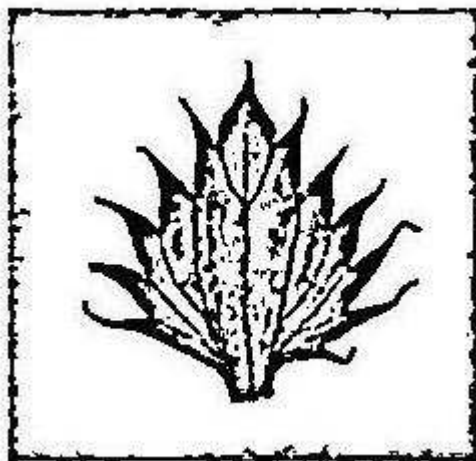


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce
**Morfologická variabilita druhů *Euphrasia stricta* a
*Euphrasia nemorosa***

2008



Šárka Svobodová

Školitel: ing. Milan Štech, Ph.D.

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.

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. A review of the studied genera and hybridization was worked up. Morphological variation of *Euphrasia stricta*, *Euphrasia nemorosa* and morphologically intermediate populations was investigated using conventional and geometric morphometric methods. Isolation and optimization for PCR of ITS, matK and trnT-trnL regions has been made.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30.4.2008

Šárka Svobodová

Poděkování

Je mou milou povinností na tomto místě poděkovat všem, kteří mi byli během mé práce nápomocni.

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli Milanovi Štechovi za jeho trpělivost, množství cenných rad jak v terénu, tak při zpracovávání dat, a také za množství času, které mi věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat Ester Ekrtové za to, že se mnou navštívila některé lokality. Za pomoc v laboratoři bych chtělo poděkovat především Jakubovi Těšitelovi, Honzovi Chlumskému a Mirce Herbstové.

Kolegům a kamarádům v pracovně 116 na vile a laboratoři 301A bych chtěla poděkovat za vytváření přátelského a inspirativního prostředí pro práci.

Rovněž bych ráda poděkovala svým přátelům mimo fakultu za jejich podporu a za mnohé rady především technického rázu.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mi byla a je velkou oporou, a jejich trpělivost, důvěru a pochopení.

Děkuji.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Cíle práce	2
2. Literární přehled	3
2.1. Rod <i>Euphrasia</i> L.	3
2.2. Vymezení druhů v rodě <i>Euphrasia</i>	5
2.3. Vnitrorodové členění	5
2.4. Hybridizace v rodě <i>Euphrasia</i>	6
2.4.1. Velikost květů a typ rozmnožování	7
2.4.2. Ploidní úroveň	8
2.4.3. Hybridizace mezi diploidy a tetraploidy	8
2.5. Popis taxonů	9
2.5.1. <i>Euphrasia stricta</i> J.F.Lehm	9
2.5.2. <i>Euphrasia nemorosa</i> Pers	11
2.5.3. <i>Euphrasia</i> × <i>haussknechtii</i> Wettst.	12
2.6. Morfometrie	12
2.6.1. Morfometrie rodu <i>Euphrasia</i>	14
3. Metodika	15
3.1. Morfometrická analýza	15
3.1.1. Sběr a zpracování materiálu	15
3.1.2. Klasická morfometrie	16
3.1.2.1. Statistické zpracování dat	19
3.1.3. Geometrická morfometrie	20
3.1.3.1. Statistické zpracování dat	21
3.2. Molekulární metody	22
3.2.1. Sběr materiálu	22
3.2.2. Izolace DNA	22
3.2.3. PCR, purifikace a příprava sekvenční směsi	23
3.3. Nomenklatura	24
4. Výsledky	25
4.1. Morfometrické analýzy	25
4.1.1. Klasická morfometrie	25
4.1.1.1. Shluková analýza	25

4.1.1.2. Analýza hlavních komponent.....	27
4.1.1.3. Kanonická diskriminační analýza	30
4.1.1.4. Klasifikační diskriminační analýza	35
4.1.2. Geometrická morfometrie	39
4.2. Molekulární metody	42
5. Diskuse.....	43
5.1. Morfometrické analýzy.....	43
5.2. Molekulární metody	45
6. Závěr.....	46
7. Citovaná literatura	47

Přílohy:

Příloha 1: Seznam lokalit

Příloha 2: Počty analyzovaných rostlin

Příloha 3: Spearmanovy korelační koeficienty

Příloha 4: Koeficienty klasifikační funkce pro *E. stricta*, *E. nemorosa* a populaci z Kozénku.

Příloha 5: Koeficienty klasifikační funkce pro *E. stricta*, *E. nemorosa*, přechodné populace [*E. (interm.)*] a populaci z Kozénku.

Příloha 6: Fotografická příloha

1. Úvod

Vymezení rostlinných druhů na území střední Evropy není ve většině případů příliš komplikované. Přesto existuje několik skupin, které činí v různé míře potíže při determinaci. V první řadě jsou to plně nebo částečně apomiktické skupiny (např. rody *Rubus*, *Rosa*, *Alchemilla*, *Hieracium*), u kterých specifický způsob reprodukce vedl ke vzniku velkého množství drobných, ale z větší části dobře vymezených taxonů. K jejich rozlišování je nutná velká zkušenost a zpravidla je ho schopno jen několik málo specialistů. Skupiny, u kterých není známa apomixie, zpravidla ve středoevropské květeně až na několik málo výjimek determinační potíže nečiní. K oněm výjimkám můžeme řadit i rod *Euphrasia* L., který patří mezi nejkomplikovanější a nejobtížnější rody v české i evropské květeně (Smejkal 1963). Tato skutečnost je způsobena hlavně značnou habituální podobností většiny druhů, velkou vnitrodruhovou genetickou variabilitou, fenotypovou plasticitou a velmi častou hybridizací. Rovněž je v tomto rodě patrná tendence tvořit lokální endemity (Yeo 1955, Smejkal & Dvořáková 2000).

Již samotné vymezení druhů v rodu *Euphrasia* je poměrně obtížné a autoři se s ním potýkají už od počátků jeho studia. Jedním z extrémních přístupů bylo hodnocení téměř všech taxonů vyskytujících se na severní polokouli v rámci jediného druhu *Euphrasia officinalis* (např. Townsend 1884). V něm pak však přesto rozlišoval některé vnitrodruhové formy. V hodnotě samostatných druhů byly v tomto pojetí rozlišovány jen ty morfologicky nejodlišnější. Asi nejvýznamnější prací zabývající se taxonomií rodu je Wettsteinova Monografie (Wettstein 1896a). Jím navržený druhový koncept je víceméně, s některými výhradami přijímán dodnes (Yeo 1978, Vitek 1998). Druhým extrémem bylo nekritické popisování i drobných odchylek jako nových druhů (Sennen 1916, 1930), jež dnešní kritický pohled neuznává (Vitek 2001). Přesto jsou stále popisovány nové druhy a poddruhy, především Vitekem (Vitek 1985a, b), který je v současné době specialistou na rod *Euphrasia*.

Příčin obtížné determinace a vymezení druhů je v rodě *Euphrasia* několik. Jednou z nejvýznamnějších je zřejmě způsob reprodukce. V rodě je velmi častá autogamie, která dokonce u malokvětých druhů převažuje (např. Wettstein 1896a, Hartl 1974, Gómez 2002, Vitek 2002b). Není to však jediný způsob reprodukce, většina druhů je schopna allogamie. Dojde-li k hybridizaci, vzniklí hybridní jedinci se pak dále mohou množit autogamicky, především u malokvětých druhů, čímž jsou částečně stírány rozdíly mezi jednotlivými druhy

(např. Jørgensen 1919, Smejkal 1960, Vitek 1998). Vznikají tak zřejmě celé hybridní roje, které byly v minulosti i formálně popsány.

Studiem rodu *Euphrasia* na našem území se zabýval Smejkal (1958, 1960, 1963, 1964), který se pokusil o taxonomické zpracování našich druhů na úrovni daného poznání. Pro Květenu ČR zpracovala tento rod Dvořáková (Smejkal & Dvořáková 2000), která se drží Smejkalovy koncepce. Popsala rovněž i nový taxon, *E.corcontica* (Smejkal) Smejkal & Dvořáková (Dvořáková 1999). I přes detailní studie Smejkala, zůstala však celá řada problémů nevyjasněna a určování rodu stále činí potíže. Současné možnosti taxonomického studia nabízejí mnohem širší metodický aparát než bylo možno využít v 60. letech. A to jak formalizované hodnocení morfologické variability za použití moderních statistických metod, tak i využití molekulárních přístupů.

Ke své práci jsem si vybrala druhy *E. stricta* J.F.Lehm a *E. nemorosa* Pers., neboť v rámci rodu *Euphrasia* patří k našim nejproblematictějšími druhům. Za normálních podmínek nedělá determinace těchto druhů problém, ale ne vždy tomu tak je. Hlavní příčinou je hybridizace, díky níž vzniká *E. × haussknechtii* Wetst. (např. Wettstein 1893b, 1894, 1895), která svými znaky kolísá mezi oběma rodičovskými druhy. Oba tyto vybrané druhy nepůsobí problémy jen kvůli křížení mezi sebou, ale také ve vztahu k dalším druhům, jimiž jsou *E. slovaca* (Yeo) Holub či *E. tatarica* Fish u *E. stricta* a *E. coerulea* Hoppe et Fürnrohr a *E. curta* (Fries) Wettst. u *E. nemorosa* (Hartl 1974, Smejkal & Dvořáková 2000). Někdy bývá *E. tatarica* spojována s *E. stricta* a *E. curta* s *E. nemorosa*.

Pouze podrobnější výzkum rodu *Euphrasia* využívající různých metodických přístupů, může dále objasnit mikrospeciální 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.

1.1 Cíle práce

Ve své práci jsem se zaměřila na řešení následujících úkolů:

- Seznámit se s problematikou taxonomie rodu *Euphrasia* L. vypracováním literární rešerše.
- Počáteční studie morfologické variability druhů *E. stricta* a *E. nemorosa* za pomoci moderních metod klasické a geometrické morfometrie.
- Zvládnutí a optimalizace vybraných molekulárních technik na studovanou skupinu.

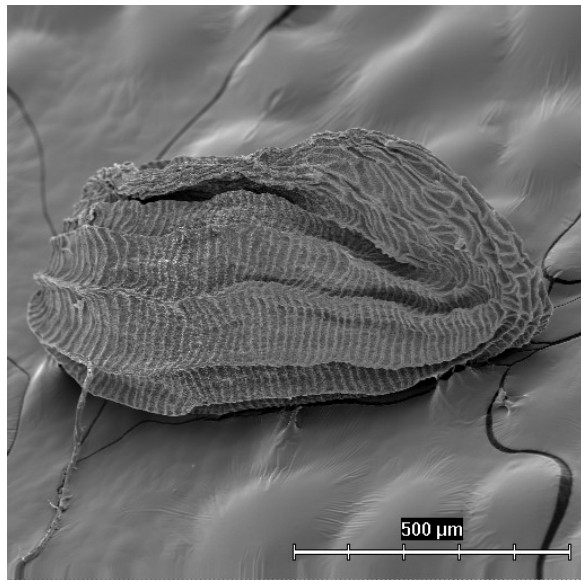
2. Literární přehled

2.1 Rod *Euphrasia* L.

Rod *Euphrasia* L. byl ještě donedávna řazen spolu s dalšími rody poloparazitických rostlin, jako jsou např. *Melampyrum* L. nebo *Rhinanthus* L., do tribu *Rhinantheae* čeledi *Scrophulariaceae*. Na základě recentních molekulárních studií se však ukázalo, že v tradičním vymezení není čeleď *Scrophulariaceae* monofyletická (Olmstead & Reeves 1995). Poloparazitické rody, včetně rodu *Euphrasia*, tak byly přiřazeny do čeledi *Orobanchaceae* (Olmstead et al 2001, Tank et al 2006).

Euphrasia L. je rod jednoletých či vytrvalých poloparazitických rostlin, ale i polokeřů (Wettstein 1896b, Reiche 1911, Hartl 1974, Hong et al. 1998, Smejkal & Dvořáková 2000). Největší skupinu druhů tvoří jednoleté druhy, které mají slabě vyvinutý kořenový systém. Hostiteli bývají nejčastěji různé druhy trav a ostřic (Koch 1891, Wettstein 1896b, Townsend 1897, Yeo 1964). Daří se jim ovšem i na dvouděložných rostlinách, jako jsou například zástupci čeledí *Caryophyllaceae*, *Asteraceae* nebo *Rubiaceae* (Wettstein 1896a, Crosby-Browne 1950, Yeo 1964). Světlíky mohou žít i bez vazby na hostitele, pak jsou však velmi malé, mnohem méně větvené a vyvíjejí jen několik málo květů (Wettstein 1896b, Seel & Press 1993, Vitek 2002a) Lodyhy jsou převážně oblé nebo mírně čtyřhranné. Listy jsou přisedlé až krátce řapíkaté, vstřícné, nejvýš 15(–20) mm dlouhé, na okraji pilovitě zubaté, vzácněji pilovitě vroubkované. Listeny jsou podobné lodyžním listům. Kalich je trubkovitě zvonkovitý, čtyřcípý. Cípy jsou celokrajné, většinou špičaté. Zářezy mezi cípy bývají nestejně hluboké, dva z nich jsou hlubší a sahají až do dolní třetiny kalicha. Květy jsou téměř přisedlé, souměrné, vyrůstají po jednom v úžlabí listenů v koncových klasech. Květenství jsou většinou poměrně bohatá a za plodu v dolní části rozvolněná. Barva koruny bývá bělavá (často s bledě nafialovělým horním pyskem), bledě fialová nebo bledě liláková, řidčeji poměrně sytě fialová. Některé druhy mají korunu žlutou, nebo se dokonce v jednom druhu mohou vyskytovat barevné mutace. Na spodním pysku je často fialové žilkování, což jsou cévní svazky zvýrazněné anthokyanovými barvivy, a žlutá skvrna při ústí korunní trubky. Korunní trubka se směrem ke koruně pozvolna rozšiřuje. Koruna je dvoupyská. Horní pysk je přilbovitý, mírně klenutý, s dvouzubým až dvoulaločným, nazpět ohnutým okrajem. Trojcípý dolní pysk bývá plochý a obvykle delší než horní. Cípy dolního pysku jsou mělce vykrojené. Květ obsahuje čtyři dvoumocné tyčinky, které jsou kryté horním pyskem. Tyčinky mají na bázi zašpičatělé prašné váčky, z nichž jeden u obou kratších tyčinek vybíhá v delší

špičatou ostruhu. Dvoupouzdrý semeník je elipsoidní, víceméně podélně zploštělý, s četnými obrácenými až hemitropními vajíčky, čnělka je dlouhá, s hlavatou bliznou. Tobolky bývají v obrysu obvejčité, eliptické až podlouhlé, ± podélně zploštělé, pouzdrosečné a mnohosemenné. Semena (Obr. 1) jsou malá, 1,0–2,5 mm dlouhá, podlouhle vejcovitá a podélně žebnatá (Jørgensen 1919, Hartl 1974, Smejkal & Dvořáková 2000).

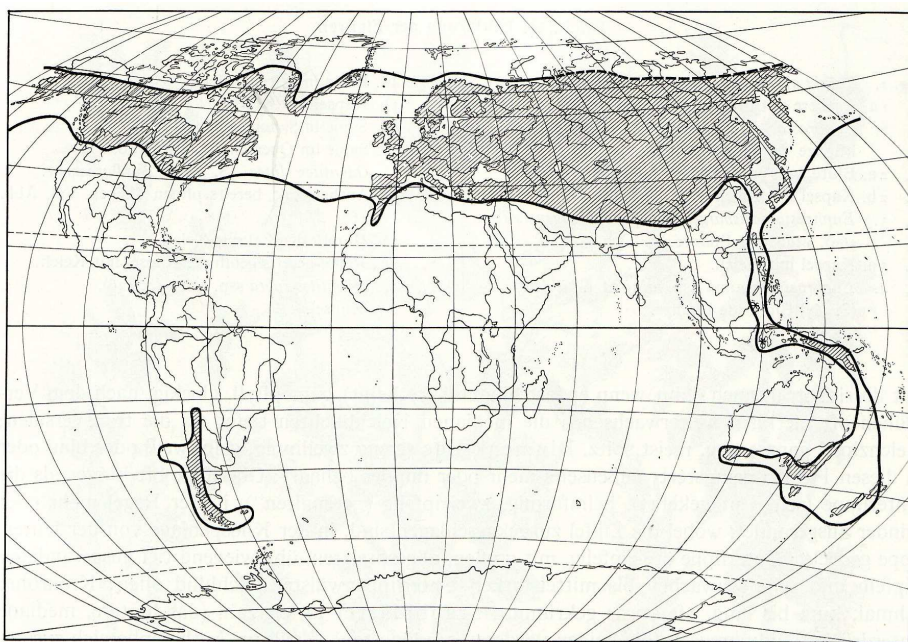


Obr.1: Semeno *Euphrasia nemorosa*. Fotografie byla pořízena scanovacím elektronovým mikroskopem JEOL JSM-6300 v Laboratoři elektronové mikroskopie. Foceno autorkou v rámci kurzu PřF JU „Elektronová mikroskopie pro biologie I“.

Rod *Euphrasia* je rozšířen především na severní polokouli, od subarktického po subtropický pás, přičemž nejvíce druhů se vyskytuje v mírném pásu. Některé druhy můžeme najít na Azorských ostrovech, v mírném pásu Jižní Ameriky, Austrálie a Nového Zélandu, na Filipínách, Borneu, Celebesu či Nové Guinei (Obr. 2; Jørgensen 1919, Yeo 1973, Hartl 1974, Smejkal & Dvořáková 2000).

Jedním z mnoha diskutovaných témat v rámci rodu *Euphrasia* byla i typifikace druhu *E. officinalis* L. Někteří autoři, jako např. Pugsley (1930), Smejkal (1963) nebo Yeo (1978), jej jako nomenklatorický typ odmítali. Důvodem byla skutečnost, že tento druh byl Linnéem doložen heterogenním materiálem. V současné době je ovšem jako lektotyp přijímána *E. officinalis* Hayne var. *fennica* (Kihlman) Jalas (Silverdine 1991), která byla popsána finskými botaniky (Jalas & Kukkonen 1973, Jalas 1977). Jedná se o jednu Linnéovu položku, druhá odpovídá *E. rostkoviana* ssp. *rostkoviana*. Poslední z jeho originálních položek odpovídá *E. tricuspidata*, o níž však nebylo zdaleka tolik diskutováno jako o prvních dvou.

V celém rodě se vyskytuje protogynie, entomogamie, autogamie a anemochorie (Smejkal & Dvořáková 2000).



Obr. 2: Mapa rozšíření rodu *Euphrasia* ve světě (převzato z Hartl 1974)

2.2. Vymezení druhů v rodě *Euphrasia*

V rodě *Euphrasia* bývá rozlišováno přibližně od 100 do 250 (–300) druhů (Hartl 1974, Smejkal & Dvořáková 2000, Vitek 2002a), přičemž záleží na taxonomickém pojetí toho kterého autora. Někteří botanici (např. Sennen 1930) používali úzké pojetí druhu, což vedlo k popsání stovek druhů světlíků. Mnoho z nich bylo postupně hodnoceno jako poddruhy či variety jiných druhů. V důsledku toho dnes existuje pro každý druh několik různých synonym (Wettstein 1893b, 1894, 1895; Rothmaler 1935, Vitek 1985a, 1985b, 1986).

Hlavními znaky používanými k rozlišování druhů v rodu *Euphrasia* jsou velikost a barva květů, přítomnost trichomů a jejich typ (žláznaté/nežláznaté), přítomnost osinek na listenech, forma růstu, tvar listenů a ekologické prostředí (např. Vitek 2002a). Proto je třeba, aby byly jednotlivé taxony určovány nejen na základě morfologických vlastností, ale i s ohledem na ekologii.

2.3. Vnitrorodové členění

Vnitřní dělení rodu *Euphrasia* je značně komplikované. Je to způsobeno velkou variabilitou druhů, na níž se v různé míře podílí několik faktorů: vnitrodruhová variabilita,

sezónní dimorfismus, fenotypová plasticita a hybridizace. Sezónní dimorfismus je jev, kdy se během téhož vegetačního období dají rozlišit dva fenologicky odlišné typy, časný (aestivánlí) a pozdní (autumnání). Oba typy se vyznačují vlastním habitem, a tak bývá častokrát zvažován jako jedno z kritérií taxonomické klasifikace (Smejkal & Dvořáková 2000, Vitek 2002b). Jednou z teorií vzniku sezónního dimorfismu je diferenciacce původně monomorfních typů v období pleistocénu, kdy se v podmínkách periglaciálního klimatu vyčlenil aestivální typ. Jedinci autumnálního typu 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, proto tato jeho teorie není zřejmě platná.

Autorem prvního užívaného členění tohoto rodu je Wettstein (1896a, b), který jej dělil na dvě sekce, *Eueuphrasia* Wettst. a *Trifidae* Benth., která obsahuje jihoamerické druhy. Sekci *Eueuphrasia* dále rozdělil na subsekcce *Semicalcaratae*, zahrnující světlíky severní polokoule, a *Australes*, která obsahuje druhy Austrálie a Nového Zélandu. Až potud bývá toto rozdělení přijímáno většinou autorů. Avšak další dělení subsekcce *Semicalcaratae* bývá často diskutované (např. Wettstein 1896b, Jørgensen 1919, Pugsley 1930, Yeo 1978) a autoři se na něm doposud neshodli. Vnitřní skupiny rodu bývají tvořeny na základě odění, velikosti květů či přítomnosti osinek. Tyto znaky však mohou být v některých skupinách rodu dosti variabilní.

2.4. Hybridizace v rodu *Euphrasia*

Hybridizace hraje v evoluci cévnatých rostlin významnou roli (Ellstrand et al. 1996). V mnohých skupinách je recentní nebo nedávná hybridizace důležitým zdrojem variability. Aby se mohly entomogamní druhy křížit, je třeba, aby se vyskytovaly sympaticky na podobných lokalitách a aby se alespoň částečně překrývala doba jejich květu. Zároveň musí být jejich genetická inkompatibilita a další izolační faktory co nejmenší (Briggs & Watlers 1997).

Solbrig (1970) uvádí, že hybridizace mezi jednoletými rostlinami je vzácná, přesto se v rodě *Euphrasia*, i v blízkce příbuzném rodě *Rhinanthus* (Sterneck 1901, Kwak 1978, Ducarme & Wesselingh 2005) vyskytuje poměrně hojně a je jednou v hlavních příčin současné variability v tomto rodě (Karlsson 1976). Přes některé izolační faktory (zejména ploidie) bylo popsáno značné množství kříženců, např. *E.* × *haussknechtii* Wetst.

(*E. nemorosa* × *E. stricta*), *E. × lerschii* Gyöffy (*E. slovacica* × *E. uechtriziana*) (např. Wettstein 1893b, 1894, 1895, Sagorski 1896, Vitek 1982). Některé z nich se v přírodě vyskytují dosti hojně, a to i bez přímého kontaktu s rodičovskými druhy.

2.4.1. Velikost květů a typ rozmnožování

Květy světlíků jsou primárně adaptovány k entomogamii, a tím pádem k allogamii, neboť jsou nápadné a pro hmyz atraktivní. Předpokládá se však, že všechny druhy jsou schopné se rozmnožovat autogamicky, ovšem záleží na míře, v jaké jsou toho schopni (Liebst & Schneller 2005), což souvisí s funkční jednopohlavností květů. Velkokvěté druhy preferují opylení hmyzem, zatímco malokvěté dávají ve většině případů přednost samoopylení. Apomixie nebyla v tomto rodě prokázána (Yeo 1968).

Abychom pochopili, proč se některé druhy světlíků kříží s jinými častěji než jiné, je třeba se zmínit zejména o velikost jejich květu a typu rozmnožování.

Velkokvěté druhy světlíků preferují opylení hmyzem, zatímco malokvěté dávají ve většině případů přednost samoopylení. Je to dáno tím, že se pravděpodobně přibližují doby dozrávání blizen a tyčinek a také zmenšováním prostorového rozdílu (u malokvětých druhů je blizna mnohem blíže tyčinkám než u druhů velkokvětých). Wettstein (1896a) rozlišuje 3 skupiny druhů světlíků podle velikosti květu.

Velkokvěté druhy (jako např. *E. rostkoviana*, *E. vesicolor* nebo *E. picta*), které mívají korunu dlouhou zpravidla 12–15 mm (měřeno na hřbetní straně plně vyvinuté koruny), jsou protogynní. Po opylení se prodlužuje koruna a otevírají se prašníky. Prodloužení koruny a ohnutí blizny způsobí její přiblížení k tyčinkám, které jsou přirostlé ke korunní trubce. Objeví-li se v této fázi na květu hmyz, pouze odnese pyl a k opylení už nedochází, protože blizna je již nefunkční. Tím je u těchto druhů víceméně zabráněno samoopylení. Přesto se u nich autogamie může vyskytnout. Pyl může být přenesen z jednoho květu na druhý v rámci jedné rostliny (Jørgensen 1919, Yeo 1966, Hartl 1974). Kerner (1888) však uvádí i možnost autogamie v rámci jednoho květu na konci doby kvetení, a to pokud nebyl daný květ opylen. Tento údaj je však zřejmě pochybný.

Druhou skupinu tvoří druhy se středně velkými květy (např. *E. stricta* nebo *E. pulchella*), jejichž koruna dosahuje délky 8–10 mm. Tyto druhy bývají opylovány hmyzem, avšak samoopylení u nich není zdaleka tak vzácné jako u velkokvětých druhů. K dozrávání tyčinek u nich totiž dochází dříve a blizna je jim blíže.

Druhy s malými květy, 4–7 mm dlouhými, se přednostně rozmnožují autogamicky (Gómez 2002). V okamžiku otevření květu bývají již prašníky puklé. Květ tak již od samého začátku funguje jako funkčně oboupohlavný. Čnělka však brzy vadne a květ pak funkčně slouží již jen jako samčí. Blizna se nachází těsně u prašníků. Proto se u těchto druhů vyskytuje samoopylení velmi často hned při rozkvětu jednotlivých květů (Yeo 1966, Hartl 1974).

2.4.2. Ploidní úroveň

Jiným faktorem ovlivňujícím možnost hybridizace u světlíků je jejich ploidní úroveň. V rodě *Euphrasia* nalezneme pouze dvě ploidní úrovně – diploidní ($n = 11$) a tetraploidní ($n = 22$) (Yeo 1954, Hamblen 1954, Vitek 1990). Hybridizace probíhá především v rámci stejné ploidní úrovně (diploidní druhy s diploidními a tetraploidní s tetraploidními) (Yeo 1966), což je případ i druhů *E. stricta* a *E. nemorosa*, které jsou tetraploidní (Yeo 1954, 1966). Hybridizace mezi ploidními úrovněmi je zřejmě vzácná a triploidní rostliny se mohou vyskytnout jen velmi vzácně (Yeo 1954, 1966).

Jak dokazuje např. Yeo (1954), hybridizace je velmi častá zvláště mezi tetraploidními druhy druhů, jimiž jsou i *Euphrasia stricta* J.F.Lehm. a *Euphrasia nemorosa* (Pers.) Wallr. (Hartl 1978), kterými se ve své bakalářské práci zabývám. Tentýž autor (Yeo 1956) současně uvádí i možnost hybridizace mezi diploidy a tetraploidy, např. *E. anglica* Pugsley a *E. micrantha* Rchb. Hybridizace mezi diploidy zřejmě taktéž existuje, i když není autory příliš zmiňovaná (Smejkal & Dvořáková 2000)

2.4.3. Hybridizace mezi diploidy a tetraploidy

Přestože se na základě Yeovy studie (Yeo 1966) zdá, že by k opylení diploidního jedince tetraploidním mohlo docházet méně často než u jedinců v rámci jedné ploidie, nejde zřejmě o tak vzácnou skutečnost, jak by se z frekvence nalezení triploidních jedinců mohlo zdát (Yeo 1956, 1966). Důvodem, proč jsou triploidní rostliny k nalezení jen velmi vzácně [Yeo (1954, 1956) uvádí jediného v přírodě pozorovaného jedince, křížence mezi *E. anglica* Pugsley a *E. micrantha*. V naší květeně je uváděno několik hybridů, např. *E. × hybrida* Wettst. (*E. rostkoviana* subsp. *rostkoviana* × *E. stricta*), které jsou však většinou uváděny pouze z jediného pozorování (Smejkal & Dvořáková 2000)] je zřejmě další vývoj embrya. Ten zřejmě velmi často závisí na mateřské rostlině, zda-li je diploidní či tetraploidní.

V případě, že byla diploidní mateřská rostlina opylena tetraploidním pylem, tobolky se vyvinou normálně, i když někdy poněkud opožděně. Yeo ve své studii (1966) uvádí, že většinou obsahovaly běžný počet normálně velkých, ovšem prázdných nebo téměř prázdných semen.

Byla-li mateřská rostlina tetraploidní, normálně velká prázdná semena se nevyskytovala. Je to dáno tím, že tetraploidní rostliny opylené diploidním pylem nejsou ve většině případů schopny dalšího vývoje semeníku. Výjimečně však k němu může dojít, a tak ve velmi vzácných případech dochází ke vzniku triploidního jedince (Yeo 1966).

2.5. Popis taxonů

2.5.1. *Euphrasia stricta* J.F.Lehm.

Světlík tuhý (*Euphrasia stricta*) je (2–) 5–30 (–50) cm vysoká bylina s přímou, často větvenou lodyhou. Větve (obvykle v počtu 2–6 i více párů) jsou dlouhé a s lodyhou svírají ostrý úhel. Lodyha je narudlá nebo šedě nafialovělá, nazpět kučeravě pýřitá. Dolní lodyžní listy jsou v obrysu obvejčité až úzce obvejčité, na bázi klínovité, s 1–2 páry tupých zubů. Střední a horní lodyžní listy vejčité, na bázi klínovité, asi dvakrát delší než široké, se 3–5 páry zubů. Zuby jsou většinou úzce trojúhelníkovité, osinkaté (řidčeji bezosinné), namířené k vrcholu listu, kdy je distální strana zubu zřetelně delší než strana proximální (Smejkal & Dvořáková 2000, Smejkal 1963). Listeny jsou podobné horním lodyžním listům, jsou však obvykle širší, vejčité, na bázi krátce klínovité, špičaté, se 4–7 páry osinkatých zubů. Osinky jsou nápadné a často pokroucené. Listy a listeny mají zelenou nebo našedle zelenou, hnědou či rezavou barvu, za sucha zřídka černají, na rubu jsou hladké a ploché (zřídka mírně svraskalé), lysé. Květenství je zpočátku husté a krátké, později se však značně prodlužuje a řídne. (5–) 6–10 (–11) mm dlouhé květy jsou skoro přisedlé, obvykle bělavé nebo bledě lilákové, řidčeji modravé až skoro fialové. Spodní pysk je světlejší a delší než horní. Kalich bývá úplně lysý, zřídka mívá kratičké štětinky, s úzkými, kopinatými osinkatými cípy. Plodem je klínovitě obvejčitá tobolka, která bývá na vrcholku utáta nebo mělce vykrojená a obvykle kratší než kalich. Na jeho okraji a vrcholku se vyskytují dlouhé přímé štětinaté brvy (Smejkal 1963).

Mnohými autory (např. Jørgensen 1919, Smejkal 1963, Hartl 1974, Kolseth & Lönn 2005) bývají v rámci druhu *E. stricta* rozlišovány různé poddruhy či variety. Bývají rozlišovány na základě morfologických znaků nebo podle toho. Toto dělení je diskutabilní vzhledem k vnitrodruhové variabilitě, fenotypové plasticitě a ekologickým podmínkám.

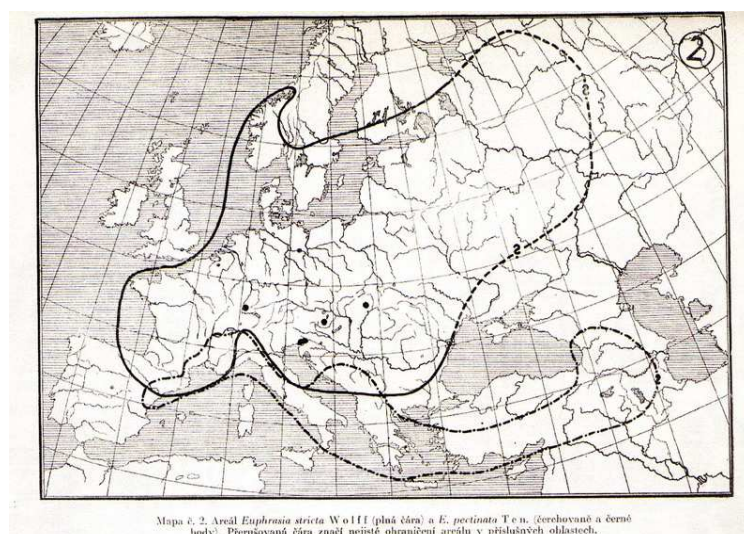
Pravděpodobně i z těchto důvodů již nejsou Smejkalem (Smejkal 1963) rozlišované poddruhy (*E. stricta* subsp. *stricta* a *E. stricta* subsp. *suecica*) uváděny v Květeně České republiky (Smejkal & Dvořáková 2000). Zároveň se v oblastech výskytu *E. stricta* s *E. tatarica* vyskytují rostliny přechodných typů, což znesnadňuje jejich zařazení k jednotlivým druhům. Někdy také bývá *E. tatarica* zahrnována do druhu *E. stricta*, protože se od ní odlišuje větvením a především oděním, přičemž tyto znaky bývají ovlivněny pravděpodobnou hybridizací obou druhů. Podobně problematické jsou populace na styku areálů s *E. pectinata* (Yeo 1971), která však bývá často slučována s *E. tatarica* (Smejkal & Dvořáková 2000).

Areál výskytu *E. stricta* zahrnuje téměř celé území Evropy, s výjimkou extrémního severu a jihu (viz Obr. 3; Wettstein 1893b, 1894, 1895, Yeo 1978, Smejkal & Dvořáková 2000).

Na našem území se *E. stricta* vyskytuje roztroušeně v celém území od planárního a zejména kolinného až do submontánního stupně. V montánním a supramontánním stupni se vyskytuje vzácně a v alpínském stupni ojediněle (Smejkal & Dvořáková 2000).

Druh *E. stricta*, který je spolu s *E. rostkoviana* subsp. *rostkoviana* naším nejhojnějším světlíkem, preferuje suché louky, pastviny, meze, úbočí úvozních cest, lesní světliny a okraje, křovinaté stráně apod. (Smejkal 1964, Smejkal & Dvořáková 2000). *E. stricta* se vyskytuje na vápnatých (Yeo 1978), neutrálních i na slabě kyselých, eutrofních až oligotrofních půdách (Hartl 1974).

Smejkal (1964, Smejkal & Dvořáková 2000) uvádí těžiště výskytu ve společenstvech *Nardo-Callunetea*, zvláště svazů *Genistion* a *Violion caninae*. Dále jej uvádí s různým stupněm četnosti ve společenstvech řádu *Arrhenatheretalia* a v některých společenstvech třídy *Festuco-Brometea*.



Obr. 3: Rozšíření *Euphrasia stricta* (plná čára) (převzato ze Smejkal 1963)

2.5.2. *Euphrasia nemorosa* Pers.

Světlík větvený (*Euphrasia nemorosa* Pers.) je jednoletá, 5–25 (–40) cm vysoká bylina. Lodyha je má narudlou nebo šedavě nafialovělou barvou. Bývá zpravidla nápadně tlustá, řidčeji tenká, nazpět kučeravě pýřitá. V dolní polovině, obvyčejně již od samé báze, bývá bohatě větvená. Větve bývají nejčastěji šikmo odstálé (s lodyhou svírají málo ostrý úhel), víceméně navzájem rovnoběžné, často opětovně větvené. Zřídka je lodyha jen chudě větvená. Dolní lodyžní listy jsou podlouhlé nebo kopinatě vejčité, tupé, s 1–3 páry tupých zubů. Prostřední a horní lodyžní listy jsou vejčité až podlouhle vejčité, tupé nebo tupě špičaté, se 4–7 páry tupých nebo ± zašpičatělých zubů. Listeny jsou širší, ale kratší než horní lodyžní listy, vejčité nebo široce vejčité, špičaté se 4–6 (–7) páry špičatých neosinkatých, nebo sotva zřetelně osinkatých, zubů. Listeny jsou šikmo nebo rovnoběžně odstálé, někdy mohou být dolů sehnuté. Listy a listeny jsou zcela lysé, masité, tmavě zelené. Za živa bývají (zvláště na líci) lesklé, za sucha nelesklé a na rubu vrásčité svraskalé se silně vyniklou žilnatinou. Hlavní květenství zpočátku husté a krátké, později se rychle prodlužuje, pak je dlouhé a v dolní části přetrhávané. Květy jsou přisedlé, kalich bývá lysý a za plodu slabě nafouklý, se špičatými, ale neosinkatými cípy. Koruna bývá malá, (4–) 5 (–6) mm dlouhá, bělavá, namodralá až modrá. Spodní pysk je malý, zděli horního. Tobolka je podlouhle vejčitá, uťatá nebo mělce vykrojená, na vrcholku a na okraji s přímými štětinatými brvami. Za plodu bývá stejně dlouhá nebo o trochu delší než kalich. Kvete od konce července do září, někdy do října (Smejkal 1963).

V pojetí některých autorů (např. Yeo 1978) bývá do *E. nemorosa* zahrnována *E. curta*, a to především v místech jejich společného výskytu. Důvodem je značná proměnlivost důležitějších morfologických znaků používaných k jejich determinaci (odení či přítomnost osinek na listenech).

Euphrasia nemorosa je atlantský a subatlantský druh (Smejkal 1960). Vyskytuje se od severního Španělska, přes Francii, Velkou Británii, střední Evropu (s výjimkou Alp), Skandinávii [přestože Jørgensen (1919) ji ve své práci nezmiňuje, Pugsley (1930) i Yeo (1978) uvádějí výskyt *E. nemorosa* i z tohoto území], Karpaty, jižní Polsko zřejmě až do středního Ruska. Rovněž jej můžeme najít v Severní Americe (Hartl 1974).

U nás se vyskytuje téměř výhradně ve fytochorionech Českomoravského mezofytika a v nižších polohách Českomoravského oreofytika. Většina lokalit leží v suprakolinním a submontánním stupni (nadmořská výška 400 – 700 m). Vzácně se vyskytuje taktéž v planárním, kolinním a montánním stupni (Smejkal & Dvořáková 2000).

Druh *E. nemorosa* můžeme nalézt na suchých loukách, pastvinách, vřesovištích, hrázích rybníků, travnatých polních cestách a mezích či lesních okrajích a světlinách (Smejkal 1963, 1964, Smejkal & Dvořáková 2000). Z ekologického hlediska může být tento druh srovnáván s *E. stricta*, oproti němuž však jeví výraznější nitrofilní charakter. To mu umožňuje výskyt i v lemech polních cest a v návesních trávnicích (Smejkal & Dvořáková 2000).

Těžištěm výskytu *E. nemorosa* jsou společenstva třídy *Nardo-Callunetea*, zvláště svazy *Violion caninae* a *Genistion*. Vyskytuje se ovšem i v některých společenstvech řádu *Arrhenatheretalia*, především svazu *Cynosuron*.

2.5.3. *Euphrasia* × *haussknechtii* Wettst.

Hybridizací *E. stricta* a *E. nemorosa* vzniká *E. × haussknechtii* Wettst. (Wettstein 1893b, 1894, 1895, Smejkal 1963), který je naším nejhojnějším křížencem světlíků. Taxon kolísá ve svých znacích mezi oběma rodičovskými druhy. Přestože *E. × haussknechtii* tvoří jak formy intermediárního vzhledu, tak jedince blížící se jednomu nebo druhému rodičovskému druhu, rostliny v jednotlivých populacích bývají svým vzhledem poměrně jednotné. Při určování však v mnoha případech není možno jednoduše odlišit o extrémní formy *E. stricta* či *E. nemorosa* od *E. × haussknechtii*.

Hybridizace *E. stricta* s *E. nemorosa* je umožněna především těmito okolnostmi: oba rodičovské druhy jsou tetraploidní, jsou blízce příbuzné, rostou na obdobných stanovištích a kvetou přibližně v tutéž dobu (Smejkal & Dvořáková 2000).

V České republice je *E. × haussknechtii* udávána z oblastí výskytu *E. nemorosa* spadajících převážně do mezofytika, kde byla ještě v první polovině 20. století rozšířena téměř stejně tak hojně jako tento jeho rodičovský druh (Smejkal & Dvořáková 2000). Protože hybridní populace v rodě *Euphrasia* mohou být dosti samostatné a často se vyskytují bez rodičovských druhů (Vitek 1998, Štech in prep.), je velmi pravděpodobné, že i *E. × haussknechtii* se na části lokalit vyskytuje bez přítomnosti rodičovských druhů.

2.6. Morfometrie

Morfologie je k popisování a hodnocení taxonů využívána odedávna. S rozvojem statistiky a výpočetní techniky (Sokal & Sneath 1963) se vyvinula morfometrická analýza, která patří v taxonomii rostlin k často užívaným metodám. Ke klasickým metodám popisujícím rozměry jednotlivých orgánů rostlin se v nedávné době přidružily metody

popisující tvar a označované dnes jako geometrická morfometrie (Marhold & Suda 2002). Za její vznik lze považovat sborník prací z Michiganského morfometrického workshopu (Rohlf & Bookstein 1990) a práci F. Booksteina (1991). Rozvoj těchto metod umožnil zejména bouřlivý rozvoj výpočetní a zobrazovací techniky a nových počítačových programů. Oba morfometrické přístupy se mohou vhodně doplňovat při studiu morfologie vybraných znaků studovaných taxonů.

Klasická (tradiční) morfometrie je taxonomy využívána již dlouhou dobu, především k ověření platnosti determinačních znaků nebo k nalezení znaků nových, a to u nejrůznějších skupin rostlin (z recentních studií např. Marhold 1998, Kučera 1999, Štech & Drábková 2005, Guttová et al. 2006, Košnar 2006, Koutecký 2008). Pro určování bříz byla dokonce sestavena diskriminační funkce, která může být použita jako jedno z kritérií využitelných při jejich determinaci (Stace 1997). Nevýhodou klasické morfometrie však je, že zpětně nemůžeme rekonstruovat tvar studovaných organismů (Zelditch et al. 2004).

Detailní rešerši problematiky geometrické morfometrie zpracoval ve své práci Těšitel (2005), proto se zde zmíním jen o nejdůležitějších údajích.

V geometrické morfometrii můžeme rozlišovat analýzu založenou na význačných bodech – landmarcích (*landmarks*) a analýzu obrysu.

Metody založené na význačných bodech vychází ze srovnání souřadnic těchto bodů. Jsou jimi především přímé srovnání souřadnic význačných bodů pomocí tzv. Booksteinových souřadnic tvaru (*Bookstein shape coordinates*), Prokrustova analýza a metoda ohebných pásků (*thin plate spline*) (Marhold & Suda 2002, Zelditch et al. 2004).

Jedním ze základních předpokladů úspěšné analýzy tvaru založené na význačných bodech je výběr landmarků. Měly by být vybírány tak, aby byly zřetelně, opakovaně a spolehlivě rozeznatelné na všech studovaných organismech, měly by adekvátně postihovat morfologii. Landmarky můžeme zaznamenávat jak na ploše, tak i v prostoru (Zelditch et al. 2004). Tato metoda byla využita např. při studiu morfologické variability některých řas (Neustupa & Šťastný 2006, Neustupa & Němcová 2007,).

Metody založené na analýze obrysu jsou např. analýza vlastních tvarů (*eigenshape analysis*) nebo Fourierova analýza (*Fourier analysis, harmonic analysis*), která přispěla např. k řešení problematiky rozdílnosti tvarů korunních plátek u variet druhu *Primula sieboldii* (Yoshioka et al. 2004).

2.6.1. Morfometrie rodu *Euphrasia*

Morfometrickou analýzou, především klasickou morfometrií, rodu *Euphrasia* se zabývala řada prací (např. Bobear 1969, Yeo 1962, Hellström et al. 2004, Liebst & Schneller 2005, Gussarova & Vitek 2007). Téměř žádná z nich se však nezabývala přímým srovnáním porovnáním *E. stricta* a *E. nemorosa*. Výjimku tvoří studie Thomase Karlssona (1976), ve které se autor mimo jiné zabýval variabilitou délky koruny u těchto dvou druhů.

Většina autorů zabývajících se morfologickou variabilitou v rodě *Euphrasia* ji nemohla zachytit v takové míře jako je tomu možné dnes. Je to dáno možnostmi tehdejší a současné, především počítačové, techniky. S tím souvisí i skutečnost, že přes snahy některých autorů (např. Yeo 1962, Wilkins 1963) zachytit variabilitu ve tvarech orgánů u světlíků, nebyla doposud ke studiu rodu *Euphrasia* využita geometrická morfometrie. Dosavadní studie tvarů orgánů v tomto rodě tak bylo omezeno pouze na nákresy a hodnocení jen na základě pozorování, bez statistického vyhodnocení.

3. Metodika

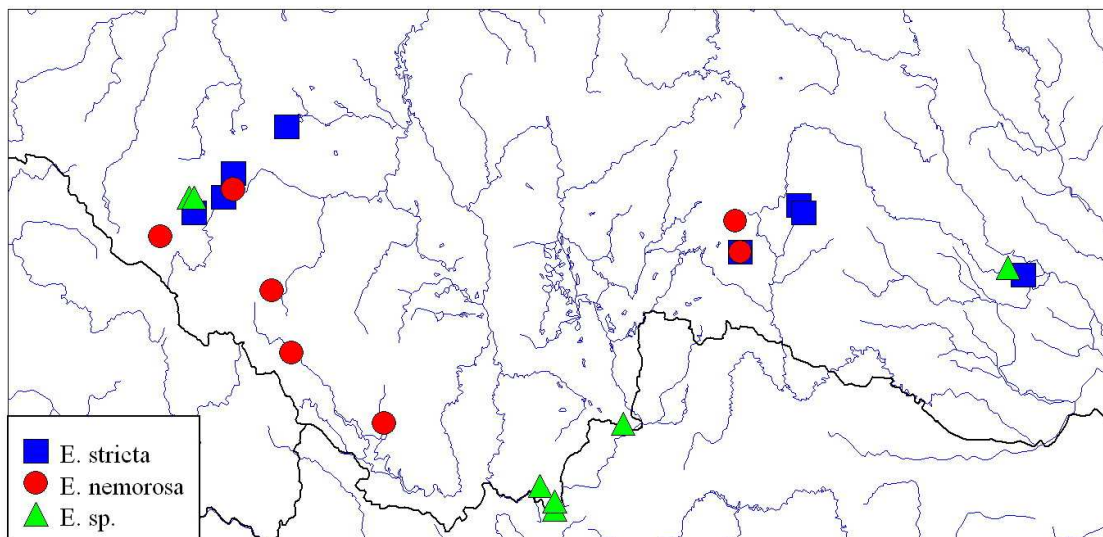
3.1. Morfometrické analýzy

3.1.1. Sběr a zpracování materiálu

Lokality pro sběr materiálu byly vybírány s cílem získat rostliny z populací, kde bylo možno jednoznačně určit druh, i z populací přechodných typů, abych se mohla pokusit o jejich klasifikaci pomocí morfologických přístupů.

Pro morfometrické analýzy jsem použila vzorky z 24 populací (471 rostlin). Seznam jednotlivých lokalit je uveden v Příloze 1, na Obr.4 je vyznačení jejich geografické polohy. Sebrala jsem vzorky z 10 populací *E. stricta*, 5 *E. nemorosa* a 9 populací přechodných typů. Druhy jsem určovala především na základě větvení, velikosti květu a přítomnosti osinek. V každé populaci jsem náhodně vybrala v průměru 20 jedinců (viz Marhold & Suda 2002). Na několika málo lokalitách nebylo možno z důvodu menší velikosti populace odebrat požadované množství rostlin, a tak jsem sebrala 10 až 15 jedinců.

Z každé rostliny jsem odebrala dva květy, lodyžní list, první, pátý a desátý listen. Ty jsem pomocí průhledné lepící pásky nalepila na papír (viz Obr.5).



Obr. 4: Lokality, na kterých byl proveden sběr materiálu.



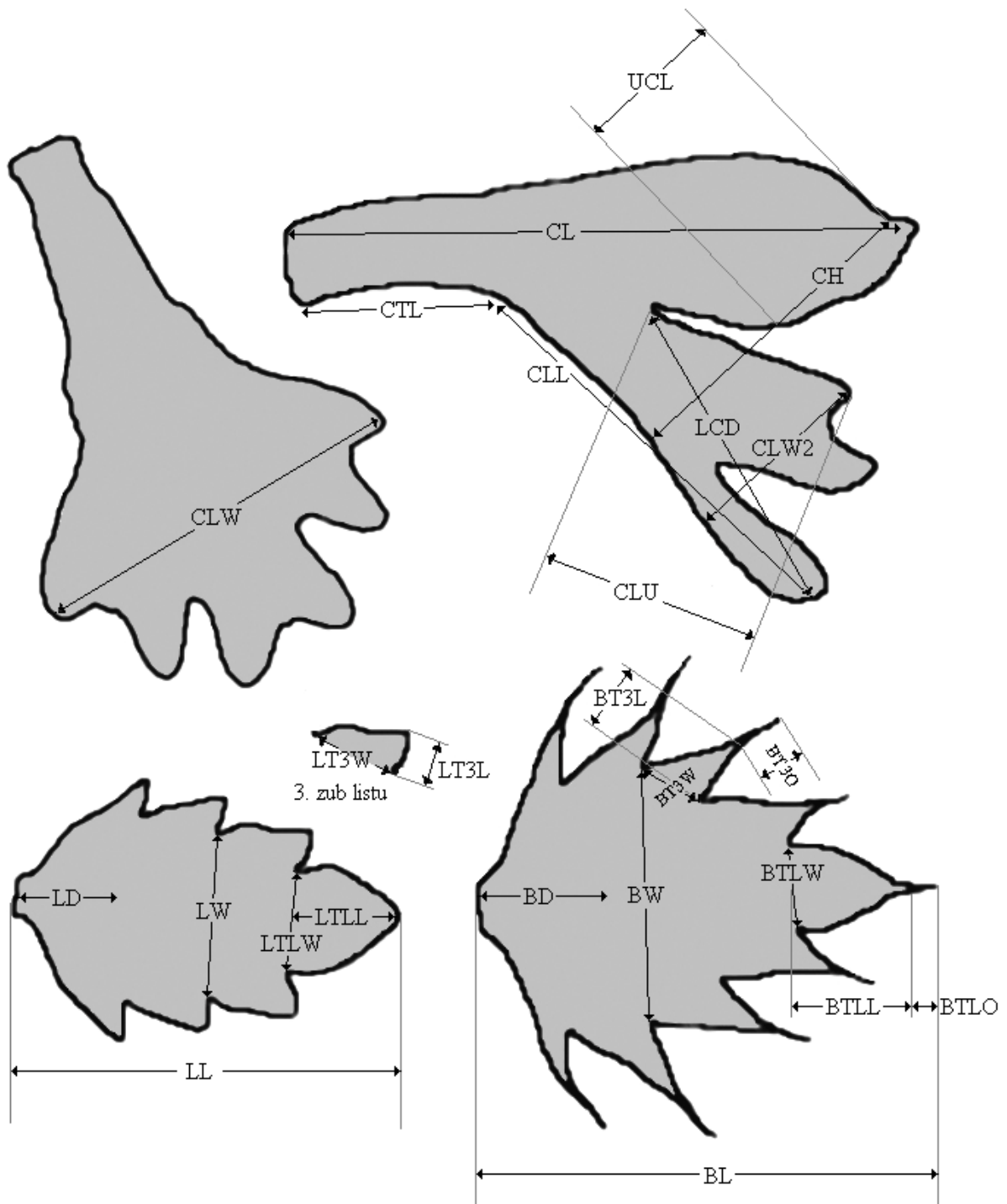
Obr. 5: Způsob nalepení jednotlivých částí rostlin (v pořadí zleva 2 květy, lodyžní list, 1., 5., a 10. listen, otočeno o 90° doprava).

Takto připravený materiál jsem naskenovala v rozlišení 600dpi. Data pro klasickou i geometrickou morfometrii jsem získávala pomocí programu tpsDig, verze 2.10 (Rohlf 2006).

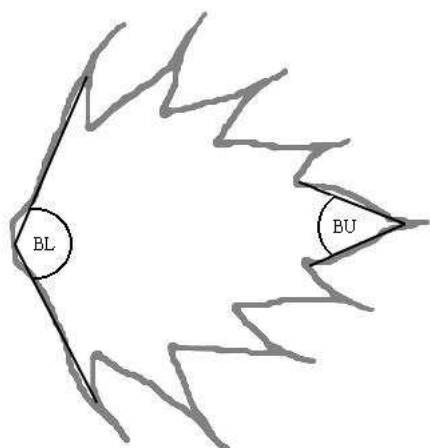
3.1.2. Klasická morfometrie

Pro klasickou morfometrii jsem vybrala 51 znaků (9 na květu a listu, 11 na každém listenu), které jsem měřila na každé rostlině. Znaky jsem vybírala pro ověření jejich platnosti (především délka květu) a také pro zjištění, nejsou-li mezi nimi některé, které by umožnily spolehlivěji určit zařazení do druhu. Jednotlivé znaky, které jsem zaznamenávala, jsou vyznačené v Obr. 6 a 7, zkratky jsou vysvětleny v Tab. 1.

Data získaná programem tpsDig jsem uložila jako formát tps. Pro další zpracování jsem takto uložená data převedla do tabulky v programu Excel.



Obr. 6: Vyznačení kvantitativních znaků studovaných klasickou morfometrií. Každý znak na listenu měl za svou zkratku ještě označení, z kolikátého listenu pocházel. V případě délky listenu to vypadalo následovně: BL1, BL5, BL10.



Obr. 7: Vyznačení měřených úhlů na listenech.

Tab. 1: Přehled znaků měřených na sbíraných rostlinách (a – květy, b – listy, c – listeny), kurzívou jsou zvýrazněné znaky, které nebyly zahrnuty do statistických analýz, protože chyběly u většího množství jedinců.

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 šířka dolního korunního pysku
<i>CLW</i>	<i>šířka dolního korunního pysku</i>
LCD	diagonála na dolním pysku

b) Znaky měřené na listech.

Zkratka	Popis znaku
LL	délka listu
LW	šířka listu
LD	vzdálenost nejširšího místa od báze
LT3W	šířka 3.zubu
LT3L	délka 3.zubu
LT3O	délka osinky 3.zubu
LTLW	šířka posledního zubu
LTLL	délka posledního zubu
LTLO	délka osinky posledního zubu

c) 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
BU	úhel koncového zubu
BL	úhel rozpětí spodních zubů

3.1.2.1. Statistické zpracování dat

Data jsem zpracovávala pomocí programu STATISTICA (StatSoft 2001), pro mnohorozměrné analýzy jsem použila Canoco for Windows a CanoDraw (ter Braak & Šmilauer 2002).

Nejprve jsem spočítala aritmetický průměr všech měřených znaků pro jednotlivé populace. Před započítáním vlastních statistických analýz jsem ověřovala, zda mají data normální rozdělení (Lepš 1996, Marhold & Suda 2002), protože diskriminační analýza toto rozdělení vyžaduje. Většina znaků však této distribuci neodpovídala, pokusila jsem se proto o jejich transformaci pomocí logaritmické funkce [$x' = \log(x+1)$]. Tato funkce byla prospěšná u znaků UCL, CLL, BW1, BD1, BTLW1, BTLL1, BL5, BD5, BT3L5, BTLL5, BD10, 1BU, 5BU a 10BU. Ani poté však neměly všechny znaky normální rozdělení.

Některé měřené znaky jsem do analýz nezahrnula, protože chyběly u více než poloviny rostlin. Jednalo se o šířku dolního korunního pysku (CLW) a hodnoty měřené na listech. V případě, že bych vyloučila jedince, u kterých tato data chyběla, byly by z analýz zcela vyloučeny některé populace. Vysvětlením, proč listy chyběly u tak velkého procenta rostlin je prosté, *E. stricta* i *E. nemorosa* mívají listy za květu velmi často opadané (Smejkal 1963).

Provedla jsem analýzu hlavních komponent (PCA, *principal component analysis*) jednotlivých populací, abych detekovala atypické jedince (*outliers*). Ty jsem následně vyloučila z dalších analýz (Marhold & Suda 2002). Jednalo se o následující jedince (značka populace/číslo rostliny; označení populací viz Příloha 1): Zik/3, Zik/8, Leo/11, Poh1/17, Poh2/10, Poh2/21, Poh2/25, Min/4, Vlk/12, NR2/6, VLho1/4, Nevc1/3, Nevc1/9, Nevc1/10,

Nevc2/8, Nevc2/10, Cep/10, Cep/15, Bret/4, Bret/6, HMB/1, HMB/7, Kad/1, Kad/3, Kad/19, Vimp/4 Vimp/7, Vimp/20, Vimp/21.

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

Abych zjistila základní rozdělení populací, provedla jsem PCA, kterou jsem provedla na průměrných hodnotách pro jednotlivé populace. Z dat jsem vyřadila atypické jedince. Následně jsem využila PCA ke zjištění rozdělení jednotlivých jedinců.

Pro zjištění, které znaky nejlépe oddělují *E. stricta* od *E. nemorosa* jsem využila diskriminační analýzu. Jako klasifikační znak jsem použila kód druhu.

3.1.3. Geometrická morfometrie

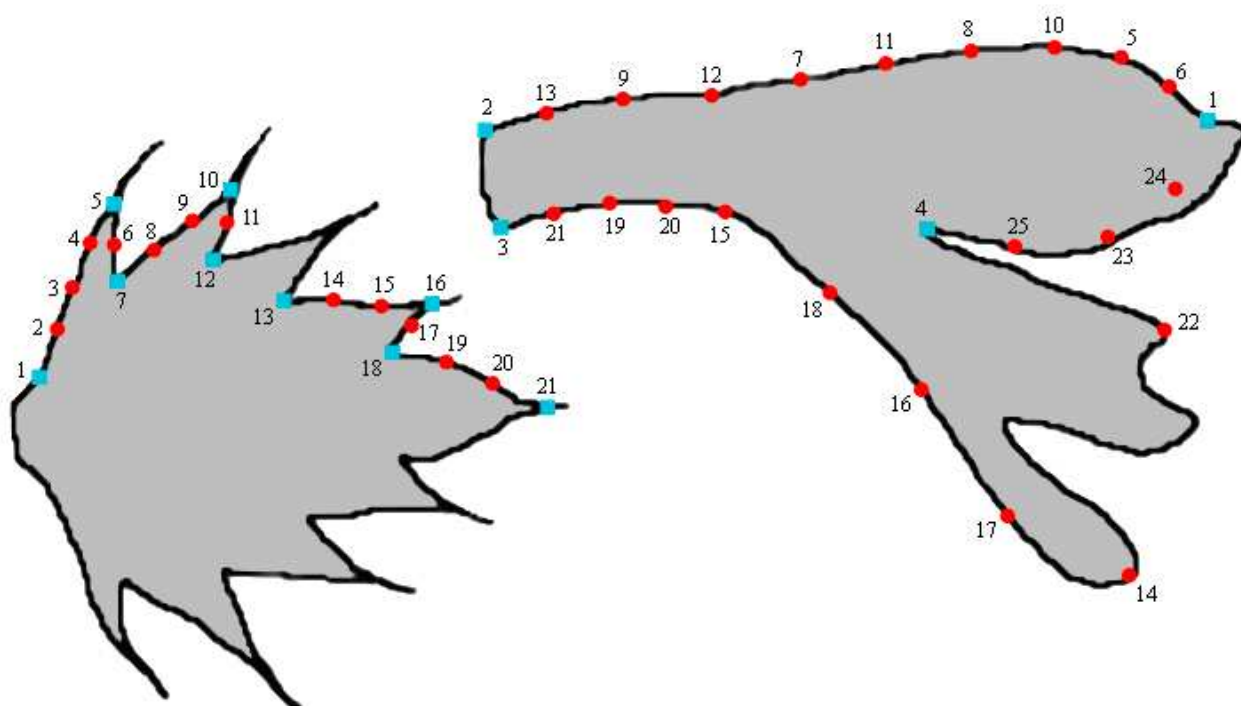
Rozdíl tvarů mezi jednotlivými druhy jsem zkoumala pomocí geometrické morfometrie. Data jsem získávala z analýzy květu, pátého a desátého listenu. Tvar listenů je totiž používám jako jeden z determinacních znaků. Analýzou květu jsem chtěla zjistit, zda-li se jejich tvar u studovaných druhů nějak liší.

K popsání tvaru květu jsem vybrala 4 landmarky a 21 semilandmarků (vyznačení viz Obr.8). Landmarky jsem definovala jako vrchol horního cípu květu (1), konce korunní trubky (2 a 3) a místo oddělení horního a dolního pysku koruny (4). Některé semilandmarky jsem si také definovala významnými zlomy obrysu: (5), (14), (15) a (22). Ostatními jsem danou část květu rozdělila opakovaně na poloviny.

K analýze tvaru listenů jsem vybrala 9 landmarků a 12 semilandmarků (viz Obr. 8). Landmarky (2), (4), (7) a (9) jsem definovala jako konce zubů, landmarky (1), (3), (5), (6) a (8) potom báze zubů listenů. Semilandmarky jsem poté danou část listenů rozdělila na poloviny, třetiny či čtvrtiny. Protože programy používané ke zpracování dat (viz dále) neumí přesně pracovat se symetrickými objekty, zaznamenávala jsem pouze tvar poloviny listenů.

Vzhledem k tomu, že listeny mívají variabilní počet zubů, zaznamenávala jsem pouze tvar dvou nejspodnějších zubů, koncového zubu a zubu těsně pod ním (viz Obr. 8). Takto jsem mohla popsat téměř všechny listeny. Jen ve velmi vzácných případech se stalo, že ani tento počet zubů na daném listenu nebyl. Tyto listeny jsem proto z analýz vyřadila. Rovněž

jsem vyřadila květy či listeny, na kterých nebylo možno landmarky spolehlivě vyznačit, protože byly poškozené. Počty analyzovaných rostlin z jednotlivých populací jsou uvedeny v Příloze 2.



Obr. 8: Landmarky (modře) a semilandmarky (červeně) použité při analýze květu a listenů.

3.1.3.1. Statistické zpracování dat

Data jsem zpracovávala pomocí programů tpsUtil, ver. 1.26 (Rohlf 2004), tpsRelw, ver. 1.45 (Rohlf 2007), tpsPLS, ver. 1.12 (Rohlf 2003) a STATISTICA (StatSoft 2001).

Před započítáním 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 pomocí programu STATISTICA (StatSoft 2001).

Protože společná analýza všech listenů dohromady nepřinesla očekávané výsledky, bylo nutné vyhodnotit pouze data získaná jen na listenech, které měly stejný počet párů zubů. Vybrala jsem proto listeny se 4 a 5 páry zubů, které jsem analyzovala zvlášť.

3.2. Molekulární metody

K vyzkoušení molekulárních metod jsem zvolila sekvenaci nekódujících úseků DNA: ITS (jaderná DNA), matK a trnT-trnL (cpDNA), které jsou v rostlinné taxonomii často používané, např. ke studiu fylogenetických vztahů.

3.2.1. Sběr materiálu

Materiál pro molekulární metody jsem sebrala na 6 lokalitách: VLho1, VLho2, Nevc1, Nevc2, VLho3 a Cep (viz Příloha 1) v počtu 3-10 rostlin z populace, přičemž záleželo na velikosti populace. Z každé rostliny jsem odebrala 20 listenů, které jsem uchovávala v silikagelu v mrazáku.

3.2.2. Izolace DNA

K izolaci DNA jsem vybrala tři ze sebraných populací: VLho1, VLho2 a Nevc2. Z každé populace (dvě populace *E. stricta* a jedna populace *E. nemorosa*) jsem izolovala DNA ze třech vzorků.

Izolaci jsem prováděla podle standardního protokolu komerčním kitem INVITEK pouze s některými malými změnami (způsob homogenizace). K izolaci jsem použila 5-6 listenů z každé rostliny, záleželo na velikosti. Homogenizaci jsem prováděla v 1,5 ml Eppendorfce pomocí sterilního písku a 400 μ l lyzačního pufru (*Lysis Buffer P*). Poté jsem homogenizát 1 min. centrifugovala při 11000 ot./min. Homogenizát jsem následně přenesla do nových 1,5 ml zkumavek, přidala 20 μ l proteinázy K, zamíchala a inkubovala 30 min. při 65°C. Během inkubace jsem směs třikrát promíchala. Vzorky jsem přenesla na filtr (*Spin Filter*) a centrifugovala 10 minut při 12 000 ot. Poté jsem přidala 40 μ l RNázy A (k jednomu vzorku *E. stricta* a *E. nemorosa* nebyla přidána, protože již nebyla k dispozici). Zamíchala jsem pomocí vortexu. Po 5 minutách inkubace při pokojové teplotě jsem přidala 200 μ l vázacího pufru (*Binding Buffer P*) a zamíchala jsem. Vzorky jsem přenesla na nové filtry a 1 min. jsem je nechala inkubovat. Poté jsem směs centrifugovala 1 min. při 12 000 ot. Odstranila jsem filtrát a přidala jsem 550 μ l prvního vymývacího pufru (*Wash Buffer I*), centrifugovala jsem 1 min. při 12 000 ot. Přidala jsem 550 μ l druhého vymývacího pufru (*Wash Buffer II*) a opět jsem centrifugovala 1 min. při 12 000 ot. Filtrát jsem odstranila a přidala opět 550 μ l druhého vymývacího pufru a centrifugovala 1 min. při 12 000 ot.

Odstranila jsem filtrát a centrifugovala 2 min při 12 000 ot. pro odstranění ethanolu /jím jsou naředěné pufrý). Eluci (poslední krok izolace) jsem prováděla dvakrát pomocí 60µl elučního pufru (Elution Buffer D) předehřátého na 65°C, inkubovala jsem 5 minut při pokojové teplotě. Posledním krokem izolace DNA byla centrifugace 1 min. při 10 000 ot.

3.2.3. PCR, purifikace a příprava sekvenční směsi

Dalším krokem byla amplifikace vybraných úseků DNA pomocí PCR (*polymerase chain reaction*). Vzorků, které jsem použila pro tento a následující kroky bylo jen velmi málo: pro ITS jeden vzorek *E. stricta* a jeden *E. nemorosa*, pro matK dva vzorky od každého z těchto dvou druhů a pro ústek trnT-trnL pak po dva vzorky *E. stricta* a jeden vzorek *E. nemorosa*. PCR směs (vždy 25 µl na vzorek) pro úseky matK a trnT-trnL jsem namíchala v poměru 12,5µl Master Mix Top Bio, 1µl prvního primeru, 1µl druhého primeru, 9,5µl PCR vody a 1 µl vzorku DNA, pro úsek ITS pak v poměru 12,5µl Master Mix Top Bio, 3µl prvního primeru, 3µl druhého primeru, 5,5µl vody a 1 µl DNA. Použité primery byly následující: ITS1P (5'-CTTTATCATTTAGAGGAAGGAAG-3'; Selosse, Bauer & Moyersoen 2002), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; White et al. 1990), matK5 (5'-TGGGTTGCTAACTCAATGG-3'), matK3 (5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG-3'; Shaw et al. 2005), trnT (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), trnL (5'-TCTACCGATTTCGCCATATC-3'; Taberlet et al. 1991). Koncentrace primerů byla 2,5 pmol. Amplifikace DNA probíhala v termocycleru Biometra T3000 nebo BIOER XP CYCLER. V Tabulce 2 jsou uvedené PCR cykly pro jednotlivé úseky DNA. Počet cyklů byl pro ITS 32, pro matK 35 a pro trnT-trnL 30.

Tab.2: PCR cykly pro úseky ITS, matK a trnT-trnL.

	ITS		matK		trnT-trnL	
	teplota (°C)	čas (s)	teplota (°C)	čas (s)	teplota (°C)	čas (s)
počáteční amplifikace	95	300	95	240	95	300
cykly	95	60	95	60	95	60
	52	90	54	60	62	60
	72	90	72	120	72	150
konečná elongace	72	600	72	300	72	600

Amplifikované úseky DNA jsem analyzovala elektroforézou na 1,5% agarózových gelech v pufru TBE a detekovala barvením SyberGreen (5 μ l vzorku a 1 μ l SyberGreen). Elektroforéza probíhala při napětí 60-65 V. Gely jsem fotografovala pod UV světlem.

Poté bylo potřeba DNA purifikovat. To jsem prováděla podle standardního protokolu komerčním kitem JETquick (GENOMED). Ke 20 μ l PCR reakce jsem přidala 80 μ l roztoku H1 (NH₂C(NH)NH₂HCl, isopropanol, pH=7,0). Řádně promíchanou směs jsem přenesla na JETquick kolonku, která byla umístěná ve 2 ml zkumavce. Centrifugovala jsem při 12 000 ot. 1 minutu. Odstranila jsem filtrát, na kolonku jsem přidala 500 μ l roztoku H2 (50 - 200 mM NaCl, 10 - 100 mM Tris a 1 - 10 mM EDTA, pH 7.5) a opět jsem centrifugovala 1 min při 12 000 ot. Odstranila jsem filtrát a pro úplné odstranění roztoku H2 z kolonky jsem centrifugovala 1 min. při 13 500 ot. Poté jsem kolonku přemístila do nové 1,5 ml zkumavky a přidala 30 μ l TE pufru (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) předeřátého na 65°C a centrifugovala jsem 2 min. při 12 000 ot.

Po purifikaci jsem připravila směs na sekvenování. Pro úseky ITS a matK jsem použila následující poměr: 4 μ l vzorku, 2 μ l primeru (ITS1, matK3) a 9 μ l vody, pro úsek trnT-trnL pak poměr 6 μ l vzorku, 2 μ l primeru (trnL) a 7 μ l vody. Takto připravenou směs jsem odnesla do sekvenčního centra.

3.3. Nomenklatura

Jména taxonů vyskytujících se na našem území jsem uváděla podle Dvořáková (2002) a Smejkal & Dvořáková (2000). Jména druhů, které se u nás nevyskytují, jsem uváděla dle Stace (1997).

4. Výsledky

4.1. Morfometrické analýzy

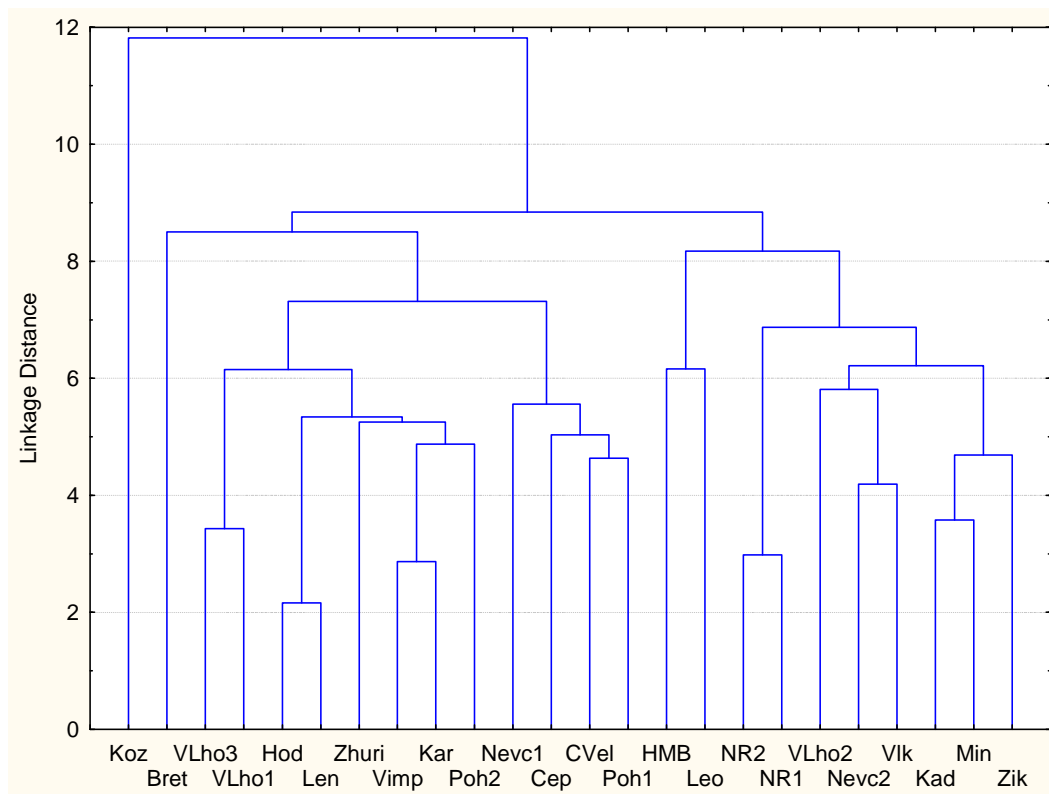
4.1.1. Klasická morfometrie

Do statistických analýz jsem zahrnula 41 z 51 měřených znaků (viz kapitola 3.1.2.1.). Nejdříve jsem spočítala korelace mezi měřenými znaky. Protože většina dat neodpovídala normálnímu rozdělení, použila jsem neparametrický Spearmanův korelační koeficient. Přehled korelací znaků je uveden v Příloze 3. Znaky nejvíce korelované ($r \geq 0,5$) jsou zvýrazněné. Přestože nebyla zjištěna extrémně silná korelace (všechny korelační koeficienty byly menší než 0,9), vyřadila jsem z některých analýz délku bočního okraje dolního korunního pysku (CLU) a délku střední části dolního korunního pysku (CLL), které byly silně korelované ($r = 0,84$ resp. $0,87$) s diagonálou na dolním pysku (LCD). Taktéž jsem vyřadila znaky na prvním a desátém listenu, protože byly korelované se znaky na pátém listenu. Na listenech byly korelované především jejich délky, ale vyřadila jsem všechny znaky na listenech. Data jsem standardizovala směrodatnou odchylkou.

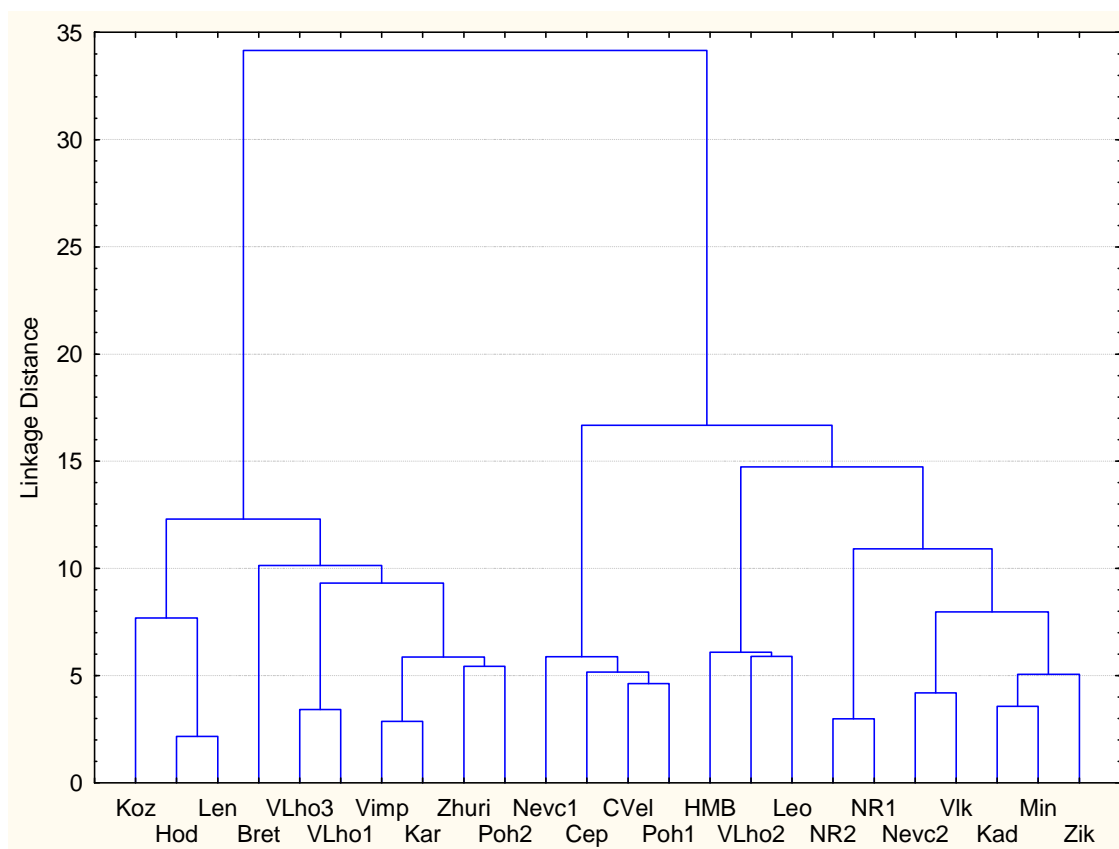
4.1.1.1. Shluková analýza

Výsledky shlukové analýzy metodou průměrné vzdálenosti jsou uvedeny v Obr.9. Je vidět, že populace z Kozénku (Koz) se úplně oddělila od ostatních. Zbytek dendrogramu od sebe úspěšně odděluje populace *E. stricta* a *E. nemorosa*. Přechodné populace jsou však rozmístěny různě v obou skupinách. Rovněž populace z Čepičné (Cep) a Nevcehle (Nevc1) jsou přiřazeny ke shluku *E. nemorosa* a většiny přechodných populací, přestože se jednalo o *E. stricta*.

Výsledky Wardovy metody (Obr.10) naznačují rozdělení populací do dvou shluků, které by se daly označit jako *E. strica* a *E. nemorosa*. Ovšem populace z Kozénku je oproti metodě průměrné vzdálenosti zařazena do shluku k *E. nemorosa*. Přechodné populace jsou opět rozmístěny jak ve shluku spíše odpovídajícímu *E. stricta*, tak ve shluku kolem populací *E. nemorosa*. Některé populace jsou však oproti předchozí metodě zařazeny do blízkosti opačného druhu.



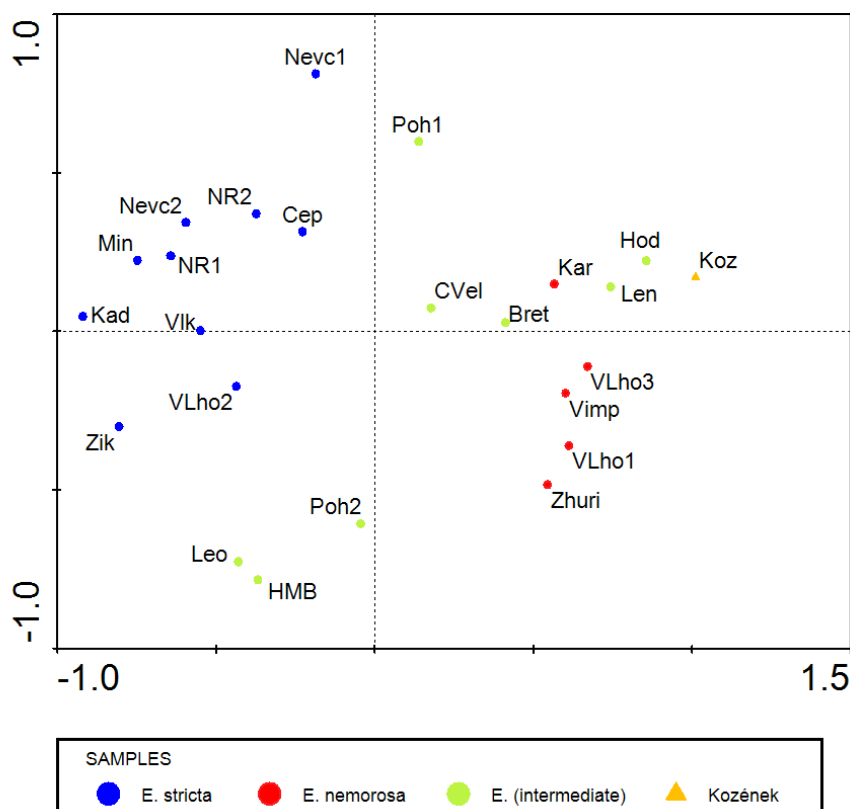
Obr. 9: Shluková analýza populací (metoda průměrné vzdálenosti, Euklidovská vzdálenost).



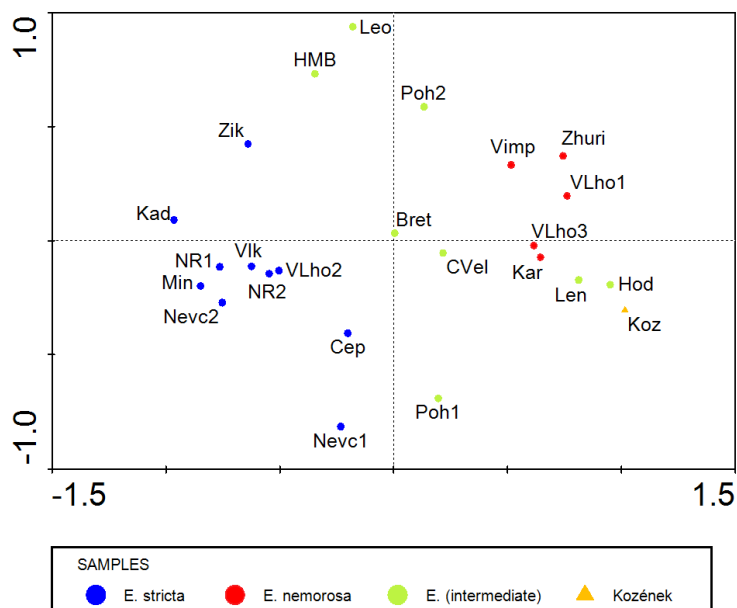
Obr. 10: Shluková analýza populací (Wardova metoda, Euklidovská vzdálenost).

4.1.1.2. Analýza hlavních komponent

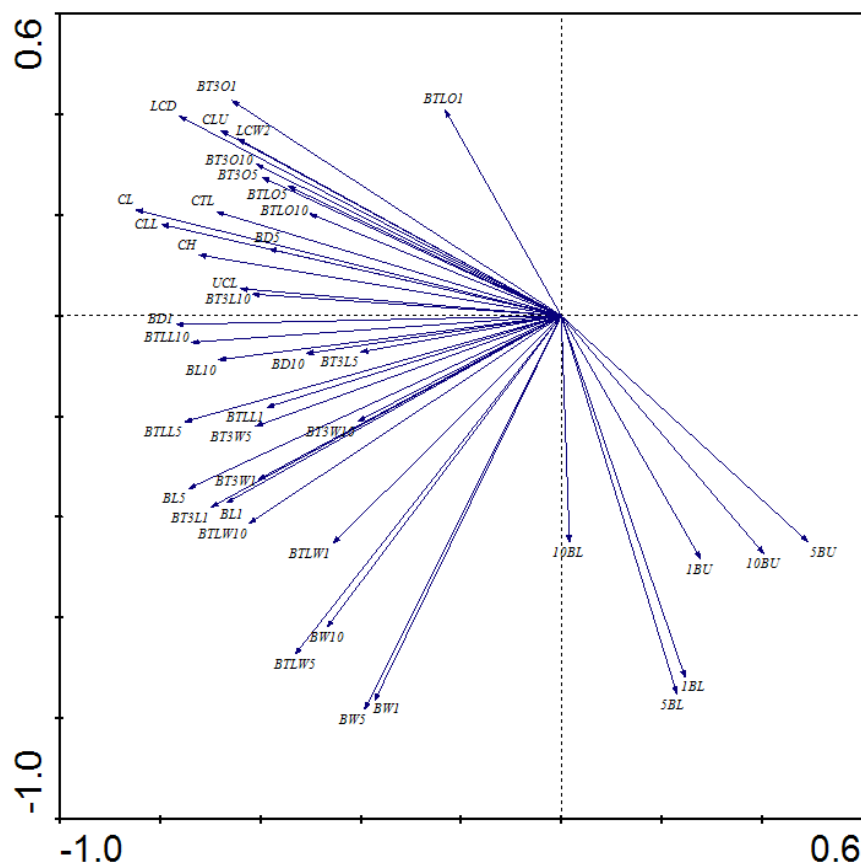
Dalším krokem byla analýza hlavních komponent (PCA) hodnot populačních průměrů pro jednotlivé znaky (na standardizovaných, ale netransformovaných datech). Tu jsem provedla jak na souboru dat, který obsahoval všech 41 analyzovaných znaků, tak na datech, ze kterých byly odstraněny korelované znaky délka bočního okraje dolního korunního pysku (CLU), délka střední části dolního korunního pysku (CLL) a znaky na prvním a desátém listenu. Výsledky v obou případech (Obr. 11, Obr. 12 a Obr. 13) ukazují zřetelné oddělení populací *E. stricta* od populací *E. nemorosa*. Přechodné populace se v ordinačním prostoru skutečně nachází mezi morfologicky dobře vyhraněnými populacemi *E. stricta* a *E. nemorosa*. Znaky, které především odlišují oba druhy jsou znaky na květech a délka osinek na listenech. Populace z Kozénku, která ač habituálně vypadala jako *E. stricta*, byla touto metodou přiřazena spíše k *E. nemorosa*.



Obr.11: Rozmístění jednotlivých populací na základě analýzy populačních průměrů všech znaků v PCA prostoru. První ordinační osa vysvětluje 25,4% a druhá 12,5% variability. První dvě osy vysvětlují 37,9% variability.

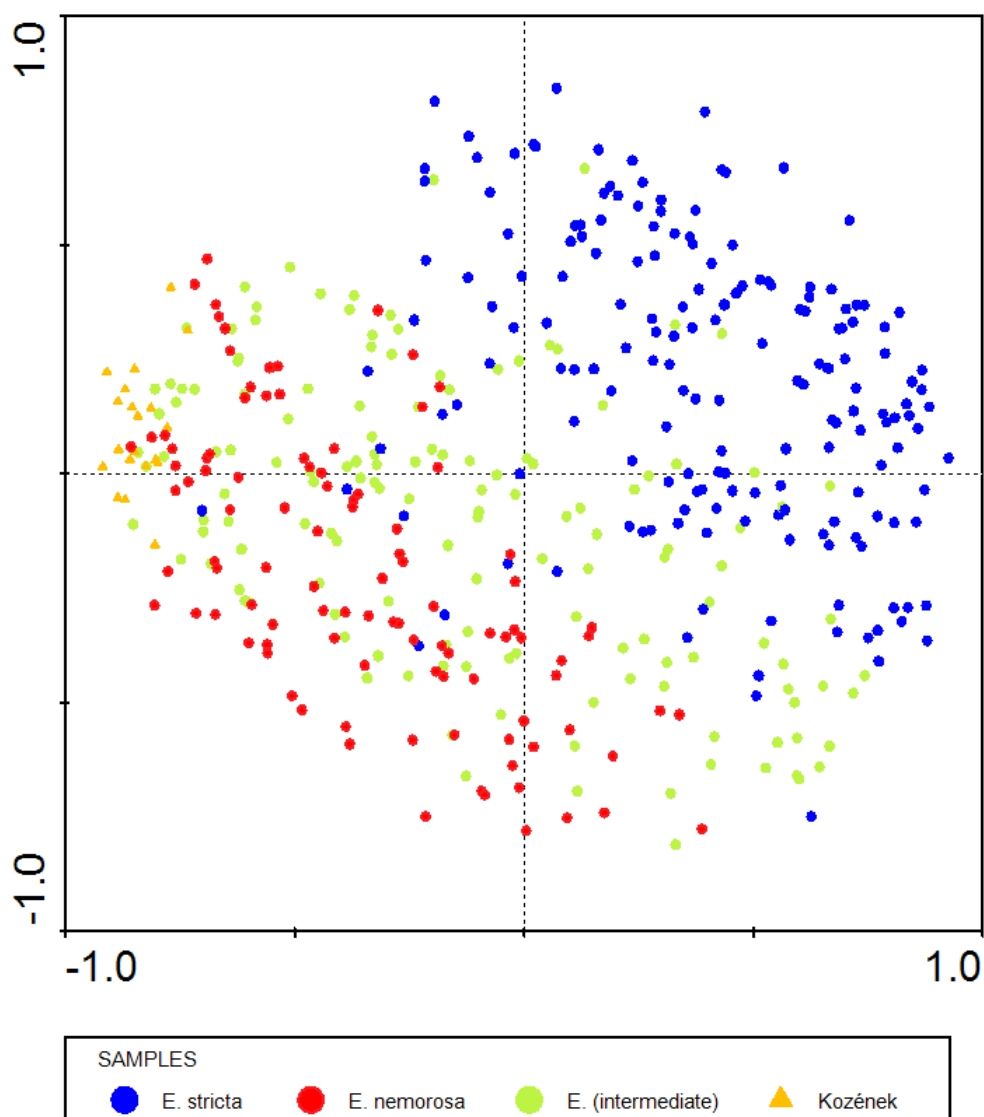


Obr. 12: Rozmístění jednotlivých populací na základě analýzy populačních průměrů znaků (s vyřazením korelovaných znaků) v PCA prostoru. První ordinační osa vysvětluje 38,7% a druhá 16,2% variability. První dvě osy vysvětlují 54,9% variability.

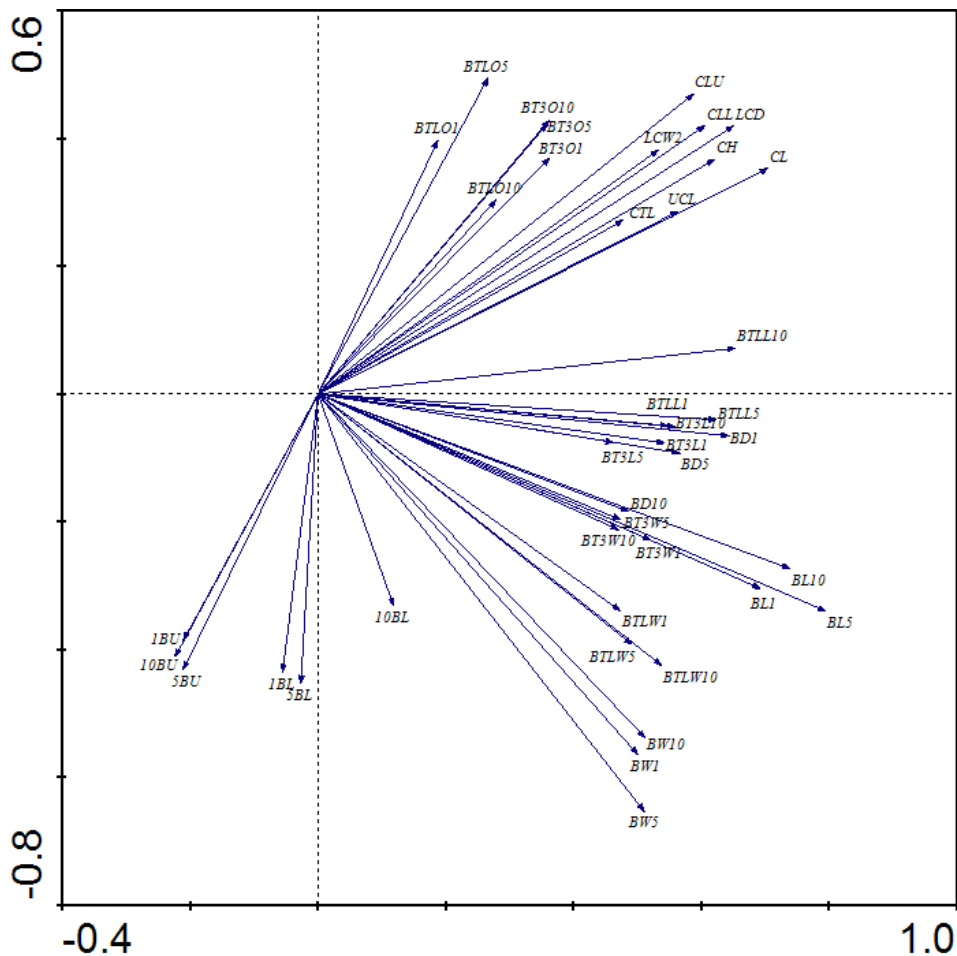


Obr. 13: PCA variability 16 znaků (vyřazeny byly korelované znaky). První ordinační osa vysvětluje 38,7% a druhá 16,2% variability. První dvě osy vysvětlují 54,9% variability

Následně jsem provedla PCA jednotlivých rostlin. Tuto analýzu jsem provedla jak na souboru dat, ze kterého byly vyřazeni všichni jedinci, u kterých chyběla některá data, tak i na datech, do kterých byly doplněny populační průměry tam, kde tato data chyběla. Protože se od sebe obě analýzy výrazně nelišily, uvádím zde tu s doplněnými populačními průměry pro chybějící data a vyřazenými atypickými jedinci. I v tomto případě jsem prováděla PCA na všech 41 znacích, tak na datech s vyřazenými korelovanými znaky. Ani zde nebyl velký rozdíl ve výsledcích. Uvádím výsledky PCA se všemi znaky (Obr. 12 a 13).



Obr. 12: Rozmístění jednotlivých rostlin na základě analýzy 41 znaků v PCA prostoru. První ordinační osa vysvětluje 25,4% a druhá 12,5% variability. První dvě osy vysvětlují 37,9% variability.



Obr. 13: PCA variability 41 znaků. První ordinační osa vysvětluje 25,4% a druhá 12,5% variability. První dvě osy vysvětlují 37,9% variability.

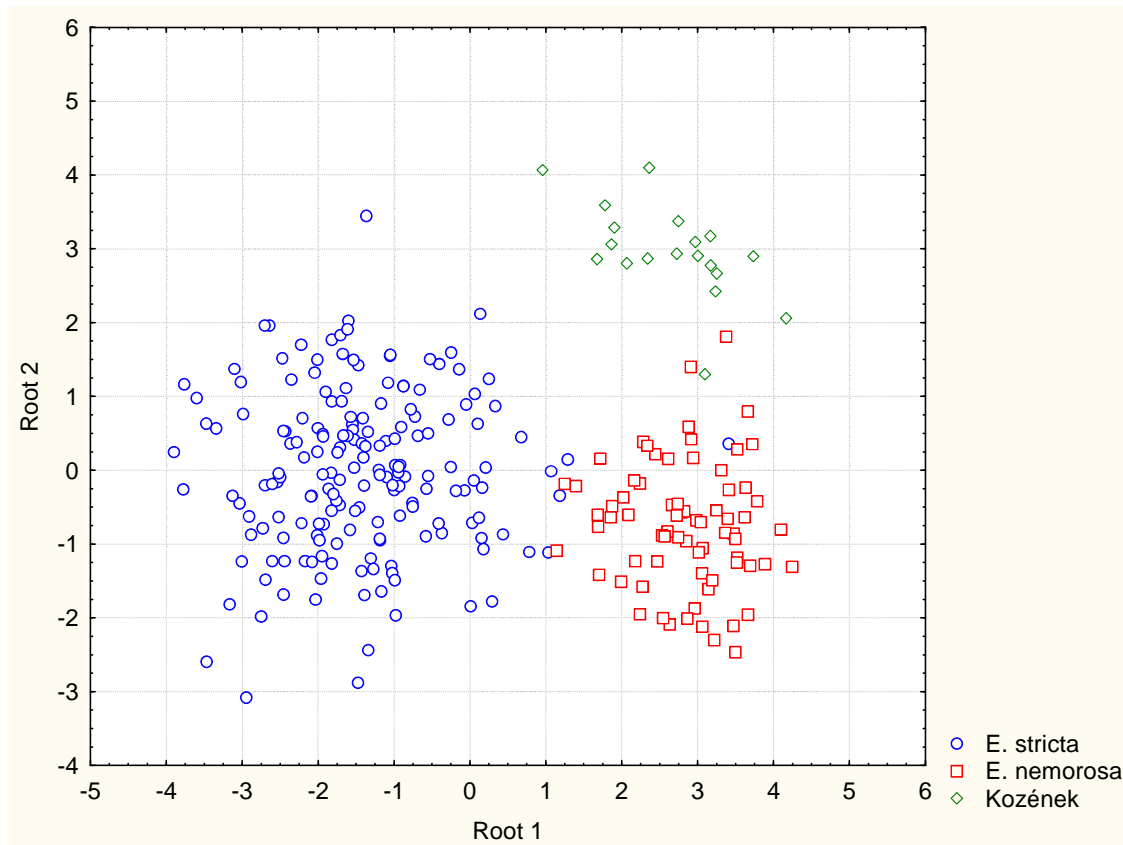
4.1.1.3. Kanonická diskriminační analýza

Pro kanonickou diskriminační analýzu jsem použila rozdělení jedinců podle určení v terénu či z položek, tzn. populace *E. stricta*, *E. nemorosa* a přechodné populace. Zároveň jsem vyznačila populaci z Kozénku, neboť ji shluková analýza metodou průměrné vzdálenosti odděluje od zbylých populací a PCA ji přiřazuje k *E. nemorosa*, přestože habituelně vypadala jako *E. stricta*.

Diskriminační analýzou, kterou jsem prováděla na transformovaných datech, jsem testovala možnost, zda lze odlišit populace *E. stricta* od *E. nemorosa* a zároveň jsem chtěla zjistit, kterému druhu jsou na základě dat klasické morfometrie bližší přechodné populace a populace z Kozénku. Vzhledem k tomu, že žádná dvojice studovaných znaků nebyla silně korelována (ve všech případech $|r| < 0,9$, viz Příloha 3), zařadila jsem do analýzy všech 41

znaků. Použila jsem data, ze kterých byly vyřazeny ti jedinci, u kterých některé znaky chyběly.

Na Obrázku 14 je znázorněn výsledek analýzy populací *E. stricta*, *E. nemorosa* a populace z Kozénku. Koeficienty diskriminační analýzy jsou uvedeny v Tab. 3. Je zde patrné dobré odlišení obou studovaných druhů i populace z Kozénku. Nejvýznamnějšími znaky, které nejvíce přispívají k oddělení populací *E. stricta* od *E. nemorosa* (podél první osy) patří především délky osinek, délka bočního okraje dolního korunního pysku (CLU) či délka střední části dolního korunního pysku (CLL), přičemž poslední dva z nich jsou korelovány s tradičně užívaným znakem, délkou koruny. K odlišení populace z Kozénku od obou druhů dochází podél druhé osy, především na základě délky a šířky listenů, délky koruny a korunní trubky, poloviny šířky dolního pysku (LCW2), výšky květu a úhly měřené na prvním listenu.

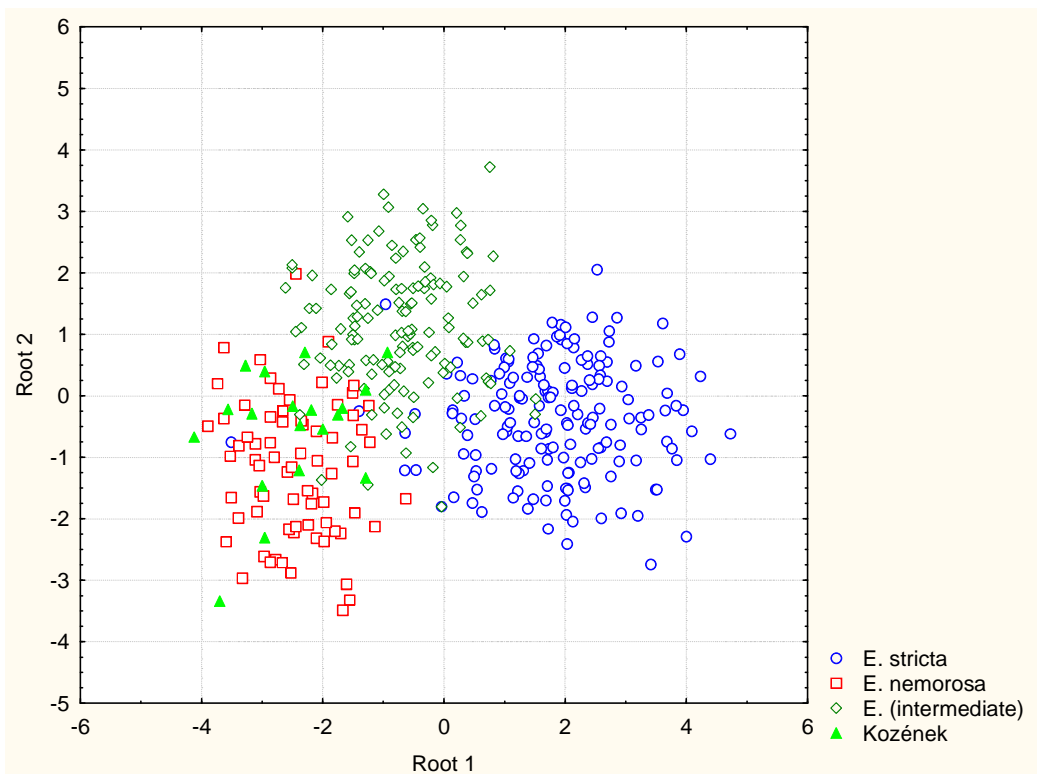


Obr. 14: Kanonická diskriminační analýza populací *E. stricta*, *E. nemorosa* a populace z Kozénku.

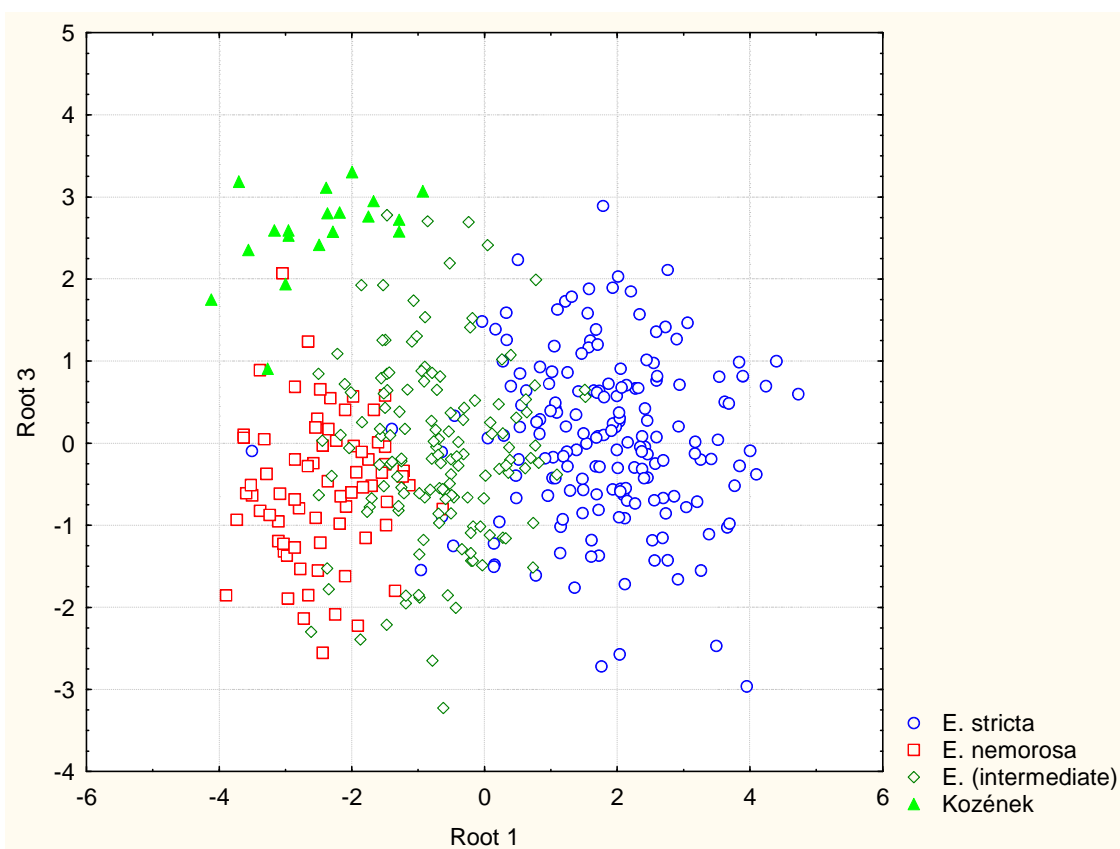
Tab. 3: Celkové strukturní koeficienty a standardizované koeficienty diskriminační funkce.

Znak	Celkové struk. koef.		Standard. str. koef.		Znak	Celkové struk. koef.		Standard. str. koef.	
	OSA1	OSA 2	OSA 1	OSA2		OSA1	OSA 2	OSA 1	OSA2
CL	-0.4781	7.7717	-0.021030	0.34184	BT3L5	2.4191	-0.8223	0.135053	-0.04591
CTL	0.8584	-7.0106	0.046269	-0.37788	BT3O5	-6.1771	3.2352	-0.401717	0.21040
CH	-5.8426	-4.7931	-0.299804	-0.24595	BTLW5	4.2217	-5.1671	0.184537	-0.22587
UCL	-1.3937	3.4526	-0.083986	0.20807	BTLL5	-1.4244	1.7955	-0.069029	0.08702
CLU	-2.6037	0.5888	-0.157034	0.03551	BTLO5	-1.7848	-2.0183	-0.105048	-0.11879
CLL	-3.6933	0.1077	-0.239435	0.00698	BL10	-10.1802	6.9085	-0.623259	0.42296
CLW2	2.4189	-5.2028	0.165946	-0.35694	BW10	0.2224	1.3185	0.019703	0.11681
LCD	-1.8529	4.4337	-0.118185	0.28280	BD10	1.6792	-5.3119	0.097416	-0.30815
BL1	-1.9785	-0.3358	-0.141877	-0.02408	BT3W10	-1.2204	-6.0458	-0.059711	-0.29581
BW1	0.1845	-4.0874	0.016309	-0.36130	BT3L10	0.0401	-3.9355	0.002406	-0.23590
BD1	-2.7740	5.3202	-0.165140	0.31672	BT3O10	-2.0717	-0.3259	-0.123654	-0.01945
BT3W1	0.1268	-1.9056	0.007165	-0.10766	BTLW10	-0.2758	2.4666	-0.011677	0.10445
BT3L1	-2.2174	2.7782	-0.130404	0.16339	BTLL10	2.2625	-11.3164	0.114727	-0.57383
BT3O1	-7.1051	5.6476	-0.446941	0.35525	BTLO10	1.2095	-6.1255	0.067570	-0.34221
BTLW1	7.0031	-1.0046	0.313427	-0.04496	1BU	-4.6393	3.1437	-0.308728	0.20921
BTLL1	0.2727	-5.4441	0.015612	-0.31164	1BL	3.7005	2.2439	0.231028	0.14009
BTLO1	0.9002	1.0212	0.056699	0.06432	5BU	-0.5467	3.8255	-0.037774	0.26430
BL5	-1.7754	10.9961	-0.109410	0.67765	5BL	-0.7593	2.2328	-0.046299	0.13615
BW5	4.3031	-13.3589	0.359947	-1.11744	10BU	2.8537	-0.4793	0.205377	-0.03449
BD5	1.7585	-1.5892	0.105584	-0.09542	10BL	1.7085	-0.8455	0.110869	-0.05487
BT3W5	-3.1324	3.4072	-0.163905	0.17828					

Následně jsem provedla kanonickou diskriminační analýzu na datech, do kterých byly zahrnuty i přechodné populace (Obr. 15 a 16, Tab. 4). Opět se ukazuje dobré odlišení obou rodičovských druhů. Přechodné populace stojí mezi *E. stricta* a *E. nemorosa*. Znaky, které se na tomto rozdělení nejvíce podílejí (podél první osy) jsou zejména výška květu, délka střední části dolního korunního pysku (CLL), polovina šířky dolního korunního pysku (CLW2), délka osinek na listenech, délka a šířka listenů. Podél druhé osy se mírně oddělují přechodné populace, jejichž odlišení probíhá především na základě délky koruny, korunní trubky, délky střední části dolního korunního pysku (CLL), a několika znaků na listenech. Populace z Kozénku se od zbylých populací odděluje až na třetí ose (Obr. 16). Znaky, kterými je toto oddělení nejvíce ovlivněno, jsou opět zejména délka koruny a korunní trubky, délka střední části dolního korunního pysku (CLL), výška koruny či šířka listenů.



Obr. 15: Kanonická diskriminační analýza populací *E. stricta*, *E. nemorosa*, přechodných populací a populace z Kozénku (první a druhá osa).



Obr. 16: Kanonická diskriminační analýza populací *E. stricta*, *E. nemorosa*, přechodných populací a populace z Kozénku (první a třetí osa).

Tab. 4: Celkové strukturní koeficienty a standardizované koeficienty diskriminační funkce.

Znak	Celkové strukturní koeficienty			Standardizované struk. koef.		
	OSA1	OSA 2	OSA 3	OSA 1	OSA2	OSA 3
CL	-1.62240	12.9383	8.20635	-0.071653	0.57142	0.362432
CTL	-0.75199	-8.3514	-3.52938	-0.043699	-0.48531	-0.205096
CH	8.50627	-6.7607	-4.53607	0.419176	-0.33316	-0.223531
UCL	1.94098	0.8519	2.27033	0.113271	0.04972	0.132491
CLU	1.73688	2.7041	-1.25085	0.098875	0.15394	-0.071206
CLL	6.99607	-12.7919	4.54305	0.411363	-0.75215	0.267127
CLW2	-2.21845	0.9320	-2.70052	-0.146691	0.06162	-0.178567
LCD	-0.03590	5.1519	1.48321	-0.002154	0.30911	0.088993
BL1	1.86184	2.5604	-0.40649	0.131769	0.18121	-0.028769
BW1	-0.28215	7.6122	-4.23285	-0.025793	0.69587	-0.386946
BD1	1.15539	3.3983	5.51855	0.068164	0.20049	0.325576
BT3W1	1.25868	-3.5583	1.26344	0.070966	-0.20062	0.071234
BT3L1	0.64998	-1.8819	4.15487	0.038420	-0.11124	0.245593
BT3O1	6.00925	1.2981	3.15686	0.346991	0.07495	0.182286
BTLW1	-3.26653	-12.7151	-0.25177	-0.150979	-0.58769	-0.011637
BTLL1	-0.19911	-1.4267	-6.32965	-0.011809	-0.08462	-0.375408
BTLO1	-0.82561	3.4508	0.44130	-0.048114	0.20110	0.025718
BL5	0.63525	13.9560	2.53024	0.038778	0.85192	0.154454
BW5	-3.61643	-13.4580	-6.26498	-0.319062	-1.18734	-0.552732
BD5	-0.68478	-1.8285	-1.49411	-0.040836	-0.10904	-0.089098
BT3W5	0.78330	3.3977	1.34706	0.043093	0.18692	0.074108
BT3L5	-0.90058	-1.2289	-1.19004	-0.050991	-0.06958	-0.067381
BT3O5	6.56305	-0.9874	4.63205	0.394480	-0.05935	0.278414
BTLW5	-1.40976	-2.1494	-4.75100	-0.062569	-0.09540	-0.210860
BTLL5	-0.42339	-2.3888	3.22413	-0.022795	-0.12861	0.173584
BTLO5	0.02705	-2.4138	-0.13632	0.001801	-0.16069	-0.009075
BL10	8.45112	8.3243	0.64086	0.525784	0.51790	0.039871
BW10	1.39291	-6.9265	4.49759	0.130164	-0.64726	0.420289
BD10	-0.81917	0.9937	-2.47069	-0.047449	0.05756	-0.143111
BT3W10	-0.18644	4.4657	-7.04814	-0.009602	0.22999	-0.362997
BT3L10	-0.41352	-1.2371	-4.45252	-0.025660	-0.07677	-0.276293
BT3O10	3.65597	1.1147	-1.90923	0.206579	0.06298	-0.107880
BTLW10	-0.43617	-0.7063	-0.21374	-0.019450	-0.03150	-0.009531
BTLL10	-1.54654	-5.0754	-5.20707	-0.085040	-0.27908	-0.286322
BTLO10	0.14921	-0.3721	-3.72009	0.007595	-0.01894	-0.189369
1BU	2.41285	1.2643	2.47006	0.166899	0.08745	0.170856
1BL	-4.33816	4.8928	0.25987	-0.277795	0.31331	0.016641
5BU	0.21342	-1.2023	4.30137	0.015466	-0.08713	0.311713
5BL	1.04089	4.8169	0.76997	0.067421	0.31200	0.049873
10BU	-1.86526	-0.7411	0.19735	-0.135110	-0.05368	0.014295
10BL	-3.80854	9.0761	-2.12669	-0.257447	0.61352	-0.143759

4.1.1.4. Klasifikační diskriminační analýza

Klasifikační diskriminační analýza sloužila k sestavení klasifikační funkce pro každou skupinu. Koeficienty této funkce pro soubor s *E. stricta*, *E. nemorosa* a populace z Kozénku jsou v Příloze 4, pro soubor *E. stricta*, *E. nemorosa*, přechodných populací a populace z Kozénku pak v Příloze 5.

Pomocí těchto funkcí byly soubory studovaných rostlin zpětně klasifikovány (toto zařazení je označováno jako *posterior probabilities*). Výsledek pravděpodobnosti zařazení do skupin je uveden v Tabulce 5 a 6.

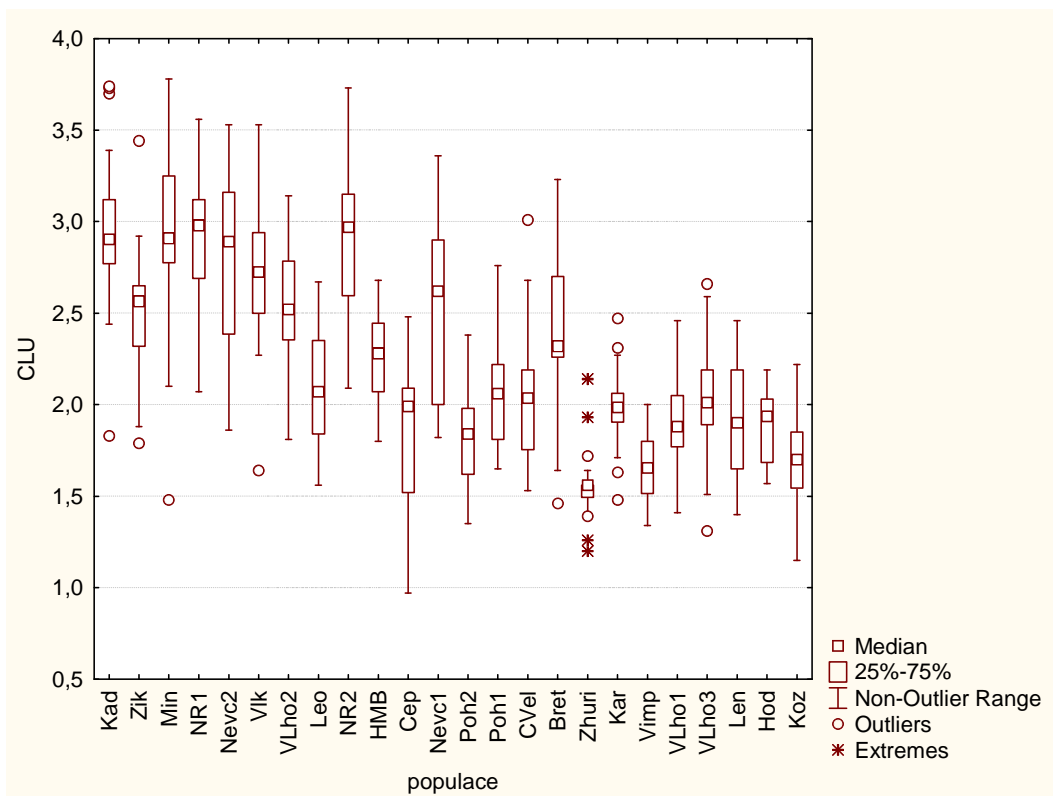
Tabulka 5: Klasifikační matice jedinců (*posterior probabilities*) pro analýzu *E. stricta*, *E. nemorosa* a populace z Kozénku.

Druh	% správných klasifikací	<i>E. stricta</i>	<i>E. nemorosa</i>	Kozének
<i>E. stricta</i>	97.19101	173	5	0
<i>E. nemorosa</i>	98.61111	0	71	1
Kozének	94.73684	0	1	18
celkem	97.39777	173	77	19

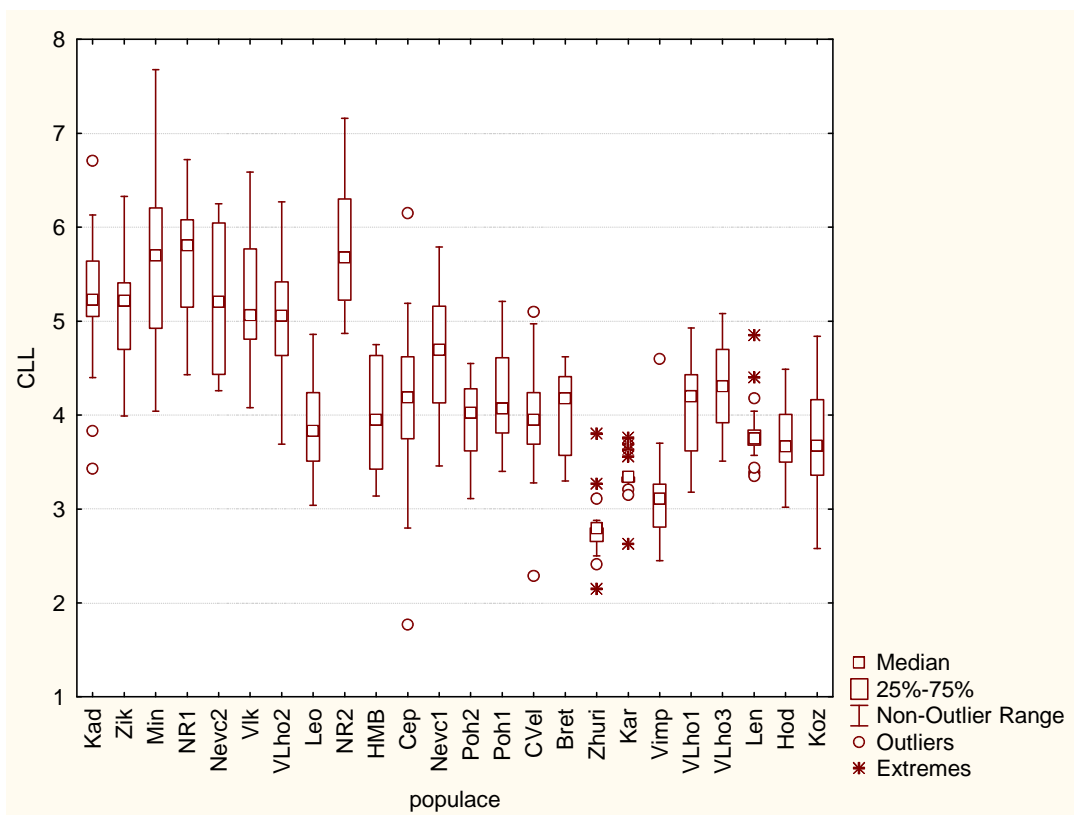
Tabulka 6: Klasifikační matice jedinců (*posterior probabilities*) pro analýzu *E. stricta*, *E. nemorosa*, přechodných populací a populace z Kozénku.

Druh	% správných klasifikací	<i>E. stricta</i>	<i>E. nemorosa</i>	E.(interm.)	Kozének
<i>E. stricta</i>	93.25843	166	2	10	0
<i>E. nemorosa</i>	87.50000	0	63	8	1
E. (interm.)	88.81119	10	5	127	1
Kozének	94.73684	0	1	0	18
celkem	90.77670	176	71	145	20

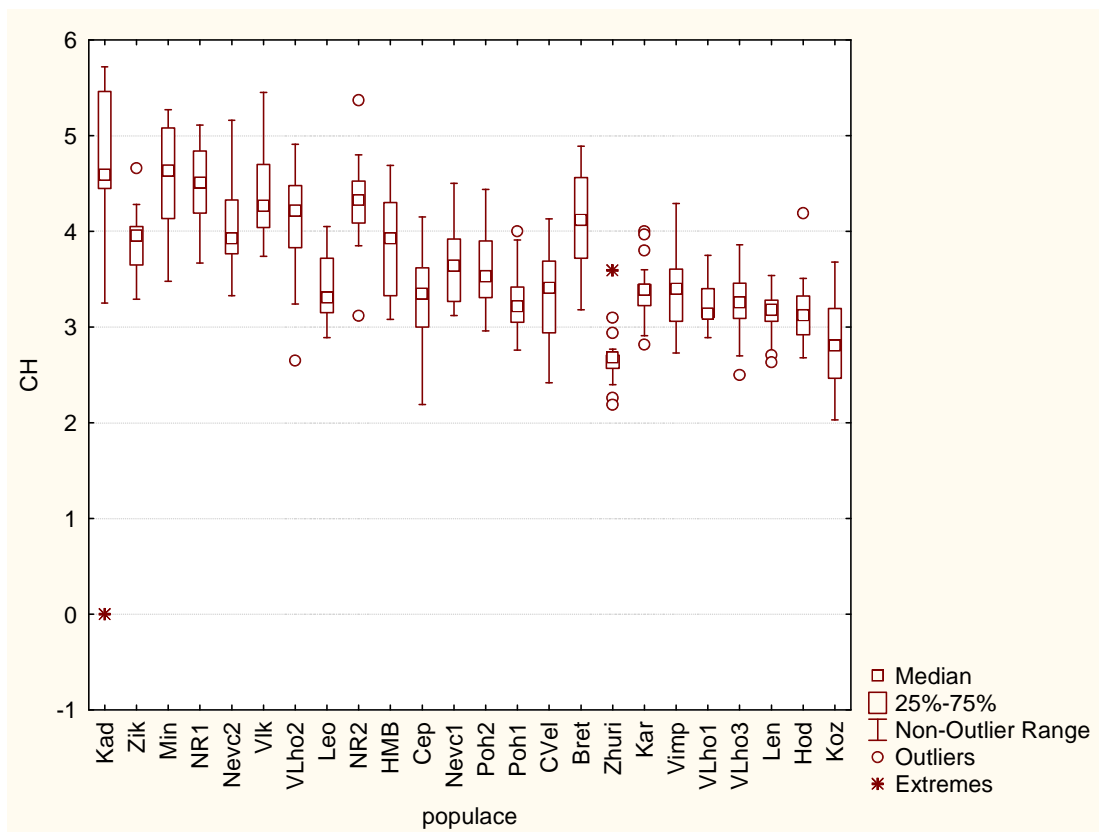
Znaky, které na základě výsledků kanonické diskriminační analýzy populačních průměrů populací *E. stricta*, *E. nemorosa* a populace z Kozénku pravděpodobně nejlépe oddělují druhy jsem vynesla do obrázků zobrazujících Box & Whiskers plot (Obr.17-22), abych vizualizovala jejich rozdíly mezi oběma druhy. Jsou jimi znaky délka bočního okraje dolního korunního pysku (CLU), délka střední části dolního korunního pysku (CLL), výška koruny (CH), polovina šířky dolního korunního pysku (CLW2), délka osinek a délka listenu. Ne všechny tyto znaky však zcela zřetelně oddělují populace *E. stricta* od populací *E. nemorosa*. Populace v těchto obrázcích jsou řazeny podle pořadí na první ordinační ose PCA populačních průměrů (viz Obr. 11).



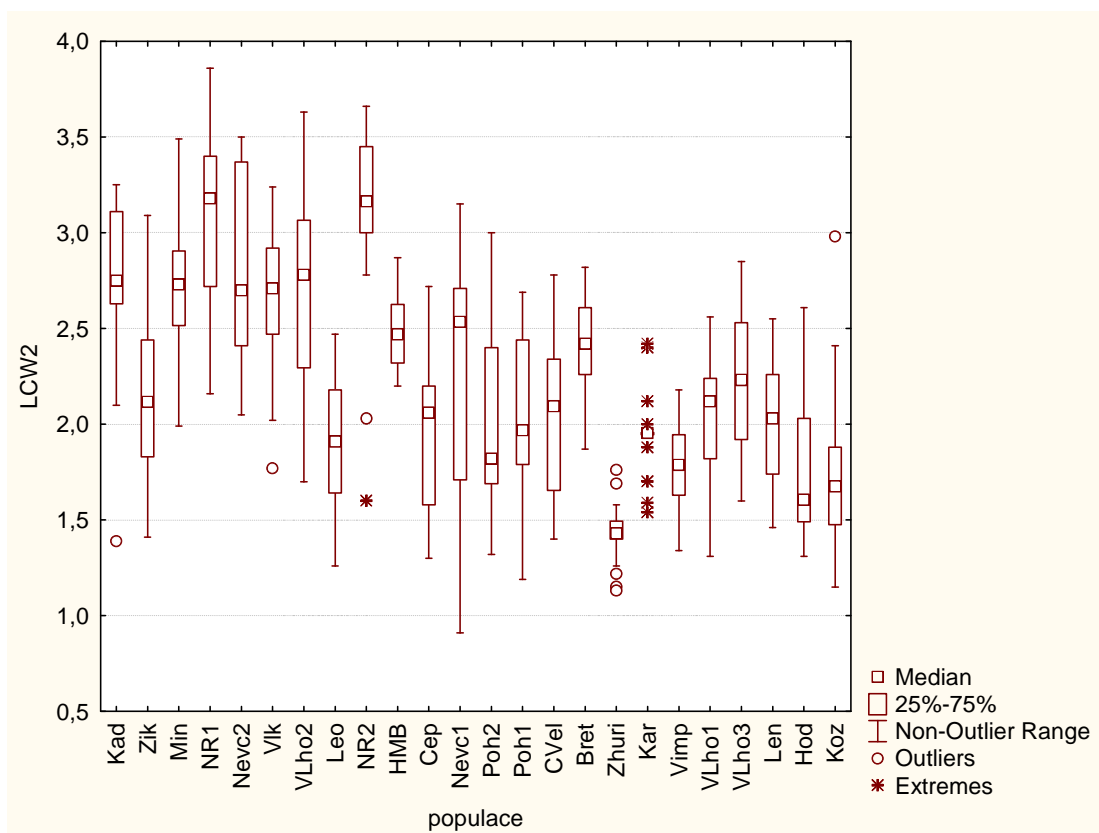
Obr. 17: Box & Whiskers plot délky bočního okraje dolního korunního pysku (CLU), v závislosti na populaci.



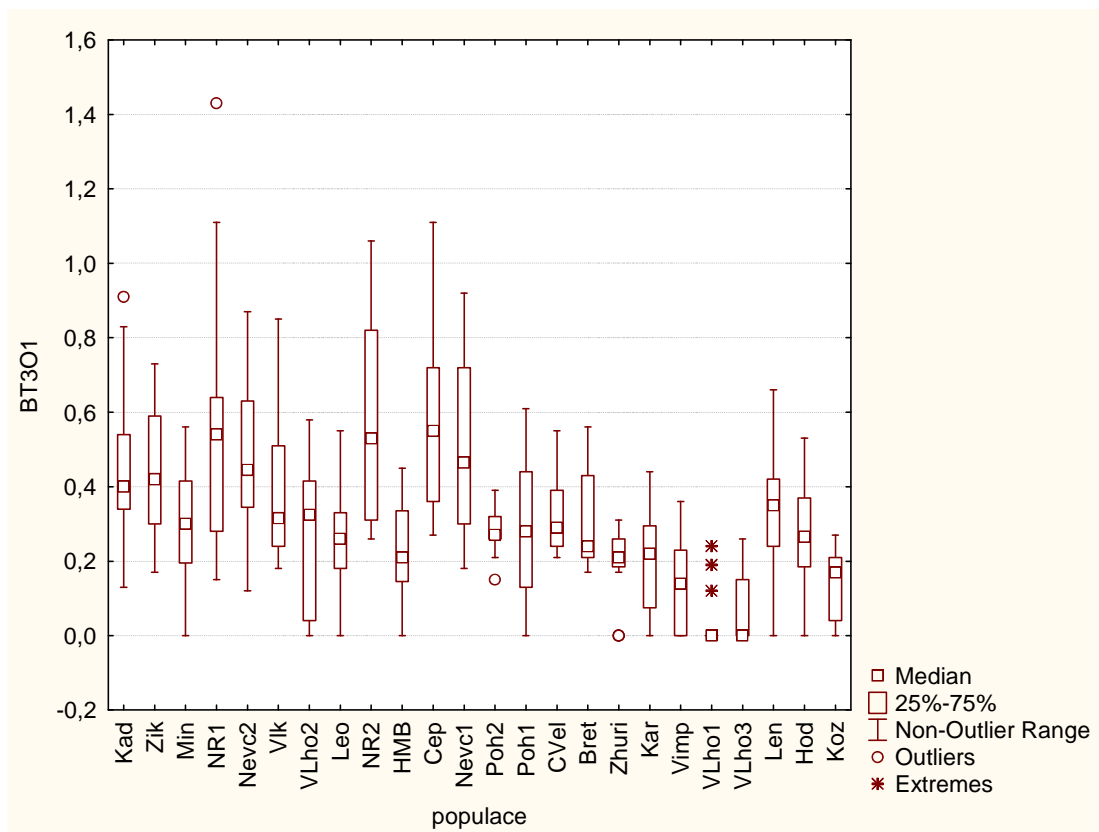
Obr. 18: Box&Whiskers plot délky střední části dolního korunního pysku (CLL) v závislosti na populaci.



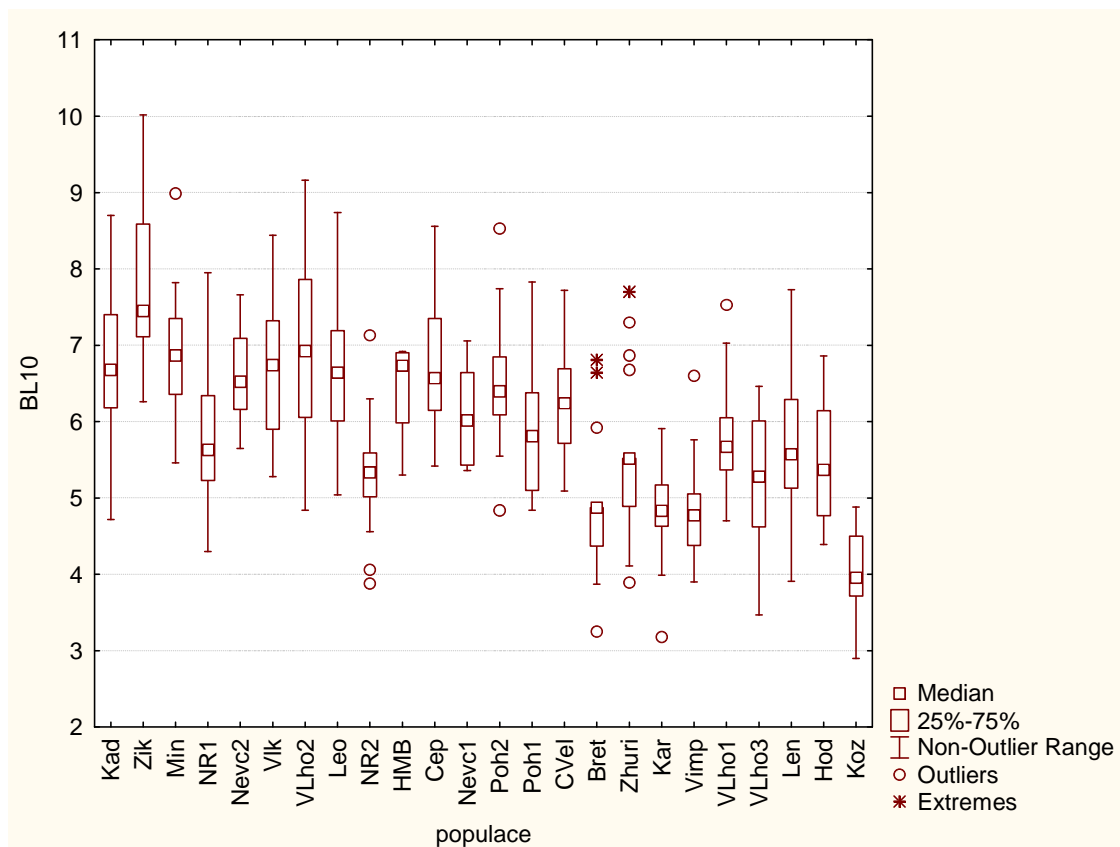
Obr. 19: Box & Whiskers plot výšky koruny (CH) v závislosti na populaci.



Obr. 20: Box&Whiskers plot poloviny šířky dolního korunního pysku (CLW2) v závislosti na populaci



Obr.21: Box&Whiskers plot délky délky osinky na třetím zubu prvního listenu (BT3O1) v závislosti na populaci.



Obr.22: Box&Whiskers plot délky délky desátého listenu (BL10) v závislosti na populaci

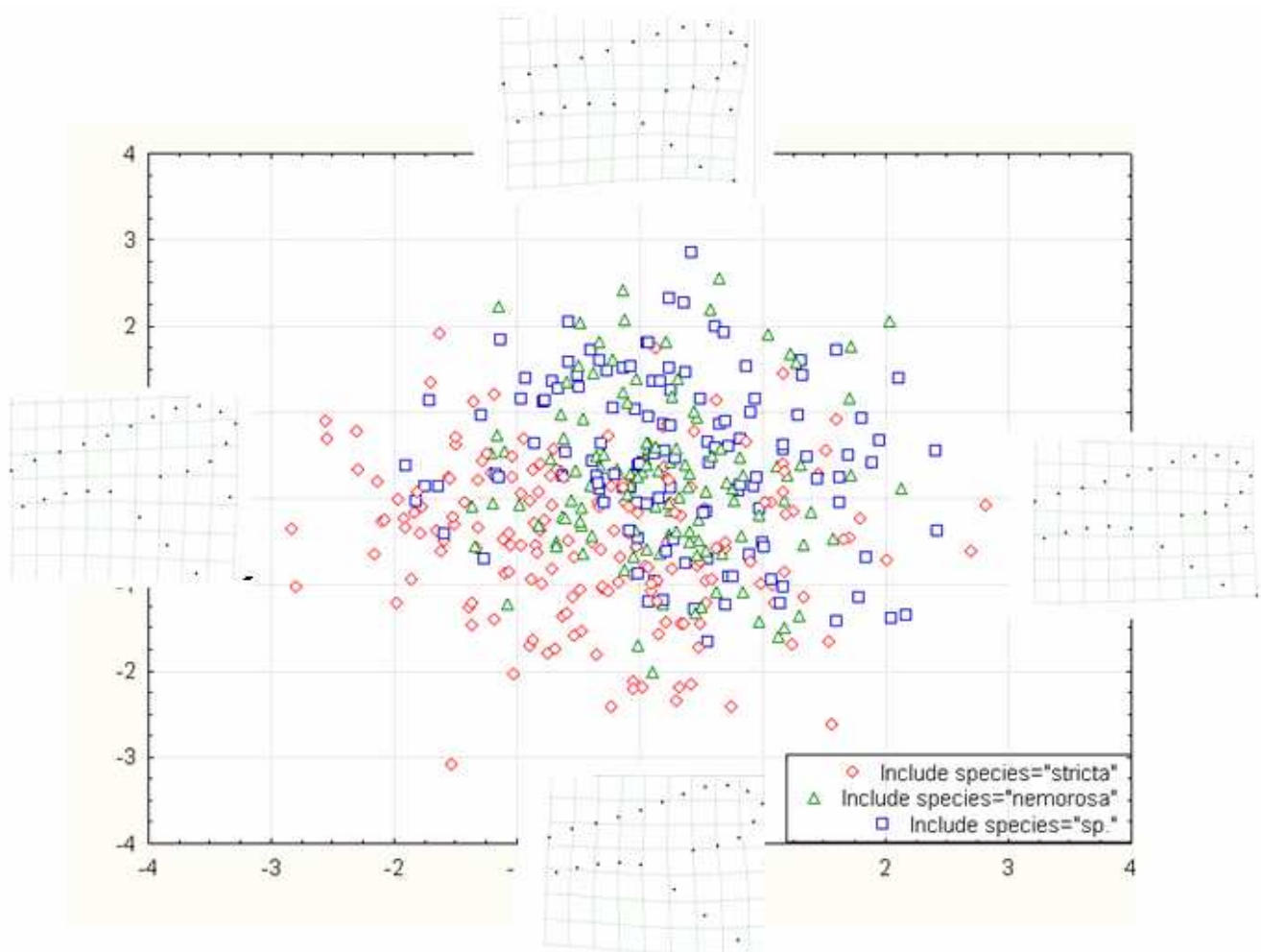
4.1.2. Geometrická morfometrie

Pomocí programu tpsRelw, ver. 1.45 (Rohlf 2007) jsem sestrojila diagramy, které vyjadřují variabilitu jednotlivých landmarků a semilandmarků zaznamenaných na květech a listenech (Obr.23).



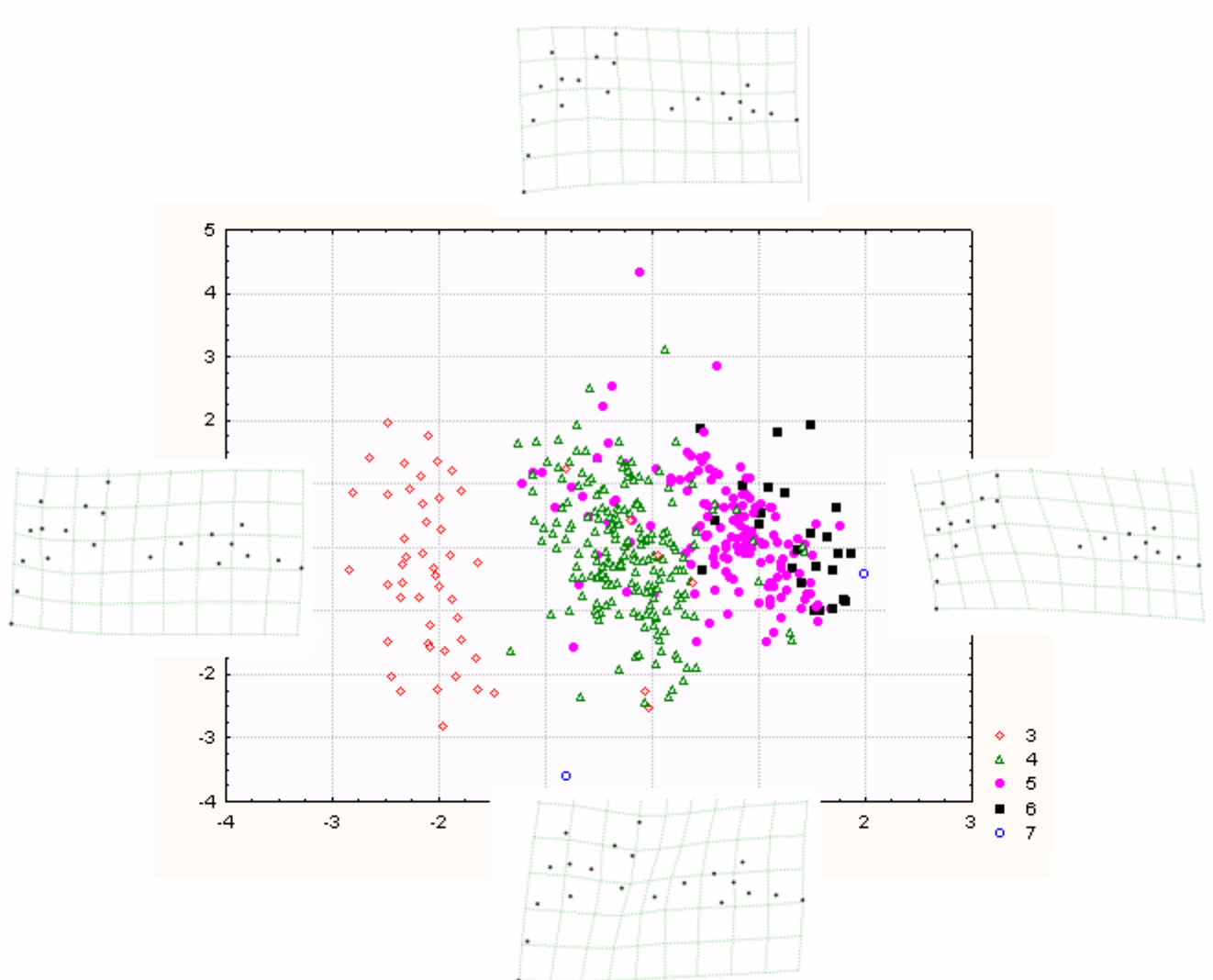
Obr. 23: Diagram zaznamenaných bodů na jednotlivých orgánech (A – květ, B – 10. listen)

Na základě analýzy relativních deformací (RWA, *relative warps analysis*; Obr.24) se ukazuje, že tvar květu se mezi oběma druhy příliš neliší. První osa vysvětluje 33,7% variability. Zdá se, že květ *E. stricta* má o něco delší korunní trubku. Potenciální variabilita v tvaru však může být překryta variabilitou, která vzniká v důsledku různého ontogenetického stáří květu.



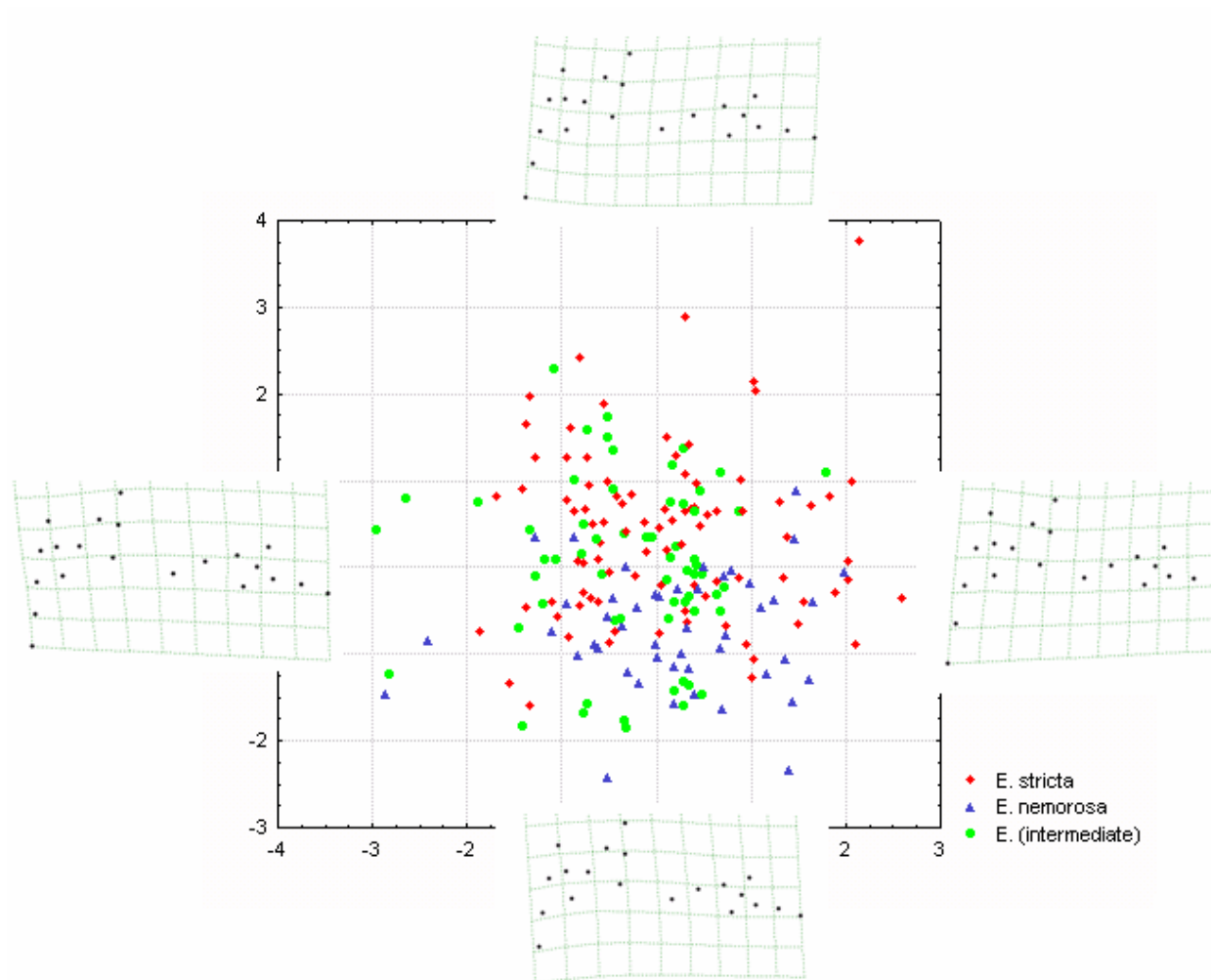
Obr. 24: Ordinační diagram RWA květů. První osa vysvětluje 33,7% variability, druhá 27,6%.

Analýza relativních deformací všech desátých listenů rovněž nepřinesla očekávané výsledky. Vytvořil se kompaktní shluk, jehož struktura není korelována s příslušností rostlin k jednotlivým druhům. Variabilita mezi druhy je překryta rozdíly mezi listeny s různým počtem bočních zubů. Na ordinačním diagramu (Obr. 25) jsou poměrně dobře odděleny listeny se třemi bočními zuby. Listeny se 4 a 5 páry zubů mírně promíchané, přesto se však pro jednotlivé počty párů zubů vytvořily poměrně kompaktní shluky. První osa vysvětluje 64,5% a druhá 8,6% variability.



Obr. 25: RWA ordinační diagram rozlišující změnu tvaru podle počtu párů zubů. První osa vysvětluje 64,5% a druhá 8,6% variability.

Následná analýza listenů se 4 páry zubů (tzn. jedním párem zubů mezi oběma analyzovanými částmi) ukazuje, že *E. stricta* pravděpodobně dosahuje tvaru mnohem více variabilního než *E. nemorosa* (Obr.26). Zatímco *E. nemorosa* má listeny spíše širší, *E. stricta* je má poněkud štíhlejší a protáhlejší. Přestože mívá listeny i širší, zdá se, že nedosahuje takové šířky jako *E. nemorosa*. U přechodných populací se tvar listenu pohybuje opět mezi oběma rodičovskými druhy. Přesto si myslím, že stejně jako v případě květu, může být tato variabilita ve tvaru listenu překryta variabilitou, která vzniká v důsledku různého ontogenetického stáří listenu.



Obr. 26: RWA ordinační diagram 10.listenů se 4 páry zubů naznačuje tvarové oddělení *E. stricta* od *E. nemorosa*. Hybridní rostliny jsou rozptýlené mezi oběma druhy. První osa vysvětluje 36,6% a druhá osa 15,4% variability.

4.2. Molekulární metody

Celkem jsem získala 9 sekvencí pro všechny tři studované úseky (2 pro úsek ITS, 3 pro úsek trnT-trnL a 4 pro matK). Všechny vzorky byly čteny pouze z jedné strany. Při míchání směsi pro PCR úseku matK zřejmě došlo ke kontaminaci jednoho vzorku *E. nemorosa*. Tento proto musel být z následného vyhodnocování sekvencí vyřazen.

Sekvence úseků ITS, matK ani trnT-trnL nebyly mezi druhy *E. stricta* a *E. nemorosa* variabilní.

5. Diskuse

5.1. Morfometrické analýzy

Analýza morfologických znaků přesvědčivě ukázala, že dobře vyhraněné populace obou druhů se liší mnoha znaky. Mezi nejlepší zdá se patřit především výška koruny (CH), délka střední části dolního korunního pysku (CLL), délka bočního okraje dolního korunního pysku (CLU), délka osinek na listenech, šířka listenů či úhel koncového zubu listenu.

Délka koruny, tradičně užívaný znak k rozlišování druhů *E. stricta* a *E. nemorosa*, může rozlišování obou druhů komplikovat, a to proto, že pravděpodobně existují populace *E. stricta* s menšími květy než se běžně uvádí v literatuře (např. Smejkal 1963, Vitek 2002b). To dokazuje i Karlssonova studie (Karlsson 1976), v níž popisuje populace *E. stricta*, které délkou koruny odpovídaly spíše *E. nemorosa*, se kterou je porovnával. Rovněž v případě *E. nemorosa* se vyskytují komplikace. Existuje totiž druh *E. curta*, která je *E. nemorosa* velmi podobná, ale má o něco větší květy a osinky (Smejkal & Dvořáková). Proto s ní bývá mnohdy zaměňována. Někteří autoři (např. Hartl 1974, Yeo 1978) proto *E. curta* ztotožňují s *E. nemorosa*.

Ani v případě této studie nebyly naměřené délky koruny zcela homogenní. Kratší korunou se odlišovaly především populace z Čepičné (Cep) a Nevcehle (Nevc1). V těchto případech to však bylo pravděpodobně způsobeno stářím květů. Obě populace byly sbírány koncem doby květu, proto měly květy poněkud povadlé, což se pravděpodobně projevilo v délce jejich koruny i dalších znacích na květech.

Dalším významným a hojně využívaným znakem k rozlišování druhů v rámci rodu *Euphrasia* je přítomnost či nepřítomnost osinek 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) připouští možnost, že má *E. nemorosa* taktéž osinky. Je to způsobeno především tím, že do druhu *E. nemorosa* zahrnují jinými autory (např. Smejkal 1963, Smejkal & Dvořáková 2000, Stace 1997) odlišovanou *E. curta*. V souboru mých dat nebyla snad žádná populace, u které by toto na sto procent platilo. Může to být způsobeno variabilitou v rámci druhu nebo tím, že ani tyto populace nebyly zcela čisté, přestože se tak podle habitu i dalších znaků jeví.

Znakem, který by mohl být užitečný při odlišování obou druhů je úhel měřený na koncovém zubu listenu. Zatímco u *E. stricta* byl tento úhel velmi ostrý, průměrně zhruba

45°, u populací *E. nemorosa* dosahoval hodnot o 5-9° více. Populace intermediárního vzhledu pak dosahovaly zhruba 51°.

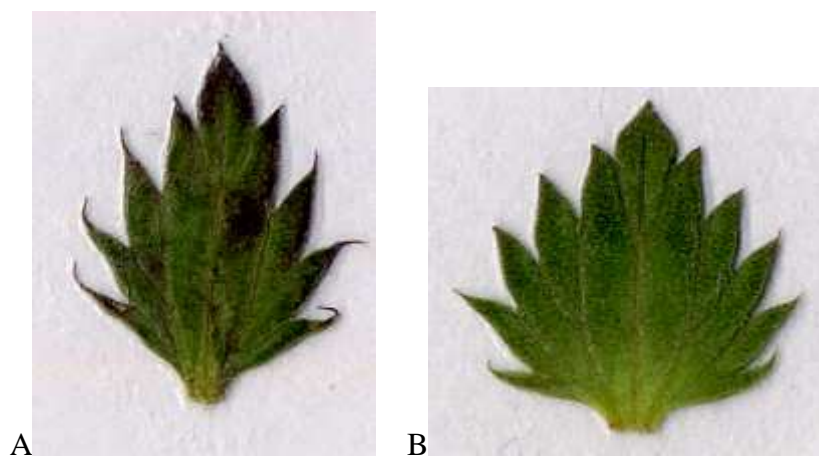
Ostatní znaky pak byly většinou dosti variabilní a zřejmě ovlivněné i ontogenetickým stadiem jednotlivých rostlin. Jejich využitelnost k odlišování jednotlivých druhů tedy zřejmě není příliš velká. Je však nutno podotknout, že by asi bylo třeba prozkoumat daleko větší soubor dat na daleko větším území než jsem měla k dispozici v této práci já.

Zároveň by bylo zajímavé pokusit se porovnat populace míst s různými ekologickými podmínkami, jako např. zastínění lokalit či hostitel. I tyto faktory mají totiž zajisté vliv na vzhled rostlin (např. Smejkal & Dvořáková, Vitek 2002a).

Analýza tvaru květů ukázala, že je tvar je mezi oběma druhy poměrně uniformní. Přesto se zde však ukázalo, že *E. stricta* by mohla mít o něco delší korunní trubku. Pravděpodobná variabilita ve tvaru květu však mohla být překryta variabilitou způsobenou různým ontogenetickým stadiem vývoje jednotlivých květů.

Při analýze relativních deformací listenů se ukázalo, že analyzovat tvar listenů rodu *Euphrasia* naráží na značné metodické potíže způsobené zejména různým počtem zubů u různě vyvinutých listenů. Je proto třeba analyzovat listeny s pokud možno stejným počtem párů zubů. Další možností pak je pokusit se využít jiné metody. McLellan & Endler (1998) analyzovali tvar listů podobně tvarově komplikovaných druhů rodu *Acer* pomocí Fourierových analýz. To by mohla být možnost, jak lépe analyzovat tvar i v rámci rodu *Euphrasia*.

Přestože morfometrická analýza nepotvrdila, při pohledu na listeny typických jedinců *E. stricta* a *E. nemorosa* (viz Obr. 27) je zjevné, že se oba druhy od sebe liší. *E. stricta* má užší a protáhlejší listeny zatímco *E. nemorosa* kratší a širší.



Obr. 27: Rozdíl tvaru listenu *E. stricta* (A) a *E. nemorosa* (B).

Taktéž je možné, že použitá metoda analýzy tvaru byla ovlivněna vnitřní variabilitou mezi populacemi. Tím by se mohly zcela zkreslit výsledky. Nabízí se proto také otázka, zda-li by nebylo lepší a vhodnější pro tento účel vybírat listeny v optimální fázi vývoje, než odebírat striktně první, pátý či desátý listen.

5.2. Molekulární metody

Cílem této části bakalářské práce bylo především naučit se metodice přípravy sebraného materiálu pro sekvenování a ověřit využitelnost této metody ke studiu vnitrodruhové variability v rodě *Euphrasia*. Z tohoto důvodu jsem pracovala pouze s velmi malým počtem vzorků. Není proto možné vyvozovat ze získaných výsledků nějaké zásadní závěry. Přesto se zdá, že úseky ITS, matK a trnT-trnL nejsou mezi *E. stricta* a *E. nemorosa* rozdílné a nejsou proto vhodné ke studiu mezidruhové variability. Pro další studium variability této supiny rodu *Euphrasia* bude proto třeba pokusit se najít buď jiné úseky DNA nebo vyzkoušet další molekulární metody, např. AFLP, ISSR či analýzu mikrosatelitů, která byla použita s úspěchem na Britských světlicích (French, Hollinsworth & Ennos 2003).

6. Závěr

Za účelem studia morfologické variability mezi druhy *E. stricta* a *E. nemorosa* se podařilo sesbírat 24 populací. Zpracování tohoto materiálu nastínilo znaky, které oba druhy pravděpodobně nejlépe odlišují. K tradičně udávané délce koruny přibyly především délka bočního okraje dolního pysku (CLU), výška koruny či úhel koncového zubu listenu.

Při studiu variability tvarů se ukázalo, že tvar květu je u obou druhů stejný a není tak možno jej využít jako determinační znak. Naopak analýzou tvaru listenů se ukazuje, že zde jisté rozdíly mezi oběma druhy jsou, avšak jejich formální zachycení a hodnocení naráží na značné metodické potíže .

Sekvenování úseků ITS, matK a trnT-trnL zatím neprokázalo, že by byly *E. stricta* a *E. nemorosa* v těchto úsecích variabilní. Zdá se, že jsou ke studiu mezidruhové variability nevhodné a bude proto třeba vyzkoušet jiné úseky či molekulární metody.

Ke studiu takto problematické skupiny druhů bude potřeba využít co možná nejvíce různých přístupů. Kromě morfomterických analýz a molekulárních metod by mohly být přínosné kultivační pokusy ke studiu fenotypové plasticity či umělé hybridizace, abychom zjistili, zda-li mezi těmito druhy skutečně probíhá. Rovněž je třeba problematiku těchto druhů studovat na mnohem větším území než které pokrývala tato bakalářská práce.

7. Citovaná literatura

- Bobear J.B. (1969): An analysis of populations of Irish *Euphrasia* L. – *Watsonia*, 7(2): 68-90.
- Bookstein F.L. (1991): Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. – Cambridge University Press, New York, USA.
- Briggs D. & Walters S.M. (1997): Plant variation and evolution. – Cambridge University Press, Cambridge, 512 p. [český překlad: Havránek P., Rybka V., Konvička M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin – Univerzita Palackého, Olomouc].
- Crosby-Browne A.J. (1950). The root parasitism of *Euphrasia salisburgensis* Funck. – *Watsonia* 1: 354–355.
- Ducarme V. & Wesselingh R.A. (2005): Detecting hybridization in mixed populations of *Rhinanthus minor* and *Rhinanthus angustifolius*. – *Folia Geobotanica* 40: 151–161.
- Dvořáková M. (1999): *Euphrasia corcontica*, eine endemische Art aus dem Gebirge Krkonoše (Riesengebirge, Westsudeten). – *Preslia* 71: 33–35.
- 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.
- Ellstrand N.C., Whitkus R. & Riesenber L.H. (1996): Distribution of spontaneous plant hybrids. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5090–5093.
- French G.C., Hollingsworth P.M. & Ennos A (2003): Isolation of polymorphic microsatellite markers for British *Euphrasia* L. – *Molecular Ecology Notes* 3: 626–628.
- 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.L. & Vitek E. (2007): *Euphrasia amurensis*, *E. hirtella* var. *ramosa* and var. *karoiana* (Orobanchaceae). – *Bot. J. Linn. Soc.* 154: 215–223.
- Guttová A, Bačkor M., Marhold K. & Slezáková V. (2006): Morphometric and chemical evaluation of *Solenopsis carpatica* (Catillariaceae). – In: Lackovičová, A., Guttová, A., Lisická, E. & Lizoň, P. (eds.): Central European lichens – diversity and threat, Mycotaxon Ltd., Ithaca, pp. 85–96.
- Hamblen D.J. (1954): Cytology of the Scrophulariaceae and Orobanchaceae. – *Nature*, 174: 838.

- 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., Huhta A.P. & Tuomi J. (2004): Tolerance of an annual hemiparasite, *Euphrasia stricta* agg., to simulated grazing in relation to the host environment. – *Flora* 199: 247–255.
- Hong D–Y., Yang H., Jin C.–L., Fischer M.A., Holmgren N.H. & Mill R.R. (1998): Scrophulariaceae. – In Zhengyi W., Raven P.H. [eds.]: *Flora of China*, vol. 18: 1–212, Missouri Botanical Garden Press, Missouri, USA.
- Jalas J. (1977): New nomenclatural combinations in *Euphrasia*, *Rumex*, *Silene* and *Stachys*. – *Ann. Bot. Fennici* 14: 191–192.
- Jalas J. & Kukkonen (1973): Typification of the taxa of *Euphrasia* (Scrophulariaceae) described by Finnish botanists. – *Ann. Bot. Fennici* 10: 27–42.
- 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.
- Kerner von Marilaun A. (1888): Ueber die Bestäubungseinrichtungen der *Euphrasien*. – *Verh. Zool.-Bot. Ges. Wien* 38: 563–567.
- Koch L. von (1891): Zur Entwicklungsgeschichte der Rhinanthaceen (II *Euphrasia officinalis* L.). – *Jahrb. F. Wiss. Bot.* 22: 1–33.
- Kolseth A.-K. & Lönn M. (2005): Genetic structure of *Euphrasia stricta* on the Baltic island of Gotland, Sweden. – *Ecography* 28:443–452.
- Košnar J. (2006): Morfologické a ekologické aspekty problematiky trsnatých morfortypů *Carex nigra* v České republice. – Ms., 69 p. [Magisterská diplomová práce, depon in: Společná knihovna biologických pracovišť AV ČR a PřF JU, České Budějovice].
- Koutecký P. (2008): Taxonomická studie střeoevropských zástupců *Centaurea* sect. *Jacea*. – Ms., 211 p. [Doktorská disertační práce, depon in: Společná knihovna biologických pracovišť AV ČR a PřF JU, České Budějovice].
- Kučera J. (1999): Taxonomická studie skupiny *Didymodon rigidulus* (Bryopsida, Pottiaceae) v Evropě. – Ms., 120 p. [Doktorská disertační práce, depon in: Společná knihovna biologických pracovišť AV ČR a PřF JU, České Budějovice].
- Kwak M.M. (1978): Pollination, hybridization and ethological isolation of *Rhinanthus minor* and *R. serotinus* (*Rhinanthoideae: Scrophulariaceae*) by bumblebees (*Bombus* Latr.) – *Taxon* 27(2/3): 145–158.

- Lepš J. (1996): Biostatistika. – Skriptum, Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- 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.
- Marhold K. (1998): Morphometric comparison of diploid populations of *Cardamine amara* (Brassicaceae) from Central Europe and the Balkan Peninsula. – *Thaiszia J. Bot.* 8: 19–32.
- Marhold K. & Suda J. (2002): Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). – Karolinum, Praha.
- McLellan T. & Endler J.A. (1998): The relative success of some methods for measuring and describing the shape of complex objects. – *Systematic Biology* 47: 264–281.
- Neustupa J. & Němcová Y. (2007): A geometric morphometric study of the variation in scales of *Mallomonas striata* (Synurophyceae, Heterokotophyta). – *Phycologia* 46 (2): 123–130.
- Neustupa J. & Šťastný J. (2006): The geometric morphometric study of Central European species of the genus *Micrasterias* (Zygnematophyceae, Viridiplantae). – *Preslia* 78: 253–263.
- Olmstead R.G. & Reeves P.A. (1995): Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* 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.
- Pugsley H.W. (1930): A revision of the British *Euphrasiae*. – *J. Linn. Soc. Bot.* 48: 467–542.
- Reiche K. (1911): *Euphrasia*. – In: Reiche K. (1911): Estudios críticos sobre la Flora de Chile, vol. 6, Anales de la Universidad de Chile, Santiago, Chile, p. 87–95.
- 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.
- Rohlf F.J. & Bookstein F.L. [eds.] (1990): Proceeding of the Michigan morphometric workshop. – Special Publ. No. 2, The University of Michigan Museum of Zoology.

- Rothmaler W. (1935): Generum plantarum ibericarum revisi critica III., *Euphrasia* L. – *Cavanillesia* 7: 5–28.
- Sagorski E. (1896): Ein neuer *Euphrasia*-Bastard. *Euphrasia montana* × *Tatrae* = *E. Javorinensis* m. - *Öster. Bot. Zs.* 46: 289.
- Schwarz O. (1935): Über einiger *Euphrasia*- und *Rhinanthus*-Arten des höchsten Erzgebirges. – *Report. Spec. Nov. Regni Veg.* 38: 43–48.
- Seel W.E. & Press M.C. (1993): Influence of the host on tree sub-Arctic annual facultative root hemiparasites: I. Growth, mineral accumulation and above-ground dry-matter partitioning. – *New Phytol.* 125: 131–138
- Senlosse M.A., Bauer R., Moyersoen B. (2002): Basal hymenomycetes belonging to the *Sabacinaceae* are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. – *New Phytologist* 155: 183–195.
- 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.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Shilling E.E. & Small R.L. (2005): The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. – *Amer. Journ. of Botany* 92: 142–166.
- Silverside A. J. (1991): The identity of *Euphrasia officinalis* L. and its nomenclatural implication. *Watsonia* 18: 343–350
- Smejkal M. (1958): K taxonomii některých československých světlíků (*Euphrasia* L.) – *Čas. Slez. Mus., ser. A*, 3: 253–269.
- 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 ekologicko-fytocenologická charakteristika československých světlíků (*Euphrasia* L.). – *Spisy Přírod. Fak. Univ. Turkyňe Brno*, no 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.
- Sokal R.R. & Sneath P.H.A. (1963): *Principles of numerical taxonomy*. – W.H.Freeman and comp., San Francisco & London, 359p.

- Solbrig O.T. (1970): Principles and methods of plant biosystematics. – Collier-MacMillan, London, 226 p.
- 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>.
- Sterneck J. v. (1901): Monographie der Gattung *Alectorophus*. – Abh. Zool.-Bot. Ges. Wien, 1(2):1–150.
- Štech M. (in prep.): Euphrasia. – In: Marhold K. et al. (in prep.): Určovací klíč papraďorostov a semenných rastlín Slovenska.
- Štech M. & Drábková L. (2005): Morphometric and RAPD study of the *Melampyrum sylvaticum* group in the Sudeten, the Alps and Carpathians. – Folia Geobotanica 40: 177–193.
- 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. *Australian Systematic Botany* 19, 289–307.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. – *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- 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.
- Těšitel J. (2005): Variabilita *Melampyrum sylvaticum* agg. v části Střední Evropy. – Ms, 49 p. [Bakalářská diplomová práce, depon in: Společná knihovna biologických pracovišť AV ČR a PřF JU, České Budějovice].
- 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. (1982): Zwei neue Hybriden in der Gattung *Euphrasia* (Scrophulariaceae). – *Plant Syst. Evol.* 139: 319–322.
- Vitek E. (1985a): Evolution alpinen Populationen von *Euphrasia* (Scrophulariaceae): Die mittel- bis kleinblütigen, drüsenhaarigen Arten. – *Plant Syst. Evol.* 148: 215–237.
- Vitek E. (1985b): Evolution alpinen Populationen von *Euphrasia* (Scrophulariaceae): *E. alpina* und *E. christii*. – *Plant Syst. Evol.* 149: 1–18.

- Vitek E. (1986): Evolution alpine Populationen von *Euphrasia* (Scrophulariaceae): Die tetraploide *E. minima*. – Plant Syst. Evol. 151: 241–269.
- Vitek E. & Kiehn M. (1990): Chromosomenzählungen an *Euphrasia rostkoviana* (Scrophulariaceae) und verwandten Taxa. – Flora 184: 31–41.
- 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* L. – In: López Sáez J.A., Catalán P., Sáez L. (eds): Plantas parásitas de la Península Ibérica e Islas Baleares: p. 252–274, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Vitek E. (2002b): *Euphrasia*. – In: Jäger E.J., Werner K. (eds.): Exkursionsflora von Deutschland. Bd. 4, Gefäßpflanzen: Kritischer Band, 9. Aufl.: 575–578.
- 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
- White T., Burns T., Lee S. & Tailor J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J. (ed.): PCR protocols, p. 315–322, Academic Press, San Diego, Calif.
- Wilkins D.A. (1963): Plasticity and establishment in *Euphrasia*. – Annals of Botany 27: 533–552.
- Yeo P.F. (1954): The cytology of British species of *Euphrasia*. – Watsonia, 3, Part 2: 101–108.
- 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. (1956): Hybridisation between diploid and tetraploid species of *Euphrasia*. – Watsonia, 3, Part 5, 253–269.

- Yeo P.F. (1962): A study of variation *Euphrasia* by means of outdoor cultivation. – *Watsonia* 5(4): 224–235.
- 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. (1968): The evolutionary significance of the speciation of *Euphrasia* in Europe. – *Evolution*, 22: 736–747.
- 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. (1973). The Azorean species of *Euphrasia*. - *Boletim do Museu Municipal do Funchal*, 17: 74–83.
- Yeo P.F. (1978): A taxonomic revision of *Euphrasia* in Europe – *Bot. J. Linn. Soc.* 77: 223–334.
- Yoshioka Y., Iwata H., Oshawa R. & Ninomiya S. (2004): Analysis of petal shape variation of *Primula sieboldii* by elliptic Fourier descriptions and principal komponent analysis. – *Annals of Botany* 94: 657–664.
- Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D. & Fink W.L. (2004): *Geometric Morphopetrics for biologists: a primer*. – Elsevier Academic Press, London, 443 p.

Příloha1:Seznam lokalit

Označení	Druh	Lokalita	Severní zeměpisná šířka	Východní zeměpisná délka	Nadm. výška (m)	Datum
Zik	<i>E. stricta</i>	Žikov: pastvina ve stráni u silnice, ca 150 m Z od středu obce	49°13'53.3"	13°27'16.9"	553	2.8.2007
Leo	přechodný typ	Pohorská Ves, Leopoldov: staré zarůstající skladiště dřeva u křižovatky cest ca 0,4 km JJ(Z) od středu osady	48°38'33.6"	14°38'17.7"	798	29.8.2007
Poh1	přechodný typ	Pohorská Ves, Pohoří na Šumavě: okraj louky a stará luční cesta cca 900 m JZ kostela	48°35'45.4"	14°41'24.2"	922	29.8.2007
Poh2	přechodný typ	Pohorská Ves, Pohoří na Šumavě: travnaté plochy před kostelem a v základech zříčeného kostela	48°36'14.2"	14°41'47.9"	918	29.8.2007
Min	<i>E. stricta</i>	Sušice: stará cesta nad lomem na vrchu Minovka ca 1,2 km SV od nádraží v Sušici	49°15'18.9"	13°33'03.5"	584	30.8.2007
Len	přechodný typ	Lenora: složiště dřeva u silnice ca 0,4 km S od nádraží v Lenore	48°55'58.7"	13°47'46.2"	765	30.8.2007
Hod	přechodný typ	Hodňov: okraj lesní cesty ca 100 m V od železniční zastávky Hodňov	48°46'37.9"	14°06'09.5"	752	30.8.2007
Vlk	<i>E. stricta</i>	Vlkonice: travnatá plocha u silnice ca 0,8 km S od středu obce	49°18'25.2"	13°35'34.3"	472	30.8.2007
Koz	přechodný typ	Lhánice: u rezervace Kozének V od Lhánic: travnatá plocha u polní cesty ca 100 m SV od statku	49°06'29.5"	16°14'20.6"	365	11.9.2007
NR1	<i>E. stricta</i>	Hrubšice: okraj silničky podél PR Nad Řekami ca 500 m od mostu z Biskoupek na Hrubšice	49°05'34.8"	16°17'21.9"	269	11.9.2007
NR2	<i>E. stricta</i>	Hrubšice: travnatá plocha na svahu v PR Nad Řekami ca 500 m od mostu z Biskoupek na Hrubšice	49°05'31.5"	16°17'20.8"	271	11.9.2007
CVel	přechodný typ	České Velenice: lesní cesta ca 2,8 km ZSZ od železničního nádraží v Českých Velenicích	48°46'49.2"	14°55'19.2"	515	15.9.2007
VLho1	<i>E. nemorosa</i>	Velká Lhota: kulturní louka na Z od silnice ca 500 m S od křižovatky na Poldovku	49°08'44.7"	15°19'59.4"	626	20.9.2007
VLho2	<i>E. stricta</i>	Velká Lhota: lesní cesta k rybníku ca 300 m SZ od křižovatky na Poldovku	49°08'35.3"	15°19'54.6"	640	20.9.2007
Nevc1	<i>E. stricta</i>	Nevcehle: polní cesta ca 1.5 km SZ od středu obce	49°14'14.3"	15°31'32.7"	575	20.9.2007
Nevc2	<i>E. stricta</i>	Nevcehle: polní cesta ca 300 SSZ od středu obce	49°13'42.2"	15°32'12.8"	608	20.9.2007
VLho3	<i>E. nemorosa</i>	Velká Lhota: luční komplex Z rybníka ca 800 m SZ od křižovatky na Poldovku	49°08'50"	15°19'38.7"	600	20.9.2007
Čep	<i>E. stricta</i>	Čepičná: dno starého lomu ca 0,4 km Z(S)Z od kaple v obci	49°16'03.9"	13°35'15.1"	450	20.9.2007
Bret	přechodný typ	Břetětice: soukromá louka cca 200 m jižně od středu obce při silnici na Svojšice	49°15'04.5"	13°27'39.7"	637	5.9.2007
HMB	přechodný typ	Hory Matky Boží: 500 m jižně po žluté turistické značce od obce	49°15'46.3"	13°26'16.9"	686	5.9.2007
Kad	<i>E. stricta</i>	Kadov: lada na jihozápadním okraji obce	49°24'01.1"	13°46'12.7"	517	20.8.2007
Kar	<i>E. nemorosa</i>	Horní Pole: luční cesta V od rybníka Karhov ca 750 m V od křižovatky silnic na severním okraji obce Horní Pole	49°12'37.5"	15°18'40.4"	686	19.8.2007
Vimp	<i>E. nemorosa</i>	Vimperk: okraj louky severně od silnice, ca 0,5 km Z(J)Z od křižovatky U Sloupu Z od Vimperka	49°03'44.9"	13°43'49.2"	900	8.9.2007
Zhuri	<i>E. nemorosa</i>	Zhůří: okraje silničky a luční cesty nedaleko kapličky v zaniklé obci Zhůří ca 8,6 km SV od Železné Rudy	49°10'34.3"	13°20'05.9"	895	10.8.2007

Příloha 2: Počty analyzovaných rostlin

populace	počet sebraných rostlin	klas. morfom.	květ	list	5B	10B
Zik	20	20	20	5	19	20
Leo	22	22	22	21	21	22
Poh1	20	20	17	9	19	19
Poh2	25	25	24	25	25	25
Min	25	25	25	13	24	25
Len	21	21	21	10	21	21
Hod	20	20	20	11	19	19
Vlk	19	19	19	7	18	19
Koz	20	20	20	1	20	20
NR1	21	21	21	1	21	21
NR2	21	21	21	0	21	21
Cvel	20	20	20	4	19	20
VLho1	21	21	21	16	21	21
VLho2	20	20	18	6	18	20
Nevc1	13	13	11	1	11	10
Nevc2	14	14	13	0	14	14
VLho3	25	25	22	15	24	24
Cep	19	19	14	0	15	17
Bret	15	15	15	10	14	9
HMB	10	10	10	3	9	9
Kad	20	20	16	14	20	18
Kar	20	20	11	14	17	16
Vimp	20	20	19	18	19	16
Zhuri	20	20	10	13	18	12

Příloha 3: Spearmanovy korelační koeficienty.

	CL	CTL	CH	UCL	CLU	CLL	CLW2	LCD	BL1	BW1	BD1	BT3W1	BT3L1	BT3O1	BTLW1	BTLL1	BTLO1	BL5	BW5	BD5
CL	*	0.74	0.82	0.73	0.78	0.80	0.69	0.82	0.46	0.26	0.47	0.38	0.38	0.40	0.36	0.42	0.24	0.50	0.25	0.42
CTL	0.74	*	0.60	0.52	0.57	0.46	0.49	0.59	0.30	0.17	0.32	0.33	0.26	0.21	0.25	0.32	0.14	0.32	0.14	0.34
CH	0.82	0.60	*	0.76	0.75	0.73	0.78	0.83	0.39	0.24	0.33	0.34	0.35	0.37	0.36	0.41	0.26	0.38	0.21	0.27
UCL	0.73	0.52	0.76	*	0.62	0.58	0.49	0.64	0.41	0.20	0.35	0.30	0.33	0.33	0.32	0.39	0.23	0.39	0.18	0.27
CLU	0.78	0.57	0.75	0.62	*	0.80	0.78	0.84	0.32	0.13	0.37	0.32	0.31	0.35	0.25	0.34	0.28	0.36	0.12	0.34
CLL	0.80	0.46	0.73	0.58	0.80	*	0.76	0.87	0.33	0.12	0.36	0.31	0.28	0.37	0.25	0.31	0.24	0.40	0.13	0.35
CLW2	0.69	0.49	0.78	0.49	0.78	0.76	*	0.84	0.26	0.12	0.23	0.30	0.26	0.30	0.26	0.31	0.20	0.28	0.12	0.23
LCD	0.82	0.59	0.83	0.64	0.84	0.87	0.84	*	0.35	0.14	0.39	0.34	0.32	0.39	0.27	0.37	0.27	0.38	0.12	0.35
BL1	0.46	0.30	0.39	0.41	0.32	0.33	0.26	0.35	*	0.74	0.72	0.59	0.56	0.27	0.63	0.67	0.10	0.85	0.65	0.52
BW1	0.26	0.17	0.24	0.20	0.13	0.12	0.12	0.14	0.74	*	0.45	0.37	0.52	0.21	0.62	0.40	-0.05	0.68	0.84	0.38
BD1	0.47	0.32	0.33	0.35	0.37	0.36	0.23	0.39	0.72	0.45	*	0.54	0.42	0.28	0.40	0.45	0.08	0.72	0.43	0.68
BT3W1	0.38	0.33	0.34	0.30	0.32	0.31	0.30	0.34	0.59	0.37	0.54	*	0.32	0.05	0.51	0.46	0.03	0.61	0.46	0.47
BT3L1	0.38	0.26	0.35	0.33	0.31	0.28	0.26	0.32	0.56	0.52	0.42	0.32	*	0.31	0.44	0.54	0.09	0.54	0.43	0.34
BT3O1	0.40	0.21	0.37	0.33	0.35	0.37	0.30	0.39	0.27	0.21	0.28	0.05	0.31	*	0.04	0.19	0.45	0.30	0.11	0.22
BTLW1	0.36	0.25	0.36	0.32	0.25	0.25	0.26	0.27	0.63	0.62	0.40	0.51	0.44	0.04	*	0.58	-0.02	0.53	0.58	0.26
BTLL1	0.42	0.32	0.41	0.39	0.34	0.31	0.31	0.37	0.67	0.40	0.45	0.46	0.54	0.19	0.58	*	0.06	0.54	0.35	0.33
BTLO1	0.24	0.14	0.26	0.23	0.28	0.24	0.20	0.27	0.10	-0.05	0.08	0.03	0.09	0.45	-0.02	0.06	*	0.10	-0.09	0.04
BL5	0.50	0.32	0.38	0.39	0.36	0.40	0.28	0.38	0.85	0.68	0.72	0.61	0.54	0.30	0.53	0.54	0.10	*	0.73	0.69
BW5	0.25	0.14	0.21	0.18	0.12	0.13	0.12	0.12	0.65	0.84	0.43	0.46	0.43	0.11	0.58	0.35	-0.09	0.73	*	0.40
BD5	0.42	0.34	0.27	0.27	0.34	0.35	0.23	0.35	0.52	0.38	0.68	0.47	0.34	0.22	0.26	0.33	0.04	0.69	0.40	*
BT3W5	0.40	0.35	0.32	0.29	0.31	0.33	0.32	0.34	0.41	0.28	0.42	0.60	0.30	0.06	0.33	0.30	0.03	0.58	0.37	0.52
BT3L5	0.37	0.28	0.33	0.26	0.33	0.27	0.26	0.30	0.41	0.37	0.36	0.35	0.61	0.29	0.35	0.39	0.10	0.48	0.43	0.39
BT3O5	0.38	0.25	0.36	0.28	0.37	0.35	0.31	0.37	0.27	0.15	0.28	0.12	0.31	0.65	0.11	0.21	0.46	0.27	0.10	0.16
BTLW5	0.36	0.23	0.36	0.31	0.28	0.27	0.29	0.30	0.51	0.56	0.38	0.49	0.38	0.09	0.63	0.39	0.03	0.61	0.66	0.34
BTLL5	0.46	0.35	0.39	0.38	0.35	0.35	0.29	0.40	0.59	0.38	0.50	0.48	0.50	0.28	0.49	0.64	0.21	0.65	0.39	0.41
BTLO5	0.33	0.18	0.30	0.27	0.28	0.29	0.19	0.29	0.15	-0.04	0.16	0.04	0.22	0.42	0.03	0.15	0.47	0.19	-0.08	0.09
BL10	0.49	0.32	0.35	0.36	0.37	0.41	0.28	0.38	0.70	0.52	0.66	0.53	0.43	0.29	0.36	0.41	0.09	0.86	0.60	0.66
BW10	0.29	0.14	0.21	0.18	0.17	0.22	0.15	0.16	0.59	0.66	0.45	0.41	0.34	0.15	0.41	0.27	-0.03	0.71	0.76	0.44
BD10	0.32	0.31	0.21	0.20	0.26	0.26	0.18	0.25	0.42	0.35	0.52	0.39	0.24	0.14	0.24	0.24	-0.05	0.55	0.39	0.64
BT3W10	0.33	0.32	0.27	0.21	0.27	0.27	0.25	0.27	0.37	0.27	0.40	0.54	0.25	0.04	0.29	0.20	-0.01	0.52	0.38	0.48
BT3L10	0.39	0.28	0.31	0.28	0.34	0.31	0.27	0.34	0.45	0.35	0.43	0.33	0.50	0.31	0.21	0.39	0.09	0.56	0.38	0.47
BT3O10	0.43	0.32	0.42	0.36	0.43	0.38	0.34	0.41	0.25	0.09	0.30	0.13	0.25	0.61	0.03	0.21	0.42	0.28	0.07	0.24
BTLW10	0.31	0.22	0.24	0.18	0.24	0.27	0.25	0.26	0.47	0.44	0.40	0.50	0.31	0.05	0.45	0.32	-0.02	0.62	0.57	0.43
BTLL10	0.53	0.39	0.43	0.38	0.45	0.45	0.39	0.48	0.52	0.28	0.52	0.44	0.46	0.33	0.34	0.52	0.22	0.63	0.29	0.54
BTLO10	0.32	0.15	0.29	0.31	0.27	0.24	0.20	0.28	0.21	0.07	0.30	0.11	0.22	0.43	0.08	0.17	0.36	0.23	-0.01	0.19
1BU	-0.19	-0.16	-0.16	-0.16	-0.19	-0.19	-0.11	-0.20	-0.17	0.14	-0.19	-0.04	-0.25	-0.24	0.17	-0.45	-0.21	-0.14	0.17	-0.19
1BL	-0.11	-0.10	-0.03	-0.05	-0.22	-0.24	-0.12	-0.21	0.11	0.49	-0.28	-0.03	0.19	-0.01	0.29	0.08	-0.13	0.02	0.39	-0.23
5BU	-0.24	-0.16	-0.15	-0.20	-0.20	-0.20	-0.08	-0.19	-0.15	0.16	-0.22	-0.02	-0.22	-0.29	0.09	-0.29	-0.23	-0.16	0.22	-0.15
5BL	-0.11	-0.14	-0.08	-0.06	-0.19	-0.21	-0.13	-0.21	0.15	0.35	-0.16	0.06	0.12	-0.08	0.29	0.08	-0.07	0.09	0.46	-0.34
10BU	-0.28	-0.20	-0.23	-0.24	-0.25	-0.19	-0.15	-0.22	-0.16	0.07	-0.21	0.00	-0.25	-0.31	0.04	-0.31	-0.22	-0.17	0.15	-0.21
10BL	0.02	-0.10	-0.01	0.00	-0.09	-0.04	-0.06	-0.07	0.23	0.30	0.03	0.07	0.13	0.06	0.20	0.06	0.02	0.23	0.33	-0.12

Příloha 3: Spearmanovy korelační koeficienty (pokračování).

	BT3W5	BT3L5	BT3O5	BTLW5	BTL5	BTLO5	BL10	BW10	BD10	BT3W10	BT3L10	BT3O10	BTLW10	BTL10	BTLO10	1BU	1BL	5BU	5BL	10BU	10BL
CL	0.40	0.37	0.38	0.36	0.46	0.33	0.49	0.29	0.32	0.33	0.39	0.43	0.31	0.53	0.32	-0.19	-0.11	-0.24	-0.11	-0.28	0.02
CTL	0.35	0.28	0.25	0.23	0.35	0.18	0.32	0.14	0.31	0.32	0.28	0.32	0.22	0.39	0.15	-0.16	-0.10	-0.16	-0.14	-0.20	-0.10
CH	0.32	0.33	0.36	0.36	0.39	0.30	0.35	0.21	0.21	0.27	0.31	0.42	0.24	0.43	0.29	-0.16	-0.03	-0.15	-0.08	-0.23	-0.01
UCL	0.29	0.26	0.28	0.31	0.38	0.27	0.36	0.18	0.20	0.21	0.28	0.36	0.18	0.38	0.31	-0.16	-0.05	-0.20	-0.06	-0.24	0.00
CLU	0.31	0.33	0.37	0.28	0.35	0.28	0.37	0.17	0.26	0.27	0.34	0.43	0.24	0.45	0.27	-0.19	-0.22	-0.20	-0.19	-0.25	-0.09
CLL	0.33	0.27	0.35	0.27	0.35	0.29	0.41	0.22	0.26	0.27	0.31	0.38	0.27	0.45	0.24	-0.19	-0.24	-0.20	-0.21	-0.19	-0.04
CLW2	0.32	0.26	0.31	0.29	0.29	0.19	0.28	0.15	0.18	0.25	0.27	0.34	0.25	0.39	0.20	-0.11	-0.12	-0.08	-0.13	-0.15	-0.06
LCD	0.34	0.30	0.37	0.30	0.40	0.29	0.38	0.16	0.25	0.27	0.34	0.41	0.26	0.48	0.28	-0.20	-0.21	-0.19	-0.21	-0.22	-0.07
BL1	0.41	0.41	0.27	0.51	0.59	0.15	0.70	0.59	0.42	0.37	0.45	0.25	0.47	0.52	0.21	-0.17	0.11	-0.15	0.15	-0.16	0.23
BW1	0.28	0.37	0.15	0.56	0.38	-0.04	0.52	0.66	0.35	0.27	0.35	0.09	0.44	0.28	0.07	0.14	0.49	0.16	0.35	0.07	0.30
BD1	0.42	0.36	0.28	0.38	0.50	0.16	0.66	0.45	0.52	0.40	0.43	0.30	0.40	0.52	0.30	-0.19	-0.28	-0.22	-0.16	-0.21	0.03
BT3W1	0.60	0.35	0.12	0.49	0.48	0.04	0.53	0.41	0.39	0.54	0.33	0.13	0.50	0.44	0.11	-0.04	-0.03	-0.02	0.06	0.00	0.07
BT3L1	0.30	0.61	0.31	0.38	0.50	0.22	0.43	0.34	0.24	0.25	0.50	0.25	0.31	0.46	0.22	-0.25	0.19	-0.22	0.12	-0.25	0.13
BT3O1	0.06	0.29	0.65	0.09	0.28	0.42	0.29	0.15	0.14	0.04	0.31	0.61	0.05	0.33	0.43	-0.24	-0.01	-0.29	-0.08	-0.31	0.06
BTLW1	0.33	0.35	0.11	0.63	0.49	0.03	0.36	0.41	0.24	0.29	0.21	0.03	0.45	0.34	0.08	0.17	0.29	0.09	0.29	0.04	0.20
BTL1	0.30	0.39	0.21	0.39	0.64	0.15	0.41	0.27	0.24	0.20	0.39	0.21	0.32	0.52	0.17	-0.45	0.08	-0.29	0.08	-0.31	0.06
BTLO1	0.03	0.10	0.46	0.03	0.21	0.47	0.09	-0.03	-0.05	-0.01	0.09	0.42	-0.02	0.22	0.36	-0.21	-0.13	-0.23	-0.07	-0.22	0.02
BL5	0.58	0.48	0.27	0.61	0.65	0.19	0.86	0.71	0.55	0.52	0.56	0.28	0.62	0.63	0.23	-0.14	0.02	-0.16	0.09	-0.17	0.23
BW5	0.37	0.43	0.10	0.66	0.39	-0.08	0.60	0.76	0.39	0.38	0.38	0.07	0.57	0.29	-0.01	0.17	0.39	0.22	0.46	0.15	0.33
BD5	0.52	0.39	0.16	0.34	0.41	0.09	0.66	0.44	0.64	0.48	0.47	0.24	0.43	0.54	0.19	-0.19	-0.23	-0.15	-0.34	-0.21	-0.12
BT3W5	*	0.29	0.00	0.45	0.42	0.04	0.56	0.43	0.44	0.61	0.39	0.08	0.53	0.49	0.08	0.02	-0.08	-0.03	-0.02	-0.04	0.09
BT3L5	0.29	*	0.25	0.41	0.47	0.18	0.43	0.35	0.34	0.30	0.57	0.28	0.35	0.49	0.20	-0.19	0.10	-0.20	0.10	-0.28	0.05
BT3O5	0.00	0.25	*	0.09	0.30	0.46	0.23	0.07	0.11	0.04	0.24	0.64	0.03	0.30	0.45	-0.24	-0.07	-0.29	-0.01	-0.27	0.00
BTLW5	0.45	0.41	0.09	*	0.50	0.02	0.47	0.54	0.33	0.37	0.32	0.06	0.61	0.40	0.08	0.20	0.24	0.26	0.31	0.12	0.22
BTL5	0.42	0.47	0.30	0.50	*	0.21	0.52	0.34	0.30	0.30	0.43	0.25	0.41	0.63	0.28	-0.29	0.01	-0.41	0.11	-0.31	0.10
BTLO5	0.04	0.18	0.46	0.02	0.21	*	0.14	-0.05	0.01	-0.02	0.20	0.48	-0.02	0.26	0.45	-0.30	-0.16	-0.41	-0.07	-0.30	0.04
BL10	0.56	0.43	0.23	0.47	0.52	0.14	*	0.78	0.68	0.62	0.62	0.33	0.66	0.65	0.24	-0.16	-0.10	-0.16	0.00	-0.15	0.21
BW10	0.43	0.35	0.07	0.54	0.34	-0.05	0.78	*	0.47	0.43	0.53	0.16	0.66	0.38	0.01	0.07	0.22	0.08	0.31	0.14	0.52
BD10	0.44	0.34	0.11	0.33	0.30	0.01	0.68	0.47	*	0.59	0.45	0.15	0.46	0.39	0.08	-0.08	-0.17	-0.03	-0.18	-0.04	-0.22
BT3W10	0.61	0.30	0.04	0.37	0.30	-0.02	0.62	0.43	0.59	*	0.35	0.06	0.55	0.42	0.03	0.02	-0.10	0.01	-0.04	-0.02	0.01
BT3L10	0.39	0.57	0.24	0.32	0.43	0.20	0.62	0.53	0.45	0.35	*	0.28	0.43	0.56	0.18	-0.28	0.01	-0.24	0.00	-0.25	0.17
BT3O10	0.08	0.28	0.64	0.06	0.25	0.48	0.33	0.16	0.15	0.06	0.28	*	0.06	0.36	0.47	-0.28	-0.14	-0.32	-0.06	-0.39	0.09
BTLW10	0.53	0.35	0.03	0.61	0.41	-0.02	0.66	0.66	0.46	0.55	0.43	0.06	*	0.49	0.04	0.08	0.11	0.10	0.19	0.21	0.29
BTL10	0.49	0.49	0.30	0.40	0.63	0.26	0.65	0.38	0.39	0.42	0.56	0.36	0.49	*	0.23	-0.33	-0.08	-0.35	-0.06	-0.49	0.11
BTLO10	0.08	0.20	0.45	0.08	0.28	0.45	0.24	0.01	0.08	0.03	0.18	0.47	0.04	0.23	*	-0.20	-0.13	-0.29	-0.09	-0.35	0.00
1BU	0.02	-0.19	-0.24	0.20	-0.29	-0.30	-0.16	0.07	-0.08	0.02	-0.28	-0.28	0.08	-0.33	-0.20	*	0.25	0.57	0.26	0.49	0.11
1BL	-0.08	0.10	-0.07	0.24	0.01	-0.16	-0.10	0.22	-0.17	-0.10	0.01	-0.14	0.11	-0.08	-0.13	0.25	*	0.28	0.57	0.17	0.41
5BU	-0.03	-0.20	-0.29	0.26	-0.41	-0.41	-0.16	0.08	-0.03	0.01	-0.24	-0.32	0.10	-0.35	-0.29	0.57	0.28	*	0.22	0.54	0.05
5BL	-0.02	0.10	-0.01	0.31	0.11	-0.07	0.00	0.31	-0.18	-0.04	0.00	-0.06	0.19	-0.06	-0.09	0.26	0.57	0.22	*	0.23	0.54
10BU	-0.04	-0.28	-0.27	0.12	-0.31	-0.30	-0.15	0.14	-0.04	-0.02	-0.25	-0.39	0.21	-0.49	-0.35	0.49	0.17	0.54	0.23	*	0.10
10BL	0.09	0.05	0.00	0.22	0.10	0.04	0.21	0.52	-0.22	0.01	0.17	0.09	0.29	0.11	0.00	0.11	0.41	0.05	0.54	0.10	*

Příloha 4: Koeficienty klasifikační funkce pro *E. stricta*, *E. nemorosa* a populaci z Kozénku

Znak	<i>E. stricta</i>	<i>E. nemorosa</i>	Kozének
CL	460.78	453.04	481.93
CTL	-52.96	-44.17	-70.31
CH	574.85	553.50	536.82
UCL	-481.86	-490.32	-477.27
CLU	287.28	275.76	278.43
CLL	-148.38	-164.18	-163.10
CLW2	-46.62	-32.52	-52.25
LCD	-146.19	-157.32	-140.55
BL1	-296.35	-304.52	-305.40
BW1	-394.29	-390.51	-405.69
BD1	996.17	980.47	1000.69
BT3W1	-459.96	-458.02	-465.11
BT3L1	-186.27	-197.74	-187.04
BT3O1	127.51	93.14	115.38
BTLW1	-1317.74	-1287.20	-1292.22
BTLL1	627.37	632.52	612.30
BTLO1	232.33	235.41	239.03
BL5	1981.96	1966.35	2007.43
BW5	-1646.00	-1617.89	-1668.19
BD5	602.90	611.55	605.33
BT3W5	-299.63	-315.45	-302.25
BT3L5	330.27	341.16	337.67
BT3O5	111.23	82.57	95.70
BTLW5	-1259.08	-1237.32	-1257.25
BTLL5	666.38	659.01	665.93
BTLO5	-184.18	-190.30	-197.45
BL10	1278.59	1230.20	1257.69
BW10	-974.69	-974.71	-969.86
BD10	336.69	347.73	327.74
BT3W10	-125.97	-126.73	-148.90
BT3L10	-215.13	-212.08	-226.67
BT3O10	-188.90	-197.48	-198.30
BTLW10	-936.03	-939.01	-929.82
BTLL10	-23.36	-5.44	-47.79
BTLO10	-288.28	-278.64	-301.56
1BU	736.40	714.36	726.87
1BL	1098.58	1112.69	1120.31
5BU	762.24	757.11	771.38
5BL	1319.44	1314.57	1322.98
10BU	780.91	793.40	791.10
10BL	850.44	858.33	854.88
konstanta	-5770.46	-5716.88	-5786.39

Příloha 5: Koeficienty klasifikační funkce pro *E. stricta*, *E. nemorosa*, přechodné populace [*E. (interm.)*] a populaci z Kozénku.

Znak	<i>E. stricta</i>	<i>E. nemorosa</i>	<i>E. (interm.)</i>	Kozének
CL	1096.64	1087.94	1118.95	1122.13
CTL	-244.33	-232.09	-254.42	-248.52
CH	349.79	321.81	318.67	302.75
UCL	-479.26	-489.59	-483.27	-482.04
CLU	233.96	225.05	233.79	222.79
CLL	-219.66	-241.59	-257.39	-236.05
CLW2	-14.41	-4.11	-6.95	-11.84
LCD	-156.76	-161.77	-149.16	-153.78
BL1	-178.57	-188.39	-179.40	-188.11
BW1	-677.18	-679.78	-664.37	-688.07
BD1	888.00	876.96	889.32	896.39
BT3W1	-307.23	-310.39	-315.97	-308.82
BT3L1	-29.47	-33.15	-34.59	-21.40
BT3O1	67.35	38.76	53.52	49.16
BTLW1	-1277.94	-1253.30	-1288.69	-1262.16
BTLL1	771.10	776.90	770.44	756.17
BTLO1	267.52	267.91	274.74	271.58
BL5	1527.30	1511.50	1546.27	1528.45
BW5	-1187.11	-1156.79	-1197.17	-1184.95
BD5	636.04	641.37	635.26	635.54
BT3W5	-290.15	-297.11	-287.24	-290.73
BT3L5	191.33	196.90	191.96	192.42
BT3O5	113.75	83.81	94.84	97.32
BTLW5	-1045.46	-1034.84	-1044.38	-1051.04
BTLL5	433.31	435.18	430.31	443.75
BTLO5	45.96	47.93	42.29	45.94
BL10	1318.10	1274.76	1308.99	1281.71
BW10	-1109.62	-1112.49	-1124.26	-1102.98
BD10	423.25	427.38	427.20	420.34
BT3W10	-9.55	-8.26	-1.28	-27.43
BT3L10	-155.25	-149.82	-155.38	-164.54
BT3O10	-94.03	-109.41	-101.37	-114.87
BTLW10	-868.00	-865.43	-867.92	-866.53
BTLL10	-106.56	-92.66	-109.45	-112.17
BTLO10	-449.99	-448.10	-450.36	-460.00
1BU	902.13	889.32	897.51	897.74
1BL	1251.30	1265.59	1269.65	1269.81
5BU	713.46	710.99	710.45	723.66
5BL	1076.28	1067.38	1080.75	1072.86
10BU	653.16	661.62	656.77	661.86
10BL	967.13	977.11	990.79	976.55
konstanta	-5884.79	-5831.65	-5938.07	-5890.58

Příloha 6: Fotografická příloha



E. stricta



Intermediární jedinec