2007; Freeland et al. 2011). U rostlin je obecně mt DNA poměrně velmi konzervativní a i cp DNA má nízkou míru variability a její využití je vhodné pro studium procesů ve velmi vzdálené minulosti na vyšší než druhové úrovni (Allendorf & Luikart 2007; Freeland et al. 2011). Naopak jaderná DNA a její mikrosatelitové úseky jsou díky své vysoké mutační rychlosti výborným molekulárním markerem na úrovni a pod úroveň druhu (Arif et al. 2010).

1.4.3.1 Mikrosatelity

Mikrosatelity neboli SSRs (*single sequence repeats*) či STR (*short tandem repeats*) byly objeveny v 90. letech minulého století. V současnosti jsou široce používanými markery v populační genetice (Allendorf & Luikart 2007). Patří do větší skupiny tandemových repetitivních sekvencí (spolu se satelity a minisatelity – liší se délkou motivu a počtem opakování) (Bennett 2000).

Jedná se o tandemově opakované krátké sekvence s motivem o délce 1 – 6 nukleotidů ohraničené specifickou sekvencí nukleotidů tzv. *flanking region*. Počet opakování motivu se pohybuje od 5 do 100, obvykle však do 40 opakování. Zkráceně lze např. dinuklotidový mikrosatelit zapsat jako $(XY)_n$ či trinukleotidový $(XYZ)_n$ (kde X, Y, Z jsou jednotlivé nukleotidy – správně tedy A, C, G či T; a n je počet opakování motivu) (Allendorf & Luikart 2007; Beebee & Rowe 2008). Právě rozdíl v počtu opakování motivu určuje jednotlivé alely (Awise 2004). Jedná se o kodominantní marker umožňující rozlišit mezi homo- a heterozygoty (umožňuje tak stanovit např. vliv inbreedingu v populaci) (Freeland et al. 2011). Homozygotní mikrosatelitový lokus má stejný počet opakování jednotek daného mikrosatelitu na obou homologních chromozomech, zatímco heterozygot má odlišný počet opakování pro každou alelu (Oliveira et al. 2006).

Mikrosatelity jsou velmi početné v eukaryotním genomu (Beebee & Rowe 2008). U rostlin tvoří až 1 % jaderného genomu, jejich početnost je však druhově specifická (Oliveira et al. 2006). Velká část je situována v nekódujících úsecích, nejsou tedy zdrojem genetické informace a jsou selekčně neutrální. Právě díky selekční neutralitě přetrvávají v čase po generace a pouze se konstantně mění díky mutacím (Beebee & Rowe 2008). Alely tak nejsou odstraňovány selecí a rozdíly mezi populacemi jsou tak výsledkem mutací a náhodného genetického driftu. Některé mikrosatelity, především tri- a hexanukleotidové, však mohou mít vliv na regulaci genové exprese (Bennett 2000). Převažují proto v exonech kódujících expresi proteinů (Tóth et al. 2000).

Díky vysoké mutační rychlosti 10^{-3} až 10^{-6} za generaci (oproti mutační rychlosti zbytku DNA 10^{-9} až 10^{-10}) se jedná o vysoce polymorfní marker (Freeland et al. 2011). Mutace obvykle způsobí změnu v počtu opakování motivu jako důsledek sklouznutí DNA polymerázy o 1 či více jednotek během replikace DNA (DNA slippage) či nerovnoměrného crossing-over, kdy může dojít k velkým změnám ztrátou či získáním velkého počtu jednotek opakování (Oliveira et al. 2006). Vysoká polymorfnost markeru je na jednu stranu velmi špatně využitelná pro interpretaci procesů z dávné minulosti na vyšších taxonomických úrovních, ale naopak výborně reflektuje relativně nedávné události na vnitro druhové úrovni i v malých populacích. Umožňuje tak dobrou identifikaci populačně genetických procesů jako jsou míra inbreedingu, genetický drift či genový tok. Velká mutační

rychlost generující mnoho různých alel na lokus rovněž umožňuje přesnou identifikaci jedinců a velmi dobré rozlišení klonálních jedinců (Awise 2004; Oliveira et al. 2006).

1.4.3.2 Mikrosatelitová analýza populací

Analýza je založena na PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů (Awise 2004). Pro ty je nutné vyvinout primery, které jsou komplementární k *flanking region* (specifická nukleotidová sekvence) ohraničující každý mikrosatelit (Arif et al. 2010). Jednotlivé úseky jsou potom namnoženy při PCR (Beebee & Rowe 2008).

Primery jsou druhově specifické, což činí mikrosatelitovou analýzu nákladnější a obtížnější (Freeland et al. 2011). Vývoj primerů může probíhat úplně nově konstrukcí genomických knihoven pro daný druh obohacených o mikrosatelity (zahrnuje screening, sekvenování a charakteristiku mikrosatelitových lokusů) (Beebee & Rowe 2008). Další možností je tzv. cross-amplifikace. Jedná se o testování použitelnosti primerů publikovaných již známých mikrosatelitů pro mikrosatelitové lokusy u blízce příbuzných druhů (Allendorf & Luikart 2007; Awise 2004). Přenositelnost na příbuzné druhy je však pouze částečná (Beebee & Rowe 2008). Na druhou stranu právě druhová specifita primerů umožňuje analýzu i kontaminovaného materiálu jinými organismy či organickými zbytky.

Celou analýzu lze zjednodušit tvorbou multiplexu pro amplifikaci více mikrosatelitových lokusů při jednom běhu PCR. Multiplex obsahuje páry primerů identifikujících více lokusů, přičemž je každý primer obarven fluorescenční barvou. Primery, u nichž nedochází k překryvu délky alel mikrosatelitových lokusů jsou obarveny stejnou fluorescenční barvou, primery s překrývající se délkou alel jsou obarveny různými barvami (Guichoux et al. 2011).

Produkty PCR (amplifikované alely pro jednotlivé mikrosatelitové lokusy) jsou vizualizovány a analyzovány následnou elektroforézou (Allendorf & Luikart 2007). Vzhledem k malé délce mikrosatelitových lokusů mezi 75 a 300 páry bazí a odlišnosti alel v jen pouze malém počtu nukleotidů je potřebné využít přesného polyakrylamidového gelu nebo radioaktivního značení alel a jejich rozdělení autoradiografií či fluorescenční značení a dělení v automatickém DNA sekvenátoru (Allendorf & Luikart 2007; Beebee & Rowe 2008).

Mikrosatelitová analýza skýtá i několik problémů. Jedním z nich je výskyt tzv. nulových alel, kdy došlo k mutaci ve *flanking region* a daný primer tak nemůže nasednout. Příslušná alela není amplifikována a způsobí tak zdánlivou homozygotitu jedince (Beebee & Rowe 2008). Dalším, ale dobře řešitelným problémem je homoplazie, náhodná podobnost dvou alel vzniklá nezávisle bez mutací ze společného předka. Tu lze ale identifikovat pomocí odlišností ve *flanking region* (Jarne & Lagoda 1996). Dále pak nelze použít analýzu k determinaci polyploidních jedinců, protože metodou nelze určit, která alela je přítomna vícekrát (Ferrao et al. 2014). K eliminaci problémů a pro maximalizaci síly statistických výstupů je důležité využití většího počtu lokusů (Beebee & Rowe 2008).

1.5 Cíle práce

Práce je zaměřena na zákonem chráněný ohrožený druh, sasanku lesní *Anemone sylvestris*. Přes původně poměrně hojné rozšíření zejména v oblasti nížin, početnost populací výrazně klesá. Pro stanovení vhodných opatření na záchranu druhu je nezbytné odhalení genetické struktury populací. Cílem této práce je právě popis této populačně-genetické struktury druhu na území celé České republiky pomocí analýzy variability mikrosatelitových markerů. Práce je rozdělena na několik dílčích cílů:

- a) Odhalení struktury populací *Anemone sylvestris* na území České republiky
- b) Stanovení míry odlišností těchto populací tj. genetického toku mezi nimi
- c) Určení zdrojových populací pro aktuální populace *Anemone sylvestris* v České republice
- d) Určení genetického původu populací, které jsou enklávami výskytu druhu mimo hlavní oblast rozšíření *Anemone sylvestris* v České republice

2. Metodika

2.1 Sběr vzorků

Vzhledem k zamýšleným populačně-genetickým analýzám a ostrůvkovitému rozšíření druhu, bylo nezbytné postihnout sběrem vzorků celou oblast výskytu *Anemone sylvestris* v České republice. Výběr lokalit s potenciálním výskytem druhu jsem učinila již v létě 2017 za pomoci databáze Pladias (Pladias ©2014–2019), která shrnuje nálezy druhu ve fytoocenologických snímcích se stručným popisem lokality výskytu, či případně s GPS souřadnicemi. Zároveň jsem tyto informace srovnávala s dostupnými údaji o lokalitách (např. s plány péče, informačními tabulemi, naučnými stezkami). Vytipovala jsem si 15 lokalit, na nichž by se měl druh vyskytovat. Při návštěvě terénu jsem však *Anemone sylvestris* našla pouze na 3 lokalitách. Vzhledem k tomu, že se obvykle vyskytuje pouze na velmi malé ploše, nikoli kontinuálně, a v malých populacích v rámci většího území, kde je její výskyt uváděn, je velmi obtížné populaci najít. V rámci hledání lokalit na Strakonicku jsem kontaktovala Ing. Radima Pauliče z Odboru životního prostředí – Oddělení ekologie krajiny Městského úřadu Strakonice, který měl velký přehled o výskytu *Anemone* ze svých terénních šetření nejen na Strakonicku, ale v celých jižních Čechách. Zároveň mi potvrdil, že výskyt *Anemone* na lokalitách se rok od roku mění tím, že je druh na ústupu, proto není na řadě lokalit z databáze již vůbec přítomný. Získala jsem od něj i cenné kontakty na pracovníky lokálních muzeí, kteří výskyt *Anemone sylvestris* sledují (Ing. Radim Paulič, VI. 2017, in verb.). *Anemone sylvestris* je na lokalitách nejnáze nalezitelná v době kvetení a bezprostředně po odkvětu, díky nápadným bílým květům a dlouze vlnatým nažkám (obr. 2.1) (Hejný & Slavík 2003; Kubát 2002). Další sběr vzorků jsem proto odložila na nadcházející sezonu.

Díky kontaktům od Ing. Pauliče jsem obeslala pracovníky regionálních muzeí a pracovišť AOPK na botanických úsecích a zároveň získala přístup k Nálezové databázi ochrany přírody, která sdružuje mimo jiné i druhové záznamy z terénních průzkumů pracovníků AOPK spolu s přibližným popisem místa nálezu a kde lze tedy dohledat aktuálnější výskyty *Anemone sylvestris* (AOPK ČR ©2016–2019). Z uvedených pramenů jsem vytipovala 35 lokalit tak, aby co nejvíce korespondovaly s rozšířením *Anemone sylvestris* v České republice (viz obr. 2.2). Sběr jsem prováděla na přelomu května a června 2018 v době, kdy by měl druh kvést (Kubát

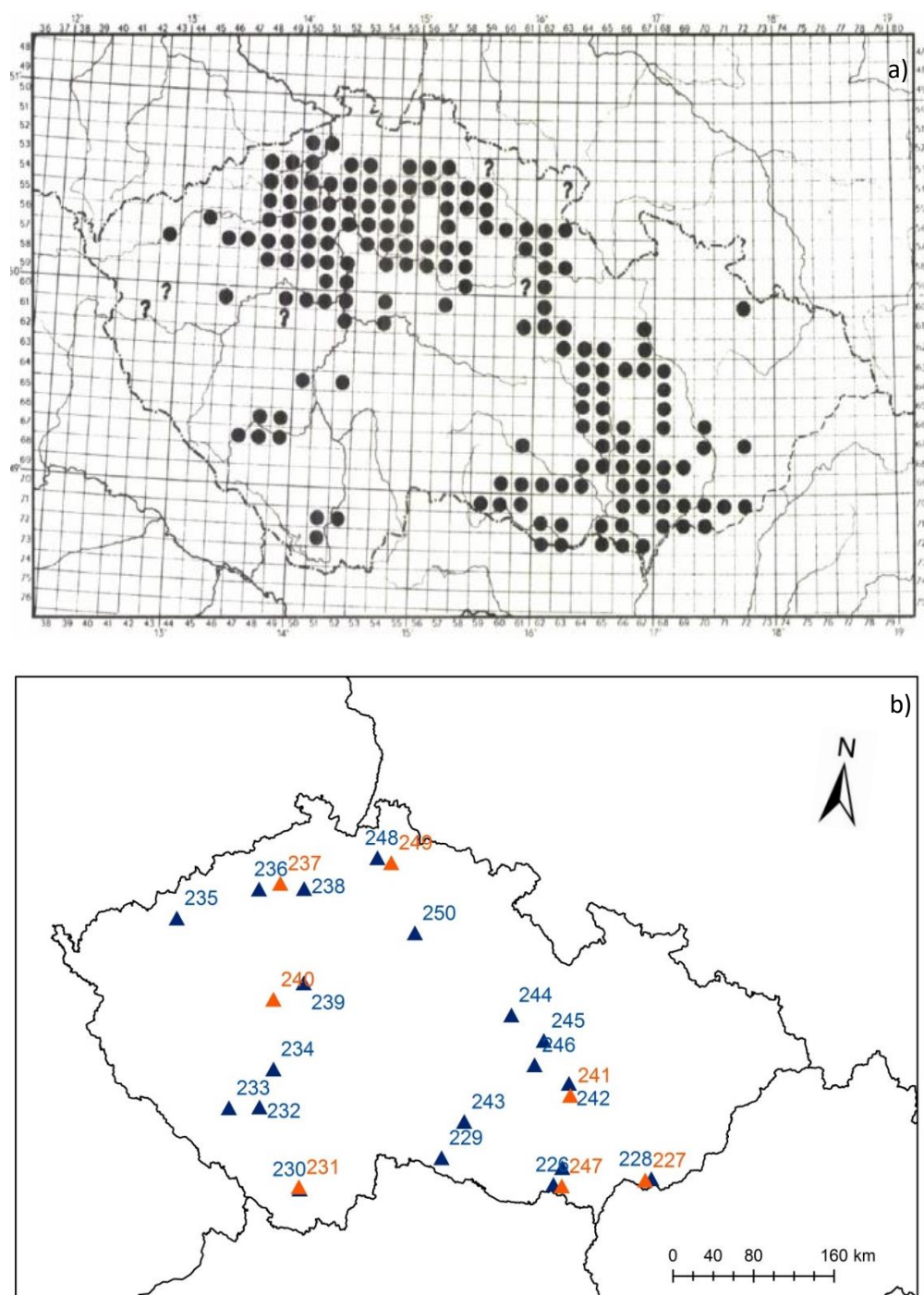
2002; Hejný & Slavík 2003). Díky extrémně teplému a suchému období, však byly rostliny již na řadě míst odkvetlé, což ztěžovalo jejich determinaci. Vzhledem k problematickému hledání a rychle mizícím lokalitám výskytu o malých populacích, jsem našla druh na 26 lokalitách (obr. 2.2, obr. 2.3, tab. 2.1).



Obr. 2.1: Ukázka snadné identifikace druhu v době kvetení. Kvetoucí (obrázek vlevo) a plodící *Anemone sylvestris* (obrázek vpravo bezprostředně po odkvětu a s dlouze vlnatými nažkami). Fotografie z terénního sběru vzorků.

Na každé lokalitě jsem zaznamenala GPS souřadnice výskytu druhu, charakteristiku přesného místa výskytu a přibližnou velikost populace, včetně počtu sterilních a fertálních jedinců (viz tab. 2.1). Zároveň jsem, pokud to bylo vzhledem k velikosti populace možné, odebrala vzorky z 20 rostlin, vzdálených od sebe minimálně 1 metr na transektu (vzhledem ke klonalitě rostlin způsobené šířením oddenky, a tedy možnosti zachytit téhož jedince ve vzorku vícekrát odběrem z téhož polykormonu, by byla vhodnější ještě větší vzdálenost mezi odběry, ale ta byla omezena právě velikostí populací a malým ostrůvkovitým výskytem druhu) (Hejný & Slavík 2003). Pokud to však velikost populace umožňovala, prováděla jsem odběr vzorků co nejdále od sebe. Protože jsem prováděla veškerá populační porovnání na základě molekulárních markerů a nesledovala žádné morfologické charakteristiky, jako je výška rostlin, velikost polykormonů či počet semen, odebírala jsem z každé rostliny vždy jen tři zhruba dvoucentimetrové kousky z listů přízemní růžice.

Odebrané vzorky jsem uchovávala až do molekulárních analýz v čajových sáčcích v silikagelu.



Obr. 2.2: Porovnání rozšíření *Anemone sylvestris* v ČR a lokalit, na nichž byl uskutečněn sběr vzorků. a) Rozšíření *Anemone sylvestris* v ČR (vyznačen výskyt druhu v každém ze čtverců, na něž je rozděleno území ČR), čerpá z fytokartografických záznamů (převzato ze Slavík 1986). Novější údaje např. z databáze Pladias jsou bohužel pouze neověřené nálezy, mapa je proto vzhledem k ústupu druhu v krajině velmi orientační.

b) 26 lokalit sběru vzorků *Anemone sylvestris* (z původních 35 vytipovaných). Tyto lokality pokrývají přibližně celý areál rozšíření druhu na území ČR.

Legenda: ▲ – na mikrosatelity analyzované populace; ▲ – neanalyzované populace.



Obr. 2.3: Ukázka z fotodokumentace lokalit sběru.

Legenda: (a) Velké Dunajovice, Slunečná, (b) Český Krumlov, železniční trať na Dobrkovice, (c) Nerestce, horní hrana Nerestského lomu.

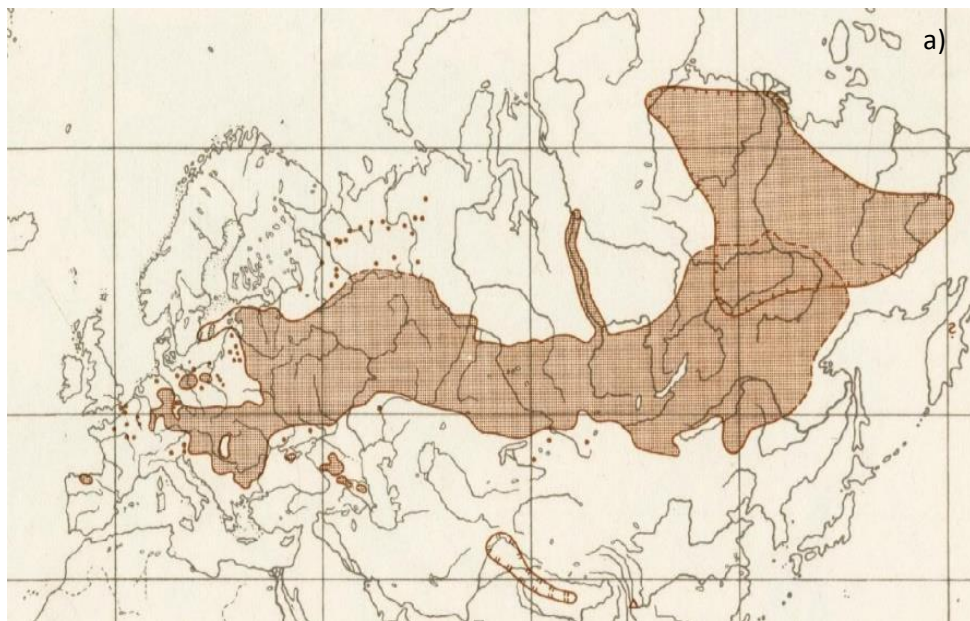
Tab. 2.1: Přehled lokalit sběru *Anemone sylvestris* v ČR a jejich charakteristik. Vybarveny a tučně zvýrazněny jsou populace, které byly vybrány pro molekulární analýzy (světle žlutá a sytě žlutá barva). Sytě žlutou barvou jsou zvýrazněny velké populace s nejméně 100 kvetoucími jedinci.

Legenda: č.p.- číslo populace (přiděleno v rámci celého evropského projektu), vz. – počet sebraných vzorků na dané lokalitě, poč. kv. – odhadnutý počet kvetoucích jedinců.

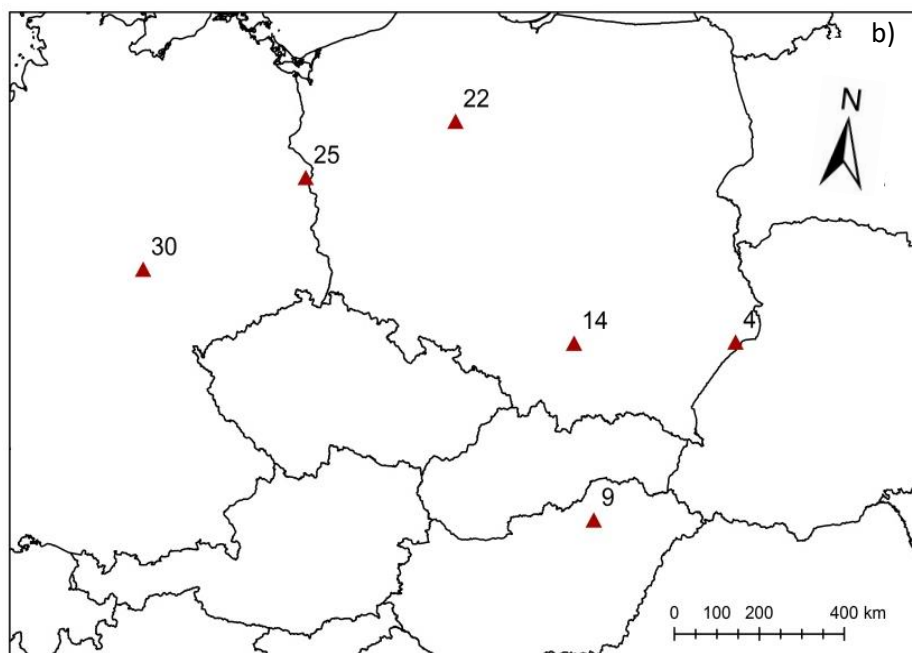
Č. p.	Vz.	Lokalita		Velikost populace, popis	Poč. kv.	Popis nálezu	Zem. šířka	Zem. délka
225	20	Pouzdrány	Pouzdránská step-Kolby	několik desítek jedinců, z toho zhruba do 20 kvetoucích	20	3 plošky vzdálené cca 2-3 metry od sebe, strmější sklon, zarůstá keři	48°56'32,757"	16°38'36,30"
226	20	Velké Dunajovice	vrch Slunečná	zhruba 100 kvetoucích	100	pod vrcholovým platem u růžových keří	48°50'42,476"	16°33'52,596"
227	20	Kněždub		zhruba dvě desítky sterilních jedinců, jeden kvetoucí	1	okrajový lem lesa, ve vyšší trávě u nekosené louky	48°52'12.236"	17°22'58.290"
228	20	Malá Vrbka	pod vrchem Výzkum	dvě až tři desítky sterilních a cca 10 kvetoucích	10	podmáčená nekosená lokalita s kosatci, hlohem a růží	48°52'40.609"	17°26'15.945"
229	20	Menhartice		dvě až tři desítky sterilních a cca 10 kvetoucích	10	drobné skalní enklávy v lese, v okolí bývalého lomu, velmi prudký svah	48°59'57.959"	15°34'2.243"
230	20	Český Krumlov	trať Č. Krumlov - Dobrkovice	desítky sterilních a cca 20 kvetoucích	20	prudké suché skalní svahy po obou stranách železniční trati	48°49'4.840"	14°18'8.776"
231	20	Český Krumlov	pod vrchem Vyšný	desítky sterilních a cca 10 kvetoucích	10	terasy pod lesem	48°49'49.761"	14°17'46.812"
232	20	Rovná u Zbuše		dvě až tři desítky kvetoucích, několik desítek sterilních	30	stráň u cesty	49°17'30.393"	13°56'41.668"
233	20	Hejná	úpatí vrchu Pučanka	stovka až dvě kvetoucích, řada sterilních	200	louka na kraji lesa na úpatí vrchu	49°17'12.580"	13°40'18.129"
234	20	Nerestce	Nerestský lom	přes 300 kvetoucích	300	malinká stráň nad hranou lomu, částečně zastíněná	49°30'32.161"	14°4'7.720"
235	20	Lestkov	Rašovické skály	50 až 100 kvetoucích	100	na skalních stupních u paty skal ve stínu a pod keři	50°21'46.317"	13°12'28.364"
236	20	Kocourov		cca 20 kvetoucích	20	nekosená louka zarůstající keři pod lesem	50°31'32.059"	13°56'26.328"

Č.p.	Vz.	Lokalita		Velikost populace, popis	Poč. kv.	Popis nalezu	Zem. šířka	Zem. délka
237	20	Pokratice	Bílé Stráně	cca do 10 kvetoucích, zbytek sterilních	10	prudší část osluněné louky	50°33'26.230"	14°7'51.213"
238	20	Vědlice	Stráně u Drahozubi	cca 50 kvetoucích	50	pod stromem ve stínu na loučce	50°31'40.892"	14°20'33.697"
239	20	Lochkov	Cikánka	cca 30 kvetoucích, 20 sterilních	30	u pěšinky na kraji v lemu lesa, světlna na prudkém svahu	49°59'51.679"	14°20'22.449"
240	20	Suchomasty	Na Voskopě	pouze starilní, kolem 50 jedinců	0	keři zarůstající světlna v lese, velmi suchá	49°54'17.359"	14°4'10.069"
241	20	Vilémovice		přes 30 kvetoucích, desítky sterilních	30	suchá louka sv. <i>Bromion</i> , prohloubenina pod stromem	49°21'28.331"	16°42'56.562"
242	20	Žďár		přes 100 kvetoucích	100	velká populace v okrajích suchého trávníku kolem výchozů vápence u mlaziny smrku	49°25'36.281"	16°42'13.628"
243	20	Markvartice		přes cca 30 kvetoucích	30	ve vysoké trávě uvnitř smrkového lesíku	49°12'28.620"	15°46'9.012"
244	20	Chotěnov		kolem 100 kvetoucích	100	stráž s pastvinou a keřovým pásem uprostřed polí	49°48'58.596"	16°11'23.045"
245	20	Banín	VKP Sasanky u Banína	přes 100 kvetoucích	100	lesní prosvětlený svah u silnice	49°40'15.742"	16°28'47.511"
246	20	Prosetín		přes 50 kvetoucích	50	světlna na okraji remízku	49°31'55.800"	16°23'45.400"
247	20	Klentnice	Tabulová	kolem 30-40 kvetoucích	40	roztroušeně v louce	48°50'10.084"	16°38'19.347"
248	20	Javorník	Jizerské hory	30 kvetoucích, cca desítka sterilních	30	vyschlý kraj pastviny, jihozápadní stráž	50°41'58.822"	14°59'48.343"
249	20	Rydvaltice		20 kvetoucích, cca 20 sterilních	20	okraj sečené louky, jižní svah, velmi suchý	50°40'21.120"	15°7'10.209"
250	19	Dubečno		60 kvetoucích	60	hojna populace, v remízkovém lese, poměrně vlhko	50°16'45.123"	15°19'47.026"

Podle stejného principu byl prováděn sběr vzorků v 6 zahraničních populacích (pro identifikaci zdrojových populací a směru šíření druhu) (viz obr. 2.4a a 2.4b a tab. 2.2), které již ale sbíral tým pod vedením prof. Mgr. Bohumila Mandáka, Ph.D. v rámci širšího projektu podpořeného GA ČR na téma: Jaký je biogeografický původ středoevropských suchých trávníků? Syntéza komparativní fylogeografie a paleodistribučního modelování (GA18-03028S) (GA ČR ©2019), kterého je práce součástí. Ze zahraničních sběrů nejsou dostupné informace o velikosti populací a charakteru stanovišť. Počet vzorků v těchto populacích obvykle nedosahuje 20 (viz tab. 2.2). Zároveň není pokryta rovnoměrně oblast kolem celé republiky, protože je sběr vzorků v rámci projektu dělen na několik let. Z tohoto důvodu v analýzách chybí populace z Rakouska (sběr je plánován až na letní vegetační sezonu 2019), což se budu snažit při interpretaci možné historie šíření a původu linií *Anemone sylvestris* v České republice zohledňovat.



Obr. 2.4a: Porovnání rozšíření *Anemone sylvestris* v Evropě a zahraničních lokalit sběru vzorků.
- celosvětové rozšíření *Anemone sylvestris* (převzato z Meusel et al. 1965: 160).



Obr. 2.4b: Porovnání rozšíření *Anemone sylvestris* v Evropě a zahraničních lokalit sběru vzorků.

- 6 zahraničních lokalit sběru vzorků (označeny ▲). Je zde patrná absence vzorků ze Severních vápencových Alp na území Rakouska (sběr je, jakožto součást grantového projektu, plánován až na následující vegetační sezonu).

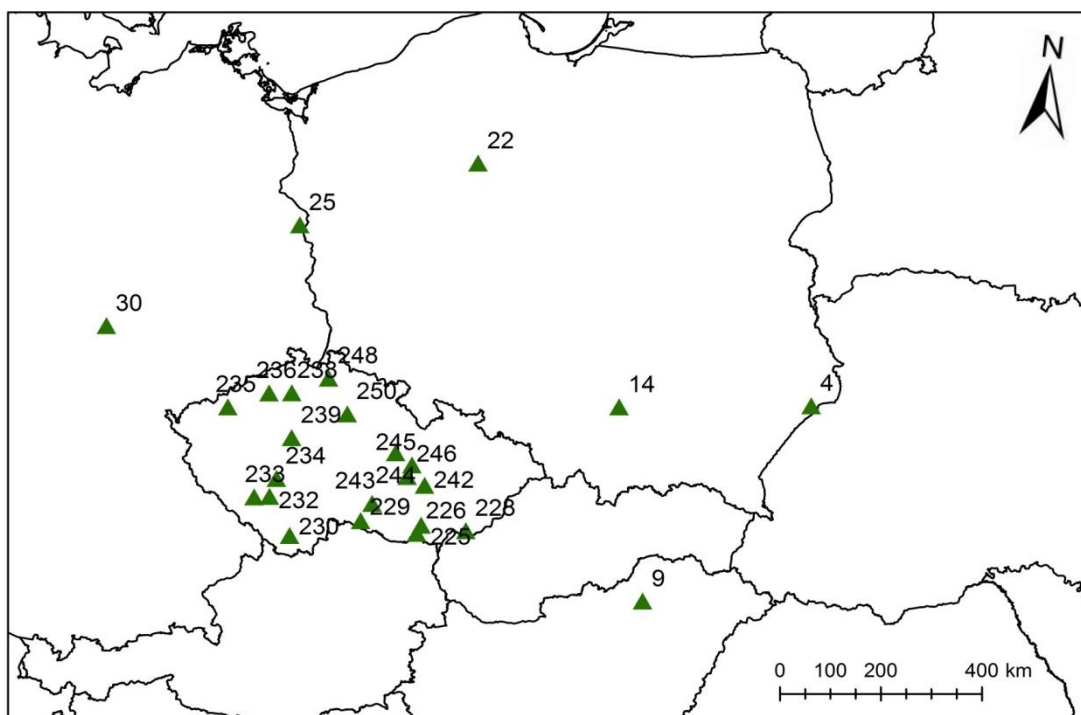
Tab. 2.2: Přehled lokalit sběru *Anemone sylvestris* v zahraničí a jejich charakteristik.

Číslo populace	Počet vzorků	Země	Lokalita	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka
4	10	Polsko	Tomaszow Lubelski, Zuravce	50°22'28.740"	23°34'39.108"
9	20	Maďarsko	Bükk, Eger	48°0'44.640"	20°34'44.220"
14	12	Polsko	Kalina-Lisiniec	50°21'41.832"	20°9'42.480"
22	20	Polsko	Trzeciewnica	53°9'14.672"	17°39'13.071"
25	20	Německo	Mallnow	52°27'48.838"	14°29'9.906"
30	14	Německo	Seega (Wipperdurchbruch)	51°18'42.215"	11°2'52.105"

2.2 Molekulární analýzy

Veškeré molekulární analýzy jsem prováděla v laboratoři katedry ekologie na FŽP CZU pod vedením Ing. Kateřiny Machynkové.

Počet populací jsem omezila tak, aby počet vzorků odpovídal dvěma velkým izolacím DNA (tj. 4 x 96 vzorků, izolují se vždy 2 sady najednou). Pro molekulární analýzy jsem proto vybrala z 26 tuzemských populací 19 populací rovnoměrně postihujících výskyt druhu (obr. 2.2, tab 2.1). Analyzováno bylo celkem 475 vzorků z nich 379 z českých populací (jedna populace čítala pouze 19 vzorků namísto obvyklých 20) a 96 ze zahraničních (viz obr 2.5, tab. 2.3). Molekulární analýzy u zahraničních populací prováděla laborantka Ing. Kateřina Machynková pracující v rámci výše zmíněného projektu (GA ČR ©2019).



Obr. 2.5: Vybrané molekulárně analyzované populace (19 z území ČR a 6 z blízkého zahraničí).

Tab. 2.3: Přehled všech molekulárně analyzovaných lokalit sběru *Anemone sylvestris*. Odhad velikosti populace udává celkový odhad počtu jedinců/odhad počtu kvetoucích jedinců.

Číslo populace	Počet vzorků	Země	Lokalita	Odhad velikosti populace	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka
225	20	ČR	Pouzdrány	40/20	48°56'32,757"	16°38'36,30"
226	20		Velké Dunajovice	150/100	48°50'42,476"	16°33'52,596"
228	20		Malá Vrbka	40/10	48°52'40.609"	17°26'15.945"
229	20		Menhartice	40/10	48°59'57.959"	15°34'2.243"
230	20		Český Krumlov	50/20	48°49'4.840"	14°18'8.776"
232	20		Rovná u Zbuše	60/30	49°17'30.393"	13°56'41.668"
233	20		Hejná	300/200	49°17'12.580"	13°40'18.129"
234	20		Nerestce	350/300	49°30'32.161"	14°4'7.720"
235	20		Lestkov	150/100	50°21'46.317"	13°12'28.364"
236	20		Kocourov	40/20	50°31'32.059"	13°56'26.328"
238	20		Vědlice	80/50	50°31'40.892"	14°20'33.697"
239	20		Lochkov	50/30	49°59'51.679"	14°20'22.449"
242	20		Žďár	200/100	49°25'36.281"	16°42'13.628"
243	20		Markvartice	50/30	49°12'28.620"	15°46'9.012"
244	20		Chotěnov	150/100	49°48'58.596"	16°11'23.045"
245	20		Banín	120/100	49°40'15.742"	16°28'47.511"
246	20		Prosetín	100/50	49°31'55.800"	16°23'45.400"
248	20		Javorník	50/30	50°41'58.822"	14°59'48.343"
250	19		Dubečno	100/60	50°16'45.123"	15°19'47.026"
4	10		Polsko	Tomaszow Lubelski	-	50°22'28.740"
9	20	Maďarsko	Bükk	-	48°0'44.640"	20°34'44.220"
14	12	Polsko	Kalina-Lisiniec	-	50°21'41.832"	20°9'42.480"
22	20	Polsko	Trzeciewnica	-	53°9'14.672"	17°39'13.071"
25	20	Německo	Mallnow	-	52°27'48.838"	14°29'9.906"
30	14	Německo	Seega	-	51°18'42.215"	11°2'52.105"

2.2.1 Izolace DNA

Celý postup jsem prováděla dle postupu pro izolaci velkým kitem společnosti Qiagen (*DNeasy Plant Maxi kit*) s drobnými změnami zaznamenanými v metodické části (Qiagen ©2018a).

Nejprve jsem rostlinný materiál připravila do kolonek o objemu 650 µl. Vždy zhruba jeden 2 cm kousek listu daného vzorku jsem pinzetou nalámala na menší a vložila do kolonky. Do každé jsem přidala 2 velké a 2 malé wolframkarbidové kuličky. Kolonky jsem umístila do stojánků po 96 vzorcích. Dostala jsem tak 4 sady

vzorků, celou izolaci jsem prováděla dvakrát (analyzovala jsem vždy 2 sady najednou). Následně jsem vzorky drtila v oscilačním mlýnu Mixer Mill 400 (Retsch) po dobu 1 minuty při frekvenci 30Hz, dokud v kolonkách nezbyl pouze prach.

Buněčná lyze: Účelem buněčné lyze je narušení buněčných stěn a organel. Pufř AP1 jsem nechala zahřát na 65°C tak, aby došlo k rozpuštění sraženin a mohla probíhat reakce. Z 90 ml předeřátého pufřu AP1, 225 μ l RNasy A a 225 μ l Reagentu DX jsem si připravila buněčný lyzát pro první dvě sady vzorků. Do každé kolonky jsem napipetovala 400 μ l lyzátu. Obě sady jsem potom nechala v oscilačním mlýnu po dobu 10 s při frekvenci 30Hz.

Vysrážení zbytkových molekul bílkovin a polysacharidů: Do každé kolonky jsem napipetovala 130 μ l pufřu P3 a uzavřela je čistými víčky. Vzorky jsem promíchala na vortexu Vortex Mixer classic (Velp Scientific) a nechala stočit v centrifuze Heraeus Multifugex3R Centrifuge (Thermo Scientific) tak, aby bylo dosaženo 3000 otáček. Poté se vzorky jsem nechala na 10 minut v mrazáku Comfort (Liebherr) při -20°C, což napomáhá vysrážení bílkovin. Poté jsem vzorky odstředila v centrifuze po dobu 5 minut při 6000 otáčkách.

Vázání DNA na membránu: Do nových kolonek jsem následně napipetovala 400 μ l odstředěného supernatantu tak, abych nasála pouze čistou část bez usazenin na dně. Ke každému vzorku jsem přidala 600 μ l pufřu AW1 (pufř byl v laboratoři naředěn ethanolem, dle instrukcí na obalu). Vzorky jsem nejprve ručně protřepala přibližně 15 s a poté nechala v centrifuze odstředit tak, aby bylo dosaženo 3000 otáček. DNeasy 96 jamkové destičky s filtry jsem položila na S-bloky sloužící k zachycení sacharidů a dalších rostlinných metabolitů. Z každého vzorku jsem přepipetovala 1 ml do odpovídající kolonky s filtrem v DNeasy 96 jamkové destičce. Destičku jsem přelepila vzducho-propustnou folií a odstředila v centrifuze po dobu 4 minut při 6000 otáčkách. Ve všech jamkách prošel lyzát přes filtrační membránu, na které zůstala zachycena DNA kontaminovaná sacharidy a dalšími látkami.

Promývání DNA: Lyzát z S-bloku jsem vylila, a do každé jamky v DNeasy destičce jsem přidala 800 μ l pufřu AW2 (pufř byl v laboratoři naředěn ethanolem, dle instrukcí na obalu). Odstředila jsem v centrifuze při 6000 otáčkách po dobu

15 minut, díky čemuž došlo k odstranění nežádoucích látek a k vysušení DNeasy membrán. Na membránách tak zůstala již jen čistá DNA.

Eluce DNA (uvolnění DNA do pufru): DNeasy destičky s membránami jsem přemístila na novou 96 jamkovou destičku, do které se díky přidanému pufru uvolní DNA z membrány. Do každého vzorku jsem přidala 50 µl pufru AE a přelepila folií. Vzorky jsem nechala stát při pokojové teplotě po dobu 1 minuty a potom odstředila 2 minuty při 6000 otáčkách. Krok jsem zopakovala a opět přidala 50 µl pufru AE a odstředila. Tímto postupem jsem získala postupně všechny čtyři destičky s izolovanou DNA z mých populací.

Měření koncentrace DNA: Pro PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů bylo potřebné naředit vzorky na přibližně stejnou koncentraci DNA. Koncentraci izolované DNA jsem měřila na spektrofotometru Nanodrop UVS-99 (AvansBio). Všechny vzorky jsem naředila dvojitě destilovanou deionizovanou vodou na koncentraci 10 ng/µl. Takto připravené destičky jsem uložila do mrazáku až do PCR.

2.2.2 PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů

Při polymerázové řetězové reakci (PCR) dojde k rychlému zmnožení (amplifikaci) daného úseku DNA (zde konkrétně mikrosatelitu) přesně ohraničeného dvěma primery (*forward* – předním a *reverse* – zadním primerem) (Alberts et al. 2001). Všechny používané primery byly vyvinuty v laboratoři FŽP CZU v rámci již zmíněného řešeného projektu (GA ČR ©2019). Použití vyvinutých primerů bylo týmem optimalizováno pro tento druh. Tedy na dostupných vzorcích vybraných populací *Anemone sylvestris* byly testovány všechny vybrané primery na přítomnost daných mikrosatelitových sekvencí ve všech vzorcích. Následně bylo provedeno sestavení primerů do Multiplexu a výběr jejich správné koncentrace a optimálních teplot nasedání (*annealingu*) při PCR (tab. 2.4). Výsledný Multiplex tak umožní amplifikaci všech mikrosatelitů v daném vzorku při jedné PCR. Výsledkem je tedy mnoho kopií primery určených mikrosatelitů pro každý vzorek.

Příprava Multiplexu: Složení PCR Multiplexu, včetně příslušných objemů pro 1 vzorek uvádí tabulka (tab. 2.4). Multiplex jsem připravila pro 96 vzorků (jedna destička) najednou a to tak, že k celkovému množství složek jsem připočetla 10% rezervu pro případné ztráty způsobené nepřesností pipety. Všechny používané

primery byly již z laboratoře naředěné a barevně označené (použity jsou čtyři barvy FAM – modrá, VIC – zelená, PET – červená a NED – žlutá). Vedle mikrosatelitových primerů byl součástí multiplexu i Qiagen Multiplex PCR (složení Multiplexu: Taq DNA polymeráza, MgCl₂, dNTP Mix, Q-Solution, R-Nase free water) (Qiagen ©2018b). Všechny složky PCR multiplexu jsem před přípravou po rozmrznutí zvortexovala a krátce odstředila v centrifuze.

Tab. 2.4: Složení Multiplexu pro PCR. Voda již nebyla přidávána, celkový objem byl potřebné 4 µl.

Legenda: MM Qiagen – Qiagen Multiplex PCR, As-Tet-47-FAM – název primeru (as – *Anemone sylvestris*, Di/Tri/Tetra – primer vymezující mikrosatelit složení ze dvou/tří/čtyř nukleotidových opakujících se sekvencí, FAM/VIC/PET/NED – barva, kterou je daný primer značen, F/R – *forward* a *reverse* primer).

Multiplex1		
Složky multiplexu	V (µl) pro 1 vzorek	
MM Qiagen	2,500	
Primery		
As-Tet-47-FAM	F	0,050
	R	0,050
As-Tri-35-VIC	F	0,050
	R	0,050
As-Di-92-PET	F	0,125
	R	0,125
As-Tri-30-NED	F	0,050
	R	0,050
As-Tet-49-FAM	F	0,050
	R	0,050
As-Tet-44-PET	F	0,075
	R	0,075
As-Tet-91 -NED	F	0,050
	R	0,050
As-Di-21-VIC	F	0,200
	R	0,200
As-Di-67-NED	F	0,050
	R	0,050
As-Tet-90-FAM	F	0,050
	R	0,050
Celkový objem PCR multiplexu	4,000	

Příprava vzorků DNA pro PCR: Celou přípravu (včetně přípravy Multiplexu1) jsem prováděla v laminátovém boxu UVP (UX Sterilizing PCR Workstation). Do nové destičky jsem napipetovala 4 µl PCR Multiplexu1 (viz tab. 2.4) a 1 µl DNA (rozmrznuté, zvortexované a odstředěné na dosažení otáček). Zafoliované destičky jsem zvortexovala a odstředila na centrifuze Iniversal 320R (Hettich Zentrifugen) po dobu 1 minuty při 3000 otáčkách.

Připravené vzorky jsem vložila do termocyklerů Veriti Thermal cykler 96 Well (Applied Biosystems) a Labcykler (Sensoquest), PCR probíhala tedy pro dvě destičky paralelně. Teplotní program a jednotlivé fáze PCR reakce jsou uvedeny v tabulce (tab. 2.5). Úspěšnost amplifikace jsem již netestovala na agarozovém gelu (byla testována během optimalizace primerů). Celý proces jsem zopakovala pro PCR amplifikaci všech 380 vzorků DNA. Všechny vzorky jsem následně předala laborantce, která je připravila na fragmentační analýzu a to přípravou nové destičky, kdy každá jamka obsahovala 1 µl PCR produktu, 12 µl deionizovaného formamidu (Applied Biosystems) a 0,2 µl interního velikostního standardu Gene Trace 500 LIZ cize standard (žebříček). Analýza probíhala v automatickém sekvenátoru Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Výstupem ze sekvenátoru byla data s příponou *.fsa, která poté vstupovala do dalšího vyhodnocování prostřednictvím počítačových programů.

Tab. 2.5: Teplotní program PCR reakce pro značené primery nastavený v termocykleru. T udává teplotu během reakce ve °C, t značí čas, po který trvá daná fáze programu (v minutách či sekundách) a op. vyjadřuje počet opakování dané fáze programu. Fáze reakce značí, co v daný okamžik při PCR reakci probíhá: úvodní denaturace – rozpletení dvouvláknové DNA, opakovaná sekvence s nasedáním primerů – annealingu a syntetizováním produktů, tedy mikrosatelitů Taq polymerázou (opakování pro zvýšení počtu syntetizovaných fragmentů), závěrečná extenze – plné dosyntetizování všech produktů (Alberts et al. 2001).

PCR program						
Fáze reakce	Úvodní denaturace	Denaturace	Nasedání primerů	Extense	Závěrečná extenze	
T (°C)	95	95	55	72	72	4
t	15 min	30 s	30 s	30 s	10 min	∞
op.	1 x	35 x			1 x	

2.3 Analýza molekulárních dat

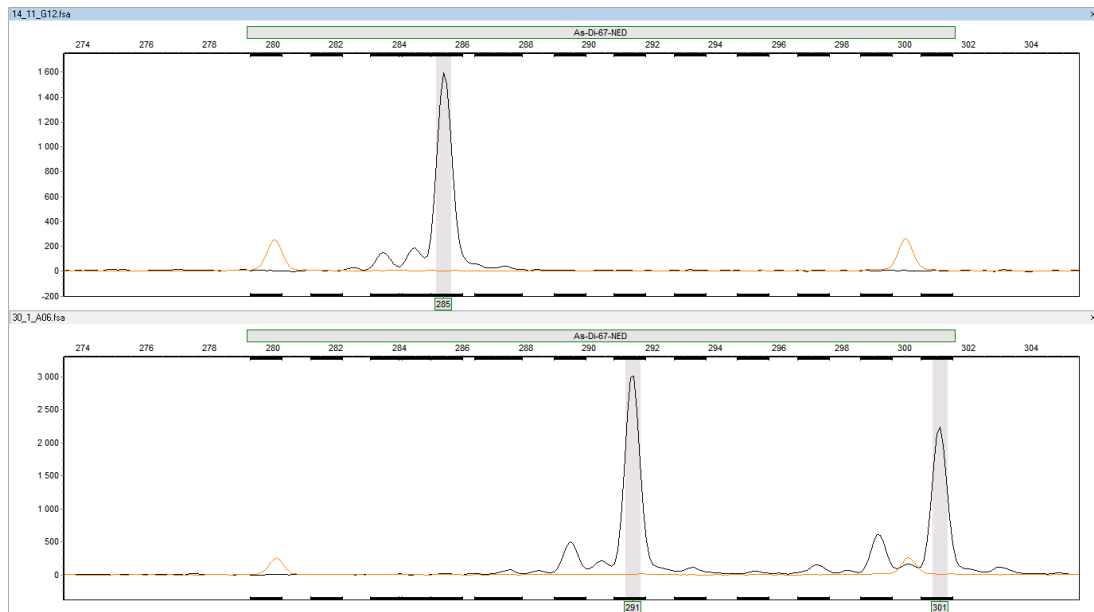
2.3.1 Analýza mikrosatelitových dat

Mikrosatelitová data jsem prohlížela v programu GeneMarker (verze 2.4.0, SoftGenetics), přičemž jsem analýzu prováděla již pro všechny vzorky, včetně zahraničních populací. Při načítání vzorků jsem nastavila párování se standardem (*size standard – GMC*), aby měl program při analýze dat stanovený standard pro délky píků, dále fragmentační analýzu u rostlin (*Fragment Plant*) a v editačním panelu označila druh jako diploidní (*Diploid*). Následně jsem spustila analýzu.

Pro každý vzorek se zobrazil jeden nebo dva píky symbolizující jednotlivé alely pro každý mikrosatelitový lokus. To značí homozygotního (přítomnost pouze jedné alely v daném lokusu) či heterozygotního jedince (přítomnost dvou alel). Přibližná délka každého mikrosatelitového lokusu byla známa z procesu optimalizace primerů (tab. 2.6). V tomto rozmezí počtu bazí by se měly v daném programu nacházet všechny alely příslušné danému lokusu. Zároveň byl každý lokus určen barvou, již byly označeny primery, které amplifikovaný mikrosatelitový úsek vymezují. Počet bazí a barva tak specificky určily každý mikrosatelitový lokus (obr. 2.6). Zároveň správné seřazení alel podle počtu bazí umožnil velikostní standard Gene Trace 500 LIZ (žebříček) přidáný před analýzou v sekvenátoru.

Tab. 2.6: Očekávané délky jednotlivých mikrosatelitových lokusů dané počtem bazí tvořících daný mikrosatelit (včetně specifických sekvencí, na něž nasedají dané primery). V rozmezí těchto délek by se měly nacházet všechny alely příslušné danému mikrosatelitu.

Barva	FAM			VIC	
Primer	As-Tet-47	As-Tet-49	As-Tet-90	As-Tri-35	As-Di-21
Očekávaná délka mikrosatelitového lokusu	167-184	197-216	407-466	182-197	280-286
Barva	PET		NED		
Primer	As-Di-92	As-Tet-44	As-Tri-30	As-Tet-91	As-Di-67
Očekávaná délka mikrosatelitového lokusu	171-200	207-222	168-203	214-222	301-320

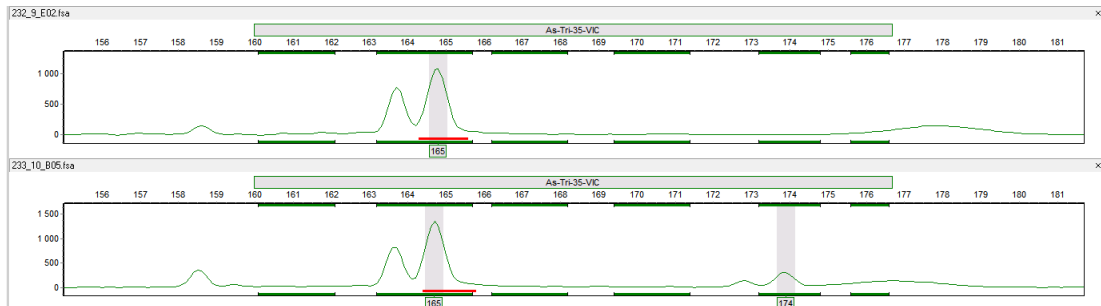


Obr. 2.6: Ukázka jednoho mikrosatelitového lokusu zobrazeného programem GeneMarker pro dva různé vzorky. U prvního vzorku je přítomna pouze jedna alela, jedná se tedy o homozygota se dvěma stejnými alelami o délce 285 bazí na tomto lokusu. Druhý vzorek je příkladem heterozygota se dvěma různými alelami o délkách 291 a 301 bazí.

Legenda: Černou barvou jsou označeny jednotlivé alely (zde se jedná o zobrazení mikrosatelitu značeného žlutou barvou NED, kterou program zobrazí jako černou). V horním rámečku je označen příslušný mikrosatelitový lokus zde vymezený primerem As-Di-67. Osa x značí počet bazí, na ní se řadí dle délky jednotlivé fragmenty, osa y značí intenzitu jednotlivých píků, oranžovou barvou je znázorněn žebříček.

Prohlédla jsem všechny vzorky a upravila následující problémy v programu. Pro všechny vzorky jsem upravila podle přítomných alel hranice pro délku předpokládaného mikrosatelitového lokusu (některé alely byly mimo rozsah délek, na níž byly očekávány dle dat z optimalizace) a zaokrouhlila alely, pro každý mikrosatelit stejným způsobem, na celá čísla (každá alela je daná počtem nukleotidů, tedy celým číslem).

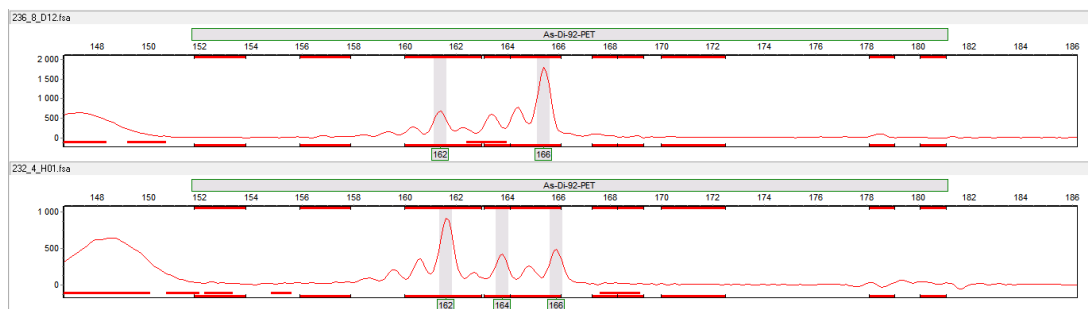
Často docházelo v programu ke čtení pouze první alely o vysoké intenzitě a nečtení druhé malé alely. Způsobil to zřejmě jev zvaný *allele drop-out*, kdy není ve vzorku při PCR dostatek DNA a první alela je proto množena preferenčně a druhá méně (viz obr. 2.7) (Piyamongkol et al. 2003). Výsledek pak ukazuje na falešnou homozygotitu namísto heterozygotních jedinců. V programu jsem proto manuálně menší alelu doplnila.



Obr. 2.7: Demonstrace *allele drop-out* (ADO). První vzorek je homozygot s alelou 165. V druhém případě byla původně programem čtena pouze alela 165. Jedná se však o heterozygota s alelami 165 a 174.

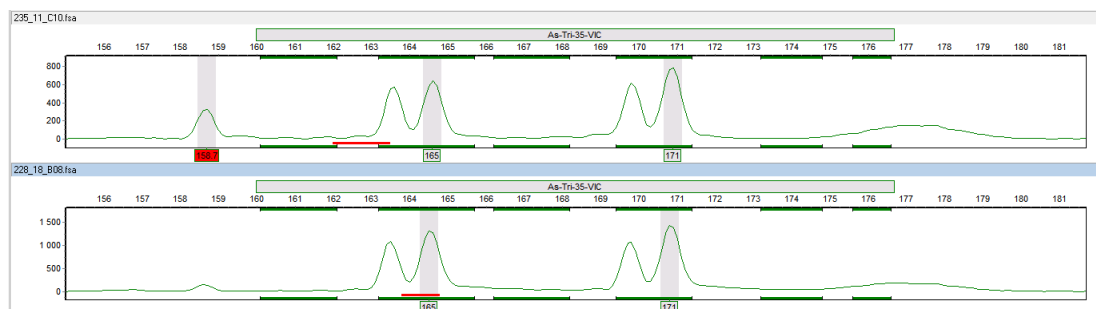
Další komplikací bylo obtížné čtení některých alel, kdy buď mohlo dojít k posunu alely o jednu bázi vlivem mutace a mikrosatelit tak byl zkrácen a vznikla alela nová anebo došlo pouze k netemplátovému přidání adenosinu na 3' konec mikrosatelitového řetězce Taq DNA polymerázou, zde by se nejednalo o jinou alelu, ale pouze o tzv. +A alelu rodičovské alely (Smith et al. 1995).

Dále bylo mnohdy problematické určení heterozygotních alel v případě, kdy byly jednotlivé alely blízko sebe, či se překrývaly a zároveň vytvářely velké množství *stutterů*. *Stutter* je artefaktem amplifikace mikrosatelitové sekvence způsobený sklouznutím Taq DNA polymerázy při amplifikaci a tím přeskočením repetitivní jednotky a jeho délka je obvykle o jednu jednotku opakování kratší než samotná rodičovská alela. Některé alely vytvářejí několik *stutterů*, jejichž vzdálenosti od rodičovské alely jsou právě násobky těchto jednotek (u di-nukleotidové opakující se sekvence budou *stuttery* od rodičovské alely vzdáleny o násobek 2 bazí, tedy budou o 2, 4, 6... bazí kratší než rodičovská alela) (viz obr. 2.8) (Brookes et al. 2012; Hosseinzadeh-Colagar et al. 2016).



Obr. 2.8: Alely příslušející mikrosatelitovému lokusu tvořené di-nukleotidovou opakující se jednotkou. Každá alela vytváří velké množství *stutterů* vzdálených od rodičovské alely o 2 nukleotidy, tedy o 1 repetici (k alele na pozici 166 tak náleží *stutter* na pozici 164). Obvykle lze určit rodičovskou alelu podle předcházejících *stutterů* a intenzity píku. U prvního vzorku se však jedinec jeví jako heterozygot s alelami 162 a 166, kdy každá z nich vytváří velké množství *stutterů* a rodičovské alely jsou díky vysoké intenzitě již dobře patrné. Ve druhém případě však není jasné, zda se nejedná o tři alely na pozicích 162, 164 a 166 (jednalo by se o tetraploidního jedince, který by měl jednu z uvedených alel přítomnou ve dvou kopiích).

Na řadě míst vznikaly i falešné píky, jejichž přítomnost byla způsobena pouze částečným čtením mikrosatelitů, kdy Taq DNA polymeráza sklouzla při jejich čtení a přeskočila tak i několik opakování dané mikrosatelitové jednotky. Vznikala tak situace naznačující znásobenou ploidii vzorkované rostliny a přítomnost tří alel, ale přitom se jednalo pouze o fragment některé z rodičovských alel (obr. 2.9) (Hosseinzadeh-Colagar et al. 2016).



Obr. 2.9: Fragment alely na pozici 159 způsobený sklouznutím Taq DNA polymerázy vytváří falešný pík a zdánlivou další alelu mikrosatelitového lokusu u prvního vzorku. Všechny rodičovské alely mají však k sobě přítomnou i tzv. +A alelu (alelu s přidaným adenosinem na 3 konci řetězce, kterou fragment na pozici 159 nemá).

Vzhledem k velkému počtu nejasností při čtení alel u některých primerů, podezření na polyploidizaci u některých vzorků (obr. 2.10) a neúspěšné PCR amplifikaci některých lokusů i celých vzorků bylo nutné celý proces zopakovat. U vzorků, kde nedošlo k amplifikaci většiny mikrosatelitových lokusů jsem znovu izolovala DNA (celkem 19 vzorků) pomocí *DNeasy plant mini kit*, postupovala jsem

přesně podle protokolu určeného pro izolaci tímto kitem (Qiagen ©2016). A následně provedla znovu i PCR. V případě podezření na polyploidní jedince (u vzorků přítomnost několika tří-alelových lokusů) jsem zopakovala PCR reakci se všemi primery. Vzorky, u nichž bylo nejasné čtení některých lokusů, jsem rozdělila do skupin podle primerů, které jsem u nich potřebovala zopakovat. V těchto skupinách potom byla provedena znovu PCR tentokrát však již s multiplexem tvořeným pouze problematickými primery. Objem vybraných primerů se shodoval s jejich objemem v původním Multiplexu 1 (viz tab. 2.4), nový multiplex byl doplněn do požadovaného objemu 4 μ l pro jeden vzorek vodou bez přítomnosti R-Nasy (*R-Nase free water*).



Obr. 2.10: Ukázka pravděpodobně tetraploidního jedince v populaci. První vzorek má na dvou mikrosatelitových lokusech (As-Tri-30 a As-Di-67) přítomné tři alely, zatímco ve druhém případě se jedná o heterozygota na všech třech mikrosatelitových lokusech.

Nově získaná data jsem následně porovnávala se stávajícími a doplnila chybějící alely. U některých vzorků bylo však riziko špatné determinace alel natolik vysoké, že jim byla pro další analýzy stanovena hodnota 0 pro daný chybný mikrosatelitový lokus. Z dalších analýz byly dále vyřazeny 4 vzorky z populace 232, u nichž přetrvávalo podezření na polyploidizaci a stále se jevíli na více mikrosatelitových lokusech zároveň jako tetraploidní (na lokusu se opětovně vyskytovaly tři alely).

Výstupem z programu GeneMarker pro další statistické vyhodnocení byla tabulka v MS Excel znázorňující všechny populace a vzorky v rámci nich a k nim hodnoty příslušných alel pro každý zkoumaný mikrosatelitový lokus, tedy pro 10 lokusů určených příslušnými značenými primery (viz příloha č. 1).

2.4 Vyhodnocení molekulárních dat

2.4.1 Základní populačně-genetické charakteristiky

Nejprve jsem připravila vstupní matici populací, jedinců a jim příslušejících alel pro všechny mikrosatelitové lokusy. Matice vznikla úpravou výstupu z programu GeneMarker v MSExcel. Matici jsem vložila do poznámkového bloku a upravila chybějící hodnoty v jednotlivých lokusech na hodnotu 0. Celý soubor jsem uložila s příponou *.dat.

Základní parametry jsem vypočítala v programu Fstat 2.9.3 (Goudet 1995). Genetickou diverzitu všech populací jsem popsala pomocí následujících parametrů: počtu polymorfních lokusů (P , jedná se o lokusy s více než jednou alelou), průměrného počtu alel na lokus (A , je však ovlivněn velikostí vzorku/populace) a alelickou bohatostí (A_R , *allelic richness*, umožňuje porovnávat různě velké vzorky různě velkých populací). Dále jsem prostřednictvím programu R 3.5.1, knihovna adegenet 2.0.0, vypočítala koeficient inbreedingu pro jednotlivé populace (F_{IS}), pozorovanou heterozygotitu v dané populaci (H_O , *observed heterozygosity*, tj. průměrnou heterozygotitu populace pro vzorky o 10 různých lokusech) a očekávanou heterozygotitu (H_E , *expected heterozygosity*, tj. podíl heterozygotních jedinců v případě, že je daná populace v HWE) (Allendorf & Luikart 2007). V tomto programu bylo testováno, i zda jsou jednotlivé populace v Hardy-Weinbergově rovnici (HWE) (Fath 2018).

V programu GenAIEx 6.51b2 (Peakall & Smouse 2006; Peakall & Smouse 2012) jsem určila počet unikátních alel pro populaci (A_U), tedy alel které se vyskytují právě v jedné populaci ze všech analyzovaných. Dále jsem v programu vytvořila grafy shrnující alelickou bohatost u jednotlivých populací. Program funguje jako doplněk k MSExcel, nebylo proto nutné měnit formát dat.

Míru závislosti parametrů, které popisují genetické složení populací, na velikosti populace jsem vyjádřila a vizualizovala pomocí lineární regrese v programu Statistica (Tibco Software). Stejný program jsem použila i pro vyjádření korelací některých populačních charakteristik.

2.4.2 Klonální struktura uvnitř populací

Klonální strukturu populací jsem popsala pomocí parametrů vypočtených pomocí programu GenClone 2.0 (Arnaud-Haond & Belkhir 2006). Vytvořila jsem celkem 25 vstupních souborů, pro každou populaci separátní soubor s příponou *.txt. Pro každou populaci jsem testovala matici alel daných vzorků. Vzorky, které obsahovaly neznámé hodnoty pro některé lokusy, jsem z výpočtů vyřadila. Program neumí pracovat s neznámými hodnotami, díky jejich přítomnosti vyhodnotí vzorek jako unikátní genotyp a sníží tak případnou míru klonality (Arnaud-Haond & Belkhir 2006). Testovány byly tyto parametry: počet různých MLG (G , MLG – *multi locus genotype*), genotypová bohatost (R , *genotypic richness*), p_{gen} (pravděpodobnost výskytu daného genotypu) a p_{sex} (pravděpodobnost, že určitý genotyp, který se v populaci vyskytl vícekrát, je výsledkem pohlavního rozmnožování) (Arnaud-Haond et al. 2007).

2.4.3 Prostorová struktura populací

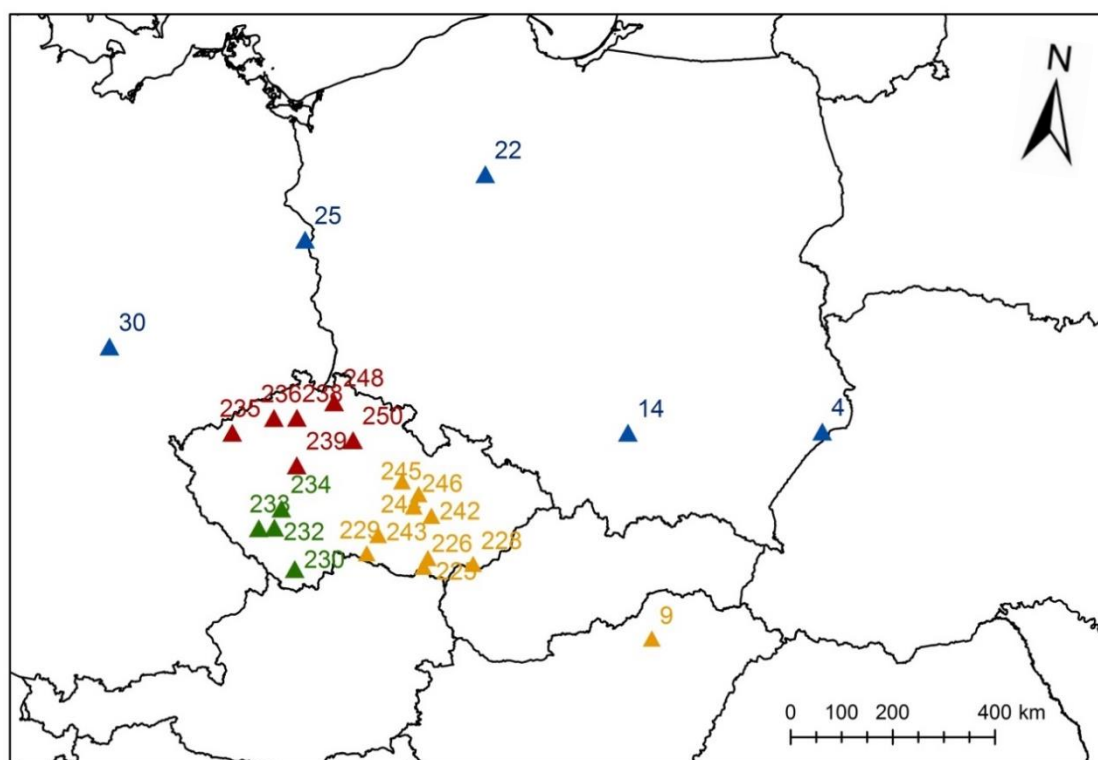
2.4.3.1 Analýza molekulární variance

Způsob rozložení genetické variability mezi populacemi a uvnitř populací jsem vypočítala pomocí programu Arlequin 3.5.2.2 analýzou molekulární variance AMOVA (Excoffier & Lischer 2010). Analýza umožňuje porovnávat i variabilitu mezi skupinami populací. Pro tyto účely jsem rozdělila populace do čtyř skupin, v rámci nichž bych, dle geografické polohy, očekávala stejný či podobný původ (velké oblasti souvislejších nížin s výskytem vhodných stanovišť druhu vzájemně oddělené geografickou bariérou, zde se jedná zejména o pohoří) (viz tab. 2.7 a obr. 2.10). Analýzu jsem provedla jak pro celý dataset rozdělený na skupiny populací, tak pro jednotlivé skupiny populací, abych mohla vylišit skupinu, v níž jsou populace geneticky podobnější, než v rámci jiných skupin.

Pro tento program byl nutný převod souboru s příponou *.dat na jiné rozložení matice do souboru s příponou *.arp. Pro převod na tento formát jsem použila program PGDSpider 2.1.1.5 (Excoffier & Lischer 2012). Do této matice jsem doplnila rozdělení na 4 skupiny a zařazení jednotlivých populací do těchto skupin.

Tab. 2.7: Rozdělení populací do skupin dle jejich společného geografického původu.

Skupina populací	Populace ve skupině									
	225	226	228	229	242	243	244	245	246	9
Moravsko-panonská oblast										
Oblast jihočeských pánví	230	232	233	234						
Oblast České tabule	235	236	238	239	248	250				
Oblast Německo-Polských nížin	14	22	25	30	4					



Obr. 2.10: Rozdělení populací do skupin dle jejich společného geografického původu.

Legenda: ▲ – Moravsko-panonská oblast; ▲ – Oblast jihočeských pánví; ▲ – Oblast České tabule; ▲ – Oblast Německo-Polských nížin.

2.4.3.2 Genetický tok a analýza hlavních koordinát (PCoA)

V programu Arlequin 3.5.2.2 jsem rovněž vypočítala párový F_{ST} index vyjadřující genetický tok mezi dvěma populacemi, tedy míru jejich podobnosti založenou na frekvencích alel (Allendorf & Luikart 2007). Výstupem byla matice párových F_{ST} hodnot pro každou dvojici populací a statistická průkaznost genetické diference dané dvojice. Dále jsem v téže programu vypočetla Slatkinův R_{ST} index (Slatkin 1995). Ten je založen na počtu opakování mikrosatelitového motivu. Bere tedy

v úvahu možnost mutace alely přidáním či odstraněním jedné jednotky díky *DNA slippage*. Takto vzniklé dvě různé alely si budou v modelu příbuznější ve srovnání s F_{ST} , kdy jsou odlišné alely považovány za unikátní (Slatkin 1995). Pro výpočet R_{ST} bylo nutné připravit nový vstupní soubor, který bude místo délek alel obsahovat počet motivů jejich opakování. K tomuto účelu byl využit program Convert (Glaubitz 2004).

Pro vizualizaci vztahů mezi dvojicemi populací jsem provedla analýzu hlavních koordinát PCoA (*principal coordinate analysis*). Vztahy jsem tímto vyjádřila prostřednictvím ordinačního diagramu, který na základě genetické vzdálenosti mezi populacemi (vyjádřeno pro F_{ST} a R_{ST}) převede populace do prostoru tak, aby byla maximalizována vysvětlená variabilita. Pro výpočet vysvětlené variability a grafickou vizualizaci jsem použila program Past 3.22 (Hammer et al. 2001). Vstupními daty byla v MSExcel upravená symetrická distanční matice (výstup F_{ST}/R_{ST} hodnot z programu Arlequin). V ordinačním diagramu jsem zobrazila 1. a 2. osu, které vysvětlovaly nejvíce variability. Jednotlivé populace jsem v diagramu barevně rozdělila do větších skupin odpovídajících geografické příbuznosti stejně jako u analýzy variance (viz výše). Příbuznost vztahů jsem vizualizovala pomocí analýzy UPGMA, metodou shlukování populací s nejmenší genetickou vzdáleností, v programu Past 3.22 (Hammer et al. 2001). Jako kritérium pro rozdělení populací jsem zvolila již jen hodnoty F_{ST} .

2.4.3.3 Izolace vzdáleností

Izolaci vzdáleností (IBD, *isolation by distance*) tedy souvislost mezi geografickou vzdáleností mezi populacemi a mírou jejich genetické diferenciace jsem znázornila v programu Past 3.22 proložením regresní přímky metodou lineární regrese. Vstupními daty byly hodnoty F_{ST} pro každou dvojici populací a k nim příslušná hodnota jejich vzájemné geografické vzdálenosti. Matici geografických vzdáleností jsem získala z GPS souřadnic jednotlivých populací pomocí programu GDMG 1.2.3 (Geographic Distance Matrix Generator) (Ersts 2019). GPS souřadnice jsem před výpočtem matice převedla do formátu WGS84.

Dále jsem spočítala v programu Arlequin 3.5.2.2 Mantelův test tj. korelaci matic genetických a geografických vzdáleností. Vstupním souborem byl již výše

uvedený soubor ve formátu *.arp, do kterého jsem doplnila matici párových F_{ST} a matici geografických vzdáleností.

2.4.4 Kryptická struktura populací

Pro určení základních genetických klastrů, z nichž zkoumané populace povstaly, a tedy zařazení jedinců do určitého počtu klastrů nezávislém na mém definovaném počtu separátních populací, jsem využila program InStruct (Gao et al. 2007). Program, na rozdíl od často používaného programu Structure (Pritchard et al. 2000), umožňuje analýzu populací, které nejsou v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Vstupní datový soubor jsem vytvořila převodem z původního v programu PGDSpider 2.1.1.5. Pro běh programu je nutné určit počet K , tedy klastrů, do nichž se budou jednotlivé populace dělit a jejichž pravděpodobnost bude potom následně testována. Testováno bylo celkem 25 klastrů, přičemž pro každé K je nutné spustit program zvlášť. Vzhledem k velké výpočetní náročnosti programu mi program InStruct pustil prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D. na fakultních počítačích. Dále jsem pak zpracovávala výstupy z programu. Podobně jako v programu Structure, i zde bylo nutné zvolit model: *with admixture*, který zohledňuje případný společný původ (genový tok z jiných populací) a tedy sdílení části genů a jejich alelických frekvencí mezi různými jedinci. Další parametry pro chod programu byly nastaveny následovně: počet generací burn-in na 500 000 (délka běhu programu), počet generací na 1 000 000 (počet kroků Markov chain řetězce, *Number of MCMC Reps after Burnin*) a počet řetězců jako 10 (počet běhů pro každé K).

Pro výběr optimálního počtu klastrů (K) jsem z výstupů z programu InStruct vytvořila graf v MsExcel. Z výstupů pro každé K jsem použila průměrnou pravděpodobnost pro dané K (logaritmus pravděpodobnosti). Pro každý řetězec (běh programu pro dané K) byla modelem vypočítána i pravděpodobnost, tedy 10 hodnot pro dané K . Z těch jsem určila průměrnou pravděpodobnost a její standardní odchylku, dále jsem pak dle Evanno et al. 2005 vytvořila grafy vztahů: logaritmu likelihood modelu $[\ln P(D)]$ a počtu klastrů (K) a graf ΔK a K (tj. jakých hodnot dosahuje vybrané K). Na základě těchto údajů jsem stanovila optimální K .

Dále jsem pracovala již jen s výstupy z programu InStruct pro vybraná K . Z výstupu jsem si vykopírovala z každého běhu do nového souboru údaje o rozdělení

populací do klastrů a do dalšího souboru údaje o rozdělení jedinců. Populace jsem přečíslovala tak, aby mohly být běhy spojeny do jednoho pomocí programu Clumpp 1.1.2b (Jakobsson et al. 2007) (program InStruct začal číslovat všechny populace od 0, zatímco program Clumpp vyžaduje číslování od 1, podobně i s jedinci). Dále jsem spojila všechny nezávislé běhy (iterace) pro vybrané K do jedné průměrné v programu Clumpp 1.1.2b. Pro program jsem použila z výsledků zvlášť soubor pro jednotlivce *.indfile a zvlášť pro populace *.popfile (pro mnou vybrané K). Pro každý soubor jsem připravila soubor s parametry pro program *paramfile*, kde jsem upravila K – počet klastrů, počet iterací, počet jedinců/populací (podle toho, zda daný soubor příslušel k populacím či jedincům) a metodu jsem nastavila jako algoritmus *Greedy* (*Greedy option 2* – náhodné vstupní pořadí, *Repeats 1000* – počet opakování). Metoda Greedy pracuje sice v omezenějším rozsahu a není tedy tak přesná jako metoda fullSearch, ale vzhledem k velkému rozsahu vzorků není zdaleka tak časově výpočetně náročná jako přesnější metoda (Jakobsson et al. 2007). Po proběhnutí programu jsem dostala dva výstupní soubory s příponou *.outfile pro populace a pro jedince zvlášť.

Vizualizaci zařazení jedinců/populací do jednotlivých klastrů jsem provedla v programu Dstruct 1.1 (Rosenberg 2004). Pro program jsem změnila přípony u výstupních souborů z programu Clumpp na *.indivq pro jedince a na *.popq pro populace. Dále jsem vytvořila soubor *.names s číslováním a názvy populací a soubor *.perm barvami pro každý klast. V posledním souboru *drawparams*, který udává parametry pro vykreslení bar plotu, jsem opravila názvy vstupních a výstupních souborů, počet klastrů, populací a jedinců a parametry pro vzhled bar plotu. Výsledný soubor s příponou *.ps jsem překonvertovala do formátu PDF pomocí programů Ghostscript 9.26 a GSview 5.0 (Artifex Software). Genetické složení populací jsem vizualizovala v mapě pomocí koláčových grafů. Podkladem byl vstupní soubor se složením populací pro program Dstruct (podíl zastoupení jednotlivých klastrů v rámci populace).

3. Výsledky

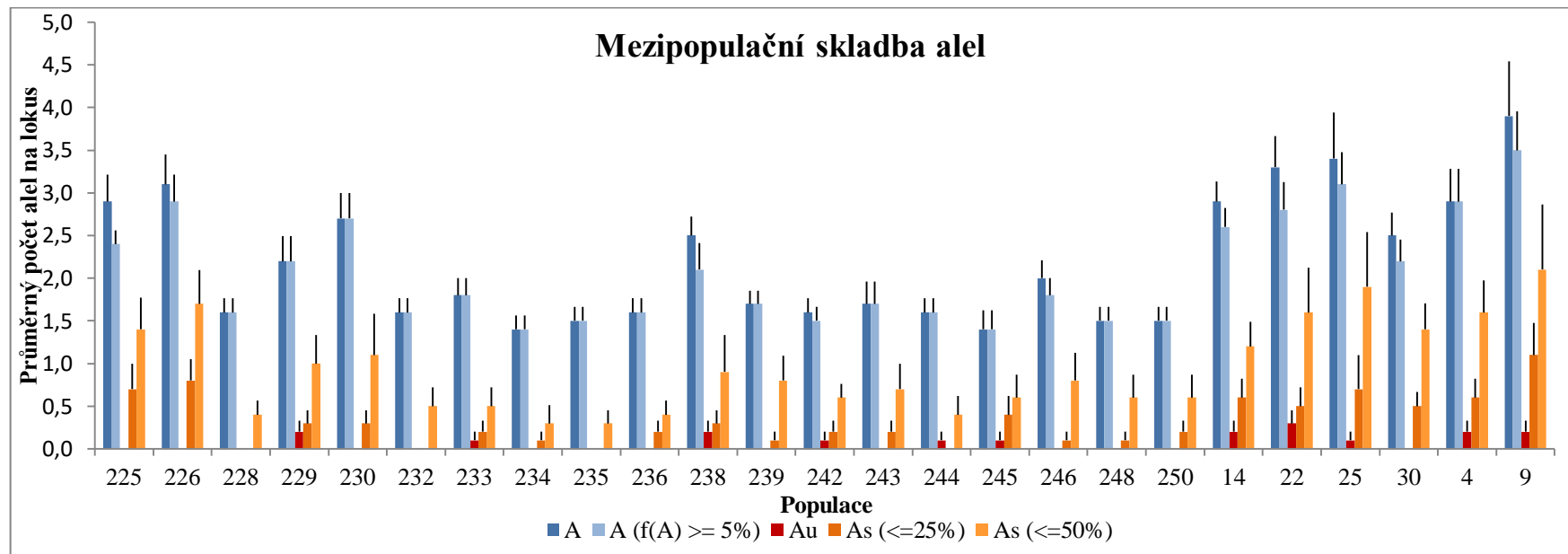
3.1 Základní populačně-genetické charakteristiky

Pro určení základních charakteristik všech populací byl v programu Arlequin stanoven počet polymorfních lokusů, průměrný počet alel a alelická bohatost (*allelic richness*) (viz tab. 3.1, obr. 3.1).

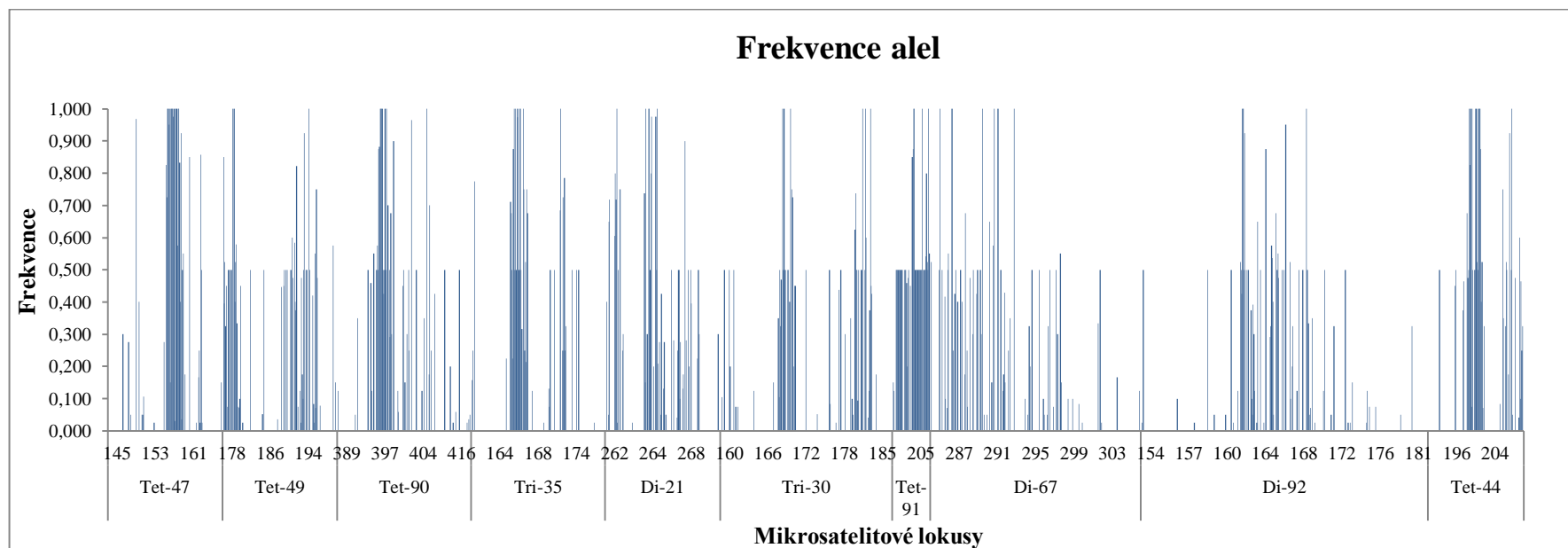
V populacích v České republice se počet polymorfních lokusů, tedy lokusů, kde jsou v populaci zastoupeny alespoň dvě alely, pohyboval od 4 do 10, zatím co zahraniční populace vykazovaly téměř 100% zastoupení polymorfních lokusů v populacích, což se pojí i s dopovídající vyšší genetickou bohatostí populací.

Jako geneticky nejbohatší populace (největší alelická bohatost; $A_R > 2$, se jeví populace jižní Moravy (populace č. 225 a 226). Dále pak populace v Českém Krumlově (populace č. 230) a u Vědlic (populace č. 238). Zároveň je u jihomoravských populací a u populace z Českého Krumlova koeficient inbreedingu nejbližší 0 (viz tab. 3.2). Naopak ostatní populace v České republice nedosahují $A_R = 2$, jedná se tedy o velmi geneticky chudé populace. Extrémními případy jsou lokality Nerestce (234), Lestkov (235), Malá Vrbka (238), Lochkov (239) a Banín (245), kde alelická bohatost nepřesahuje 1,7 a zároveň je koeficient inbreedingu blízký nebo roven -1, tedy populace jsou výrazně heterozygotní. Celková nízká alelická bohatost populací v ČR ukazuje často na přítomnost nejvýše dvou alel na lokus (viz obr. 3.2). Zároveň v rámci populací v České republice, není alelická bohatost korelována s velikostí populací (viz obr. 3.3). Geneticky nejbohatší jsou však zahraniční lokality (Polsko, Německo a Maďarsko) (A_R se pohybuje v rozsahu 2,3 – 3,5), mezi nimiž nejvíce vyniká Bükk v Maďarsku s $A_R = 3,472$ (populace č. 9). Zároveň je i koeficient inbreedingu u zahraničních populací blízký 0, především u polských populací 14 ($F_{IS} = -0,097$) a 22 ($F_{IS} = -0,038$). Chybí však terénní záznamy velikosti zahraničních populací, proto zde nemůže být vztažen F_{IS} k velikosti populace, která by mohla být příčinou takto vyrovnaných hodnot.

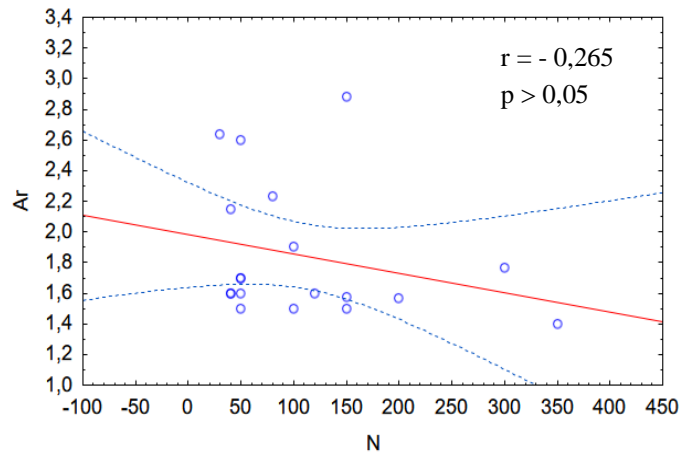
V populacích byl stanoven počet unikátních alel (A_U ; alely přítomné právě v jedné populaci v rámci všech analyzovaných). Největší zastoupení těchto alel je v zahraničních populacích (1-3 unikátní alely na populaci). V České republice jsou vzácné alely přítomny pouze v 6 populacích v počtu jedné, maximálně dvou vzácných alel na populaci. Korelace počtu unikátních alel s velikostí populace zde nebyla prokázána (viz obr. 3.4).



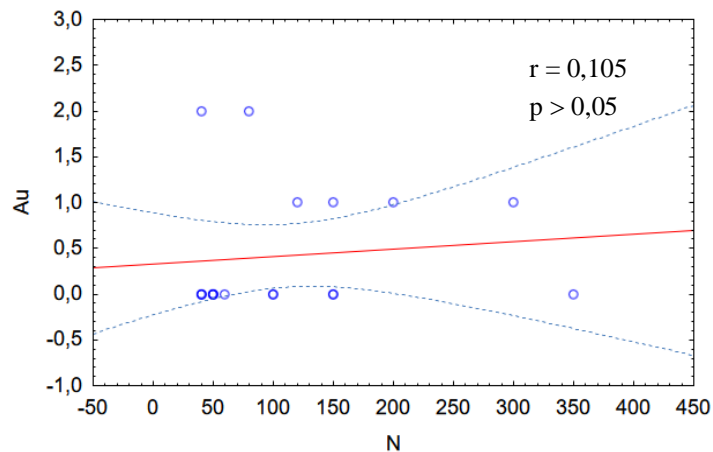
Obr. 3.1: Skladba alel v jednotlivých populacích. Na ose x jsou vyneseny jednotlivé populace, na ose y průměrný počet alel na lokus v dané populaci. Legenda: A – průměrný počet alel; A (f(A) >= 5%) – počet alel, jejichž frekvence je větší nebo rovna 5%; Au – průměrný počet unikátních alel na lokus v dané populaci, As <= 25% - průměrný počet alel, které sdílí méně než či právě 25% populací; As <= 50% - průměrný počet alel, které sdílí méně než či právě 50% populací.



Obr. 3.2: Alelické frekvence pro jednotlivé lokusy a populace. Na ose x je vynesena délka fragmentů (jednotlivé alely na mikrosatelitových lokusech), na ose y alelická frekvence, modrou čárkou jsou označeny frekvence alel v každé populaci pro daný lokus. Z grafu je patrná nerovnoměrnost, kdy některé lokusy v určitých populacích jsou čistě homozygotní s fixovanou jedinou alelou (frekvence = 1) – zbylé odstranil genetický drift, zato část lokusů je heterozygotní s fixací právě dvou alel (frekvence = 0,5), kdy nedošlo k jejich odstranění genetickým driftem. Tyto dva extrémní případy zcela převažují ve velké části populací (alely o jiných frekvencích se vyskytují méně často).



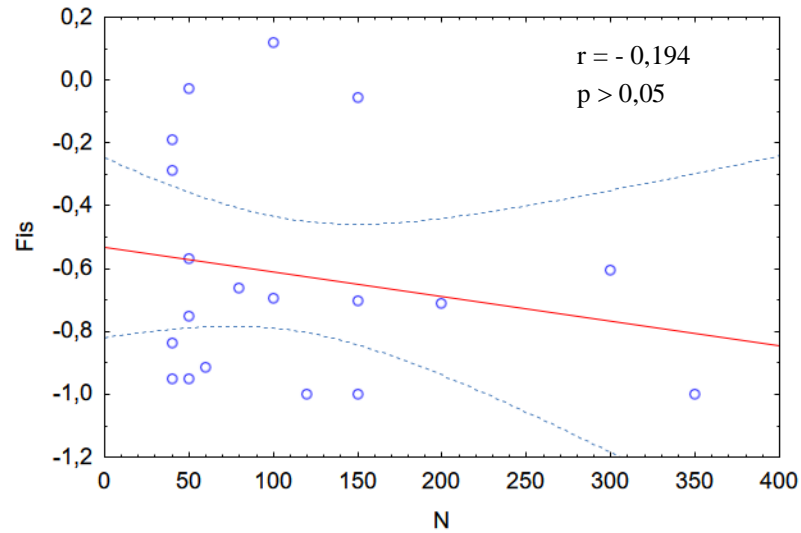
Obr. 3.3: Korelace alelické bohatosti (A_R , *allelic richness*) s velikostí populace (N) u populací v ČR. Zobrazen 95% konfidenční interval.



Obr. 3.4: Korelace počtu unikátních alel (A_U) s velikostí populace (N) u populací v ČR. Zobrazen 95% konfidenční interval.

Určení, zda jsou populace v HWE či nikoli (založené na odlišnostech pozorované a očekávané heterozygoty) bylo provedeno v programu R, nikoli v programu Arlequin, který z analýz odstraňoval monomorfní lokusy v populaci (homozygotní lokusy s přítomností pouze 1 alely v celé populaci), čímž ještě více vyklonil hodnoty pozorované heterozygoty do extrému. Všechny analyzované populace se průkazně liší od HWE přičemž dle koeficientu inbreedingu F_{IS} (hodnoty často se blíží $F_{IS} = -1$) a srovnání pozorované a očekávané heterozygoty (H_O a H_E) zde dochází k výrazným odchylkám ve směru vysokého zastoupení

heterozygotních jedinců (bráno poměrně přes všechny lokusy) (viz tab. 3.1). F_{IS} (podobně jako pozorovaná heterozygotita – veličiny vzájemně korelují, zobrazena proto pouze korelace F_{IS}) nejsou korelovány s velikostí populace (viz obr. 3.5).



Obr. 3.5: Korelace koeficientu inbreedingu (F_{IS}) s velikostí populace (N) u populací v ČR. Zobrazen 95% konfidenční interval.

Tab. 3.1: Genetická diverzita populací *Anemone sylvestris*, základní populačně-genetické parametry. Legenda: Pop. – číslo populace, V – konečný počet hodnocených vzorků (některé po hodnocení lokusů kvůli možné polyploidizaci odstraněny), N_P – odhadovaná velikost populace udávaná v počtech jedinců, Zeměpisná šířka a délka – GPS souřadnice ve formátu WGS84, P – počet polymorfních lokusů, A – průměrný počet alel na lokus, A_R – alelická bohatost (*allelic richness*), A_U – počet unikátních alel (alely přítomné právě v jedné populaci), F_{IS} – koeficient inbreedingu (* u hodnoty značí, že populace **není** v HWE), H_O – pozorovaná heterozygotita, H_E – očekávaná heterozygotita. Graficky shrnuje populační charakteristiky zaměřené na alelické složení populací obr. 3.1).

Pop.	V	Země	Lokalita	N_P	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	P	A	A_R	A_U	F_{IS}	H_O	H_E
225	20	CZE	Pouzdřany	40	48.9424325	16.6434167	10	2,9	2,73	-	-0.190*	0,52	0,43
226	20		Velké Dunajovice	150	48.8451322	16.5646100	10	3,1	2,93	-	-0.055*	0,52	0,49
228	20		Malá Vrbka	40	48.8779469	17.4377625	6	1,6	1,68	-	-0.953*	0,60	0,30
229	20		Menhartice	40	48.9994331	15.5672897	7	2,2	2,11	2	-0.288*	0,42	0,32
230	20		Český Krumlov	50	48.8180111	14.3024378	10	2,7	2,76	-	-0.027*	0,47	0,46
232	16		Rovná u Zbuše	60	49.2917758	13.9449078	6	1,6	1,6	-	-0.915*	0,56	0,29
233	20		Hejná	300	49.2868278	13.6717025	7	1,8	1,74	1	-0.605*	0,42	0,26
234	20		Nerestce	350	49.5089336	14.0688111	4	1,4	1,40	-	-1.000*	0,40	0,20
235	20		Lestkov	150	50.3628658	13.2078789	5	1,5	1,500	-	-1.000*	0,50	0,25
236	20		Kocourov	40	50.5255719	13.9406467	6	1,6	1,600	-	-0.836*	0,54	0,29
238	20		Vědlice	80	50.5280256	14.3426936	10	2,5	2,235	2	-0.661*	0,61	0,37
239	20		Lochkov	50	49.9976886	14.3395692	7	1,7	1,700	-	-0,950*	0,70	0,36
242	20		Žďár	200	49.4267447	16.7037856	6	1,6	1,563	1	-0.710*	0,50	0,30

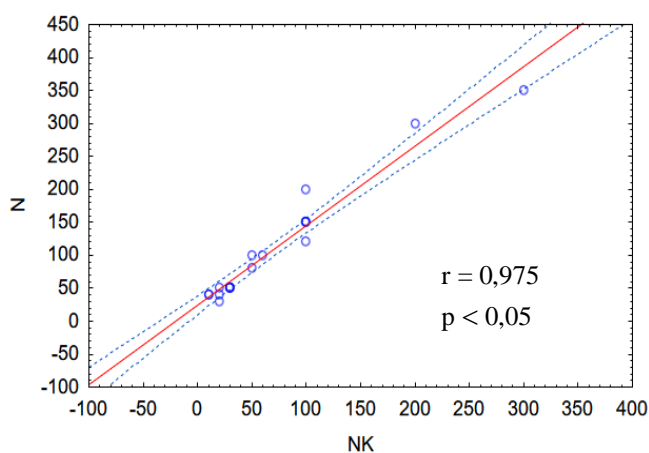
Pop.	V	Země	Lokalita	N _P	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	P	A	A _R	A _U	F _{IS}	H _O	H _E
243	20	CZE	Markvartice	50	49.2079500	15.7691700	5	1,7	1,696		-0.568*	0,37	0,24
244	20		Chotěnov	150	49.8162767	16.1897347	6	1,6	1,576	1	-0.703*	0,48	0,28
245	20		Banín	120	49.6710394	16.4798642	6	1,6	1,600	1	-1.000*	0,60	0,30
246	20		Prosetín	100	49.5321667	16.3959444	8	2	1,900	-	0.117*	0,32	0,37
248	20		Javorník	50	50.6996728	14.9967619	5	1,5	1,500	-	-0.753*	0,50	0,29
250	19		Dubečno	100	50.2792008	15.3297294	5	1,5	1,500	-	-0.694*	0,51	0,30
14	12	POL	Kalina-Lisowiec	-	50.3616200	20.1618000	10	2,9	2,841	2	-0.097*	0,52	0,47
22	20	POL	Trzeciewnica	-	53.1540756	17.6536309	10	3,3	2,982	3	-0.038*	0,52	0,50
25	20	DEU	Mallnow	-	52.4635660	14.4860850	10	3,4	3,115	1	-0.174*	0,62	0,52
30	14	DEU	Seega	-	51.3117264	11.0478070	9	2,5	2,376	-	-0.526*	0,56	0,37
4	10	POL	Tomaszow Lubelski	-	50.3746500	23.5775300	9	2,9	2,900	2	-0.337*	0,66	0,49
9	20	HUN	Bükk	-	48.0124000	20.5789500	10	3,9	3,472	2	-0.184*	0,66	0,56

3.2 Klonální struktura uvnitř populací

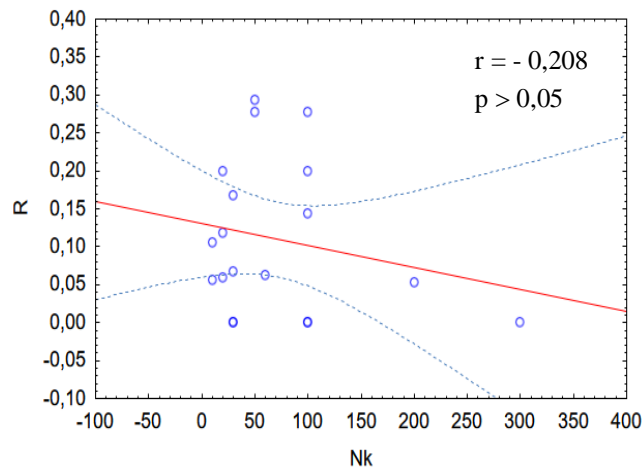
Vzhledem k možnosti vegetativního šíření druhu pomocí oddenků a absenci studií zabývajících se mírou klonality, velikosti klonů a podílu vegetativního a generativního rozmnožování *Anemone sylvestris*, bylo nutné prověřit míru klonality analyzovaných populací. Ta totiž může být příčinou neobvykle vysoké míry heterozygoty populací.

Míra klonality v populacích byla určena pomocí programu GenClone a je shrnuta v tabulce č. 3.2. Genotypová bohatost (R) je opět nejvyšší v zahraničních populacích, kde počet unikátních multi-lokusových (MLG) genotypů dosahuje až 15, což znamená, že téměř všichni vzorkovaní jedinci jsou nezávislými genetickými individui, tedy genety. Naopak populace v České republice jsou genotypově velmi chudé, od extrémních případů s jediným MLG na populaci po populace s 6 různými multi-lokusovými genotypy.

Pravděpodobnost, že by jedinci se stejným multi-lokusovým genotypem vznikly pohlavní cestou rozmnožováním mezi blízkce příbuznými jedinci (v tabulce uvedena jako p_{sex}) je pro všechny populace v rámci každého z multi-lokusových genotypů velmi nízká ($< 0,01$).

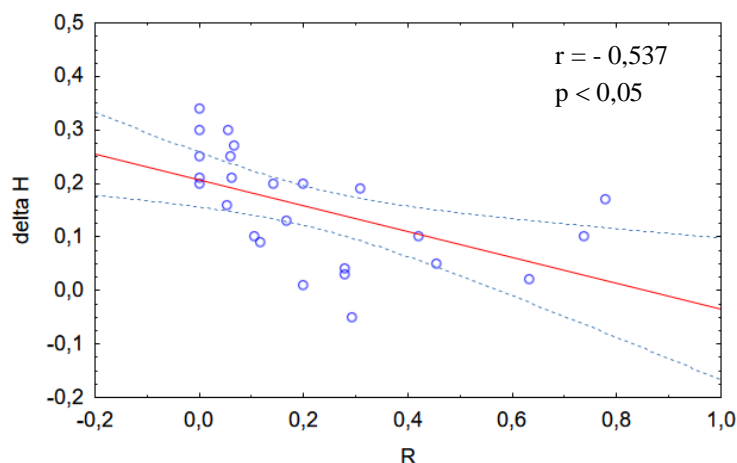


Obr. 3.6: Korelace počtu kvetoucích s celkovým počtem jedinců u populací v ČR. Zobrazen 95% konfidenční interval.



Obr. 3.7: Korelace genotypové bohatosti (R) s počtem kvetoucích jedinců u populací v ČR. Zobrazen 95% konfidenční interval.

Pro stanovení faktorů ovlivňujících schopnost vegetativního a generativního rozmnožování byl vzájemně korelován počet kvetoucích jedinců s velikostí populace. Korelace je silně pozitivní ($p < 0,05$) (viz obr. 3.6). Dále pak určen vztah mezi genotypovou bohatostí a počtem kvetoucích (potenciálně pohlavně se rozmnožujících jedinců) (viz obr. 3.7). Tato korelace byla však neprůkazná ($p > 0,05$). Pro ověření vlivu vegetativního rozmnožování na genetickou skladbu populace (zastoupení homo a heterozygotních lokusů) byl korelován rozdíl pozorované a očekávané heterozygotity populací s multi-lokusovou bohatostí populací (viz obr. 3.8). Jedná se o průkazně záporný vztah ($p < 0,05$). Kdy s klesajícím počtem rozdílných multi-lokusových genotypů v populaci výrazně roste rozdíl mezi pozorovanou a očekávanou heterozygotitou populace, tedy je v populaci více heterozygotních jedinců, než by se dalo dle HWE očekávat.



Obr. 3.8: Korelace MLG bohatosti (R) s delta H (delta H = $H_O - H_E$; rozdíl mezi pozorovanou a očekávanou heterozygotitou). Zobrazen 95% konfidenční interval.

Tab. 3.2: Míra klonality v populacích. Legenda: N_p – odhadovaná velikost populace udávaná v počtech jedinců, N_K – počet kvetoucích jedinců v populaci, V_K – počet vzorků v dané populaci vyšetřovaný na míru klonality a unikátních genotypů, G – počet odlišných MLG (*multi locus genotype*, počet odlišných multi-lokusových genotypů v populaci; první číslo udává počet MLG, který se liší o více než jednu alelu; druhé (+1/+2... udává počet MLG, které se od ostatních liší pouze v délce jedné alely, pravděpodobně jakožto důsledek mutace), R – genotypová bohatost (*genotypic richness*, obdoba alelické bohatosti bez vlivu počtu vzorků mezi populacemi), p_{gen} – pravděpodobnost výskytu daného genotypu, p_{sex} – pravděpodobnost že se určitý genotyp, který je v populaci přítomen vícekrát, objevil v důsledku pohlavního rozmnožování mezi blízkými příbuznými a nikoli jako důsledek nepohlavního klonálního množení.

Populace	Země	Lokalita	N_p	N_K	V_K	G	R	p_{fen}	p_{sex}
225	CZE	Pouzďřany	30	20	18	3	0,118	< 0,01	< 0,01
226		Velké Dunajovice	150	100	19	5+1	0,278	< 0,01	< 0,01
228		Malá Vrbka	40	10	19	1+1	0,056	< 0,1	< 0,01
229		Menhartice	40	10	20	3	0,105	< 0,01	< 0,01
230		Český Krumlov	50	20	16	4	0,2	< 0,01	< 0,01
232		Rovná u Zbuše	50	30	16	1+1	0,067	< 0,1	< 0,01
233		Hejná	300	200	20	2	0,053	< 0,1	< 0,01
234		Nerestce	350	300	20	1	0	< 0,1	< 0,1
235		Lestkov	150	100	20	1	0	< 0,1	< 0,01
236		Kocourov	40	20	18	1+1	0,059	< 0,1	< 0,01
238		Vědlice	80	50	19	5+1	0,278	< 0,01	< 0,01
239		Lochkov	50	30	18	1	0	< 0,01	< 0,01
242		Žďár	200	100	15	1+2	0,143	< 0,1	< 0,01
243		Markvartice	50	30	19	3+1	0,167	< 0,1	< 0,01
244		Chotěnov	150	100	16	2+2	0,2	< 0,1	< 0,01
245		Banín	120	100	20	1	0	< 0,1	< 0,01
246		Prosetín	100	50	18	3+3	0,294	< 0,01	< 0,01
248	Javorník	50	30	14	1	0	< 0,1	< 0,01	
250	Dubečno	100	60	17	1+1	0,063	< 0,1	< 0,01	
14	POL	Kalina-Lisiniec	-	-	12	6+1	0,455	< 0,01	< 0,01
22	POL	Trzeciewnica	-	-	20	13	0,632	< 0,01	< 0,01
25	DEU	Mallnow	-	-	20	15	0,737	< 0,01	< 0,01
30	DEU	Seega	-	-	14	5	0,308	< 0,01	< 0,01
4	POL	Tomaszow Lubelski	-	-	10	7+1	0,778	< 0,01	< 0,01
9	HUN	Bükk	-	-	20	7+2	0,421	< 0,01	< 0,01

3.3 Prostorová struktura populací

3.3.1 Analýza molekulární variance

Pro analýzu molekulární variance AMOVA byly populace rozděleny do skupin podle společného geografického původu (viz tab. 3.3). Variabilita byla určována jak mezi těmito skupinami, tak i v rámci nich. Jednotlivé geograficky členěné regiony se mezi sebou prokazatelně neliší, na jejich genetickou odlišnost připadají pouhá 2 % genetické variability. Mezi-populační variabilita je však velmi vysoká tj. 42 % genetické variability. Zbýlých 56 % určuje variabilitu v rámci populací.

V rámci vymezených geografických celků je situace velmi podobná. Opět je vysoká mezi-populační variabilita kolem 45 % a relativně nízká vnitro-populační variabilita přibližně 55 % v závislosti na konkrétním regionu. Výjimkou je pouze skupina německých a polských nížin, kde je vnitro-populační variabilita o něco vyšší než v ostatních skupinách tj. 68 % a mezi-populační variabilita naopak výrazněji nižší 32 %.

Tab. 3.3: Analýza molekulární variance (AMOVA) mezi skupinami populací a populacemi *Anemone sylvestris*. Analýza jak pro celý dataset, tak i pro popis variability v rámci geograficky členěných skupin. Legenda: % – procento modelem vysvětlené variability na základě variance alelických frekvencí, p – hladina signifikance.

	d.f.	sum of squares	variance	%	p
Celý dataset					
Mezi regiony (skupinami)	3	198,5	0,1	2	>0,05
Mezi populacemi v rámci regionů	21	1079,1	1,3	42	<0,05
V rámci populací	919	1597,3	1,7	56	<0,05
Moravsko-panonská oblast					
Mezi populacemi	9	492,1	1,3	43	<0,05
V rámci populací	390	683,7	1,8	57	
Oblast jihočeských pánví					
Mezi populacemi	3	123,9	1,1	45	<0,05
V rámci populací	148	192,194	1,3	55	
Oblast České tabule					
Mezi populacemi	5	241,1	1,2	47	<0,05
V rámci populací	234	307,2	1,3	53	
Oblast německých a polských nížin					
Mezi populacemi	4	146,3	1,1	32	<0,05
V rámci populací	147	360,9	2,5	68	

3.3.2 Genetický tok a analýza hlavních koordinát (PCoA)

Kromě rozdělení variability mezi a v rámci populací pomocí analýzy molekulární variance byla stanovena i míra genetické odlišnosti jednotlivých párů populací prostřednictvím fixačního indexu, Wrightova F_{ST} (viz tab. 3.4) a Slatkinova R_{ST} indexu (viz tab. 3.5), který odráží počet opakování motivu alel.

Celková míra diferenciací populací je vysoce průkazná ($F_{ST} = 0,436$, $p < 0,05$), což vyplynulo již z analýzy variance. Podle členění Wrighta (Wright 1978) se jedná o velmi velkou genetickou diferenciaci, ta platí pro hodnoty $F_{ST} > 0,25$. Celkové R_{ST} ($R_{ST} = 0,366$, $p < 0,05$) ukazuje rovněž průkaznou odlišnost populací.

Při detailnější analýze všech párů populací, vyšla průkazná genetická diferenciací všech populací v případě F_{ST} . Nejnižší hodnotou je $F_{ST} = 0,148$, což i tak značí střední míru diferenciací (Wright 1978). Hodnoty však často přesahují i 0,5, kdy je tedy mezipopulační odlišnost více než 50 %, kdežto variabilita uvnitř populací je menší než 50 % (podobně jako v případě celkové analýzy variance). V případě R_{ST} nebyla odlišnost prokázána pouze v jednom případě u dvojice populací 230 a 9 (Maďarsko a Český Krumlov) (viz tab. 3.4 a 3.5).

Tabulka 3.5 uvádí páry populací, u nichž je $R_{ST} > F_{ST}$, tudíž má větší vliv na jejich diferenciací mutace alel. Závislost rozdílu $R_{ST} - F_{ST}$ (vyjadřující převládající vliv mutací v kladných hodnotách a genetického driftu v nulových či záporných hodnotách) na geografické vzdálenosti dvojice populací však vyšla neprůkazná, koeficient determinace nevysvětluje ani 1 % variability (viz obr. 3.9). Z obr. 3.9 je naopak patrné, že jsou tyto veličiny zcela nezávislé ($p > 0,05$).

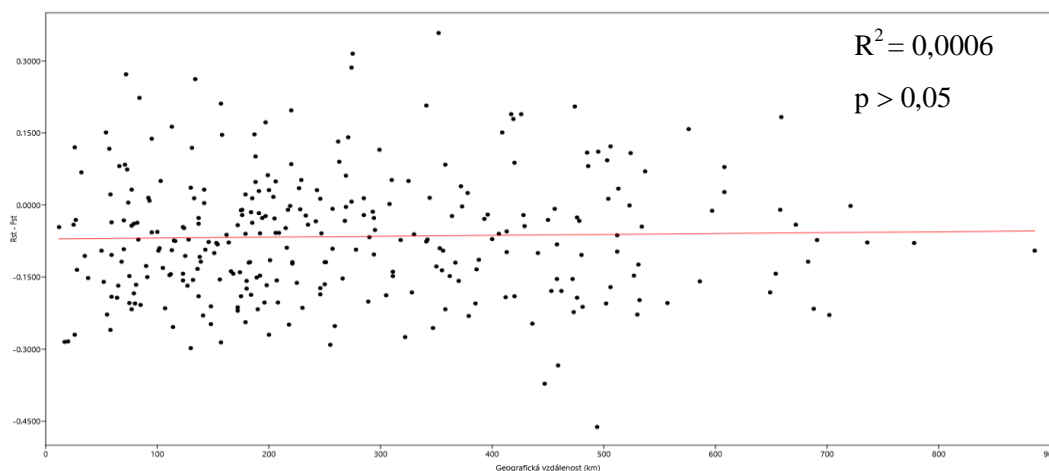
Tab. 3.4: Síla genetického toku mezi populacemi vyjádřená hodnotami párového F_{ST} . Míra (ne)podobnosti mezi populacemi vyjádřena maticí genetických vzdáleností. Legenda: všechny populace jsou navzájem průkazně geneticky diferenciované; míra nepodobnosti dvojice populací, jejich diferenciací je vyjádřena intenzitou barvy (tmavší barva indikuje velmi vysokou míru populační diferenciací, kdy je nevíce genetické variability spotřebováno na rozdíly mezi populacemi, kdežto vnitro-populační variabilita je velmi nízká). 0,15-0,25 (střední míra genetické diferenciací), >0,25 (velmi velká genetická diferenciací).

	225	226	228	229	230	232	233	234	235	236	238	239	242	243	244	245	246	248	250	14	22	25	30	4	9
225	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
226	0,265	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
228	0,274	0,379	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
229	0,330	0,334	0,469	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
230	0,224	0,252	0,362	0,367	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
232	0,392	0,297	0,536	0,437	0,221	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
233	0,482	0,477	0,498	0,614	0,473	0,604	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
234	0,405	0,454	0,488	0,547	0,212	0,474	0,580	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
235	0,413	0,393	0,490	0,510	0,341	0,507	0,433	0,457	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
236	0,387	0,370	0,458	0,531	0,374	0,510	0,494	0,531	0,488	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
238	0,265	0,368	0,339	0,476	0,239	0,380	0,455	0,290	0,364	0,386	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
239	0,257	0,336	0,488	0,409	0,337	0,410	0,612	0,549	0,546	0,499	0,358	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
242	0,508	0,485	0,629	0,565	0,459	0,474	0,606	0,634	0,596	0,640	0,548	0,569	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
243	0,431	0,310	0,558	0,550	0,311	0,460	0,640	0,554	0,499	0,621	0,480	0,521	0,637	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
244	0,350	0,326	0,401	0,418	0,261	0,383	0,576	0,556	0,550	0,460	0,462	0,451	0,601	0,575	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
245	0,357	0,380	0,560	0,545	0,380	0,474	0,664	0,606	0,597	0,593	0,446	0,419	0,596	0,519	0,574	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
246	0,330	0,362	0,388	0,456	0,330	0,441	0,507	0,431	0,494	0,511	0,356	0,411	0,562	0,531	0,493	0,525	.	*	*	*	*	*	*	*	*
248	0,481	0,458	0,507	0,566	0,433	0,602	0,645	0,605	0,544	0,634	0,525	0,589	0,685	0,529	0,631	0,596	0,413	.	*	*	*	*	*	*	*
250	0,345	0,444	0,507	0,538	0,354	0,447	0,603	0,515	0,569	0,563	0,331	0,430	0,612	0,539	0,589	0,554	0,387	0,601	.	*	*	*	*	*	*
14	0,266	0,262	0,422	0,412	0,153	0,293	0,487	0,376	0,397	0,436	0,306	0,366	0,458	0,334	0,384	0,361	0,306	0,353	0,406	.	*	*	*	*	*
22	0,323	0,257	0,375	0,395	0,268	0,366	0,440	0,492	0,409	0,431	0,426	0,438	0,485	0,442	0,273	0,471	0,368	0,401	0,515	0,238	.	*	*	*	*
25	0,299	0,229	0,267	0,374	0,247	0,305	0,445	0,388	0,398	0,385	0,271	0,322	0,465	0,367	0,330	0,442	0,322	0,372	0,401	0,261	0,279	.	*	*	*
30	0,487	0,371	0,585	0,570	0,504	0,557	0,590	0,663	0,589	0,569	0,508	0,470	0,637	0,630	0,607	0,577	0,489	0,616	0,634	0,427	0,400	0,371	.	*	*
4	0,293	0,279	0,389	0,445	0,356	0,436	0,461	0,553	0,469	0,442	0,375	0,409	0,500	0,508	0,414	0,438	0,474	0,535	0,531	0,270	0,283	0,248	0,404	.	*
9	0,148	0,213	0,272	0,328	0,171	0,285	0,324	0,341	0,303	0,291	0,244	0,248	0,350	0,369	0,256	0,358	0,254	0,397	0,333	0,178	0,216	0,214	0,397	0,201	.

Tab. 3.5: Síla genetického toku mezi populacemi vyjádřená hodnotami párového R_{ST} (hodnoty pod diagonálou). Jediná dvojice populací, u níž nebyla průkazná diferenciace je zvýrazněna. Nad diagonálou jsou uvedeny populace, u nichž byla hodnota $R_{ST} > F_{ST}$.

Legenda: - populace $R_{ST} < F_{ST}$; * populace $R_{ST} > F_{ST}$ (barva a počet * znázorňují velikost rozdílu: * < 0,05; ** 0,05-0,15; *** > 0,15

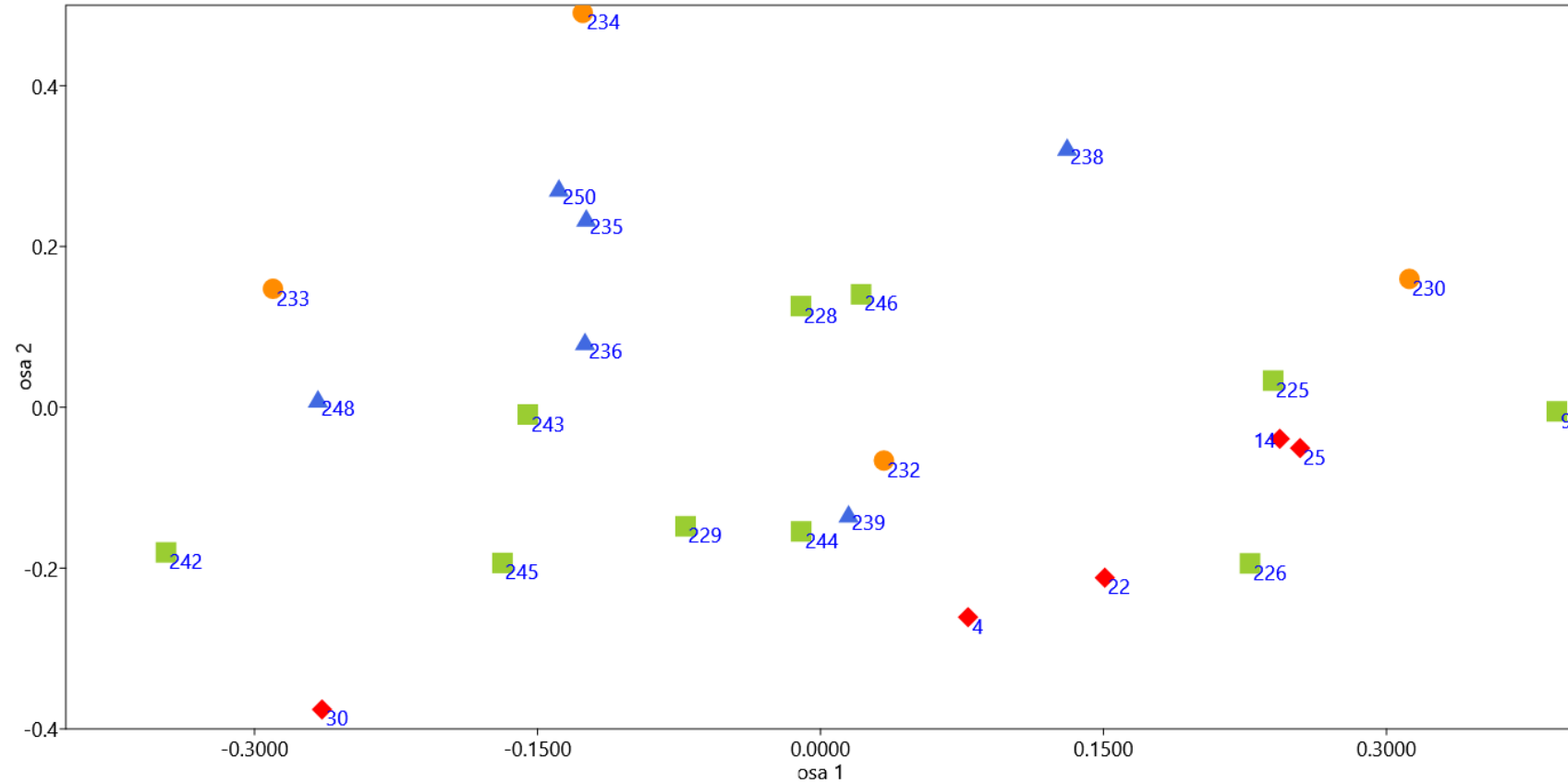
	225	226	228	229	230	232	233	234	235	236	238	239	242	243	244	245	246	248	250	14	22	25	30	4	9
225	-	-	-	-	-	*	*	-	-	**	-	*	**	-	*	-	-	*	-	**	***	*	-	**	*
226	0,219	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	*	-	-	-	*	*	-	-	-	-
228	0,238	0,186	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
229	0,291	0,186	0,430	-	-	-	*	-	-	-	-	*	**	-	-	-	-	-	-	-	**	-	-	-	-
230	0,183	0,114	0,148	0,310	-	-	-	-	-	-	-	**	*	-	-	*	-	-	-	-	*	-	-	-	-
232	0,423	0,274	0,283	0,391	0,117	-	-	-	-	-	-	***	-	*	-	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
233	0,568	0,467	0,405	0,618	0,441	0,320	-	-	-	-	*	**	-	*	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
234	0,238	0,250	0,198	0,390	0,028	0,204	0,533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
235	0,386	0,341	0,233	0,501	0,191	0,208	0,315	0,203	-	-	-	**	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
236	0,520	0,217	0,310	0,473	0,316	0,320	0,417	0,457	0,416	-	-	**	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
238	0,232	0,183	0,138	0,329	0,022	0,150	0,463	0,029	0,237	0,364	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
239	0,275	0,385	0,479	0,441	0,455	0,633	0,810	0,532	0,688	0,671	0,380	-	***	**	***	-	-	**	**	***	***	**	**	***	**
242	0,658	0,566	0,463	0,703	0,507	0,359	0,527	0,563	0,434	0,581	0,466	0,831	-	*	-	**	-	-	-	*	-	*	*	*	*
243	0,339	0,394	0,390	0,519	0,236	0,473	0,668	0,268	0,380	0,594	0,306	0,668	0,705	-	*	-	-	-	-	-	**	**	*	**	-
244	0,400	0,180	0,292	0,323	0,240	0,163	0,373	0,366	0,377	0,303	0,275	0,662	0,560	0,597	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
245	0,319	0,396	0,416	0,489	0,394	0,576	0,726	0,462	0,610	0,625	0,351	0,268	0,742	0,508	0,609	-	-	*	-	***	**	*	-	**	*
246	0,212	0,144	0,257	0,248	0,118	0,282	0,492	0,221	0,338	0,422	0,152	0,368	0,536	0,388	0,288	0,310	-	-	-	-	-	-	-	-	-
248	0,533	0,417	0,474	0,539	0,385	0,462	0,583	0,499	0,443	0,534	0,427	0,778	0,680	0,453	0,564	0,603	0,358	-	-	*	*	*	*	*	-
250	0,335	0,325	0,258	0,445	0,110	0,200	0,390	0,143	0,107	0,450	0,173	0,608	0,421	0,205	0,384	0,534	0,297	0,330	-	-	-	-	-	-	-
14	0,381	0,314	0,331	0,389	0,145	0,114	0,390	0,183	0,150	0,434	0,217	0,680	0,497	0,331	0,311	0,569	0,285	0,332	0,131	-	*	*	*	**	-
22	0,528	0,338	0,349	0,503	0,338	0,161	0,223	0,431	0,291	0,309	0,366	0,724	0,307	0,593	0,202	0,659	0,367	0,480	0,356	0,269	-	*	*	-	-
25	0,387	0,185	0,237	0,346	0,187	0,169	0,431	0,285	0,360	0,267	0,128	0,505	0,478	0,525	0,206	0,476	0,194	0,465	0,319	0,350	0,305	-	-	-	-
30	0,453	0,267	0,357	0,379	0,356	0,369	0,589	0,447	0,510	0,365	0,310	0,592	0,687	0,655	0,376	0,499	0,329	0,631	0,539	0,461	0,461	0,276	-	-	-
4	0,400	0,234	0,166	0,433	0,283	0,206	0,315	0,382	0,334	0,251	0,255	0,680	0,505	0,627	0,129	0,601	0,354	0,618	0,377	0,381	0,243	0,169	0,335	-	-
9	0,150	0,074	0,153	0,194	0,016	0,133	0,231	0,113	0,135	0,234	0,112	0,364	0,424	0,263	0,101	0,373	0,072	0,232	0,152	0,115	0,206	0,142	0,239	0,151	-



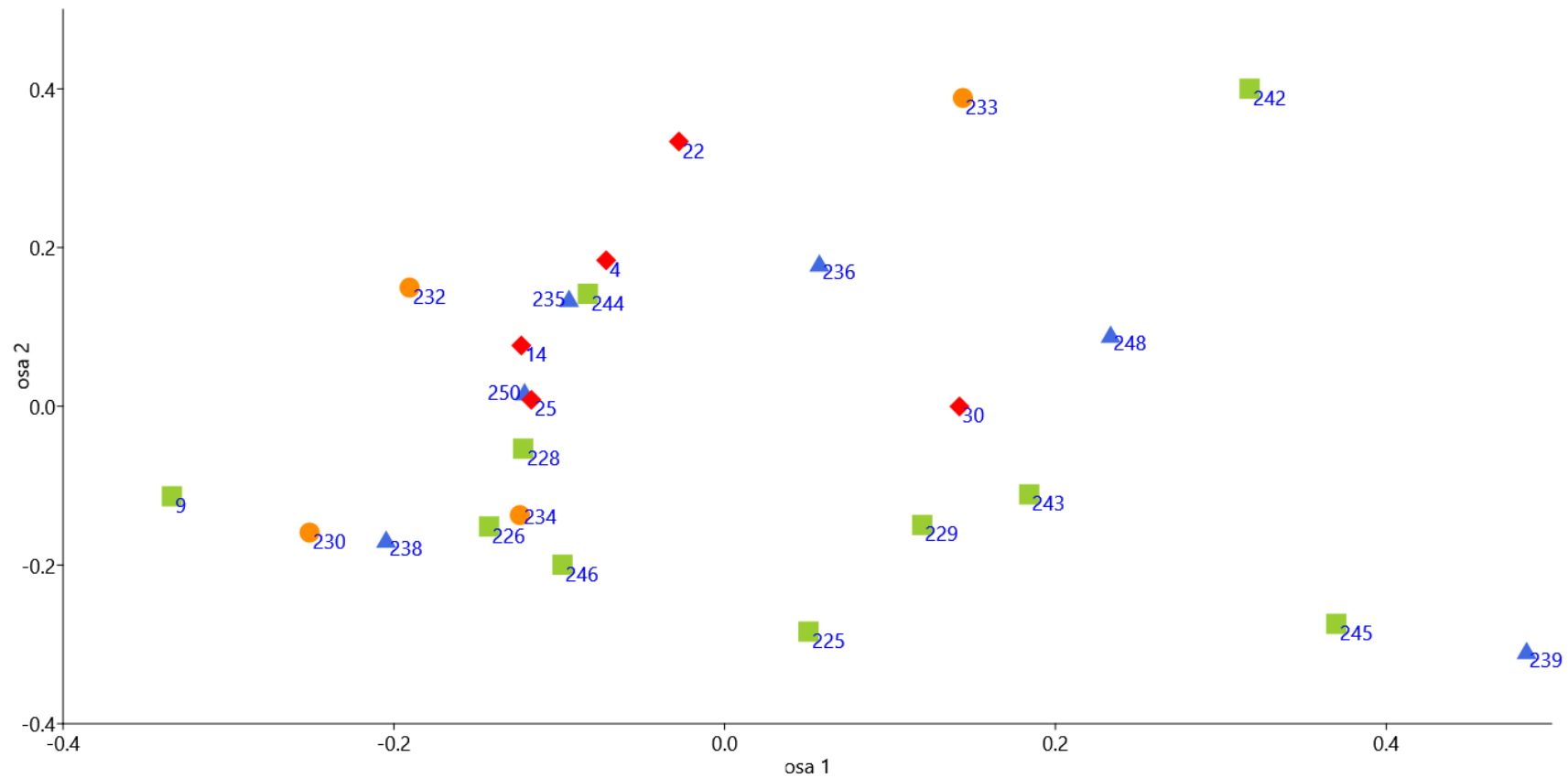
Obr. 3.9: Závislost rozdílu $R_{ST} - F_{ST}$ na geografické vzdálenosti příslušných dvojic populací.

Analýza hlavních koordinát (PCoA) párových hodnot F_{ST} i R_{ST} nevyšlila žádné smysluplné klastry (viz obr. 3.10 a 3.11). Spolu se zobrazují snad jen některé zahraniční populace z Polska a Německa (14, 25, 4 a 22; populace 30 je však úplně mimo). Ačkoli se rozložení populací v prostoru liší mezi PCoA založené na F_{ST} a R_{ST} , obě analýzy mají společnou absenci struktury v rozložení populací. Nezávisle na geografické příbuznosti v rámci větších geografických celků (vylišeny barevně) jsou populace rozmístěny v celém ordinačním prostoru.

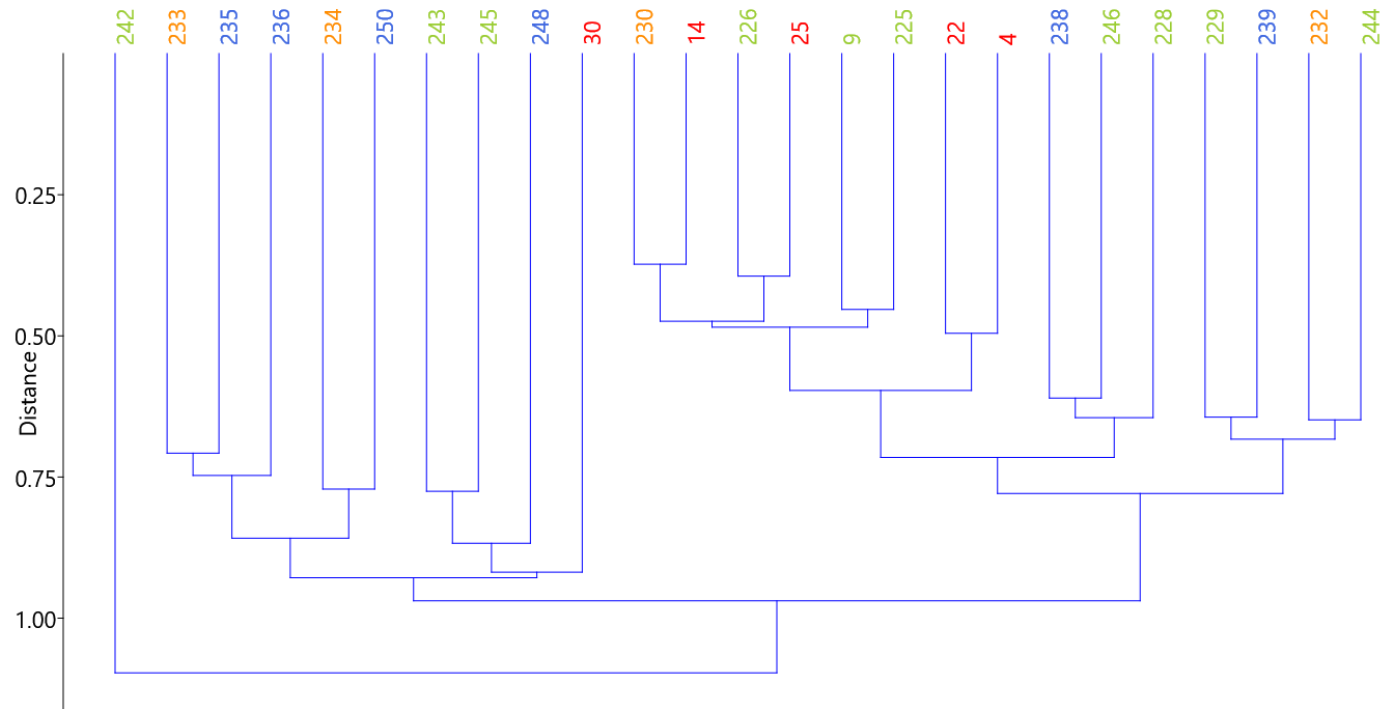
Absenci jakýchkoli smysluplných skupin vykazuje i analýza UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*), která shlukuje populace s nejmenší genetickou vzdáleností do klastrů. Strom je vytvořený na základě matice genetické vzdálenosti populací vyjádřené fixačním indexem F_{ST} (viz obr. 3.12). Vzhledem k převaze vlivu genetického driftu ve většině populací reprezentovaného právě fixačním indexem ($F_{ST} > R_{ST}$), už dále není uvedena varianta UPGMA analýzy pro R_{ST} . Opět jsou zde vylišeny pouze zahraniční populace Polska a Německa (bez populace 30, která se oddělovala i v analýze PCoA), jejichž příbuznost je ale vyjádřena mnohem větším klastrem, do nějž jsou zařazeny i další populace. I strom tak odráží náhodnou populační strukturu.



Obr. 3.10: Analýza hlavních koordinát (PCoA) párových hodnot F_{ST} vizualizovaná programem Past. 1. ordinační osa vysvětluje 36% variability, 2. osa vysvětluje 10% variability. Legenda: populace barevně a tvarově odlišeny dle příslušnosti do geografického celku, v rámci něhož byla prováděna AMOVA (■ – Moravsko-panonská oblast; ● – Oblast jihočeských pánví; ▲ – Oblast České tabule; ◆ – Oblast Německo-Polských nížin).



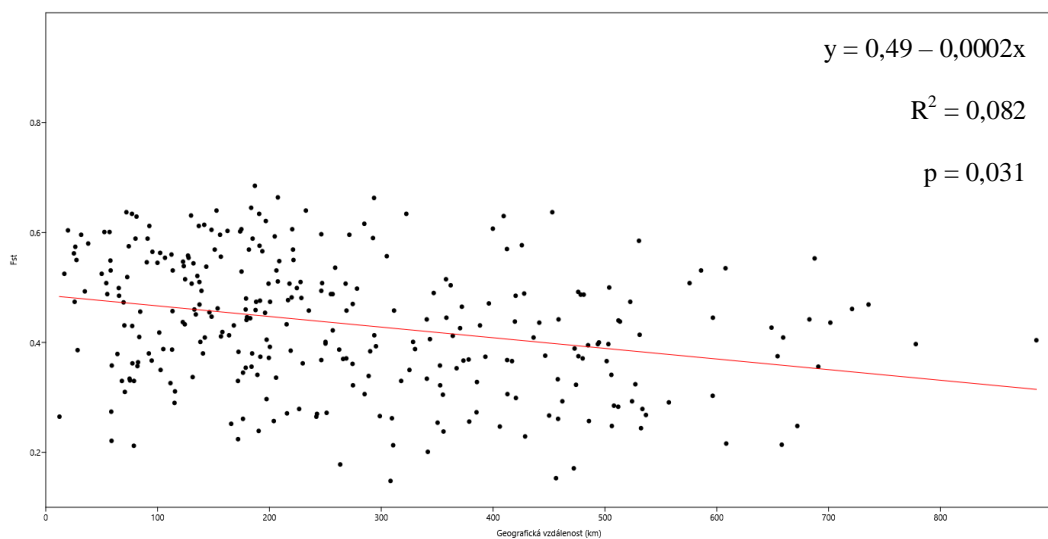
Obr. 3.11: Analýza hlavních koordinát (PCoA) párových hodnot R_{ST} vizualizovaná programem Past. 1. ordinační osa vysvětluje 43% variability, 2. osa vysvětluje 26% variability. Legenda: populace barevně a tvarově odlišeny dle příslušnosti do geografického celku, v rámci něhož byla prováděna AMOVA (■ – Moravsko-panonská oblast; ● – Oblast jihočeských pánví; ▲ – Oblast České tabule; ◆ – Oblast Německo-Polských nížin).



Obr. 3.12: Fylogenetický strom vytvořený metodou UPGMA založený na fixačním indexu F_{ST} . Není zde patrné žádné dělení do smysluplných skupin (snad jen klastř zahrnující jihomoravské populace, Maďarskou populaci a Polské a Německé populace). Legenda: populace barevně odlišeny dle příslušnosti do geografického celku, v rámci něhož byla prováděna AMOVA (■ – Moravsko-panonská oblast; ● – Oblast jihočeských pánví; ▲ – Oblast České tabule; ◆ – Oblast Německo-Polských nížin).

3.3.3 Izolace vzdáleností

Závislost míry genetické diference populací na jejich geografické vzdálenosti je vyjádřena pomocí fixačního indexu F_{ST} (rozdíl od hodnot R_{ST} diskutován již dříve) (viz obr. 3.13). Koeficient determinace lineární regrese ($R^2 = 0,082$) ukazuje, že geografická vzdálenost populací vysvětluje pouze necelých 8 % variability v datech. Zároveň Mantelův korelační test matic genetických a geografických vzdáleností neudává dostatečnou pravděpodobnost pro korelaci vzdálenosti s hodnotami F_{ST} ($r = -0,29$ $p = 0,96$).

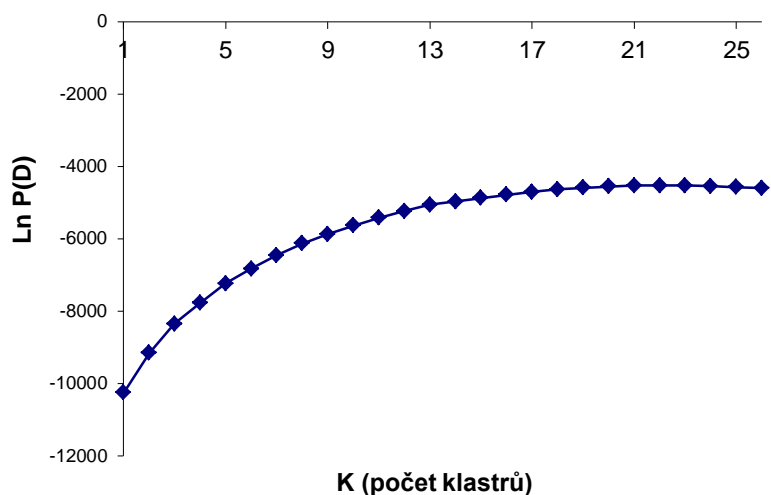


Obr. 3.13: IBD (*isolation by distance*) vyjadřující závislost F_{ST} (míra genetické diference dvojice populací) na geografické vzdálenosti příslušné dvojice populací. Osa x – geografická vzdálenost v km, osa y – hodnota párového F_{ST} .

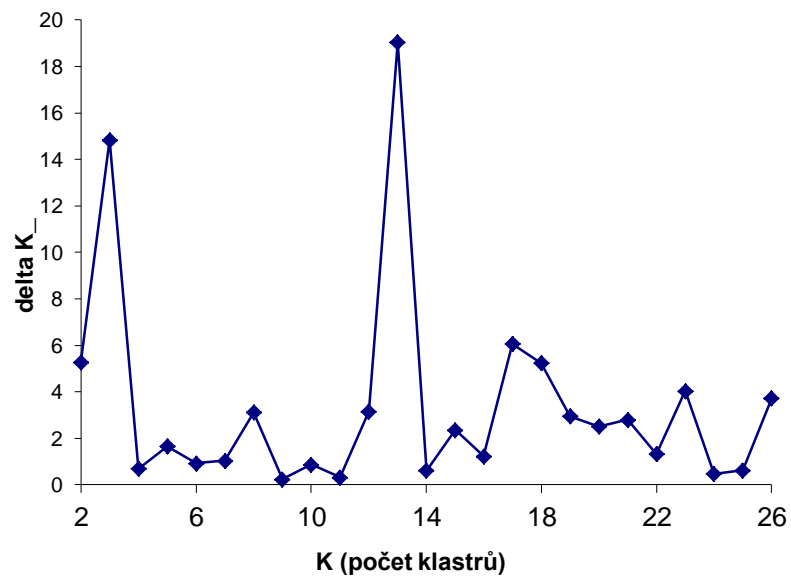
3.4 Kryptická struktura populací

Jelikož analyzované populace nebyly v Hardy-Weinbergově rovnováze, nebylo možné k analýze kryptické genetické populační struktury použít program Structure. Analýza byla proto provedena v programu InStruct, který umožňuje analýzu dat vychýlených z HWE (inbredních populací, populací se zastoupením autogamie apod.).

Na základě určení průměrné pravděpodobnosti modelu (vyjádřené jako logaritmus pravděpodobnosti $\ln P(D)$) a její standartní odchylky byly dle Evanno vytvořeny grafy pro pravděpodobnost modelu a delta K, ty umožní určit vhodné K (počet klastrů, z nichž se jednotlivé populace skládají) (viz obr. 3.14 a 3.15) (Evanno et al. 2005). Vhodnými K jsou K = 3 a K = 13, kde dochází k narovnání křivky (pro K = 3 přestává křivka strmě růst, pro K = 13 se křivka vyrovnává vodorovně s osou x). Delta K dosahuje nejvyšších hodnot pro K = 13, zároveň jsou i hodnoty p pro K = 3 ve srovnání s jinými hodnotami velmi vysoké. Uvažovány budou tedy obě varianty, přičemž pravděpodobnějším scénářem je K = 13.

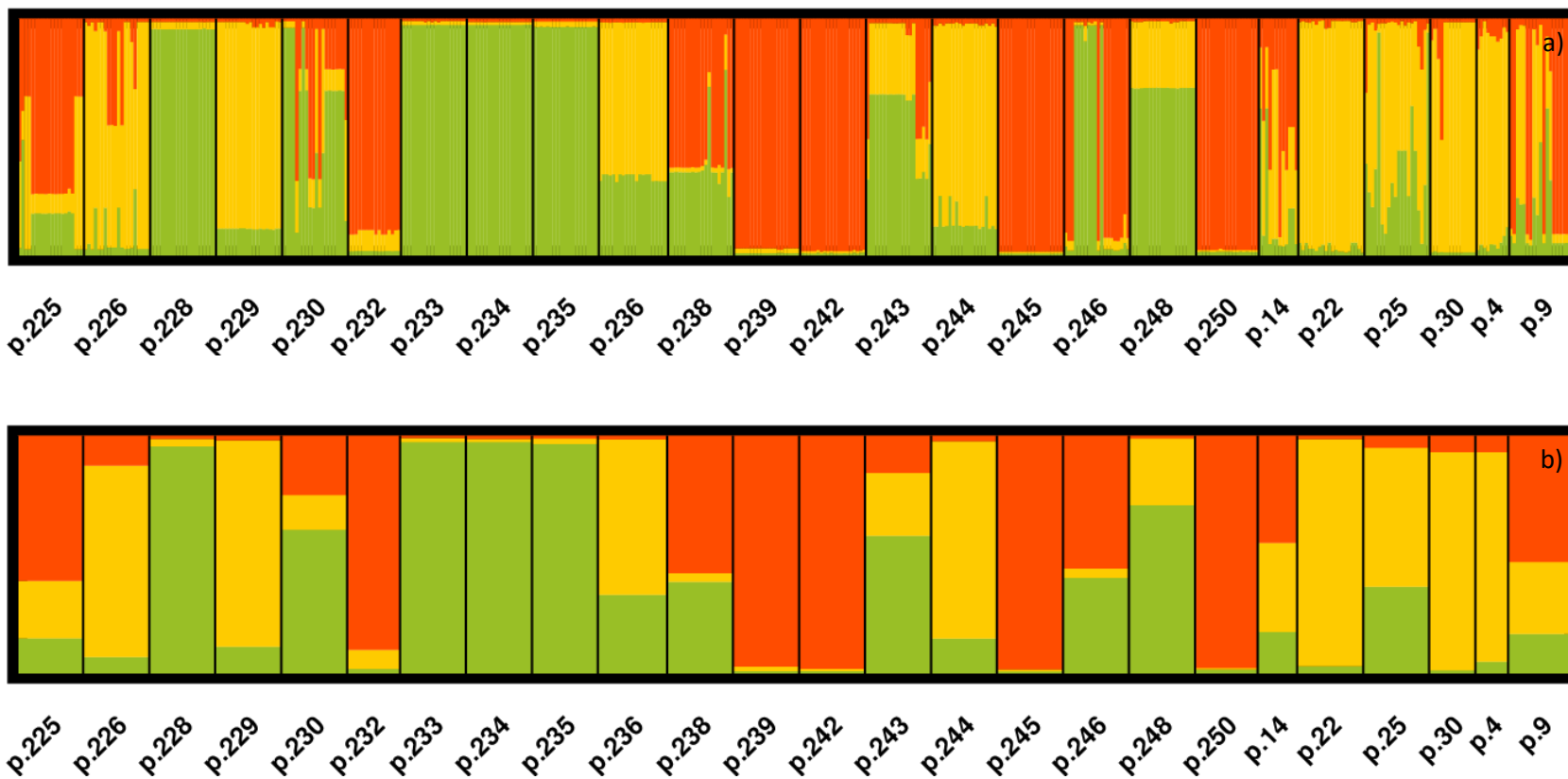


Obr. 3.14: Pravděpodobnost modelu (likelihood) ve vztahu k rostoucímu K. Osa x vyjadřuje hodnotu K (počtu klastrů), osa y logaritmus pravděpodobnosti [$\ln P(D)$].

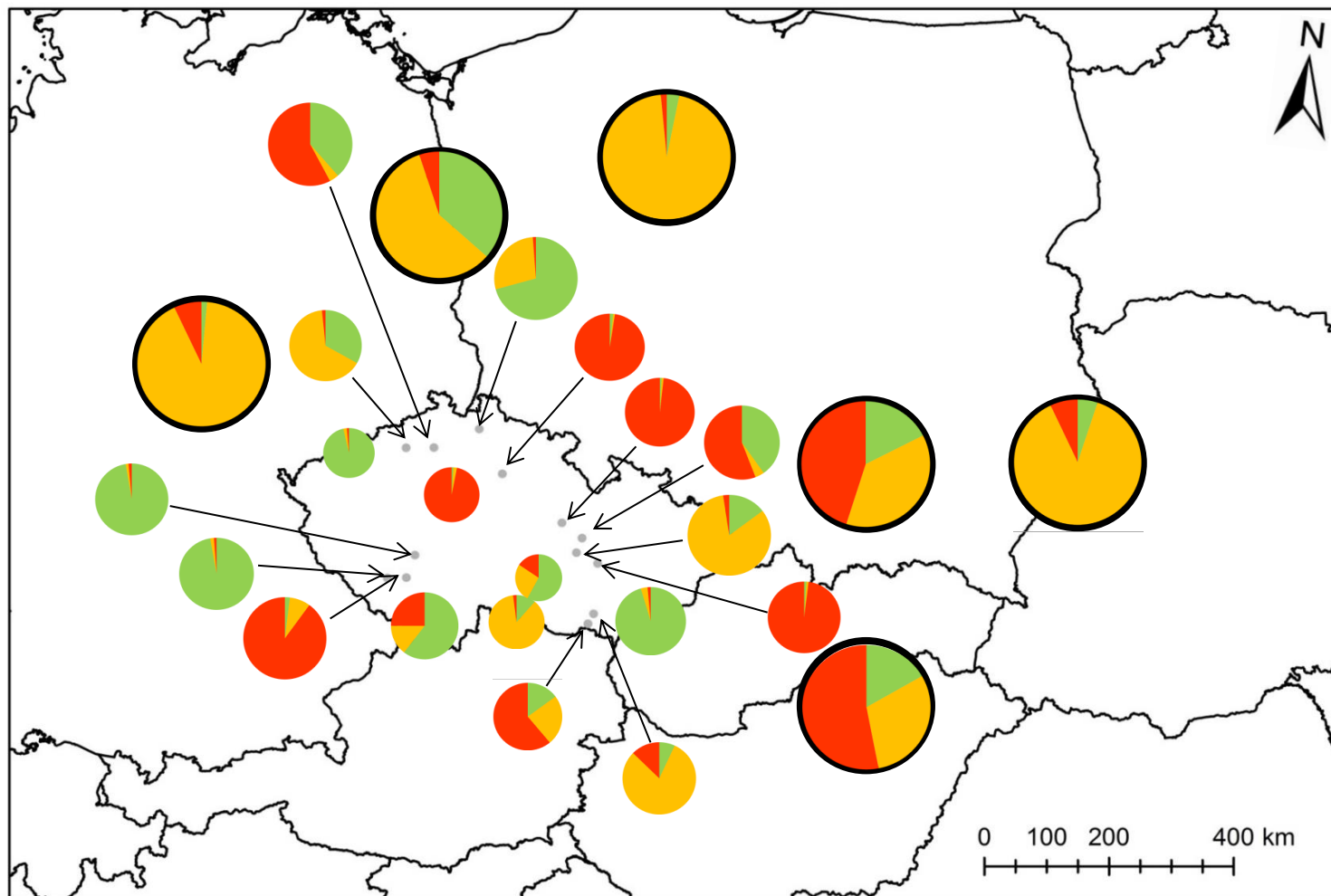


Obr. 3.15: Hodnoty delta K pro daná K. Osa x udává hodnotu K, osa y odpovídající delta K.

Složení jedincu a populací ze tří různých klastrů pro $K = 3$ je graficky znázorněno v obrázku č. 3.16. Obrázek č. 3.17 znázorňuje genetické složení populací zobrazených na mapě. Dle analýzy by měla být řada českých populací zařazena do stejné genetické linie (populace číslo 228, 233, 234, 235 do jedné a populace číslo 232, 239, 242, 245 a 250 do druhé). Další populace by pak měly být tvořeny různým zastoupením všech tří linií (populace číslo 225, 230, 236, 238, 246).

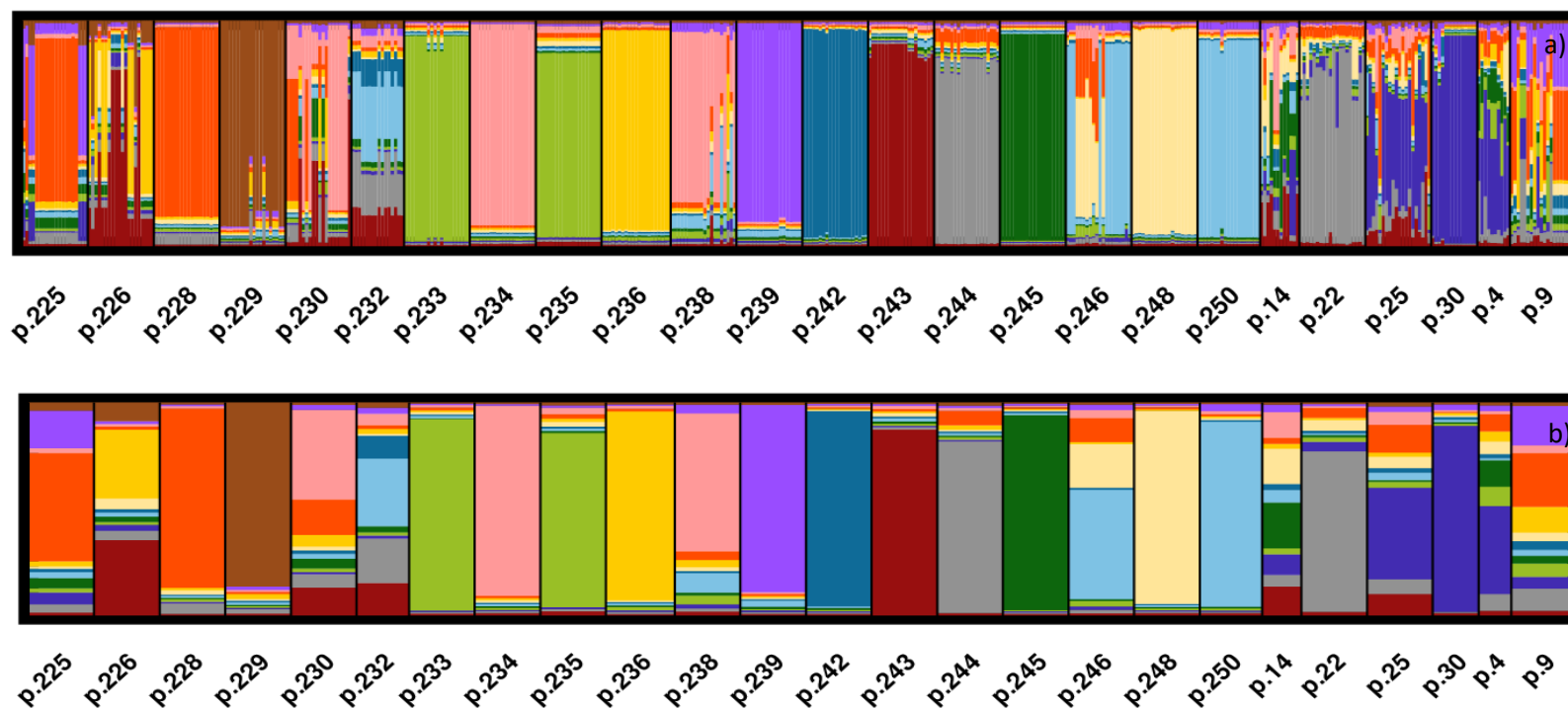


Obr. 3.16: a) Rozdělení jedinců v populacích do 3 genetických linií ($K = 3$) (graf a). b) Složení populací ze 3 genetických linií s různým zastoupením.

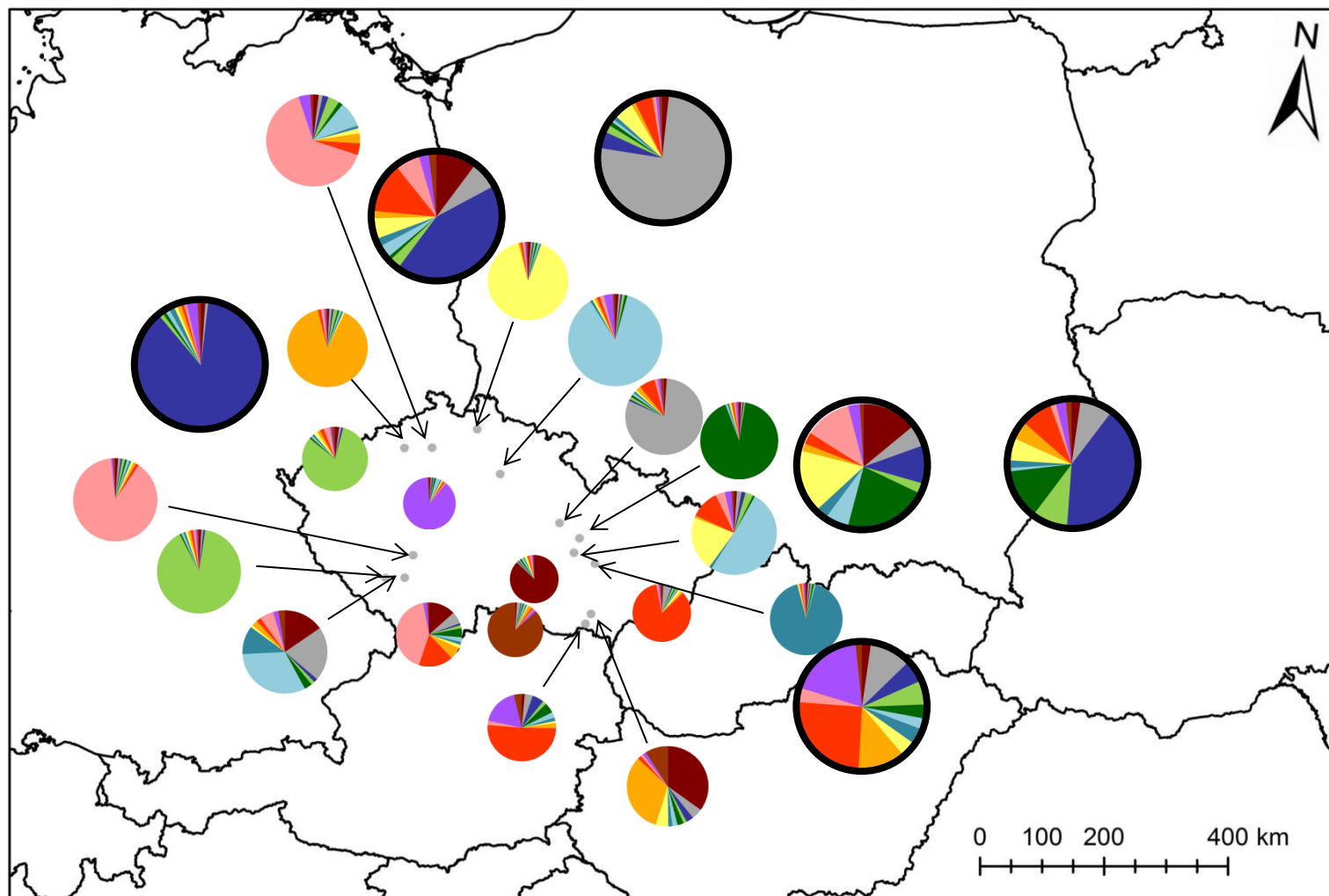


Obr. 3.17: Genetická skladba populací *Anemone sylvestris* (rozdělení do 3 genetických linií).

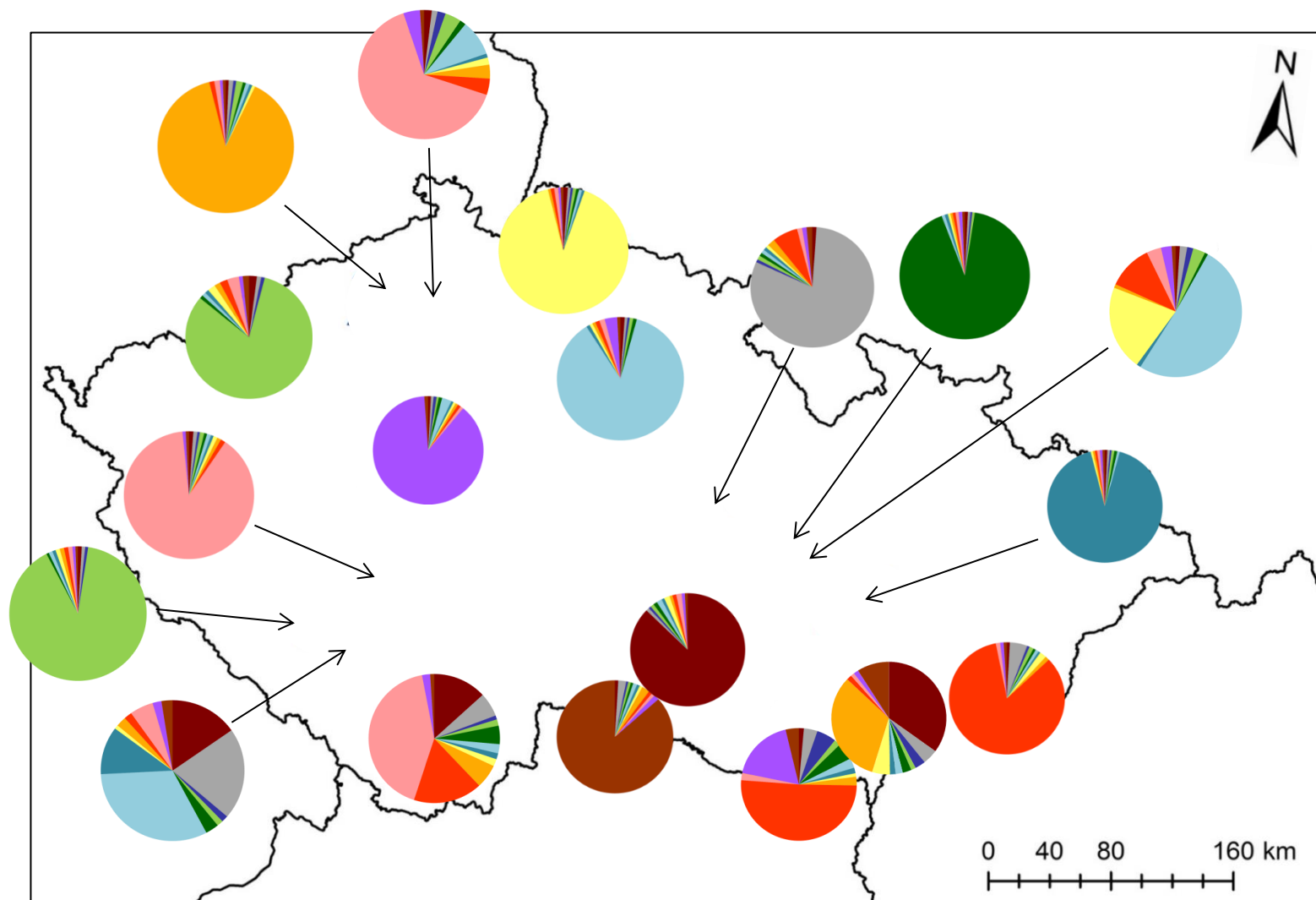
Složení jedinců a populací ze 13 různých klastrů pro $K = 13$ je graficky znázorněno v obrázku č. 3.18. Obrázky č. 3.19 a 3.20 znázornují genetické složení populací zobrazených na mapě. Téměř každá populace v rámci České republiky je reprezentována samostatnou genetickou linií, kdy jsou jedinci uniformní a jejich genetická skladba odpovídá příslušnosti právě do této genetické linie (populace č. 228, 233, 234, 235, 236, 239, 242, 243, 244, 245, 248 a 250). Ve zbylých populacích jsou někteří jedinci reprezentující více genetických linií (populace č. 225, 230, 246 a zahraniční populace).



Obr. 3.18: a) Rozdělení jedinců v populacích do 13 genetických linií ($K = 13$) (graf a). b) Složení populací ze 13 genetických linií s různým zastoupením.



Obr. 3.19: Genetická skladba populací *Anemone sylvestris* (rozdělení do 13 genetických linií).



Obr. 3.19: Genetická skladba populací *Anemone sylvestris* v České republice (rozdělení do 13 genetických linií).

4. Diskuze

4.1 Základní populačně-genetické charakteristiky

Všechny analyzované populace v ČR se ukázaly jako poměrně geneticky chudé ve srovnání se zahraničními. Přestože jsou mikrosatelity výrazně polymorfními markery (Hartl & Clark 2007), počet zastoupení polymorfních lokusů v českých populacích byl velmi nízký, zřídka kdy dosahující 100%. Ukazuje zde tak na poměrně velkou genetickou uniformitu jednotlivých populací s řadou homozygotních lokusů s jedinou alelou v celé populaci.

Populace v České republice často nepřesahují velikost 100 jedinců, což ukazuje na potenciální rizika malých populací jako je genetický drift působící ztrátu alelické bohatosti či vysoká míra inbreedingu zvyšující zastoupení homozygotních jedinců (Allendorf & Luikart 2007; Falk & Holsinger 1991). Alelická bohatost ale v tomto případě nesouvisí s velikostí populace. Počet alel tak může být buď zcela náhodným jevem, či jevem závislejícím na délce izolace populace (z více izolovaných populací mohla řada alel již vymizet, i když jsou populace početnější než recentněji izolované populace) nebo jevem, který do značné míry ovlivňuje jiný mechanismus (klonalita, diskutována později).

Nejvyšší alelická diverzita jihomoravských populací může být vysvětlena možností genetického toku mezi populacemi díky vysoké hustotě lokalit, na nichž je *Anemone sylvestris* na jižní Moravě přítomna (analogicky je možné uvažovat i pro populace v Českém Krumlově, kde je v okolí také poměrně velký počet lokalit výskytu). Díky své genetické bohatosti by tak tyto lokality při prvním hrubém pohledu mohly být považovány za zdrojové a tedy být i v centru ochrannářských opatření. Druhou možností je oživení populací jižní Moravy přetrvávajícím tokem genů ze zdrojových maďarských populací panonské oblasti, které jsou geneticky nejbohatší.

Vzhledem k velké alelické bohatosti (ve srovnání s českými populacemi), by mohly být zahraniční populace považovány za zdrojové pro populace v ČR. Větší genetickou bohatost zahraničních lokalit lze vysvětlit pravděpodobným tokem genů mezi populacemi (především v případě populací v Polsku a Německu), případně

jejich izolací v nedávné době (ještě nedošlo ke ztrátě alel vlivem genetického driftu) (Freeland et al. 2011). Velká alelická bohatost a vyrovnaná pozorovaná a očekávaná heterozygotita v těchto populacích však může být pouze důsledkem velké velikosti populací, o které ale bohužel nejsou záznamy (Allendorf & Luikart 2007). Možný scénář tak může přiblížit míra odlišnosti těchto populací vyjádřená pomocí F_{ST} v následujících kapitolách, kdy by nízký fixační index F_{ST} znamenal větší podobnost lokalit a tím větší tok genů, který by zvyšoval genetickou bohatost a snižoval tak i příbuzenské křížení, naopak vysoký F_{ST} by u těchto populací s F_{IS} blízkým 0 ukazoval na velké populace s množstvím jedinců, kde by alely nemohly být tak snadno odstraňovány genetickým driftem a zároveň by bylo omezeno křížení příbuzných jedinců.

Všechny analyzované populace (populace v České republice mnohem výrazněji) vykazovaly větší míru heterozygotity, než jaká by byla na základě alelických frekvencí očekávána. Díky ní nebyly populace v HWE. V malých populacích dochází obvykle vlivem inbreedingu k odchylkám opačného směru, kdy roste zastoupení homozygotních jedinců, čímž heterozygotita klesá a tím roste F_{IS} do kladných hodnot blížících se 1 (Allendorf & Luikart 2007). Zde však pozorovaná heterozygotita či míra inbreedingu nesouvisely s velikostí populace a musí tak existovat mechanismus, který fixuje heterozygotní jedince i v malých populacích. Zároveň se často vysoká míra heterozygotity v malých populacích pojí s nízkou alelickou bohatostí nasvědčující často fixaci dvou alel na lokus. Vlivem genetického driftu by však již dávno byla jedna alela fixována a druhá odstraněna (Allendorf & Luikart 2007). Možnými mechanismy tak mohou být buď velmi silná selekce ve prospěch heterozygotních jedinců, či vysoká míra klonality, která může fixovat heterozygotní jedince v podobě ramet v rámci jedné genety. Dobrymi ukazateli těchto jevů jsou geograficky zcela izolované populace (případ lokalit Lestkov, Nerestce a Malá Vrbka), které mají jak velmi nízkou alelickou bohatost, tak i jejich index inbreedingu dosahuje výrazně extrémních záporných hodnot dokládajících fixaci řady lokusů v heterozygotní podobě. Zároveň by fixace některých alel prostřednictvím klonů vysvětlila i existenci vzácných alel v některých poměrně malých populacích v ČR, které by jinak již dávno byly vlivem genetického driftu z populací odstraněny (Falk & Holsinger 1991).

Tyto základní údaje poskytují představu o pestrosti genetického složení jednotlivých populací, avšak neurčují nic bližšího o jejich případné genetické unikátnosti ve srovnání s jinými populacemi.

4.2 Klonální struktura uvnitř populací

Vysoký počet multi-locusových genotypů v rámci zahraničních lokalit ukázal na nízkou míru klonality a menší roli vegetativního rozmnožování, podpořenou i hodnotami indexu inbreedingu blížících se 0. Naopak populace v České republice se vzhledem k velmi nízkým počtům MLG ukázaly jako silně klonální. Pravděpodobnost, že by jedinci se stejným genotypem v rámci lokality vznikly pohlavní cestou v rámci rozmnožování mezi velmi blízkými příbuznými jedinci (p_{sex}) se ukázala být velmi nízká. Zároveň i sběr vzorků probíhal na celém transektu, na němž se druh vyskytoval a přesto se i v poměrně početných populacích okolo 100 jedinců vyskytl pouze jediný MLG (případ lokalit Banín, Nerestce a Lestkov). Přitom Holderegger ve své práci vymezující vzdálenost odlišných klonů (tedy rozdílných genet) pro příbuzný druh *Anemone nemorosa* uvádí vzdálenost 1 m jakožto okruh ovlivněný klonálním růstem jedné genety (Holderegger et al. 1998). V podrobnější studii pak udává pouze vzdálenost 0,5 m vymezující geneticky příbuznější jedince, než vzdálenosti větší (Stehlik & Holderegger 2000).

Většina jedinců, kteří tedy sdílí stejný MLG v dané populaci jsou s největší pravděpodobností pouze klony (potomci jedné klonální linie MLL, *multi locus lineage*). Počet nezávislých MLG je proto dobrým ukazatelem míry pohlavního rozmnožování, či spíše historické schopnosti jedinců se úspěšně pohlavně množit. Více MLG tak může být pozůstatkem z minulosti a současné populace se např. již pohlavně množit nemusí a genetičtí jedinci tak existují pouze prostřednictvím „nesmrtelných“ klonů.

Vysoká míra klonality by mohla vysvětlit jak nízkou alelickou bohatost populací (určitá kombinace alel fixovaná jako klon přes celou lokalitu), tak i vysokou heterozygotitu jedinců v populaci. Podobný trend dokládá Matthew ve studii populací *Ziziphus celata*, kde se rovněž vyskytuje velká míra heterozygotity a je zde vysvětlena právě klonalitou populací (Matthew et al. 2011). Na fixaci heterozygotních lokusů prostřednictvím klonů ukazuje i průkazná záporná korelace rozdílu pozorované a očekávané heterozygotity a multi-locusové bohatosti. Znamená

to tedy, že v populacích, kde byla pozorovaná heterozygotita výrazně vyšší než očekávaná, je i nižší MGL bohatost, tedy vyšší míra klonality, naopak v populacích, kde se pozorovaná a očekávaná heterozygotita svými hodnotami přibližují, roste zastoupení rozdílných MLG a tedy klesá míra klonálního zastoupení jedinců. Rozdíl v pozorované a očekávané heterozygotitě, potažmo i v záporném F_{IS} a HW nerovnováze populací, tak může být vysvětlen jejich klonálním množením. Vzhledem k tomu, že je pozorovaná heterozygotita vyšší u všech lokalit s výjimkou populace u Prosetína a v žádné populaci není roven počet vzorků a počet unikátních MLG, hraje zjevně klonalita alespoň částečnou roli ve všech populacích.

Otázkou je, z jakého důvodu je zastoupeno na lokalitě tak extrémně nízké množství genotypů (případ lokalit s jediným klonálně fixovaným genotypem; vápencový lom u obce Nerestce, Lestkovské výchozy skal a Malá Vrbka v Bílých Karpatech) a proč se zafixovalo tolik lokusů v heterozygotní podobě, kdy nedošlo nejprve k fixaci pouze jediné alely na lokus způsobené genetickým driftem. Patrně byla takováto kombinace alel selekčně výhodnější anebo je výsledek dílem převážení klonality nad genetickým driftem, podobně jako tomu je v případě *Cypripedium calceolus*, kdy klonalita zabránila právě ztrátě alel driftem (Gargiulo et al. 2018). U klonálních druhů se sníženou schopností pohlavního rozmnožování však během pár let často nahradí úspěšnější genotyp všechny ostatní, kompetičně méně úspěšné. Tímto výrazně poklesne diverzita a dochází ke genetické homogenitě populace (Stehlik & Holderegger 2000). Zároveň se však dá předpokládat, že má tento úspěšný genotyp širší ekologickou valenci než jiné (což by mohl odrážet i vyšší počet heterozygotních lokusů umožňující větší toleranci jedince ke změnám prostředí, než v případě čistě homozygotních lokusů) (Cosedai et al. 2013).

Nespornou výhodou klonality je schopnost rychlé kolonizace volných ploch bez nutnosti přítomnosti pohlavního partnera. Proto mají také vegetativně rozmnožující se druhy větší kolonizační potenciál, širší areál rozšíření a častěji se vyskytují ve dříve zaledněných oblastech (Cosedai et al. 2013). Je tedy možné, že se *Anemone sylvestris* v těžišti svého rozšíření tj. jižní Sibíři klonálně ani nešíří. Hypotézu by bylo nutné ověřit analýzou původních populací. Na druhou stranu by mohla všechny nevýhody, které klonalita skýtá, kompenzovat polyploidizace jedinců. Ta kromě udržení větší genetické diverzity a vyšší míry heterozygotity u *Anemone sylvestris* zvyšuje i schopnost regenerace jedinců, jejich vzrůst, produkci

semen a přežívání do následujících sezon (Cosedai et al. 2013; Záhumenická et al. 2018). Otázkou je, zda se v přírodě tetraploidní jedinci vyskytují (předchozí studie pracovala s laboratorně indukovanou polyploidizací). V případě této práce byly např. z lokality Rovná u Zbuše vyloučeni z dalších analýz 4 jedinci právě pro podezření na polyploidizaci podle přítomnosti tří alel na více lokusech. Populaci by však bylo vhodné podrobněji prověřit metodou průtokové cytometrie.

Pro životaschopnost populací je však klíčová alespoň částečná schopnost pohlavního rozmnožování, které generuje genetickou variabilitu, umožňuje se přizpůsobit dlouhodobým změnám podmínek a v neposlední řadě zvyšuje odolnost proti nemocem (Allendorf & Luikart 2007; Denisow & Wrzesien 2015; Holderegger et al. 1998). V případě *Anemone sylvestris* se jedná především o ohrožení rzí *Transchelia pruni-spinosae*, kde *Anemone* funguje jako druhý hostitel (Dušková & Kopřiva 2009). Úspěšnost pohlavního rozmnožování může být ovlivněna řadou faktorů. Vzhledem k silně pozitivní korelaci počtu kvetoucích jedinců s velikostí populace a naopak nezávislosti genotypové bohatosti a počtu kvetoucích, není omezena schopnost ramet kvést a neliší se mezi populacemi tvořenými převážně rametami či genetami (ve stejně velkých populacích je srovnatelný počet kvetoucích jedinců nezávislý na počtu MLG v dané populaci). Absence jedinců vzniklých pohlavní cestou na řadě lokalit tedy může mít mnohem skrytější příčiny.

Častým reprodukčním problémem bývá změna v produkci či kvalitě pylových zrn (Denisow Wrzesien 2015). Dále citlivost semenáčků potažmo i dospělých jedinců k zástinu keří a stromy, který tak omezuje jejich klíčivost (Denisow Wrzesien 2015). Kompetiční tlak dřevin na *Anemone sylvestris* prostřednictvím změny v intenzitě fotosyntézy rovněž ovlivňuje životaschopnost pylových zrn a potažmo i množství vyprodukovaných semen (Denisow Wrzesien 2015). Klonalita tak může být způsobena nedostatkem semen, která mají navíc omezenou klíčivost. Zároveň není známo, jakou má druh semennou banku a zda je tedy semeno schopno přetrvávat v půdě více let. Stehlik a Holderegger ve své práci u příbuzného druhu *Anemone nemorosa* dokládají větší limitaci pohlavního rozmnožování druhu nedostatkem vhodných míst pro klíčení semenáčku daleko více než nedostatkem semen (Stehlik & Holderegger 2000). Spolu se ztrátou vhodných habitatů, na nichž by mohla semena klíčit a s rostoucím tlakem kompetičně silnějších druhů se jeví

klonalita jako jediným možným způsobem šíření druhu. Navíc i v případě narušení porostu a uvolnění ploch pro uchycení nových jedinců mohou být plošky obsazeny rychleji progresivnějšími klony. Při tom se jako dostatečná pro udržení genetické variability populací udává alespoň 3% úspěšnost semenáčků (Stehlik & Holderegger 2000). I v případě, že by došlo k obnově pohlavního rozmnožování populací a zvýšení produkce semen, v extrémních případech pouze jediného genotypu na lokalitě se bude i pohlavní rozmnožování prakticky rovnat tomu klonálnímu. Navíc zhoršení klimatických podmínek zvyšuje riziko samooplození jedinců (Denisov et al. 2016). Variabilita způsobená mutacemi tak zde bude generována až za mnoho desítek či stovek generací (Allendorf & Luikart 2007, Beebe & Rowe 2008).

4.3 Prostorová struktura populací

4.3.1 Analýza molekulární variance

Analýza molekulární variance neukázala nijak průkaznou variabilitu mezi většími geografickými celky. Nemá tedy smysl uvažovat o společném původu populací z geografického hlediska. Vyvrací se tedy původní myšlenka propojení Moravských populací s panonskými a tím potenciální genový tok z Maďarských populací směrem na Moravu. Zároveň ale jeho případný historický vliv nelze vyloučit vzhledem k možné dlouhodobé izolaci populací a tím vzniklé řadě genetických odlišností, jak působením genetického driftu, tak prostřednictvím dominance jiných klonálních linií (Stehlik & Holderegger 2000) (viz předchozí kapitola).

Naopak variabilita mezi populacemi je velmi vysoká a poukazuje právě na izolovaný vývoj jednotlivých populací a velmi omezený komunikační tok mezi nimi. Velká podobnost vnitro a mezi populační variability ukazuje na relativně uniformní složení populací (oproti běžně očekávané vysoké vnitro-populační variabilitě) – odráží tedy nízkou alelickou diverzitu populací. Při dlouhodobé izolaci poměrně malých populací tak mohl genetický drift náhodně odstranit některé alely z každé populace, populace by tedy teď obsahovaly jen určitou náhodnou část alel z původní velké populace (Allendorf & Luikart 2007). Spolu s kompeticí jednotlivých genotypů reprezentujících klony, kdy během určitého časového období došlo k dominanci toho nejúspěšnějšího klonu, o niž rozhodly zejména klimatické a vegetační podmínky dané lokality, tak zapříčinil velkou genetickou diferenciaci

jednotlivých populací a zároveň vysvětluje velkou uniformitu v rámci populací (Cosedai et al. 2013; Stehlik & Holderegger 2000).

Výjimku tvoří pouze skupina populací z Polska a Německa, kde je mezi-populační variabilita výrazněji nižší, než v ostatních regionech. Mezi těmito populacemi patrně nějaký genetický tok přetrvává či mají společný původ a k jejich oddělení došlo v relativně nedávné době ve srovnání s ostatními analyzovanými populacemi. Případné migraci mezi těmito populacemi výrazně napomáhá geografická kontinuita obou oblastí nížin, kdy jedna přechází plynule do druhé a nejsou zde přítomny četné geografické bariéry tak, jak je tomu naopak např. v České republice. Případná velká velikost těchto populací by rovněž umožnila udržet daleko větší počet alel a snížit tak rizika klonality a genetického driftu.

4.3.2 Genetický tok a analýza hlavních koordinát PCoA

Velká míra vzájemné genetické diferenciace populací určená jak pomocí Wrightova F_{ST} (fixační index), tak i pomocí Slatkinova R_{ST} ukázala na velkou genetickou odlišnost mezi páry populací (s výjimkou jediné dvojice v případě R_{ST} , kdy odlišnost nebyla průkazná). Je tak v souladu s předchozí analýzou variance. Párová srovnání však navíc umožňují vylišit míru podobnosti konkrétních populací. Pokud uvažujeme míru diferenciace populací dle Wrighta, hodnoty přesahující $F_{ST} = 0,25$ již poukazují na velmi velkou míru diferenciace populací (Wright 1978). Velká většina analyzovaných populací však vykazuje ještě daleko větší odlišnost (často kolem $F_{ST} = 0,5$). Nejen tedy že se dle analýzy variance obecně liší populace mezi sebou, ale i mezi konkrétními dvojicemi populací je stále velká genetická odlišnost.

Poměrně podstatné je srovnání rozdílů hodnot F_{ST} a R_{ST} , ten umožní odhalit hlavní mechanismus ovlivňující míru tak velké genetické odlišnosti. F_{ST} odráží jak genetickou diferenciaci populací, tak i intenzitu genetického toku mezi nimi, kdy dvojice populací s nízkým F_{ST} bude méně geneticky odlišná a bude si tak vyměňovat více jedinců, než dvojice s vysokým F_{ST} , která bude zcela izolovaná. Zároveň však F_{ST} index bere každou alelu separátně jako unikátní a nerozliší jejich případný společný původ vzniklý mutací. Zásadní roli však může hrát právě vysoká mutační rychlost mikrosatelitových lokusů (Freeland et al. 2011), kde dvě alely lišící se o jednotku opakování mají patrně společný původ a jedna dala vznik druhé a jsou si tedy příbuznější, než alely lišící se o velký počet jednotek (Oliveira et al. 2006).

Přestože je F_{ST} ve studiích nejvíce používaným indexem vhodným pro analýzy s menším počtem lokusů (do 20), je z hlediska mutace mikrosatelitových lokusů vhodné použití srovnání se Slatkinovým indexem diference R_{ST} (Gaggiotti et al. 1999; Hardy et al. 2003). R_{ST} zohledňuje mutaci jednotlivých lokusů, kdy jsou si alely lišící se o 1 jednotku opakování podobnější, než ty které se liší o více jednotek. Rozdíl obou indexů tedy odráží, zda hlavní příčinou genetické diference jsou mutace v počtu motivů opakování (větší R_{ST} index) nebo dlouhodobá izolace populací (absence migrace) a následný genetický drift (větší F_{ST} index) (Hardy et al. 2003).

Pro průměrné celkové hodnoty indexů zde platí $F_{ST} > R_{ST}$, což znamená, že alely lišící se o malý počet jednotek jsou častěji mezi populacemi, než v rámci populací a k diferenciaci populací tak přispívá větší měrou jejich izolace a genetický drift (Hardy et al. 2003). Vše tedy nasvědčuje velké fragmentaci populací na malé subpopulace, v nichž genetický drift naprosto nezávisle některé alely zafixoval, a proto jsou si populace navzájem velmi nepodobné (Allendorf & Luikart 2007). Zároveň je genetický tok přerušen již po velmi dlouhou dobu, vzhledem k naprosté odlišnosti populací.

Přesto je u části populací situace opačná a mutace převažují nad genetickým driftem (ale pouze v menšině populací). Bylo by možné očekávat, že mutace budou hrát větší roli v diferenciaci geograficky bližších populací, než v těch vzdálenějších (společný původ stejných alel, které se vlivem mutací při izolaci blízkých populací mírně odliší ve své délce). Ukazuje se však, že variabilita generovaná mutacemi alel a geografická vzdálenost jsou zcela nezávislé veličiny (viz. obr. 3.9).

Náhodný proces ovlivňující složení a fixaci alel v populacích, tedy genetický drift, nezávislý na příbuznosti populací ve větších geografických celcích potvrzuje i zobrazení vzorků v ordinačním prostoru prostřednictvím analýzy hlavních koordinát PCoA, z nichž není patrný žádný smysluplný vztah mezi populacemi (viz obr. 3.10 a 3.11). I fylogenetický strom vytvořený shlukovací analýzou UPGMA odráží náhodnou populační strukturu (viz obr. 3.12). Podobně tomu bylo zjištěno u populací *Ziziphus celata*, kdy se spolu zobrazovaly a klastrovaly genotypy z velkých geografických vzdáleností nezávisle na svém geografickém původu.

Analýza tak neznázorňuje jejich příbuznost, ale právě pozůstatek většího rozšíření s následnou fragmentací a genetickým driftem (Matthew et al. 2011).

4.3.3 Izolace vzdáleností

Izolace vzdáleností vyjadřující závislost genetické diferenciace populací (F_{ST}) na jejich geografické vzdálenosti je v tomto případě neprůkazná. Stejně geneticky odlišné či příbuzné si mohou být jak geograficky blízké populace, tak i ty velmi vzdálené. Vzhledem k velkému rozptylu hodnot od regresní přímky je převažujícím jevem působícím populační odlišnost genetický drift, zatímco migrace jedinců je minimální (Beebee & Rowe 2008), což je zcela v souladu s předchozími analýzami.

4.4 Kryptická struktura populací

Analýza genetických linií, z nichž se skládají jednotlivé populace, ukázala dva potenciálně možné scénáře. V prvním se dělí populace pouze do tří odlišných genetických linií. Tato možnost je poměrně nepravděpodobná při srovnání s předchozími výsledky, kdy byly jednotlivé populace navzájem od sebe velmi odlišné. Navíc pokud se podíváme na populace tvořené pouze čistě jedinou genetickou linií (např. lokality Lochkov, Žďár, Dubečno a Banín v jedné genetické linii či Malá Vrbka, Hejná, Nerestce a Lestkov představující druhou genetickou linii), jsou z hlediska alelické skladby reprezentovány obvykle jedním, maximálně dvěma multi-lokusovými genotypy. Jedná se tedy o silně klonální populace. Je těžko představitelné, že pokud se na lokalitě vyskytuje pouze jediný genotyp, neukáží předešlé analýzy žádnou podobnost mezi těmito lokalitami. Ani v PCoA či klastrovací analýze UPGMA nevytvořily tyto populace jednotlivý klastr a jsou součástí poměrně nepřibuzných větví. Takto malý počet genetických linií by mohl reflektovat snad pouze velmi dávný společný původ, kdy byl druh hojněji rozšířen a stepní lokality byly více propojeny, například na konci poslední ledové a úplném počátku Holocénu, kdy došlo k velké expanzi stepních a lučních společenstev (Feurdean et al. 2018), či ještě dříve během posledního glaciálu, kdy sprašová step umožňovala pravděpodobně existenci řady druhů kontinentálních stepí se současným těžištěm výskytu na jižní Sibiři (Chytrý et al. 2010b). To by bylo vhodné prověřit analýzou konzervativnějších méně polymorfních markerů, které dokáží odhalit opravdu starou strukturu (Allendorf & Luikart 2007; Freeland et al. 2011).

Přednost je proto dána mnohem jemnějšímu dělení populací do třinácti různých genetických linií, pro něž model vykazuje zároveň i vyšší pravděpodobnost. Toto dělení, kdy téměř každá populace reprezentuje samostatnou genetickou linii, odráží velkou míru nepříbuznosti jednotlivých populací, jejich izolaci a náhodnou fixaci určitých alel geneticky driftem. Zároveň populace s vysokou mírou klonality, tedy s uniformním složením jedinců, jsou právě těmi populacemi, které jsou nejčastěji tvořeny zcela odlišnými samostatnými liniemi. Naopak populace s větším počtem multi-lokusových genotypů jsou pestřejší. Zvláštními případy jsou zahraniční populace z polské Trzeciwnice (populace 22) a z německé lokality Seega (populace 30). V obou těchto populacích výrazně převládá jediná genetická linie, přestože mají výrazně vyšší počet multi-lokusových genotypů a alelickou bohatost, než populace v České republice. Vysvětlením může být výrazně vyšší počet polymorfních lokusů ve srovnání s českými populacemi, které mají obvykle část lokusů striktně homozygotních a čistě monomorfních v populaci a druhou část striktně heterozygotních s často pouze dvěma alelami na populaci. Vysoký počet multi-lokusových genotypů tak může být zapříčiněn pouze přítomností jen několika málo alel navíc oproti českým populacím, které umožní více kombinací a tím i větší počet unikátních genotypů, přesto se však celkové zastoupení alel bude jen velmi málo lišit od populací v ČR, proto budou tyto dvě zahraniční populace tvořeny opět velmi malým počtem genetických linií.

Vzhledem k velké odlišnosti jednotlivých populací tedy nelze příliš uvažovat o zdrojových populacích. Vše je patrně zapříčiněno izolací populací, v nichž byly alely zcela náhodně fixovány genetickým driftem (Allendorf & Luikart 2007). A zároveň klonalitou, která zajistila, že alespoň některé lokusy zůstaly polymorfní, a na druhou stranu ještě více posílila vzájemnou odlišnost jednotlivých lokalit prostřednictvím dominance kompetičně nejúspěšnějšího genotypu (klonu) (Gargiulo et al. 2018; Stehlik & Holderegger 2000). Každou populaci tak lze považovat za genetický unikát se specifickou kombinací alel, která není nahraditelná ani geograficky blízkými populacemi.

Otázkou je, jaké historické události za touto izolací a velkou diferenciací stojí. Možných vysvětlení je hned několik s ohledem na různě hluboký pohled do minulosti. První možností je několik scénářů odrážejících současnou strukturu populací jako pozůstatek historicky velmi bohatých diferenciováných populací,

z nichž se vlivem fragmentace do současnosti dochovala jen část, která byla vlivem driftu ochuzena a klonálně fixována analogicky jako v případě *Ziziphus celata* (Matthew et al. 2011):

1. Druh se hojně rozšířil v době ledové v rámci sprašové stepi (Roleček et al. 2014). Takovou možnost lze doložit analogiemi z oblasti jižní Sibíře, kde je zároveň i současné těžiště výskytu druhu (Hejný & Slavík 2003; Chytrý et al. 2010b). Přítomnost ledovce dosahujícího na severní hranici České republiky by vysvětlovala velkou odlišnost polských a německých populací (od populací severu ČR), které se na území polských a německých nížin patrně rozšířily až na konci doby ledové (Ložek 2004). Bariéra pohoří podél hranic ČR pak patrně bránila jejich průniku na naše území. České populace pak v průběhu Holocénu a s ním spojenou intenzivní expanzí dřevin zůstaly izolovány a zde by mohlo dojít k jejich výrazné diferenciaci (Bennet & Provan 2008). Díky klonalitě však zůstala část historické genetické variability zachována a nebyla odstraněna genetickým driftem (Gargiulo et al. 2018).

2. Druh byl na našem území přítomen již před poslední dobou ledovou. Její podmínky však neumožnily existenci větších populací v rámci drsného klimatu sprašové stepi a jednotlivé populace tak zůstaly izolovány v mikroklimatických kryptických refugiích (Schmitt & Varga 2012). Existence těchto refugií v České republice je doložena i pro řadu stepní druhů (Listl et al. 2017; Schmitt & Varga 2012). Během doby ledové tak vlivem izolace mohlo dojít k diferenciaci genetických linií. Zároveň by ale při největší expanzi stepních lokalit za začátku Holocénu nemohlo dojít k promíchání těchto linií natolik, aby byla genetická odlišnost smazána (Feuerdan et al. 2018). Či naopak na střetu menších hybridních zón v rámci ČR došlo k vzniku nových geneticky smíšených populací, jejichž diferenciaci byla při následné izolaci vlivem nástupu lesa v Atlantiku výrazně posílena (Bylebyl et al. 2008).

3. Druh se rozšířil do středoevropského prostoru z východních refugií asijské stepní zóny až s příhodnými podmínkami na konci doby ledové a začátku Holocénu (Feuerdan et al. 2018; Pokorný et al. 2015). Jeho šíření však nebylo kontinuální směrem z východu, ale došlo ke styku několika migračních linií v ČR a tím zde byla vytvořena hybridní zóna, kde se stýká v určitém prostoru několik oddělených genetických linií na velmi malém geografickém prostoru – velmi geograficky blízké

populace tak mohou být zcela nepříbuzné. Podobně jako v případě hybridní zóny *Eryngium campestre* v sousedním Německu (Bylebyl et al. 2008).

4. Druh se šířil kontinuálně z východoasijských stepí v raném Holocénu, kdy následně došlo k izolaci jednotlivých populací vlivem expanze lesa v období Atlantiku (Bennet & Provan 2008; Pokorný et al. 2015). V této době pak došlo k fragmentaci velké bohaté zdrojové populace na malé subpopulace postupně vzájemně diferencované náhodným odstraněním alel genetickým driftem (Matthew et al. 2011).

Další možností je recentní struktura zahrnující dva možné scénáře diferenciací lokalit:

1. Velmi málo početné geneticky chudé populace, které byly nedávno izolovány. V tomto případě by ale hodnoty R_{ST} indexu nebyly průkazné. Kdyby se délky alel vzájemně lišily jen jedním či několika málo motivy opakování, tak by se jednotlivé multi-lokusové genotypy populací od sebe neměly příliš lišit, tedy by byla míra odlišnosti populací vyjádřená prostřednictvím R_{ST} velmi nízká. Vzhledem k velmi vysokým hodnotám F_{ST} a průkaznosti hodnot R_{ST} indexu, je ale ukázáno, že právě naopak je mezi všemi multi-lokusovými genotypy rozdíl značný a vysoká míra diverzifikace tak není způsobena jen několika málo mutacemi původně společných alel (Hardy et al. 2003). Z tohoto důvodu se takový scénář zdá jako velmi nepravděpodobný.

2. Zdánlivá příbuznost geograficky zcela nepříbuzných lokalit může být důsledkem přenosu jedinců člověkem, přesadbou na lokality či únikem ze zahrad a přesadbou ze zahrad jako tomu bylo u řady jiných druhů např. *Vinca minor*, *Hedera helix* a *Aquilegia vulgaris* (Pergl et al. 2016). Lidský faktor by mohl vysvětlit i výskyt druhu na lokalitách mimo hlavní oblast rozšíření (předšumavské Vápence, Malá Vrbka v Bílých Karpatech). Jak již bylo řečeno, na každé lokalitě má tendenci převládnout jediný nejúspěšnější klon, lokalita je potom tvořena jedinou genetickou linií. Někteří jedinci v jinak uniformním složení lokalit však nápadně připomínají strukturu genetických linií rozdělení jedinců v jiných lokalitách (viz obr. 3.18 a) (jedná se zejména o jedince z populace 239, kteří se svým složením geneticky shodují s částí jedinců v populaci 225; dále dvojice populací 243 a 226; 228 a 230;

248 a 246). To by mohlo znamenat právě přenos jedinců mezi populacemi především v případě vzdálenějších lokalit.

Na kolik je pestrá diverzifikace dílem historického vývoje geneticky bohatých populací dávné minulosti a nakolik je ovlivněna potenciálními recentními lidskými zásahy je velmi těžké stanovit. S jistotou hraje vývoj v dávné minulosti významnou roli, společným jmenovatelem všech scénářů je zde období Atlantiku – kritický bottleneck pro řadu druhů nelesní vegetace. Přičemž konkrétní podoba šíření *Anemone sylvestris* by měla být určena s ohledem na složení populací v celé Evropě a centra jejího rozšíření na jižní Sibíři. Jen tak lze odpovědět, nakolik jsou současné populace pozůstatkem velké genetické bohatosti. Vliv recentních událostí je množné částečně odfiltrovat i použitím méně polymorfních genetických markerů, které tak dobře neodráží vnitropopulační strukturu a rychlé mutace mikrosatelitových lokusů.

5. Závěr

Znalost genetické populační struktury je velmi hodnotná pro tvorbu účinných ochrannářských opatření a výběr populací, které by měly být ve středu zájmu. Cílem je ochrana co největšího spektra genetické diverzity zvyšující evoluční potenciál druhu a snižující riziko ohrožení. Ohroženy jsou především malé populace s omezeným podílem pohlavního rozmnožování, kdy není genetická diverzita generována. Při velkém podílu vegetativního rozmnožování jsou však ohroženy i populace velké, pokud jsou tvořeny několika málo klony. Absence genetické variability zapříčiní vyhynutí celé populace při změně podmínek či výskytu patogenu.

V případě populací *Anemone sylvestris* v České republice se jedná právě o extrémně vysokou míru klonálních geneticky chudých populací s absencí pohlavně vzniklých jedinců. Velká izolace těchto populací zamezuje migračnímu toku a eliminuje tak jakoukoli možnost oživení genetické diverzity. Hlavní roli má v populacích především genetický drift, který v malých populacích odstraňuje náhodně některé alely a v extrémních případech vytvoří zcela monomorfní lokusy pro celou populaci. Vlivem působení driftu tak začaly být zcela náhodně některé alely z populací odstraňovány. Díky klonalitě jedinců však došlo k fixaci části alel, a to i těch vzácných, a tím řady lokusů v heterozygotní podobě před tím, než byly populace zcela postiženy genetickým driftem. Zároveň na řadě lokalit dle místních mikroklimatických podmínek převládl jediný kompetičně nejúspěšnější genotyp. Při nedostatečné migraci a přísunu nových alel, nemožnosti mít velké geneticky bohaté populace, se tak jeví jako efektivní únik z naprosté genetické chudoby s pouze 1 alelou na lokus nepohlavní klonální množení. Výsledkem jsou geneticky zcela diferencované unikátní populace, kde vzájemná příbuznost některých je výsledkem náhody prostřednictvím náhodné fixace alel genetickým driftem.

Historicky se jeví jako velmi pravděpodobná existence velké geneticky bohaté populace, která byla vlivem ztráty vhodných stanovišť, pravděpodobně v době maxima zalesnění v období Atlantiku, fragmentována. V jednotlivých populacích se vlivem *bottleneck* efektu proto náhodně vyskytla určitá skladba alel a následně ovlivnil malé populace právě genetický drift. Klonalita však alespoň částečně „zakonzervovala“ původní genetickou diverzitu. Geografickou nesourodost

geograficky velmi blízkých lokalit však mohl do jisté míry ovlivnit i člověk možnou přesadbou či šířením druhu ze zahrad, kde se jeho kultivary běžně pěstují.

Úspěšná záchrana ohrožených populací tohoto druhu skýtá však řadu problémů a nevysvětlených otázek. Každá populace je zde totiž zvláštní genetickou jednotkou hodnou ochrany. Ztráta každé klonální linie (tedy často celé populace) znamená výraznou ztrátu genetické variability druhu. Je proto nezbytné chránit všechny současné populace jako geneticky unikátní. V budoucnu se zaměřit především na experimenty zaměřené na schopnost pohlavního rozmnožování jedinců, vhodným managementem (především snižování zástinu dřevin) udržovat dostatek vhodných ploch pro klíčení semen a růst populace. V případě velkého snížení velikosti populace a nutnosti transferu jedinců, tak pouze z co nejbližších lokalit, jestli vůbec, je zde zvýšené riziko narušení lokálních adaptací převládajícího genotypu. Ve výsledku tak může dojít k úplnému vyhynutí populace. Klíčové je však, generovat genetickou variabilitu pro zajištění odolnosti stávajících populací zajištěním pohlavního rozmnožování jedinců.

6. Literatura

Allendorf F. W. & Luikart G., 2007: Conservation and the genetics of populations. Wiley-Blackwell, Malden ISBN 978-1-4051-2145-3

Arif I. A., Bakir M. A., Khan H. A., Farhan A. H., Homaidan A. A., Bahkali A. H., Sadoon M. & Shobrak M., 2010: A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 2079-2096.

Arnaud-Haond S. & Belkhir K., 2006: Genclone: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* 7(1):15-17.

Arnaud-Haond S., Duarte C. M., Alberto F., Serrao E. A., 2007: Standardizing methods to address clonality in population. *Molecular Ecology* 16: 5115-5139.

Avise J., 2004: Molecular markers. Sinauer Associates, Sunderland ISBN 0-87893-041-8

Beebee T. J. C. & Rowe G., 2008: An introduction to molecular ecology. Oxford University Press, Oxford ISBN 978-0-19-929205-9

Bennet P., 2000: Demystified... Microsatellites. *Journal of Clinic Pathology* 53: 177-183.

Bennett K. D. & Provan J., 2008: What do we mean by 'refugia'? *Quaternary Science Reviews* 27: 2449-2455.

Bornkamm R., 2006: Fifty years vegetation development of a xerothermic calcareous grassland in Central Europe after heavy disturbance. *Flora* 201 (4): 249-267.

Brookes C., Bright J. A., Harbison S. A., Buckleton J., 2012: Characterising stutter in forensic STR multiplexes. *Forensic Science International : Genetics* 6 (1): 58-63.

Bylebyl K., Poschlod P. & Reisch Ch., 2008: Genetic variation of *Eryngium campestre* L. (Apiaceae) in Central Europe. *Molecular Ecology* 17(14): 3379-3388.

Cosendai A. C., Wagner J., Ladinig U., Rosche C. & Hórandl E., 2013: Geographical parthenogenesis and population genetic structure in the alpine species *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). *Heredity* 110: 560-569.

Cremene C., Groza G., Rakosy L., Schileyko A. A., Baur A., Erhardt A. & Baur B., 2005: Alternations of steppe-like grasslands in eastern Europe: a threat to regional biodiversity hotspots. *Conservation biology* 19 (5): 1606-1618.

Denisow B. & Wrzesień M., 2015: Does vegetation impact on the population dynamics and male function in *Anemone sylvestris* L. (Ranunculaceae)? A case study in three natural populations of xerothermic grasslands. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 84 (2): 197-205.

Denisow B., Antoń S. & Wrzesień M., 2016: Morphology of *Anemone sylvestris* L. flower (Ranunculaceae). *Acta Botanica Croatia* 75 (1): 74-80.

Dušková L. & Kopřiva J., 2009: *Ochrana rostlin proti chorobám a škůdcům*. Grada, Praha ISBN 978-80-247-2756-1

Earl D. A. & vonHoldt B. M., 2012: STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359-361.

Evanno G., Regnaut S. & Goudet J., 2005: Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-1620.

Excoffier L. & Lischer H., 2012: PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics* 28: 298-299.

Excoffier L. & Lischer H. E. L., 2010: Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Falk D. A. & Holsinger K. E., 1991: *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, Oxford ISBN 0-19-506429-1

Fath B. D., 2018: *Encyklopedia of Ecology*. Elsevier: 124.

Ferrao L. F., Caixeta E. T., Cruz C. D., de Souza F. F., Ferrao M. A., Maciel-Zambolim E., Zambolim L. & Sakiyama N. S., 2014: The effects of encoding data in diversity studies and the applicability of the weighting index approach for data

analysis from different molecular markers. *Plant Systematics and Evolution* 300: 1649-1661.

Feuerdan A., Ruprecht E., Simon Z. M., Hutchinson M. & Hickler T., 2018: Biodiversity-rich European grasslands: Ancient forgotten ecosystems. *Biological Conservation* 228: 224-232.

Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. & McInnes K. H., 2002: Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge ISBN 0-521-63985-9

Freeland J., Kirk H. & Petersen S., 2011: *Molecular ecology*. Wiley-Blackwell, Malden ISBN 978-0-470-74834-3

Gaggiotti O. E., Lange O., Rassmann K. & Gliddon C., 1999: A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular ecology* 8 (9): 1513-1520.

Gao H., Williamson S. & Bustamante C. D., 2007: An MCMC Approach for Joint Inference of Population Structure and Inbreeding Rates from Multi-Locus Genotype Data. *Genetics*

Gargiulo R., Pironon S., Zheleznaya E., Sanchez M. D., Balázs Z. R., Podar D., Wilkinson T., Jäkäläniemi A., Kull T., Väre H. & Fay F., 2018: Phylogeography and post-glacial dynamics in the clonal-sexual orchid *Cypripedium calceolus* L. *Journal of Biogeography* 46: 526-538.

Gitzendanner M. A., Weekley C. W., Germain-Aubrey Ch. C., Soltis D. E. & Soltis P. S., 2011: Microsatellite evidence for high clonality and limited genetic diversity in *Ziziphus calata* (Rhamnaceae), an endangered, self-incompatible shrub endemic to the Lake Wales Ridge, Florida, USA. *Conservation Genetics* 13(1): 223-234.

Glaubitz J. C., 2004: Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* 4: 309-310.

Goudet J., 1995: FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*. 86(6): 485-486.

Green D. M., 2005: Designatable units for status assessment of endangered species. *Conservation Biology* 19 (6): 1813-1820.

Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F. & Petit R. J., 2011: Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.

Hájek M., Dudová L., Hájková P., Roleček J., Moutelíková J., Jamrichová E. & Horsák M., 2016: Contrasting Holocene environmental histories may explain patterns of species richness and rarity in a Central European landscape. *Quaternary Science Reviews* 133: 48-61.

Hájková P., Roleček J., Hájek M., Horsák M., Fajmon K., Polák M. & Jamrichová E., 2011: Prehistoric origin of the extremely species-rich semi-dry grasslands in the Bílé Karpaty Mts (Czech Republic and Slovakia). *Preslia*: 83: 185-204.

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001: PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.

Hardy O. J., Charbonnel N., Freville H. & Heuertz M., 2003: Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163 (4): 1467-1482.

Hartl D. L. & Clark A. G., 2007: Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland ISBN 978-0-87893-308-2

Hejcman M., Hejcmanová P., Pavlů V. & Beneše J., 2013: Origin and history of grasslands in Central Europe – a review. *Grass and Forage Science* 68: 345-363.

Hejný S. et Slavík B. [eds], 2003: Květena České republiky. 2. Academia, Praha: 405-406. ISBN 80-200-1089-0.

Hewitt G. M., 1999: Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.

Holderegger R., Stehlik I. & Schneller J. J., 1998: Estimation of the relative importance of sexual and vegetative reproduction in the clonal woodland herb *Anemone nemorosa*. *Oecologia* 117: 105-107.

Horsák M. & Chytrý M., 2010: Krajiny zamrzlé v čase I. Jižní Sibiř – současná analogie střední Evropy v době ledové. *Živa* 3: 118-120.

Hosseinzadeh-Colagar A., Haghghatnia M. J., Amiri Z., Mohadjerani M., Tafrihi M., 2016: Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: Evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands. *Molecular Biology Research Communications*. 5 (3): 167-174.

Chuman T., 2013: Vývoj půd v kvartéru. *Geografické rozhledy* 1: 13-14.

Chytrý M., 2007: Vegetace České republiky. 1, Travná a keříčková vegetace. Academia, Praha ISBN 978-80-200-1462-7

Chytrý M., Horsák M., Danihelka J., Ermakov N., German D. A., Hájek M., Hájková P., Kočí M., Kubešová S., Lustyk P., Nekola J. C., Pavelková Řičánková V., Preislerová Z., Resl P. & Valachovič M., 2018: A modern analogue of the Pleistocene steppe-tundra ecosystem in southern Siberia. *Boreas* 48: 36-56.

Chytrý M., Kučera T., Kočí M., Grulich V. & Lustyk P., 2010a: Katalog biotopů České republiky. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha ISBN 978-80-87457-02-3

Chytrý M., Pavelková Řičánková V. & Horsák M., 2010b: Kde dnes znamená včera Jihsibiřské refugium doby ledové. *Vesmír* 89: 526-530.

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

Jarne P. & Lagoda J. L., 1996: Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11 (10): 424-9.

Juříčková L., Horáčková J. & Ložek V., 2014: Direct evidence of central European forest refugia during the last glacial period based on mollusc fossils. *Quaternary Research* 82: 222-228.

Kubát K., 2002: Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha: 116.

- Kwiatkowska-Falińska A. J. & Faliński J. B., 2007: Conditions of the occurrence of *Anemone sylvestris* in a Kettle hole in North-Eastern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 76 (2): 133-140.
- Lande R., 1988: Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241 (4872): 1455-1460.
- Listl D., Poschlod P. & Reisch Ch., 2017: Phylogeography of a tough rock survivor in European dry grasslands. *PLoS ONE* 12 (6): 1-21.
- Ložek V., 1973: *Příroda ve čtvrtohorách*. Academia, Praha.
- Ložek V., 2004: Středoevropské bezlesí v čase a prostoru. *Ochrana přírody* 59.
- Ložek V., 2010: Spraš a sprašová step – přehlížený biom ledových dob II. Sprašová step – významný prvek glaciální krajiny. *Živa* 4: 146-149.
- Ložek V., 2011: *Po stopách pravěkých dějů. O silách, které vytvářely naši krajinu*. Dokořán, Praha. ISBN 978-80-7363-301-1
- Magri D., Vendramin G. G., Comps B., Dupanloup I., Geburek T., Górnóry D., Latalowa M., Litt T., Paule L., Roure J. M., Tantau I., Knaap W. O., Petit R. J. & de Beaulieu J. L., 2006: A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: paleobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171 (1): 199-221.
- Müller N., Schneller J. J. & Holderegger R., 2000: Variation on breeding system among populations of the common woodland herb *Anemone nemorosa* (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution* 221: 69-76.
- N. A. Rosenberg, 2004: Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137-138.
- Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R. & Vieira M. L. C., 2006: Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29 (2): 294-307.
- Peakall R. & Smouse P.E., 2006: GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* 6: 288-295.

Peakall R. & Smouse P.E., 2012: GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

Pergl J., Sádlo J., Petřík P., Danihelka J., Chrtek J., Hejda M., Moravcová L., Perglová I., Štrajerová K. & Pyšek P., 2016: Dark side of the fence: ornamental plants as a source of wild-growing flora in the Czech Republic. *Preslia* 88: 163-184.

Petit R. J., Brewer S., Bordács S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csai Kl U. M., van Dam B., Deans J. D., Espinel S., Fineschi S., Finkeldey R., Glaz I., Gouicoechea P., Jensen J. S., König A. O., Lowe A. J., Madsen S. F., Mátyás G., Munro R. C., Popescu F., Slade D., Tabbener H., de Vries S. G. M., Ziegenhagen B., de Beaulieu J. L. & Kremer A., 2002: Indentification of refugia and post-glacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.

Piyamongkol W., Bermúdez M. G., Harper J. C., Wells D., 2003: Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Basic science of reproductive medicine*. 9 (7): 411-420.

Pokorný P., Chytrý M., Juříčková L., Sádlo J., Novák J. & Ložek V., 2015 *The Holocene* 25 (4): 716-726.

Poschlod P. & WallisDeVries M. F., 2002: The historical and socioeconomic perspective of calcareous grasslands – lessons from the distant and recent past. *Biological conservation* 104 (3): 361-376.

Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P., 2000: Inference of population structure using multilocus genotype. *Genetics* 155: 945-959.

Roleček J., Čornej I. I. & Tokarjuk A. I., 2014: Understanding the extreme species richness of semi-dry grasslands in east-central Europe: a comparative approach. *Preslia* 86: 13-34.

Schmitt T. & Varga Z., 2012: Extra-Mediterranean refugia: The rule and not the exception? *Frontiers in Zoology* 9 (22).

- Slatkin M., 1995: A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139 (1): 457-462.
- Slavík B., 1986: Fytokartografické syntézy ČSR: 1. Díl. BÚ ČSAV, Průhonice, 199 s.
- Smith J. R., Carpten J. D., Browstein M. J., Ghosh S., Magnuson V. L., Gilbert D. A., Trent J. M., Collins F., 1995: Approach to Genotyping Errors Caused by Nontemplated Nucleotide Addition by Taq DNA Polymerase. *Genome Research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 312-317.
- Stehlik I. & Holderegger R., 2000: Spatial genetic structure and clonal diversity of *Anemone nemorosa* in late successional deciduous woodlands of Central Europe. *Journal of Ecology* 88: 424-435.
- Stewart J. R., Lister A. M., Barnes I. & Dalén L., 2009: Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society* 277: 661-671.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G. & Cosson J. F., 1998: Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Toth E., Deak B., Valko O., Kelemen A., Miglecz T., Tothmeresz B. & Torok P., 2018: Livestock type is more crucial than grazing intensity: traditional cattle and sheep grazing in short-grass steppes. *Land degradation & development* 29 (2): 231-239.
- Tóth G., Gáspári Z. & Jurka J., 2000: Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A., 1964: *Flora Europea*. Cambridge university press, Cambridge: 217-219.
- Urbaniak J., Kwiatkowski P. & Ronikier M., 2018: postglacial history and current population genetic diversity of a central-European forest plant *Hacquetia epipactis*. *Preslia* 90: 39-57.

Willis K. J. & van Andel T. H., 2004: Trees or no trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews* 23: 2369-2387.

Wood T. E., Takebayashi N., Barker M. S., Mayrose I., Greenspoon P. B. & Rieseberg L. H., 2009: The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the national academy of sciences of the United states of America* 106 (33): 13875-13879.

Wright, S., 1978: *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability within and among Natural Populations.* University of Chicago Press

Zahumenická P., Fernández E., Šedivá J., Žiarovská J., Ros-Santaella J. L., Mertínez-Fernandez D., Russo D. & Milella L., 2018: Morphological, physiological and genomic comparisons between diploids and induces tetraploids in *Anemone sylvestris* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 132: 317-327.

Internetové zdroje:

AOPK ČR, ©2016–2019: Nálezová databáze ochrany přírody (online) [cit.2019.01.28], dostupné z <<http://portal.nature.cz>>.

Ersts P. J., 2019: Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3) (online) [cit. 2019.02.9], dostupné z <http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg>.

GAČR, ©2019: Grantová agentura České republiky (online) [cit.2019.01.28], dostupné z <<http://gacr.cz/seznam-podporených-projektu>>.

Pladias, ©2014–2019: Databáze české flóry a vegetace (online) [cit.2019.01.28], dostupné z <<http://www.pladias.cz>>.

Qiagen ©2016: DNeasy® Plant Mini Kit (online) [cit. 2019.01.28], dostupné z <<http://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=6b9bcd96-d7d4-48a1-9838-58dbfb0e57d0&lang=en>>.

Qiagen ©2018a: DNeasy® Plant Handbook (online) [cit. 2019.01.28], dostupné z <<http://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en>>.

Qiagen ©2018b: MM PCR kit (online) [cit. 2019.02.9], dostupné z <<https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/end-point-pcr-enzymes-and-kits/regular-pcr/qiagen-multiplex-pcr-kit/#orderinginformation>>.

Legislativní zdroje:

Směrnice č. 92/43/EHS ze dne 21. května 1992, O ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin., Příloha č. I O ochraně přírodních stanovišť v zájmu společenství.

Vyhláška č. 395/1992 Sb. VYHLÁŠKA ministerstva životního prostředí České republiky ze dne 11. června 1992, kterou se provádějí některá ustanovení zákona České národní rady č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny.

7. Přílohy

7.1 Příloha č. 1

Alelické složení mikrosatelitových lokusů vzorkovaných jedinců analyzovaných v programu GenClone 2.0.

Č.p.	Vzorek		Odhad N	As-Tet-47-FAM	AS-Tet-49-FAM	As-Tet-90-FAM	As-Tri-35-VIC	As-Di-21-VIC	As-Tri-30-NED	As-Tet-91-NED	As-Di-67-NED	As-Di-92-PET	As-Tet-44-PET										
225	10	225_10_B02.fsa	30	161	161	178	182	393	397	162	165	264	264	182	182	197	205	285	289	164	174	200	200
	11	225_11_C02.fsa		157	157	178	178	397	416	165	165	0	0	169	178	205	205	285	285	154	166	200	200
	12	225_12_D02.fsa		157	161	178	194	389	397	162	171	266	268	182	182	197	205	285	289	162	174	200	200
	13	225_13_E02.fsa		157	161	178	194	389	397	162	171	266	268	182	182	197	205	285	289	162	174	200	200
	14	225_14_F02.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	15	225_15_G02.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	16	225_16_H02.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	17	225_17_A03.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	18	225_18_B03.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	19	225_19_C03.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	20	225_20_D03.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	2	225_2_B01.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	3	225_3_C01.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	4	225_4_D01.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	5	225_5_E01.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	6	225_6_F01.fsa		157	157	178	178	393	397	0	0	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	7	225_7_G01.fsa		157	157	178	178	393	397	165	165	264	264	169	182	205	205	285	289	166	166	200	208
	1	225_1_A01.fsa		157	161	178	194	389	397	162	171	266	268	182	182	197	205	285	289	162	174	200	200

	9	225_9_A02.fsa		157	161	178	194	389	397	162	171	266	268	182	182	197	205	285	289	162	174	200	200
	8	225_8_H01.fsa		157	161	178	194	389	397	162	171	266	268	182	182	197	205	285	289	162	174	200	200
226	10	226_10_F04.fsa	100	157	157	178	190	397	408	162	165	262	262	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
	11	226_11_G04.fsa		157	157	186	194	397	397	165	165	266	268	169	175	205	205	295	297	164	164	200	208
	12	226_12_H04.fsa		157	157	178	190	397	408	162	165	262	262	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
	13	226_13_A05.fsa		149	157	190	198	397	408	165	171	264	264	169	182	205	205	291	291	164	172	200	200
	14	226_14_B05.fsa		157	157	178	190	397	408	162	165	262	262	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
	15	226_15_C05.fsa		157	157	178	190	397	408	162	165	262	262	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
	16	226_16_D05.fsa		149	157	190	198	397	408	165	171	264	264	169	182	205	205	291	291	164	172	200	200
	17	226_17_E05.fsa		149	149	178	190	397	408	165	165	266	266	160	182	197	205	291	291	164	164	200	200
	18	226_18_F05.fsa		149	149	178	190	397	408	165	165	266	266	160	182	197	205	291	291	164	164	200	200
	19	226_19_G05.fsa		149	149	178	190	397	408	165	165	266	266	160	182	197	205	291	291	164	164	200	200
	1	226_1_E03.fsa		149	157	190	198	397	408	165	171	264	264	169	182	205	205	291	291	164	172	200	200
	20	226_20_H05.fsa		149	149	178	190	397	408	165	165	266	266	160	182	197	205	291	291	164	164	200	200
	2	226_2_F03.fsa		157	157	178	190	397	408	162	165	262	268	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
	3	226_3_G03.fsa		157	157	178	190	397	408	162	165	262	268	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
	4	226_4_H03.fsa		157	157	178	186	397	397	165	165	262	266	175	182	205	205	295	297	164	164	200	200
	5	226_5_A04.fsa		157	157	0	0	397	397	165	165	262	266	0	0	197	205	291	291	164	170	200	200
	6	226_6_B04.fsa		157	157	178	190	397	408	162	165	262	268	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
	7	226_7_C04.fsa		157	157	178	190	397	408	162	165	262	268	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
	8	226_8_D04.fsa		157	157	178	190	397	408	162	165	262	268	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
	9	226_9_E04.fsa		157	157	178	190	397	408	162	165	262	268	182	182	205	205	291	293	164	172	208	208
228	10	228_10_B07.fsa	40	157	157	178	194	397	404	0	0	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	11	228_11_C07.fsa		157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	12	228_12_D07.fsa		157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	13	228_13_E07.fsa		157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	14	228_14_F07.fsa		157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	15	228_15_G07.fsa		157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208

229	16	228_16_H07.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	17	228_17_A08.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	18	228_18_B08.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	19	228_19_C08.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	1	228_1_A06.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	20	228_20_D08.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	2	228_2_B06.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	3	228_3_C06.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	4	228_4_D06.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
	5	228_5_E06.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208
6	228_6_F06.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208	
7	228_7_G06.fsa	157	157	178	178	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208	
8	228_8_H06.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208	
9	228_9_A07.fsa	157	157	178	194	397	404	165	171	264	264	169	182	205	205	287	287	154	166	200	208	
229	10	229_10_F09.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	11	229_11_G09.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	12	229_12_H09.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	13	229_13_A10.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	14	229_14_B10.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	15	229_15_C10.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	16	229_16_D10.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	17	229_17_E10.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	18	229_18_F10.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	19	229_19_G10.fsa	157	157	186	194	397	397	165	165	262	266	182	185	205	205	293	293	166	166	200	200
	1	229_1_E08.fsa	157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	20	229_20_H10.fsa	157	157	186	194	397	400	162	165	268	268	182	185	205	205	293	293	166	168	200	200
	2	229_2_F08.fsa	157	157	186	194	397	400	162	165	268	268	182	185	205	205	293	293	166	168	200	200
	3	229_3_G08.fsa	157	157	186	194	397	397	165	165	262	266	182	185	205	205	293	293	166	166	200	200

	4	229_4_H08.fsa		157	157	186	194	397	400	162	165	268	268	182	185	205	205	293	293	166	168	200	200
	5	229_5_A09.fsa		157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	6	229_6_B09.fsa		157	157	186	194	397	400	162	165	268	268	182	185	205	205	293	293	166	168	200	200
	7	229_7_C09.fsa		157	157	186	194	397	400	162	165	268	268	182	185	205	205	293	293	166	168	200	200
	8	229_8_D09.fsa		157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
	9	229_9_E09.fsa		157	157	178	186	397	397	162	162	268	268	169	182	205	205	295	297	166	181	200	200
230	10	230_10_B12.fsa	50	157	157	178	190	397	397	165	168	264	264	169	178	197	205	287	287	166	166	200	208
	11	230_11_C12.fsa		157	157	178	190	397	397	165	168	264	264	169	178	197	205	287	287	166	166	200	208
	12	230_12_D12.fsa		157	157	178	190	397	397	165	168	264	264	169	178	197	205	287	287	166	166	200	208
	13	230_13_E12.fsa		157	157	178	190	397	397	165	168	264	264	169	178	197	205	287	287	166	166	200	208
	17	230_17_A01.fsa		157	157	178	190	400	416	165	165	262	262	0	0	197	205	289	291	162	166	200	200
	14	230_14_G12.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	262	262	169	178	197	205	289	295	162	162	200	200
	15	230_15_F12.fsa		157	157	178	190	397	397	165	168	264	264	169	178	197	205	287	287	166	166	200	208
	16	230_16_H12.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	262	262	169	178	197	205	289	295	162	162	200	200
	18	230_18_B01.fsa		157	157	178	190	0	0	165	165	262	262	0	0	197	205	289	291	162	166	200	200
	19	230_19_C01.fsa		157	157	178	190	0	0	165	165	262	262	0	0	197	205	289	291	162	166	200	200
	1	230_1_A11.fsa		157	157	194	194	397	397	165	165	264	266	169	182	197	205	299	299	166	166	200	208
	20	230_20_D01.fsa		157	157	178	190	0	0	165	165	262	262	0	0	197	205	289	291	162	166	200	200
	2	230_2_B11.fsa		157	157	194	194	397	397	165	165	264	266	169	182	197	205	299	299	166	166	200	208
	3	230_3_C11.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	262	262	169	178	197	205	289	295	162	162	200	200
	4	230_4_D11.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	262	262	169	178	197	205	289	295	162	162	200	200
	5	230_5_E11.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	262	262	169	178	197	205	289	295	162	162	200	200
	6	230_6_F11.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	262	262	169	178	197	205	289	295	162	162	200	200
	7	230_7_G11.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	262	262	169	178	197	205	289	295	162	162	200	200
	8	230_8_H11.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	262	262	169	178	197	205	289	295	162	162	200	200
	9	230_9_A12.fsa		149	149	178	190	400	416	165	165	262	262	178	182	197	205	291	291	162	166	200	200
232	10	232_10_F02.fsa	50	157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200
	11	232_11_G02.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200

	12	232_12_H02.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
	13	232_13_A03.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	268	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
	14	232_14_B03.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	268	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
	15	232_15_C03.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	268	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
	16	232_16_D03.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	268	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
	17	232_17_E03.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	268	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
	18	232_18_F03.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
	19	232_19_G03.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	268	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
	1	232_1_E01.fsa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	232_20_H03.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
	2	232_2_F01.fsa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	232_3_G01.fsa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	232_4_H01.fsa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	232_5_A02.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200	
6	232_6_B02.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	268	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200		
7	232_7_C02.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200		
8	232_8_D02.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	268	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200		
9	232_9_E02.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	268	160	182	197	205	289	297	162	164	200	200		
233	10	233_10_B05.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208	
	11	233_11_C05.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208	
	12	233_12_D05.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208	
	13	233_13_E05.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208	
	14	233_14_F05.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208	
	15	233_15_G05.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208	
	16	233_16_H05.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208	
	17	233_17_A06.fsa	157	157	178	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	291	291	168	176	200	208	
	18	233_18_B06.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208	
	19	233_19_C06.fsa	157	157	178	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	291	291	168	176	200	208	

233	1	233_1_A04.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208
	20	233_20_D06.fsa	157	157	178	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	291	291	168	176	200	208
	2	233_2_B04.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208
	3	233_3_C04.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208
	4	233_4_D04.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208
	5	233_5_E04.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208
	6	233_6_F04.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208
	7	233_7_G04.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208
	8	233_8_H04.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208
9	233_9_A05.fsa	161	161	194	194	397	397	165	174	264	264	169	169	197	205	287	291	162	168	208	208	
234	10	234_10_F07.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	11	234_11_G07.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	12	234_12_H07.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	13	234_13_A08.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	14	234_14_B08.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	15	234_15_C08.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	16	234_16_D08.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	17	234_17_E08.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	18	234_18_F08.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	19	234_19_G08.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	1	234_1_E06.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	20	234_20_H08.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	2	234_2_F06.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	3	234_3_G06.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	4	234_4_H06.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	5	234_5_A07.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	6	234_6_B07.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	7	234_7_C07.fsa	157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200

	8	234_8_D07.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
	9	234_9_E07.fsa		157	157	178	190	397	397	165	165	264	264	169	178	197	205	287	295	162	162	200	200
235	10	235_10_B10.fsa	100	157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	11	235_11_C10.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	12	235_12_D10.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	13	235_13_E10.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	14	235_14_F10.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	15	235_15_G10.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	16	235_16_H10.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	17	235_17_A11.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	18	235_18_B11.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	19	235_19_C11.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	1	235_1_A09.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	20	235_20_D11.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	2	235_2_B09.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	3	235_3_C09.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	4	235_4_D09.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	5	235_5_E09.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	6	235_6_F09.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	7	235_7_G09.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
	8	235_8_H09.fsa		157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208
9	235_9_A10.fsa	157	157	178	194	397	397	165	171	264	268	169	169	197	205	291	291	162	162	200	208		
236	10	236_10_F12.fsa	20	157	157	190	194	397	416	165	165	264	268	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	11	236_11_G12.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	12	236_12_H12.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	13	236_13_E12.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	0	0	208	208
	14	236_14_F12.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	15	236_15_C01.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	268	169	182	197	205	293	293	0	0	208	208

	16	236_16_D01.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	13	236_13_A01.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	0	0	208	208
	17	236_17_E01.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	18	236_18_F01.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	19	236_19_G01.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	1	236_1_E11.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	268	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	20	236_20_G12.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	2	236_2_F11.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	3	236_3_G11.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	4	236_4_H11.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	264	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	5	236_5_A12.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	268	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	6	236_6_B12.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	268	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	7	236_7_C12.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	268	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
238	8	236_8_D12.fsa	50	157	157	190	194	397	416	165	165	264	268	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	9	236_9_E12.fsa		157	157	190	194	397	416	165	165	264	268	169	182	197	205	293	293	162	166	208	208
	10	238_10_B03.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	11	238_11_C03.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	12	238_12_D03.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	13	238_13_E03.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	14	238_14_F03.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	15	238_15_G03.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	16	238_16_H03.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	17	238_17_A04.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	18	238_18_B04.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	19	238_19_C04.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
	1	238_1_A02.fsa		157	157	178	178	397	400	165	176	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200
20	238_20_D04.fsa	157	157	178	194	397	400	0	0	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200		
2	238_2_B02.fsa	157	157	178	194	397	404	165	165	264	264	169	182	197	205	289	299	162	164	200	200		

	3	238_3_C02.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200		
	4	238_4_D02.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200		
	5	238_5_E02.fsa		157	157	178	194	400	404	165	165	264	264	169	182	197	205	297	299	160	162	196	200		
	6	238_6_F02.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200		
	7	238_7_G02.fsa		153	157	194	194	404	404	165	165	264	264	169	182	197	205	297	299	162	162	208	208		
	8	238_8_H02.fsa		157	157	178	194	400	404	165	165	263	264	169	182	197	205	297	299	160	162	196	200		
	9	238_9_A03.fsa		157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	169	182	197	205	287	289	162	162	196	200		
	239	10		239_10_F05.fsa	50	157	157	178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200
		11		239_11_G05.fsa		157	157	178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200
12		239_12_H05.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
13		239_13_A06.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
14		239_14_B06.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
15		239_15_C06.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
16		239_16_D06.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
17		239_17_E06.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
18		239_18_F06.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
19		239_19_G06.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
1		239_1_E04.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
20		239_20_H06.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
2		239_2_F04.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
3		239_3_G04.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	0	0	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
4		239_4_H04.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	0	0	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
5		239_5_A05.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
6		239_6_B05.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
7		239_7_C05.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
8		239_8_D05.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
9		239_9_E05.fsa	157	157		178	182	397	400	165	165	266	268	182	182	197	205	285	289	166	168	196	200		
242	10	242_10_B08.fsa	100	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200		

242	11	242_11_C08.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	12	242_12_D08.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	13	242_13_E08.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	14	242_14_F08.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	15	242_15_G08.fsa	0	0	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	16	242_16_H08.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	262	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	17	242_17_A09.fsa	149	157	194	194	397	397	165	174	262	262	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	18	242_18_B09.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	19	242_19_C09.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	0	0	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	1	242_1_A07.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	20	242_20_D09.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	2	242_2_B07.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	3	242_3_C07.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	4	242_4_D07.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	5	242_5_E07.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	6	242_6_F07.fsa	0	0	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	7	242_7_G07.fsa	149	149	194	194	397	397	165	174	262	268	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	8	242_8_H07.fsa	0	0	194	194	397	397	165	174	262	262	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
	9	242_9_A08.fsa	0	0	194	194	397	397	0	0	262	262	160	172	197	205	285	285	158	162	200	200
243	10	243_10_F10.fsa	157	157	178	178	397	400	165	165	262	264	160	169	197	205	291	291	164	170	200	200
	11	243_11_G10.fsa	157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	12	243_12_H10.fsa	157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	13	243_13_A11.fsa	157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	14	243_14_B11.fsa	157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	15	243_15_C11.fsa	157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	16	243_16_D11.fsa	157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	17	243_17_E11.fsa	157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	18	243_18_F11.fsa	157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200

	19	243_19_G11.fsa		157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	1	243_1_E09.fsa		157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	20	243_20_H11.fsa		157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	2	243_2_F09.fsa		157	157	178	178	397	404	165	165	262	264	160	169	197	205	291	291	164	164	200	200
	3	243_3_G09.fsa		157	157	178	178	397	404	165	165	262	264	160	169	197	205	291	291	164	164	200	200
	4	243_4_H09.fsa		157	157	178	178	397	404	165	165	262	262	169	178	197	205	291	291	164	164	200	200
	5	243_5_A10.fsa		157	157	178	178	397	400	165	165	262	264	160	169	197	205	291	291	164	170	200	200
	6	243_6_B10.fsa		157	157	178	178	397	400	165	165	262	264	160	169	197	205	291	291	164	170	200	200
	7	243_7_C10.fsa		157	157	178	178	397	400	0	0	262	264	160	169	197	205	291	291	164	170	200	200
8	243_8_D10.fsa	157	157	178	178	397	400	165	165	262	264	160	169	197	205	291	291	164	170	200	200		
9	243_9_E10.fsa	157	157	178	178	397	400	165	165	262	264	160	169	197	205	291	291	164	164	200	200		
244	10	244_10_B01.fsa	100	157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	11	244_11_C01.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	12	244_12_D01.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	0	0	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	13	244_13_E01.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	9	244_9_A01.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	266	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	14	244_14_F01.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	0	0	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	15	244_15_G01.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	266	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	16	244_16_H01.fsa		157	157	190	194	397	397	0	0	0	0	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	17	244_17_A02.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	266	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	18	244_18_B02.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	19	244_19_C02.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	266	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	1	244_1_A12.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	266	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	20	244_20_D02.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	266	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	2	244_2_B12.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	266	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	3	244_3_C12.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	169	182	205	205	287	297	166	180	200	208
	4	244_4_D12.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	5	244_5_E12.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	0	0	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208

	6	244_6_F12.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	169	182	205	205	287	297	166	180	200	208
	7	244_7_G12.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	266	169	182	205	205	287	297	166	166	200	208
	8	244_8_H12.fsa		157	157	190	194	397	397	165	165	262	266	169	182	205	205	287	297	166	166	200	200
245	10	245_10_F03.fsa	100	157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	11	245_11_G03.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	12	245_12_H03.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	13	245_13_A04.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	14	245_14_B04.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	15	245_15_C04.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	16	245_16_D04.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	17	245_17_E04.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	18	245_18_F04.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	19	245_19_G04.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	1	245_1_E02.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	20	245_20_H04.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	2	245_2_F02.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	3	245_3_G02.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	4	245_4_H02.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	5	245_5_A03.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	6	245_6_B03.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	7	245_7_C03.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
	8	245_8_D03.fsa		157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200
9	245_9_E03.fsa	157	157	178	178	393	408	165	174	262	262	182	182	197	205	285	289	162	170	192	200		
246	10	246_10_B06.fsa	50	157	157	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
	11	246_11_C06.fsa		149	149	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
	12	246_12_D06.fsa		149	149	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
	13	246_13_E06.fsa		157	157	178	178	397	397	171	171	264	264	169	169	197	205	287	287	168	168	200	200
	14	246_14_F06.fsa		157	157	178	178	397	397	171	171	264	264	169	169	197	205	287	287	168	168	200	200

246	15	246_15_G06.fsa	157	157	178	178	397	397	171	171	264	264	169	169	197	205	287	287	168	168	200	200
	16	246_16_H06.fsa	157	157	178	178	397	397	171	171	262	264	169	169	197	205	287	287	168	168	200	200
	17	246_17_A07.fsa	157	157	178	178	397	397	171	171	264	264	169	169	197	205	287	287	168	168	200	200
	18	246_18_B07.fsa	157	157	178	178	397	397	0	0	264	264	169	169	197	205	287	287	168	168	200	200
	19	246_19_C07.fsa	157	157	178	178	397	397	171	171	264	264	169	169	197	205	287	287	0	0	200	200
	1	246_1_A05.fsa	149	149	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
	20	246_20_D07.fsa	157	157	178	178	397	397	171	171	264	264	169	169	197	205	287	287	168	168	200	200
	2	246_2_B05.fsa	149	157	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
	3	246_3_C05.fsa	149	157	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
	4	246_4_D05.fsa	149	157	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
	5	246_5_E05.fsa	149	149	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
	6	246_6_F05.fsa	149	149	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
	7	246_7_G05.fsa	149	157	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200
8	246_8_H05.fsa	149	161	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200	
9	246_9_A06.fsa	149	157	190	190	397	400	165	171	264	264	182	182	197	205	289	297	168	168	200	200	
248	10	248_10_F08.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	11	248_11_G08.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	0	0	168	172	200	200
	12	248_12_H08.fsa	157	157	178	178	404	404	171	171	0	0	169	169	197	205	0	0	168	172	200	200
	13	248_13_A09.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	0	0	168	172	200	200
	14	248_14_B09.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	15	248_15_C09.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	16	248_16_D09.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	17	248_17_E09.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	18	248_18_F09.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	19	248_19_G09.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	1	248_1_E07.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	20	248_20_H09.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	2	248_2_F07.fsa	157	157	178	190	404	404	0	0	262	264	169	169	197	205	0	0	168	172	200	200

	3	248_3_G07.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	0	0	168	172	200	200
	4	248_4_H07.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	0	0	168	172	200	200
	5	248_5_A08.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	6	248_6_B08.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	7	248_7_C08.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	8	248_8_D08.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
	9	248_9_E08.fsa	157	157	178	190	404	404	171	171	262	264	169	169	197	205	291	295	168	172	200	200
250	10	250_10_A11.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	11	250_11_B11.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	12	250_12_C11.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	13	250_13_D11.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	14	250_14_E11.fsa	157	157	178	178	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	15	250_15_F11.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	16	250_16_G11.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	17	250_17_H11.fsa	157	157	178	178	397	400	0	0	0	0	160	175	0	0	289	289	0	0	0	0
	18	250_18_B12.fsa	157	157	178	178	397	400	0	0	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	19	250_19_C12.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	20	250_20_D12.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	2	250_2_A10.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	3	250_3_B10.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	4	250_4_C10.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	5	250_5_D10.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	6	250_6_E10.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	7	250_7_F10.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	8	250_8_G10.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
	9	250_9_H10.fsa	157	157	178	194	397	400	165	165	264	264	160	175	197	205	289	289	160	168	200	200
14	10	14_10_F12.fsa	157	157	178	190	397	400	165	171	262	264	169	169	197	205	299	303	164	168	200	200
	11	14_11_G12.fsa	157	157	190	190	397	400	165	171	262	264	169	182	205	205	285	285	164	168	200	208

	12	14_12_H12.fsa	157	157	178	190	397	400	165	171	262	264	169	169	197	205	299	303	164	168	200	200
	1	14_1_E11.fsa	157	157	178	190	393	393	165	165	262	262	169	169	197	205	285	301	164	168	200	200
	2	14_2_F11.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	163	169	197	205	301	301	162	162	200	204
	3	14_3_G11.fsa	157	157	190	194	397	397	165	165	262	262	163	169	197	205	301	301	162	162	200	204
	4	14_4_H11.fsa	157	157	178	178	393	400	165	171	262	262	163	169	197	205	285	285	162	168	200	200
	5	14_5_A12.fsa	157	157	178	190	393	393	165	165	262	266	169	169	197	205	285	301	164	168	200	200
	6	14_6_B12.fsa	157	157	178	190	393	393	165	165	262	262	169	169	197	205	285	301	164	168	200	200
	7	14_7_C12.fsa	161	161	190	190	393	400	165	171	262	264	169	175	197	205	285	303	162	162	200	200
	8	14_8_D12.fsa	161	161	190	190	393	400	165	171	262	264	169	175	197	205	285	303	162	162	200	200
9	14_9_E12.fsa	157	157	178	190	393	393	165	165	262	262	169	169	197	205	285	301	164	168	200	200	
22	10	22_10_B05.fsa	145	145	190	198	397	404	171	171	262	262	169	169	205	205	285	291	162	166	200	208
	11	22_11_C05.fsa	157	157	190	198	393	416	171	171	262	266	169	182	197	205	287	297	164	166	200	208
	12	22_12_D05.fsa	145	145	190	198	397	404	171	171	262	262	169	169	205	205	285	291	162	166	200	208
	13	22_13_E05.fsa	149	161	190	194	397	397	171	171	262	266	166	169	197	205	287	297	164	166	200	208
	14	22_14_F05.fsa	157	157	190	198	397	397	171	171	262	266	166	169	197	205	287	297	164	166	200	208
	15	22_15_G05.fsa	149	161	198	198	397	397	165	171	262	262	169	169	197	205	297	297	166	174	200	200
	16	22_16_H05.fsa	157	161	190	198	397	404	171	171	262	262	169	182	205	205	287	297	164	166	200	208
	17	22_17_E03.fsa	161	161	198	198	397	397	165	168	266	266	169	169	197	205	287	297	164	166	200	208
	18	22_18_F03.fsa	157	157	198	198	393	397	165	171	262	262	169	169	205	205	289	297	157	164	208	208
	19	22_19_G03.fsa	161	161	190	198	397	397	165	165	262	262	169	169	205	205	289	291	164	166	200	208
	1	22_1_A04.fsa	157	157	190	198	397	397	165	171	262	262	166	169	205	205	297	297	164	166	208	208
	20	22_20_H03.fsa	161	161	190	198	393	404	171	171	262	266	169	182	197	205	287	297	164	166	200	208
	2	22_2_B04.fsa	157	157	190	198	397	397	165	171	262	262	166	169	205	205	297	297	164	166	208	208
	3	22_3_C04.fsa	157	157	190	198	397	397	165	171	262	262	166	169	205	205	297	297	164	166	208	208
	4	22_4_D04.fsa	145	145	198	198	393	397	171	171	266	266	169	169	197	205	297	297	166	166	200	208
	5	22_5_E04.fsa	157	157	190	198	397	397	165	171	262	262	166	169	205	205	297	297	164	166	208	208
	6	22_6_F04.fsa	145	145	190	198	397	404	171	171	262	262	169	169	205	205	285	291	162	166	200	208
	7	22_7_G04.fsa	145	145	190	198	397	404	171	171	262	262	169	169	205	205	285	291	162	166	200	208
	8	22_8_H04.fsa	157	161	190	190	397	404	165	171	262	262	182	182	205	205	287	297	164	166	200	208
	9	22_9_A05.fsa	145	145	198	198	393	397	171	171	266	266	169	169	197	205	297	297	166	166	200	208

25	10	25_10_F08.fsa	157	157	194	194	397	404	164	171	264	266	160	182	197	205	287	291	160	162	196	200
	11	25_11_G08.fsa	157	157	178	194	404	404	164	165	266	268	178	182	197	205	287	287	164	174	196	196
	12	25_12_H08.fsa	157	157	190	194	404	404	165	171	266	268	169	182	197	205	287	291	164	166	196	200
	13	25_13_A09.fsa	157	157	190	194	397	397	165	171	264	264	178	182	197	205	287	297	164	164	196	200
	14	25_14_B09.fsa	157	157	194	194	397	404	165	165	264	264	169	182	197	205	287	287	168	174	200	208
	15	25_15_C09.fsa	157	161	178	194	397	404	164	165	266	266	178	182	197	205	287	297	164	164	196	200
	16	25_16_D09.fsa	157	157	194	194	397	397	164	171	266	268	178	182	197	205	287	297	164	164	196	200
	17	25_17_E09.fsa	157	157	190	194	404	404	165	171	266	268	169	182	197	205	287	291	164	166	196	200
	18	25_18_F09.fsa	157	157	190	190	404	404	165	171	266	266	169	178	197	205	287	297	162	164	200	200
	19	25_19_G09.fsa	157	157	190	194	397	404	164	165	266	266	178	182	197	205	287	287	164	164	200	200
	1	25_1_G07.fsa	157	157	190	194	404	404	165	165	264	266	178	182	197	205	287	287	164	164	196	200
	20	25_20_H09.fsa	157	157	190	194	404	404	164	171	266	268	169	178	197	205	287	291	164	166	200	200
	2	25_2_H07.fsa	157	157	190	194	404	404	165	165	264	266	178	182	197	205	287	287	164	164	196	200
	3	25_3_A10.fsa	157	157	190	194	397	404	164	165	266	266	178	182	197	205	287	287	164	164	200	200
	4	25_4_B10.fsa	157	157	190	194	404	404	165	165	264	264	178	182	205	205	287	287	164	174	196	208
	5	25_5_A08.fsa	157	157	190	194	404	404	164	171	266	268	169	178	197	205	287	291	164	166	200	200
	6	25_6_B08.fsa	149	149	178	194	404	404	164	165	266	268	178	182	197	205	287	287	164	174	196	196
	7	25_7_C08.fsa	157	157	190	190	397	404	165	171	266	268	160	178	197	205	297	297	158	158	196	208
	8	25_8_D08.fsa	157	157	190	194	397	404	165	171	266	268	160	169	197	205	291	291	164	172	196	200
9	25_9_E08.fsa	157	157	194	194	397	404	165	165	264	264	169	182	197	205	287	287	168	174	200	208	
30	10	30_10_B07.fsa	149	161	178	194	400	400	165	165	266	268	182	182	197	205	291	301	164	164	196	208
	11	30_11_C07.fsa	161	161	186	190	400	416	165	171	266	268	182	182	197	205	285	301	164	168	200	208
	12	30_12_D07.fsa	157	161	178	190	400	400	165	171	266	268	182	182	197	205	285	301	164	168	196	208
	13	30_13_E07.fsa	149	149	190	194	400	400	165	165	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	200
	14	30_14_F07.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208
	1	30_1_A06.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208
	2	30_2_B06.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208
	3	30_3_C06.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208
	4	30_4_D06.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208

	5	30_5_E06.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208
	6	30_6_F06.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208
	7	30_7_G06.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208
	8	30_8_H06.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208
	9	30_9_A07.fsa	161	161	190	190	400	400	171	171	266	268	182	182	197	205	291	301	162	164	196	208
4	10	4_10_D11.fsa	157	161	194	194	393	393	165	165	262	262	169	182	205	205	285	287	164	166	204	204
	1	4_1_C10.fsa	157	161	194	194	393	408	165	165	268	270	169	182	205	205	285	287	162	164	204	208
	2	4_2_D10.fsa	157	161	194	198	393	404	165	165	268	270	169	182	205	205	287	291	164	166	204	208
	3	4_3_E10.fsa	157	161	194	198	393	404	165	165	268	270	182	182	205	205	285	291	162	166	204	204
	4	4_4_F10.fsa	157	161	194	194	393	408	165	165	268	270	169	182	205	205	285	287	162	164	204	208
	5	4_5_G10.fsa	157	161	194	194	393	408	165	165	268	270	169	182	205	205	285	287	162	164	204	208
	6	4_6_H10.fsa	157	161	194	198	393	404	165	171	264	266	169	182	205	205	285	285	162	164	204	204
	7	4_7_A11.fsa	157	161	194	194	393	408	165	165	268	270	169	182	205	205	285	291	162	166	204	208
	8	4_8_B11.fsa	157	161	178	194	393	404	171	171	262	266	169	178	205	205	285	295	156	164	204	204
	9	4_9_C11.fsa	157	161	178	194	393	404	171	171	262	262	169	178	205	205	285	295	156	164	204	204
9	10	9_10_B02.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	264	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204
	11	9_11_C02.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204
	12	9_12_D02.fsa	157	157	178	194	389	397	165	165	264	264	169	182	205	205	293	293	164	166	200	204
	13	9_13_E02.fsa	165	165	190	194	397	397	165	165	266	266	160	169	197	205	287	307	162	174	208	208
	14	9_14_F02.fsa	165	165	190	194	397	397	165	165	266	266	160	169	197	205	287	307	162	174	208	208
	15	9_15_G02.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204
	16	9_16_H02.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	168	170	200	204
	17	9_17_A03.fsa	157	157	178	194	389	397	165	165	264	264	169	182	205	205	293	293	164	166	200	204
	18	9_18_B03.fsa	157	161	178	194	397	416	165	165	266	266	178	182	197	205	307	307	168	170	204	208
	19	9_19_C03.fsa	157	157	178	194	397	416	165	165	266	266	178	182	197	205	295	295	162	168	208	208
	20	9_20_D03.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204
	2	9_2_B01.fsa	157	157	178	178	397	397	165	165	264	266	169	182	197	205	299	301	162	168	208	208
	3	9_3_C01.fsa	157	157	178	194	397	397	171	171	262	262	169	182	197	205	289	289	166	172	208	208
	4	9_4_D01.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204
	5	9_5_E01.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204

	6	9_6_F01.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204
	7	9_7_G01.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204
	8	9_8_H01.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204
	9	9_9_A02.fsa	153	157	178	194	397	397	165	171	262	264	169	182	197	205	285	285	166	168	200	204
	1	9_1_A01.fsa	165	165	190	194	397	397	165	165	266	266	160	169	197	205	287	307	162	174	208	208

