

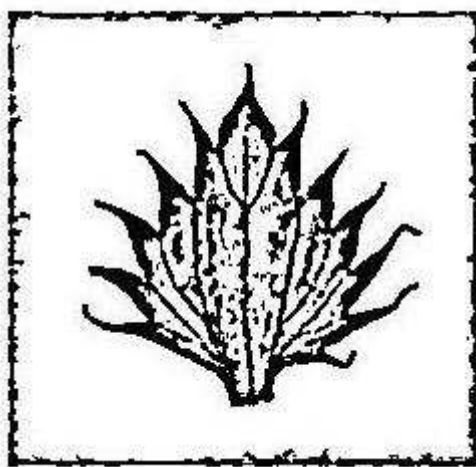
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Magisterská diplomová práce

Morfologická a genetická diference druhů *Euphrasia stricta* a *E. nemorosa*



Bc. Šárka Svobodová

Školitel: ing. Milan Štech, Ph.D.

České Budějovice, 2011

Svobodová Š. (2010): Morfologická a genetická diferenciacie druhů *Euphrasia stricta* a *E. nemorosa*. [Morphological and genetical differentiation of species *Euphrasia stricta* and *Euphrasia nemorosa*. Mgr. Thesis, in Czech] – 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Euphrasia L. belongs to the most taxonomically complicated genera in Europe. This is caused especially by considerable similarity of majority of species, intraspecific variation and hybridization, which occurs very often in this genus. Morphological variation of *E. stricta* group and *E. nemorosa* group and morphologically intermediate populations was investigated using conventional and geometric morphometric methods. Genetic variation was investigated using ISSR method. Hybridization experiment between *E. stricta* and *E. nemorosa* species was made. Cultivation experiment was accomplished to investigate phenotypic plasticity of *E. stricta* and *E. nemorosa*.

Tato práce byla podpořena „Mattoni Awards for Studies of Biodiversity and Conservation Biology“ v roce 2008.

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

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

V Českých Budějovicích dne 3.1.2011

Šárka Svobodová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomohli při vytváření této diplomové práce. Především bych chtěla poděkovat svému školiteli Milanovi Štechovi za jeho trpělivost, množství cenných rad, dovezení řady populací a také za množství času, který mi věnoval po celou dobu mé práce.

Můj velký dík si zaslouží Jirka Košnar a Petr Koutecký za nepřeborné množství užitečných rad a pomoc v laboratoři. Za pomoc se sběrem a rostlin děkuju především Ester Ekrtové a Honzovi Košnarovi, ale i všem ostatním. Pavlovi Kúrovi a Jakubovi Těšitelovi jsem vděčná za pomoc se statistickým zpracováním dat a nesčetné konzultace všeho druhu. Všem spolupracovníkům Laboratoře molekulární biologie rostlin a všem kolegům a kamarádům z pracovny 116 bych chtěla poděkovat za vytváření přátelského a inspirativního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich trpělivost, podporu, důvěru a pochopení.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 <i>Euphrasia stricta</i> agg.....	3
1.2 <i>Euphrasia nemorosa</i> agg.....	4
1.3 Fenotypová plasticita a její význam v rodě <i>Euphrasia</i>	5
1.4 ISSR.....	5
1.5 Cíle práce	6
2 Metodika	7
2.1 Přiřazení k tradičně rozlišovaným druhům.....	7
2.2 Opylovací pokus	8
2.3 Morfometrická analýza.....	10
2.3.1 Sběr a zpracování materiálu.....	10
2.3.2 Klasická morfometrie.....	11
2.3.3 Geometrická morfometrie.....	13
2.4 ISSR.....	14
2.4.1 Sběr materiálu a izolace DNA	14
2.4.2 PCR a příprava na fragmentační analýzu.....	16
2.4.3 Hodnocení dat a statistické zpracování.....	17
2.5 Kultivační pokus.....	17
3. Výsledky	19
3.1 Opylovací pokus	19
3.2 Morfometrická analýza.....	20
3.2.1 Klasická morfometrie.....	20
3.2.1.1 Shluková analýza	21
3.2.1.2 Analýza hlavních komponent.....	22
3.2.1.3 Kanonická diskriminační analýza	25
3.2.1.4 Klasifikační diskriminační analýza	26
3.2.2 Geometrická morfometrie.....	29
3.3 ISSR.....	32
3.4 Kultivační pokus.....	36
3.4.1 Analýza hlavních komponent	36
3.4.2 Kanonická diskriminační analýza.....	38
3.4.3 Klasifikační diskriminační analýza.....	39

4 Diskuse.....	41
4.1 Hybridizace.....	41
4.2 Morfometrické analýzy.....	42
4.3 Genetická variabilita.....	43
4.4 Fenotypová plasticita.....	45
5 Závěr	46
6 Literatura.....	47

Přílohy:

Příloha 1: Seznam lokalit

Příloha 2: Spearmanovy korelační koeficienty mezi měřenými morfologickými znaky; morfometrická analýza.

Příloha 3: Spearmanovy korelační koeficienty mezi měřenými morfologickými znaky; kultivační experiment.

Příloha 4: Fotografická příloha.

1 Úvod

Rod *Euphrasia* L. je rodem převážně jednoletých poloparazitických rostlin. Ještě donedávna byl řazen spolu s dalšími rody poloparazitických rostlin, jako jsou např. *Melampyrum* L., *Rhinanthus* L. či *Pedicularis* L., do tribu *Rhinantheae* čeledi *Scrophulariaceae* (např. Hartl 1974). Na základě recentních molekulárních studií se však ukázalo, že čeleď *Scrophulariaceae* není v jejím tradičním pojetí monofyletická (Olmstead & Reeves 1995, Khoshrang et al 2006). Rod *Euphrasia* a ostatní poloparazitické rody byly přiřazeny k čeledi *Orobanchaceae* (Olmstead et al 2001, Tank et al 2006).

U nás i v Evropě je rod *Euphrasia* považován za tzv. taxonomicky kritický rod. Značná habituální podobnost, velká vnitrodruhová genetická variabilita, fenotypová plasticita a velmi častá hybridizace jsou hlavní faktory, které komplikují určování jednotlivých druhů (Yeo 1955, Smejkal & Dvořáková 2000). Při určování je proto nutné hodnotit více jedinců z populace (Stace 1997, Vitek 2002b). Není proto divu, že již samotné vymezení druhů v rodě *Euphrasia* je poměrně obtížné a autoři se s ním potýkají už od počátků jeho studia. Extrémním případem bylo hodnocení většiny taxonů vyskytujících se na severní polokouli v jediném druhu *Euphrasia officinalis* L. (např. Linné & Willdenow 1800, Townsend 1884). V něm pak byly rozlišovány některé vnitrodruhové formy. V hodnotě samostatných druhů byly v tomto pojetí rozlišovány jen ty morfologicky nejodlišnější (např. *E. officinalis*, *E. salisburgensis* HOPPE či *E. tricuspidata* L.). Druhým extrémem bylo úzké pojetí druhu a tím nekritické popisování i drobných odchylek jako samostatných druhů (Sennen 1916, 1930), jež dnešní pohled neuznává (Vitek 2001). Druhový koncept je však v rodě velmi nejednotný a hodnocení jednotlivých taxonů různými autory je značně odlišné. Jednou z prvních prací zabývajících se taxonomií rodu *Euphrasia* je Wettsteinova Monografie (Wettstein 1896a). Jím navržený druhový koncept je s některými výhradami víceméně přijímán dodnes (Yeo 1978, Vitek 1998). Jednou z nich je např. zpochybnění taxonů, které se liší vzájemně pouze oděním (Yeo 1978). V současné době jsou stále popisovány nové druhy a rozlišovány poddruhy, jejich rozlišování je však podpořeno podrobnějšími studii (jak morfometrických, tak molekulárních) než tomu bylo v minulosti (např. Vitek 1985a, b, Kolseth & Lönn 2005). Většina rozsáhlejších taxonomických prací byla založena především na morfologických studiích a bylo by vhodné je podpořit i studii molekulárními.

Nejvýznamnější vnitrodruhovou variabilitu v rodě *Euphrasia*, stejně jako v dalších rodech poloparazitických rostlin, představuje sezónní dimorfismus. Jedná se ojev,

kdy se během téhož vegetačního období dají rozlišit dva fenologicky odlišné typy, časný (aestivální) a pozdní (autumnální). Oba typy se vyznačují vlastním habitem. Rostliny aestiválního typu mívají lodyhu nevětvenou nebo chudě větvenou v horní polovině, s malým počtem lodyžních článků a lodyžní listy často přetrvávají v době květu. Lodyha autumnálního typu je naopak často bohatě větvená už od báze, lodyžní články jsou krátké a je jich více než u aestiválního typu. Lodyžní listy jsou za květu obvykle opadané. Oba tyto typy bývají hodnoceny na různých taxonomických úrovních (Smejkal & Dvořáková 2000, Vitek 2002b). Jednou z teorií vzniku sezónního dimorfismu je diferenciace původně monomorfních typů v období pleistocénu, kdy se v podmínkách periglaciálního klimatu vyčlenil aestivální typ (z našich světlíků především *E. uechtritziiana*). Jedinci autumnálního typu (většina našich druhů) pak zůstaly v oblastech vzdálených ledovcům (Schwarz 1935, Smejkal 1963). Druhou, starší, teorií vzniku sezónního dimorfismu byla teorie Wettsteinova (Wettstein 1893a, 1896a). Ta považovala za hlavní faktor kosení luk. Ovšem sezónní dimorfismus se vyskytuje i v oblastech, kde senoseč není obvyklá. Touto teorií se zabýval i Zopfi (1993a, b), který považuje za hlavní příčinu fenologické a morfologické adaptace populací způsob obhospodařování luk. Za různé ekotypy považuje populace z luk s různým managementem. Tuto teorii podporují jeho studie na rodech *Rhinanthus* (Zopfi 1995) a *Euphrasia* (Zopfi 1998).

V poslední době bývá v rodě *Euphrasia* rozlišováno 100 až 300 druhů (Hartl 1974, Smejkal & Dvořáková 2000, Vitek 1991, Vitek 2002a). Hlavními znaky používanými k rozlišování druhů světlíků jsou velikost a barva květů, přítomnost trichomů a jejich typ (žláznaté/nežláznaté), habitus, tvar listenů, přítomnost osinek na listenech a ekologické nároky (např. Vitek 2002a). Jednotlivé taxony by měly být určovány nejen na základě morfologických vlastností, ale i s ohledem na okolní vegetaci, která může jejich vzhled pozměnit.

V rodě *Euphrasia* můžeme nalézt několik ploidních úrovní: diploidní ($n = 11$), tetraploidní ($n = 22$), které jsou běžně rozšířeny (Yeo 1954, Hamblen 1954, Vitek 1990), a hexaploidní ($n = 33$) a dodekaploidní ($n = 66$), které se vyskytují u australských druhů (Barker et al. 1988).

Pro svou diplomovou práci jsem si vybrala tetraploidní druhy *E. stricta* J.F.Lehm a *E. nemorosa* (Pers.) Wallr., protože představují naše nejproblematictější druhy rodu. Za normálních podmínek nedělá jejich determinace problémy, ale v řadě případů je tomu právě naopak. Hlavní příčinou je fenotypová plasticita a hybridizace, díky níž by měl vznikat údajný kříženec *E. ×haussknechtii* Wetst. (např. Wettstein 1893b, 1894, 1895, Smejkal 1960).

Ten svými znaky kolísá mezi oběma rodičovskými druhy. Jeho hybridní původ však nebyl experimentálně prokázán (Smejkal 1960).

Každý z vybraných druhů patří do skupiny taxonů, s nimiž bývá někdy sjednocován či tyto druhy často působí komplikace při determinaci. Někdy autoři používají zařazení do serií (series *Majoriflorae* Joerg. (Yeo 1978) či series *Pectinatae* Pugsl. (Smejkal 1963) pro *E. stricta*, series *Nemorosae* Pugsl. (Smejkal 1963, Yeo 1978) pro *E. nemorosa*), ale např. Karlsson (1976) a Yeo (1978) sdružují druhy do skupin taxonů (*E. stricta* agg., *E. nemorosa* agg.).

Zřejmě z důvodů značné variability a existence často nesnadno určitelných populací navrhuji Hämet-Ahti et al (1998), aby byly oba studované druhy hodnoceny jako druh jeden.

1.1 *Euphrasia stricta* agg.

E. stricta agg. je skupina taxonů se středně velkými květy, listy a listeny většinou se špičatými, často s osinkatými zuby. Listeny bývají lysé nebo štětinkaté, nežláznaté. Rostliny jsou většinou statné (Smejkal 1963, Yeo 1978).

Členění této skupiny taxonů je poměrně komplikované a nejednotné. Na vině jsou především odlišné názory autorů na hodnocení poddruhů *E. stricta* a dalších blízkých příbuzných druhů. Za nejbližší příbuzné druhy jsou obvykle považovány *E. tatarica* Fischer a *E. pectinata* Ten. Všechny tyto druhy jsou značně variabilní a navzájem si podobné (Vitek 2002a). Liší se od sebe především různou mírou odění (např. Smejkal 1963). Jako odlišná bývá uváděna i míra větvení, avšak to je poněkud diskutabilní znak, neboť bývá ovlivněn fenotypovou plasticitou. Určování druhů komplikuje i jejich pravděpodobná hybridizace (Smejkal & Dvořáková 2000). Wettstein (1896b) rozlišuje všechny tyto tři taxony na druhové úrovni. S tímto členěním se ztotožňují i další autoři (např. Smejkal 1964). Rovněž Gussarova (Gussarova et al. 2008) rozlišuje všechny tři taxony jako samostatné druhy. Toto hodnocení podporují markery jak v jaderné (ITS), tak v chloroplastové DNA. Naopak Rothmaler (1935), Jørgensen (1919) nebo Hartl (1974) sdružují všechny tři taxony do jediného druhu. Často bývají tyto druhy rozlišovány pouze jako poddruhy *E. stricta*. Vyskytují se ovšem i názory, které rozlišují pouze dva druhy a ztotožňují *E. tatarica* pouze s jedním z obou zbývajících druhů. Yeo (1971, 1978) a Siddiqui (1993) ji zahrnují do *E. pectinata*, zatímco např. Vitek

(2002a, 2005) do *E. stricta*. V okruhu *E. stricta* agg však bývají rozlišovány i další samostatné druhy. Yeo (1978) navíc rozlišuje druhy *E. hyperborea* (Skandinávie), *E. cebennensis* (Francie) a *E. liburnica* (Pyrenejský poloostrov). Dalším taxonem, který bývá řazen do *E. stricta* agg. je *E. slovacca*. Oproti ostatním druhům má charakteristické žláznaté odění. Od *E. stricta* se liší především odstálejšími listeny (Dvořáková & Smejkal 2000). Ovšem tento taxon bývá někdy hodnocen pouze jako varieta druhu *E. stricta* (Hartl 1974). Počet vnitrodruhových taxonů však může být mnohem vyšší. Ve Švédsku je rozlišováno pět variet *E. stricta*, z nichž dvě byly potvrzeny molekulárními markery (AFLP), zatímco zbylé tři tvořily společnou skupinu. Obě oddělené variety jsou časně kvetoucí, oproti zbylým třem, morfologicky i ekologicky jsou si však podobné. Zbylá skupina je diverzifikovaná mírou odění, ale autoři studie to považují za možnou adaptaci na prostředí (Kolseth & Lönn 2005).

V současné době je v české literatuře uznáván Wettsteinův koncept (Wettstein 1893b, 1894, 1895, Smejkal & Dvořáková 2000), který odlišuje *E. stricta*, *E. tatarica*, *E. pectinata*. Zároveň je rozlišována i *E. slovacca*. V rámci *E. stricta* pak není rozlišován žádný poddruh.

1.2 *Euphrasia nemorosa* agg.

Obdobně problematické je hodnocení taxonů z okruhu *E. nemorosa* agg., který ve střední Evropě obvykle zahrnuje druhy *E. nemorosa*, *E. curta* (Fries) Wettst. a *E. uechtriziana* Junger et Engler (Wettstein 1893b, 1894, 1895, Ronniger 1943, Dvořáková & Smejkal 2000). I v tomto případě se druhy od sebe liší především oděním, přítomností osinek, ale také dobou květu, neboť *E. uechtriziana* je oproti oběma dalším druhem aestivální (např. Smejkal 1963).

Stejně jako v případě *E. stricta* agg., i zde je hodnocení taxonů z okruhu *E. nemorosa* agg. nejednotné. V pojetí některých autorů (např. Yeo 1971, 1978) bývá do *E. nemorosa* zahrnována *E. curta*, a to především v místech jejich společného výskytu, zatímco *E. uechtriziana* je oddělována jako samostatný druh. Jiní autoři pak všechny tyto taxony sdružují do jediného druhu a odlišují je pouze na vnitrodruhové úrovni (Hartl 1974) nebo jim nepřikládají prakticky žádný význam (Vitek 2002b).

V české literatuře je v současné době, obdobně jako u *E. stricta* agg., uznáván Wettsteinův koncept (Wettstein 1893b, 1894, 1895, Smejkal & Dvořáková 2000), který odlišuje *E. nemorosa*, *E. curta* a *E. uechtriziana*. V rámci *E. nemorosa* pak nerozlišuje žádné poddruhy.

1.3 Fenotypová plasticita a její význam v rodě *Euphrasia*

Fenotypová plasticita je schopnost organismů měnit svůj genotyp v závislosti na prostředí, v němž se vyskytují. Hlavními faktory, které mohou ovlivňovat fenotyp rostlin jsou abiotické faktory jako míra slunečního záření, množství vody a živin, ale také faktory jako kompetice s okolní vegetací, predátoři či opylovači (Schlichting 2002).

Fenotypová plasticita v rodě *Euphrasia* ovlivňuje především habitus rostlin. Na dobrém hostiteli (např. *Trifolium*) jsou jedinci vyšší, větvenější a statnější než na méně vhodném hostiteli (např. *Koeleria*, *Thymus*), či zcela bez hostitele (Wilkins 1963, Yeo 1964). Dále fenotypový projev světlíků ovlivňuje okolní vegetace. Čím je vegetace vyšší, tím jsou světlíky vytáhlejší (Hellström et al 2004). Rozdíly ve velikosti a tvaru květu na různých hostitelích nebyly prokázány (Wilkins 1963, Svobodová 2008).

1.4 ISSR

Studium genetické variability druhů je dnes nepostradatelným přístupem v rostlinné taxonomii. Jednou z metod úspěšně použitých v řadě studií (např. Hao 2002, Shi 2010, Ducarme et al. 2010) je ISSR. Jedná se o hypervariabilní marker, u kterého není potřeba žádná znalost genomu zkoumaného organismu. Další výhodou je jeho poměrně nízká cena. Nevýhodou je pak obvykle časově náročná optimalizace pro každý studovaný organismus.

Metoda ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) je založena na PCR. Jako primery jsou využívány sekvence komplementární k mikrosatelitovým sekvencím. Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice tvořené opakováním obvykle 1-6 nukleotidů, které se vyskytují v genomu eukaryotických organismů poměrně hojně. Každý úsek, který se během PCR amplifikuje, je ohraničen dvěma stejnými mikrosatelitovými

sekvencemi. Ty jsou v řetězci DNA umístěny v opačném směru. Výsledkem jsou různě dlouhé úseky DNA mezi mikrosatelity (Zietkiewicz et al. 1994).

Přestože byly pro rod *Euphrasia* izolovány primery z *E. nemorosa* pro 5 různých mikrosatelitů (French et al 2003), bylo pro studium genetické diverzity mezi druhy *E. stricta* a *E. nemorosa* výhodnější využít metodu ISSR. Mikrosatelity zatím nebyly vyzkoušeny na *E. stricta*, navíc je tato metoda oproti ISSR výrazně dražší.

1.5 Cíle práce

Na družích *E. stricta* a *E. nemorosa* byla provedena řada taxonomických i ekologických studií (např. Yeo 1966, Bobear 1969, Hellström et al. 2004, French et al 2005, Kolseth & Lönn 2005), téměř žádná z nich se však nezaměřovala na přímé srovnání obou druhů. Výjimku tvoří pouze studie Karlssona (1976), který porovnával délku korunní trubky mezi oběma druhy. Pouze podrobnější výzkum rodu *Euphrasia*, který by využíval různé metodické přístupy, může dále objasnit mikrospeciační procesy v tomto zajímavém rodě a objasnit příčiny a hodnotu morfologické variability. Může tak být základem moderního taxonomického zpracování rodu v ČR, které je velmi potřebné.

Ve své diplomové práci jsem se proto zaměřila na řešení následujících úkolů:

- Zjistit podíl hybridizace mezi druhy *E. stricta* a *E. nemorosa*
- Určit význam fenotypové plasticity pro diagnosticky významné znaky
- Nalézt vhodné molekulární markery pro odlišení obou druhů a studium hybridizace
- Prozkoumat morfologickou variabilitu vybraných přírodních populací *E. stricta* a *E. nemorosa* za využití klasické a geometrické morfometrie
- Porovnat morfologickou a genetickou variabilitu mezi studovanými druhy

2 Metodika

2.1 Přiřazení k tradičně rozlišovaným druhům

Jednotlivé populace bylo potřeba přiřadit k dosud rozlišovaným druhům. Vybrala jsem 4 znaky (velikost květu, délku osinek, postavení větví a odění rostliny), které jsou v taxonomii středoevropských světlíků považovány za nejdůležitější determinační znaky. První tři jmenované znaky jsem použila pro přiřazení sebraných populací ke druhům *E. stricta* a *E. nemorosa*. Odění pak sloužilo k odlišení dalších taxonů, jako jsou *E. tatarica*, *E. curta*, *E. uechtriziana* a *E. slovacica*. *E. uechtriziana* je kromě toho taxonem aestiválním.

Vzhledem k variabilitě těchto znaků a existenci intermediárních znaků jsem zvolila tři možné stavy pro každý znak (viz Tab.1). Hodnota 1 odpovídala *E. nemorosa*, hodnota 3 odpovídala *E. stricta* (Smejkal 1963, Smejkal & Dvořáková 2000) a hodnota 2 byla použita u znaků, které měly intermediární charakter nebo kde nebylo možno s jistotou říci, ke kterému stavu náleží. Jednalo se především o typ větvení.

Tab. 1: Definování stavů 1, 2 a 3 pro znaky použité k určení rostlin.

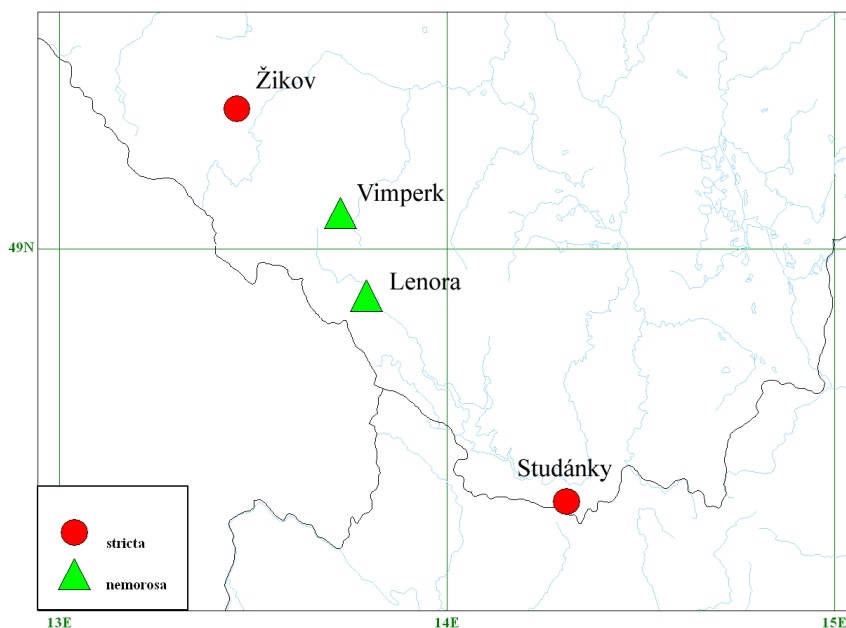
Stav znaku	1	2	3
velikost květu	do 6 mm	6-7 mm	nad 7 mm
postavení větví	v tupém úhlu	intermediární	v ostrém úhlu
délka osinek na zubech listenů	do 0,4 mm	0,4-0,6 mm	nad 0,6 mm
odění štětinkami	žádné	řídke	husté

Následně jsem sečetla hodnoty pro znaky velikost květu, postavení větví a délka osinek na zubech listenů. Ty sloužily k základnímu zařazení do skupin *E. stricta* agg., *E. nemorosa* agg. a intermediární typ. Populace se součtem rovným nebo nižším než 5 jsem označila *E. nemorosa* agg., populace s hodnotou 6 jsem označila jako intermediární a populace hodnotou nad 7 jsem pak označila jako *E. stricta* agg. Teprve poté jsem použila odění k odlišení zbývajících taxonů.

2.2 Opylovací pokus

Cílem hybridizačního pokusu bylo zjistit, zda se druhy *E. stricta* a *E. nemorosa* jsou schopny křížit se mezi sebou a jak je tato hybridizace úspěšná. Opylovací experiment jsem provedla v létě 2008, a to na 2 lokalitách druhu *E. stricta* (Studánky, Žižkov) a 2 lokalitách *E. nemorosa* (Lenora, Vimperk) (viz Obr. 1, Příloha 1). Na každé lokalitě jsem provedla pět zásahů (sterilizace, samovolná autogamie, xenogamie – opylení cizím pylem z jiného jedince stejného druhu ze stejné lokality, hybridizace – opylení pylem druhého druhu a kontrola). Kontrolní květy byly ponechány bez zakrytí samovolnému opylení. Květy, na kterých byly provedeny ostatní zásahy jsem poprovedení zásahu zakryla monofilem (viz Příloha 4). U zásahů sterilizace, xenogamie a hybridizace jsem vytrhla tyčinky. U xenogamie a hybridizace jsem rostliny následně opylila. Z květu sebraného pro pyl jsem pinzetou vytrhla tyčinky, které jsem následně narušila, aby se uvolnil pyl. Do tohoto pylu jsem pak ponořila bliznu. Jeden květ jsem opylovala dvěma různými květy z téže rostliny.

Pyl použitý pro opylování druhým druhem jsem sbírala den před opylováním. Abych jej uchovala co nejčerstvější, odebrala jsem na dané lokalitě celé rostliny. Přes noc jsem je nechala ve vodě. Ráno jsem odebrala květenství, která jsem hermeticky uzavřela v krabičce. Tu jsem po dobu cesty na lokalitu chladila ledem. Od každého zásahu jsem založila 20 opakování, pouze na lokalitě Žižkov jen 10 opakování. V Tabulce 2 je uvedeno, jaká lokalita byla zvolena pro mezidruhové křížení na které lokalitě. Tři týdny po provedení zásahů jsem odebrala zralé tobolky a spočetla jsem množství vyvinutých semen a počet nevyvinutých vajíček.



Obr. 1: Lokality, na kterých byl proveden opylovací experiment.

Tab. 2: Lokality, ze kterých byl odebrán pyl na hybridizaci.

Lokalita	Druh	Cizí pyl - lokalita
Studánky	<i>E. stricta</i>	Vimperk
Lenora	<i>E. nemorosa</i>	Studánky
Vimperk	<i>E. nemorosa</i>	Studánky
Žikov	<i>E. stricta</i>	Lenora

Získaná semena jsem v listopadu vysela na 2 lokality, zahrady v Boršově nad Vltavou a v Křenovicích.

Ve statistických analýzách jsem porovnávala poměry úspěšně vyvinutých semen a celkového počtu vajíček v tobolce (tzn. vyvinutá semena + počet nevyvinutých vajíček) mezi oběma studovanými druhy a mezi různými zásahy. Použila jsem *nested design*, kdy byla lokalita vnořena do druhu.

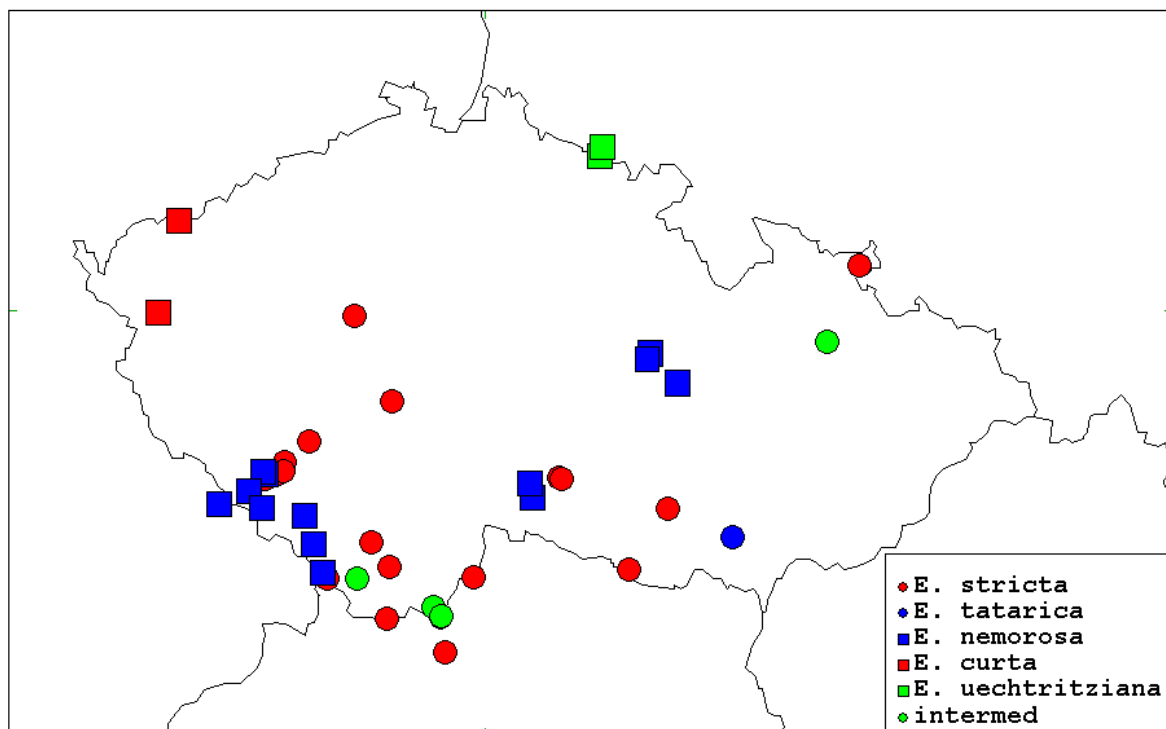
Data jsem hodnotila pomocí GLMM (*generalized linear mixed models*) s reziduální variabilitou popisovanou za pomoci binomické distribuce. K výpočtu byla použita funkce `glmer` (package `lme4`, Bates & Maechler 2010) v programu R 2.12 (R Development Core Team 2010). Nejlepší model byl vybírán metodou postupného výběru, kvalita jednotlivých modelů byla porovnáвана likelihood ratio testem. Protože GLMM je poměrně nový a v běžně dostupných statistických programech dosud nedostatečně zdokumentovaný typ modelů,

analyzovala jsem data pro porovnání ještě pomocí nested-design ANOVA s interakcí druh \times zásah v programu Statistica 9 (StatSoft 2001). Ta na rozdíl od současných implementací GLMM umožňuje přímo testovat významnost náhodného efektu. ANOVA však v porovnání s GLMM vyžaduje normální rozdělení a homogenitu variancí. Proto jsem hodnoty vysvětlované proměnné (podíl vyvinutých semen/celkový počet vajíček v tobolce) transformovala arcsinovou transformací ($\arcsin(\sqrt{x})$). Lokalita byla použita jako faktor s náhodným efektem.

2.3 Morfometrická analýza

2.3.1 Sběr a zpracování materiálu

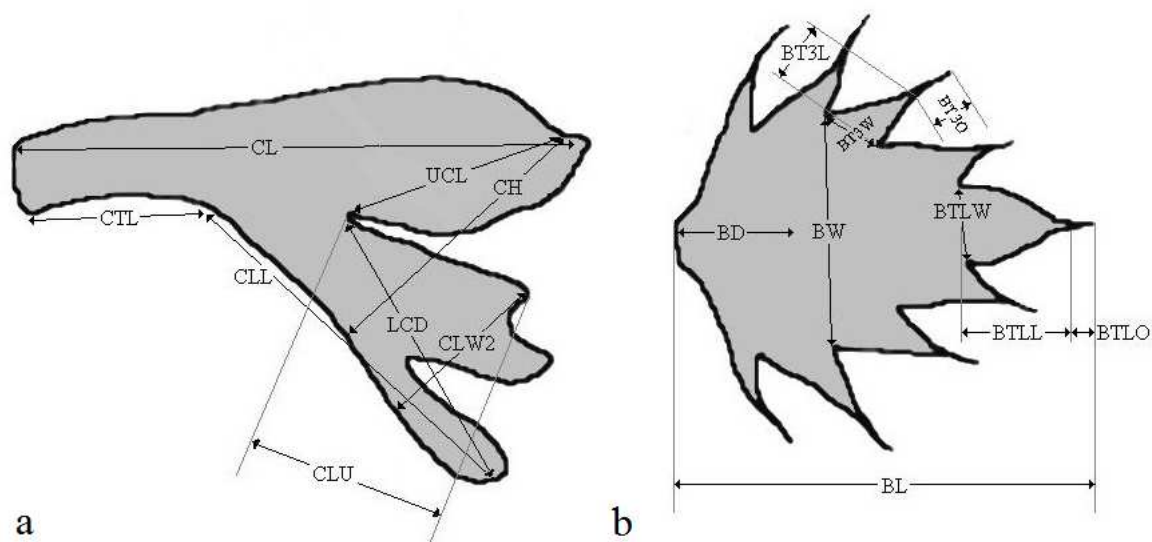
Pro morfometrické analýzy jsem použila vzorky z 43 populací (748 rostlin) z České republiky a jedné lokality v Rakousku. Seznam jednotlivých lokalit je uveden v Příloze 1, na Obr. 2 je vyznačena jejich geografická poloha. Populace jsem přiřadila k tradičně rozlišovaným druhům podle metodiky uvedené v kapitole 3.1. Sebrala jsem vzorky z 19 populací *E. stricta*, 15 *E. nemorosa*, 5 populací přechodných typů, 2 *E. curta* a 2 *E. uechtriziana*. Z každé populace jsem náhodně vybrala 20 jedinců. Toto množství se bohužel nepodařilo sebrat na všech lokalitách, a to buď kvůli jejich velikosti nebo fenologické fázi. Z každé rostliny jsem odebrala jeden květ, lodyžní list, první, pátý a desátý list. Ty jsem pomocí průhledné lepící pásky nalepila na papír. Takto připravený materiál jsem naskenovala v rozlišení 600dpi. Data pro klasickou i geometrickou morfometrii jsem získávala pomocí programu tpsDig, verze 2.10 (Rohlf 2006).



Obr. 2: Lokality studovaných populací

2.3.2 Klasická morfometrie

Pro klasickou morfometrii jsem vybrala 35 znaků (8 na květu, 9 na každém ze tří listenů), které jsem změřila na každé rostlině. Zahrnula jsem znaky uváděné v literatuře jako důležité pro určování jednotlivých druhů a znaky, které by mohly být potenciálně vhodné. Listy jsem z analýz vyřadila, neboť záhy opadávají a chyběly u většího množství rostlin. Ze stejného důvodu jsem následně vyřadila z analýz i všechny znaky na prvním listenu. Jednotlivé znaky, které jsem zaznamenávala, jsou vyznačeny na Obr. 3, zkratky jsou vysvětleny v Tab. 3. Data získaná pomocí programu tpsDig jsem pro další zpracování převedla do tabulky v programu Excel.



Obr. 3: Kvantitativní znaky měřené na květech a listenech (a – květy, b – listeny). Každý znak na listenu měl za svou zkratku ještě označení, z kolikátého listenu pocházel. V případě délky listenu to vypadalo následovně: BL1, BL5, BL10.

Tab. 3: Přehled znaků měřených na sbíraných rostlinách (a – květy, b – listeny).

a) Znaky měřené na květech.

Zkratka	Popis znaku
CL	délka koruny
CTL	délka korunní trubky
CH	výška koruny
UCL	délka horního korunního pysku
CLU	délka bočního okraje dolního korunního pysku
CLL	délka střední části dolního korunního pysku
CLW2	1/2 šířky dolního korunního pysku
LCD	diagonála na dolním pysku

b) Znaky měřené na listenech.

Zkratka	Popis znaku
BL	délka listenu
BW	šířka listenu
BD	vzdálenost nejširšího místa od báze listenu
BT3W	šířka 3.zubu listenu
BT3L	délka 3.zubu listenu
BT3O	délka osinky 3.zubu listenu
BTLW	šířka posledního zubu listenu
BTLL	délka posledního zubu listenu
BTLO	délka osinky posledního zubu listenu

Data jsem hodnotila v programu Statistica 9 (StatSoft 2001), mnohorozměrné analýzy jsem provedla v programovém balíku Canoco for Windows (ter Braak & Šmilauer 2002). Protože některé statistické metody vyžadují normální rozdělení dat, musela jsem některé znaky logaritmičtě transformovat. Pro PCA a shlukovou analýzu byla data standardizována.

Nejprve jsem provedla analýzu hlavních komponent (PCA, *principal component analysis*) jednotlivých populací, abych detekovala atypické jedince (*outliers*). Ty jsem následně vyřadila z výpočtů populačních průměrů jednotlivých populací (Marhold & Suda 2002).

Vztahy mezi jednotlivými populacemi jsem se pokusila zjistit pomocí shlukové analýzy, metodou průměrné vzdálenosti (UPGMA – *unweighted pair-group method using arithmetic averages*) a Wardovou metodou. Použila jsem data průměrných hodnot znaků pro jednotlivé populace. Jako koeficient vzdálenosti pro tyto analýzy byla zvolena euklidovská vzdálenost (Marhold & Suda 2002).

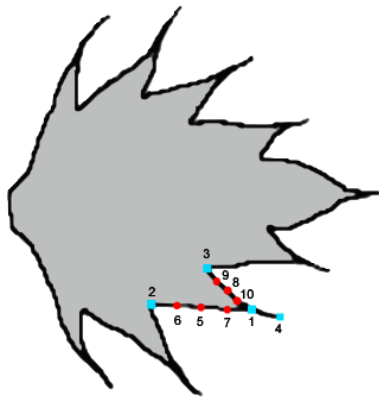
Abych zjistila vzájemnou pozici populací, provedla jsem PCA na průměrných hodnotách znaků pro jednotlivé populace. Následně jsem provedla PCA ke zjištění vztahů i mezi jednotlivými jedinci.

Pro zjištění, které znaky nejlépe oddělují studované druhy, jsem využila diskriminační analýzu. V krokové diskriminační analýze jsem při postupném výběru (*forward selection*) použila Monte Carlo permutační test (999 permutací) v programu Canoco for Windows. Klasifikační diskriminační analýzu jsem provedla v programu Statistica 9, jako klasifikační znak jsem použila kó druhu.

2.3.3 Geometrická morfometrie

Rozdíl ve tvaru vybraných částí mezi jednotlivými druhy jsem zkoumala pomocí geometrické morfometrie. Analyzovala jsem nejširší zub na desátém listenu. K získání dat jsem využila program tpsDig 2.10 (Rohlf 2006). Tvar celého listenu u rodu *Euphrasia* použít nelze, protože listeny mívají různý počet zubů a výsledná analýza je tím značně ovlivněna.

K popsání tvaru nejširšího zubu jsem vybrala 4 landmarky a 6 semilandmarků (vyznačení viz Obr. 4). Landmarky jsem definovala jako špičku zubu (1), báze zubu (2, 3) a konec osinky (4). Semilandmarky jsem poté každou stranu zubu rozdělila na čtvrtiny.



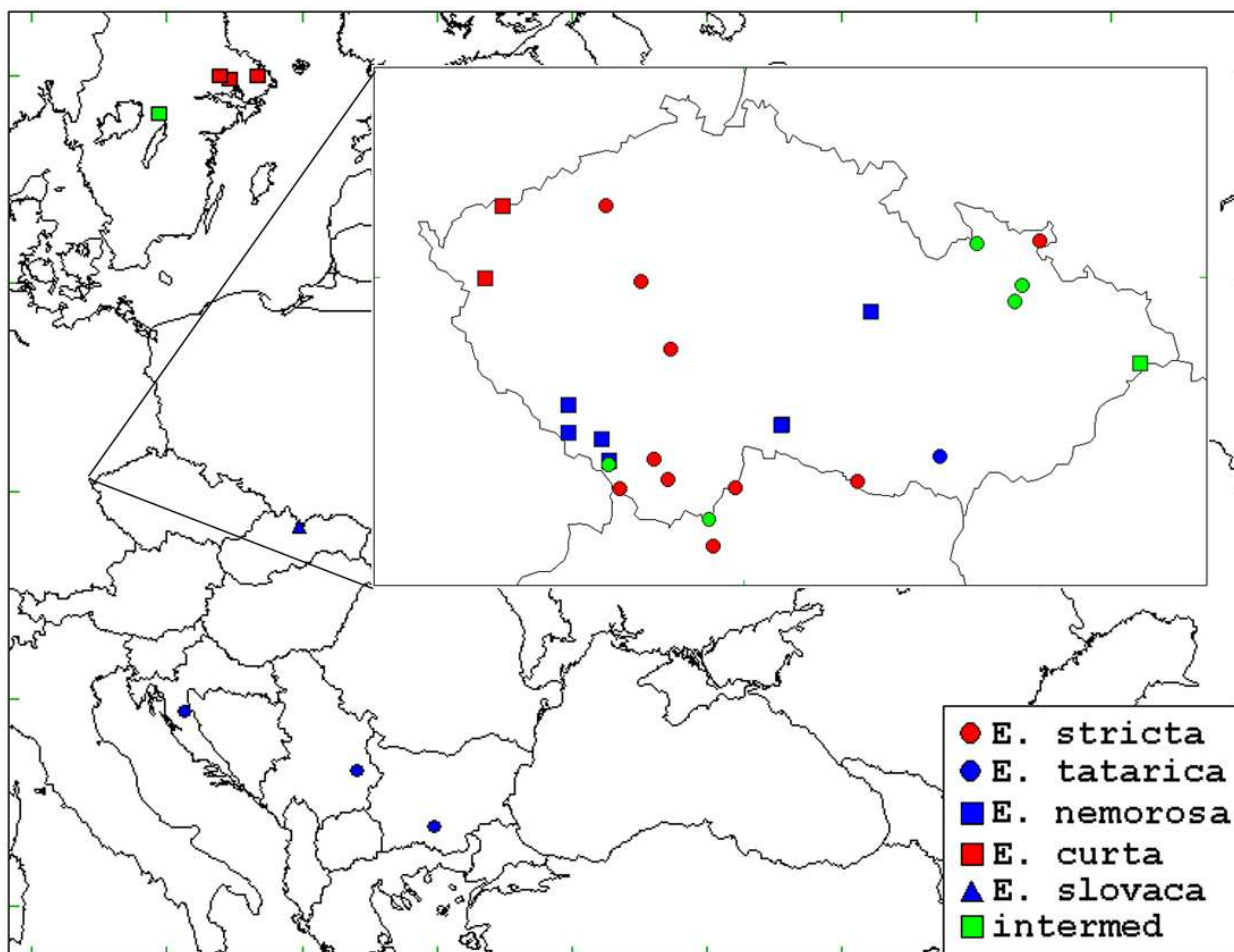
Obr. 4: Vyznačení landmarků (modře) a semilandmarků (červeně) použitých při analýze tvaru zubu na listenu.

Data jsem zpracovala pomocí programů tpsUtil, ver. 1.26 (Rohlf 2004), tpsRelw, ver. 1.45 (Rohlf 2007), tpsPLS, ver. 1.12 (Rohlf 2003) a Statistica 9 (StatSoft 2001). Před započítím vlastní analýzy bylo potřeba si nejprve jednotlivé objekty (květy či listeny) uspořádat tak, aby si homologní body co nejvíce odpovídaly (Zelditch et al. 2004). Toto uspořádání jsem provedla v programu tpsRelw, ver. 1.45 (Rohlf 2007) pomocí Prokrustovy superimpozice. K porovnání tvarových rozdílů jsem využila analýzu relativních deformací, která je obdobná analýze hlavních komponent (Marhold & Suda 2002, Zelditch et al. 2004). Získaná data jsem následně standardizovala a poté vytvořila výsledný diagram v programu Statistica 9.

2.4 ISSR

2.4.1 Sběr materiálu a izolace DNA

Pro analýzu ISSR jsem vybrala vzorky z 36 lokalit, a to jak z České republiky, tak ze Slovenska, Rakouska, Švédska a Balkánského poloostrova (viz Obr 5, Příloha 1). Z každé populace jsem sebrala 5 rostlin z populace. V případě menších populací, jsem sebrala méně rostlin. Z každé rostliny jsem odebrala přibližně 10 listenů, které jsem uchovávala v silikagelu při teplotě -20°C .



Obr. 5: Lokality studovaných populací.

Vzorky jsem izolovala z 11 populací *E. stricta*, 8 populací *E. nemorosa*, 6 populací přechodného typu, 5 populací *E. curta*, 1 populace *E. uechtriziana*, 4 populace *E. tatarica* a 1 populace *E. slovaca*.

Izolaci jsem prováděla podle standardního protokolu komerčním kitem INVITEK Plant Extraction Kit (www.invitek.de) pouze s některými drobnými změnami (způsob homogenizace, eluce). K izolaci jsem použila 5-6 listenů z každé rostliny, záleželo na velikosti. Homogenizaci jsem prováděla v 2 ml eppendorfci pomocí mlýnku Retsch MM400 (2 minuty, frekvence 30/s, wolframkarbidové mlecí kuličky o průměru 3 mm). Eluci jsem prováděla 70 μ elučního pufru (*Elution Buffer D*) předehřátého na 65°C, inkubovala jsem 30 min při pokojové teplotě. Pro získání vyšší koncentrace DNA jsem první eluát napipetovala opět na kolonku a nechala ještě dalších 10 minut inkubovat.

2.4.2 PCR a příprava na fragmentační analýzu

Izolovanou DNA jsem pro účely metody ISSR ředila sterilovanou PCR vodou v poměru 1:5. Tuto ředěnou DNA jsem následně použila pro amplifikaci pomocí 4 vybraných fluorescenčně značených primerů: OW1 (5'-GAG AGA GAG AGA GAG AA-3', VIC), OW4 (GAG AGA 5'-GAG AGA GAG AYA-3', 6-FAM), 840 (5'-AGA GAG AGA GAG AYT-3', VIC) (Werner et al. 2005) a 14 (5'-TGT CAC ACA CAC ACA CAC-3', NED) (Spagnuolo et al. 2007). PCR reakce jsem připravovala v objemu 10 µl a jejich složení bylo 2 µl PCR vody, 2,4 µl primeru o koncentraci 2,5 pM, 0,2 µl PCR enhanceru (Top-Bio), 5 µl 2x Plain PP Master Mixu (Top-Bio) a 0,4 µl ředěné DNA. Amplifikace probíhala v termocycleru Biometra T3000. Reakční podmínky pro jednotlivé primery jsou shrnuty v Tabulce 4.

Tab. 4: Podmínky PCR

Primer	OW1		OW4 a 840		14	
Denaturace	94°C	3 min	94°C	3 min	94°C	3 min
5 cyklů s touchdown protokolem (snížení teploty annealingu o 1°C v každém cyklu)	94°C	1 min	94°C	1 min	94°C	1 min
	57°C	1 min	61°C	1 min	67°C	1 min
	72°C	2 min	72°C	2 min	72°C	2 min
32 cyklů	94°C	1 min	94°C	1 min	94°C	1 min
	52°C	1 min	56°C	1 min	62°C	1 min
	72°C	2 min	72°C	2 min	72°C	2 min
Závěrečná elongace	72°C	10 min	72°C	10 min	72°C	10 min

Následně jsem získané PCR produkty připravila na fragmentační analýzu. PCR produkty jsem smíchala do směsi po dvou vždy 1 µl od každého primeru. Protože primery OW1 a 840 byly značeny stejnou fluorescencí barvou (VIC), směsi tvořily primery OW1 se 14 a OW4 s 840. Z těchto směsí PCR produktů jsem vytvořila jednotlivé vzorky pro fragmentační analýzu. Každý vzorek obsahoval 0,5 µl velikostního standardu (*Size standard*, 1200-LIZ), 10 µl deionizovaného formamidu (tzv. Hi-Di formamid) a 0,5 µl směsi PCR produktů. Vzorky byly analyzovány v Sekvenačním centru BC AV ČR a Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, kde byla provedena fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems.

2.4.3 Hodnocení dat a statistické zpracování

Výsledky fragmentační analýzy jsem hodnotila v programu GeneMarker 2.7 (SoftGenetics, Inc.). Do tabulky jsem zaznamenávala přítomnost fragmentů, které měly intenzitu fluorescence vyšší než 500 RFU (*Relative Fluorescent Units*). U 10% vzorků jsem provedla dva nezávislé běhy PCR a fragmentační analýzy. Jejich výsledky jsem vyhodnocovala nezávisle na sobě. Fragmenty, které jsem nehodnotila u dvojic vzorků stejně, jsem z dat vyloučila u všech vzorků. Spočítala jsem podíl nestejně hodnocených fragmentů (*error rate*). Z dat jsem poté vyloučila všechny fragmenty, které se vyskytovaly s frekvencí menší nebo rovnou *error rate*.

Ze získané binární matice jsem následně v programu FAMD (Schlüter & Hartus 2006) pomocí spočetla matici genetických vzdáleností (koeficient Jaccard). Tu jsem použila pro analýzu hlavních koordinát (PCoA, *principal coordinate analysis*) v programovém balíku Canoco for Windows (ter Braak & Šmilauer 2002).

Vztah jednotlivých jedinců jsem rovněž analyzovala pomocí metody *neighbour network* v programu SplitsTree 4.1 (Huson & Bryant 2006).

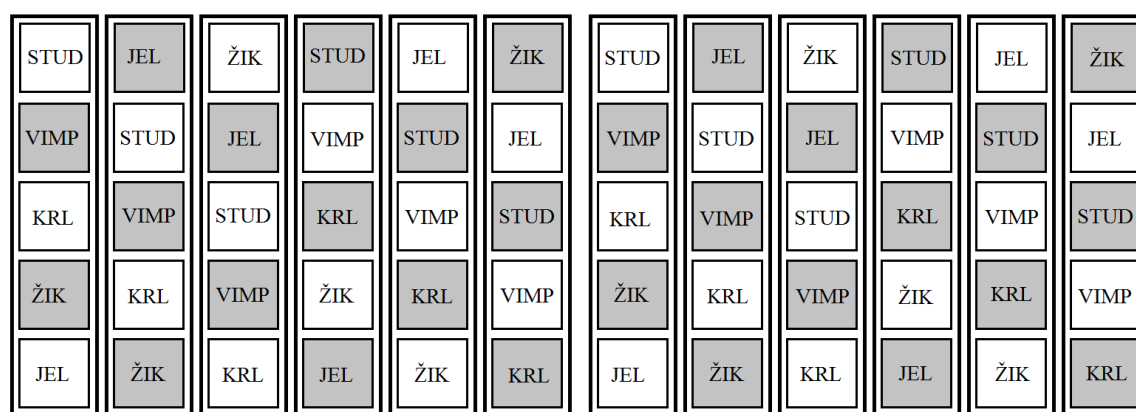
Následně jsem použila model-based shlukovací metodu ke zjištění nejpravděpodobnější struktury populací a počtu skupin v datech (K). Data jsem analyzovala v programu Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003). Tento program využívá Markov chain Monte Carlo (MCMC) algoritmus ke shlukování jedinců do populací. Použila jsem *admixture model* (pro každou analýzu 200 000 generací, 20 000 generací *burn-in*, pro každé testované K počítáno pětkrát).

Nejprve jsem testovala pouze *E. stricta*, *E. nemorosa* a intermediární populace, protože od ostatních druhů je méně populací. Poté jsem zvlášť testovala agregáty *E. stricta* agg. a *E. nemorosa* agg. Pro každou z těchto analýz byla testována K = 1 až K = 12.

2.5 Kultivační pokus

Kultivační pokus jsem založila za účelem zjištění závislosti morfologické variability obou studovaných druhů světlíků na hostiteli. Na podzim roku 2008 jsem sebrala semena z 5 lokalit: Studánky (*E. stricta*), Žikov (*E. stricta*), Vimperk (*E. nemorosa*), Jelení

(*E. nemorosa*) a Kralovické louky (morfologicky přechodný typ). Semena jsem nechala naklíčit na vlhkém filtračním papíru 4 týdny ve tmě při 6°C. Poté jsem nechávala semena jeden den při pokojové teplotě a jeden den v chladu. Po 14 dnech semena začala klíčit, a tak jsem je vysela do připravených květináčů se substrátem (rašelina smíchaná s pískem v poměru 2:1) a naklíčenými hostiteli. Jako hostitele jsem vybrala hrách (*Pisum*), jako zástupce dvouděložných rostlin, a pšenici (*Triticum*), jako zástupce jednoděložných rostlin. Hostitele jsem vysela přímo do květináčů v době, kdy jsem začala střídat teploty u semen světlíků. Od každé lokality a hostitele jsem udělala 6 opakování. Uspořádání pokusu v klimaboxu je znázorněno na Obrázku 6.



Obr. 6: Uspořádání kultivačního pokusu v klimaboxu. Hostitelé jsou označeni barvou pole: *Triticum* bíle, *Pisum* šedivě; lokality zkratkou: STUD = Studánky, VIMP = Vimperk, KRL = Kralovické louky, ŽIK = Žikov, JEL = Jelení.

Když měly rostliny dva květy, odebrala jsem je na morfometrickou analýzu. Květ, list, první a pátý listen jsem nalepila pomocí průhledné lepící pásky na papír. Zároveň jsem změřila výšku rostliny, výšku květenství (vyska2), průměr lodyhy a spočítala jsem počet nodů k prvnímu květu. Na květu, listu a listenech jsem měřila stejné znaky jako na populacích z přírody (viz kapitola 3.3.2). Protože některé statistické metody vyžadují normální rozdělení dat, musela jsem některé znaky logaritmicky transformovat. Byly to tyto znaky: CL, CTL, UCL, BD5, BT3L5, BT3O5, BL10, BD10, BT3W10, BTLL10, BTLO10. Pro PCA a shlukovou analýzu byla data standardizována.

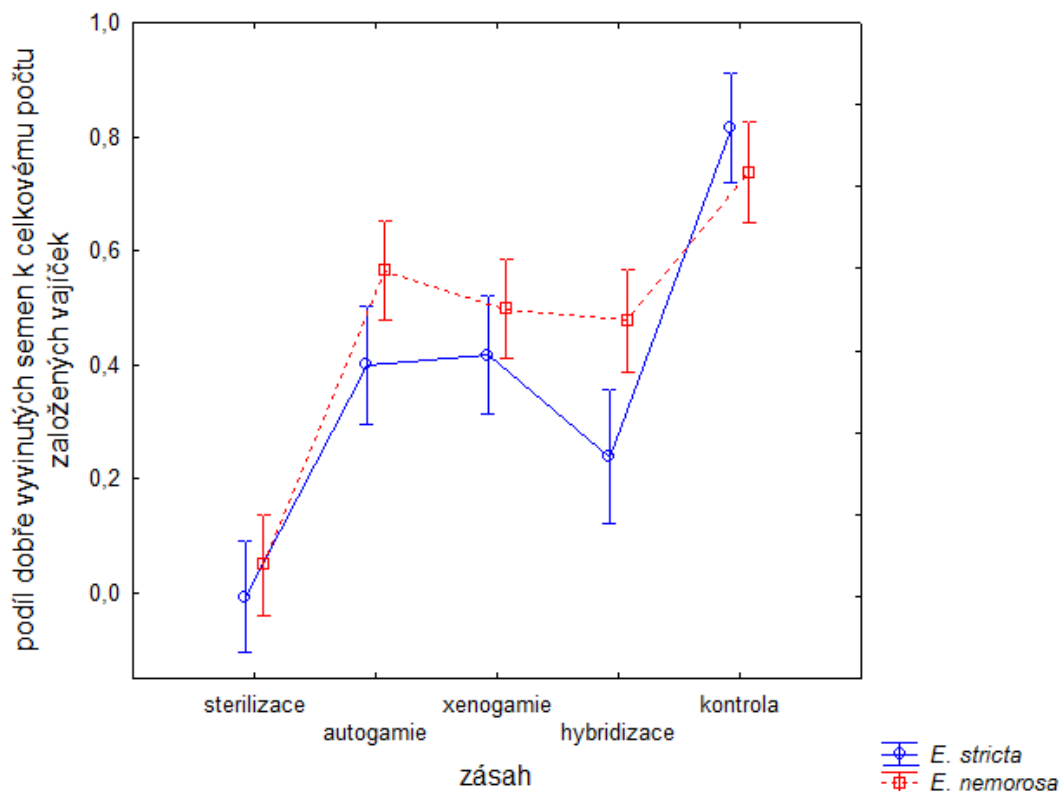
Získaná data jsem hodnotila pomocí PCA v programovém balíku Canoco for Windows (ter Braak & Šmilauer 2002). Pro zjištění, které znaky jsou hostitelem nejvíce ovlivněny, jsem využila diskriminační analýzu. Kanonickou diskriminační analýzu jsem provedla v programu Canoco for Windows, klasifikační diskriminační analýzu pak v programu Statistica 9. Jako klasifikační znak jsem použila kód druhu hostitele.

3. Výsledky

3.1 Opylovací pokus

Celkem jsem našla 284 z 350 založených květů, neboť některé rostliny byly ukousnuté, byl poškozen monofilový sáček nebo se do něj dostal hmyz. V analýze ANOVA vyšel jako průkazný pouze rozdíl mezi zásahy ($Df = 4, 272; F = 74,68; p < 0,001$). Rozdíl mezi druhy byl neprůkazný ($Df = 1, 2; F = 1,05; p = 0,412$), interakce druhu a zásahu je průkazná na 5% hladině významnosti ($Df = 4, 272; F = 3,36; p = 0,011$) a efekt lokality byl průkazný ($Df = 2, 272; F = 6,64; p = 0,002$). Grafické znázornění výsledků prezentuje netransformovaná data (Obr. 7).

Vzhledem k povaze dat jsem je vyhodnotila také pomocí GLMM (*generalized linear mixed models*) s binomickým rozdělením. Výsledky jsou obdobné jako v případě analýzy ANOVA: efekt druhu je nesignifikantní ($Df = 1; \chi^2 = 1,49; p = 0,222$), zásah pak signifikantní ($Df = 4; \chi^2 = 1374,8; p < 0,001$). Interakce druh \times zásah je taktéž průkazná ($Df = 5; \chi^2 = 98,61; p < 0,001$).



Obr 7: Rozdíly v úspěšnosti produkce semen mezi zásahy u druhů *E. stricta* a *E. nemorosa*.

Následně jsem spočetla stejnou ANOVu pouze pro zásahy autogamie, xenogamie a hybridizace, jejichž porovnání mezi oběma druhy mě nejvíce zajímalo. Vliv druhu byl opět neprůkazný ($Df = 1, 2; F = 1,55; p = 0,338$), vliv zásahu ($Df = 2, 157; F = 2,89; p = 0,0586$) ani interakce druh \times zásah ($Df = 2, 157; F = 0,79; p = 0,457$) nevyšel průkazně.

Vysetá semena nevzešla ani na jedné z obou lokalit, proto jsem nemohla provést morfologické ani genetické porovnání rodičovských a hybridních rostlin.

3.2 Morfometrická analýza

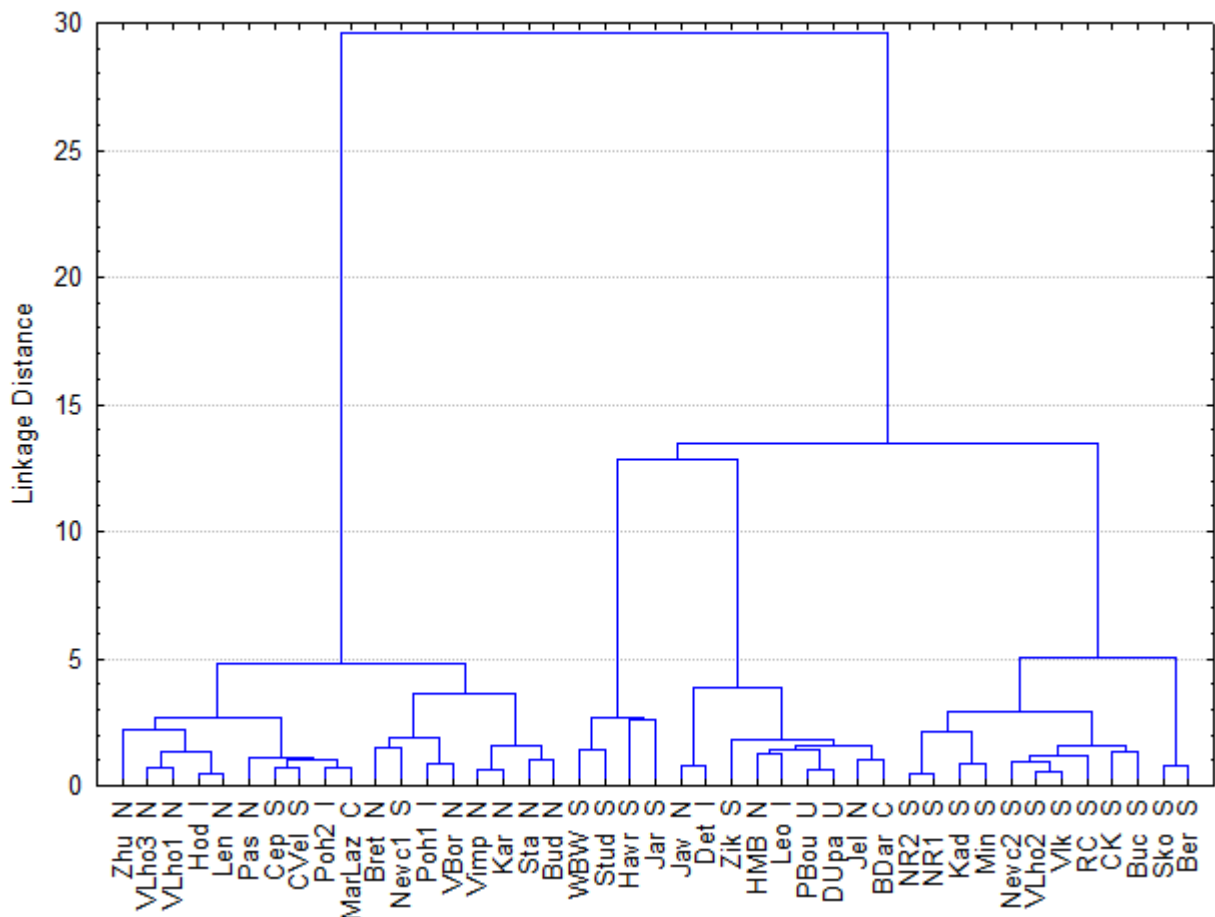
3.2.1 Klasická morfometrie

Nejprve jsem spočítala základní popisné charakteristiky každého znaku (aritmetický průměr, směrodatná odchylka) pro jednotlivé populace. Otestovala jsem normalitu rozdělení pro jednotlivé znaky (Shapiro-Wilk test). Většina znaků se od normálního rozdělení odchylovala, proto jsem nejvíce odchylné znaky logaritmicky transformovala. Spočetla jsem korelace mezi jednotlivými znaky. Protože většina dat neodpovídala normálnímu rozdělení, použila jsem neparametrické (Spearmanovy) korelační koeficienty (Příloha 2). Znaky nejvíce korelované ($r \geq 0,5$) jsou zvláště. Přestože nebyla zjištěna extrémně silná korelace ($r \geq 0,95$), vyřadila jsem z dalších analýz znak diagonála na spodním pysku květu (LCD), protože byla silně korelována s několika dalšími znaky na květu (CL, CH, CLU, CLL a CLW2).

Provedla jsem analýzu hlavních komponent (PCA, *principal component analysis*) pro každou populaci zvlášť. Atypičtí jedinci (*outliers*), které jsem vyloučila pro výpočet průměrných hodnot pro jednotlivé populace (Marhold & Suda 2002), byli následující (označení populace/číslo rostliny; označení populací viz Příloha 1): BDar/3, Bret/6, Buc/7, Bud/14, Havr/2, Kad/18, Kad/19, Leo/11, Min/4, Nevc2/14, PBou/13, Sko/9, VLho2/19, Vlk/12.

3.2.1.1 Shluková analýza

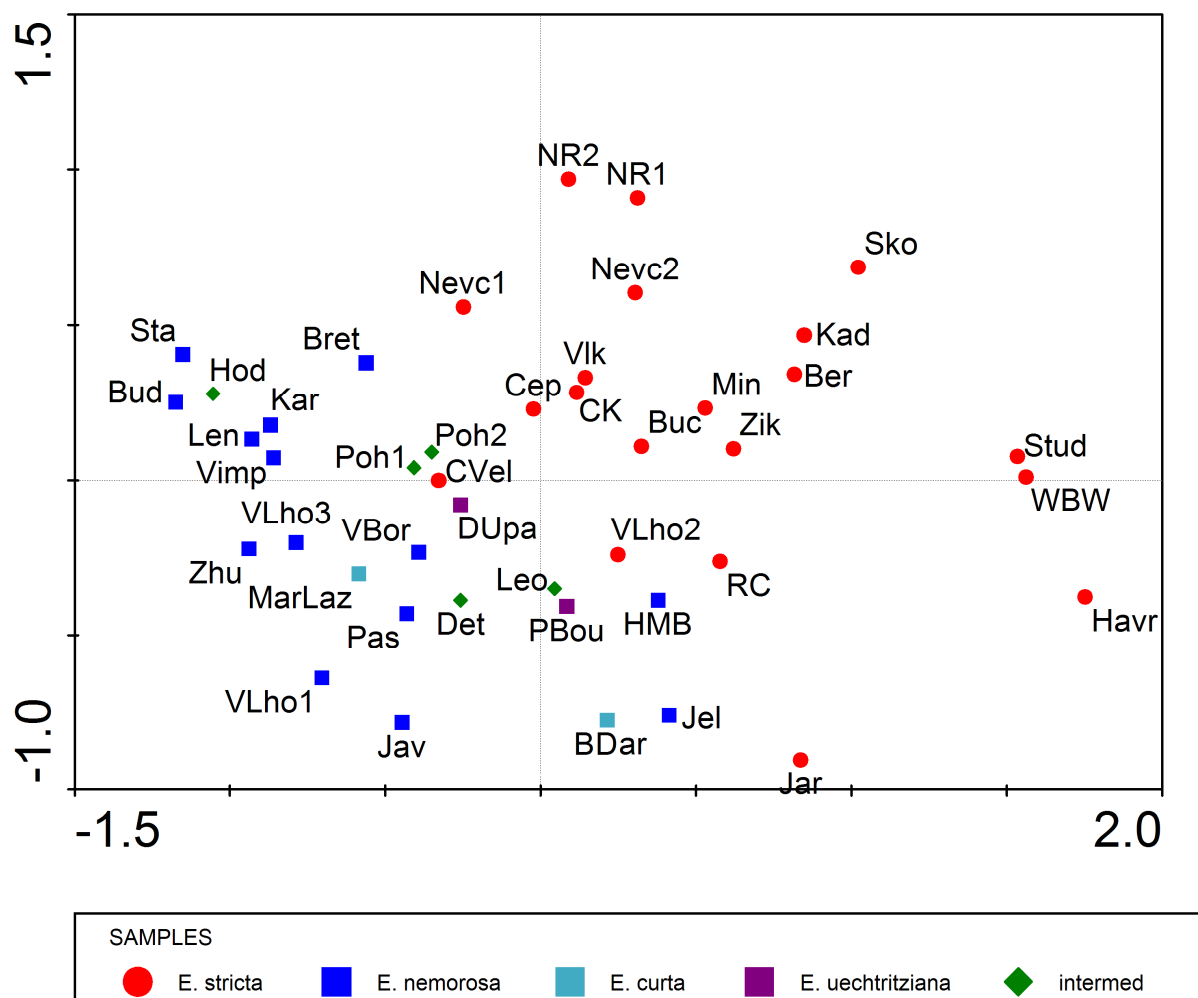
Výsledky shlukové analýzy Wardovou metodou jsou uvedeny v Obr. 8. Provedla jsem rovněž shlukovou analýzu metodou průměrné vzdálenosti, jejíž výsledky byly obdobné. Shluková analýza rozděluje studované populace na dvě skupiny, které jsou víceméně tvořeny druhy *E. stricta* a *E. nemorosa*. Ve skupině s převahou populací *E. nemorosa* jsou dvě skupiny rozlišené na velmi nízké úrovni. Tři populace *E. stricta* se míchají s populacemi *E. nemorosa*. Skupina s převažující *E. stricta* je tvořena třemi podskupinami, z nichž dvě tvoří pouze populace *E. stricta*. Třetí z nich je tvořena oběma populacemi *E. uechtriziana*, jednou populací *E. curta* a *E. stricta* a třemi populacemi *E. nemorosa*. Morfologicky intermediární populace jsou rozděleny mezi obě hlavní skupiny. Populace *E. curta* jsou v dendrogramu umístěny v jiných skupinách.



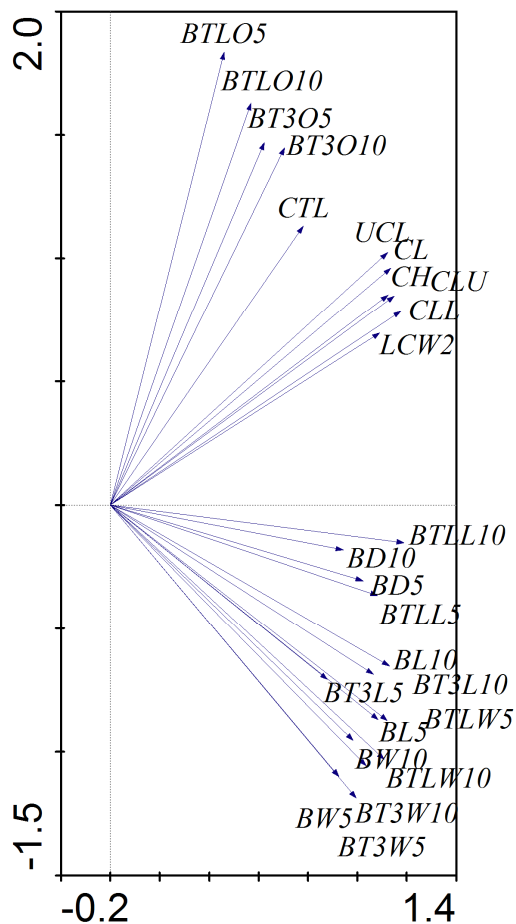
Obr. 8: Shluková analýza populací (Wardova metoda, Euklidovská vzdálenost). Za označením populace je uvedeno zařazení k jednotlivým druhům (N – *E. nemorosa*, S – *E. stricta*, C – *E. curta*, U – *E. uechtriziana*, I – morfologicky přechodné populace).

3.2.1.2 Analýza hlavních komponent

Analýzu hlavních komponent (PCA) jsem provedla nejprve na hodnotách populačních průměrů pro jednotlivé znaky. Výsledky (Obr. 9a a Obr. 9b) ukazují poměrně zřetelné oddělení populací *E. stricta* a *E. nemorosa*. Druhy *E. curta* a *E. uechtriziana*, stejně jako morfologicky přehodné populace se vyskytují v ordinačním prostoru mezi populacemi *E. nemorosa*. Znaky, které jsou nejvíce korelovány s gradientem mezi druhy *E. stricta* a *E. nemorosa*, jsou znaky na květech a délka osinek na listenech.

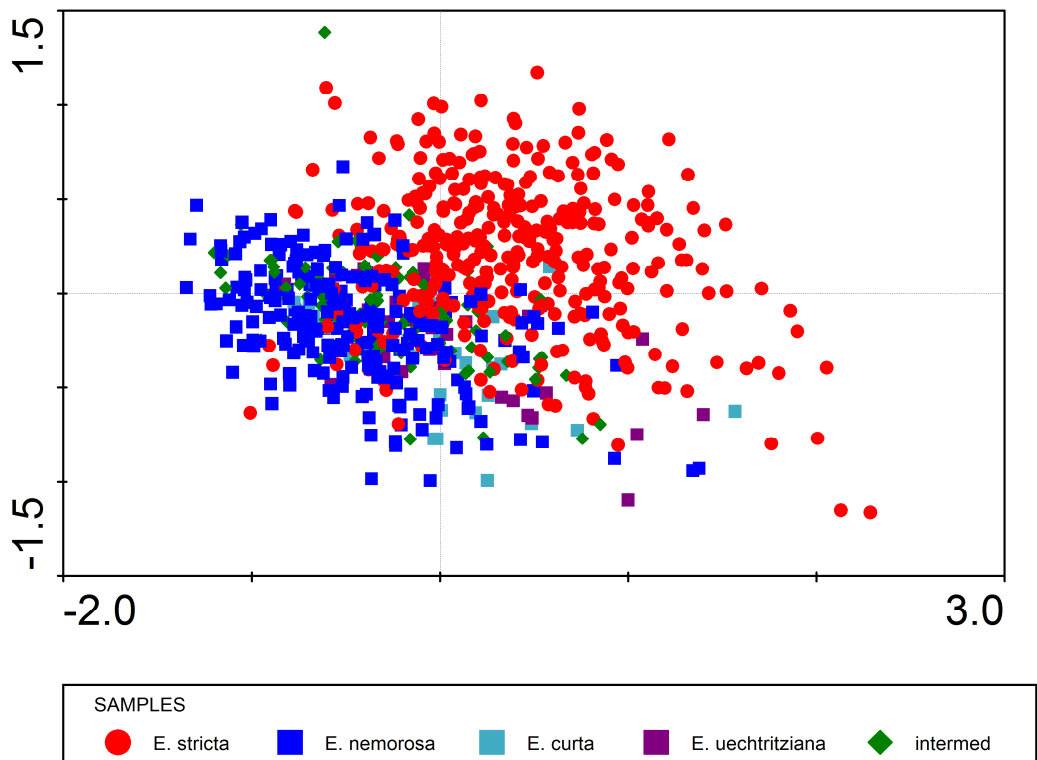


Obr. 9a: PCA ordinační diagram jednotlivých populací. První ordinační osa vysvětluje 52,9% a druhá 19,5% variability. První dvě osy vysvětlují 72,4% variability.

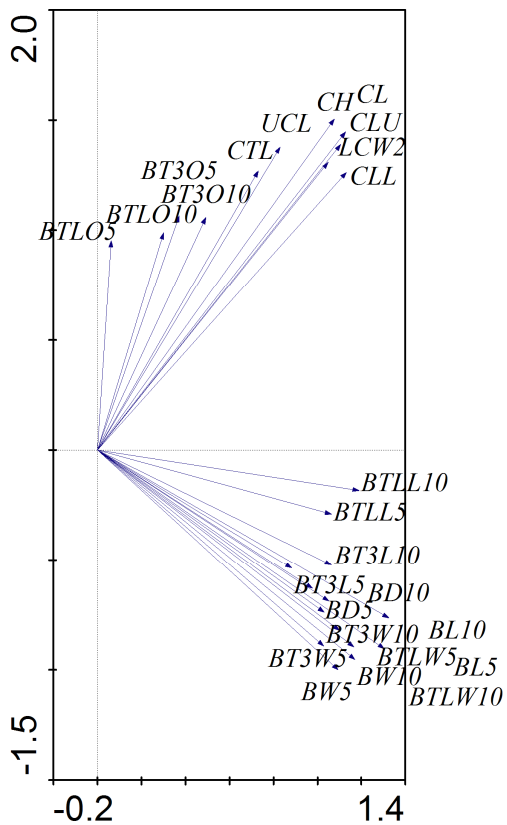


Obr. 9b: Promítnutí 25 znaků do PCA prostoru.

Následně jsem provedla PCA jednotlivých rostlin. Z ordinačního diagramu (Obr. 10a a 10b) je zřetelný morfologický gradient mezi *E. stricta* a *E. nemorosa*. Jedinci *E. stricta*, kteří zasahují do prostoru *E. nemorosa*, pocházejí především z populací CVel, Jar a Cep, jejichž populační průměry jsou nejbližší variabilitě *E. nemorosa*. Znaky, které nejvíce odlišují druhy *E. stricta* a *E. nemorosa*, jsou opět znaky na květech a délka osinek na listenech. *E. curta* se promítá do části ordinačního prostoru, kam se promítá *E. nemorosa*, *E. uechritziana* je pak zejména na přechodu *E. stricta* a *E. nemorosa*.



Obr. 10a: PCA ordinační diagram jednotlivých rostlin. První ordinační osa vysvětluje 40,8% a druhá 15,5% variability. První dvě osy vysvětlují 56,3% variability.

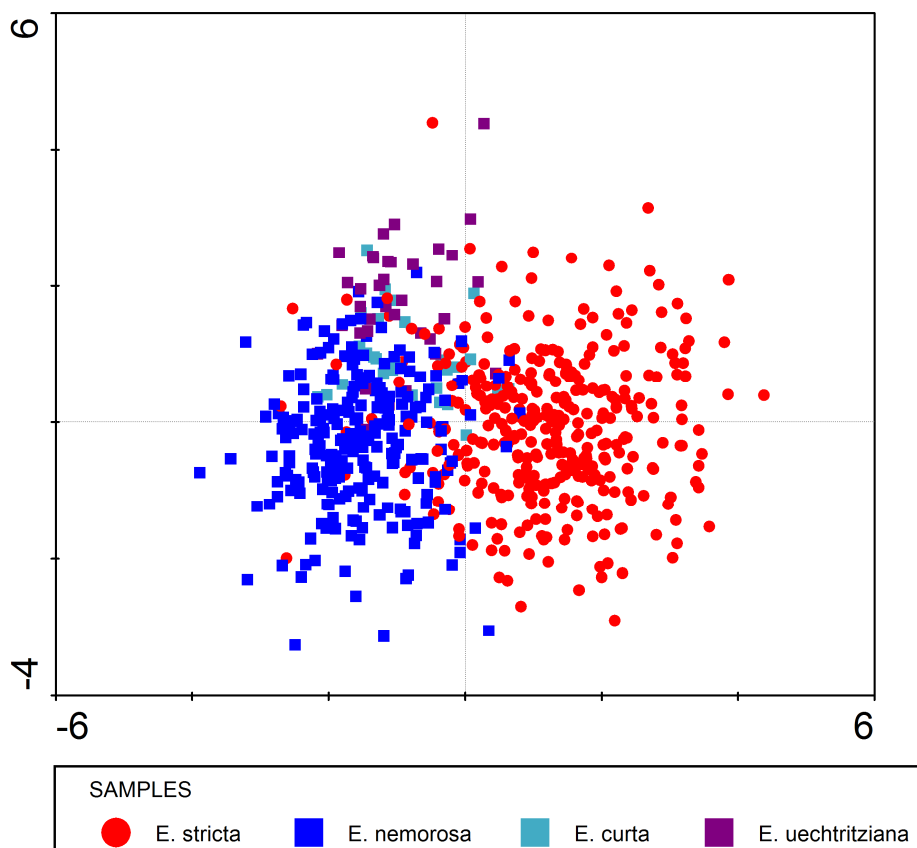


Obr. 10b: Promítnutí 25 znaků do PCA prostoru.

3.2.1.3 Kanonická diskriminační analýza

Pro kanonickou diskriminační analýzu (CDA) jsem použila rozdělení populací na základě určení v terénu či z položek (viz kapitola 2.1). Morfologicky přechodné populace (Det, Leo, Poh1, Poh2 a Hod) jsem z této analýzy vyřadila.

Diskriminační analýzou jsem testovala možnost, zda lze od sebe odlišit rostliny určené jako *E. stricta*, *E. nemorosa*, *E. curta* a *E. uechtriziana* a na základě jakých znaků. Vzhledem k tomu, že žádná dvojice studovaných znaků nebyla silně korelována (ve všech případech $|r| < 0,9$), zařadila jsem do analýzy všech 25 znaků. Na Obrázku 11 je výsledek analýzy jedinců. Použity jsou znaky, které byly vybrány při postupném výběru (*forward selection*) v krokové diskriminační analýze jako znaky, které průkazně přispívají k odlišení studovaných druhů. Podle první osy se od sebe oddělují *E. stricta* a *E. nemorosa*, a to především na základě délky osinky na koncovém zubu desátého listenu. Podél druhé osy se pak odděluje *E. curta* od *E. nemorosa* na základě šířky pátého listenu. V Tabulce 5 jsou uvedeny koeficienty diskriminační analýzy.



Obr. 11: CDA jedinců.

Tab. 5: Faktorové strukturní koeficienty a standardizované koeficienty diskriminační funkce.

Znaky, které nejvíce přispívají k oddělení druhů jsou zvýrazněné.

Znak	Faktorové strukturní koef.			Standardizované strukt. koef.		
	Root 1	Root 2	Root 3	Root 1	Root 2	Root 3
CLL	-0,659143	0,290923	-0,144193	-0,359504	0,355738	-0,438721
CL	-0,667045	-0,077544	-0,156946	-0,428460	-0,549567	-0,190822
BT3O5	-0,351793	-0,064579	-0,090897	-0,343868	-0,148950	0,139935
BL10	-0,381499	0,395660	0,163984	-0,873020	0,452215	1,267009
BW5	-0,103825	0,395775	-0,206494	0,287370	0,347241	-0,999381
CH	-0,616120	-0,019265	0,058314	-0,415734	-0,439091	0,287786
LCW2	-0,486688	0,265945	0,091313	0,207060	0,386963	0,425234
BTLL5	-0,258716	-0,088599	0,116223	-0,133028	-0,673449	-0,166945
BTLO10	-0,303657	-0,025647	-0,298460	-0,058200	0,048294	-0,399327
BL5	-0,250340	0,386536	0,036009	0,596840	0,626835	0,381788
BD5	-0,250784	0,229344	-0,123888	-0,181509	-0,229041	-0,286913
BW10	-0,217693	0,347431	-0,091843	-0,070033	-0,702364	-0,649053
BTLO5	-0,299327	-0,099896	-0,238511	-0,165235	-0,088745	-0,217558
CTL	-0,315283	-0,210031	-0,174397	0,252625	-0,016869	-0,245866
BTLW5	-0,121465	0,253886	0,124202	0,031253	0,192266	0,427121
CLU	-0,568391	0,277821	-0,066038	0,102460	0,445528	-0,169603
BT3W5	-0,134240	0,379361	0,040429	-0,049891	0,326727	-0,163947
BTLW10	-0,185753	0,231658	0,194257	0,191443	-0,088874	0,234979
BT3O10	-0,373802	0,158267	-0,084351	-0,067392	0,267663	0,018989
BTLL10	-0,386115	0,026573	0,253022	-0,100919	-0,344056	-0,008378
BT3L10	-0,261052	0,287539	0,054075	0,051028	0,371315	-0,078974
BD10	-0,255027	0,205685	-0,058703	0,037904	-0,043445	-0,326357
UCL	-0,450229	-0,087700	0,096972	-0,038452	-0,072521	0,290025
BT3L5	-0,135659	0,085081	0,024945	0,023316	-0,157364	0,150493

3.2.1.4 Klasifikační diskriminační analýza

Klasifikační diskriminační analýza byla použita k sestavení klasifikační funkce pro každý druh. Koeficienty této funkce pro data bez morfologicky přechodných populací jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab 6: Koeficienty klasifikační funkce.

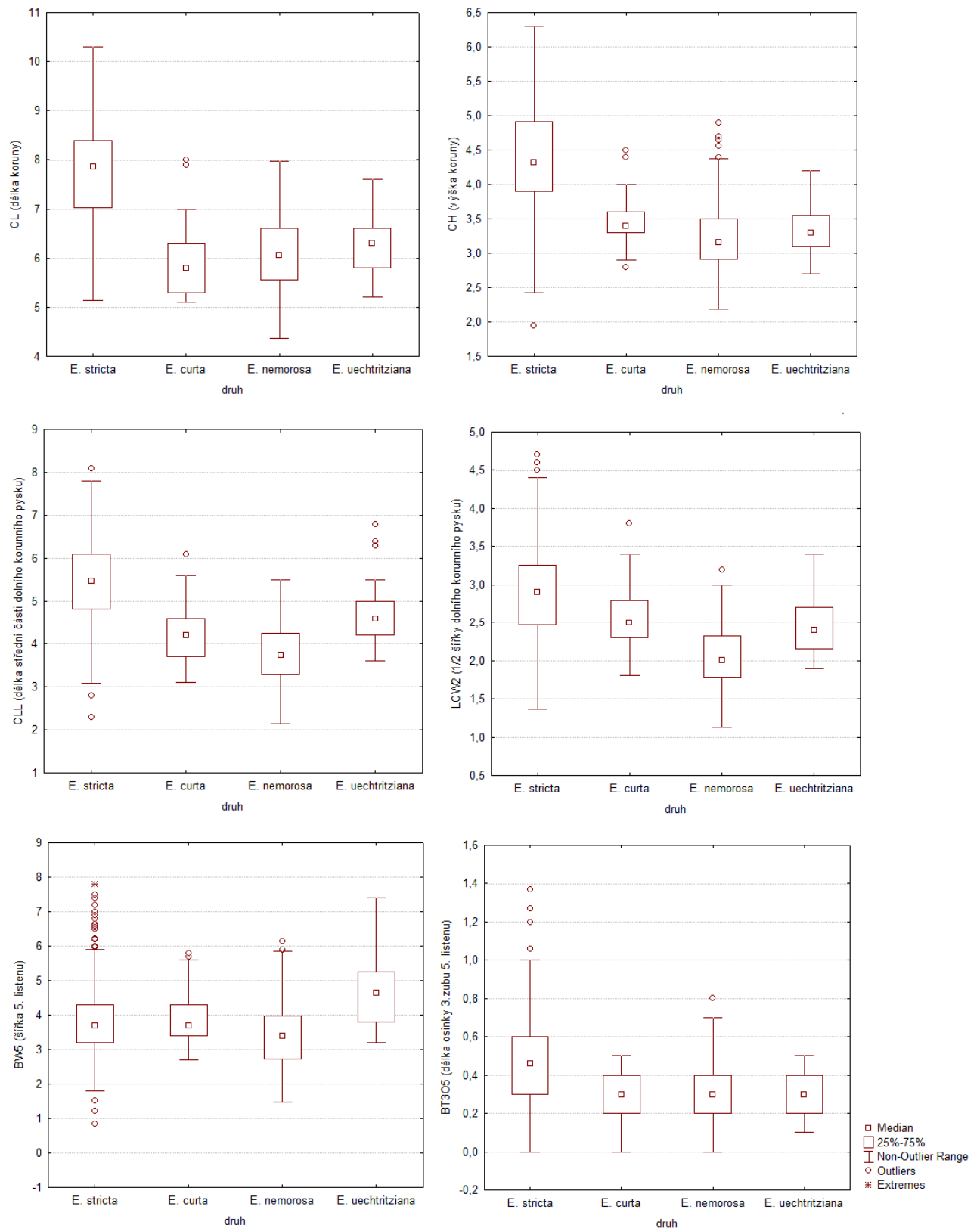
Znak	<i>E. stricta</i>	<i>E. curta</i>	<i>E. nemorosa</i>	<i>E. uechtriziana</i>
CLL	-22,884	-24,167	-24,185	-22,440
CL	1240,838	1194,564	1220,209	1203,436
BT305	106,071	92,536	90,207	84,064
BL10	972,569	988,649	934,347	932,404
BW5	9,106	8,461	9,785	11,589
CH	-21,666	-23,413	-23,233	-25,015
LCW2	12,843	16,360	13,644	14,126
BTLL5	13,614	8,365	13,194	9,351
BTLO10	-141,722	-158,719	-145,268	-132,364
BL5	-35,570	-33,181	-34,469	-33,948
BD5	210,499	188,065	203,429	201,982
BW10	-25,602	-27,996	-25,547	-26,268
BTLO5	26,711	20,406	23,862	24,786
CTL	-367,327	-365,726	-355,289	-352,791
BTLW5	25,859	30,330	25,906	25,531
CLU	-14,289	-13,038	-14,019	-11,728
BT3W5	6,682	7,030	5,814	9,175
BTLW10	-26,426	-23,325	-24,114	-26,475
BT3010	-4,537	-2,830	-6,075	-2,722
BTLL10	-168,045	-182,469	-170,971	-183,847
BT3L10	-26,499	-17,108	-26,218	-11,178
BD10	-236,517	-247,223	-234,252	-229,236
UCL	14,834	20,122	13,476	5,817
BT3L5	75,866	77,295	77,776	68,727
konstanta	-630,763	-598,101	-582,139	-579,674

Pomocí těchto funkcí jsem soubory studovaných rostlin zpětně klasifikovala (toto zařazení je označováno jako *posterior probabilities*). Výsledek pravděpodobnosti zařazení do skupin je uveden v Tabulce 7.

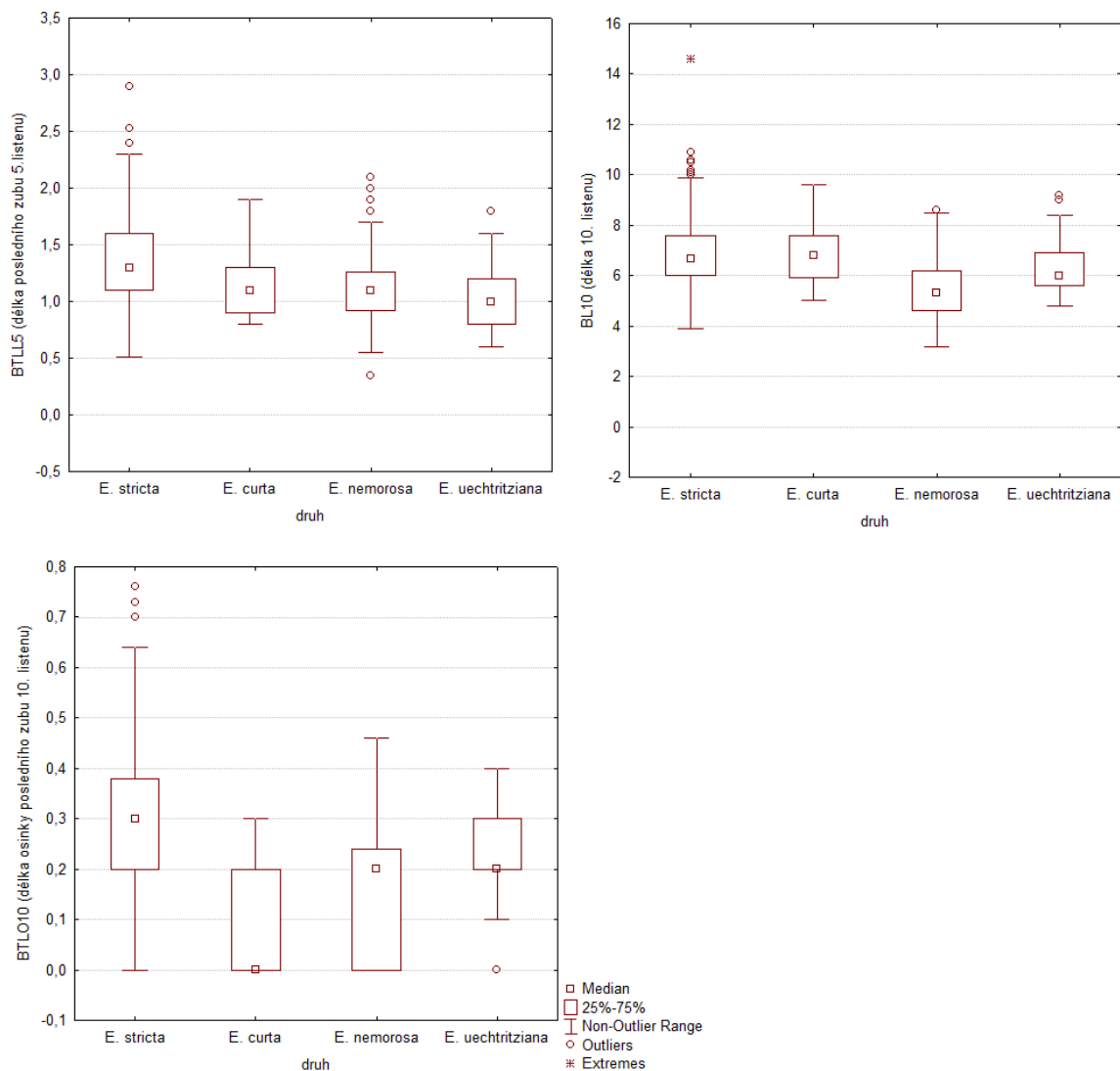
Tab. 7: Klasifikační matice jedinců (*posterior probabilities*).

Druh	% správných klasifikací	<i>E. stricta</i>	<i>E. curta</i>	<i>E. nemorosa</i>	<i>E. uechtriziana</i>
<i>E. stricta</i>	91,42857	320	2	24	4
<i>E. curta</i>	67,85714	2	19	7	0
<i>E. nemorosa</i>	90,41666	17	5	217	1
<i>E. uechtriziana</i>	72,97298	3	0	7	27
celkem	89,00764	342	26	255	32

Znaky, které podle výsledků kanonické diskriminační analýzy nejlépe oddělují druhy *E. stricta*, *E. nemorosa*, *E. curta* a *E. uechtriziana* od sebe, jsem zobrazila do grafů Box & Whiskers plot (Obr. 12a, b).



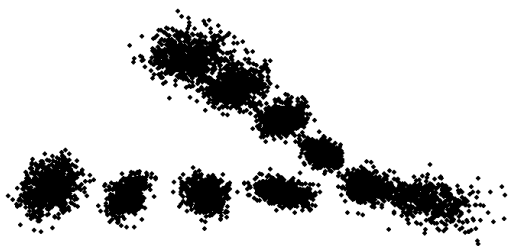
Obr. 12a: Hodnoty vybraných kvantitativních znaků u jednotlivých druhů.



Obr. 12b: Hodnoty vybraných kvantitativních znaků u jednotlivých druhů.

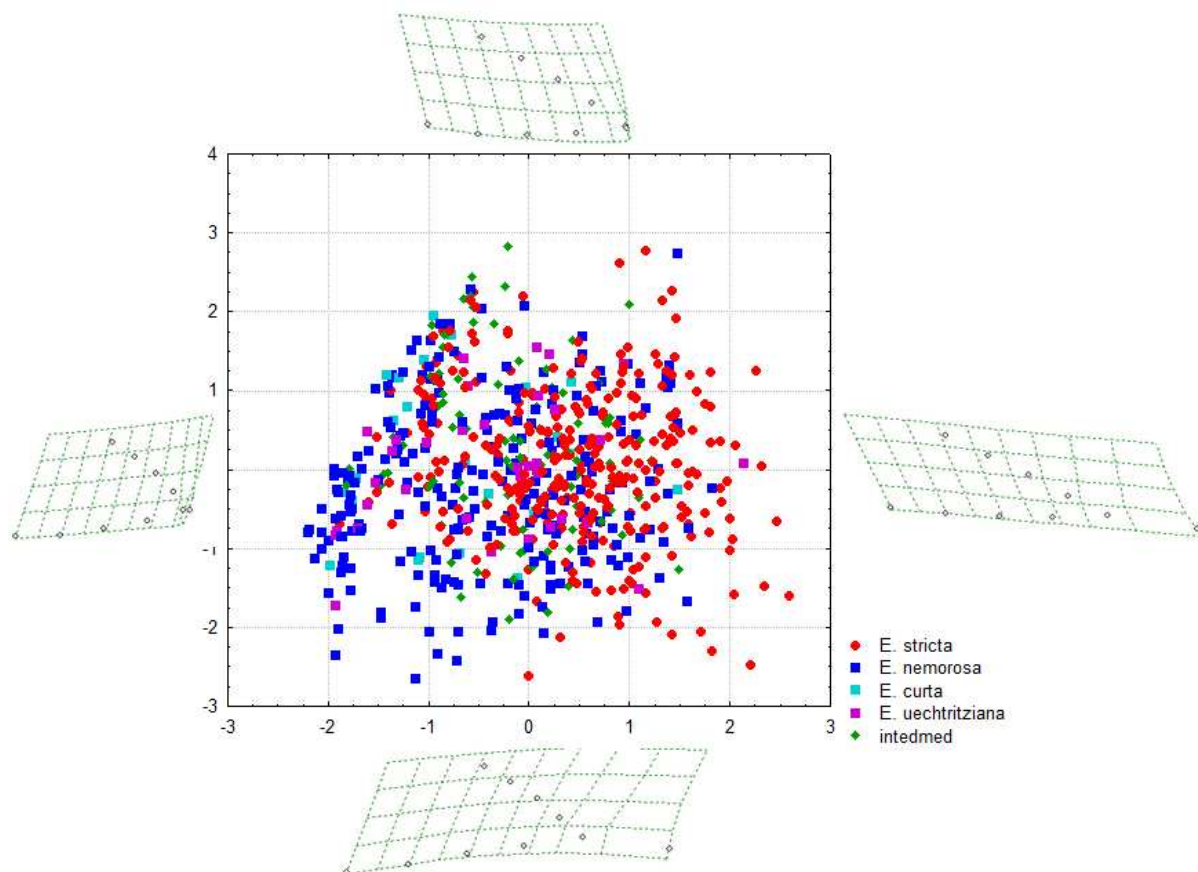
3.2.2 Geometrická morfometrie

Pomocí programu tpsRelw, ver. 1.45 (Rohlf 2007) jsem sestrojila diagram vyjadřující variabilitu jednotlivých landmarků a semilandmarků zaznamenávaných na nejširším zubu desátého listenu (Obr. 13).

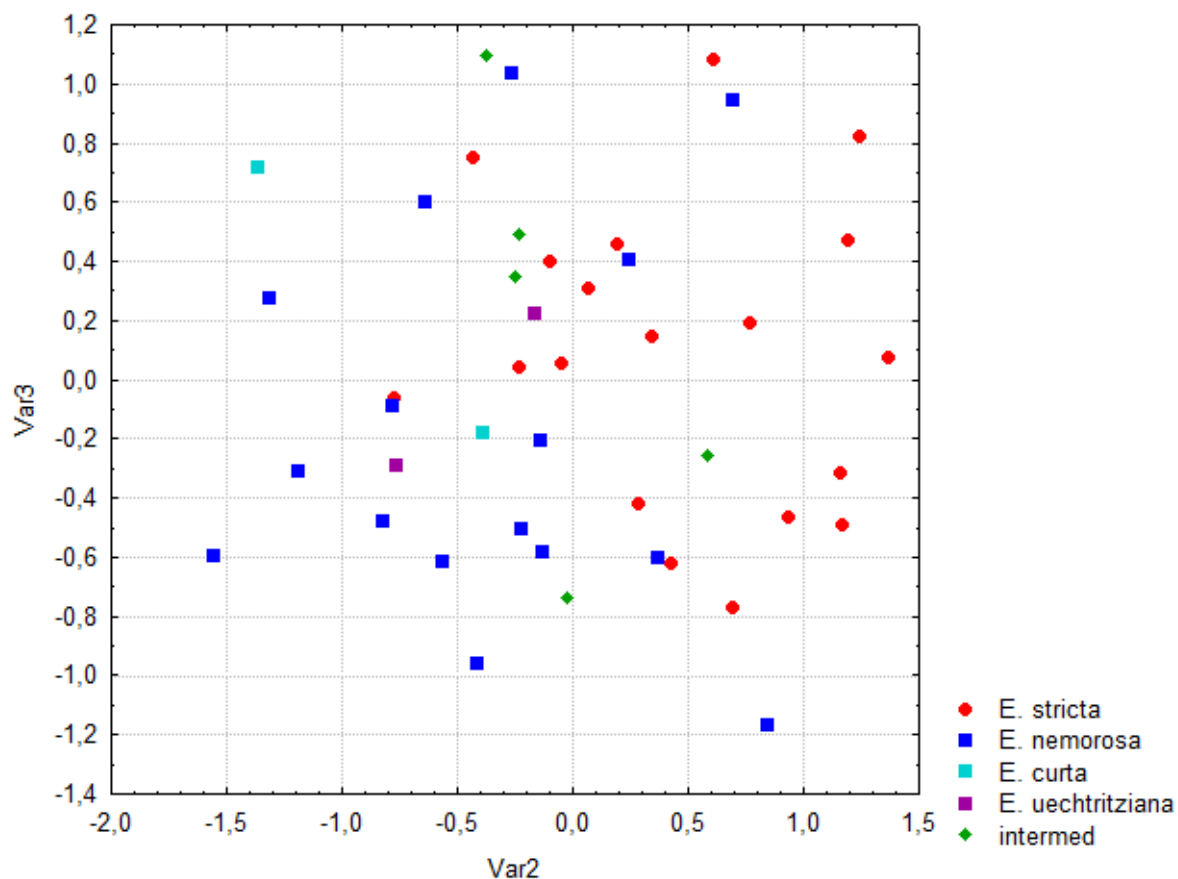


Obr. 13: Diagram zaznamenávaných bodů na nejširším zubu desátého listenu.

Na základě analýzy relativních deformací všech jedinců (RWA, *relative warps analysis*; Obr. 14 a Obr. 15) se ukazuje, že tvar nejširšího zubu desátého listenu se mezi studovanými druhy příliš neliší. Je zde však patrná tendence *E. nemorosa* tvořit zuby širší a s kratší osinkou než *E. stricta*. Obě populace *E. curta* jsou od sebe zřetelně odděleny. Lokalita MarLaz má zuby bez osinek, naproti tomu lokalita BDar osinky má.



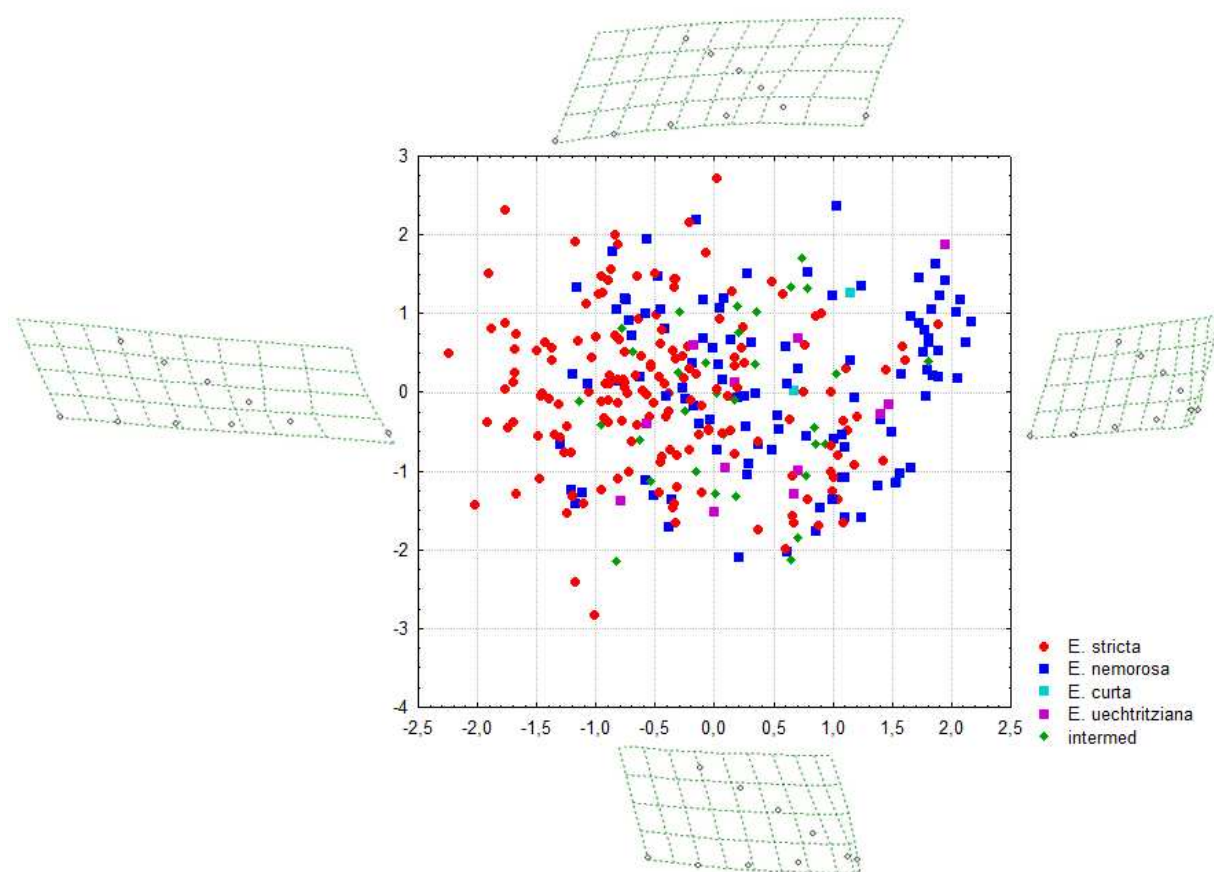
Obr. 14: RWA ordinační diagram nejširšího zubu desátého listenu všech jedinců. První osa vysvětluje 49,7% a druhá osa 27,2% variability. První dvě osy vysvětlují 76,9% variability.



Obr. 15: RWA ordinační diagram nejširšího zubu desátého listenu populačních průměrů.

Tvar zubů na listenu je však ovlivněn jejich počtem. Proto jsem analýzu provedla i na desátých listenech, které měly 4 zuby (Obr. 16). Tím jsem však ztratila velké množství jedinců a některé lokality (MarLaz, WBW) jsem vyřadila úplně, protože neměly požadovaný počet zubů. Rovněž se u několika lokalit (BDar, Jav, Bret, Havr) stalo, že byl do analýzy zařazen jen jeden nebo dva vzorky z dané populace.

Zde se ukazuje jasnější oddělení druhů *E. stricta* a *E. nemorosa*. Jedinci *E. stricta* mají spíše užší zuby s delšími osinkami. Do ordinačního prostoru *E. stricta* zasahuje nejvíce především populace Stašov, která měla poměrně dlouhé osinky.



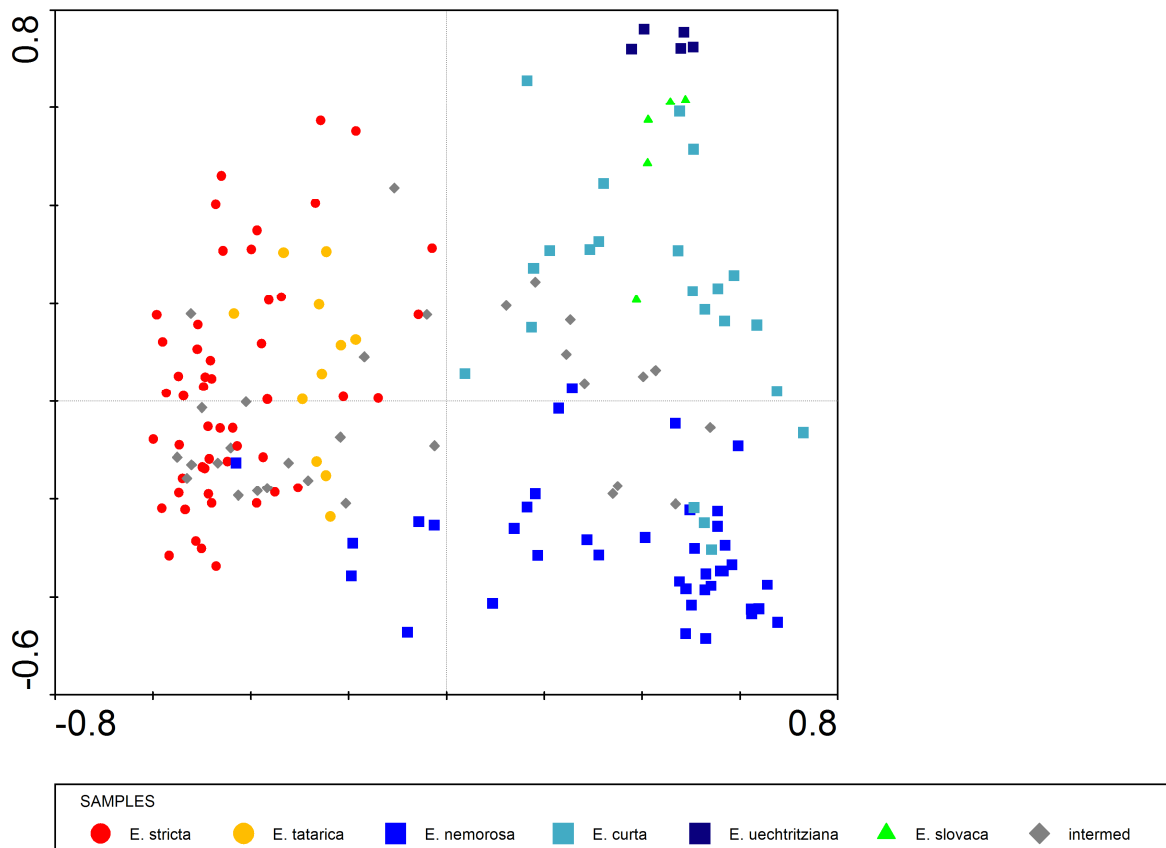
Obr. 16: RWA ordinační diagram nejširšího zubu desátého listenu se čtyřmi zuby. První osa vysvětluje 52,4% a druhá osa 25,8% variability. První dvě osy vysvětlují 78,2% variability.

3.3 ISSR

Celkem jsem našla 71 polymorfních lokusů (15 pro primer OW4 , 17 pro primer 840, 13 pro primer 14 a 26 pro primer OW1). *Error rate* byl 13,6%.

Pro srovnání mezidruhové a vnitrodruhové variability jsem spočetla matici genetických vzdáleností jednotlivých vzorků. Použila jsem Jaccardův koeficient podobnosti v programu FAMD. V analýze hlavních koordinát (PCoA) se poměrně dobře oddělují skupiny *E. stricta* agg. a *E. nemorosa* agg. podél první ordinační osy (Obr. 17). Lokalita *E. nemorosa*, která zasahuje do ordinačního prostoru *E. stricta* je Zátoň. *E. tatarica* netvoří samostatný shluk a je promíchaná s *E. stricta*. V rámci *E. nemorosa* agg. se mírně oddělují druhy *E. nemorosa* a *E. curta*, *E. slovaci* není oddělena od *E. curta*. Populace *E. uechtriziana* tvoří kompaktní shluk na okraji variability *E. nemorosa* agg.

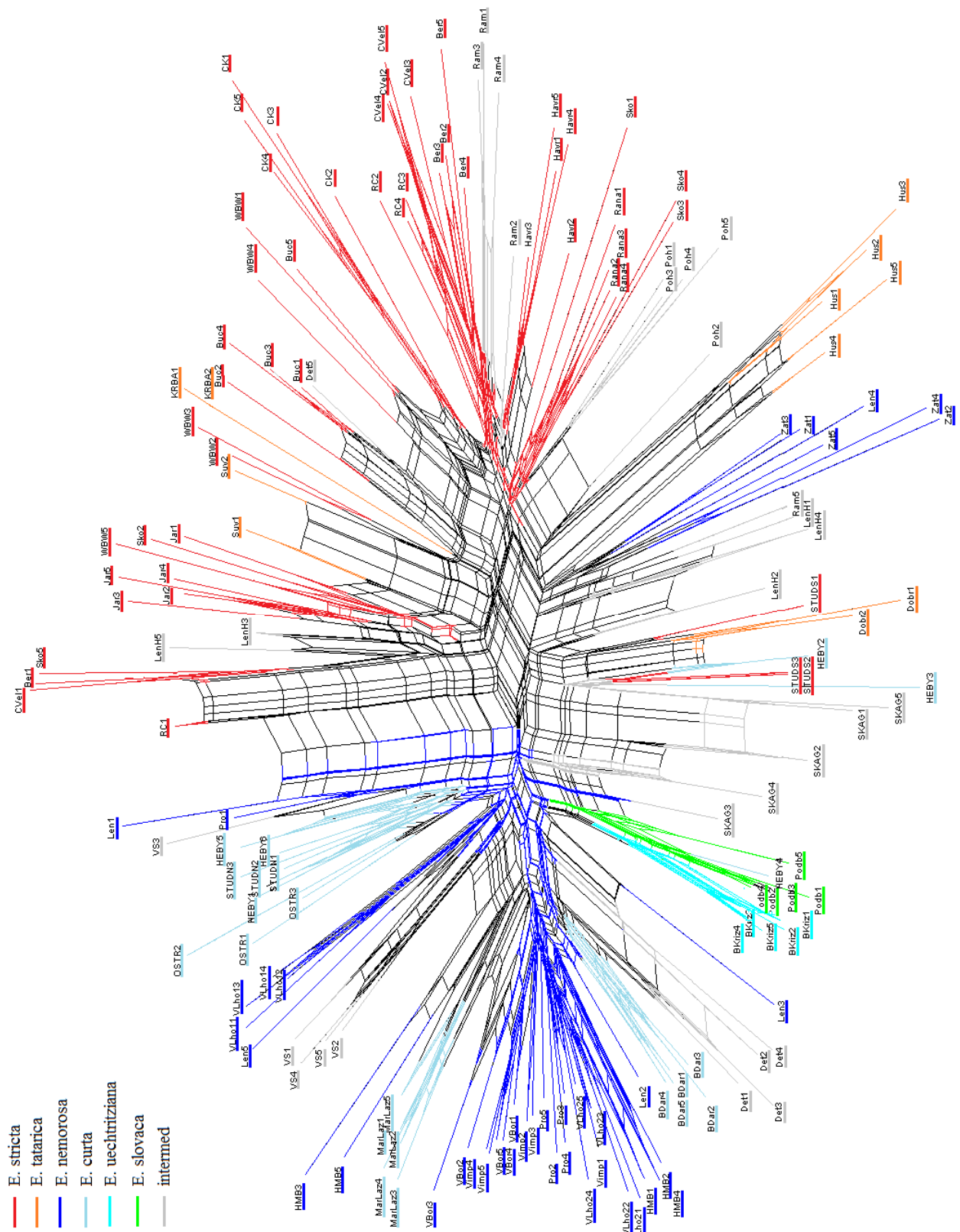
Z morfologicky intermediárních populací jsou tři z nich (Ram, Poh, LenH) molekulárně příbuzné *E. stricta*. Lokality VS a Det se řadí k *E. nemorosa*. Jeden jedinec z populace Det se však nachází mezi *E. stricta*. Lokalita SKAG je značně heterogenní, neboť její zástupci se vyskytují jak v ordinačním prostoru *E. stricta*, tak *E. nemorosa*.



Obr. 17: PCoA všech jedinců. První osa vysvětluje 18,5% variability, druhá osa vysvětluje 8,8% variability. První dvě osy vysvětlují 27,3% variability.

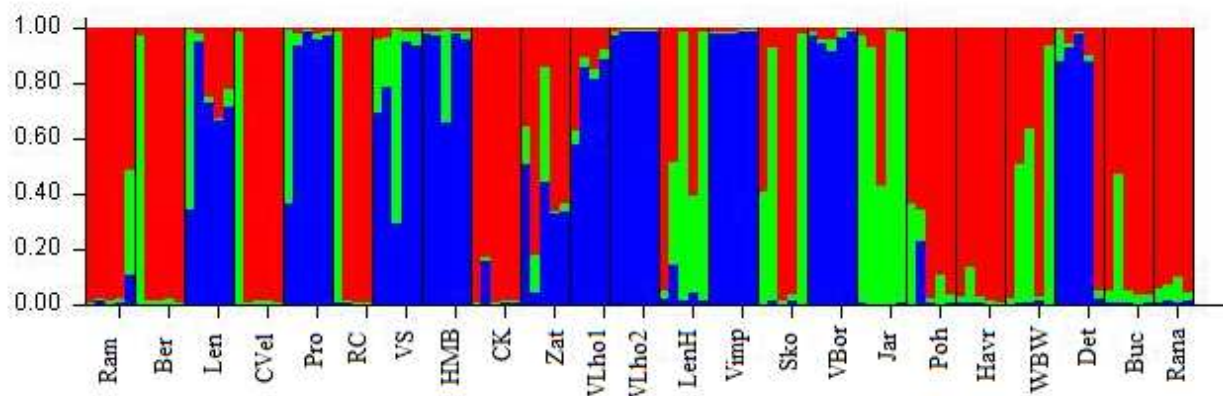
Analýza metodou neighbour network rovněž odděluje *E. stricta* agg. a *E. nemorosa* agg. (Obr. 18). Morfologicky intermediární populace jsou přiřazovány obdobně jako v PCoA. Lokality Ram a Poh k *E. stricta*, lokality VS a Det k *E. nemorosa*. Jeden jedinec populace Det je opět řazen mezi *E. stricta*. Populace LenH je rozdělena na dvě části, jedna je zařazena mezi *E. stricta*, druhá pak mezi populace, které jsou na přechodu *E. stricta* agg. a *E. nemorosa* agg. Lokalita SKAG, která v PCoA vycházel jednak mezi *E. stricta*, ale i mezi *E. curta*, se zde nachází na přechodu *E. stricta* agg. a *E. nemorosa* agg. Druhy *E. uechtriziana* a *E. slovaca* tvoří kompaktní a od ostatních populací poměrně oddělený

shluk. Z výsledků je rovněž patrné, že vnitropopulační rozdíly jsou obvykle menší než rozdíly mezi populacemi.



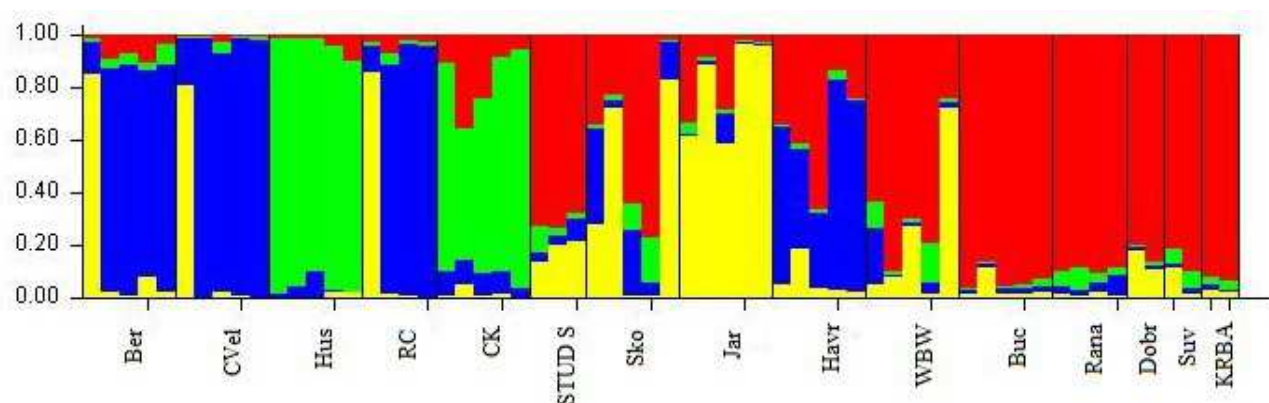
Obr. 18: Výsledek neighbour network analýzy.

Analýza *E. stricta* agg, *E. nemorosa* agg. a morfologicky intermediárních populací v programu Structure rozdělila populace na 3 skupiny (Obr. 19). Vedle *E. nemorosa* byly rozlišeny dvě skupiny *E. stricta*. Morfologicky intermediární populace jsou mezi oba druhy rozděleny v souladu s předchozími analýzami.



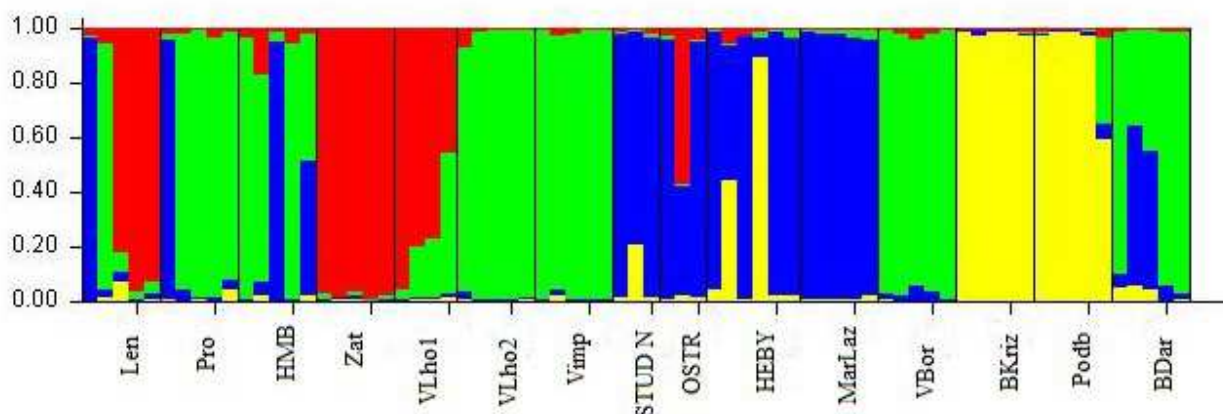
Obr. 19: Graf zařazení jedinců do navržených skupin (červeně a zeleně *E. stricta*, modře *E. nemorosa*)

Poté jsem analyzovala taxony *E. stricta* agg. Likelihood (ln) byl variabilní mezi různými běhy (K=1 až K=12), konzistentní vyšel pro pro K = 2 a K = 4 (Obr. 20), u kterého však byl ln mnohem vyšší. Z grafu je vidět, že jednu skupinu tvoří populace Ber, CVel a RC, druhou Hus a CK, třetí Jar a čtvrtou WBW, Buc, Rana, Dobr, Suv, KRBA a nejspíše by se k nim daly zařadit i STUD S a Sko, které však nejsou zařazeny jednoznačně. Populace Havr je geneticky mezi první a čtvrtou skupinou. Zároveň je zřejmé, že *E. tatarica* z lokality Hustopeče (Hus) je geneticky odlišná od populací *E. tatarica* z Balkánského poloostrova. Ta je však podobná některým lokalitám *E. stricta* (Buc a Rana).



Obr. 20: Graf zařazení jedinců z *E. stricta* agg. do navržených skupin.

E. nemorosa agg. je rozdělena rovněž na 4 skupiny (Obr. 21), pro které byl ln nejkonzistentnější. Jednu tvoří většina populací *E. curta* (švédské populace a Marlaz), další *E. slovaca* a *E. uechtriziana* (lokality Podb a BKriz) a vlastní *E. nemorosa* je rozdělena na dvě podskupiny. Ne všechny populace jsou však jednoznačně zařazeny (např. BDar, HMB nebo HEBY).



Obr. 21: Graf zařazení jedinců do navržených skupin (červená a zelená *E. nemorosa*, modrá *E. curta* a žlutá *E. uechtriziana* a *E. slovaca*).

3.4 Kultivační pokus

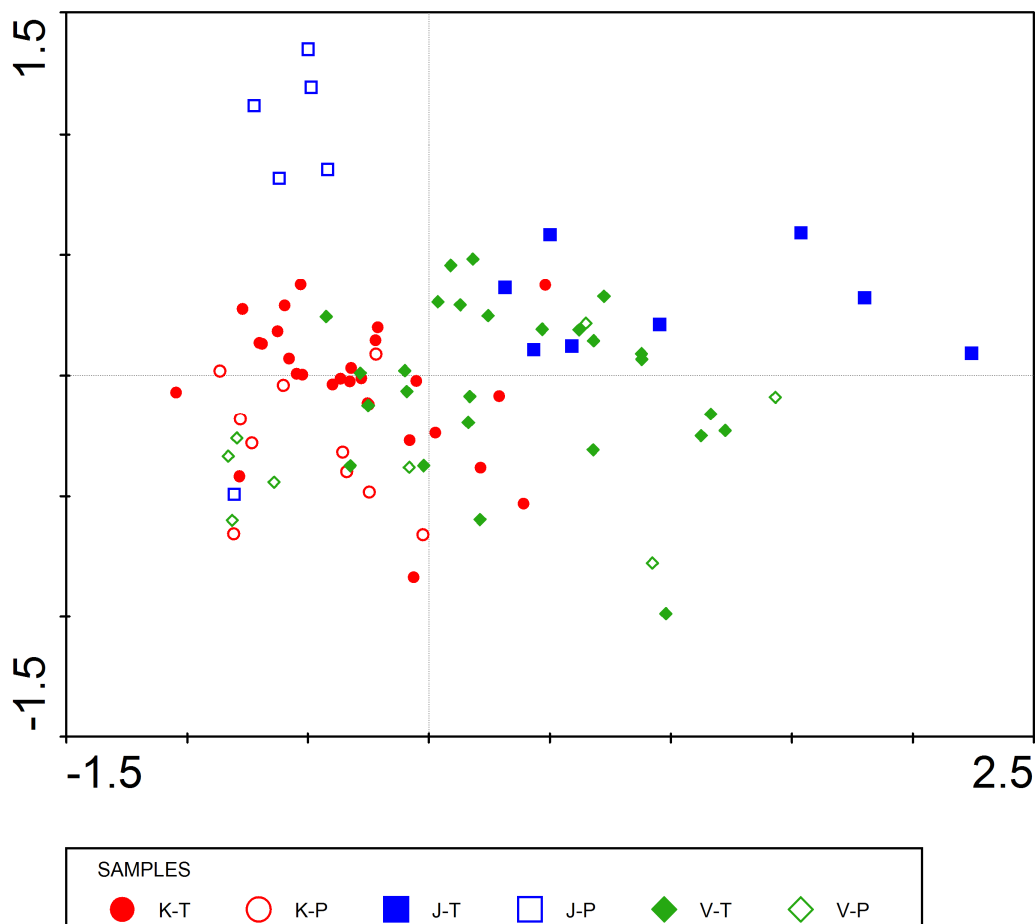
E. stricta nevzešla v dostatečném množství, abych ji mohla zahrnout do statistických analýz. Ty jsem proto prováděla pouze na rostlinách *E. nemorosa* a morfologicky přechodného typu.

3.4.1 Analýza hlavních komponent

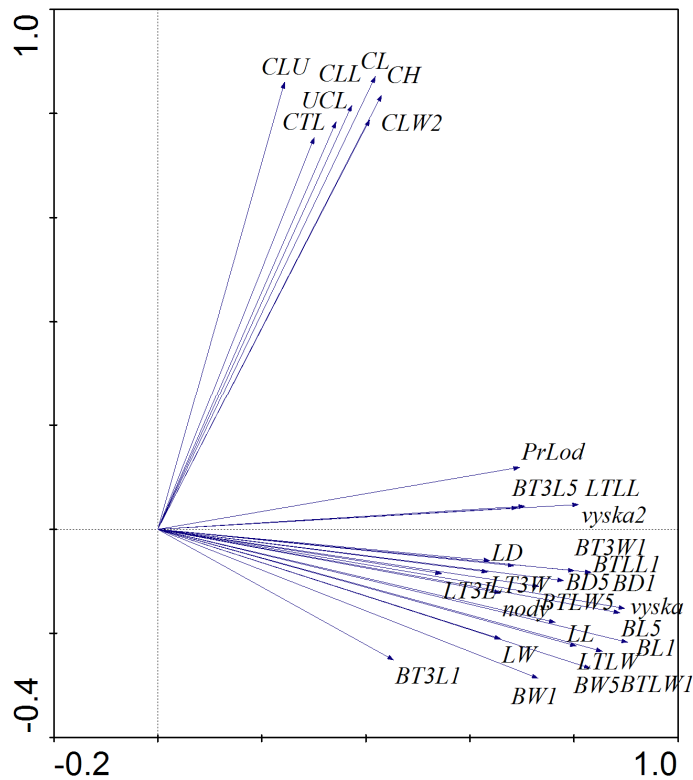
Nejprve jsem spočítala základní popisné charakteristiky každého znaku (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, maximum a minimum) pro jednotlivé populace. Otestovala jsem normalitu rozdělení pro jednotlivé znaky (Shapiro-Wilk test). Většina znaků se od normálního rozdělení odchylovala, proto jsem nejvíce odchylné znaky logaritmičtě transformovala. Pro shlukovou analýzu a PCA jsem hodnoty jednotlivých znaků normalizovala. Spočetla jsem korelace mezi jednotlivými znaky. Spearmanovy korelační koeficienty jsou uvedeny v Příloze 3. Znaky nejvíce korelované ($r \geq 0,5$) jsou zvýrazněné.

Mezi šířkou a délkou na třetím i posledním zubu pátého listenu (BT3W5 a BT3L5, BTLW5 a BTLL5) byla korelace vyšší než 0,95. Jeden ze dvojice znaků jsem proto z dalších analýz vyřadila. Ze znaků na třetím listenu jsem vyřadila jeho šířku (BT3W5), protože délka zubu (BT3L5) by mohla být ovlivněna více než jeho šířka. Naopak u posledního zubu listenu jsem vyřadila jeho délku (BTLL5), protože by potenciální vypovídající hodnota šířky posledního zubu listenu mohla být vyšší.

Poté jsem provedla analýzu hlavních komponent (PCA). Z ordinačního diagramu (Obr. 22a) jsou zřejmé morfologické posuny jednotlivých populací v závislosti na hostiteli. Nejzřetelněji je tento rozdíl vidět na populaci *E. nemorosa* z Jelení. U rostlin z obou dalších populací nejsou rozdíly mezi hostiteli tak velké. Nejvíce ovlivněné znaky (Obr. 22b) byly průměr lodyhy (PrLod), BT3L5, LTLL a výška květenství (vyska2). Naopak znaky na květech ovlivněné nebyly.



Obr. 22a: Rozmístění jednotlivých rostlin z různými populací na dvou hostitelích v PCA prostoru na základě analýzy 30 znaků. Označení lokalit (K = Kralovické Louky, J = Jelení, V = Vimperk) je následováno označením hostitele (T = *Triticum*, P = *Pisum*). První ordinační osa vysvětluje 46,0% a druhá 17,5% variability. První dvě osy vysvětlují 63,5% variability.



Obr. 22b: Promítnutí 30 znaků do PCA prostoru.

3.4.2 Kanonická diskriminační analýza

Diskriminační analýzou jsem testovala, které znaky nelépe zachytí morfologické změny mezi rostlinami pěstovanými na různých hostitelích. Vzhledem k tomu, že dvě dvojice znaků byly silně korelované (BT3W5 a BT3L5, BTLW5 a BTLL5), do analýzy jsem zahrнула vždy jen jeden z nich, a to BT3L5 a BTLW5 (viz kap. 3.4.1).

V Tab. 8 je výsledek analýzy jedinců. Použity jsou znaky, které byly vybrány při postupném výběru (*forward selection*) v krokové diskriminační analýze jako znaky, které průkazně přispívají k odlišení rostlin na hostitelích. Jsou jimi průměr lodyhy (PrLod), délka pátého listenu (BL5), výška rostliny (vyska) a šířka třetího zubu listu (LT3W).

Tab. 8: Faktorové strukturní koeficienty a standardizované koeficienty diskriminační funkce.

Znak	Faktor. str. koef.	Stand. koef. disk. fce
	Root 1	Root1
PrLod	-0,434090	-0,32223
LT3W	0,026409	0,54696
BL5	-0,420602	-1,67036
vyska	-0,146753	1,22606
BD1	-0,171214	1,12302
LD	-0,273445	-0,34374
nody	-0,298630	-0,35132
CLL	-0,216123	-0,80719
CLW2	-0,089188	0,60326
BL1	-0,314519	-0,62243

3.4.3 Klasifikační diskriminační analýza

Klasifikační diskriminační analýza sloužila k sestavení klasifikační funkce pro každý druh hostitele. Koeficienty této funkce pro data bez morfologicky přechodných populací jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab 9: Koeficienty klasifikační funkce.

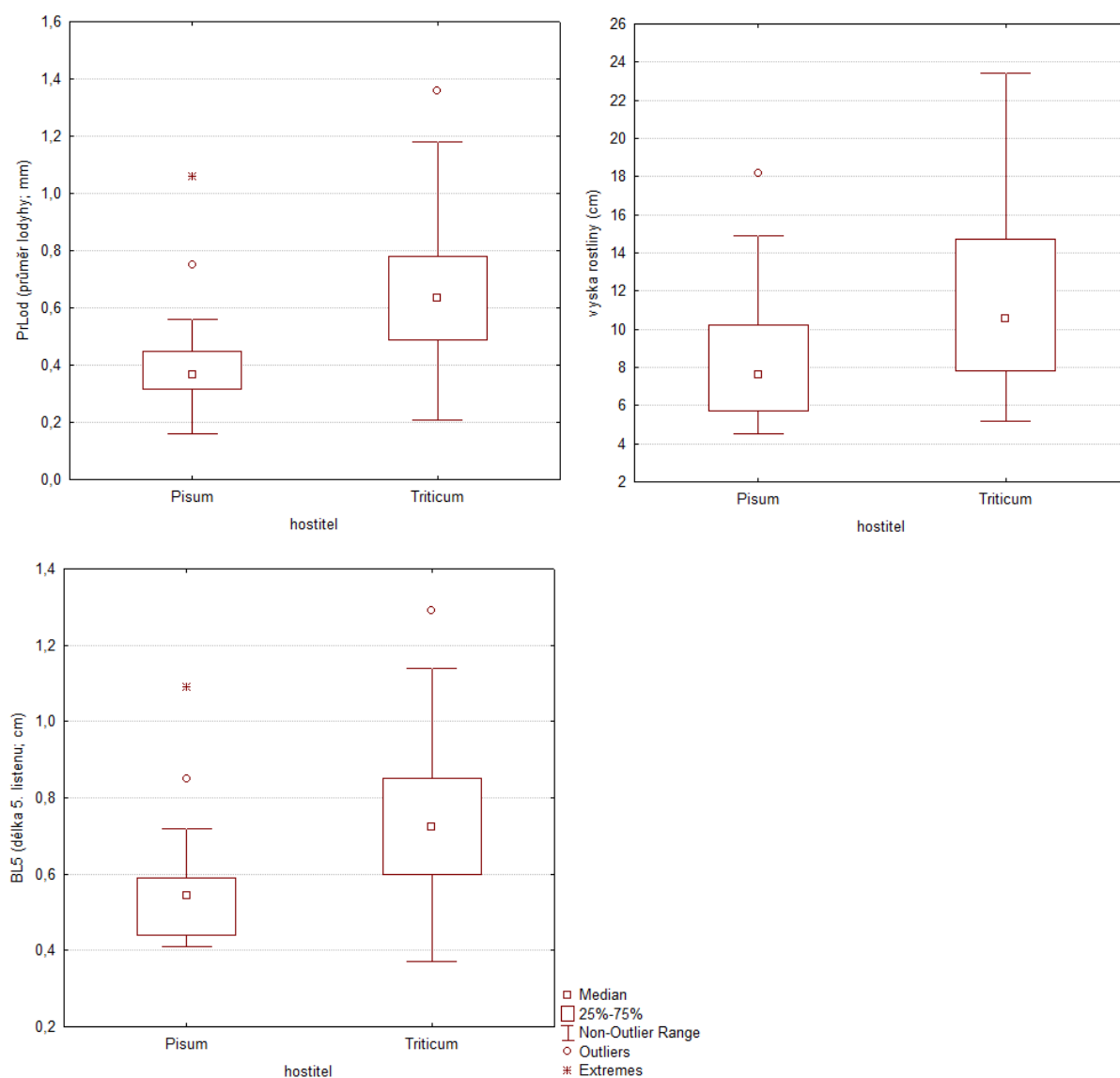
Znak	<i>Pisum</i>	<i>Triticum</i>
PrLod	-198,000	-161,073
LT3W	40,932	-33,354
BL5	361,681	457,859
vyska	-627,154	-824,497
BD1	-81,005	-113,503
LD	-6,302	30,836
nody	58,196	64,042
CLL	208,487	281,198
CLW2	58,439	-25,825
BL1	1,660	9,112
konstanta	-57,512	-75,333

Pomocí těchto funkcí jsem soubory studovaných rostlin zpětně klasifikovala (*posterior probabilities*). Výsledek pravděpodobnosti zařazení do skupin je uveden v Tabulce 10.

Tab. 10: Klasifikační matice jedinců (*posterior probabilities*).

Hostitel	% správných klasifikací	<i>Pisum</i>	<i>Triticum</i>
<i>Pisum</i>	87,50000	21	3
<i>Triticum</i>	95,16129	3	59
celkem	93,02325	24	62

Znaky, které jsou podle výsledků kanonické diskriminační analýzy nejvíce ovlivněné hostitelem, jsem zobrazila do grafů Box & Whiskers plot (Obr. 23).



Obr. 23: Hodnoty vybraných kvantitativních znaků v závislosti na hostiteli.

4 Diskuse

4.1 Hybridizace

Výsledky opylovacího pokusu ukazují, že nejsou rozdíly v úspěšnosti tvorby semen mezi druhy *E. stricta* a *E. nemorosa*, ani nebyl zjištěn pokles tvorby semen při hybridizaci oproti autogamii a xenogamii. Zároveň potvrdily schopnost obou druhů se společně hybridizovat a tím potenciálně vytvářet křížence, *E. ×haussknechtii* Wettst., jak je hojně uváděno v literatuře (např. Hartl 1974, Smejkal 1960, Wettstein 1893b, 1894, 1895), a to nezávisle na tom, který z obou druhů je mateřský. Schopnost obou rodičovských taxonů se křížit však nebyla doposud experimentálně prokázána, ovšem např. Smejkal (1960) o ní však nepochybuje vzhledem k morfologické a fylogenetické příbuznosti obou druhů, jejich obdobným ekologickým nárokům či shodné době květu.

Velmi zajímavé by bylo porovnat hybridní rostliny s rodičovskými populacemi. Není vyloučeno, že by se rostliny této hybridní kombinace mohly morfologicky lišit v závislosti na mateřském druhu (Smejkal 1960). Ty byly prokázány např. při křížení *E. hirtella* a *E. christii* (Liebst & Schneller 2005). Toto srovnání však nebylo možné u získaných hybridních semen provést, protože vyšetá semena nevzešla ani na jedné z lokalit. Příčinou bylo nejspíše přílišné zamokření a přílišná konkurence okolní vegetace na pokusných plochách.

Rozdíly mezi zásahy se ukázaly být průkazné. Účelem sterilizace bylo potvrzení hypotézy, že květy ve fázi, kdy jsem květy opylovala, ještě nebyly samovolně opyleny. V 7 případech se v těchto květech vyvinula semena. Jejich průměrný počet byl však nižší než u ostatních zásahů. Semena se vyvinula pravděpodobně kvůli neopatrnému vytrhnutí tyčinek, při kterém mohlo dojít ke kontaktu s bliznou. Druhým zásahem, jež se od ostatních průkazně lišil, byla kontrola. V tomto případě jsou vyšší počty získaných semen na tobolku pravděpodobně způsobeny opakovaným opylením v přírodních podmínkách. Význam tohoto jevu byl prokázán také u příbuzných rodů *Melampyrum* (Kwak & Jennersten 1991) a *Rhinanthus*, který bývá opylován až 6-8krát (Kwak & Jennersten 1986).

Mezi ostatními zásahy (autogamie, xenogamie a hybridizace) byly rozdíly neprůkazné. Získané poměry vzniklých semen při autogamii a xenogamii odpovídají hodnotám zjištěným

Gómezem (2002) pro druh *E. willkommii* Freyn a Liebstem se Schnellere (2005) pro druhy *E. officinalis* L., *E. hirtella* Jordan ex Reuter a *E. minima* Jacquin ex Lamarck et DC.

Množství semen získaných při autogamii je u obou studovaných druhů velmi podobné, stejně jako v porovnání s příbuznou *E. willkommii* (Gómez 2002) Druhy s menšími květy, mezi něž patří i *E. nemorosa*, mají prašníky mnohem blíže blizně než druhy s květy většími. Předpokládá se, že tyto druhy se proto mnohem častěji rozmnožují autogamicky (Wettstein 1896a, Gómez 2002, Vitek 2002b), zatímco u druhů s většími květy (včetně *E. stricta*) je výraznější podíl allogamie prostřednictvím entomogamie. K autogamii u nich dochází v případě, že opylení hmyzem neproběhlo (např. Hartl 1974). Z výsledků je však zřejmé, že v případě nutnosti je autogamie u *E. stricta* stejně efektivní jako u *E. nemorosa*, přestože k ní pravděpodobně dochází v pozdější fázi kvetení.

4.2 Morfometrické analýzy

Klasická morfometrická analýza ukázala, že dobře vyhraněné populace druhů *E. stricta* a *E. nemorosa* se od sebe liší, avšak mezi oběma druhy existuje víceméně morfologické kontinuum. Mezi znaky, které oba druhy zřetelně oddělují patří znaky na květech, a to délka střední části dolního korunního pysku (CLL) a délka koruny (CL). Tyto znaky nepodléhají ovlivnění fenotypovou plasticitou. Délka koruny, která patří mezi nejdůležitější určovací znaky našich druhů světlíků (Dvořáková 2002, Smejkal 1963), však může v některých případech rozlišování druhů *E. stricta* a *E. nemorosa* komplikovat, neboť v literatuře jsou zmiňovány i populace *E. stricta* s menšími květy, než se běžně uvádí v určovací literatuře (např. Smejkal 1963, Vitek 2002b). Také Karlsson ve své studii (Karlsson 1976) popisuje populace *E. stricta*, které délkou koruny odpovídaly spíše *E. nemorosa*. Ostatními znaky, především větvením, odpovídají tyto populace druhu *E. stricta*. Mohlo by se tak jednat o ne zcela typickou *E. stricta*. Z populací, které vyšly morfologicky nejbližší *E. nemorosa* a pro které jsou i molekulární data (CVel, Jar, VLho2 a RC) se ukazuje, že populace VLho2 je skutečně zřejmě *E. nemorosa*, ostatní pak geneticky vychází jako typická *E. stricta*. Tyto populace jsou promíchány s ostatními a netvoří žádnou oddělenou skupinu. Morfologicky mají oproti ostatním populacím *E. stricta* o něco kratší korunu a populace Jar a RC i kratší osinky. Obě hodnoty dosahovaly spíše intermediárních hodnot mezi *E. stricta* a *E. nemorosa*.

Dalším významným diagnostickým znakem je přítomnost či nepřítomnost osinek na listenech. Přestože se v literatuře uvádí, že druh *E. nemorosa* nemá osinky (Smejkal 1963, Stace 1997), jiní autoři (např. Pugsley 1930, Hartl 1974 či Yeo 1978) u něj přítomnost osinek připouští. Je to způsobeno především tím, že do druhu *E. nemorosa* zahrnují dalšími autory (např. Smejkal 1963, Smejkal & Dvořáková 2000, Stace 1997) odlišovanou *E. curta*. Tento druh byl v morfometrických analýzách zastoupen dvěma lokalitami (BDar a Marlaz). Ty jsou řazeny k *E. nemorosa*, především díky velikosti květu, neboť také větší část populací *E. nemorosa*, které jsem do této práce zahrnula, měla osinky. Nejčastěji se vyskytovaly na nejspodnějších dvou až třech zubech listenu. Od populací *E. stricta* se však lišily svou délkou, která byla prokazatelně kratší.

Ostatní znaky, především na listenech, pak byly většinou dosti variabilní a zřejmě částečně ovlivněné fenotypovou plasticitou. Jejich využitelnost k odlišování jednotlivých studovaných druhů je proto sporná, jak uvádí např. i Karlsson (1976). Naopak ve vztahu k druhům, které jsou zřetelně odlišné, jako je např. *E. salisburgensis*, by měly být tyto znaky platné.

Analýza tvaru nejširšího zubu na listenu ukázala značnou variabilitu u všech zkoumaných druhů, a to i v případě, že byly do analýzy zahrnuty pouze listeny se čtyřmi páry zubů. Z výsledků je však patrné, že *E. stricta* má ve větší míře zuby užší s delší osinkou. Naproti tomu *E. nemorosa* mívá častěji zuby širší a s kratší osinkou či zcela bez ní.

V rodě *Euphrasia* existují druhy, které jsou velikostí a tvarem listenů značně rozdílné. Najdeme zde druhy, které mají typicky malý (např. *E. minima*, *E. frigida*) nebo větší (např. *E. stricta*, *E. nemorosa*, *E. officinalis*) počet zubů či zcela odlišný tvar listenů (např. *E. salisburgensis*, *E. tricuspdata*). V případě studia druhů, které si jsou podobné, je potřeba zkoumat listeny se shodným počtem zubů.

4.3 Genetická variabilita

Vnitrodruhová variabilita většiny populací je poměrně nízká, jedinci z jednotlivých populací tvoří v analýzách poměrně kompaktní shluky. Existují však i populace (např. WBW, LenH, Ram, Len či HMB), jejichž vnitrodruhová variabilita je výrazná. Kolseth a Lönn (2005) pozorovali podobnou strukturu genetické variability populací při studiu variet druhu *E. stricta* ve Švédsku. Metoda ISSR poměrně spolehlivě odděluje *E. stricta* agg. a *E. nemorosa* agg.

Situaci komplikuje populace *E. nemorosa* ze Zátoně (Zat), která zasahuje do *E. stricta*. Není vyloučeno, že by se v okolí mohla vyskytovat populace *E. stricta*, se kterou mohlo v minulosti dojít k hybridizaci. Rovněž by bylo možné zavlečení semen *E. stricta* odjinud a následná hybridizace, neboť tato lokalita se nachází podél silnice. Jinou možností je, že by se mohlo jednat o podobný případ jako populací *E. stricta* CVel či RC, a to, že jde o morfologicky odlišné *E. stricta*, které jí však molekulárně odpovídají. Materiál na morfometrickou analýzu však nebyl dostupný, a tak tato teorie nemohla být potvrzena.

E. stricta agg. je geneticky značně variabilní, model-based shlukovou metodou byl rozdělen na několik skupin. U populací, u kterých bylo možné provést porovnání s morfometrickou analýzou, nebyl nalezen žádný zřetelný vztah se zjištěnou genetickou strukturou. Vybrané populace *E. tatarica* jsou značně promíchány s populacemi *E. stricta*, což by implikovalo možné sloučení obou druhů, jak to navrhuje např. Hartl (1974) nebo Vitek (2002a). Vzorek populací *E. tatarica* však není dostatečný na zásadnější tvrzení ohledně existence tohoto druhu. *E. tatarica* je tradičně chápána jako taxon s velkým areálem a naše populace mohou být značně odlišné od populací z východní části areálu (Smejkal 1963).

Vnitřní struktura skupiny *E. nemorosa* agg. je poněkud zřetelnější než struktura *E. stricta* agg. Taxony *E. nemorosa* a *E. curta* tvoří v PCoA víceméně plynulý přechod, který je tvořen zejména populací BDar. Ta je v dalších analýzách od ostatních populací *E. curta* poměrně oddělená a je spíše řazena k *E. nemorosa*. Švédské populace *E. curta* se zdají být od *E. nemorosa* poměrně dobře odlišené. K nim se pak v model-based shlukovací metodě přidává populace *E. curta* z Mariánských lázní (MarLaz). Ta je však v analýze metodou neighbour-network, stejně jako populace z Božího Daru (BDar), promíchána s *E. nemorosa* s. str. Švédské populace tvoří oddělenou skupinu. Populace z tohoto území bývají hodnoceny jako *E. curta* subsp. *curta*, oproti populacím z našeho území, které jsou řazeny do *E. curta* subsp. *glabrescens* (Smejkal & Dvořáková 2000). To by mohlo naznačovat, že má smysl tyto dvě taxonomické jednotky odlišovat.

E. uechtritziiana a *E. slovacica* tvoří ve všech analýzách kompaktní shluk, oddělený od ostatních populací. To podporuje možnost, že se skutečně jedná o samostatné taxony. Ovšem i v tomto případě bylo od těchto druhů do práce zahrnuto málo populací (jedna od každého druhu) a bez analýzy dalšího materiálu není možno tuto otázku zodpovědět. Do morfometrické analýzy pak byly zahrnuty jen dvě populace *E. uechtritziiana*, odlišné od té, která je použita pro ISSR. Jejich srovnání není proto zcela relevantní.

Metoda ISSR se zdá být pro studium genetické variability v rodě *Euphrasia* vhodná. Celkový počet získaných lokusů pro jednotlivé primery je srovnatelný s obdobnými pracemi využívajícími tuto metodu (např. Archak et al 2003, Ruas et al. 2003, Ge et al. 2005).

4.4 Fenotypová plasticita

Výsledky kultivačního pokusu jsou pouze částečné, neboť semena z lokalit *E. stricta* vzešla v minimálním, nehodnotitelném množství. Pravděpodobnou příčinou, proč *E. stricta* vzešla v tak malém množství, je vlhčí půda, než jaká je běžná na přírodních stanovištích. Avšak výsledky získané na druhu *E. nemorosa* by mohly přesto mít obecnější platnost.

Řada měřených znaků je ovlivněna hostitelem, na kterém jedinci parazitují. Nejvíce ovlivněnými znaky byly průměr lodyhy (PrLod), výška rostliny (vyska) a délka pátého listenu (BL5), které dosahovaly vyšších hodnot na rostlinách parazitujících na pšenici. Oba použití hostitelé patří do čeledí považovaných za dobré hostitele (Townsend 1897, Wettstein 1893b, 1894, 1895, Yeo 1964). Důvodem, proč byli jedinci parazitující na pšenici mohutnější, by mohl být fakt, že je tato rostlina jednoděložná. Tím, že vytváří velké množství adventivních kořenů, umožňuje parazitujícím rostlinám snadnější a početnější připojení haustorii a tím se do nich může dostávat větší množství živin. Vysoké procento správně hodnocených jedinců v klasifikační diskriminační analýze je pravděpodobně dáno malým souborem dat.

Rozdíly v morfologii byly zřetelné především na úrovni populační. Rostliny z jedné populace na různém hostiteli se od sebe lišily více než při porovnání *E. nemorosa* a populace morfologicky přechodného typu.

Asi nejdůležitějším poznatkem kultivačního experimentu je skutečnost, že velikost květu, jeden ze základních určovacích znaků (Hartl 1974, Smejkal 1964), není ovlivněna hostitelem. Také se ukázalo, že druh hostitele ovlivňuje jak znaky využívané k determinaci (např. délka listenu, větvení), tak znaky, které běžně využívané nejsou (výška rostlin či průměr lodyhy). Na tyto znaky není proto možné se spoléhat.

Jistě by bylo vhodné pokus zopakovat s větším množstvím opakování (o což jsem se pokusila, ovšem semena při naklíčení dvakrát po sobě zplesnivěla), na dalších hostitelích, v různě hustém porostu či při různém stupni osvětlení.

5 Závěr

Hybridizační experiment potvrdil schopnost obou druhů úspěšně se křížit. Porovnání morfologie kříženců nemohlo být provedeno, bylo by proto vhodné tento pokus zopakovat. Množství semen získaných autogamií je u obou studovaných druhů stejné, a to i přes skutečnost, že oba druhy liší ve velikosti květu a u *E. stricta* by tedy mělo docházet k autogamii v pozdější fázi kvetení.

Studium morfologie druhů z *E. stricta* agg. a *E. nemorosa* agg. ukázalo jejich značnou variabilitu a pravděpodobné ovlivnění fenotypovou plasticitou. Zároveň byly zjištěny znaky, které obě skupiny druhů odlišují nejlépe, délka střední části dolního korunního pysku (CLL), délka koruny (CL) a délka osinek na listenech.

Rovněž genetická variabilita obou skupin druhů je velká. Skupiny jsou od sebe však poměrně dobře odděleny. Uvnitř skupiny *E. stricta* agg. (*E. stricta* s. str. a *E. tatarica*) nebyla zjištěna zřetelná diference. Naopak v *E. nemorosa* agg. se od většiny populací poměrně zřetelně odděluje dvojice druhů *E. uechtriziana* a *E. slovacica*. Oba druhy však byly zastoupeny jen jednou populací. To platí i pro *E. curta* z našeho území, která byla zastoupena dvěma populacemi. Pro silnější podporu vztahů mezi zmiňovanými skupinami druhů je třeba do analýz zahrnout větší množství populačních vzorků těchto druhů. Zároveň s tím by měly být zahrnuty i do morfometrických analýz.

Studium fenotypové plasticity ukázalo ovlivnění některých znaků druhem hostitele. Rozdíly se projeví především na úrovni populací.

Na základě získaných dat se domnívám, že sloučení druhů *E. stricta* a *E. nemorosa*, jak navrhuje Hämet-Ahti et al (1998), je neoprávněné.

6 Literatura

- Archak S., Gaikwad A.B., Gautam D., Rao E.V.V.B, Swamy K.R.M. & Karihaloo J.L. (2003): Comparative assesment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessoins of India. *Genome* 46: 362-369.
- Barker W.R., Kiehn M. & Vitek E. (1988): Chromosome numbers in Australian *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 158: 161-164.
- Bates D. & Maechler M. (2010): lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999375-37. url: <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Bobear J.B. (1969): An analysis of populations of Irish *Euphrasia* L. *Watsonia* 7(2): 68-90.
- Ducarme V., Vrancken J. & Wesselingh R.A. (2010): Hybridization in annual plants: Patterns and dynamics during a four-year study in mixed *Rhinanthus* populations. *Folia Geobot.* 45: 387–405
- Dvořáková M. (2002): *Euphrasia* L. – In: Kubát K., Hrouda L., Chrtěk J. jun., Kaplan Z., Kirscher J. & Štěpánek J. [eds.] (2002): Klíč ke květeně České republiky Academia, Praha, 928p.
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. (2003): Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567–1587.
- French G.C., Hollingsworth P.M. & Ennos A. (2003): Isolation of polymorphic microsatellite markers for British *Euphrasia* L. *Mol. Ecol. Notes* 3: 626–628.
- French G.C., Ennos R.A., Silverside A.J & Hollingsworth P.M. (2005): The relationship between flower size, inbreeding koeficient and inferred selfing rate in British *Euphrasia* species. *Heredity* 94: 44-51.
- Ge X.-J., Yu Y., Yuan Y.-M., Huang H.-W. & Yan G (2005): Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (*Leguminosae*) populations in desert region sof northwest China as revealed by ISSR analysis. *Ann. Bot.-London* 95: 843-851.

- Gómez J.M. (2002): Self-pollination in *Euphrasia willkommii* Freon (*Scrophulariaceae*), an endemic species from the alpine of the Sierra Nevada (Spain). *Plant. Syst. Evol.* 232: 63–71.
- Gussarova G., Popp M., Vitek E. & Brochmann C. (2008): Molecular phylogeny and biogeography of the bipolar *Euphrasia* (*Orobanchaceae*): Recent radiations in an old genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48:444–460.
- Hämet-Ahti L., Suominen J., Ulvinen T. & Uotila P. (eds.) (1998): Retkeilykasvio [Field Flora of Finland]. Finnish Museum of Natural History, Botanical Museum, Helsinki. 656 p. *non vidi*.
- Hao G., Lee D.-H., Lee J. S. & Lee N. S. (2002): A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect. *Sacculiferum* (*Alliaceae*) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 63–68.
- Hartl D. (1974): *Euphrasia* L. – In: Hartl D. & Wagenitz G. [eds.] – Hegi's Illustrierte Flora von Mitteleuropa 6/1, ed. 2, Carl Hanser, München, p. 335 – 373.
- Hellström K., Rautio P., Hutha A.-K. & Tuomi J. (2004): Tolerance of an annual hemiparasite, *Euphrasia stricta* agg., to simulated grazing in relation to the host environment. *Flora* 199:247–255.
- Huson D.H. & Bryant D. (2006): Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2):254–267, url: <http://www.splitstree.org>.
- Jørgensen E. (1919): Die *Euphrasia*-Arten Norwegens. – Bergens Mus. Aarb. 1916– 1917, *Naturvid. raekke* 5, 1–337.
- Karlsson T. (1976): *Euphrasia* in Sweden: hybridization, parallelism and species concept. *Bot. Notiser* 129: 49–60.
- Khoshrang G.S., Kazempour O.S. & Saeidi-Mehrvarz S. (2006): Phylogeny of the Tribe *Rhinantheae* (*Scrophulariaceae*) based on Morphology. *Iran. J. Biol.* 18 (4): 331–323.
- Kolseth A.-K. & Lönn M. (2005): Genetic structure of *Euphrasia stricta* on the Baltic island of Gotland, Sweden. *Ecography* 28:443–452.
- Kwak M.M. & Jennersten O. (1986): The significance of pollination time and frequency and of purity of pollen loads for seed set in *Rhinanthus angustifolius* (*Scrophulariaceae*) and *Viscaria vulgaris* (*Caryophyllaceae*). *Oecologia* 70 : 502–507.

- Kwak M.M. & Jennersten O. (1991): Bumblebee visitation and seedset in *Melampyrum pratense* and *Viscaria vulgaris*: heterospecific pollen and pollen limitation. *Oecologia* 86: 99-104.
- Liebst B. & Schneller J. (2005): How selfing and intra- and interspecific crossing influence seed set, morphology and ploidy level in *Euphrasia*: An experimental study of species occurring in the Alps of Switzerland. *Plant Syst. Evol.* 255: 193–214.
- Linné, C.v. & Willdenow C.L. (1800): Caroli a Linne Species plantarum. Tomus III [microform]: exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas Impensis G.C. Nauk, Berolini [Berlin].
- Marhold K. & Suda J. (2002): Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). Karolinum, Praha.
- Olmstead R.G. & Reeves P.A. (1995): Evidence for the polyphyly of the *Scrophulariaceae* based on chloroplast ryc1 and ndhF sequences. *Ann. Mi. Bot. Gard.* 82: 176–193.
- Olmstead R.G., dePamphilis C. W., Wolfe A. D., Young N.D., Elisons W.J. & Reeves P.A. (2001): Disintegration of the *Scrophulariaceae*. *Amer. J. Bot.* 88(2): 348–361.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Pugsley H.W. (1930): A revision of the British *Euphrasiae*. *J. Linn. Soc. Bot.* 48: 467–542.
- R Development Core Team (2010): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. url: <http://www.R-project.org/>.
- Rohlf F. J. (2003): tpsPLS, partial least-squares, version 1.12. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf F. J. (2004): tpsUtil, file utility program. version 1.26. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf F.J. (2006): tpsDig, version 2.10. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf F.J. (2007): tpsRelw, version 1.45. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Ronniger K. (1943): Mitteilungen über *Euphrasia uechtritziiana* Junger et Engler. *Mitt. Thüring. Bot. Ver.*, ser.n. 50:222-223.

- Rothmaler W. (1935): Generum plantarum ibericarum revisi critica III., *Euphrasia* L. *Cavanillesia* 7: 5–28.
- Ruas P.M., Ruas C.F., Rampim L., Carvalho V.P., Ruas E.A. & Sera T. (2003): Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter- Simple Sequence Repeat) markers. *Genetics and Molecular Biology* 26:319–327.
- Schlichting C.D. (2002): Phenotypic plasticity in plants. *Plant Species Biology* 17: 85–88.
- Schlüter P.M. & Harris S.A. (2006): Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes*: 6: 569–572.
- Schwarz O. (1935): Über einiger *Euphrasia*- und *Rhinanthus*-Arten des höchstes Erzgebirges. *Report. Spec. Nov. Regni Veg.* 38: 43–48.
- Sennen F. (1916): Plantes d'Espagne. *Bol. Soc. Aragonesa Ci. Nat.*: 217–272.
- Sennen F. (1930): Plantes d'Espagne. *Bot. Soc. Ibér. Ci. Nat.* 29: 74–89, 110–125, 148–163.
- Shi A., Kantartzi S., Mmbaga M. & Chen P. (2010): Development of ISSR PCR markers for diversity study in dogwood (*Cornus spp.*). *Agric. Biol. J. N. Am.* 1(3): 189–194.
- Siddiqui T.H. (1993): *Taxonomic studies of genus Euphrasia L. from Pakistan and adjoining areas*. PhD thesis, University of Karachi, Karachi.
- Smejkal M. (1960): K taxonomii, rozšíření a ekologii *Euphrasia nemorosa* (Pers.) H.Mart. a *E. haussknechtii* Wettst. Na Moravě. *Sbor. Klubu Přírod. Brno* 32: 31–40.
- Smejkal M. (1963): Taxonomické studie československých druhů rodu *Euphrasia* L. *Biol. Pr. SAV* 9 (9): 1–83.
- Smejkal M. (1964): Rozšíření a ekologicke-fytocenologická charakteristika československých světlíků (*Euphrasia* L.). *Spisy Přírod. Fak. Univ. Turkyň Brno* 452: 173–217.
- Smejkal M. & Dvořáková M. (2000): *Euphrasia* L. – In Slavík B. [ed.] (2000): Květena České republiky 6. 1.vyd. *ACADEMIA*. Praha. p. 430–449.
- Spagnuolo V., Muscariello L., Cozzolino S., Cobianchi R. C. & Giordano S. (2007): Ubiquitous genetic diversity in ISSR markers between and within populations of the asexually producing moss *Pleurochaete squarrosa*. *Plant Ecol.* 188: 91–101.

- Stace C.A. (1997): *New Flora of the British Isles*. – 2nd Edition. Cambridge University Press. 1130 p.
- StatSoft, Inc. (2001): STATISTICA (data analysis software system), version 6 – url: <http://www.statsoft.com>.
- Svobodová Š. (2008): Morfologická variabilita druhů *Euphrasia stricta* a *Euphrasia nemorosa*. [Morphological variability of species *Euphrasia stricta* and *Euphrasia nemorosa*. Bc. Thesis, in Czech] – 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Tank D.C., Beardsley P.M., Kelchner S.A. & Olmstead R.G. (2006): L. A. S. JOHNSON REVIEW No. 7. Review of the systematics of *Scrophulariaceae* s.l. and their current disposition. *Aust. Syst. Bot.* 19, 289–307.
- ter Braak C.J.F. & Šmilauer P. (2002): Canoco reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, NY.
- Townsend F. (1884): On *Euphrasia officinalis* L. *The Journal of Botany* 22: 161–168.
- Townsend F. (1897): Monograph of the genus *Euphrasia*. *J.Bot.* 33: 321–326, 395–406, 417–426, 465–476.
- Vitek E. (1985a): Evolution alpiner Populationen von *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*): Die mittel- bis kleinblütigen, drüsenhaarigen Arten. *Plant Syst. Evol.* 148: 215–237.
- Vitek E. (1985b): Evolution alpiner Populationen von *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*): *E. alpina* und *E. christii*. *Plant Syst. Evol.* 149: 1–18.
- Vitek E., 1991: *Euphrasia*. - In: Strid A., Tan K. (eds): *Mountain flora of Greece*, 2: 236-240. Edinburgh: University Press.
- Vitek E. (1998): Are the taxonomic concepts of agamospermous genera useful for autogamous groups - a critical discussion using the example of *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*). *Folia Geobot. Phytotax.* 33: 349–352.
- Vitek E. (2001): *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*) – described or distributed by SENNEN. *Ann. Naturhist. Mus. Wien, B*, 103: 573–597.
- Vitek E., 2002a: *Euphrasia*. - In: López Sáez J.A., Catalán P., Sáez L. (eds): *Plantas parásitas de la Península Ibérica e Islas Baleares*: 252-274. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

- Vitek E., 2002b: *Euphrasia*. - In: Jäger E.J., Werner K. (eds.): Exkursionsflora von Deutschland. Bd. 4, Gefäßpflanzen: Kritischer Band, 10. Aufl.: 585-587.
- Vitek E., 2005: Augentrost / *Euphrasia*. - In: Fischer M.A., Adler W., Oswald K.: Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol: 751-753. Linz: Oberösterreichisches Landesmuseum.
- Werner O., Rams S. & Ros R.M. (2005): Genetic diversity of *Pohlia bolanderi* (*Mniaceae*), a rare and threatened moss in Sierra Nevada (Spain), estimated by ISSR molecular markers. *Nova Hedwigia*, 81: 413-420.
- Wettstein R. (1893a): Der Saison-Dimorphismus als Ausgangspunkt für die Bildung neuer Arten im Pflanzenreiche. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 13: 303–313.
- Wettstein R. (1893b, 1894, 1895): Die Arten der Gattung *Euphrasia*. *Österr. Bot. Z.* 43: 77–83, 126–133, 193–202, 238–241, 305–310, 1893; 44: 5–11, 53–60, 92–97, 132–138, 169–173, 244–249, 288–294, 328–333, 374–381, 405–410, 448–455, 1894; 45: 14–17, 111–112, 1895.
- Wettstein R. (1896a): Monographie der Gattung *Euphrasia*. Leipzig.
- Wettstein R. (1896b): Zur Systematik der europäischen *Euphrasia*-Arten. – *Österr. Bot. Z.* 43: 381–386.
- Wilkins D.A. (1963): Plasticity and establishment in *Euphrasia*. *Ann. Bot.-London* 27: 533–552.
- Yeo P.F. (1955): The species concept in *Euphrasia* (Exhibit). – In: Lousley J.E. (1955): Species studies in the British flora. *Bot. Soc.of the Bri. Isl.*, p. 128–133.
- Yeo P.F. (1964): The growth of *Euphrasia* in cultivation. *Watsonia* 6 (1): 1–24.
- Yeo P.F. (1966) The breeding relationship of some European *Euphrasiae*. *Watsonia* 6: 216–245.
- Yeo P.F. (1971): Revisional notes on *Euphrasia*. – In: Heywood V.H. (red.): *Notulae systematicae ad Floram Europeam spectantes*, no. 11. *Bot. J. Linn. Soc.* 64: 353–361.
- Yeo P.F. (1978): A taxonomic revision of *Euphrasia* in Europe. *Bot. J. Linn. Soc.* 77: 223–334.
- Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D. & Fink W.L. (2004): Geometric Morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press, London, 443 p.

- Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- Zopfi H-J. (1993a): Ecotypic variation in *Rhinanthus alectorolophus* (Scopoli) Pollich (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management. I. Morphological delimitations and habitats of seasonal ecotypes. *Flora* 188: 15–39.
- Zopfi H-J. (1993b): Ecotypic variation in *Rhinanthus alectorolophus* (Scopoli) Pollich (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management. II. The genotypic basis of seasonal ecotypes. *Flora* 188: 153–173.
- Zopfi H-J. (1995): Life history variation and infraspecific heterochrony in *Rhinanthus glacialis* Personnat (*Scrophulariaceae*). *Plant Syst. Evol.* 198: 209–233.
- Zopfi H.-J. (1998): Life-history variation among populations of *Euphrasia rostkoviana* Hayne (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management. *Biol. J. Linn. Soc.* 64: 179-205.

Příloha 1: Seznam lokalit (označení M v Analýze značí morfometrii).

Ozn.	Druh	Lokalita	GPS souřadnice	Nadm. v. (m n.m.)	Datum	Analýza
Ber	<i>E. stricta</i>	CZ, Beroun: plocha bývalého vojenského cvičiště, ca 850 m S od želez. zast. Beroun - Závodí	N 49°58'25,1"; E 14°4'59,8"	280	25.7.2009	M, ISSR
Buc	<i>E. stricta</i>	CZ, Bučávka: okraj luční cesty ca 800 m V od středu obce	N 50°12'27,4"; E 17°38'11,4"	377	5.9.2010	M, ISSR
Cep	<i>E. stricta</i>	CZ, Čepičná: dno starého lomu ca 400 m Z(S)Z od kaple v obci	N 49°16'03,9"; E 13°35'15,1"	450	20.9.2007	M
CK	<i>E. stricta</i>	CZ, Český Krumlov: okraj luční cesty ca 1 km SV od nádraží v Českém Krumlově	N 48°49'43,7"; E 14°19'33,1"	590	22.8.2010	M, ISSR
CVel	<i>E. stricta</i>	CZ, České Velenice: lesní cesta ca 2,8 km ZSZ od nádraží	N 48°46'49,2"; E 14°55'19,2"	515	15.9.2007	M, ISSR
Havr	<i>E. stricta</i>	CZ, Havraníky: rozvolněné plochy v Havranickém vřesovišti při cestě do Popic ca 650 m S od kostela v obci	N 48°49'01,8"; E 16°00'36,3"	315	11.6.2010	M, ISSR
Jar	<i>E. stricta</i>	CZ, Jaronín: okraj louky ca 2,2 km SZ od Brloha	N 48°56'35,5"; E 14°12'03,3"	615	28.8.2010	M, ISSR
Kad	<i>E. stricta</i>	CZ, Kadov: lada na jihozápadním okraji obce	N 49°24'01,1"; E 13°46'12,7"	517	20.8.2007	M
Min	<i>E. stricta</i>	CZ, Sušice: stará cesta nad lomem na vrchu Minovka ca 1,2 km SV od nádraží v Sušici	N 49°15'18,9"; E 13°33'03,5"	584	30.8.2007	M
Nevc1	<i>E. stricta</i>	CZ, Nevcehle: polní cesta ca 1,5 km SZ od středu obce	N 49°14'14,3"; E 15°31'32,7"	575	20.9.2007	M
Nevc2	<i>E. stricta</i>	CZ, Nevcehle: polní cesta ca 300 m SSZ od středu obce	N 49°13'42,2"; E 15°32'12,8"	608	20.9.2007	M
NR1	<i>E. stricta</i>	CZ, Hrubšice: okraj silničky podél PR Nad Řekami ca 500 m od mostu z Biskoupek na Hrubšice	N 49°05'34,8"; E 16°17'21,9"	269	11.9.2007	M
NR2	<i>E. stricta</i>	CZ, Hrubšice: travnatá plocha na svahu v PR Nad Řekami ca 500 m od mostu z Biskoupek na Hrubšice	N 49°05'31,5"; E 16°17'20,8"	271	11.9.2007	M
Ran	<i>E. stricta</i>	CZ, Raná: trávníky na V úpatí vrchu Raná u obce	N 50°24'38,7"; E 13°46'23,3"	342	21.6.2010	ISSR
RC	<i>E. stricta</i>	CZ, Rakouská cesta, U Říjiště: ca 50 m směrem ke křižovatce U Koňského potoka, zelená tur. stezka ca 2,6 km Z od Nové Pece	N 48°46'22,3"; E 13°53'34,8"	890	30.8.2008	M, ISSR
Sko	<i>E. stricta</i>	CZ, Skoupý: lada mezi poli, ca 600 m SSV od kostela v obci	N 49°34'56,2"; E 14°20'51,6"	545	2.9.2010	M, ISSR
Stud	<i>E. stricta</i>	CZ, Studánky: okraj louky ca 900 m Z od kostela ve vsi	N 48°35'24,9"; E 14°18'51"	750	15.6.2008	M

Příloha 1 pokračování

Ozn.	Druh	Lokalita	GPS souřadnice	Nadm. v. (m n.m.)	Datum	Analýza
STUD S	<i>E. stricta</i>	SWE, Solbaken: okraj lesní silničky východně od rašeliniště Lars-Olskärret ca 3,8 km ZJZ od obce	N 59°57'10,9"; E 17°18'06,9"	62	8.8.2009	ISSR
VLho2	<i>E. stricta</i>	CZ, Velká Lhota: lesní cesta k rybníku ca 300 m SZ od křižovatky na Poldovku	N 49°08'35,3"; E 15°19'54,6"	640	20.9.2007	M, ISSR
Vlk	<i>E. stricta</i>	CZ, Vlkonice: travnatá plocha u silnice ca 800 m S od středu obce A, St. Leonhard bei Freistadt, Maasch: rozvolněná plocha u silnice ca 450 m SSV od obce	N 49°18'25,2"; E 13°35'34,3"	472	30.8.2007	M
WBW	<i>E. stricta</i>	CZ, Žikov: pastvina ve stráni u silnice, ca 150 m Z od středu obce	N 48°26'24,6"; E 14°43'29,3"	660	18.8.2010	M, ISSR
Zik	<i>E. stricta</i>	CZ, Břetětice: soukromá louka cca 200 m jižně od středu obce při silnici na Svojšice	N 49°13'53,3"; E 13°27'16,9"	553	2.8.2007	M
Bret	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Budislav: osada Borek, kosený trávník u domu a okraje cesty pod ním, asi 500 m ZSZ od křižovatky silnic vedoucích k obcím Proseč a Jarošov	N 49°15'04,5"; E 13°27'39,7"	637	5.9.2007	M
Bud	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Hory Matky Boží: 500 m J po žluté turistické značce od obce	N 49°48'22,8"; E 16°9'30,3"	515	5.9.2008	M
HMB	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Velký Javor: rozvolněné plochy v horské louce (sjezdovka) na vrchu Velký Javor ca 400 S od vrcholu	N 49°15'46,3"; E 13°26'16,9"	686	5.9.2007	M, ISSR
Jav	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Jelení: okraj silnice, zelená turistická stezka, zastavení U Stříšky, cca 1,3 km ZSZ od Rosenauerovy kaple	N 49°06'57"; E 13°07'59,1"	1320	30.9.2010	M
Jel	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Homí Pole: luční cesta V od rybníka Karhov ca 750 m V od křižovatky silnic na severním okraji obce Horní Pole	N 48°48'21,2"; E 13°51'37,3"	940	30.8.2008	M
Kar	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Lenora: složité dřeva u silnice ca 400 m S od nádraží v Lenoře	N 48°55'58,7"; E 13°47'46,2"	765	30.8.2007	M, ISSR
Len	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Paseky: asi 1,2 km JV od kaple v obci; zarostlý střed a okraje cesty v komplexu kulturních lesů, stinnější stanoviště	N 49°46'42,5"; E 16°8'14,2"	648	5.9.2008	M
Pas1	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Proseč: rozvolněné trávníky a okraje zarůstajících cest na dně opuštěného rulového lomu, asi 560 m VJV od kostela na náměstí	N 49°48'08,2"; E 16°07'27,2"	535	19.9.2009	M, ISSR
Pro	<i>E. nemorosa</i>					

Příloha 1 pokračování

Ozn.	Druh	Lokalita	GPS souřadnice	Nadm. v. (m n.m.)	Datum	Analýza
Sta	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Stašov: asi 1,3 km ZJZ od kostela v obci; okraje cesty v kulturní smrčíně	N 49°40'12,8"; E 16°21'9,1"	667	4.9.2008	M
VBor	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Prášily, Velký Bor: trávník na okraji parkoviště v ostré zatáčce v místě zaniklé osady Velký Bor ca 3,8 km V od Prášil	N 49°06'09,5"; E 13°25'49,3"	890	8.8.2010	M, ISSR
Vimp	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Vimperk: okraj louky severně od silnice, ca 500 m ZJZ od křižovatky U Sloupu Z od Vimperka	N 49°03'44,9"; E 13°43'49,2"	900	8.9.2007	M, ISSR
VLho1	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Velká Lhota: kulturní louka na Z od silnice ca 500 m S od křižovatky na Poldovku	N 49°08'44,7"; E 15°19'59,4"	626	20.9.2007	M, ISSR
VLho3	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Velká Lhota: luční komplex Z rybníka ca 800 m SZ od křižovatky na Poldovku	N 49°08'50"; E 15°19'38,7"	600	20.9.2007	M
Zat	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Zátoň: okraj silnice z Lenory do Zátoně, ca 1,2 km S od nádraží v Lenoře	N 48°56'20,6"; E 13°47'52,2"	770	6.9.2009	ISSR
Zhuri	<i>E. nemorosa</i>	CZ, Zhůří: okraje silničky a luční cesty nedaleko kapličky v zaniklé obci Zhůří ca 8,6 km SV od Železné Rudy	N 49°10'34,3"; E 13°20'05,9"	895	10.8.2007	M, ISSR
BDar	<i>E. curta</i>	CZ, Boží Dar: louky podél silnice z Božího Daru do Homí Blatné, ca 4,5 km Z od středu obce	N 50°24'36,7"; E 12°51'05,5"	967	18.9.2010	M, ISSR
HEBY	<i>E. curta</i>	SWE, Heby: luční cesta na okraji rašeliniště StorMossen ca 9,3 km SSV od obce	N 60°00'50,4"; E 16°56'14,2"	75	13.8.2009	ISSR
MarLaz	<i>E. curta</i>	CZ, Mariánské lázně: okraj silnice směrem na Duncanovu vyhlídku, ca 3,7 km S od nádraží Mar. Láz. - město	N 49°59'32,5"; E 12°41'49,9"	521	4.9.2010	M, ISSR
OSTR	<i>E. curta</i>	SWE, Pettbol: nájezd na lesní cestu ca 1,1 km Z od obce	N 60°01'03,5"; E 18°22'10,2"	30	9.8.2009	ISSR
STUD N	<i>E. curta</i>	SWE, Solbaken: okraj lesní silničky východně od rašeliniště Lars-Olskärret ca 3,8 km ZJZ od obce	N 59°57'10,9"; E 17°18'06,9"	62	8.8.2009	ISSR
BKriz	<i>E. uechtriziana</i>	CZ, Bílý Kříž: okraj cesty horskou loukou ca 1,7 km Z od hotelu Sulov v osadě Bílý Kříž	N 49°30'01,7"; E 18°31'09,6"	860	29.6.2010	ISSR

Příloha 1 pokračování

Ozn.	Druh	Lokalita	GPS souřadnice	Nadm. v. (m n.m.)	Datum	Analýza
DUpa	<i>E. uechtritziiana</i>	CZ, Dolní Malá Úpa: okraj silnice ca 1 km JZ od obce CZ, Pomezní Boudy: okraj cesty ca 130 m ZSZ od parkoviště	N 50°42'27,8"; E 15°48'17,2"	830	6.8.2008	M
PBoud	<i>E. uechtritziiana</i>	na Pomezních Boudách	N 50°44'47,9"; E 15°49'16"	1060	6.8.2008	M
Podb	<i>E. slovacica</i>	SVK, Podbanské: okraj cesty ca 100 m V hotelu	N 49°08'49,2"; E 19°54'38,3"	950	10.7.2006	ISSR
Dobr	<i>E. tatarica</i>	BG, Dobrostan: pastviny u obce Dobrostan, ca 1,3 km Z od středu obce	N 41°54'18,2"; E 24°54'36,1"	1370	24.7.2010	ISSR
Hus	<i>E. tatarica</i>	CZ, Hustopeče: rozvolněné plochy podél luční cesty ca 2,4 km S od kostela v obci	N 48°57'40,5"; E 16°44'29,1"	230	4.9.2009	M, ISSR
KRBA	<i>E. tatarica</i>	HR, Kravica: pastviny u silnice Korenica – Gospić ca 3,5 km JV od obce	N 44°41'17,3"; E 15°39'07,2"	700	23.8.2010	ISSR
SP	<i>E. tatarica</i>	SRB, Niška Banja: pastviny nad soutěskou ca 5,2 km JJV od obce	N 43°16'59,9"; E 22°04'02,4"	500	26.7.2010	ISSR
Det	přechodný typ	CZ, Děřichov nad Bystřicí: lesní cesta 3,1 km S od kostela	N 49°51'24"; E 17°24'32"	630	22.8.2010	M, ISSR
Hod	přechodný typ	CZ, Hodňov: okraj lesní cesty ca 100 m V od železniční zastávky Hodňov	N 48°46'37,9"; E 14°06'09,5"	752	30.8.2007	M
LenH	přechodný typ	CZ, Lenora: kulturní louky u hájovny ca 800 m JJZ od středu obce Lenora	N 48°54'53,5"; E 13°47'56"	780	6.9.2009	ISSR
Leo	přechodný typ	CZ, Pohorská Ves, Leopoldov: staré zarůstající skladiště dřeva u křižovatky cest ca 400 m JJ(Z) od středu osady	N 48°38'33,6"; E 14°38'17,7"	798	29.8.2007	M
Pohl	přechodný typ	CZ, Pohorská Ves, Pohoří na Šumavě: okraj louky a stará luční cesta cca 900 m JZ kostela	N 48°35'45,4"; E 14°41'24,2"	922	29.8.2007	M, ISSR
Poh2	přechodný typ	CZ, Pohorská Ves, Pohoří na Šumavě: travnaté plochy před kostelem a v základech zříceného kostela	N 48°36'14,2"; E 14°41'47,9"	918	29.8.2007	M
Ram	přechodný typ	CZ, Ramzová: plocha sjezdovky ca 500 m JV od nádraží v obci Ramzová	N 50°11'21,4"; E 17°04'12,3"	790	11.10.2009	M, ISSR
SKAG	přechodný typ	SWE, Hasselfors: okraj lesní cesty západně od rašeliniště Skagershultsmossen ca 3,2 km SV od obce	N 59°06'22,4"; E 14°42'07,7"	90	18.8.2009	ISSR
VS	přechodný typ	CZ, Mezina: polní cesta, modrá turistická značka smerem na Venušinu sopku, ca 1 km J od středu obce Mezina	N 49°56'58,8"; E 17°28'27,5"	630	9.10.2010	ISSR

Příloha 2: Spearmannovy korelační koeficienty mezi měřenými morfologickými znaky; morfometrická analýza.

	CL	CTL	CH	UCL	CLU	CLL	LCW2	LCD	BL5	BW5	BD5	BT3W5	BT3L5	BT3O5	BTLW5	BTLL5	BTLO5	BL10	BW10	BD10	BT3W10	BT3L10	BT3O10	BTLW10	BTLL10	BTLO10
CL	*	0,75467	0,8562	0,70887	0,79164	0,82504	0,72878	0,8251	0,39461	0,26762	0,34814	0,29964	0,2409	0,28875	0,3359	0,42364	0,26492	0,45962	0,34439	0,34297	0,34761	0,35138	0,31704	0,34715	0,51139	0,29967
CTL	0,75467	*	0,60349	0,53013	0,52507	0,46498	0,47334	0,54747	0,17991	0,09999	0,22147	0,17004	0,11843	0,16322	0,14502	0,24249	0,19206	0,24502	0,14761	0,24313	0,22606	0,17531	0,18623	0,16408	0,29692	0,18971
CH	0,8562	0,60349	*	0,75249	0,7994	0,79681	0,82903	0,86249	0,35455	0,28437	0,25463	0,29156	0,25124	0,25431	0,35408	0,39957	0,21713	0,39925	0,32995	0,26323	0,32918	0,33322	0,30909	0,33598	0,47232	0,24433
UCL	0,70887	0,53013	0,75249	*	0,61012	0,57214	0,536	0,63975	0,25662	0,18555	0,17631	0,14742	0,13641	0,19253	0,22532	0,28923	0,21609	0,29206	0,21746	0,20888	0,18067	0,224	0,24409	0,19614	0,33425	0,25949
CLU	0,79164	0,52507	0,7994	0,61012	*	0,86797	0,85012	0,89084	0,36133	0,25758	0,30712	0,334	0,2851	0,29187	0,34915	0,38334	0,1911	0,41003	0,31702	0,29595	0,34528	0,38353	0,34966	0,345	0,48315	0,211
CLL	0,82504	0,46498	0,79681	0,57214	0,86797	*	0,83446	0,91519	0,41443	0,28944	0,35761	0,35993	0,26753	0,28078	0,36377	0,40538	0,21354	0,46169	0,37043	0,33044	0,36832	0,39733	0,33713	0,38056	0,50989	0,21474
LCW2	0,72878	0,47334	0,82903	0,536	0,85012	0,83446	*	0,8878	0,34072	0,27827	0,25089	0,34736	0,26882	0,25128	0,36797	0,35904	0,12548	0,37893	0,32245	0,23734	0,34362	0,35732	0,29168	0,36135	0,46583	0,15223
LCD	0,8251	0,54747	0,86249	0,63975	0,89084	0,91519	0,8878	*	0,39705	0,2857	0,33261	0,3686	0,27651	0,27322	0,36925	0,42278	0,18936	0,44227	0,34457	0,30035	0,36922	0,38899	0,33511	0,37686	0,51985	0,21058
BL5	0,39461	0,17991	0,35455	0,25662	0,36133	0,41443	0,34072	0,39705	*	0,78844	0,68284	0,62017	0,47874	0,15072	0,67263	0,61615	0,04685	0,85257	0,74448	0,51942	0,53967	0,56762	0,19837	0,6417	0,58726	0,10123
BW5	0,26762	0,09999	0,28437	0,18555	0,25758	0,28944	0,27827	0,2857	0,78844	*	0,46149	0,49463	0,46041	0,04921	0,67892	0,39648	-0,1122	0,66268	0,81419	0,40549	0,46533	0,44521	0,08816	0,60203	0,35202	-0,0462
BD5	0,34814	0,22147	0,25463	0,17631	0,30712	0,35761	0,25089	0,33261	0,68284	0,46149	*	0,48712	0,36368	0,09822	0,39776	0,37367	0,04961	0,6382	0,46498	0,60672	0,44441	0,4604	0,19612	0,43421	0,48639	0,13912
BT3W5	0,29964	0,17004	0,29156	0,14742	0,334	0,35993	0,34736	0,3686	0,62017	0,49463	0,48712	*	0,34255	-0,0566	0,54522	0,44732	-0,0902	0,57123	0,49581	0,38587	0,63301	0,46308	0,05513	0,57571	0,49456	-0,0391
BT3L5	0,2409	0,11843	0,25124	0,13641	0,2851	0,26753	0,26882	0,27651	0,47874	0,46041	0,36368	0,34255	*	0,18653	0,46852	0,48653	0,056	0,40604	0,37155	0,28193	0,3183	0,57343	0,21111	0,37927	0,47362	0,10556
BT3O5	0,28875	0,16322	0,25431	0,19253	0,29187	0,28078	0,25128	0,27322	0,15072	0,04921	0,09822	-0,0566	0,18653	*	0,04742	0,21213	0,42565	0,11631	0,01934	0,0777	-0,0133	0,17408	0,56921	-0,0292	0,18462	0,41029
BTLW5	0,3359	0,14502	0,35408	0,22532	0,34915	0,36377	0,36797	0,36925	0,67263	0,67892	0,39776	0,54522	0,46852	0,04742	*	0,58019	-0,0647	0,53455	0,58329	0,3507	0,44784	0,42309	0,07055	0,65222	0,47848	0,00788
BTLL5	0,42364	0,24249	0,39957	0,28923	0,38334	0,40538	0,35904	0,42278	0,61615	0,39648	0,37367	0,44732	0,48653	0,21213	0,58019	*	0,06514	0,49759	0,35603	0,2723	0,34455	0,48078	0,16133	0,46809	0,65982	0,1544
BTLO5	0,26492	0,19206	0,21713	0,21609	0,1911	0,21354	0,12548	0,18936	0,04685	-0,1122	0,04961	-0,0902	0,056	0,42565	-0,0647	0,06514	*	0,02894	-0,0966	0,01534	-0,0985	0,07353	0,40592	-0,1013	0,11797	0,4869
BL10	0,45962	0,24502	0,39925	0,29206	0,41003	0,46169	0,37893	0,44227	0,85257	0,66268	0,6382	0,57123	0,40604	0,11631	0,53455	0,49759	0,02894	*	0,81818	0,68231	0,65334	0,62704	0,23181	0,69976	0,63365	0,13239
BW10	0,34439	0,14761	0,32995	0,21746	0,31702	0,37043	0,32245	0,34457	0,74448	0,81419	0,46498	0,49581	0,37155	0,01934	0,58329	0,35603	-0,0966	0,81818	*	0,50392	0,53855	0,55306	0,11854	0,68441	0,42589	-0,0276
BD10	0,34297	0,24313	0,26323	0,20888	0,29595	0,33044	0,23734	0,30035	0,51942	0,40549	0,60672	0,38587	0,28193	0,0777	0,3507	0,2723	0,01534	0,68231	0,50392	*	0,52797	0,46157	0,10159	0,46059	0,39722	0,05683
BT3W10	0,34761	0,22606	0,32918	0,18067	0,34528	0,36832	0,34362	0,36922	0,53967	0,46533	0,44441	0,63301	0,3183	-0,0133	0,44784	0,34455	-0,0985	0,65334	0,53855	0,52797	*	0,43424	0,03512	0,60872	0,47904	-0,058
BT3L10	0,35138	0,17531	0,33322	0,224	0,38353	0,39733	0,35732	0,38899	0,56762	0,44521	0,4604	0,46308	0,57343	0,17408	0,42309	0,48078	0,07353	0,62704	0,55306	0,46157	0,43424	*	0,22861	0,51393	0,59418	0,09752
BT3O10	0,31704	0,18623	0,30909	0,24409	0,34966	0,33713	0,29168	0,33511	0,19837	0,08816	0,19612	0,05513	0,21111	0,56921	0,07055	0,16133	0,40592	0,23181	0,11854	0,10159	0,03512	0,22861	*	0,05976	0,25779	0,42453
BTLW10	0,34715	0,16408	0,33598	0,19614	0,345	0,38056	0,36135	0,37686	0,6417	0,60203	0,43421	0,57571	0,37927	-0,0292	0,65222	0,46809	-0,1013	0,69976	0,68441	0,46059	0,60872	0,51393	0,05976	*	0,58367	-0,0449
BTLL10	0,51139	0,29692	0,47232	0,33425	0,48315	0,50989	0,46583	0,51985	0,58726	0,35202	0,48639	0,49456	0,47362	0,18462	0,47848	0,65982	0,11797	0,63365	0,42589	0,39722	0,47904	0,59418	0,25779	0,58367	*	0,11264
BTLO10	0,29967	0,18971	0,24433	0,25949	0,211	0,21474	0,15223	0,21058	0,10123	-0,0462	0,13912	-0,0391	0,10556	0,41029	0,00788	0,1544	0,4869	0,13239	-0,0276	0,05683	-0,058	0,09752	0,42453	-0,0449	0,11264	*

Příloha 3: Spearmannovy korelační koeficienty mezi měřenými morfologickými znaky; kultivační experiment.

	CL	CTL	CLL	CLU	CLW2	CH	UCL	LL	LW	LD	LT3W	LT3L	LTLW	LTL	BL1	BW1	BD1	BT3W1	BT3L1	BTLW1	BTL1	BL5	BW5	BD5	BT3W5	BT3L5	BTLW5	BTL5	vyska	vyska2	nody	PrLod	
CL	*	0,7923	0,8863	0,7904	0,7814	0,8885	0,8162	0,193	0,0751	0,2769	0,1832	0,127	0,1557	0,3129	0,2506	0,1016	0,2531	0,2288	0,0154	0,1552	0,2907	0,2721	0,1821	0,223	0,283	0,283	0,2033	0,2033	0,2024	0,3069	0,2348	-0,2	
CTL	0,7923	*	0,6152	0,608	0,623	0,6332	0,5949	0,0747	0,0309	0,1429	0,0869	0,1271	0,0803	0,3185	0,154	0,0322	0,1747	0,2186	0,013	0,1939	0,2636	0,2129	0,0973	0,3012	0,2564	0,2564	0,1248	0,1248	0,1824	0,3117	0,2268	-0,185	
CLL	0,8863	0,6152	*	0,7705	0,813	0,8553	0,7315	0,1347	-0,076	0,2964	0,2347	0,0299	0,0686	0,2607	0,2	0,0126	0,2578	0,1924	-0,036	0,0695	0,228	0,2036	0,0996	0,1977	0,2283	0,2283	0,1119	0,1119	0,1365	0,2083	0,1758	-0,191	
CLU	0,7904	0,608	0,7705	*	0,7652	0,8465	0,7257	0,0819	0,0049	0,1541	0,0222	0,1413	-0,014	0,2343	0,0798	0,0089	0,1426	0,0065	0,0201	-0,032	0,0488	0,0961	0,0076	0,1063	0,116	0,116	0,0979	0,0979	0,0455	0,1176	0,0776	-0,135	
CLW2	0,7814	0,623	0,813	0,7652	*	0,845	0,6782	0,1885	0,0418	0,3331	0,146	0,0434	0,1091	0,2902	0,2119	0,0502	0,2901	0,182	-0,034	0,137	0,2136	0,2161	0,1677	0,21	0,2271	0,2271	0,1339	0,1339	0,1988	0,2376	0,2401	-0,077	
CH	0,8885	0,6332	0,8553	0,8465	0,845	*	0,8149	0,2406	0,1301	0,2723	0,2035	0,1416	0,1642	0,3297	0,2419	0,1832	0,2532	0,1906	0,0664	0,1912	0,2623	0,2127	0,176	0,1455	0,1976	0,1976	0,1849	0,1849	0,2223	0,2486	0,2642	-0,112	
UCL	0,8162	0,5949	0,7315	0,7257	0,6782	0,8149	*	0,1101	0,0928	0,1155	0,1236	0,1659	0,1037	0,2316	0,1664	0,1651	0,1568	0,1135	0,0786	0,0836	0,1391	0,1561	0,1029	0,0563	0,2461	0,2461	0,1826	0,1826	0,1198	0,1904	0,1412	-0,116	
LL	0,193	0,0747	0,1347	0,0819	0,1885	0,2406	0,1101	*	0,7714	0,6817	0,3724	0,617	0,723	0,4929	0,6416	0,671	0,4708	0,4064	0,4352	0,6128	0,4631	0,5391	0,573	0,4194	0,2533	0,2533	0,4896	0,4896	0,5876	0,4567	0,6629	0,2745	
LW	0,0751	0,0309	-0,076	0,0049	0,0418	0,1301	0,0928	0,7714	*	0,3472	0,2042	0,687	0,7236	0,3947	0,5389	0,6917	0,3097	0,2992	0,4298	0,5238	0,4151	0,4128	0,5434	0,301	0,2273	0,2273	0,4278	0,4278	0,4745	0,3855	0,5189	0,3198	
LD	0,2769	0,1429	0,2964	0,1541	0,3331	0,2723	0,1155	0,6817	0,3472	*	0,4416	0,1951	0,5114	0,4146	0,6181	0,4084	0,6161	0,4658	0,226	0,5173	0,4621	0,5621	0,4985	0,4445	0,2962	0,2962	0,32	0,32	0,5435	0,4121	0,5021	-0,056	
LT3W	0,1832	0,0869	0,2347	0,0222	0,146	0,2035	0,1236	0,3724	0,2042	0,4416	*	0,1018	0,5583	0,5939	0,4355	0,299	0,4023	0,5417	0,1654	0,5311	0,578	0,402	0,3458	0,292	0,3991	0,3991	0,3067	0,3067	0,4971	0,3966	0,3481	-0,065	
LT3L	0,127	0,1271	0,0299	0,1413	0,0434	0,1416	0,1659	0,617	0,687	0,1951	0,1018	*	0,5013	0,3856	0,3696	0,5	0,2419	0,1796	0,407	0,3437	0,3027	0,3163	0,3475	0,211	0,1511	0,1511	0,3828	0,3828	0,3268	0,3276	0,3479	0,3177	
LTLW	0,1557	0,0803	0,0666	-0,014	0,1091	0,1642	0,1037	0,723	0,7236	0,5114	0,5583	0,5013	*	0,635	0,6416	0,6292	0,4682	0,5221	0,3435	0,6783	0,5737	0,5683	0,6605	0,3366	0,5139	0,5139	0,4857	0,4857	0,649	0,5421	0,6203	0,1593	
LTL	0,3129	0,3185	0,2607	0,2343	0,2902	0,3297	0,2316	0,4929	0,3947	0,4146	0,5939	0,3856	0,635	*	0,4735	0,4157	0,3721	0,4322	0,2757	0,5634	0,5689	0,3997	0,3991	0,3204	0,4443	0,4443	0,2573	0,2573	0,536	0,5163	0,442	-0,003	
BL1	0,2506	0,154	0,2	0,0798	0,2119	0,2419	0,1664	0,6416	0,5389	0,6181	0,4355	0,3696	0,6416	0,4735	*	0,7008	0,8625	0,7682	0,4587	0,792	0,7668	0,8967	0,8377	0,5924	0,5024	0,5024	0,6778	0,6778	0,823	0,7244	0,5988	-0,135	
BW1	0,1016	0,0322	0,0126	0,0089	0,0502	0,1832	0,1651	0,671	0,6917	0,4084	0,299	0,5	0,6292	0,4157	0,7008	*	0,4515	0,4103	0,7152	0,6589	0,5178	0,6311	0,7343	0,3453	0,3022	0,3022	0,583	0,583	0,6527	0,5151	0,5718	0,1639	
BD1	0,2531	0,1747	0,2578	0,1426	0,2901	0,2532	0,1568	0,4708	0,3097	0,6161	0,4023	0,2419	0,4682	0,3721	0,8625	0,4515	*	0,7425	0,2652	0,6326	0,6084	0,8047	0,6767	0,5994	0,4776	0,4776	0,5431	0,5431	0,7472	0,6585	0,4365	-0,164	
BT3W1	0,2288	0,2186	0,1924	0,0065	0,182	0,1906	0,1135	0,4064	0,2992	0,4658	0,5417	0,1796	0,5221	0,4322	0,7682	0,4103	0,7425	*	0,0849	0,7911	0,695	0,7352	0,6148	0,4603	0,5911	0,5911	0,5037	0,5037	0,7898	0,7249	0,5356	-0,177	
BT3L1	0,0154	0,013	-0,036	0,0201	-0,034	0,0664	0,0786	0,4352	0,4298	0,226	0,1654	0,407	0,3435	0,2757	0,4587	0,7152	0,2652	0,0849	*	0,3277	0,3391	0,4375	0,4926	0,2765	0,1106	0,1106	0,5269	0,5269	0,311	0,2791	0,2922	0,1353	
BTLW1	0,1552	0,1939	0,0695	-0,032	0,137	0,1912	0,0836	0,6128	0,5238	0,5173	0,5311	0,3437	0,6783	0,5634	0,792	0,6589	0,6326	0,7911	0,3277	*	0,7916	0,7156	0,6879	0,4633	0,5012	0,5012	0,51	0,51	0,8576	0,6817	0,6824	-0,037	
BTL1	0,2907	0,2636	0,228	0,0488	0,2136	0,2623	0,1391	0,4631	0,4151	0,4621	0,578	0,3027	0,5737	0,5689	0,7668	0,5178	0,6084	0,695	0,3391	0,7916	*	0,6862	0,6659	0,4763	0,4953	0,4953	0,5253	0,5253	0,7558	0,6878	0,5001	-0,174	
BL5	0,2721	0,2129	0,2036	0,0961	0,2161	0,2127	0,1561	0,5391	0,4128	0,5621	0,402	0,3163	0,5683	0,3997	0,8967	0,6311	0,8047	0,7352	0,4375	0,7156	0,6862	*	0,8734	0,7158	0,5744	0,5744	0,7697	0,7697	0,8416	0,7971	0,5082	-0,229	
BW5	0,1821	0,0973	0,0996	0,0076	0,1677	0,176	0,1029	0,573	0,5434	0,4985	0,3458	0,3475	0,6605	0,3991	0,8377	0,7343	0,6767	0,6148	0,4926	0,6879	0,6659	0,8734	*	0,4735	0,5041	0,5041	0,7552	0,7552	0,7932	0,7051	0,5459	-0,082	
BD5	0,223	0,3012	0,1977	0,1063	0,21	0,1455	0,0563	0,4194	0,301	0,4445	0,292	0,211	0,3366	0,3204	0,5924	0,3453	0,5994	0,4603	0,2765	0,4633	0,4763	0,7158	0,4735	*	0,3567	0,3567	0,4687	0,4687	0,5424	0,5109	0,3109	-0,243	
BT3W5	0,283	0,2564	0,2283	0,116	0,2271	0,1976	0,2461	0,2533	0,2273	0,2962	0,3991	0,1511	0,5139	0,4443	0,5024	0,3022	0,4776	0,5911	0,1106	0,5012	0,4953	0,5744	0,5041	0,3567	*	1	1	0,4221	0,4221	0,62	0,677	0,3417	-0,156
BT3L5	0,283	0,2564	0,2283	0,116	0,2271	0,1976	0,2461	0,2533	0,2273	0,2962	0,3991	0,1511	0,5139	0,4443	0,5024	0,3022	0,4776	0,5911	0,1106	0,5012	0,4953	0,5744	0,5041	0,3567	1	*	0,4221	0,4221	0,62	0,677	0,3417	-0,156	
BTLW5	0,2033	0,1248	0,1119	0,0979	0,1339	0,1849	0,1826	0,4896	0,4278	0,32	0,3067	0,3828	0,4857	0,2573	0,6778	0,583	0,5431	0,5037	0,5269	0,51	0,5253	0,7697	0,7552	0,4687	0,4221	0,4221	*	1	0,6251	0,6758	0,3866	-0,044	
BTL5	0,2033	0,1248	0,1119	0,0979	0,1339	0,1849	0,1826	0,4896	0,4278	0,32	0,3067	0,3828	0,4857	0,2573	0,6778	0,583	0,5431	0,5037	0,5269	0,51	0,5253	0,7697	0,7552	0,4687	0,4221	0,4221	1	*	0,6251	0,6758	0,3866	-0,044	
vyska	0,2024	0,1824	0,1365	0,0455	0,1988	0,2223	0,1198	0,5876	0,4745	0,5435	0,4971	0,3268	0,649	0,536	0,823	0,6527	0,7472	0,7898	0,311	0,8576	0,7558	0,8416	0,7932	0,5424	0,62	0,62	0,6251	0,6251	*	0,8215	0,5663	-0,107	
vyska2	0,3069	0,3117	0,2083	0,1176	0,2376	0,2486	0,1904	0,4567	0,3855	0,4121	0,3966	0,3276	0,5421	0,5163	0,7244	0,5161	0,6585	0,7249	0,2791	0,6817	0,6878	0,7971	0,7051	0,5109	0,677	0,677	0,6758	0,6758	0,8215	*	0,3931	-0,203	
nody	0,2348	0,2268	0,1758	0,0776	0,2401	0,2642	0,1412	0,6629	0,5189	0,5021	0,3481	0,3479	0,6203	0,442	0,5988	0,5718	0,4365	0,5356	0,2922	0,6824	0,5001	0,5082	0,5459	0,3109	0,3417	0,3417	0,3866	0,3866	0,5663	0,3931	*	0,3698	
PrLod																																	

Příloha 4: Fotografická příloha



Označení rostlin v opylovacím pokusu.



Zakrytí pokusných rostlin v opylovacím pokusu