

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Faktory ovlivňující fertilitu hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*)

Bakalářská práce

Barbora Jonášová

Školitel: RNDr. Libor Ekrt, PhD.

České Budějovice 2015

Jonášová B., 2015: Faktory ovlivňující fertilitu hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*). [Bracken (*Pteridium aquilinum*) fertility affecting factors, bachelor thesis in Czech] – 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: *Pteridium aquilinum* se rozmnožuje především vegetativním způsobem pomocí podzemních oddenků. Fertilní populace se v přírodě vyskytují spíše vzácně. V této bakalářské práci bylo zjišťováno, proč tomu tak je a jaké faktory mohou fertilitu tohoto druhu zapříčinit.

Annotation: Usually, *Pteridium aquilinum* reproduces vigorously by the use of rhizomes. An occurrence of fertile populations is rather rarely recorded. The aim of this bachelor thesis was to estimate the cause and factors affecting the fertility.

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

V Českých Budějovicích dne 19. 4. 2015

Barbora Jonášová

Poděkování

Mé poděkování patří všem, kteří mi pomohli při tvorbě této bakalářské práce. Děkuji svému školiteli Liboru Ekrtovi za vedení, důležité rady i přátelský přístup. Děkuji také Petru Blažkovi za velkou pomoc se statistikou, Ondrovi Hornychovi za pomoc při sběru vzorků v terénu a seznámení s pro mě doposud neznámými programy, Petru Kouteckému za ochotu a možnost pracovat s průtokovým cytometrem, Martinu Lepšimu za umožnění přístupu do herbářů Jihočeského muzea a v neposlední řadě paní knihovnici a rodinné známé Radce Sudové a jejím kolegyním za trpělivé poskytování odborných článků. Obrovský dík patří mé mamince Yvoně Jonášové jakožto spolehlivému řidiči a perfektnímu hledači hasivek při terénní práci, ale i za přívětivé prostředí s domácí stravou poskytnuté při kompletaci této bakalářské práce.

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární rešerše	3
2.1 Rozšíření a ekologie druhu.....	3
2.2 Cytologie a taxonomie	5
2.3 Reprodukce	10
2.3.1 Životní cyklus	10
2.3.2 Vegetativní reprodukce.....	11
2.3.3 Sexuální reprodukce	12
2.3.3.1 Faktory ovlivňující fertilitu druhu	13
2.3.4 Fertilita a polyploidní cytotypy.....	15
3 Metodika.....	17
3.1 Hodnocení faktorů prostředí v přirozených populacích	17
3.2 Stanovení ploidie za pomoci průtokové cytometrie	19
3.3 Měření velikosti průduchů	19
3.4 Mikroskopické hodnocení abortace spor.....	20
4 Výsledky	22
4.1 Hodnocení faktorů prostředí v přirozených populacích	22
4.2 Stanovení ploidní úrovně za pomoci průtokové cytometrie.....	26
4.3 Měření velikosti průduchů	29
4.4 Mikroskopické hodnocení abortace spor.....	32
5 Diskuze	36
5.1 Hodnocení faktorů prostředí v přirozených populacích na vliv fertility hasivky.....	36
5.2 Ploidní úrovně v populacích hasivky	37
5.3 Hodnocení abortace spor	38
6 Závěr	40
8 Přílohy	47

1 Úvod

Hasivka orličí *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn je kosmopolitní a hojně se vyskytující druh v přírodě i v blízkosti lidských sídel. Bývá řazena mezi nejrozšířenější kapradiny, někdy dokonce rostliny obecně (Page 1976). V současnosti proto existuje mnoho studií zabývajících se nejrůznějšími tématy týkající se této kapradiny jako např. toxicitou (Shanin et al. 1999; Aranha et al. 2014) nebo biokontrolou (Lawton 1988).

Hasivka orličí se rozmnožuje především vegetativně pomocí oddenků. Na rozdíl od převážné většiny ostatních kapradin, které jsou zpravidla každoročně pravidelně fertilmí, se plodné populace hasivky v přírodě vyskytují spíše vzácně. Proč tomu tak je zůstává dosud nepříliš spolehlivě vyřešeno. V minulosti se pouze několik studií zabývalo otázkou fertility tohoto druhu. Autoři většinou došli k závěru, že vznik výtrusnic a výtrusů na rostlině je dán souborem několika faktorů. Mezi ně zřejmě patří fyziologické faktory jako například věk rostliny, vitalita oddenku či míra vyvinutosti trofosporofylu a nebo faktory environmentální – vlhkost, intenzita světla, teplota a živiny (Boodle 1904; Conway 1953, 1957; Schwabe 1951; Dring 1965; Wynn et al. 2000).

Podle předběžných informací od školitele (revize herbářových položek ve veřejných herbářových sbírkách) je převážná většina lokalit hasivky orličí v ČR sterilních. Fertilmích lokalit je hrubým odhadem zřejmě několik málo procent lokalit (L. Ekrt in verb.). Proto vyvstává otázka, zda existuje nějaký pattern mezi lokalitami, kde se vyskytují rostliny fertilmí.

Studované téma se týká v první řadě studia fertility a faktorů, které ji mohou ovlivňovat a nebo ji přímo způsobují. Studie sestává ze dvou částí – teoretické a praktické. První rešeršní část nastiňuje problematiku tématu a byla nezbytná k pochopení dílčích aspektů vlastního výzkumu. Faktory, na které byla upřena pozornost, byly především ekologického a cytologického charakteru. Po provedení literární rešerše (kap. 2) je zřejmé, že na území České republiky a pravděpodobně ani ve střední Evropě nebyla představena žádná podobná práce zaměřující se blíže na fertilitu tohoto druhu.

Cíle bakalářské práce byly vytyčeny jako:

- 1) Vypracovat rešerši se zaměřením na fertilitu druhu.
- 2) Pokusit se detekovat faktory zodpovědné za fertilitu hasivky orličí.
- 3) Určit ploidní úrovně hasivky orličí v České republice a zjistit případnou korelaci s fertilitou.
- 4) Vyhodnotit procento abortovaných výtrusů u fertálních rostlin.

2 Literární rešerše

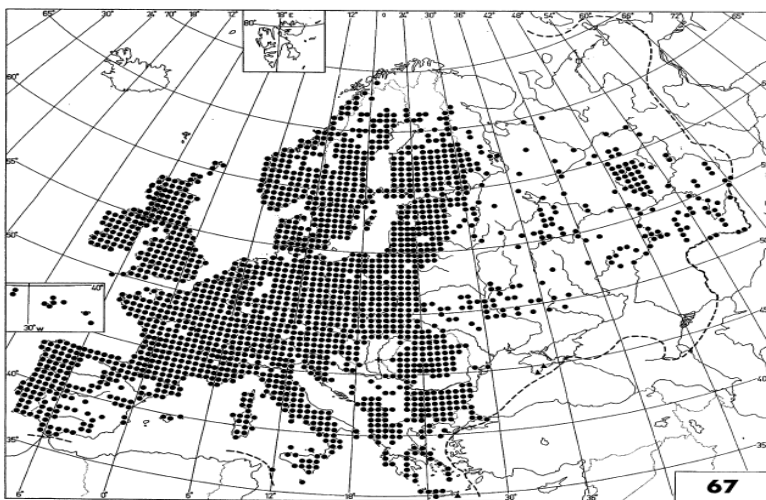
2.1 Rozšíření a ekologie druhu

Hasivka orličí je jednou z nejrozšířenějších rostlin na Zemi. Vyskytuje se prakticky všude kromě Antarktidy a arktických oblastí jako např. Island, Špicberky či Grónsko. Najdeme ji v tropických či mírných lesích, ale i v semiaridních oblastech obou polokoulí (Hegi 1981; Marrs 2006; Rasmussen 2003). Rod *Pteridium* se pravděpodobně vyvinul v tropických podmínkách. Z fosilních záznamů víme, že celosvětové distribuce dosáhla v době oligocénu (~23.8 Ma) v třetihorách (Page 1976). Nejčastěji se vyskytuje na obhospodařovaných loukách, pastvinách či jinak narušovaných místech, ale i v přírodních biotopech jako jsou lesy či okraje vodních toků. Druhotně expandovala na lidmi vytvořená stanoviště. Zemědělci ve Velké Británii, severozápadním USA a na Novém Zélandu je vnímána především jako plevelný druh, kterého se lze jen obtížně zbavit (Tryon 1941). Někteří autoři uvádí, že její výskyt je spjat s plochami, kde se v různé míře uplatnil požár (Page 1976). Jiní zase popisují kuriózní výskyt v místech, která byla značně narušena vojenskou technikou během a po Druhé světové válce (Conway 1953). Lze tedy s jistotou tvrdit, že preferuje narušená stanoviště a má expanzní tendence. Její kolonizační způsob života nejlépe vystihuje r/S-strategie. V České republice je uváděna ve světlých acidofilních (často borových) lesích, pasekách, lesních lemech, keřnatých stráních, pastvinách a vřesovištích, místy polích a úhorech (Dvořáková 1988). V oceánických oblastech jako je např. Velká Británie se uvádějí faktory, které mohou ovlivnit výskyt a kondici hasivky orličí jako teplota, srážky a vlhkost vzduchu, větrné podmínky, sluneční expozice, sklon a orientace svahu. Dále je citlivá na mráz, nedostatek vody a prudký vítr (Marrs and Watt 2008). Z téže studie vyplývá, že populace hasivky často rostou na jižních svazích se sklonem větším než 20° s orientací na severovýchod a jihozápad. Jinak je ale velmi adaptibilní ve všech směrech. Druh nemá výraznou preferenci na půdní chemismus ani okolní vegetaci (Watt 1940). Navíc se jedná o druh konkurenčně silný vyskytující se celkem ve 42 různých rostlinných společenstvech obývajících lesy, vřesoviště, rašeliniště, louky či přímořská stanoviště (Rodwell 1991, 1992, 2000). Ačkoliv chybí přímé důkazy, řada vědců se domnívá, že hasivka využívá, kromě zastiňování a vytlačování okolních druhů, i interspecifickou chemickou kompetici tzv. alelopatii (Whitehead 1964).

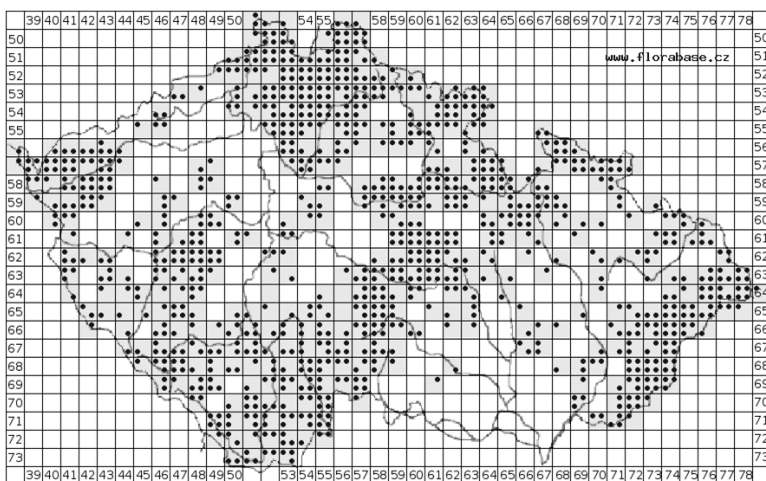
Obecně se jedná o rostlinu rostoucí prakticky všude kromě extrémně vysokých poloh. V kontinentální Evropě se udává její výškový limit kolem 1800 m n. m. a ve Velké Británii kolem 600 m n. m. (Valentine 1964; Pearman 2004). Výjimečně se vyskytuje až ve 3000 m n. m., ale pouze na africkém kontinentu (Page 1976). Ačkoliv má široký celosvětový areál rozšíření (viz Obr. 1), Evropy (viz Obr. 2) i České republiky (viz Obr. 3), lze na základě detailnějšího studia charakteru rozšíření usuzovat, že preferuje spíše oceánské klima (Page 1976).



Obr. 1: Kosmopolitní rozšíření *Pteridium aquilinum sensu lato* (Hegi 1981).



Obr. 2: Rozšíření druhu *Pteridium aquilinum* v Evropě. Schéma převzato z práce Marrs (2006), jímž bylo reprodukováno z *Florae Europaeae* vol. 1 se svolením Committee for the mapping of the Flora of Europe and Societas Biologica Fennica Valamo.



Obr. 3: Rozšíření druhu *Pteridium aquilinum* na území České republiky. Výstup z databáze Florabase <duben 2015> (Danihelka et al. 2011, www.florabase.cz).

2.2 Cytologie a taxonomie

Hasivka orličí *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn je kapradina náležící do čeledi Dennstaedtiaceae. Poprvé ji popsal Carl Linné v 18. století pod názvem *Pteris aquilina* L. (Linnaeus, 1753). Čeleď Dennstaedtiaceae zahrnuje terestriální nebo epilitické leptosporangiální kapradiny, které se vyznačují například triletními a čtyřbokými výtrusy nebo monoletními a ledvinitými výtrusy, ostěrou, pod níž se nachází výtrusnice či plazivým oddenkem s hustými chlupy, který se silně větví a rozpiná do okolí (Mickel 1973; Kramer 1990).

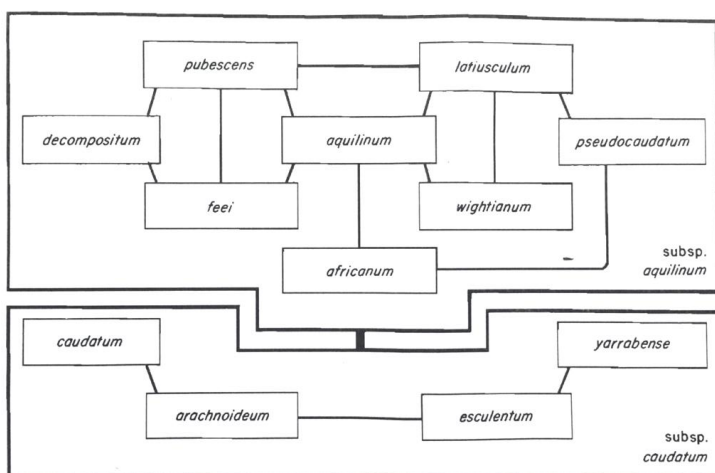
Zařazení hasivky do systému se potýká už desítky let s jistou mírou kontroverze. Byla řazena k nejrůznějším čeledím a nebyla jednoznačně ukotvena v systému.

Od roku 1950, kdy byly položeny základy cytologie u kapradin (tj. počítání chromozomů) víme, že se rod *Pteridium* vyznačuje základním chromozomovým číslem $x = 52$ a tudíž že diploidní (somatický) stav sporofytu odpovídá $2n = 2x = 104$ (Manton 1950). V jedné chvíli se uvažovalo, že základní chromozomové číslo je poloviční (Löve and Kjellqvist 1972), ale nebylo to potvrzeno (Wolf et al. 1987; Sheffield et al. 1993).

Polyploidní typy hasivky jsou spíše ojedinělé. Tetraploidy byli objeveni pouze na dvou místech – ve Střední a Jižní Americe (Galapágy) a v Asii (Jarret et al. 1968). Zvláštní pozornost si zaslouží doposud jediný zaznamenaný triploid. Důkaz byl podán na základě počtu chromozomů

$2n = 3x = 153$ v buňkách kořenové čepičky ve smíšené populaci v severním Walesu ve Velké Británii (Sheffield et al. 1993).

Dříve byla hasivka orličí považována za monotypický druh (Christensen 1906). V rámci jediného druhu *Pteridium aquilinum* byly rozlišeny dvě subspecie a celkem dvanáct variet (Tryon 1941, viz Obr. 4). Tato poddruhová systematika byla založena na míře ochlupení oddenků, kořene i listů a jejich rozmístění na rostlině, úhlu střední žilky jednotlivých řádů listů nebo na velikosti vnitřního a vnějšího indusia.

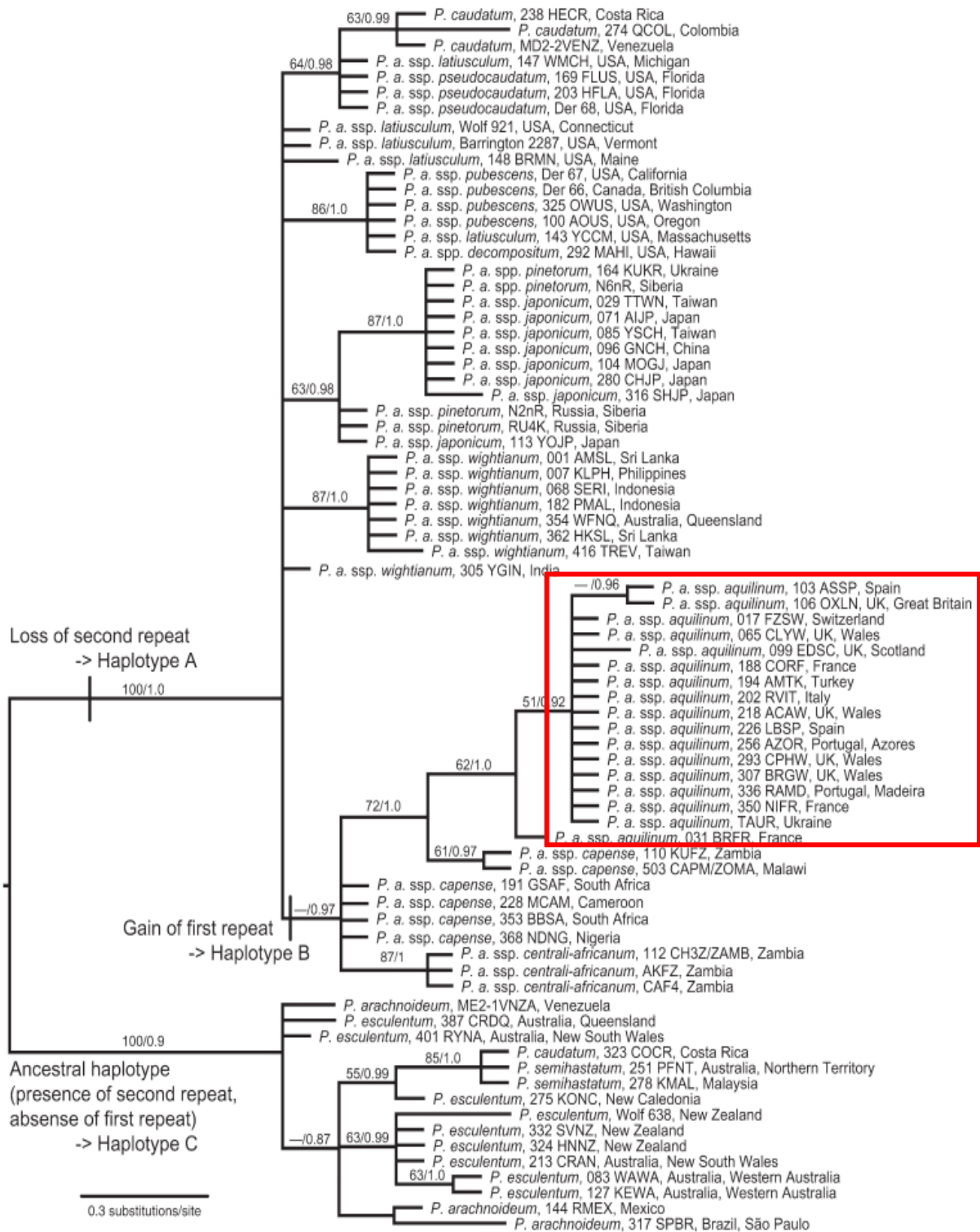


Obr. 4: První a dlouho přijímané taxonomické pojetí druhu *Pteridium aquilinum* podle Tryon (Page 1976).

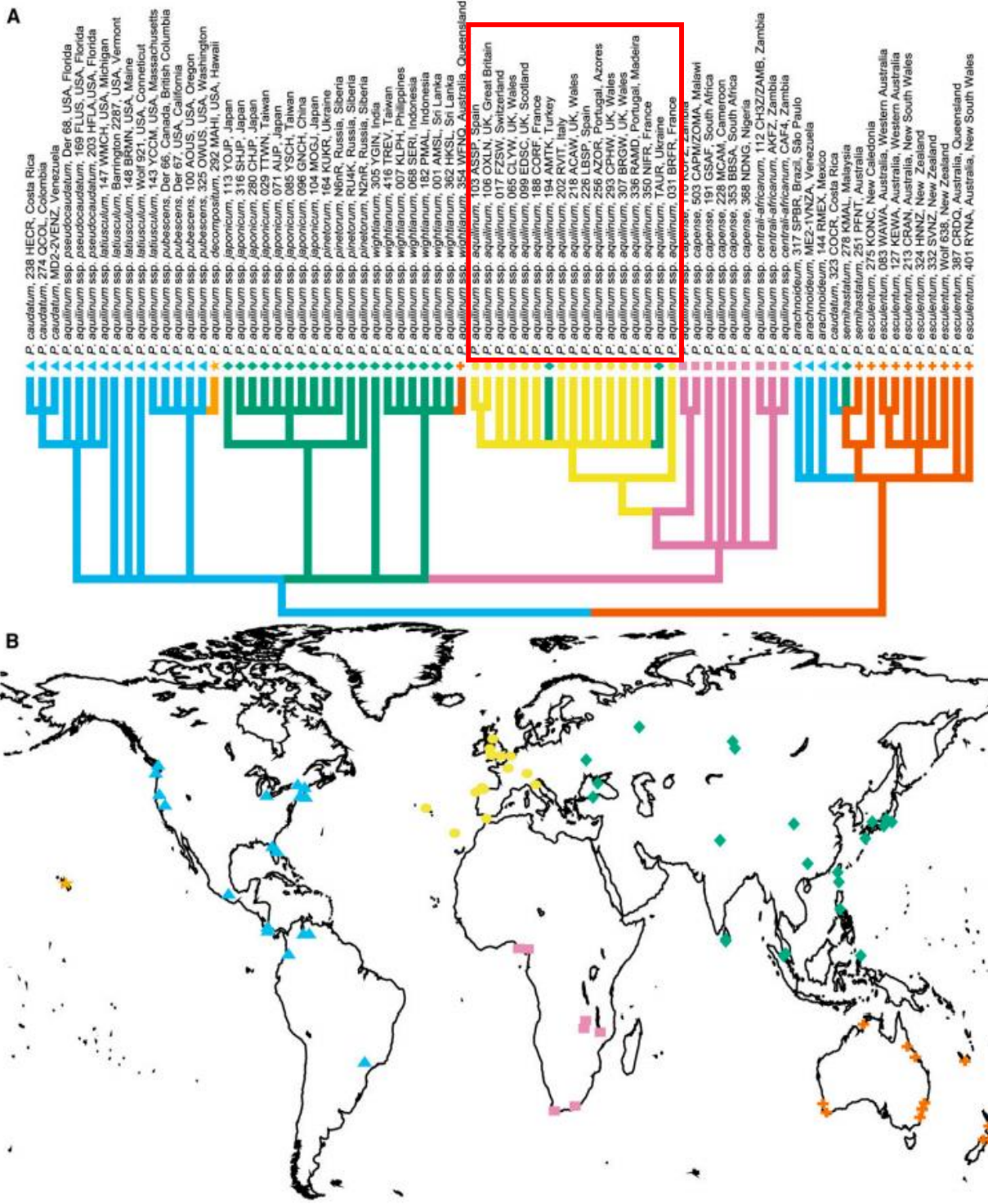
V rámci subspecie *aquilinum* byly uvedeny čtyři variety s výskytem v temperátu severní polokoule a v rámci subspecie *caudatum* byly popsány čtyři variety typické pro jižní polokouli. Page (1976) ještě akceptuje Tryonovo rozdělení a poznamenává, že v Evropě je možné nalézt ve velké míře hasivky kombinující znaky *P. aquilinum* subsp. *aquilinum* i *P. aquilinum* subsp. *caudatum*.

O komplexní přehled se potom pokusilo ještě několik autorů v osmdesátých a devadesátých letech, většinou se však pouze přeskupovaly variety a dávaly se jim jiné názvy, což vedlo spíše k dalším nejasnostem než skutečným vysvětlením.

Nejnovější fylogenetický výzkum (Thomson et al. 2009) uskutečněn na základě sekvenování chloroplastové DNA a amplifikace pomocí PCR měl za cíl lépe ošetřit systém Tryonové a upravit nomenklaturu. Na základě výsledků analýz bylo vyčleněno pět samostatných druhů *P.aquilinum*, *P.arachnoideum*, *P.caudatum*, *P.esculentum* a *P.semihastatum* s větším počtem subspecií založených na různé geografii výskytu a morfologii (viz Obr. 5). U vlastního druhu *Pteridium aquilinum* s.str. se uvádí celkem deset variet, přičemž v kontinentální Evropě je uváděna pouze *P.aquilinum subsp. aquilinum*. a *P.aquilinum subsp. pinetorum* ve východní Evropě (viz Obr. 6).



Obr. 5: Fylogram vypočtený Bayesiánskou interferencí ilustrující nejnovější taxonomii rodu *Pteridium* podle Thomsona et al. (2009).



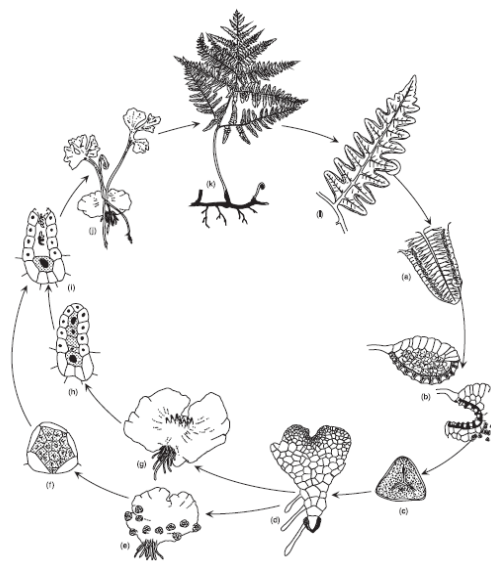
Obr. 6: Biogeografie rodu *Pteridium* podle Thomsona et al. (2009).

2.3 Reprodukce

2.3.1 Životní cyklus

Reprodukční cyklus hasivky orličí ve všech aspektech koresponduje s obecným životním cyklem leptosporangiátních kapradin (viz Obr. 7). V nedávné době byl podrobně zdokumentován životní cyklus *Pteridium caudatum* pomocí elektronové mikroskopie (del Rosario Ramírez-Trejo et al. 2013). Diploidní sporofyt nese na okraji listů marginální sori překryté indusiem a okrajem listu, které je chrání. Sporangium dozríváním tlačí na indusium, které praskne a vystřelí spory. Spory vznikají redukčním dělením a mají průměrnou velikost 31–32 μm (Conway 1953). Asi 90–95% spor v laboratorních podmínkách klíčí již druhý den. Při prvním buněčném dělení klíčící spory vzniká krátký hyalinový rhizoid, který poté začne klíčit jednou z apertur. První buňky prvoklíčku mají zpravidla velký počet plastidů. Další diferenciací pomocí meristematických buněk se začne tvořit srdčítý gametofyt, na jehož bázi se utvoří samčí antheridia a nad nimi v centrální části samičí archegonia. Oboupohlavný gametofyt se u homosporických kapradin vyskytuje často. Vývoj gametangií není determinován geneticky, nýbrž jako u většiny kapradin podmínkami prostředí a látkami, které nazýváme antheridiogeny (Voeller 1964; Miller 1968). To jsou produkty gametofytu podobné hormonům, které difundují do okolí gametofytu až do vzdálenosti 25 cm a indukují tvorbu antheridií u sousedních

gametofytů a rovněž umožňuje výtrusům klíčit ve tmě pod povrchem země. Výtrusy hasivky jsou schopny klíčit tímto způsobem pomocí antheridiogenů, ale i nezávisle na nich (Schraudolf 1967; Voeller and Weinberg 1969; Nář et al. 1975). Splynutím samčích a samičích gamet vzniká diploidní zygota a mladý dichotomicky větvený sporofyt. Mladý sporofyt již nese primární anomocytické průduchy (tj. svěrací buňky bez vedlejších buněk) o velikosti přibližně 30 μm . Z experimentu vyplývá, že celý proces trvá přibližně 78 dní.

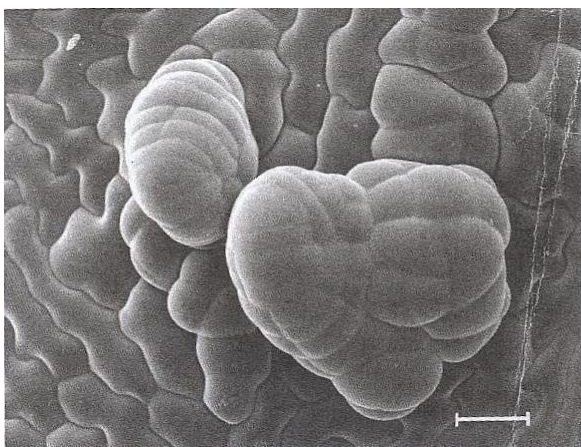


Obr. 7: Životní cyklus hasivky orličí (Sheffield 2008).

2.3.2 Vegetativní reprodukce

Hasivka orličí se nejčastěji rozmnožuje vegetativně pomocí dlouhověkových oddenků. Rozsáhlý podzemní systém plazivých oddenků (ca 1.3 kg.m⁻² biomasy, Russel et al. 1998) je jednou z příčin expanzního šíření v přírodě (Watt 1940). Hasivka orličí je vysoce klonální druh a existují názory, že ve Velké Británii existuje prakticky jedna panmiktická populace (Sheffield 2008). Klonalita může představovat problém pro experimentální výzkumy vzhledem k tomu, že genotyp může mít velký vliv na sporogenezi. Díky tomu se experimenty často provádí na prakticky stejném genetickém materiálu (Sheffield 2008). Oinonen (1967) poukazuje na dlouhověkost klonů a uvádí životaschopnost populací až 650 let.

Existují i jiné typy nepohlavního rozmnožování tzv. apogamie či aposporie, které byly u hasivky zaznamenány (Marrs and Watt 2006). Apogamií rozumíme vznik sporofytu bez oplození, zatímco aposporii charakterizuje vznik gametofytů, jejichž růst je indukován přímo z pletiv sporofytu, aniž by proběhla meiotická dělení (Marrs and Watt 2006). Výrůstky nových gametofytů se objevují na mladých listech či stoncích a mají stejnou ploidní úroveň jako mateřská rostlina (Sheffield 2008). V přírodě byl tento jev člověkem zaznamenán pouze jednou, a to více než před 100 lety (Farlow 1899), ale zřejmě nebude až tak vzácný. Aposporii lze indukovat experimentálně in vitro (viz Obr. 8, Sheffield 2008).



Obr. 8: Příklad aposporie u hasivky. Dva výrůstky gametofytů ze sporofytní tkáně juvenilního listu hasivky orličí zachycené elektronovým mikroskopem v laboratorních podmínkách podle Sheffield (2008). Měřítka odpovídá 20 μm.

2.3.3 Sexuální reprodukce

Sexuální reprodukce u hasivky je méně častá. Studií, které se zabývaly v minulosti fertilitou a faktory, které ji ovlivňují, bohužel není mnoho. Nejvíce dohledaných prací zabývajících se schopností hasivky šířit výtrusy pochází z Velké Británie (Conway 1957; Page 1976; Sheffield et al. 1993)



Obr. 8: Fertilní trofosporofyl, liniové coenosori a triletní spora ($\times 1000$) hasivky orličí (Dvořáková 1988).

Již jediná spora je schopna dát vzniku nové populaci, která se dokáže rozšířit velmi rychle. Primární role spor je tedy zřejmě efektivizace rychlého a úderného osídlení nového habitatu (Page 1976). Vzhledem ke kosmopolitní distribuci hasivky orličí je možno tvrdit, že výtrusy jsou schopny šířit se na velmi dlouhé vzdálenosti tzv. long-distance dispersal (Rumsey et al. 1991). Pro tento typ distribuce jsou výhodné malé a velmi lehké výtrusy, které se snadno rozšíří větrem. Je dokázáno obecně, že spory kapradin jsou odolné vůči UV záření a nízkým teplotám a jsou běžně schopny šíření na velké vzdálenosti (Rumsey et al. 1991; Gradstein 2001; Rodriguez de la Cruz 2009). Britská autorka Elsie Conway (1957) zaznamenala a pozorovala několik fertálních populací v západním Skotsku v letech 1946-1952 od začátku července do konce srpna, kdy se výtrusnice nachází v maximu zralosti. Za plodné jedince považovala ty, u kterých byly výtrusnice viditelné pouhým okem. Udává, že produkce spor se velmi liší rok od roku, přičemž

stanoviště mohou být heterogenní. Ze studie vyplývá, že fertilní populace jsou nalezeny jen vzácně, ale pokud jsou fertilní, tak výrazně. Spory a mladé sporofyty jsou zřejmě nejzranitelnějším stadiem celého životního cyklu (Conway 1957). To může do jisté míry vysvětlit nízkou míru plodnosti u hasivky. Fertilita je podle Conwayové ovlivněna souborem těchto činitelů: věk rostliny, míra vyvinutosti trofosporofylu, sezónní klimatické podmínky a faktory prostředí. Bright (1928) zase poukazuje na negativní vliv větru. Jednotlivé faktory ovlivňující fertilitu hasivky orličí, které byly nalezeny v literatuře, jsou uvedeny níže.

2.3.3.1 Faktory ovlivňující fertilitu druhu

Fyziologické a morfologické faktory:

Sporangia na listech mohou být tvořena pouze tehdy, když rostlina dosáhne určité zralosti. Zpravidla se udává třetí nebo čtvrté vegetační období v přirozeném prostředí (Goebel 1905). Ve Skotsku se nové listy objevují v období od konce dubna do začátku července. Výsledky potvrdily, že čím dříve vyroste nový list, tím spíše jsou na něm vyprodukována sporangia. Také dostatečně zakořeněný oddenek může mít pozitivní vliv na vyvinutí výtrusných kupek na listech (Conway 1953). Z jiných studií vyplývá, že velikost listů (lamina), lístků (pinna) a lístečků (pinnule) se snižuje s přibývajícím zástínem, čímž se snižuje i hustota listů na stanovišti a to negativně koreluje s fertilitou hasivky (Dring 1965).

Ekologické faktory:

Teplota a mechanické vlivy:

V zásadě existují dvě limitující klimatická období, která mohou zapříčinit sterilitu popř. fertilitu populací. První se ve Skotsku uskutečňuje od dubna do července, kdy přízemní mrazy mohou způsobit zničení mladých lístků a druhé od srpna do září, kdy je otevření sporangií (tj. napnutí annulu a prasknutí stomia) a distribuce spor závislá na vlhkosti vzduchu. Stejně tak popisují vítr jako jeden ze zásadních činitelů a to kvůli možnému mechanickému poškození listů, podobně jako mráz (Conway 1957).

Intenzita světla:

Extrémní podmínky způsobující oddálení či prodloužení vegetační sezóny mají vliv negativní. Například přílišné zastínění hasivek rostoucích uprostřed doubravy způsobilo o 20% méně fertilních trofosporofylů než u rostlin rostoucích na okraji o pouhých 200 metrů dále (Conway 1957). Zastínění čili intenzitu světla jako limitující faktor potvrzuje i studie, která se primárně zabývala chemickým složením půdy a poukázala na sníženou schopnost růstu rostlin při nedostatku prvků fosforu (P) a draslíku (K) (Schwabe 1951). O tři roky později ale stejná místa vykazují opačné výsledky – uprostřed zastíněného lesa byla zjištěna nejvyšší míra plodnosti ze všech studovaných lokalit. Autoři si tento jev vysvětlují tak, že biotop se nachází celkově na suchém a osluněném místě a tudíž populace měly i přes lesní zástin dostatek světla k produkci většího počtu sporangií. Conway (1953) zastává názor, že délka denního světla může hrát větší roli než skutečná intenzita. V laboratorních podmínkách po kultivaci spor bylo zjištěno, že teplota a intenzita světla má na vývoj sporangií průkazný pozitivní vliv (Wynn 2000). Se vzrůstající teplotou i intenzitou světla se zvyšoval i tzv. „spring development index“ nebo-li rychlost, s jakou se sporangia vytvoří. Kvantifikace spočívala ve vytvoření pěti potenciálních kategorií, z nichž každá označovala určitou fázi vývoje sporangií (0 – indusium chybí, 1 – přítomnost indusia, 2 – přítomnost sporangií pod indusiem, 3 – přítomnost sporangií nad indusiem, 4 – přítomnost již prázdných sporangií).

V závislosti na světle se mimo jiné mění morfologie listů. Listy, které se nachází ve stínu, jsou méně odkloněny od řapíku, zatímco exponované více (Schwabe 1951). Xeromorfní adaptace byly popsány již dříve (Boodle 1904). Listy se v tomto případě zmenší, ztvrdnou a stanou se celistvějšími. Jiná studie (Dring 1965) zabývající se faktory prostředí související se zástínem ukazuje, že intenzita světla není jediným hlavním faktorem a že záleží na spolupůsobení jiných fyzikálních činitelích jako je například vlhkost nebo teplota.

Vlhkost vzduchu:

Vyšší zastínění zpravidla znamená i vyšší vlhkost. Výsledky z měření vlhkoměrem neukazovaly korelaci se zjištěnou fertilitou, ale autoři si tento jev vysvětlují nezvyklým a příliš dlouhým obdobím suchem v pozorované oblasti na jihozápadním pobřeží Velké Británie (Dring 1965).

Půdní vlastnosti:

Co se týče půdních vlastností, spíše sterilní rostliny rostly na vlhčím a kyseljším podloží s velkou mírou humusu. Je možné, že vyšší půdní vlhkost zaznamenaná v lesních biotopech způsobuje snížení vitality oddenku a následné omezení růstu nadzemních částí rostliny včetně případných výtrusnic. Na základě tohoto tvrzení se uvádí, že by se tak dala vysvětlit snížená schopnost plodit na okrajích podmáčených stanovišť (Dring 1965). Toto tvrzení je podporováno pozorováním sterilních populací v brakických vodách ve Velké Británii (Conway 1957). Autoři se domnívají, že by více výsledků mohlo přinést provedení detailnější studie v místech lesních lemů.

Vlastnosti stanoviště:

Page (1976) ve svém přehledu zmiňuje, že fertilní populace ve Velké Británii byly nalezeny spíše na antropogenních habitatech (zídky či hromady starého zdiva, suť apod.) než v přirozených. V přirozených habitatech byly zaznamenány ale také na narušených vypálených stanovištích, což bylo mimo jiné zaznamenáno také ve Francii či Finsku (Laurent 1914; Oinonen 1967). Podle Sheffield et al. (1993) se triploidní rostliny na disturbovaných místech vyskytují častěji než diploidní.

Vzhledem k nedostatku informací se autoři převážně shodují v hypotéze, že fertilita, resp. sterilita je výsledkem interakcí širšího spektra faktorů.

2.3.4 Fertilita a polyploidní cytotypy

Převážná většina stávajících populací hasivky je diploidních (Sheffield 1993). Vyšší ploidie byly u *Pteridium aquilinum* zaznamenány pouze ojediněle. Novinkou byl objev triploidního cytotypu (Sheffield 1993). Při studiu triploidních rostlin byly překvapivě zjištěny plně vyvinutá sporangia a spory, které se vyvíjejí standardně v tetradách s nepatrným množstvím výtrusů abortovaných. Tento nečekaný výsledek byl zajímavý zejména díky tomu, že obecně u kapradin polyploidní aneuploidní cytotypy většinou tvoří jen málo plně vyvinutých spor (Manton 1950).

Vznik triploida si autoři vykládají více způsoby. Buď splynutím neredukované spory gametofytu jednoho diploidního rodiče s redukovanou tj. haploidní sporou gametofytu druhého rodiče, přičemž neredukované spory tzv. diplospory se u diploidů tvoří vzácně (Wolf 1987) a nebo případnou apogamií či aposporií (viz kap. 2.3.2). Velmi zajímavý je fakt, že jiný polyploidní cytotyp, galapážský tetraploid *P. arachnoideum* (Kaulf.), vykazoval pouze nevyvinuté výtrusy (Jarrett 1968), což jistě vyžaduje další studium. Triploidní sporofyty po kultivaci v laboratorních podmínkách daly vzniknout neredukovaným sporám – takzvaným diplosporám (Sheffield 1993).

3 Metodika

3.1 Hodnocení faktorů prostředí v přirozených populacích

Pro zhodnocení faktorů prostředí bylo celkem bylo zhotoveno 48 fytoecnologických snímků (viz Příloha 1) o velikosti 15m² (zpravidla v případě liniových porostů o rozměrech 5×3 m) v době zralosti výtrusnic od srpna do září v letech 2013 a 2014. Lokality s fertilními populacemi byly vybírány na základě předchozí revize herbářových dokladů ve veřejných herbářových sbírkách (zejména CB a BRNU) školitelem. Lokalit fertilních hasivek bylo k dispozici celkem 11, z toho 4 nebyly v terénu nalezeny. Výzkum probíhal na území Jihočeského, Středočeského, Pardubického, Olomouckého a Ústeckého kraje. Zaznamenávány byly následující environmentální faktory:

- Nadmořská výška
- Sklon svahu
- Orientace svahu
- Sluneční expozice
- Celková pokryvnost bylinného a mechového patra
- Relativní procento zastínění
- Typ reliéfu (viz Tab. 1)
- Typ mikrostanoviště (viz Tab. 1)

Pokryvnost jednotlivých druhů byla odhadována pomocí modifikované Braun-Blanquetovy stupnice (Braun-Blanquet 1964): **r** (1 až 2 jedinci s nepatrnou pokryvností), **+** (pokryvnost nižší než 1%), **1** (1 až 5%), **2** (4 až 25%), **3** (25 až 50%), **4** (50 až 75%), **5** (75 až 100%) a pro statistické zpracování převedena na sedmičlennou stupnici (r –1, + – 2, 1 – 3, 2 – 4, 3 – 5, 4 – 6, 5 – 7). Fytoecnologická data byla zadána do programu Turboveg (Hennekens 1998). Pro analýzu druhového složení z fytoecnologických snímků byl použit program Canoco 5 (ter Braak and Šmilauer 2012). Pro statistické vyhodnocení byla převedena cirkulární data orientace svahu a sluneční expozice funkcí $\cos(x)$, hodnoty mají tedy rozsah od -1 (jih) do +1 (sever). Sluneční expozice byla odhadována podle okolního reliéfu a vrstevnic. Celkové pokryvnosti bylinného a mechového patra byly upraveny arcsinovou transformací ($\arcsin(x)$; Lepš 1996), aby byl lépe splněn požadavek normálního rozdělení a homogenity variance v analýzách. Data sklonu svahu byla ze stejného důvodu logaritmována ($\log_{10}(+1)$). Z hodnot sklonu orientace byla spočtena

tepelná zátěž, která vyjadřuje příkon slunečního záření na jednotku plochy (McCune 2002). Výpočet nezohledňuje případné zastínění, a proto jím byly zjištěné hodnoty posléze vynásobeny (tepelná zátěž $\times (1 - \text{zástin} \times 0,5)$). Celkem bylo stanoveno 8 různých typů mikrostanovišť a 5 různých typů reliéfu, které byly označeny zkratkami pro lepší manipulaci při zpracování dat (viz Tab. 1). Z druhového složení byly spočteny průměrné Ellenbergovy indikační hodnoty pro každý snímek, bez vážení pokrývnosti druhů (světlo, teplota, kontinentalita, vlhkost, půdní reakce, živiny).

Tab. 1: Typy mikrostanovišť a reliéfu a kvantifikace pro statistické zpracování.

Mikrostanoviště	Číslo mikrost.	Reliéf	Číslo reliéfu
Lesní lem (jehličnaté)	M1	Úpatí svahu	R1
Obhospodařovaná louka	M2	Dno údolí	R2
Les	M3	Plošina	R3
Paseka	M4	Podhůří	R4
Lesní lem (listnaté)	M5	Svah	R5
Okraj vozovky	M6	—	—
Skalní město	M7	—	—
Okraj vodního toku	M8	—	—

Druhové složení a podmínky prostředí na jednotlivých lokalitách byly zobrazeny pomocí ordinačního diagramu detrendované korespondenční analýzy (DCA). Vztah plodnosti hasivky k podmínkám prostředí celkově se testoval pomocí reverzní redundanční analýzy (RDA), ve které byly jako závislá proměnná použity podmínky prostředí a jako vysvětlující proměnná fertilita populací. Závislost plodnosti na podmínkách prostředí se testoval také pro každou proměnnou zvlášť pomocí logistické regrese (kvantitativní proměnné) nebo kontingenční tabulky (kategoriální proměnné). Pro ordinační analýzy byl použit program Canoco 5 (ter Braak and Šmilauer 2012), pro logistickou regresi program Statistica 12 (StatSoft, Inc. 2013).

3.2 Stanovení ploidie za pomoci průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která studuje optické vlastnosti částic v roztoku. Částice prochází jednotlivě měřícím bodem, kam dopadá přes optické filtry světelný paprsek. Působením fotonů dochází k uvolňování elektronů do vnějšího prostředí, čímž dochází k požadované detekci světla. Výsledek měření je zaznamenán optickým aparátem a zpracován přidruženým počítačem. Nejčastěji měřeným parametrem je intenzita fluorescence. Podle poměru intenzity fluorescence vzorku ke standardu je potom možné stanovit ploidní úroveň příp. velikost genomu (Koutecký 2012).

Pro izolaci jader bylo připraveno 50 vzorků z rostlin chemicky vysušených silikagelem. Jednotlivé vzorky sestávaly zpravidla z 3-5 listů z jedné populace. Listy byly sbírány z rostlin od sebe vzdálených nejméně 5 metrů. Lokality se nachází na území České republiky (viz Obr. 16) a Velké Británie. Bylo použito fluorescenční A-T selektivní barvivo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol). Rostlinný materiál (přibližně 0,4 cm² listu *Pteridium aquilinum*) byl mechanicky homogenizován žiletkou v Petriho misce spolu s 400 µl vychlazeného Otto I pufru (0,1M kyselina citronová, 0,5% Tween-20) a standardem *Pisum sativum* „Ctirad“ 2C = 9.09 pg (Doležel 1998). Po řádném promíchání byla suspenze vždy přefiltrována přes 42 µm filtrační textilií (Uhelon 130T) do zkumavky a na několik minut odstavena, aby se jádra stabilizovala. Na závěr byl přidán barvicí roztok pro stanovení DNA o objemu 800 µl (Otto II pufr, tj. 0,4M Na₂HPO₄·12H₂O, 2-merkptoethanol o koncentraci 2 µl/ml a DAPI o koncentraci 4 µg/ml) Připravený vzorek byl vložen do cytometru Partec PA II (Partec GmbH, Münster, Německo). Přístroj byl nastaven tak, aby standard byl na kanálu 200 na 1024-kanálové škále a zaznamenávalo se 5000 částic. Naměřené hodnoty byly zpracovány v programu FloMax verze 2.6 (Partec GmbH, Münster, Německo).

3.3 Měření velikosti průduchů

Byla provedena mikroskopová analýza s cílem změřit délku průduchů jednotlivých cytotypů, aby se zjistilo, jestli velikost buněk koreluje s velikostí genomu hasivky orličí. Za tímto účelem byl použit světelný mikroskop Olympus BX50 a BX51 s fotoaparátem Olympus DP 71 se zvětšením objektivu 100x. Pro mikroskopické hodnocení bylo vybráno celkem osmnáct vzorků z herbářových položek, z toho patnáct diploidních a tři triploidní. Ploidie čtrnácti vzorků byla

před pozorováním změřena za pomoci metody průtokové cytometrie, čtyři zbývající vzorky sloužily pouze ke zjištění ploidie za pomoci délky průduchů. U populací, kde výsledky průtokové cytometrie vykazovaly jednoznačnou ploidiu byla zvolena jedna rostlina pro mikroskopické pozorování. U jednoho smíšeného vzorku (lokalita Pístina), kde se podle výsledků průtokové cytometrie vyskytovaly diploidní i triploidní cytotypy současně, byly proměřeny všechny tři rostliny nasbírané v terénu.

Postup přípravy vzorků byl následovný. Adaxiální strana listu (přibližně 1 cm²) byla vždy potřena bezbarvým lakem a po zaschnutí lak s přesným obtiskem povrchu listu přenesen na za pomoci transparentní lepicí pásky na podložní sklo. Pozorováno a měřeno bylo vždy dvacet průduchů na rostlinu. Měření délky průduchů bylo provedeno v programu QuickPHOTO MICRO verze 2.3 a 3.0 (Promicra 2004). Výsledky byly exportovány do programu Statistica 12 (StatSoft 2013) a graficky vyobrazeny v diagramu *Box and whisker plot* a ověřeny T-testem.

3.4 Mikroskopické hodnocení abortace spor

Pro přesné zhodnocení fertility rostlin bylo nutné provést detailní mikroskopickou analýzu výtrusů. V pteridologii se jedná o běžnou metodu, protože hodnocení přítomnosti abortovaných spor je dobrým indikátorem sterility, zejména využívanou při odlišování kříženců (Wagner and Chen 1965). Skutečnou míru fertility jednotlivých rostlin je nezbytné studovat pomocí mikroskopu, jelikož pouhým okem lze vidět struktury (ostěry či výrazné chlupy v místě výtrusnic) snadno zaměnitelné se zralými výtrusnicemi, což může vést k mylným závěrům. Někdy mohou být výtrusnice zralé a výtrusy přítomny, ale rostlina není plodná, jelikož výtrusy mohou být nevyvinuté nebo jinak deformované. Abortace výtrusů se uplatňuje v různé míře prakticky vždy a je způsobena geneticky či environmentálně (Wagner et al. 1986).

Za použití optického mikroskopu Olympus CH30 s objektivovým zvětšením 40x bylo pozorováno a zaznamenáváno procento abortace výtrusů. Abortovaný výtrus je většinou černé nebo tmavě hnědé barvy, menší než normálně vyvinutý výtrus a může mít různě deformovaný tvar (viz Obr. 9). Nejspolehlivějším testem abortace je test klíčivost (Wagner et al. 1986).

V rámci terénní práce a sběru vzorků bylo nalezeno 16 fertálních populací pozorovaných pouhým okem nebo botanicou lupou, které byly použity právě pro mikroskopickou analýzu

výtrusů. Na každé rostlině bylo hodnoceno (vyvinuté/abortované) 1000 výtrusů, aby záznam byl co nejpřesnější. Přehled fertálních a sterálních lokalit je umístěn v přílohách a graficky vyobrazen za pomoci programu DMAP (Morton 1999). Procentuální zastoupení abortovaných spor je graficky znázorněno ve výsledcích za pomoci programu Microsoft Office Excel 2007 ve formě sloupcového grafu.

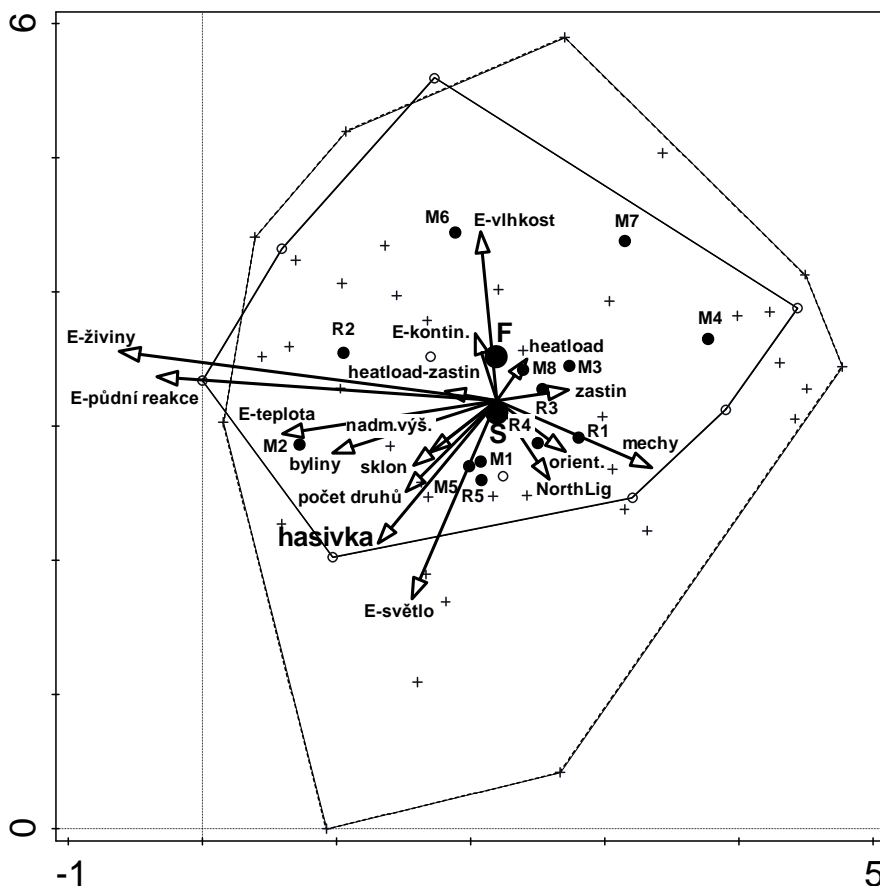


Obr. 9: Typy spor a způsoby jejich měření u kapradin (Wagner et al. 1986). D – monoletní normálně vyvinutá spora, F – triletí normálně vyvinutá spora, H – abortovaná spora.

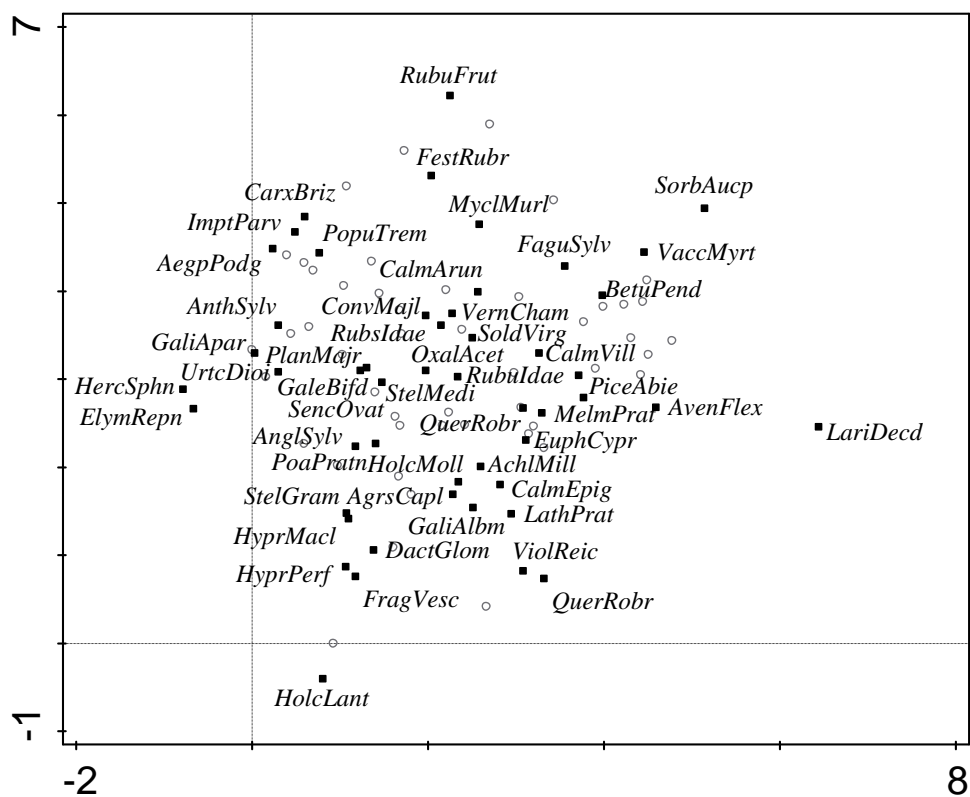
4 Výsledky

4.1 Hodnocení faktorů prostředí v přirozených populacích

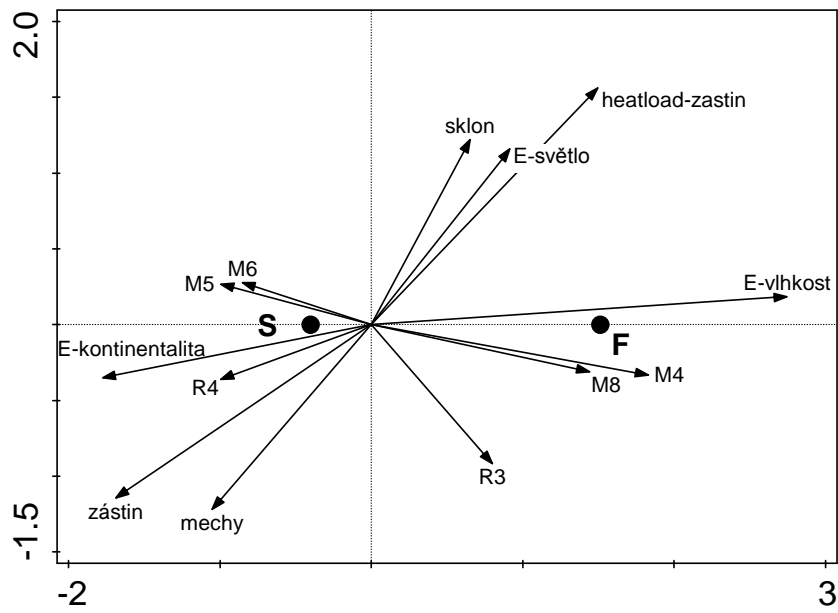
V ordinačním diagramu DCA (Obr. 10) je přehled celkové variability dat ve zhotovených vegetačních snímcích různých populací hasivky orličí. Pasivně promítnuté faktory prostředí ukazují rámcové trendy v hodnocených faktorech prostředí. Bohužel většina hodnocených proměnných nemá prakticky žádnou vypovídající hodnotu. Z analýzy DCA vycházejí na první ordinační ose jako nejvýznamnější gradienty živin a půdní reakce, kdy na levé straně jsou snímky živinami bohaté a bazičtější, s vyšší pokryvností bylinného patra, zatímco na pravé straně snímky na živiny chudších a kyselejších stanovišť, s vyšší pokryvností mechového patra. Další trend uspořádaný podél druhé ordinační osy by mohl souviset s otevřeností stanoviště, kdy snímky v horní části diagramu obsahují spíše druhy vlhkomilné a stínomilné, zatímco ve spodní části diagramu jsou druhy světlomilné a suchomilné. Tomuto druhému trendu odpovídá i fertilita hasivky, kdy fertiltní populace se vyskytovaly spíše na vlhčích stinnějších místech, ale z velkého překryvu snímků fertiltních a steriltních populací je patrné, že je tento trend velmi slabý. V přímém testování tohoto vztahu pomocí RDA (Obr. 11) se však neukázal vztah fertility a podmínek prostředí jako průkazný ($F = 1,1$, $p = 30,4$). Podle vypočítaných Ellenbergových hodnot je v DCA patrné, že hasivka je fertiltní spíše na vlhčích a oceaničtějších stanovištích, ale korelace fertility se světlem vychází naopak pozitivní. Při testování vlivu jednotlivých proměnných samostatně se ukázala průkazná pozitivní korelace fertility s vlhkostí ($p = 0,003$; $\chi^2_1 = 9,01$; Obr. 12) a negativní s kontinentalitou ($p = 0,047$; $\chi^2_1 = 3,93$; Obr. 13).



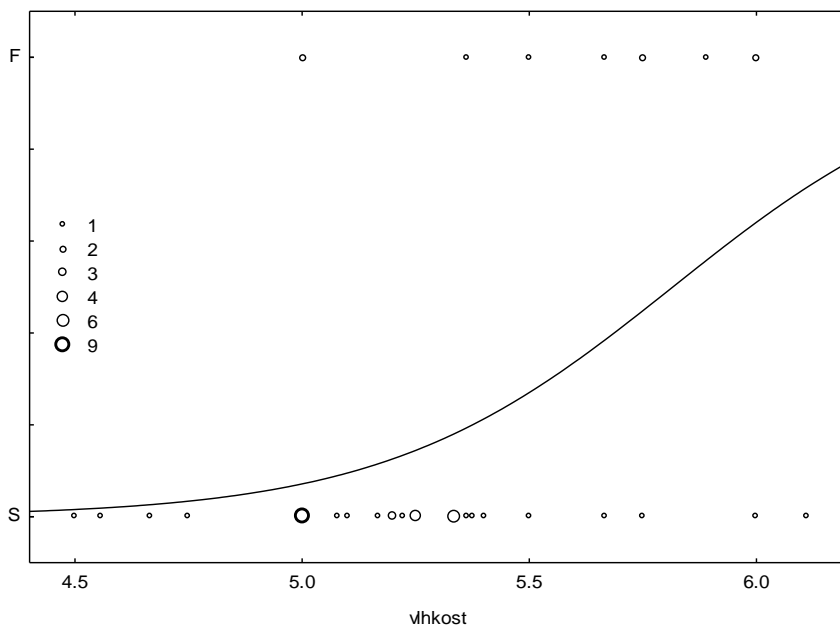
Obr. 10a: Ordinační diagram DCA. První osa vysvětluje 6,3% variability a druhá 5,3%. Prázdnými kolečky a křížky jsou označeny snímky fertilních a sterilních populací, které jsou zároveň zvýrazněny plnou a přerušovanou obálkou. Velká plná kolečka značí centroidy fertilních (F) a sterilních (S) populací, šipky proměnné prostředí a průměrné Ellenbergovy hodnoty (E). M4 – paseka, M5 – lesní lem (listnaté), M6 – okraj vozovky, M8 – okraj vodního toku, R3 – plošina, R4 – podhůří; E-živiny, E-půdní reakce, E-teplota, E-vlhkost, E-světlo, E-kontin. – Ellenbergovy průměrné hodnoty; heatlod – tepelná zátěž; heatload+zastin – tepelná zátěž a zastínění; nadm.vyš. – nadmořská výška; byliny – celková pokryvnost bylinného patra; mechy – celková pokryvnost mechového patra; sklon – sklon svahu; orient. – orientace svahu; zastin – relativní procento zastínění; NorthLig – transformovaná data sluneční expozice.



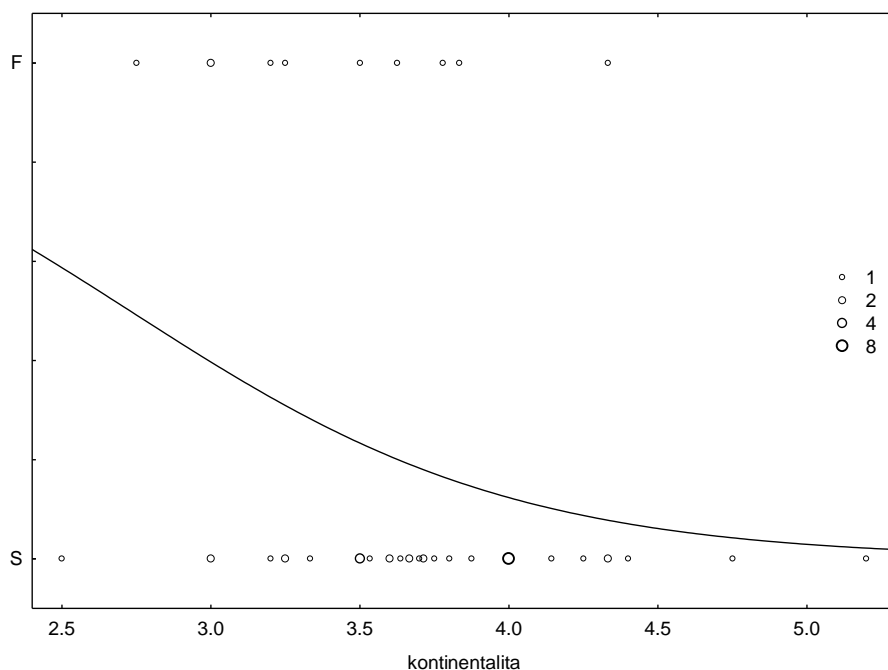
Obr. 10b: Ordinační diagram DCA vztahující k analýze z Obr. 9a. Zobrazeno 50 druhů nejlépe odpovídajících prvním dvěma osám (plné čtverce) a všechny snímky (prázdná kolečka). AchlMill – *Achillea millefolium*, AegpPdg – *Aegopodium podagraria*, AgrsCapl – *Agrostis capillaris*, AnglSylv – *Angelica sylvestris*, AnthSylv – *Anthriscus sylvestris*, AvenFlex – *Avenella flexuosa*, BetuPend – *Betula pendula*, CalmArun – *calamagrostis arundinacea*, CalmEpig – *Calamagrostis epigejos*, CalmVill – *Calamagrostis villosa*, CarxBriz – *Carex brizoides*, ConvMajl – *Convallaria majalis*, DactGlom – *Dactylis glomerata*, ElymRepn – *Elymus repens*, EuphCypr – *Euphorbia cyparissias*, FaguSylv – *Fagus sylvaticus*, FestRubr – *Festuca rubra*, FragVesc – *Fragaria vesca*, GaleBifd – *Galeopsis bifida*, GaliAlbm – *Galium album*, GaliApar – *Galium aparine*, HercSphn – *Heracleum sphondylium*, HolcLant – *Holcus lanatus*, HolcMoll – *Holcus mollis*, HyprMacl – *Hypericum maculatum*, HyprPerf – *Hypericum perforatum*, ImptParv – *Impatiens parviflora*, LathPrat – *Lathyrus pratensis*, LariDecd – *Larix decidua*, MelmPrat – *Melampyrum pratense*, MyclMurl – *Mycelis muralis*, OxalAcet – *Oxalis acetosella*, PiceAbie – *Picea abies*, PlanMajr – *Plantago major*, PoaPratn – *Poa pratensis*, PopuTrem – *Populus tremula*, QuerRobr – *Quercus robur*, RubsIdae – *Rubus idaeus*, RubuFrut – *Rubus fruticosus*, SencOvat – *Senecio ovatus*, SoldVirg – *Solidago virgaurea*, SorbAucp – *Sorbus aucuparia*, StelMedi – *Stellaria media*, StelGram – *Stellaria graminea*, VaccMyrt – *Vaccinium myrtillus*, VernCham – *Veronica chamaedrys*, ViolReic – *Viola reichenbachiana*.



Obr. 11: Ordinační diagram RDA, ve které jako závislá proměnná byly použity podmínky prostředí (šipky) a jako vysvětlující proměnná fertilita populací (plná kolečka). Zobrazeny jsou pouze proměnné, které mají shodu s první osou alespoň 1%. Zkratky viz Tab. 1. První osa vysvětluje 2,4% variability a druhá 14,0%.



Obr. 12: Logistická regrese závislosti fertility hasivky na průměrné Ellenbergově indikační hodnotě pro vlhkost. Velikost bodů odpovídá počtu pozorování v daném bodě.



Obr. 13: Logistická regrese závislosti fertility hasivky na průměrné Ellenbergově indikační hodnotě pro kontinentalitu. Velikost bodů odpovídá počtu pozorování v daném bodě.

4.2 Stanovení ploidní úrovně za pomoci průtokové cytometrie

Ploidní úroveň byla určena u celkem 50 vzorků druhu *Pteridium aquilinum*. Diploidní cytotyp (2x) byla zaznamenán u 46 vzorků u zbývajících 4 byla zjištěna triploidie (3x, viz Obr. 16). Triploidní cytotyp byl zjištěn na lokalitách Pístina, Loučovice, Vlčí jezero (Děčín) a Rybník. Výsledky analýzy pomocí průtokové cytometrie jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2. Rostliny byly pro přehlednost rozděleny nejprve podle ploidní úrovně na základě výsledných hodnot poměru průměrů vzorku ku standardu (viz Tab. 2) a poté podle plodnosti na základě pozorování (Tab. 3). Z tabulky 1 lze vyčíst poměr intenzity fluorescence jader diploidních vzorků a standardu pohybující se v rozmezí 1,1232 – 1,4615 (průměr 1,3279) a u triploidních vzorků mezi 1,8109 – 1,9676 (průměr 1,9101). Variabilitu v datech udává střední chyba průměru.

Tab. 2: Určení ploidy úrovně za pomoci průtokové cytometrie u 50 vzorků druhu *Pteridium aquilinum*.

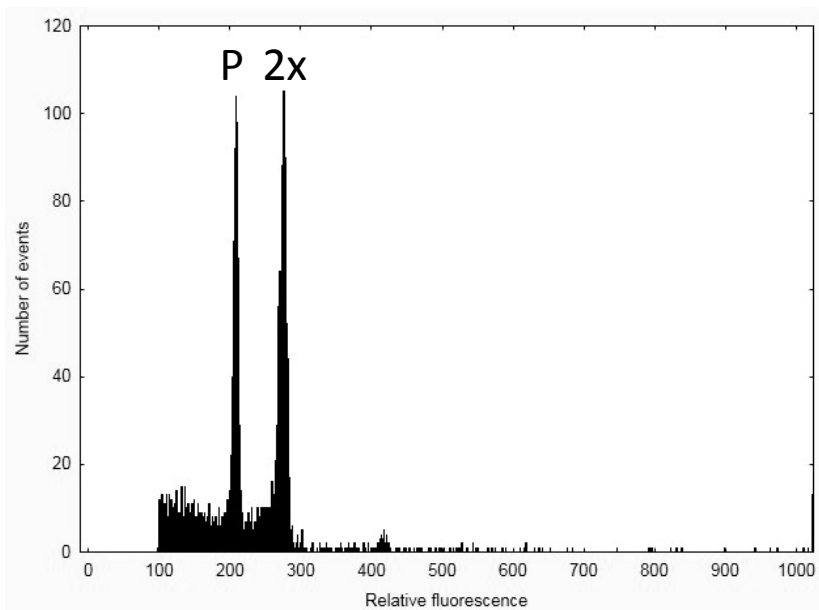
Počet vzorků	Průměr poměrů vzorku ke standardu	Minimum	Maximum	Střední chyba průměru	Ploidie
46	1,3279	1,1232	1,4615	0,0788	2x
4	1,9101	1,8109	1,9767	0,0352	3x

Dalším kritériem pro rozdělení výsledných hodnot byla plodnost. Cílem bylo zjistit případnou korelaci mezi plodností a ploidy.

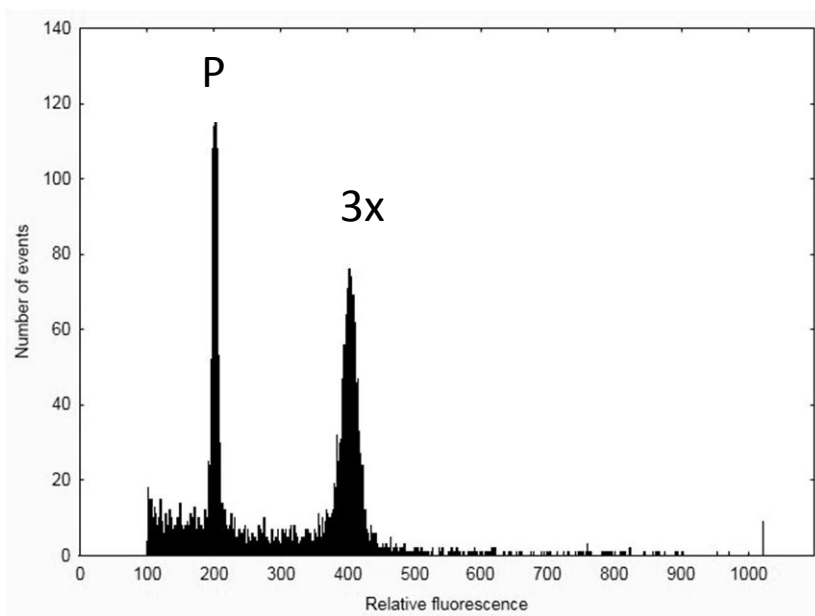
Tab. 3: Rozdělení vzorků na základě ploidy úrovně a plodnosti.

Počet vzorků	Průměr poměrů vzorku ke standardu	Minimum	Maximum	Střední chyba průměru	Ploidie	Fertilita/Sterilita
10	1,3271	1,2272	1,3925	0,0481	2x	F
36	1,3281	1,1232	1,4615	0,0144	2x	S
2	1,8724	1,8109	1,9339	0,0869	3x	F
2	1,9478	1,9190	1,9767	0,0408	3x	S

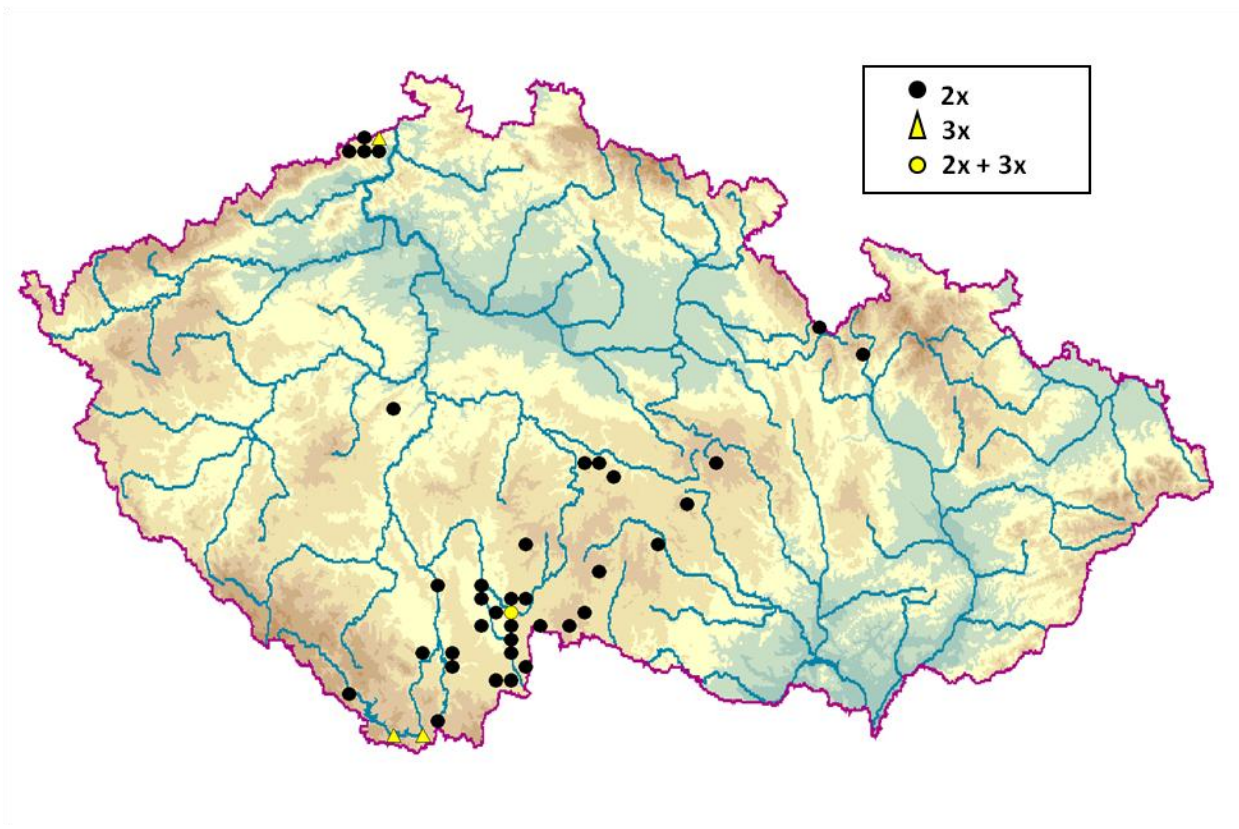
Histogramy relativní fluorescence k porovnání diploidní a triploidní *Pteridium aquilinum* jsou graficky znázorněny na obrázku 14 a 15.



Obr. 14: Histogram ilustrující analýzu diploidních rostlin *Pteridium aquilinum*. Na ose X je vynesena relativní fluorescence, na ose Y počet jader. První peak odpovídá standardu *Pisum sativum* a druhý analyzované rostlině. Standard se pohybuje okolo hodnoty 200 relativní fluorescence, diploidní vzorek okolo 270.



Obr. 15: Histogram ilustrující analýzu triploidních rostlin *Pteridium aquilinum*. Na ose X je vynesena relativní fluorescence, na ose Y počet jader. První peak odpovídá standardu *Pisum sativum* a druhý analyzované rostlině. Standard se pohybuje okolo hodnoty 200 relativní fluorescence, triploidní vzorek okolo 400.



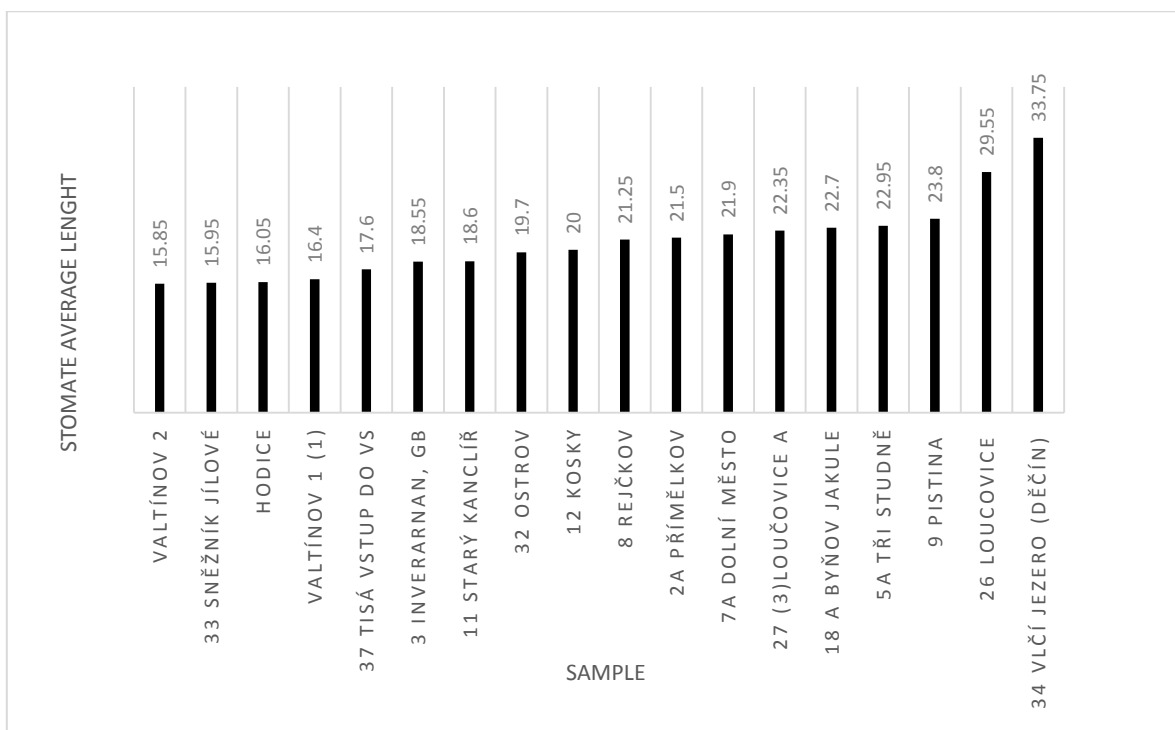
Obr. 16: Rozmístění jednotlivých cytotypů na vybraných lokalitách ČR.

4.3 Měření velikosti průduchů

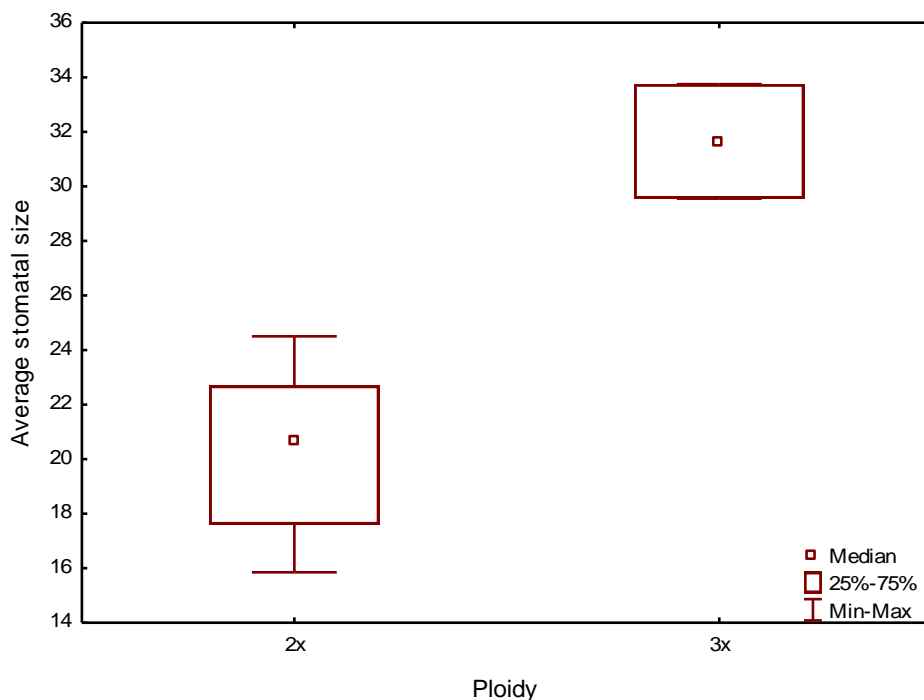
Naměřené průměrné délky průduchů (viz Tab. 4) jsou graficky znázorněny ve sloupcovém grafu (viz Obr. 17) Srovnání rozdílu v délce průduchů mezi diploidními a triploidními jedinci bylo znázorněno pomocí diagramu *Box and whisker plot* (viz Obr. 18). Průkaznost byla dokázána T-testem. S dosaženou hladinou významnosti $p = 0.000053$ a s hodnotou testového kritéria $t = -5,2598$ při 18 stupních volnosti na 95% hladině významnosti bylo ověřeno, že velikost průduchů diploidních a triploidních rostlin se průkazně liší. Na lokalitě Pístina (16–18) byl zjištěn za pomoci průtokové cytometrie diploidní i triploidní cytotyp, proto byly průduchy změřeny u všech nasbíraných jedinců.

Tab. 4: Průměrné délky prúduchů naměřené v mikrometrech z celkem 18 lokalit. Vzorky 16 – 18 byly určeny průtokovou cytometrií jako triploidní. Na lokalitě Pístina (16–18) byl zjištěn za pomoci průtokové cytometrie diploidní i triploidní cytotyp, proto byly prúduchy změřeny u všech nasbíraných jedinců.

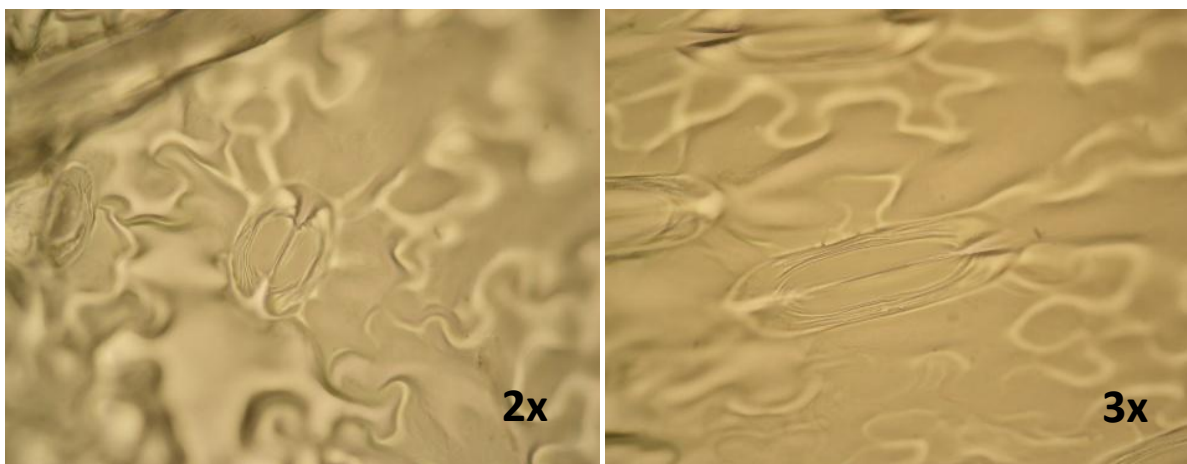
Číslo vzorku	Ploidie	Název lokality	Prům. délka prúdu. [μm]
1	2x	Valtínov 2	15.85
2	2x	33 Sněžník Jílové	15.95
3	2x	Hodice	16.05
4	2x	Valtínov 1 (1)	16.4
5	2x	37 Tisá vstup do VS	17.6
6	2x	3 Inverarnan, GB	18.55
7	2x	11 Starý Kanclíř	18.6
8	2x	32 Ostrov	19.7
9	2x	12 Kosky	20
10	2x	8 Rejčkov	21.25
11	2x	2a Přímělkov	21.5
12	2x	7a Dolní město	21.9
13	2x	27 (3)Loučovice A	22.35
14	2x	18 a Byňov Jakule	22.7
15	2x	5a Tři studně	22.95
16	2x	9 Pístina A	23
17	2x	9 Pístina B	24
18	2x	9 Pístina C	24.5
19	3x	26 Loučovice E	29.55
20	3x	34 Vlčí jezero (Děčín)	33.75



Obr. 17: Průměrné délky průduchů 18 vzorků z jednotlivých lokalit. Vzorky z lokalit Pístina, Loučovice a Vlčí jezero jsou dle ověření pomocí průtokové cytometrie měření triploidní.



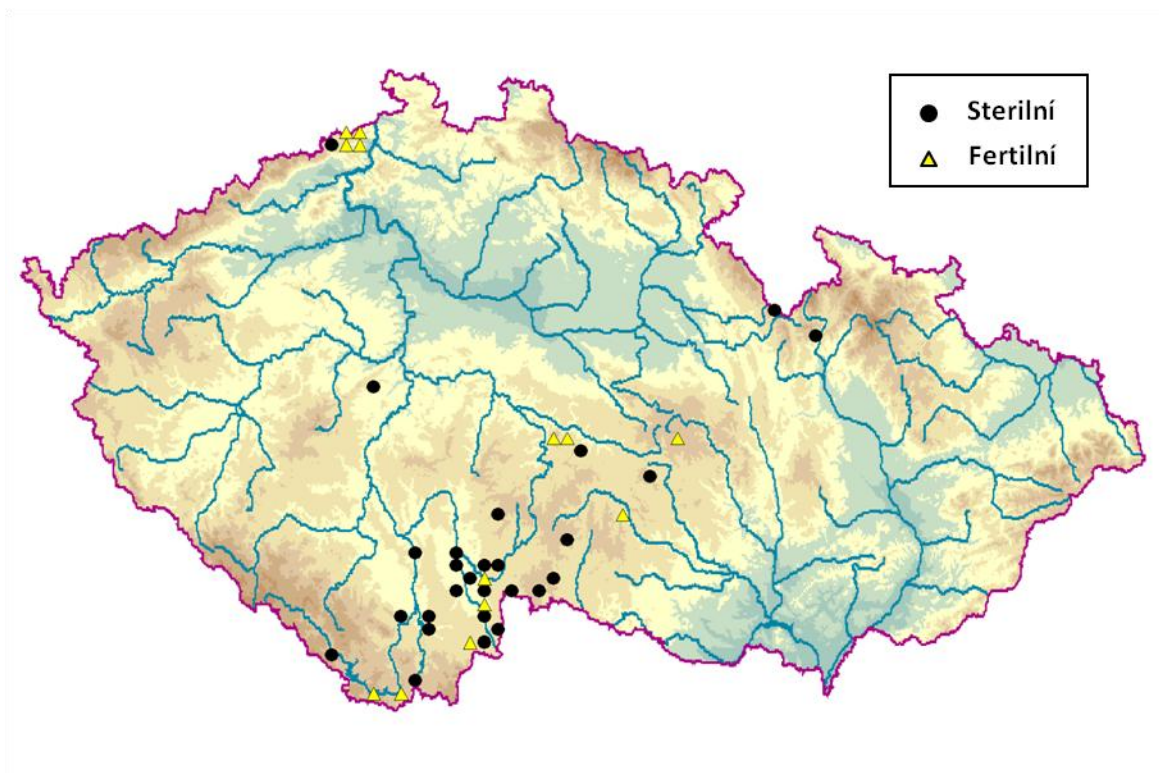
Obr. 18: Srovnání rozdílu v délce průduchů diploidního a triploidního cytotypu pomocí diagram Box and whisker plot. Na ose X byly vyneseny hodnoty všech průměrných délek průduchů [μm] a na ose Y úroveň ploidie ($p = 0.000053$, $t = -5,2598$, $df = 18$).



Obr. 19a a 19b: Mikroskopické pozorování délky (zvětšeno 1000x) průduchů při totožném měřítku diploidní (lokalita Rejčkov) a triploidní rostliny (lokalita Vlčí jezero).

4.4 Mikroskopické hodnocení abortace spor

Pro analýzu abortace výtrusů bylo vybráno celkem 16 vzorků (viz Tab. 5), které se zdály být fertily. Vyšetření pod mikroskopem odhalilo 12 reálně, tedy rostlin s vyvinutými výtrusy a výtrusnicemi (viz Obr. 20). Z těchto fertily rostlin bylo 10 diploidních a 2 triploidní (ověřené průtokovou cytometrií). Čtyři rostliny (vzorky 9–12) byly pro tuto část práce dodatečně poskytnuty školitelem a jejich ploidní úroveň byla stanovena na základě korelace délky průduchů s délkami průduchů u rostlin ověřených průtokovou cytometrií.



Obr. 20: Mapa celkového rozšíření fertálních a sterilních populací *Pteridium aquilinum* na vybraných lokalitách ČR.

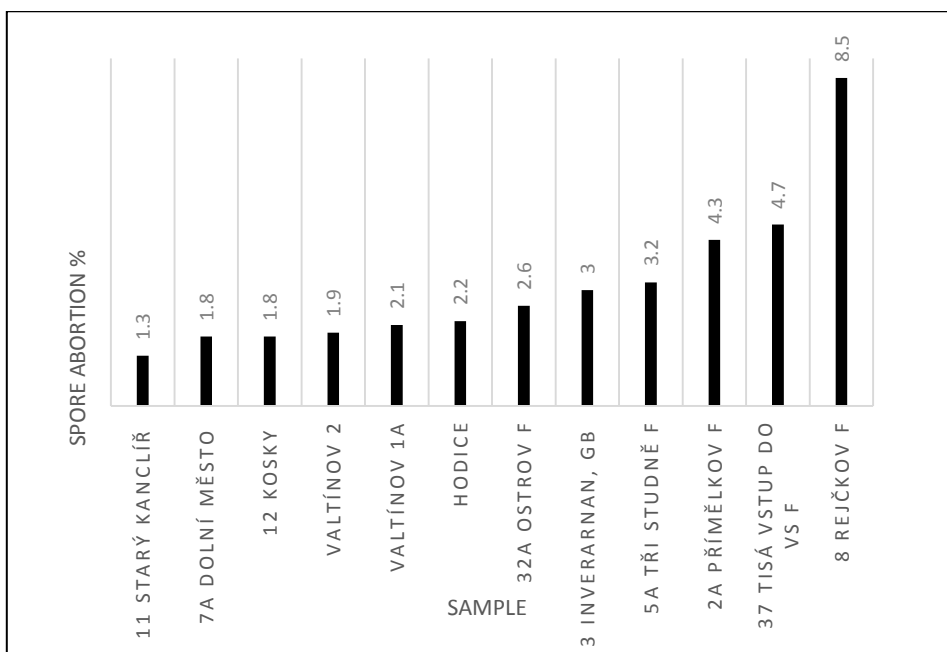
Celkem bylo zhodnoceno 13 000 výtrusů, vždy po 1000 výtrusech na rostlinu. U třech vzorků nebylo dosaženo dostatečného reprezentativního počtu výtrusů (vzorky 14–16), proto byly dodatečně vyloučeny z analýzy, jelikož porovnání s počty o dva řády nižšího počtu by nebylo relevantní. Vyloučení vzorků se týkalo jednoho triploidního vzorku (14) a dvou diploidních (vzorky 15–16), kde bylo pozorováno pouze do deseti vyvinutých výtrusů. U triploidního vzorku byly výtrusnice detekovatelné, ale výtrusy byly již vypadané. V případě prvního diploidního vzorku (15) byly viditelné pouze parafýzy, druhý diploid (16) měl otevřené a vysypané výtrusnice.

Z provedené analýzy lze celkově říci, že dvanáct vzorků vykazovalo relativně malé procento abortovaných výtrusů v rozmezí od 1,3– 8,5 % (vzorky 1–12). Triploidní vzorek (13) vykazoval 4,9 abortovaných % výtrusů a 95,1% vyvinutých výtrusů, které byly vyvinuty abnormálně s více než dvojnásobnou velikostí oproti normálně vyvinutým výtrusům (viz Obr. 19).

Tab. 5: Procento abortace spor hasivky orličí. A/N – poměr abortovaných a neabortovaných spor, % A – procento abortace.

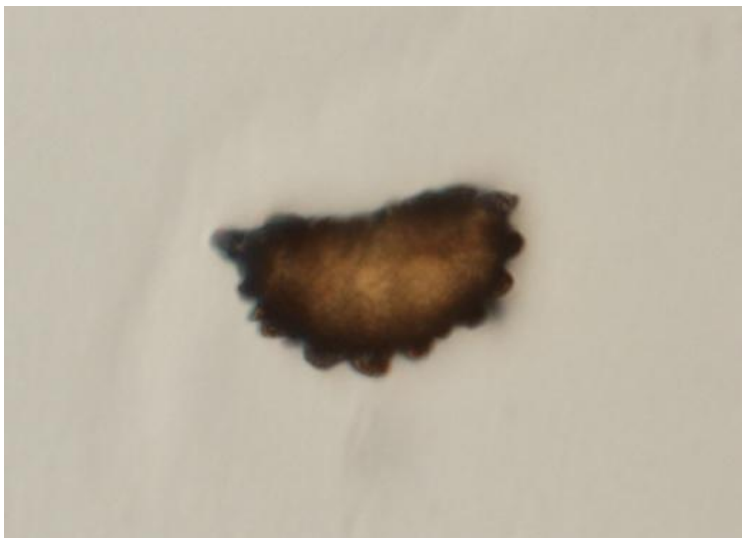
Č. vzorku	Ploidie	Název	A/N	% A
1	2x	11 Starý kanclíř	13/987	1,3
2	2x	7a Dolní město	18/982	1,8
3	2x	12 Kosky	18/982	1,8
4	2x	Valtínov 2	19/981	1,9
5	2x	Valtínov 1a	21/971	2,1
6	2x	Hodice	22/978	2,2
7	2x	32a Ostrov	26/974	2,6
8	2x	3 Inverarnan, GB	30/970	3
9	2x	5a Tři studně	32/968	3,2
10	2x	2a Přímělkov	43/957	4,3
11	2x	37 Tisá vstup do VS	47/953	4,7
12	2x	8 Rejčkov	85/895	8,5
13	3x	34 Vlčí jezero (Děčín)	49/951	4,9
14	3x	26 (3)Loučovice	—	—
15	2x	18a Byňov-Jakule	—	—
16	2x	33 Sněžník-Jílové	—	—

Na obrázku 21 jsou graficky znázorněny procentuální hodnoty abortace spor ve vzorcích 1–12 (viz Tab. 5).



Obr. 21: Sloupcový diagram znázorňuje procentuální zastoupení abortovaných spor v celkem dvanácti vzorcích.

Na obrázku 22 se nachází mikrofotografie abnormálně vyvinutého výtrusu triploidní rostliny, která se zřetelně liší velikostí i tvarem od normálně vyvinuté triletí spory hasivky orličí. Pravděpodobně se jedná o diplosporu. Tato problematika však vyžaduje další studium.



Obr. 22: Abnormálně vyvinutý výtrus u triploidní *Pteridium aquilinum* (zvětšeno 400 \times , lokalita Vlčí jezero) zřejmě představující diplosporu.

5 Diskuze

5.1 Hodnocení faktorů prostředí v přirozených populacích na vliv fertility hasivky

Diagramy obecně neukázaly průkazný vliv environmentálních podmínek na fertilitu hasivky. Mezi nejvýznamnější faktory, které mohou ovlivňovat fertilitu hasivky orličí a které byly zjištěny jako jediné statisticky průkazné v rámci této bakalářské práce jsou oceanita a vlhkost, ale i ty jsou průkazností slabé. Z ordinačního diagramu RDA na obrázku 11 a grafu logistické regrese na obrázcích 12 a 13 je patrné, že fertilní rostliny populace preferují spíše právě oceaničtější a vlhčí stanoviště. Tento závěr tedy do jisté míry souhlasí s tvrzením, že hasivka orličí preferuje oceánské klima (Page 1976), což je možné pozorovat i reálně podle maxima výskytu právě v oceánických oblastech jako je např. Velká Británie (konkrétně západní Skotsko, kde je silný oceanický vliv) či Španělsko, ale i jiná místa západní Evropy. Oceánský typ podnebí se vyznačuje malými denními rozdíly v teplotě vzduchu, zvýšenou oblačností a vyšším úhrnem srážek a již na počátku studie byl jedním z předpokládaných potenciálních vlivů. Na základě rozmístění okolních druhů byl zaznamenán méně patrný význam otevřenosti stanoviště nebo také expozice světla a výskytem fertilních populací při okrajích vodních toků (viz Obr. 9), čemuž odpovídá nález pěti fertilních populací na okraji rybníků či řek (viz Přílohy 2). Fertilní populace se vyskytovaly spíše na vlhčích a stinnějších místech, což zřejmě souvisí právě se zmíněnou oceanitou, ale korelace fertility se světlem vyšla naopak pozitivní (viz Obr. 10a).

Tento výsledek jen potvrzuje hypotézy, že fertilita hasivky je ovlivněna interakcí širšího spektra faktorů (viz kap. 2.3.3.1; Dring 1965). Vlhkost vzduchu v minulosti nebyla prokázána jako faktor mající vliv na fertilitu hasivky, ale to mohlo být způsobeno nezvyklými sezónními podmínkami, velkým suchem a vyššími teplotami v období léta (Dring 1965). Další faktory, které zřejmě ovlivňují fertilitu jako jsou např. věk rostliny (Goebel 1905), míra zakořenění oddenku (Conway 1953), teplota a mechanické vlivy (Conway 1957), půdní vlastnosti (Dring 1965; Conway 1957) nebo míra narušení stanoviště (Laurent 1914; Oinonen 1967; Page 1976; Sheffield et al. 1993) bohužel nebyly zkoumány.

Zmíněné trendy, které byly zjištěny v této bakalářské práci jsou sice průkazně vyhodnocené, ale i tak velmi slabé. Pro přesnější a průkaznější výsledky by bylo zřejmě nutné provést detailnější studii s větším počtem dat a novými zahrnutými proměnnými (půdní reakce, přesnější

mikroklimatické údaje apod.). Zároveň by bylo užitečné kvantifikovat míru plodnosti, jak bylo provedeno v rámci jiných studií (Dring 1965; Wynn 2000).

5.2 Ploidní úrovně v populacích hasivky

Analýza vzorků z přirozených populací hasivky orličí v ČR odhalila výskyt převážně diploidních rostlin (49 lokalit). Na čtyřech lokalitách byly zaznamenány však překvapivě i rostliny triploidní. Situace, kdy u výtrusných rostlin jsou známy u konkrétního druhu především diploidi a vzácně se vyskytují triploidi, byla zaznamenána recentně např. u zástupců rodu *Equisetum* (Bennert et al. 2005), *Diphasiastrum* (Bennert et al. 2011) nebo *Athyrium* (Schneller and Rasbach 1984; Rasbach et al. 1991). Ve všech případech je existence triploidů vysvětlována buď zkřížením diploidních a tetraploidních rostlin nebo splynutím redukované a neredukované spory. Z neredukovaného výtrusu vznikne diploidní gametofyt, který se zkříží s haploidním gametofytem a vznikne triploidní sporofyt (Bennert et al. 2005)..

Výskyt triploidních rostlin je zajímavý. Dosud byly triploidi u hasivky zaznamenány pouze jednou, a to ve Velké Británii (Sheffield et al. 1993). Objev triploidů v České republice byl překvapivým zjištěním. Vyvinuté výtrusy byly zaznamenány jak u diploidních, tak u triploidních rostlin (těch bylo však pro porovnání menší množství), proto lze předpokládat, že ploidní úroveň s fertilitou druhu nemusí souviset. Pro spolehlivé tvrzení by bylo potřeba však analyzovat větší množství fertálních triploidů na porovnání s diploidy.

Porovnáváním stupně ploidie a délky průduchů byla zaznamenána korelace větších průduchů s vyšší ploidí. Korelace velikosti buněk a ploidie je nejen u kapradin obecně známa (Schneller and Rasbach 1984; Barrington 1986; Nugent and Ray 1992). Tento vztah byl zaznamenán i u hasivky (Sheffield et al. 1993), při objevu triploidů ve Velké Británii. Měřením průduchů se autoři snažili nejprve ověřit triploidní cytotyp. Průměrná délka stomat triploidů vyšla prokazatelně větší než průměrná délka stomat diploidů (viz Tab. 6). Zajímavé je, že průměrná délka průduchů (poměr diploidů/triploidů) zjištěná v rámci této práce se značně liší od výsledků zmíněné studie (viz Tab. 6). Takto rozdílné hodnoty by mohly být důsledkem rozdílného způsobu měření (světelný vs. elektronový mikroskop), měřením jiné taxonomické entity nebo různou kalibrací přístroje.

Tab. 6: Srovnání velikosti průduchů u diploidních a triploidních rostlin *Pteridium aquilinum*. Hodnoty v levé části jsou průměrná velikost průduchů celkem 20 rostlin (18 diploidních, 2 triploidní) představené v rámci bakalářské práce, vpravo se nachází průměrná velikost průduchů celkem 5 rostlin (3 diploidní, 2 triploidní) převzatá z práce Sheffield et al. (2013).

	Prům. délka průduchů 2x	Prům. délka průduchů 3x
Bakalářská práce	20,15 μm	31,65 μm
Sheffield et al.(1993)	43,63 μm	47,25 μm

Na lokalitě Pístina byla zaznamenána směsná populace s výskytem jak diploidních tak triploidních rostlin. Ze vzorku, který obsahoval tři lístky třech různých jedinců nasbíraných nejméně tři metry od sebe byla zjištěna triploidie pomocí průtokové cytometrie. Měřením průduchů všech třech položek byl ale zjištěn diploidní stav. Pro triploidní rostlinu bohužel nebyl pořízen herbářový doklad, a proto nebyly změřeny její průduchy.

Rovněž byla uvažována klonalita (Oinonen 1967; Sheffield 2008) a homogenita v rámci populace, proto se neshlívalo tolik vzorků. Na základě stávajících zkušeností by bylo však vhodné provádět podrobnější sampling (více vzorků za populaci), aby se tak odhalila frekvence výskytu 2x a 3x rostlin.

5.3 Hodnocení abortace spor

Na rozdíl od některých dřívějších studií, kdy se plodnost hodnotila pouze makroskopicky (Conway 1957), poskytla mikroskopická analýza výtrusů v této práci exaktní údaje týkající se fertility hasivky. Vzhledem ke stanovení fertility (vyvinutosti výtrusů u fertiních rostlin) pomocí mikroskopu, nemohlo dojít k záměně výtrusnic s výtrusy za jiné, pouhým okem často nerozlišitelné, rostlinné útvary (mikroskopické pleviny, parafýzy) makroskopicky často podobné výtrusnicím na okraji listu a tudíž nemohlo dojít k nesprávnému označení. Proto bylo několik rostlin dodatečně v laboratoři označeno za sterilní, ačkoliv v terénu se zdály být fertlní. Podobná situace může nastat, kdy okraje listů jsou porostlé vyvinutými ostěrami a jeví se fertlní, ale po bližším pozorování však pod ostěrami nejsou nalezeny žádné výtrusnice. Byly zaznamenány tři případy, kdy rostliny vykazovaly velmi slabou fertilitu (zaznamenáno pouze několik desítek výtrusů a neúplně vyvinuté výtrusnice nebo jejich nízký počet) a nebylo možné

výtrusy hodnotit (viz kap. 4.4). To je v kontrastu s toutéž studií (Conway 1957), kde se vyskytuje údaj, že pokud je nalezena fertilní populace, pak jsou výtrusnice vyvinuté výrazně. Protože se ale jednalo o oblast západního Skotska, které je mnohem více oceanické, mohly na příznivé podmínky reagovat vyšší mírou plodnosti. Pravdou je, že trofosporofyty vzorku ze Skotska poskytnuté dodatečně školitelem měly také hojný počet značně vyvinutých výtrusnic. Britské triploidní populace (Sheffield et al. 1993) měly také zřetelně vyvinuté výtrusnice a vyvinuté výtrusy v tetrádách s nepatrným procentem abortovaných výtrusů, což je obecně pro polyploidní cytotypy spíše neobvyklé (Manton 1950; Sheffield et al. 1993; Bennert et al. 2005; Bennert et al. 2011). Nejčastěji se triploidie objevuje hybridů, kteří bývají zpravidla sterilní. V rámci této práce byli objeveni pouze dva fertilní triploidi (viz kap. 4.4). Triploidní jedince z lokality Loučovice nebylo možné kvůli nedostatečnému počtu výtrusů spolehlivě analyzovat (lokality Loučovice), avšak byly zde detekovány vyvinuté výtrusy. Triploidní rostliny z lokality Vlčí jezero (viz Tab. 5) vykazovaly 95,1% přítomnost abnormálně vyvinutých výtrusů (zřejmě diplospor, viz Obr. 22). Abnormálně vyvinuté výtrusy u rostlin z Vlčího jezera zde označené jako diplospory byly velmi překvapivým zjištěním. Abychom vyloučili možnost, že se jedná o kontaminaci jinými druhy (např. rod *Dryopteris*, pro který je charakteristický monoletní typ výtrusů a rostoucí na podobných stanovištích), byly rostliny detailně analyzovány mikroskopicky. U rostlin z Vlčího jezera však byly pod ostěrami zaznamenány vyvinuté výtrusnice obsahující právě tyto diplospory. Autoři práce zmiňující první objev triploidů hasivky orličí (Sheffield et al. 1993) se snažili rekonstruovat možný vznik triploidů kultivací diploidů nalezených v jejich okolí. V laboratorních podmínkách se vytvořily právě diplospory, které zůstaly neredukované po prvním meiotickém dělení a druhé již neproběhlo. Domnívají se tedy, že triploid může vzniknout právě splynutím neredukované a normální spory diploidních rodičů. Vznik triploidů bez allotetraploidních rostlin je v přírodě možný (Rasbach et al. 1991), ale hybridy mezi tetraploidem a diploidem většinou bývají sterilní (Wagner et al. 1986), ačkoliv fertilní triploidi byli zjištěni také např. u *Cystopteris protrusa* (Haufler et al. 1985). Vznik diplospor je ale poměrně vzácným jevem (Wolf 1987) a je způsoben buď neúplným meiotickým dělením nebo somatickou polyploidizací v částech rostlin (Schneller and Rasbach 1984). Diplospory tvořené diploidy byly zpozorovány u rodu *Equisetum* (Bennert et al. 2005), *Diphasiastrum* (Bennert et al. 2011) nebo *Athyrium* (Schneller and Rasbach 1984; Rasbach et al. 1991). Zaznamenání diplospor v přirozené populaci (nikoli laboratorních podmínkách in vitro) je dalším zajímavým zjištěným výsledkem této práce.

6 Závěr

Výsledky předložené práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Většina lokalit hasivky je sterilních. Fertilní populace se vyskytují vzácně. V datasetu bakalářské práce odpovídá fertilním lokalitám 23% lokalit. Fertilní populace avšak byly speciálně vyhledávány i pomocí již známých lokalit z historických herbářových fertilních sběrů.
2. Nebyly odhaleny průkazné faktory prostředí korelující s výskytem fertilních populací, největší zaznamenaný vliv má zřejmě kontinentalita.
3. *Pteridium aquilinum* se v ČR vyskytuje ve dvou ploidiích (2x a 3x), diploidi převažují.
4. Triploidní hasivka byla zaznamenána poprvé v kontinentální Evropě.
5. Velikost průdchů lze u hasivky, stejně jako u většiny dalších kapradin, použít jako znak na odlišení ploidii.
6. Fertilní 2x rostliny vytváří převážně vyvinuté výtrusy, pouze 1,3–8,5% výtrusů je abortovaných.
7. Fertilní 3x rostliny nebylo možné spolehlivě analyzovat a adekvátně porovnat (málo vzorků), avšak byla detekována přítomnost abnormálně vyvinutých velkých výtrusů viz (viz Obr. 22), které zřejmě představují diplospory. Toto zjištění vyžaduje další studium pro relevantní závěry.

7 Bibliografie

- Aranha P, Hansen H, Rasmussen L et al (2014) Determination of ptaquiloside and pterosin B derived from bracken (*Pteridium aquilinum*) in cattle plasma, urine and milk. *Journal of Chromatography* 951:44–51
- Bennert W, Horn K, Kauth M, Fuchs J, Jakobsen I, Øllgaard B, Schnittler M, Steinberg M, Viane R (2011) Flow cytometry confirms reticulate evolution and reveals triploidy in Central European *Diphasiastrum* taxa (Lycopodiaceae, Lycophyta). *Annals of Botany* 108:867–876
- Bennert W, Lubienski M, Körner S, Steinberg M (2005) Triploidy in *Equisetum* subgenus *Hippochaete* (Equisetaceae, Pteridophyta) *Annals of Botany* 95:807–815
- Barrington DS, Paris CA, Ranker TA (1986) Systematic interferences from spore and stomate size in the ferns. *American Fern Journal* 76:149–159
- Braun-Blanquet J (1964) Pflanzensoziologie-Grundzüge der Vegetationskunde (Plant sociology–basic course). Springer Verlag, Wien
- Bright D (1928) The effects of exposure upon the structure of certain heath plants. *Journal of Ecology* 16:323–365
- Conway E (1953) Spore and Sporeling survival in Bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). *Journal of Ecology* 41:289–294
- Conway E (1957) Spore production in bracken. *Journal of Ecology* 45:273–284
- Christensen C (1906) Index Filicum: Enumeratio Omnium Generum (1753–1905). H. Hagerup, Copenhagen.
- Danihelka J, Petrik P, Wild J (2011) Databanka flóry České republiky (Plant database of Czech republic). URL: www.florabase.cz (26.3.2013)

del RosarioRamírez-Trejo M, Pérez-García B, Mendoza-Ruiz A, Valdez-Avila R, Espinosa-Matías S (2013) Observations of the spore, gametophyte and young sporophyte of *Pteridium caudatum* (L.) Maxon using scanning electron microscopy. *Micron* 45:37-44

Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysak M, Nardi L, Obermayer R (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany* 82:17–26

Dring M (1965) The influence of shaded conditions on the fertility of Bracken. *British Fern Gazette* 9:222–227

Farlow W (1899) Apospory in *Pteris aquilina*. *Annals of Botany* 2:383–386

Goebel K (1905) Organography of plants. Clarendon Press, Oxford

Gradstein S, Van Zanten B (2001) High altitude dispersal of spores: an experimental approach. *XVI International Botanical Congress, St. Louis*. Abstract Number 15.14.13 In Kessler M (2010) Biogeography of ferns In K, Walker LR, Sharpe JM (eds) *Fern Ecology*, Cambridge University Press, pp 22–60

Haufler C, Windham M, Britton D, Robinson S (1985) Triploidy and its evolutionary significance in *Cystopteris protrusa*. *Canadian Journal of Botany* 63:1855–1863 [non vidi]

Hegi G, Conert H (1981) *Illustrierte Flora von Mittel-europa* (Illustrated Flora of Central Europe), P. Parey, Berlin

Hennekens S (1998) TURBOVEG. Software package for input, processing, and presentation of phytosociological data. Users's guide. Version 2.110. IBN-DLO Wageningen and University of Lancaster.

Dvořáková M (1988) in Hejný S, Slavík B (eds) *Květena České socialistické republiky* (Flora of the Czech Republic) 1. Academia, Praha, pp 235–236

Hietz P (2010) Fern adaptations to xeric environments. In Mehlreter K, Walker L, Sharpe J (eds) *Fern Ecology*, Cambridge University Press, pp 140–176

- Jarrett F, Manton I, Roy S (1968) Cytological and taxonomic notes on a small collection of living ferns from Galapagos. *Kew Bulletin* 22:475–480
- Koutecký P (2012) Průtoková cytometrie v botanice (Princip metody, měření velikosti genomu rostlin). JU, České Budějovice
- Kramer K (1990) Dennstaedtiaceae. Pteridophytes and Gymnosperms. The Families and Genera of Vascular Plants. Springer, Berlin Heidelberg, pp 81–82
- Laurent M (1914) Sur l'introduction récente du *Pteris aquilina* L. en Champagne pouilleuse. *Bulletin de la Société Botanique de France* 61 :74–77
- Lawton J (1988) Biological control of bracken in Britain: constraints and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 318:335–355
- Lepš J (1996) Biostatistika. JU, České Budějovice
- Linnaeus C (1753). *Species plantarum*, vol. II. Laurentii Salvii, Stockholm, Sweden
- Löve A, Kjellqvist E (1972) Cytotaxonomy of Spanish plants. *Lagascalia* 2:23–25
- Mickel J (1973) The classification and phylogenetic position of the Dennstaedtiaceae. In Jermy A et al (eds) The phylogeny and classification of the ferns. *Botanical Journal of the Linnean Society* 67:135–144 [non vidi]
- Manton I (1950) Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. Cambridge University Press, Cambridge
- Marrs R, Watt A (2006) Biological flora of the British Isles: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Journal of Ecology* 94:1272–1321
- McCune B, Keon D (2002) Equations for potential annual direct incident radiation and heat load. *Journal of Vegetation Science* 13:603–606
- Miller JH (1968) Fern gametophytes as experimental material. *Botanical Review* 34:361–440
- In Dyer FM (1979) *The Experimental Biology of Ferns*, Academic Press, London

- Morton A (1999) DMAP (Distribution mapping software). Version 7.0. www.dmap.co.uk
- Näf U, Nakanishi K, Endo M (1975) On the physiology and chemistry of fern antheridiogens. *Botanical Review* 41:315–359
- Nugent P, Ray D (1992) Spontaneous tetraploid melons. *Hortscience* 27:47–50
- Oinonen E (1967a) The correlation between the size of Finnish bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) clones and certain periods of site history. *Acta Forestalia Fennica* 83:1–51
- Skalický V (1988) Regionálně fytogeografické členění (Regional phytogeographical division). In Hejný S, Slavík B (eds) Květena České socialistické republiky (Flora of the Czech Republic) 1. Academia, Praha, pp 103–121
- Page C (1976) The taxonomy and phytogeography of bracken—a review. *Botanical Journal of the Linnean Society* 73:1–34
- Pearman D, Corner RWM (2004) Altitudinal limits of british and irish vascular plants. *Summerfield Books*, London
- Promicra, s. r. o. (2004) QuickPHOTO MICRO, version 2.3 and 3.0. www.promicra.com
- Rasmussen (2003) Ptaquiloside: an enviromental hazard? Occurence and fate of Bracken (*Pteridium* sp.) toxin in terrestrial enviroments. Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University, Chemistry Department
- Rodriguez de la Cruz D, Sanchez Reyes E, Sanchez Sanchez J (2009) Effects of meteorological factors on airborne bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) spores in Salamanca (miffle-west Spain). *International Journal of Biometeorology* 53:231-237
- Rodwell JS (1991) British plant communities Vol. 1. Woodlands and scrub, Cambridge University Press
- Rodwell JS (1992) British plant communities, Vol. 3. Grassland and montane communities, Cambridge University Press

- Rodwell JS (2000) British plant communities Vol. 5. Maritime communities and vegetation of open habitats, Cambridge University Press
- Rohlena J (1942) Conspectus florum Montenegrinae. *Preslia* 20–21:1–506 [non vidi]
- Rumsey FJ, Sheffield E, Haufler CH (1991) A re-assessment of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn in Britain. *Watsonia* 18:297–301
- Russel AE, Raich JW, Vitousek PM (1998) The ecology of the climbing fern *Dicranopteris linearis* on windward Mauna Loa, Hawaii. *Journal of Ecology* 86:765–779
- Schwabe WW (1951) Physiological studies in plant nutrition. XVI The mineral nutrition of bracken. *Annals of Botany* 15:417–446
- Shanin M, Smith B, Prakash A (1999) Bracken carcinogens in the human diet. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 443:69–79
- Sheffield E, Wolf PG, Haufler CH, Ranker T, Jermy AC (1989) A reevaluation of plants referred to as *Pteridium herediae*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 99:377–386
- Sheffield E, Wolf PG, Rumsey FJ, Robson DJ, Ranker TA, Challinor SM (1993) Spatial distribution and reproductive behavior of a triploid bracken (*Pteridium aquilinum*) clone in Britain. *Annals of Botany* 72:231–237
- Sheffield E (2008) Alternation of generations. In Ranker TA, Haufler CH (eds) *Biology and evolution of ferns and lycophytes*, Cambridge University Press, Cambridge, pp 49–74
- Schraudolf H (1967) Die Steuerung der Antheridienbildung in *Polypodium crassifolium* L. durch Licht. *Planta* 76:37–46 [non vidi]
- StatSoft, Inc. (2013) STATISTICA (data analysis software system), version 12.0. www.statsoft.com
- ter Braak C, Šmilauer P (2012) *Canoco reference manual and user's guide: software for ordination*, version 5.0. Microcomputer Power, Ithaca, USA
- Tryon R (1941) A revision of the genus *Pteridium*. *Journal of the new England botanical club* 43:1–66

- Thomson J, Der J, Stratford J, Wolf PG (2009) Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany* 96(5): 1041–1049
- Valentine D (1964) *Pteridium*. In Tutin T et al (eds) *Flora Europaea* 1:12. Cambridge University Press, Cambridge
- Voeller B (1964) Antheridiogens in ferns. In *Regulateurs naturels de la croissance vegetale* (Natural regulators of a vegetal growth). Giff-sur-Yvette: Editions du CNRS, pp 665–684 [non vidi]
- Voeller B, Weinberg E (1969) Evolutionary and physiological aspects of antheridium induction in ferns. In Gunckel J (ed) *Current Topics in Plant Science*, Academic Press, New York, pp 77–93
- Wagner W, Chen K (1965) Abortion of spores and sporangia as a tool in the detection of *Dryopteris* hybrids. *American Fern Journal* 55:9–29
- Wagner W, Wagner F, Carl Taylor W (1986) Detecting abortive spores in herbarium specimens of sterile hybrids. *American Fern Journal* 76(3):129–140
- Watt A (1940) Contributions to the ecology of bracken (*Pteridium aquilinum*). I. The rhizome. *New phytologist* 39:401–422
- Wolf P, Haufler C, Sheffield E (1987) Electrophoretic evidence for genetic diploidy in the bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Science* 236:947–949
- Whitehead D (1964) Identification of p-hydroxybenzoic, vanilic, p-coumaric, and ferulic acids in soils. *Nature* 202:417–418
- Wynn J, Small J, Pakeman R, Sheffield E (2000) An assessment of genetic and environmental effects on sporangial development in bracken [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn] using a novel quantitative method. *Annals of Botany* 85:113–115

8 Přílohy

Příloha 1: Seznam lokalit. Alt – nadmořská výška, Lat – GPS souřadnice N, Long – GPS souřadnice E, Poměr – poměr průměrů vzorků ku standardu.

ID	Název	Alt	Lat	Long	Ploidie	Poměr	Fert.	Datum
1	Lhotka	624	49 12 29	15 22 27	2x	1,355	S	2013 08 10
2	Přímělkov 1	444	49 20 15	15 44 18	2x	1,341	F	2013 08 10
3	Přímělkov 2	444	49 20 15	15 44 18	2x	1,379	S	2013 08 10
4	Bohdalov	573	49 29 23	15 53 10	2x	1,361	S	2013 08 10
5	Tři studně	726	49 36 24	16 02 28	2x	1,342	F	2013 08 10
6	Věž - Skála	556	49 33 08	15 25 22	2x	1,314	S	2013 08 10
7	Dolní město	457	49 37 10	15 23 11	2x	1,318	F	2013 08 10
8	Rejčkov	593	49 37 47	15 18 29	2x	1,345	F	2013 08 10
9	Pístina	480	49 03 35	14 54 29	2x + 3x	1,976	S	2013 08 10
10	Lutová	477	49 00 28	14 53 12	2x	1,344	S	2013 08 10
11	Starý kanclíř	458	48 58 42	14 54 06	2x	1,227	F	2013 08 10
12	Kosky	457	48 57 07	14 53 15	2x	1,392	F	2013 08 11
13	Majdalena	463	48 56 49	14 52 20	2x	1,368	S	2013 08 11
14	Františkov	478	48 53 40.	14 57 23	2x	1,369	S	2013 08 11
15	Františkov 2	479	48 51 32	14 55 05	—	—	—	2013 08 11
16	Halámky	495	48 48 17	14 53 06	2x	1,208	S	2013 08 11
17	Halámky 2	490	48 48 31	14 52 42	—	—	—	2013 08 11
18	Byňov - Jakule	483	48 49 14	14 49 09	2x	1,352	F	2013 08 11
19	Komařice	449	48 52 38	14 33 41	2x	1,309	S	2013 08 11
20	Strážkovice	494	48 54 37	14 33 16	2x	1,267	S	2013 08 11
21	Borek	417	49 11 80	14 29 49	2x	1,404	S	2013 08 11
22	Janoušov	516	50 00 14	16 50 30	2x	1,429	S	2013 08 11
23	Těchonín	491	50 06 14	16 39 51	2x	1,352	S	2013 09 10
24	Suchdol	558	48 40 43	14 27 03	2x	1,268	S	2013 09 10
25	Rybník	542	48 37 46	14 23 21	3x	1,919	S	2014 08 21
26	Loučovice 1	663	48 37 46	14 14 44	3x	1,933	F	2014 08 21
27	Loučovice 2	663	48 37 46	14 14 44	—	—	—	2014 08 21
28	Pernek	764	48 47 47	13 59 50	2x	1,342	S	2014 08 21
29	Stoěgrova huť	760	48 47 39	13 59 48	2x	1,333	S	2014 08 21
30	Tisá	548	50 47 65	14 01 42	2x	1,382	S	2014 09 03
31	Rájec	452	50 48 61	14 00 69	2x	1,359	S	2014 09 03
32	Ostrov	398	50 48 31	14 02 89	2x	1,320	F	2014 09 03
33	Sněžník - Jílové	503	50 47 04	14 05 96	2x	1,364	F	2014 09 03
36	Tiské stěny	618	50 47 25	13 59 34	2x	1,311	S	2014 09 03
37	Tisá (vstup doVS)	552	50 47 00	14 01 17	2x	1,266	F	2014 09 03

ID	Název	Alt	Lat	Long	Ploidie	Poměr	Fert.	Datum
38	Vlkov	414	49 09 21	14 42 49	2x	1,461	S	2014 08 27
39	Ponědrážka	399	49 07 22	14 44 12	2x	1,148	S	2014 08 27
40	Kolence	460	49 05 28	14 47 20	2x	1,216	S	2014 08 27
41	Hamr	473	48 57 18	14 54 51	2x	1,217	S	2014 08 27
42	Třeboň	438	49 00 34	14 43 53	2x	1,417	S	2014 08 27
43	Novosedly	486	49 04 59	14 46 52	2x	1,305	S	2014 08 27
44	Jemčina	425	49 06 32	14 51 41	2x	1,384	S	2014 08 27
45	Bílá	475	49 07 59	14 59 10	2x	1,283	S	2014 08 28
46	Sedlec	464	49 02 22	15 03 81	2x	1,308	S	2014 08 28
47	Klášter	512	49 00 52	15 13 38	2x	1,245	S	2014 08 28
48	Landštejn	569	49 00 40	15 14 11	2x	1,389	S	2014 08 28
49	Klenová	499	49 02 32	15 10 26	2x	1,241	S	2014 08 28
50	Světce	499	49 18 30	14 59 30	2x	1,123	S	2014 08 28
51	Hadec odb.	387	49 49 34	14 10 10	2x	1,338	S	2014 08 28
52	Vrábče zastávka	507	48 55 13	14 23 46	2x	1,346	S	2014 08 28

Příloha 2: Environmentální hodnoty fytoecologických snímků. Orient.Sv° – Orientace svahu, Trans.N – transformovaná cirkulární data orientace svahu (severojižní), Trans.E – transformovaná cirkulární data orientace svahu (východozápadní), Pok.B% – Pokryvnost bylinného patra, ArcSinB – data pokryvnosti bylinného patra upravená arcsinovou transformací, Pok.M.% – Pokryvnost mechového patra, ArcSinM – data pokryvnosti mechového patra upravená arcsinovou transformací, Sklon sv.° – Sklon svahu, LogSklon – Data sklonu svahu upravená logaritmicou transformací, Zast. – Zastínění, Slun.Exp. – Sluneční expozice, TransExpN – Transformovaná cirkulární data sluneční expozice (severojižní), ArcSinExpE – Transformovaná cirkulární data sluneční expozice (východozápadní, Reliéf (viz Tab. 1), Mikrost. – Mikrostanoviště (viz Tab. 1), Tep. Zátěž – Teplná zátěž, TZ + zástin – Součet hodnot tepelné zátěže a zástinu, E – Ellenbergovy hodnoty pro světlo, teplotu, kontinentalitu, vlhkost, půdu, živiny.

ID	Název	Orient. Sv. °	Trans. N	Trans. E	Pok. B. %	ArcSi nB	Pok. M. %	ArcSi nM	Sklon sv. °	LogSklon	Zast.	Slun. Exp.	TransExp N	TransExp E	Reliéf	Mikr ost.	Tep. Zátěž	TZ + zástin	E světlo	E teplota	E kontin.	E vlhkost	E půda	E živiny
1	Lhotka	23	0.921	0.391	50	0.524	1	0.010	3	0.602	0.04	90	0.000	1	1	0.666	0.652	6.143	4.333	4.000	5.000	3.200	4.500	
2	Přímělkov 1	293	0.391	-0.921	70	0.775	0	0.000	3	0.602	0.20	293	0.391	-0.9205	2	1	0.692	0.623	6.250	5.714	4.333	5.000	5.800	6.250
3	Přímělkov 2	338	0.927	-0.375	45	0.467	25	0.253	5	0.778	0.50	315	0.707	-0.7071	2	1	0.639	0.480	5.588	5.000	3.533	5.375	3.778	4.875
4	Bohdalov	270	0.000	-1.000	40	0.412	25	0.253	1	0.301	0.55	180	-1.000	0	3	1	0.706	0.512	6.385	4.571	3.800	5.500	3.000	3.909
5	Tři studně	338	0.927	-0.375	85	1.016	0	0.000	5	0.778	0.35	135	-0.707	0.70711	3	8	0.639	0.528	6.444	5.000	3.625	5.889	4.857	6.000
6	Věž - Skála	270	0.000	-1.000	70	0.775	0	0.000	1	0.301	0.75	270	0.000	-1	3	8	0.706	0.441	5.300	5.333	3.700	5.250	5.000	5.000
7	Dolní město	113	-0.391	0.921	85	1.016	0	0.000	3	0.602	0.20	225	-0.707	-0.7071	3	1	0.722	0.650	6.455	5.500	3.778	5.364	5.429	5.700
8	Rejčkov	338	0.927	-0.375	98	1.370	0	0.000	1	0.301	0.05	338	0.927	-0.3746	1	2	0.691	0.674	7.000	5.000	3.000	5.500	5.000	4.750
9	Pístina	360	1.000	0.000	70	0.775	5	0.050	0	0.000	0.70	360	1.000	0	1	8	0.704	0.458	6.143	4.500	3.500	6.000	2.600	3.400
10	Lutová	180	-1.000	0.000	55	0.582	1	0.010	12	1.114	0.60	360	1.000	0	3	8	0.814	0.570	4.833	5.500	3.714	5.250	3.200	3.833
11	Starý kandlíř	203	-0.921	-0.391	65	0.708	0	0.000	0	0.000	0.60	203	-0.921	-0.3907	3	8	0.717	0.502	6.200	5.250	3.250	5.750	5.400	6.167
12	Kosky	225	-0.707	-0.707	70	0.775	10	0.100	1	0.301	0.10	203	-0.921	-0.3907	3	4	0.726	0.690	6.222	4.500	3.833	5.667	2.400	3.714
13	Majdalena	315	0.707	-0.707	65	0.708	0	0.000	0	0.000	0.70	135	-0.707	0.70711	3	3	0.717	0.466	5.200	5.333	4.000	4.750	3.000	4.200
14	Františkov	293	0.391	-0.921	65	0.708	0	0.000	1	0.301	0.60	293	0.391	-0.9205	2	2	0.713	0.499	6.500	5.500	4.000	5.200	5.400	5.333
15	Františkov 2	248	-0.375	-0.927	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	Halámky	293	0.391	-0.921	30	0.305	60	0.644	0	0	0.00	270	0.000	-1	3	1	0.717	0.717	4.778	4.500	3.875	5.200	2.889	3.000
17	Halámky 2	293	0.391	-0.921	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	Byňov - Jakule	360	1.000	0.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	Komařice	225	-0.707	-0.707	95	1.253	0	0.000	3	0.602	0.40	180	-1.000	0.000	2	1	0.744	0.596	5.667	5.000	4.143	6.111	5.833	6.333
20	Strážkovice	135	-0.707	0.707	80	0.927	0	0.000	0	0.000	0.25	248	-0.375	-0.927	3	1	0.717	0.627	6.438	5.333	4.000	4.556	3.857	4.231
21	Borek	203	-0.921	-0.391	55	0.582	30	0.304	3	0.602	0.55	338	0.927	-0.375	3	1	0.736	0.533	6.000	5.125	3.636	5.222	3.556	4.200
22	Janoušov	158	-0.927	0.375	99	1.429	0	0.000	3	0.602	0.65	203	-0.921	-0.391	3	1	0.723	0.488	6.500	5.000	3.333	5.000	6.000	4.600
23	Těchonín	158	-0.927	0.375	95	1.253	0	0.000	45	1.663	0.10	338	0.927	-0.375	1	6	0.989	0.939	6.250	5.000	3.000	5.250	5.000	6.750
24	Suchdol	180	-1.000	0.000	55	0.582	0	0.000	1	0.301	0.40	90	0.000	1.000	4	5	0.603	0.483	6.000	5.333	4.750	5.250	5.333	5.400
25	Rybník	360	1.000	0.000	70	0.775	30	0.305	10	1.041	0.45	360	1.000	0.000	5	1	0.567	0.440	6.000	5.500	3.500	5.364	4.667	5.273
26	Loučovice 1	113	-0.391	0.921	99	1.429	0	0.000	5	0.778	0.20	113	-0.391	0.921	2	8	0.746	0.672	6.235	4.818	4.000	5.667	5.636	5.400

ID	Název	Orient. Sv. °	Trans. N	Trans. E	Pok. B. %	ArcSi nB	Pok. M. %	ArcSi nM	Sklon sv. °	LogSklon	Zast.	Slun. Exp.	TransExp N	TransExp E	Reliéf	Mikr ost.	Tep. Zátěž	TZ + zástin	E světlo	E teplota	E kontin.	E vlhkost	E půda	E živiny
27	Loučovice 2	113	-0.391	0.921	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
28	Pernek	225	-0.707	-0.707	99	1.429	0	0.000	5	0.778	0.00	225	-0.707	-0.707	2	2	0.762	0.762	6.167	5.333	4.400	5.333	4.500	6.000
29	Stoěgrova huť	180	-1.000	0.000	99	1.429	0	0.000	2	0.477	0.30	180	-1.000	0.000	2	2	0.736	0.626	6.692	5.250	3.250	5.077	6.143	6.769
30	Tisá	360	1.000	0.000	80	0.927	2	0.020	1	0.301	0.75	225	-0.707	-0.707	1	7	0.676	0.423	6.600	4.500	3.750	5.333	2.333	2.750
31	Rájec	225	-0.707	-0.707	85	1.016	0	0.000	3	0.602	0.15	225	-0.707	-0.707	5	5	0.719	0.665	6.833	5.500	3.667	5.000	5.200	4.500
32	Ostrov	248	-0.375	-0.927	75	0.848	2	0.020	2	0.477	0.40	248	-0.375	-0.927	2	7	0.703	0.563	5.125	4.750	3.500	5.750	5.667	5.714
33	Sněžník - Jílové	225	-0.707	-0.707	50	0.524	2	0.020	1	0.301	0.20	225	-0.707	-0.707	3	3	0.701	0.631	6.600	5.000	2.750	5.000	4.000	3.750
34	Vlčí jezero	315	0.707	-0.707	85	1.016	5	0.050	1	0.301	0.01	315	0.707	-0.707	3	8	0.683	0.680	5.500	5.000	3.200	6.000	2.750	3.250
35	Nový Libouchec	248	-0.375	-0.927	99	1.429	0	0.000	5	0.778	0.10	135	-0.707	0.707	4	3	0.720	0.684	6.750	5.000	3.000	5.167	3.500	4.286
36	Tiské stěny	135	-0.707	0.707	60	0.644	5	0.050	0	0.000	0.70	135	-0.707	0.707	4	7	0.692	0.450	6.000	5.000	2.500	5.000	3.000	3.000
37	Tisá (vstup do VS)	203	-0.921	-0.391	99	1.429	0	0.000	45	1.663	0.50	225	-0.707	-0.707	5	3	0.988	0.741	6.400	4.500	3.000	6.000	2.333	3.500
38	Vlkov	270	0.000	-1.000	70	0.775	0	0.000	0	0.000	0.80	203	-0.921	-0.391	3	6	0.704	0.423	6.000	5.333	4.250	5.333	5.250	6.143
39	Ponědrážka	203	-0.921	-0.391	70	0.775	5	0.050	2	0.477	0.40	203	-0.921	-0.391	3	3	0.725	0.580	5.167	6.000	3.250	5.750	4.200	5.400
40	Kolence	225	-0.707	-0.707	99	1.429	0	0.000	1	0.301	0.25	135	-0.707	0.707	3	5	0.714	0.624	6.833	5.000	3.500	5.000	5.000	4.500
41	Hamr	338	0.927	-0.375	70	0.775	15	0.151	1	0.301	0.25	248	-0.375	-0.927	3	3	0.691	0.605	5.857	5.000	4.333	5.000	3.500	3.750
42	Třeboň	315	0.707	-0.707	99	1.429	0	0.000	1	0.301	0.60	293	0.391	-0.921	3	3	0.696	0.487	5.000	5.500	4.000	5.000	3.000	4.500
43	Novosedly	203	-0.921	-0.391	50	0.524	2	0.020	2	0.477	0.00	203	-0.921	-0.391	3	3	0.725	0.725	5.091	5.571	3.600	5.200	5.400	6.909
44	Jemčina	248	-0.375	-0.927	90	1.120	0	0.000	2	0.477	0.75	180	-1.000	0.000	3	1	0.716	0.448	7.143	5.375	3.600	5.000	5.889	5.286
45	Bílá	180	-1.000	0.000	15	0.151	1	0.010	0	0.000	0.50	180	-1.000	0.000	3	6	0.704	0.528	6.200	5.000	4.333	5.333	4.400	3.000
46	Sedlec	270	0.000	-1.000	90	1.120	0	0.000	2	0.477	0.00	270	0.000	-1.000	5	2	0.707	0.707	6.455	5.000	3.714	5.100	6.286	6.200
47	Klášteř	270	0.000	-1.000	99	1.429	0	0.000	0	0.000	0.75	135	-0.707	0.707	1	3	0.704	0.440	6.000	4.000	4.000	5.333	4.667	5.333
48	Landštejn	180	-1.000	0.000	25	0.253	5	0.050	0	0.000	0.50	225	-0.707	-0.707	1	3	0.704	0.528	5.571	5.000	3.200	5.400	4.500	5.167
49	Klenová	180	-1.000	0.000	99	1.429	0	0.000	0	0.000	0.15	225	-0.707	-0.707	3	1	0.704	0.652	6.667	5.500	3.667	5.333	3.000	4.667
50	Světce	248	-0.375	-0.927	80	0.927	5	0.050	3	0.602	0.55	248	-0.375	-0.927	5	3	0.722	0.523	4.750	4.333	4.000	5.000	2.500	3.000
51	Hadec odb.	270	0.000	-1.000	80	0.927	5	0.050	5	0.778	0.80	315	0.707	-0.707	4	3	0.710	0.426	6.200	4.667	5.200	4.500	2.500	3.000
52	Vrábče zst.	270	0.000	-1.000	50	0.524	30	0.305	2	0.477	0.4	315	0.707	-0.707	1	5	0.720	0.576	6.364	5.200	3.500	4.667	4.833	3.889

*Příloha 3a: Přehled druhů, jejich zastoupení a pokryvnosti na jednotlivých lokalitách (1– 26, názvy lokalit viz Přílohy 1). Pokryvnost jednotlivých druhů byla odhadována pomocí modifikované Braun-Blanquetovy stupnice (Braun-Blanquet 1964): **r** (1 až 2 jedinci s nepatrnou pokryvností), **+** (pokryvnost nižší než 1%), **1** (1 až 5%), **2** (4 až 25%), **3** (25 až 50%), **4** (50 až 75%), **5** (75 až 100). hl – bylinné patro, s2 – nízké keřové patro, t2 – střední stromové patro.*

Druh	Patro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Picea abies	t2				1																						
Quercus robur	t2							1			+										1	1					
Betula pendula	t2									1			+														
Pinus sylvestris	t2												+														
Populus tremula	t2														r												+
Sorbus aucuparia	t2																+										
Acer platanoides	t2																				r						
Alnus incana	t2																										+
Larix decidua	t2																										
Fraxinus excelsior	t2																										
Fagus sylvatica	t2																										
Quercus rubra	t2																										
Prunus domestica	t2																										
Sorbus aucuparia	t2																										
Prunus spinosa	s2		+																								
Sambucus nigra	s2			+																							
Rubus idaeus	s2				+								1														
Prunus avium	s2																								1		
Rosa pendulina	s2																										1
Lonicera species	s2																										
Agrostis capillaris	hl	r		2	+																+					1	
Epilobium angustifolium	hl	r				+																					

Druh	Patro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Holcus mollis	hl	1		1	+		+	2													3	r				3	
Pteridium aquilinum	hl	3	3	2	2	4	4	5	5	4	3	3	3	3	2		2			5	5	3	4	5	3	2	3
Rubus idaeus	hl	+	+		+	3		1		r		r	+							1			1		r		2
Vaccinium myrtillus	hl	1							2	2		2	r			2					r						
Elymus repens	hl		1																					2			
Fallopia convolvulus	hl		+																								
Galium aparine	hl		r									r			r											+	r
Impatiens parviflora	hl		+	+		r							r							+							r
Stellaria holostea	hl		2																								
Urtica dioica	hl		2			+		r	1			r			r					+			+			+	r
Angelica sylvestris	hl			2																						+	r
Chaerophyllum hirsutum	hl			r																							
Convallaria majalis	hl			2										3													
Fragaria vesca	hl			r				r																			
Galeopsis bifida	hl			r																							+
Hieracium murorum	hl			r																							
Hypericum maculatum	hl			+	r	r			3																		
Lapsana communis	hl			+																							
Luzula luzuloides	hl			r																							
Oxalis acetosella	hl			2						r							+										+
Stellaria graminea	hl			r																						r	
Veronica chamaedrys	hl			r				r													+					r	
Avenella flexuosa	hl				1					r			r				+					2					
Calamagrostis arundinacea	hl				+								r														1
Calamagrostis epigejos	hl				1																	r					
Calamagrostis villosa	hl				1	2				r			1				r										2
Carex species	hl				r																						
Equisetum arvense	hl				r																r						

Druh	Patro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Lupinus polyphyllus	hl				1																						
Aegopodium podagraria	hl					1						+								+				+			
Petasites hybridus	hl					+																					
Senecio ovatus	hl					+																r		+		+	+
Arrhenatherum elatius	hl						1																				
Carex digitata	hl						r																				
Dactylis glomerata	hl						+	r																		+	
Lysimachia nummularia	hl						1																				
Poa nemoralis	hl						r																				
Rubus species	hl						1																				
Scrophularia nodosa	hl						r																				
Viola reichenbachiana	hl						+	r														+					
Achillea millefolium	hl							r														r					
Festuca rubra	hl							+																		1	1
Humulus lupulus	hl							1																			
Carex brizoides	hl										+	3			3						2						2
Melampyrum pratense	hl										r											r					
Mycelis muralis	hl										r																
Carex pilulifera	hl												r														
Astragalus glycyphyllos	hl														r												
Solidago canadensis	hl														r												
Dryopteris carthusiana	hl																r										
Maianthemum bifolium	hl																r										
Vaccinium vitis-idaea	hl																r										
Galeobdolon montanum	hl																				+						
Galeopsis speciosa	hl																				r						
Lysimachia vulgaris	hl																				r						
Myosoton aquaticum	hl																				r						

Druh	Patro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Euphorbia cyparissias	hl																				r							
Hieracium laevigatum	hl																					r						
Lotus corniculatus	hl																					r						
Plantago major	hl																					r						
Poa pratensis	hl																					1	r			r		
Stellaria media	hl																					r						
Carex hirta	hl																						+					
Cytisus scoparius	hl																						r					
Hieracium lachenalii	hl																						r					
Briza media	hl																							2				
Campanula persicifolia	hl																						+					
Heracleum sphondylium	hl																								+			
Hypericum perforatum	hl																										+	
Aconitum variegatum	hl																											+
Silene vulgaris	hl																											+
Solidago virgaurea	hl																											+
Alopecurus pratensis	hl																											
Phleum pratense	hl																											
Anthriscus sylvestris	hl																											
Capsella bursa-pastoris	hl																											
Pimpinella major	hl																											
Taraxacum species	hl																											
Thlaspi arvense	hl																											
Viola tricolor	hl																											
Galium album s.str.	hl							r	r																			
Holcus lanatus	hl																											
Dryopteris filix-mas	hl																											
Geranium sylvaticum	hl																											

Druh	Patro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Molinia caerulea	hl																										
Rubus fruticosus agg.	hl																										
Scirpus sylvaticus	hl																										
Rumex acetosa	hl																										
Chelidonium majus	hl																										
Impatiens glandulifera	hl																										
Dianthus carthusianorum	hl																										
Geranium robertianum	hl																										
Lamium album	hl																										
Campanula patula	hl																										
Galium verum	hl																										
Hypochaeris radicata	hl																										
Lathyrus pratensis	hl																										
Leontodon hispidus	hl																										
Sonchus arvensis	hl																										
Artemisia absinthium	hl																										
Lathraea squamaria	hl																										
Trifolium pratense	hl																										
Brachypodium pinnatum	hl																										
Hedera helix	hl																										
Picea abies	hl	r																					r				
Quercus robur	hl						+																				
Sorbus aucuparia	hl									r													r				
Frangula alnus	hl																						r				
Betula pendula	hl																										r
Prunus species	hl																										
Acer pseudoplatanus	hl																										
Rubus idaeus	hl																										

Druh	Patro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Acer platanoides	hl																										
Fagus sylvatica	hl																										

*Příloha 3b: Přehled druhů, jejich zastoupení a pokryvnosti na jednotlivých lokalitách (27–52, názvy lokalit viz Přílohy 1). Pokryvnost jednotlivých druhů byla odhadována pomocí modifikované Braun-Blanquetovy stupnice (Braun-Blanquet 1964): **r** (1 až 2 jedinci s nepatrnou pokryvností), **+** (pokryvnost nižší než 1%), **1** (1 až 5%), **2** (4 až 25%), **3** (25 až 50%), **4** (50 až 75%), **5** (75 až 100). hl – bylinné patro, s2 – nízké keřové patro, t2 – střední stromové patro.*

Druh	Patro	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
Picea abies	t2															+							+			r	+	
Quercus robur	t2															r												
Betula pendula	t2				+			1	+			r	+			+					+							
Pinus sylvestris	t2																											
Populus tremula	t2																											
Sorbus aucuparia	t2										+											+						
Acer platanoides	t2																											
Alnus incana	t2																											
Larix decidua	t2				+																						+	
Fraxinus excelsior	t2						+																					
Fagus sylvatica	t2								+															+				
Quercus rubra	t2												+															
Prunus domestica	t2															+												
Sorbus aucuparia	t2													r														
Prunus spinosa	s2																											

Druh	Patro	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Sambucus nigra	s2																										
Rubus idaeus	s2																										
Prunus avium	s2																										
Rosa pendulina	s2																										
Lonicera species	s2															+											
Agrostis capillaris	hl					1		2		2					+				1			2					
Epilobium angustifolium	hl																										
Holcus mollis	hl		1																								
Pteridium aquilinum	hl		5	5	3	4	2	2	1	5	3	5	2	2	5	3	5	2	4	2	3	5	2	5	4	3	2
Rubus idaeus	hl																						+				
Vaccinium myrtillus	hl								3					+		2				+					2	2	
Elymus repens	hl		1																								
Fallopia convolvulus	hl			r																							
Galium aparine	hl			r																							
Impatiens parviflora	hl												r				+	+									
Stellaria holostea	hl																										
Urtica dioica	hl		1	+									+		+			r				+					
Angelica sylvestris	hl																										
Chaerophyllum hirsutum	hl																										
Convallaria majalis	hl																										
Fragaria vesca	hl																								r		
Galeopsis bifida	hl			r		r													+				+				
Hieracium murorum	hl																										
Hypericum maculatum	hl									+																	
Lapsana communis	hl																										
Luzula luzuloides	hl																										
Oxalis acetosella	hl																		1								
Stellaria graminea	hl									+																	

Druh	Patro	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Veronica chamaedrys	hl						+			+					+							r					1
Avenella flexuosa	hl				2			+	1		2	1				1											2
Calamagrostis arundinacea	hl																										
Calamagrostis epigejos	hl																			+							
Calamagrostis villosa	hl				1							2											+				
Carex species	hl																										
Equisetum arvense	hl																										
Lupinus polyphyllus	hl																										
Aegopodium podagraria	hl			1			+											1			1						
Petasites hybridus	hl																										
Senecio ovatus	hl																										
Arrhenatherum elatius	hl																										
Carex digitata	hl																										
Dactylis glomerata	hl			+						+										+							
Lysimachia nummularia	hl																										
Poa nemoralis	hl																										
Rubus species	hl																										
Scrophularia nodosa	hl																										
Viola reichenbachiana	hl																										
Achillea millefolium	hl																			r		r					+
Festuca rubra	hl						1														1						
Humulus lupulus	hl																										
Carex brizoides	hl												3		+												
Melampyrum pratense	hl																										+
Mycelis muralis	hl																	r					r				
Carex pilulifera	hl																										
Astragalus glycyphyllos	hl																										
Solidago canadensis	hl																										

Druh	Patro	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Dryopteris carthusiana	hl																										
Maianthemum bifolium	hl																										
Vaccinium vitis-idaea	hl																										
Galeobdolon montanum	hl																										
Galeopsis speciosa	hl																										
Lysimachia vulgaris	hl																										
Myosoton aquaticum	hl																										
Euphorbia cyparissias	hl																										1
Hieracium laevigatum	hl																										
Lotus corniculatus	hl																										
Plantago major	hl														r						+						
Poa pratensis	hl		+							+			r								2						
Stellaria media	hl												+						+		r		+				
Carex hirta	hl																										
Cytisus scoparius	hl																										
Hieracium lachenalii	hl																										
Briza media	hl																										
Campanula persicifolia	hl																										
Heracleum sphondylium	hl			r																							
Hypericum perforatum	hl					1																					
Aconitum variegatum	hl																										
Silene vulgaris	hl																										
Solidago virgaurea	hl																										r
Alopecurus pratensis	hl		2																								
Phleum pratense	hl		+																								
Anthriscus sylvestris	hl			+									+					r	r								
Capsella bursa-pastoris	hl			r																							
Pimpinella major	hl			r																r							

Druh	Patro	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Taraxacum species	hl			+																							
Thlaspi arvense	hl			+																							
Viola tricolor	hl			r																							
Galium album s.str.	hl					+		+													1						1
Holcus lanatus	hl					1													r					+			
Dryopteris filix-mas	hl						+							r													
Geranium sylvaticum	hl						+														r						
Molinia caerulea	hl						+																				
Rubus fruticosus agg.	hl						3						1	3	+		r				+						
Scirpus sylvaticus	hl								+																		
Rumex acetosa	hl									r																	
Chelidonium majus	hl													r						+							
Impatiens glandulifera	hl													r													
Dianthus carthusianorum	hl														r												
Geranium robertianum	hl																		r								
Lamium album	hl																			+							
Campanula patula	hl																				+						
Galium verum	hl																				+						
Hypochaeris radicata	hl																				r						
Lathyrus pratensis	hl																				r						+
Leontodon hispidus	hl																				r						
Sonchus arvensis	hl																					r					
Artemisia absinthium	hl																					+					
Lathraea squamaria	hl																					+					
Trifolium pratense	hl																					r					
Brachypodium pinnatum	hl																										+
Hedera helix	hl																										2
Picea abies	hl																										

Druh	Patro	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Quercus robur	hl																									r	r
Sorbus aucuparia	hl																										
Frangula alnus	hl																										
Betula pendula	hl																										
Prunus species	hl				r																						
Acer pseudoplatanus	hl						r																				
Rubus idaeus	hl											r															
Acer platanoides	hl																	r									
Fagus sylvatica	hl																								r		