

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Morfologická a genetická variabilita tetraploidních
populací rodu *Euphrasia* v ČR**

Diplomová práce

Bc. Pavla Bočková

Školitel: doc. Ing. Milan Štech, Ph.D.

České Budějovice 2024

Bočková P. (2024) Morfologická a genetická variabilita tetraploidních populací rodu *Euphrasia* v ČR. [Morphological and genetic variability of tetraploid *Euphrasia* populations in the Czech Republic. Mgr. Thesis, in Czech] – 62 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Euphrasia is a morphologically very variable and thus taxonomically intricate genus. In the Czech Republic, especially tetraploid species are the main source of taxonomic complications. There are some populations that cannot be easily determined at the species level. In this thesis, those populations were studied both morphometrically and using microsatellite (SSR) loci. The obtained SSR data were joined to the data from the previous study of tetraploid *Euphrasia* in the Czech Republic (Svobodová et al. 2016), together creating a comprehensive study of tetraploid *Euphrasia* populations in the region. The actual delimitation of tetraploid species *E. coerulea*, *E. stricta*, and *E. nemorosa* in the Czech Republic was genetically supported and higher seasonal variability of *E. coerulea* was observed.

Prohlašuji, že jsem autorkou této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 11. 4. 2024

.....

Pavla Bočková

Poděkování

Je mou milou povinností poděkovat všem, kteří mi v průběhu tvorby této práce pomáhali. V první řadě patří velký dík mému školiteli Milanu Štechovi za skvělé vedení celé práce, společné výjezdy do terénu, přínosné rady, připomínky a konzultace a také za to, že mi byl průvodcem po celou dobu studia. Děkuji také Šárce Svobodové za poskytnutí dat z její předchozí práce a spolupráci při spojování jejích a mých dat. Díky těmto datům má tato práce výrazně větší rozsah i smysl. Poděkování patří také Alžbětě Manukjanové a Jiřímu Košnarovi za pomoc se zpracováním vzorků v laboratoři, Petru Kouteckému za trpělivost s neustálými dotazy ohledně statistiky a Viktorii Brožové a Janu Kučerovi za pomoc s programem Structure a prostředím MetaCentrum. Závěrem bych chtěla poděkovat svému manželovi za veškerou péči, kterou věnoval mně i naší domácnosti nejen v době, kdy jsem na nic jiného než tvorbu práce neměla čas ani pomyšlení.

Obsah

1	Úvod	1
2	Literární přehled.....	3
2.1	<i>Euphrasia</i> v ČR.....	5
3	Metodika	10
3.1	Sběr a příprava materiálu.....	10
3.2	Morfometrické analýzy	10
3.3	Analýza mikrosatelitů.....	12
3.4	Spojení s dalšími daty.....	14
3.5	Statistické zpracování.....	15
4	Výsledky.....	17
4.1	Přehled studovaných populací	17
4.2	Analýza mikrosatelitů.....	17
4.2.1	Analýza vlastních dat (DP+BP).....	19
4.2.2	Analýza spojených dat (DP+BP+S).....	21
4.3	Morfometrické analýzy	24
4.3.1	Šumavský časný typ.....	24
4.3.2	Analýza hlavních komponent	27
4.3.3	Variabilita <i>E. coerulea</i>	30
4.3.4	Diskriminační analýza.....	32
4.3.5	Klasifikační diskriminační analýza	37
5	Diskuse	40
6	Závěr.....	45
7	Seznam použité literatury	46
8	Přílohy	53

1 Úvod

Světlík (*Euphrasia*) je rod z čeledi *Orobanchaceae* zahrnující poloparazitické, převážně jednoleté rostliny s největším druhovým zastoupením v temperátních oblastech severní polokoule (Gussarova et al. 2008). Celkový počet druhů je udáván mezi 150–350 (Smejkal & Dvořáková 2000, Gussarova et al. 2008, Garrett et al. 2022, POWO 2024).

Taxonomicky jsou světlíky velmi komplikovanou a dlouho studovanou skupinou (Wettstein 1896, Smejkal 1963a, Yeo 1978, Metherell & Rumsey 2018). Velká variabilita rostlin je různými autory hodnocena různě. Druhy jsou buď vymezené úzce a je jich tedy velké množství (např. Metherell & Rumsey 2018) nebo naopak široce, je jich méně a zahrnují mnoho morfologických odchylek (např. Karlsson 1976, Štech in Kaplan et al. 2019, Vitek in Müller et al. 2021). Na jednotném pojetí druhů dosud nepanuje mezi jednotlivými autory shoda (Vitek 1998, 2020).

Rozlišování světlíků je vzhledem k jejich variabilitě velmi komplikované. Protože se jedná o poloparazity, jsou rostliny velmi variabilní v závislosti na hostiteli (Brown et al. 2020, 2021). Vzhled rostlin je také ovlivňován typem prostředí a managementu (Zopfi 1998). Lokálně může docházet i k velmi rychlému vzniku a zániku různých morfologických odchylek (Vitek 1998). Celou situaci dále komplikuje častá hybridizace mezi druhy (Wettstein 1896, Yeo 1978, Wang et al. 2018).

U světlíků se také setkáváme se sezónní diferenciací, tedy tvorbou odlišných typů na jaře nebo v časném létě a v pozdním létě (Wettstein 1901, Smejkal 1963b). Stejný typ sezónního dimorfismu nebo polymorfismu se vyskytuje i u mnoha příbuzných poloparazitických rodů (Štech 2000, Zopfi 1995, Koutecký et al. 2012).

Časnými typy v ČR se zabývala práce Svobodové (et al. 2016), která na základě genetické podobnosti navrhla spojit časné druhy *E. slovacae* (Yeo) Holub a *E. coerulea* Tausch. V její práci byly studovány i další tetraploidní druhy světlíků v ČR a bylo např. geneticky podpořeno zahrnutí dříve rozlišovaných taxonů *E. tatarica* auct. a *E. curta* subsp. *glabrescens* (Wettst.) Smejkal do *E. stricta* J. F. Lehm resp. *E. nemorosa* (Pers.) Wallr.

Přestože jsou světlíky i na našem území komplikovanou skupinou, typické formy jednotlivých druhů se dají vcelku dobře rozlišit. Problémy činí množství populací netypických či přechodných forem. U těchto populací se dosud neví, jestli se jedná o hybridní populace nebo o extrémní formy některého druhu. Větší koncentrace těchto sporných populací je

zejména na Šumavě a v Předšumaví, v Krušných horách a v některých částech sudetských pohoří. Populace ze Šumavy a Předšumaví, včetně nově nalezeného časného typu, byly studovány v mé bakalářské práci (Kunzová 2022). Tato diplomová práce se zaměřuje na morfologicky nejasné populace z ostatních regionů a na rostliny z regionů bez dosavadních molekulárních záznamů (Jeseníky, Orlické hory, Žďárské vrchy). Cílem této práce je

- a) popsat genetickou a morfologickou variabilitu morfologicky nejasných populací z vybraných regionů
- b) zjistit, zda tvoří morfologicky nejasné populace vlastní genetické jednotky
- c) srovnat rostliny časného typu z bakalářské práce s časným druhem *E. coerulea*.

Spojením dat z této práce s daty získanými v rámci mé bakalářské práce (Kunzová 2022) a s daty z předchozí studie tetraploidních populací rodu *Euphrasia* na katedře botaniky PŘF JU (Svobodová et al. 2016) tak vzniká ucelená studie tetraploidních populací rodu *Euphrasia* v ČR.

2 Literární přehled

Rod *Euphrasia* L. (světlík) je rod poloparazitických rostlin rozšířený v temperátních oblastech severní a jižní polokoule, okrajově také ve vysokých horách Oceánie (Gussarova et al. 2008). Na jižní polokouli se vyskytuje mnoho růstových forem a také většina sekcí, do kterých je rod *Euphrasia* členěn. Těžiště druhové diverzity se však nachází na severní polokouli v jediné sekci *Euphrasia*. Za hlavní důvody diverzifikace této sekce je považována zejména recentní radiace, opakovaná polyploidizace a častá hybridizace (Gussarova et al. 2008, Garrett et al. 2022).

Stejně jako jiné poloparazitické rody (např. *Rhinanthus* – Jonstrup et al. 2016, *Odontites* – Snogerup 1982) jsou světlíky velmi morfologicky variabilní v závislosti na hostiteli (Brown et al. 2020, 2021). Při přichycení k „dobrému“ hostiteli (např. *Trifolium*) jsou rostliny velké, bohatě větvené a s mnoha květy. Naopak rostliny nepřichycené k žádnému hostiteli jsou malé, málo větvené a jen s jedním květenstvím (Wilkins 1963). Přichycení k hostiteli ovlivňuje také fenologii rostlin, především začátek doby květu. V práci Browna (et al. 2020) byl zjištěn rozdíl v počátku květu až měsíc mezi rostlinami přichycenými k jeteli a rostlinami bez hostitele.

U světlíků, mnoha příbuzných poloparazitických rodů (např. *Melampyrum* – Štech 2000, *Rhinanthus* – Zopfi 1995, *Odontites* – Koutecký et al. 2012), ale také například u hořečků (*Gentianella* – Wettstein 1901, Kirschnerová & Kirschner in Kaplan et al. 2019) se setkáváme s výrazným sezónním dimorfismem nebo polymorfismem. Tímto termínem je označována odlišná morfologie rostlin kvetoucích na jaře a v časném létě oproti rostlinám kvetoucím v pozdním létě (Wettstein 1901, Smejkal 1963b, Zopfi 1998). Časné (aestivální) typy jsou nevětvené nebo jen málo větvené, mají malý počet dlouhých lodyžních článků a tupěji špičaté zuby listenů. Naopak pozdní (autumnální) typy jsou bohatě větvené, mají větší počet lodyžních článků a špičatější zuby listenů (Wettstein 1895, Smejkal & Dvořáková 2000, Štech in Kaplan et al. 2019). Variabilita sezónních typů je často komplexnější a kromě časných a pozdních typů mohou existovat i různé přechodné, méně vyhraněné typy (Zopfi 1993, 1998).

Vzhled rostlin je ovlivněn také prostředím a managementem, který může působit jako silný selekční tlak preferující časné nebo naopak pozdní typy (Zopfi 1998). V závislosti na daném typu prostředí a managementu pak může docházet k tvorbě odlišných ekotypů i u velmi blízkých populací (Zopfi 1997). Zároveň však Zopfi (1998) poukazuje na genetickou podstatu těchto ekotypů. Různé morfologické odchylky mohou vznikat i zanikat velmi rychle, jak upozorňuje Vitek (1998).

Výše zmiňované faktory dělají ze světlíků skupinu velmi obtížnou na určování. Na rozdíl od ostatních zmiňovaných rodů (*Melampyrum*, *Rhinanthus*, *Odontites*), u kterých se k určování dá použít např. barva listenů či tvar koruny (Kaplan et al. 2019), je u světlíků velmi málo znaků, které by nebyly ovlivněny hostitelem, prostředím nebo sezónností (Brown et al. 2020, Zopfi 1997, 1998). Snáze se dají odlišit diploidní taxony, kterých je méně a jsou většinou lépe definované (Metherell & Rumsey 2018, Štech in Kaplan et al. 2019). U tetraploidních druhů je situace značně komplikovanější kvůli velkému počtu druhů, různým kombinacím rodičovských genomů u allotetraploidních druhů a většímu ekologickému překryvu populací (Yeo 1978, Smejkal 1963a, Metherell & Rumsey 2018, Štech in Kaplan et al. 2019). Jako relativně stabilní znak neovlivňovaný hostitelem a konzistentní při srovnání populací v přírodních a experimentálních podmínkách se jeví počet nodů k prvnímu květu (Zopfi 1998, Brown et al. 2020). Na širší geografické škále je však korelován s délkou vegetační sezóny (Karlsson 1976). Mnoho dalších určovacích znaků je značně plastických. Výška rostlin i četnost a charakter větvení jsou ovlivňovány hostitelem (Wilkins 1963, Brown et al. 2020) i prostředím, zejména množstvím živin a světelnými podmínkami (Zopfi 1997, 1998). Prostředí ovlivňuje i délku internodií (Karlsson 1976), hostitel zase např. dobu kvetení (Wilkins 1963, Brown et al. 2020). Velmi proměnlivá je také přítomnost žláznatých i nežláznatých chlupů a jejich množství (Karlsson 1976, 1984, Kolseth & Lönn 2005, Svobodová et al. 2016), které bylo a stále je při určování světlíků často využíváno (např. Yeo 1978, Metherell & Rumsey 2018). V některých případech se jedná o významné znaky, jindy ale pouze o odchylky bez významné taxonomické hodnoty (Kolseth & Lönn 2005, Svobodová et al. 2016). Díky této proměnlivosti diagnostických znaků je při určování světlíků vždy potřeba hodnotit více dobře vyvinutých jedinců z dané populace, spolu s přihlédnutím k populační variabilitě a danému prostředí, jak zmiňují i Metherell & Rumsey (2018) nebo Štech (in Kaplan et al. 2019).

Velká variabilita a z ní vyplývající obtížnost taxonomického hodnocení vedly v průběhu let k přijetí různých druhových konceptů, z nichž v současnosti převažují dva. První vymezuje velmi úzké druhy, lišící se často jen drobnými morfologickými rozdíly, a je v současnosti akceptován zejména ve Velké Británii (Metherell & Rumsey 2018, Becher et al. 2021). Tento systém vede k tomu, že se určování jednotlivých rostlin stává natolik komplikovaným, že jej zvládne jen specialista (viz např. Wang et al. 2018, Brown et al. 2021, Becher 2021). Takto úzce vymezené druhy ale zřejmě neodpovídají přirozeným jednotkám a proto není toto rozdělení zpravidla podpořeno molekulárními znaky (Wang et al. 2018, Becher et al. 2021, 2022, Garrett et al. 2022). Druhý druhový koncept je naopak široký a v rámci druhů zahrnuje mnoho morfologických odchylek. V současnosti je přijímán zejména v severní

a střední Evropě (Vitek in Fischer et al. 2008, Krok et al. 2013, Štech in Kaplan et al. 2019, Vitek in Müller et al. 2021). Tento koncept by měl více odpovídat přirozenému členění rodu (Vitek 1998), což potvrzují i některé genetické analýzy (Svobodová et al. 2016).

Přijatý druhový koncept má vliv také na množství rozeznávaných hybridů. U světlíků, podobně jako u příbuzných kokrhelů (Ducarme et al. 2010), je hybridizace považována za velmi častý jev (Wettstein 1896, Yeo 1978). Na častou hybridizaci odkazují i autoři moderních fylogenetických studií jako na jednu z příčin slabého taxonomického rozlišení analýz (Wang et al. 2018, Garrett et al. 2022). Při akceptování úzkého (a čistě morfologického) druhového konceptu je mnoho rostlin morfologicky intermediárních mezi dvěma druhy a hybridních kombinací je tak udáváno obrovské množství – Metherell & Rumsey (2018) jich uvádí 71, Silverside (in Stace et al. 2015) dokonce 82. Podle Viteka (2020) však takové množství nemůže odpovídat přirozenému členění, jehož popis by měl být cílem taxonomického hodnocení (Vitek 1998). Zvláště u tetraploidních druhů světlíků lze pozorovat velice slabé reprodukční bariéry (Yeo 1966, Liebst & Schneller 2005). Právě kvůli chybějícím reprodukčním bariérám považuje Karlsson (1976) druhy jako např. *E. nemorosa* a *E. frigida* Pugsley za součást velmi široce pojaté skupiny *E. stricta*. I světlíky však mají jisté zábrany, co se týče hybridizace. Svobodová (et al. 2016) ve své práci upozorňuje na překvapivě malou míru hybridizace mezi zkoumanými druhy a silná reprodukční bariéra je opakovaně prokazována mezi diploidními a tetraploidními druhy (Yeo 1966, Brown et al. 2022, Garrett et al. 2022). To podporuje i fakt, že doposud byl v přírodě nalezen jen jeden triploidní jedinec (Yeo 1954).

Míra hybridizace může být ovlivněna také velikostí květu. Velkokvěté druhy jsou převážně alogamické a k autogamii dochází pouze na konci kvetení v případě, že květ dosud nebyl opylen. Malokvěté druhy naopak spoléhají převážně na autogamii, i když alogamie jsou také schopné (Vitek 1998, Gómez 2002, French et al. 2005). Velký podíl autogamie u malokvětých druhů způsobuje jejich malou genetickou variabilitu (French et al. 2005, Becher et al. 2021) a předpokládáný menší význam hybridizace. Zároveň však relativně častá hybridizace byla prokázána i u malokvětých druhů *E. salisburgensis* Hoppe a *E. minima* Jacq. ve Švýcarských Alpách (Liebst 2008).

2.1 *Euphrasia* v ČR

Druhové hodnocení světlíků v České republice prošlo v poslední době podstatnou změnou. Smejkal (1963a) ve své taxonomické studii navázal na Wettsteinův (1896) úzký druhový koncept a rozeznával na území ČR 12 druhů světlíků. Jeho pojetí zapadá také do pozdější

koncepte Yea (1978). Při přípravě pro Květenu ČR (Smejkal & Dvořáková 2000) došlo jen k menším změnám. Díky novým poznatkům o genetické podstatě a variabilitě žláznatého odění byly druhy *E. picta* Wimmer a *E. kernerii* Wettst. zahrnuty do variability druhu *E. rostkoviana* Hayne. V nejnovějším zpracování přijal Štech (in Kaplan et al. 2019) na základě výsledků práce Svobodové (et al. 2016) širší druhový koncept, což výrazně změnilo počet a variabilitu rozlišovaných druhů. Menší změny se odehrály u diploidních druhů, kde došlo ke změnám u poddruhových jednotek *E. officinalis* L. Průtoková cytometrie také ukázala, že rostliny z Krkonoš označované Smejkalem a Dvořákovou (2000) jako *E. frigida* jsou diploidní a tudíž patří k druhu *E. tatrae* Wettst., jak původně tvrdil Smejkal (1963a). Zásadní změny se odehrály u tetraploidních taxonů. Jediným druhem, který zůstal beze změny, je morfologicky a ekologicky vyhraněná *E. micrantha* Rchb. V novém pojetí v sobě *E. stricta* zahrnuje i dříve rozlišované *E. tatarica* (štětinatý typ) a *E. slovacca* (časný typ). Dále již není akceptována ani *E. curta* (Fr.) Wettst., která se rozpadla mezi druhy *E. nemorosa* a *E. coerulea* (detailněji viz níže). V souladu s výsledky Svobodové (et al. 2016) byla jako jediný časný druh zachovaná *E. coerulea*, která tak v sobě zahrnuje i beskydské populace (dříve zčásti odlišované jako *E. slovacca*, k problematice *E. slovacca* viz níže), údajně endemický druh *E. corcontica* (Smejkal) Smejkal et Dvorakova a populace krušnohorských časných rostlin (dříve považované za *E. frigida*; Štech in Kaplan et al. 2019).

Tato diplomová práce je zaměřena na tetraploidní druhy světlíků v ČR. V současném pojetí (Štech in Kaplan et al. 2019) jde o druhy *E. stricta*, *E. nemorosa*, *E. coerulea* a *E. micrantha*. Druhům *E. stricta* a *E. nemorosa* jsem se detailně věnovala v teoretické části své bakalářské práce (Kunzová 2022), proto se zde u nich zaměřím pouze na hlavní určovací znaky a pojetí těchto druhů různými autory.

Euphrasia stricta (světlík tuhý) je druh velice proměnlivý. Vyznačuje se středně velkou, obvykle (6–)7–10 mm dlouhou korunou barvy bílé, bledě fialové, lilákové, řidčeji až téměř fialové a osinkatými listeny šikmo odstálými až přitisklými ke kalichu. V našich podmínkách se jedná o převážně autumnální typ, rostliny jsou tedy většinou větvené, s nejdelšími větvemi v cca polovině výšky lodyhy (Štech in Kaplan et al. 2019). Časné typy od *E. stricta* jsou známé např. v severní Evropě (Karlsson 1984, Kolseth & Lönn 2005), ve střední Evropě jsou však vzácné (Svobodová et al. 2016). Z našeho území je v současnosti známá pouze jedna lokalita časných rostlin *E. stricta* (Zděchov; viz Svobodová et al. 2016). Rostliny z této lokality připomínají typový materiál *E. slovacca* (Svobodová et al. 2016). V nejužším pojetí (např. Wettstein 1896, Smejkal 1963a) byla *E. stricta* charakterizována také úplně lysými listy, listeny i kalichy, ojediněle na kraji se sotva zřetelnými štěinkami. Rostliny

se zřetelnými štětinatými chlupy byly hodnoceny jako samostatné taxony *E. tatarica* a *E. pectinata* Ten. (charakteristická i hustým, střechovitým uspořádáním listenů a nafouklými plodními kalichy; z našeho území nebyla udávána, Smejkal (1963a) ji uvádí jen z Jihošlovenského krasu). Oba citovaní autoři však zmiňují existenci přechodných typů. Zcela jinou koncepci přijal Karlsson (1976), který do *E. stricta* řadí i několik jindy rozlišovaných druhů např. Wettsteinovu (1896) *E. brevipila* Burnat & Gremler či *E. tenuis* (Brenner) Wettstein. Zmiňuje také variabilitu v přítomnosti krátce stopkatých žlázek a podobnost či možnou shodu s druhem *E. arctica* Lange ex Rostrup, který je častý v SZ Evropě a od *E. stricta* se liší zejména tvarem listů a listenů a četností žláznatého odění (Karlsson 1976, 1984, Yeo 1978, Metherell & Rumsey 2018). Rostliny těchto dvou druhů jsou sice v krajních případech odlišné, ale v celém areálu tvoří variabilita rostlin kontinuum od jednoho druhu k druhému (Karlsson 1976). Použití přítomnosti a intenzity žláznatého odění jako významného určovacího znaku je v současnosti zpochybňováno více autory (Posz 2014, Štech in Kaplan et al. 2019).

Euphrasia nemorosa (světlík hajní) je boreálně-subatlantský druh (Smejkal 1963a, Yeo 1978) charakteristický silnými lodyhami a keříčkovitým větvením s nejdělsími větvemi spíše v dolní části lodyhy (Štech in Kaplan et al. 2019). Oproti předchozímu druhu má poněkud menší květy, obvykle s korunou dlouhou 4–7(–8) mm, která je nejčastěji bílá a jen fialově žilkovaná. Listeny jsou často rovnovážně odstálé, neosinkaté nebo jen krátce osinkaté (Štech in Kaplan et al. 2019). Také *E. nemorosa* byla v úzkém pojetí (Smejkal 1963a, Smejkal & Dvořáková 2000, Posz 2014) charakterizována lými listy, listeny a kalichy. Štětinaté rostliny podobné *E. nemorosa* byly hodnoceny jako *E. curta* (na našem území jen subsp. *glabrescens*; Smejkal 1963a, Smejkal & Dvořáková 2000). Yeo (1978) ve své revizi evropských světlíků zmiňuje *E. curta* jako rostliny kromě odění identické s *E. nemorosa*, ale kvůli geografické odlišnosti (štětinaté rostliny typu *E. curta* především ve Skandinávii a okolí Baltského moře a lysé rostliny typu *E. nemorosa* v západní Evropě) navrhuje jejich taxonomické rozlišení. Aktuálně *E. curta* jako druh většinou rozlišovaná není. Rostliny dříve takto označované spadají do druhu *E. nemorosa* (rostliny typicky autunnálního charakteru s krátkými štětinkami) nebo *E. coerulea* (rostliny časnějšího charakteru s malým podílem žlázek v odění; Štech in Kaplan et al. 2019). *E. nemorosa* je schopná tvořit rostliny časného typu, popsané z Německa jako *Euphrasia preussiana* W.Becker (Becker 1926). Časné typy rostlin nejspíše patřící k *E. nemorosa* byly nedávno nalezeny i blízko Modravy na Šumavě (Kunzová 2022).

Euphrasia coerulea (světlík modravý) je jediným aktuálně rozlišovaným aestiválním druhem světlíku v české květeně (Štech in Kaplan et al. 2019). Popsán je původně z Jizerských hor jako druh s úplně modrými květy (Tausch 1834, Szélag 2014). Patří do skupiny *E. nemorosa*, která se vyznačuje malými květy s korunou 4–7(–8)mm dlouhou a špičatými, neosinkatými nebo jen krátce osinkatými listeny. Jedná se o obvykle nevětvené nebo málo větvené rostliny s nápadně dlouhými lodyžními články a s listy, listeny a kalichy štětinatě chlupatými, často i s krátkými žlázkami (Štech in Kaplan et al. 2019, Smejkal & Dvořáková 2000). Květy mohou být růžově fialové, namodralé nebo vzácněji bílé. Je považován za endemický druh střední Evropy (Štech in Kaplan et al. 2019). V současném pojetí (Štech in Kaplan et al. 2019) zahrnuje *E. coerulea* i typy rostlin řazené dříve k jiným druhům. Některé časně kvetoucí karpatské rostliny s krátce stopkatými žlázkami byly v dříve označovány jako *E. slovacca*. Bylo však zjištěno, že tyto rostliny jsou geneticky shodné se sudetskou, mírně pozdnější, *E. coerulea* (Svobodová et al. 2016). Typovému materiálu *E. slovacca* navíc odpovídají rostliny časného typu od *E. stricta*, lišící se od *E. coerulea* zejména většími květy (Svobodová et al. 2016). Jako údajně endemický taxon Krkonoš byla Smejkalem (1963a) popsána *E. micrantha* Reichenb. var. *corcontica* Smejkal. Dvořáková (1999) později nakombinovala tento taxon na druhovou úroveň jako *E. corcontica* (Smejkal) Smejkal et Dvorakova. Jedná se o drobné rostliny vůbec nebo jen málo větvené, které byly považovány za produkt staré hybridizace mezi *E. micrantha* a *E. minima* (Smejkal 1963a, Dvořáková 1999). Tento „druh“ byl považován za vyhynulý, popsán byl jen z herbářových dokladů. Později byl údajně objeven na jedné lokalitě na polské straně Krkonoš (Posz 2017). Podle Štecha (in Kaplan et al. 2019) se rostliny označované jako *E. corcontica* dobře shodují s některými krkonošskými populacemi *E. coerulea* a nejedná se podle něj o odchylku, kterou by bylo vhodné hodnotit jako samostatný taxon. K druhu *E. coerulea* by mohly nejspíše patřit i časně rostliny z Krušných hor, které byly některými autory (např. Yeo 1978, Smejkal & Dvořáková 2000) dříve řazeny k severskému druhu *E. frigida* (Štech in Kaplan et al. 2019). Tyto rostliny jsou však v Krušných horách zřejmě vyhynulé a jejich výskyt se nepodařilo ověřit (M. Štech, ústní sdělení).

Euphrasia micrantha (světlík drobnokvětý) je morfologicky unikátní druh. Vyznačuje se velmi malými květy s korunou nejčastěji 4–5(–6) mm dlouhou, celou bělavou, s fialovými žilkami nebo s bledě fialovými pysky a bělavou trubkou a malými 3–5 mm dlouhými listeny, které jsou lysé, na okraji podvinuté, ztlustlé a za sucha lesklé. Jedná se o poměrně vysoké rostliny štíhlého vzhledu s tenkou nevětvenou nebo jen řídko větvenou lodyhou. Větve jsou velmi štíhlé a strmě vzhůru vzpřímené. *E. micrantha* roste na suchých a chudých stanovištích,

zejména vřesovištích. Na našem území se jedná o velmi vzácný taxon, v současnosti rostoucí zřejmě již jen na Třeboňsku (Smejkal & Dvořáková 2000, Štech in Kaplan et al. 2019). Vzhledem k poměrně unikátní morfologii činí taxonomie tohoto druhu jen malé potíže. I Karlsson (1976), který zastává velmi širokou druhovou koncepci, tento druh rozeznává. Smejkal (1963a) zmiňuje možnou záměnu s formami *E. stricta* či *E. nemorosa* rostoucími na vřesovištích a podobných stanovištích a var. *corcontica* (viz. u druhu *E. coerulea*), jinak je tento druh chápán jednotně.

3 Metodika

3.1 Sběr a příprava materiálu

V této práci byla využita data z nových sběrů (Příloha 1), z mojí bakalářské práce (Kunzová 2022; Příloha 2) a také data z předchozí studie rodu *Euphrasia* v ČR od Šárky Svobodové (Svobodová et al. 2016; Příloha 3). Sběr nových dat probíhal převážně v letech 2022–2023, ale byly využity i některé starší sběry od školitele. Sbírány byly cíleně taxonomicky nejasné populace a populace z území, odkud dosud nebyly žádné populace do genetických analýz zahrnuty. Z většiny lokalit bylo pro následné analýzy využito 10 rostlin, v případě velmi malých populací méně. Rostliny byly sbírány tak, aby co nejlépe pokryly variabilitu dané populace. V případě populací ležících velmi blízko u sebe (Rad+Rad-sj. a Jiv+Jiv-kop) bylo pro analýzu mikrosatelitů použito z každé populace pouze 5 rostlin a protože ve výsledcích vycházely shodně, byly tyto populace v dalších analýzách sloučeny (Rad, Jiv). Ze stejných důvodů byly sloučeny populace Jelení 1 a Jelení 2 a Galovské lúky 1 a 2.

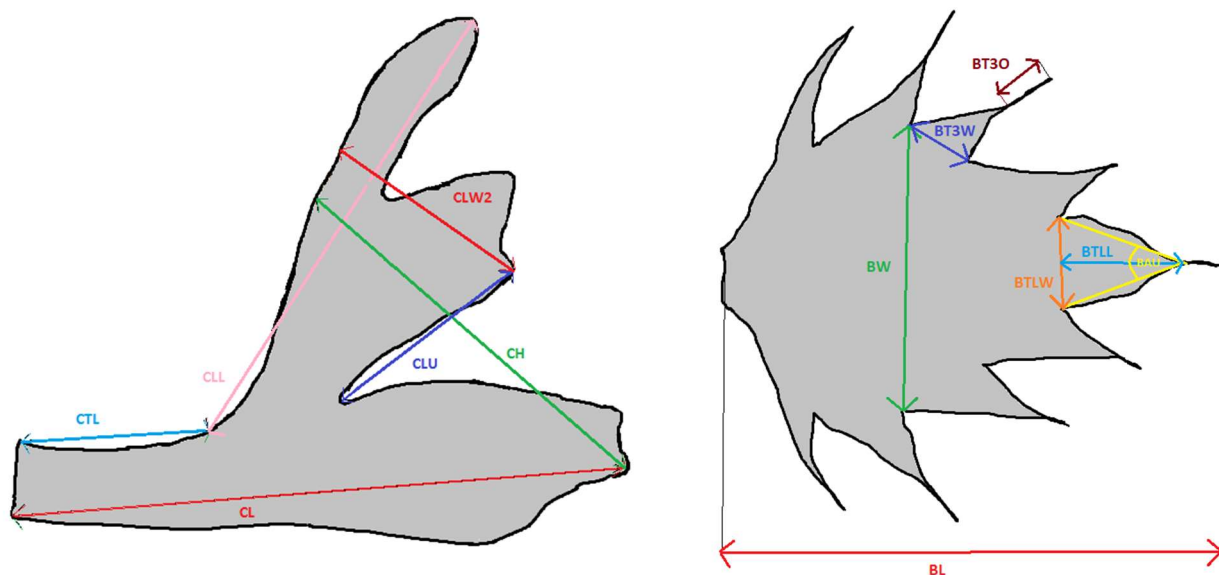
Z každé zkoumané rostliny byl použit jeden nebo dva květy, list a první, třetí a pátý listen. Tyto byly nalepeny na průhlednou lepicí pásku a spolu s ní do sešitu. Stránky sešitu byly poté naskenovány v rozlišení 600dpi. Z rostlin byl dále odebrán materiál na analýzu mikrosatelitů (většinou několik listů či listenů), který byl vysušen v silikagelu. Rostliny byly poté založeny a zpracovány jako standardní herbářové doklady. Doklady jsou uloženy v herbářové sbírce Přírodovědecké fakulty JU (herbář CBFS).

3.2 Morfometrické analýzy

Morfometrická měření lze rozdělit do dvou částí. Znaky na nalepených a naskenovaných částech rostlin byly měřeny v programu ImageJ (Schneider et al. 2012). Měřené znaky byly převzaty z bakalářské práce (Kunzová 2022), pouze s mírnými úpravami. Protože v bakalářské práci byly znaky na květu v některých případech korelovány, byla z měřených znaků vynechána diagonála dolního korunního pysku (LCD). Vynechán byl také úhel u báze listenu (BAL), který vyšel v diskriminační analýze bakalářské práce jako nepodstatný a je výrazně ovlivněn stářím rostliny. Všechny znaky měřené na květech a listenech jsou popsány v Tab. I a znázorněny na Obr. 1. Při analýze byly dále použity i odvozené znaky BL3/BW3 a BTLL3/BTLW3.

Tab. I: Přehled měřených znaků na květech a listenech, měřené v mm

CL	délka koruny
CTL	délka korunní trubky
CH	výška koruny
CLL	délka dolního korunního pysku
CLU	délka okraje dolního korunního pysku
CLW2	polovina šířky dolního korunního pysku
BL3	délka 3. listenu
BW3	šířka 3. listenu v nejširším místě
BTLW3	šířka koncového zubu 3. listenu
BTLL3	délka koncového zubu 3. listenu
BT3W3	šířka třetího zubu 3. listenu
BT3O3	délka osinky na 3. zubu 3. listenu
BAU3	úhel na vrcholu koncového zubu 3. listenu



Obr. 1: Vyznačení měřených znaků na květu a listenu.

Další znaky, měřené na herbářovaných rostlinách, jsou uvedené v Tab. II. Výška rostliny k 1. květu byla měřena pravítkem s přesností na mm jako přímá vzdálenost od nodu s děložními listy po 1. květ. Počítání nodů bylo prováděno dle metodiky v Metherell & Rumsey (2018), tj. nodus s děložními listy byl označen číslem 0. Na rozdíl od údajů v literatuře (Smejkal & Dvořáková 2000) byly děložní listy nebo jejich zbytky u zkoumaných

rostlin zachovány relativně často, což usnadnilo počítání nodů. Úhel větví byl měřen úhломěrem a hodnocen ve dvou kategoriích: a) 0-30°, b) více než 30°. Pro tvar větví byly vytvořeny 4 kategorie: a) pouze malé, b) spíše obloukovité, c) pokroucené, d) spíše přímé. Za tvar a úhel větví byl počítán vždy tvar a úhel převažující na dané rostlině u dobře vyvinutých větví. Informace o úhlu a tvaru větví byly poté převedeny na binární data (přítomnost/nepřítomnost daného typu) a pro statistické zpracování byl odstraněn poslední sloupec kvůli zachování stupňů volnosti. Při počítání celkového počtu větví byly za větve počítány již malé výrůstky, na kterých bylo možno odlišit větvíčku a lístky (mohlo být vyloučeno, že se jedná o list s řapíkem).

Tab. II: Přehled měřených znaků na herbářovaných rostlinách.

V	Výška rostliny k 1. květu
NK	Nodus s nejdolejším květem
N1V	Nodus s nejdolejší větví
NMV	Nodus s nejdelší větví
NVV	Nodus s nejhořejší větví
UV	Úhel větví
TV	Tvar větví
PV	Počet větví

K těmto měřeným znakům byly také přidány odvozené znaky a to: NK-NVV (počet nodů mezi nejhořejší větví a prvním květem), NVV-NMV (počet nodů mezi nejdelší a nejhořejší větví) a NK-N1V (počet nodů mezi první větví a prvním květem).

3.3 Analýza mikrosatelitů

Pro genetické analýzy bylo použito 8 mikrosatelitních úseků podle Svobodové (et al. 2016), která je optimalizovala na základě prací French et al. 2003 a Wang et al. 2009. Stejně mikrosatelitní úseky byly využity i v mé bakalářské práci (Kunzová 2022). Ze vzorků ze silikagelu (většinou části listu) byla nejprve vyizolována DNA NaOH metodou (Werner et al. 2002). Vzorky byly zhomogenizovány na mlýnku Retsch 400MM při frekvenci 29 kmitů/s v 1,5 ml mikrozkuřavkách spolu se 2 ocelovými kuličkami o průměru 3 mm. Následně bylo do mikrozkuřavek přidáno 40 µl 0,5M NaOH, mikrozkuřavky byly protřepány a umístěny do centrifugy na 13 200 RPM po dobu 2 minut. Z mikrozkuřavek byly odebrány 4 µl čiré kapaliny do 40 µl roztoku 100mM Tris HCl, pH 8,3. Izoláty byly 10x naředěny vodou (1 µl izolátu v 10 µl vody). Dále byla provedena PCR reakce pro jednotlivé mikrosatelitní úseky:

Ene 1, Ene 2, Ene 3, Ene 4 a Ene 5 (fluorescenčně barvené přímo pomocí značených primerů) a En-G, En-B, En-I [fluorescenčně barvené pomocí značeného M13 primeru (Schuelke 2000)]. V Tab. III je uvedeno množství reagensií pro jednu PCR reakci (celkový objem 5,5 μ l).

Tab. III: Množství reagensií pro jednu PCR reakci zkoumaných lokusů (celkový objem 5,5 μ l).

	Ene 1-5	En-G, En-B, En-I
Plain PP Master Mix (Top-Bio)	2,75 μ l	2,75 μ l
Fluorescenčně značený forward primer	0,66 μ l	-
Reverse primer	0,66 μ l	0,66 μ l
Tailed-forward primer	-	0,165 μ l
M13 primer	-	0,66 μ l
PCR voda	0,89 μ l	0,715 μ l
DNA	0,5 μ l	0,5 μ l

Kvůli předchozí problematičnosti (Kunzová 2022) byl pro PCR reakce lokusu En-I používán Combi PP Master Mix (Top-Bio), který měl vyšší úspěšnost amplifikace. Reakční podmínky pro PCR reakce jsou uvedené v Tab. IV.

Tab. IV: Reakční podmínky PCR reakcí pro jednotlivé lokusy.

		Ene 1, Ene 3, Ene 4	Ene 2	Ene 5	En-G, En-B, En-I		
		12 min	95°C	95°C	95°C	3 min	94°C
35 cyklů	15 s	95°C	95°C	95°C	30 cyklů	30 s	94°C
	15 s	53°C	54°C	52°C		30 s	50°C
	15s	72°C	72°C	72°C		30 s	72°C
	15 min	72°C	72°C	72°C	8 cyklů	30 s	94°C
	hold	15°C	15°C	15°C		30 s	46°C
						30 s	72°C
						10 min	72°C
						hold	15°C

Úspěšnost PCR reakce byla ověřena na 1,5% agarózovém gelu a při neuspokojivém výsledku byla reakce zopakována. Následně byl připraven směsný vzorek, který obsahoval úspěšné PCR produkty všech 8 lokusů pro daný vzorek. Pro směsný vzorek byl použit 1 μ l produktu od lokusů Ene 1, Ene 2, Ene 3, Ene 5 a 1,5 μ l produktu od lokusů Ene 4, En-G, En-B a En-I. Tyto směsné vzorky byly odeslány na fragmentační analýzu do firmy SEQme s.r.o.,

kteřá provedla fragmentační analýzu s velikostním standardem GeneScan™-600 LIZ®. Výsledky fragmentační analýzy byly odečteny ručně v programu GeneMarker (SoftGenetics, LLC, USA). Alely byly skórovány pouze jako přítomnost (1) či nepřítomnost (0) dané alely. Všechny zkoumané druhy jsou totiž tetraploidní a z výsledků není možné rozlišit, kolikrát se alela na daném místě vyskytuje. U některých podezřelých vzorků byl celý proces od izolace (včetně) zopakován kvůli možnosti kontaminace a v některých nejasných oblastech bylo využito skórování jako missing data (?).

3.4 Spojení s dalšími daty

Kromě dat získaných v této diplomové práci byla pro další analýzy využita i data z mé bakalářské práce (Kunzová 2022) a z práce Šárky Svobodové (Svobodová et al. 2016).

Pro morfometrické analýzy byla využita jen data z této a z bakalářské práce (Kunzová 2022), kde se shodovala většina měřených znaků. Pro spojení těchto dvou datasetů (bakalářská a diplomová práce) bylo potřeba vyřadit znaky LCD a BAL z dat z bakalářské práce.

Pro analýzu mikrosatelitních úseků byla využita data z bakalářské práce (Kunzová 2022) i data z práce Svobodové (et al. 2016), která používala stejné mikrosatelitní markery. Díky spojení přímo s autorkou a možnosti nahlédnutí do primárních dat bylo možné sjednotit skórování a datasety spojit. Z dat byly vynechány oblasti, kde skórovala pouze jedna z autorek, konkrétně se jednalo o úsek 193–218 lokusu Ene 2 a alelu 164 u lokusu Ene 1, které byly skórovány jen v práci Svobodové (et al. 2016) a o úseky 125–154, 195–205, 211–225 a alely 163, 165, 173, 186 u lokusu En-B, alely 101, 109, 112 a 127 u lokusu Ene 5, alelu 115 u lokusu Ene 2 a úsek 182–188 a alely 140, 166, 168 u lokusu Ene 1, které byly skórovány pouze v této a bakalářské práci. Vynechání těchto úseků z analýz by však nemělo mít žádný významný dopad na výsledky, protože se jednalo převážně o úseky s malou variabilitou, kde se alely objevovaly spíše výjimečně [kromě alely 115 u lokusu Ene 2, která naopak byla téměř u všech vzorků, svým tvarem ale neodpovídá typickému chování mikrosatelitního úseku – zřejmě proto nebyla v práci Svobodové (et al. 2016) skórována]. Všechny oblasti, které nesly hlavní informace z daného lokusu, byly zachovány a sjednoceny. Pro další ověření spojitelnosti dat byly analyzovány některé populace, které ve své práci zahrnula i Svobodová (et al. 2016). Jedná se o populace Kuc [~ populaci LUZ u Svobodové (et al. 2016)], VeP (~ populaci HUT) a Pre (~ populaci PREL). Tyto shodné populace tedy byly zpracovávány nezávisle a následně byly porovnány přítomné alely. V genetické struktuře nebyl zjištěn žádný rozdíl nad rámec běžné vnitropopulační variability.

3.5 Statistické zpracování

Veškerá data byla zpracovávána ve dvou až třech krocích – nejprve data jen pro tuto práci (dataset DP), následně ve spojení s daty z bakalářské práce (Kunzová 2022; dataset DP+BP) a v případě genetických analýz ve třetím kroku s připojenými daty z práce Š. Svobodové (et al. 2016; dataset DP+BP+S).

Pro data z mikrosatelitních úseků byly v programu FAMM 1.31 (Schlüter & Harris 2006) spočteny distance pomocí Jaccardova koeficientu. Z této matice byla spočítána analýza hlavních koordinát (PCoA). Údaje o pozici jednotlivých vzorků byly vizualizovány v programu R (R core team 2020) v prostředí RStudio (RStudio Team 2021). Dále bylo provedeno Bayesiánské shlukování (Bayesian clustering) v programu STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003, 2007) pro datasey DP+BP a DP+BP+S. Pro analýzu byl využit admixture model s korelovanými frekvencemi alel se 100 000 burn-in fází a 1 000 000 iterací při vlastním výpočtu. Ostatní parametry byly ponechány v základním nastavení. Testováno bylo rozdělení do shluků (K) 1–8 s 10 opakováními pro každé K. Kvůli velkému objemu dat byla pro analýzu datasetu DP+BP+S využita virtuální organizace MetaCentrum (<https://metavo.metacentrum.cz/cs/>). Ve Structure analýze datasetu DP+BP+S byly oproti datasetu DP+BP zahrnuty i dříve sbírané populace (Orlic, Pla, Serlich) a vzorky opakované kvůli podezření z kontaminace. Opakované vzorky však vyšly při druhém zpracování téměř stejně jako při prvním. Další zpracování výsledků z programu Structure a odhad optimálního počtu skupin (K) podle metodiky v Evanno et al. 2005 probíhalo v programu R a RStudio s využitím skriptů Structure-sum-2009 (Ehrich 2006).

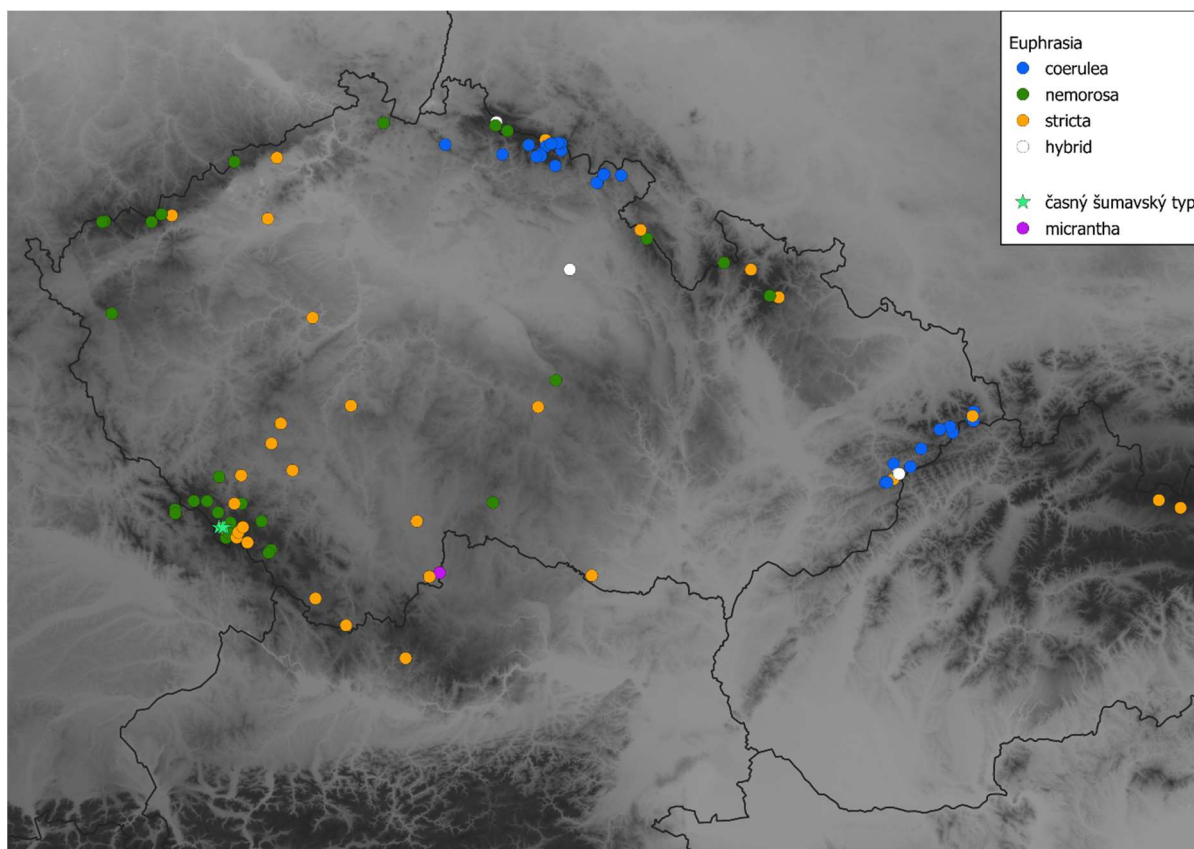
Pro morfometrické znaky byly nejprve spočítány korelační koeficienty mezi jednotlivými znaky pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Následně byly z datové sady vynechány znaky s vysokou mírou korelace ($>0,9$ nebo s více znaky $>0,8$). Jednalo se o znaky CH, CLW2, BTLL3/BTLW3 a NVV. Pro sledování celkové variability byla používána analýza hlavních komponent (PCA) a pro hledání znaků nejlépe odlišujících zkoumané skupiny byla využita diskriminační analýza. V diskriminační analýze pro *E. coerulea*, *E. nemorosa* a *E. stricta* byly provedeny testy na průkaznost jednotlivých znaků pro rozlišení daných skupin. Testována byla schopnost rozlišit sledované skupiny samostatnými znaky (tzv. marginal effects) i unikátní příspěvek znaků v modelu se všemi ostatními znaky. Provedena byla také klasifikační diskriminační analýza. Kromě unikátního šumavského časného typu byly populace pro morfometrické analýzy kódovány podle skupin definovaných genetickými analýzami. Pro počítání části morfometrických analýz nebyly zahrnuty hybridní a směsné

populace, detaily jsou vždy uvedeny u dané analýzy. Za hybridní byly považovány populace, které měly více než 30% příměs jiného genotypu podle Structure analýzy. Všechny zmíněné morfometrické analýzy byly prováděny v programu R (R core team 2020) v prostředí RStudio (RStudio Team 2021) s využitím skriptů MorphoTools (Koutecký 2015).

4 Výsledky

4.1 Přehled studovaných populací

V této práci byly nově analyzovány rostliny z celkem 39 populací z celé ČR a jedna populace z Dánska. Při spojení s daty z bakalářské práce (tj. dataset DP+BP) je celkový počet populací 63, při zahrnutí i dat z práce Svobodové (et al. 2016) pak 105 (dataset DP+BP+S). Veškeré studované populace (dataset DP+BP+S) kromě populace z Dánska jsou znázorněné na Obr. 2.



Obr. 2: Mapa studovaných populací z této práce, bakalářské práce a z práce Š. Svobodové (et al. 2016), kromě populace z Dánska.

Rostliny druhu *E. micrantha* se bohužel podařilo nalézt pouze na jedné lokalitě. Z tak malého množství dat tedy nelze vyvozovat spolehlivé závěry a v některých analýzách (v diskriminační a klasifikační diskriminační analýze) proto nebyl tento druh vůbec zahrnutý.

4.2 Analýza mikrosatelitů

Mikrosatelitními markery bylo v této práci nově analyzováno celkem 269 rostlin ze 40 populací. Analýzou 8 mikrosatelitních lokusů bylo nalezeno celkem 91 alel. Velkou část tohoto počtu tvoří alely dvou lokusů, Ene 1 (17 alel) a En-B (41 alel), u kterých se vyskytovala výrazná variabilita a pravděpodobně jejich primery amplifikovaly ještě jinou část genomu než

jen cílový mikrosatelit. Tyto „alely“ však byly buď vzácné, tudíž bez významného vlivu na celkové výsledky, nebo dávaly smysluplnou informaci (např. populační). Počty alel u všech lokusů jsou v Tab. V, počty privátních alel jednotlivých druhů pak v Tab. VI. Jako privátní alely nebyly počítány ty, které se vyskytly v celém datasetu jen jednou. Pro hodnocení privátních alel byly vynechány hybridní populace (HK-Pla, Pla, NJi, GaL) a jedinci jiné taxonomické příslušnosti než zbytek populace (Har2, Kru2, Orlic4; určováno na základě výsledků molekulárních analýz). Dobrým indikátorem byl lokus En-G, který byl variabilní jen u druhu *E. stricta*. Větší množství privátních alel pro všechny tři druhy dával také lokus En-B, v jednom případě byl privátní dokonce celý úsek (B221–225 pro *E. nemorosa*).

Tab. V: Počty alel pro jednotlivé mikrosatelitní lokusy.

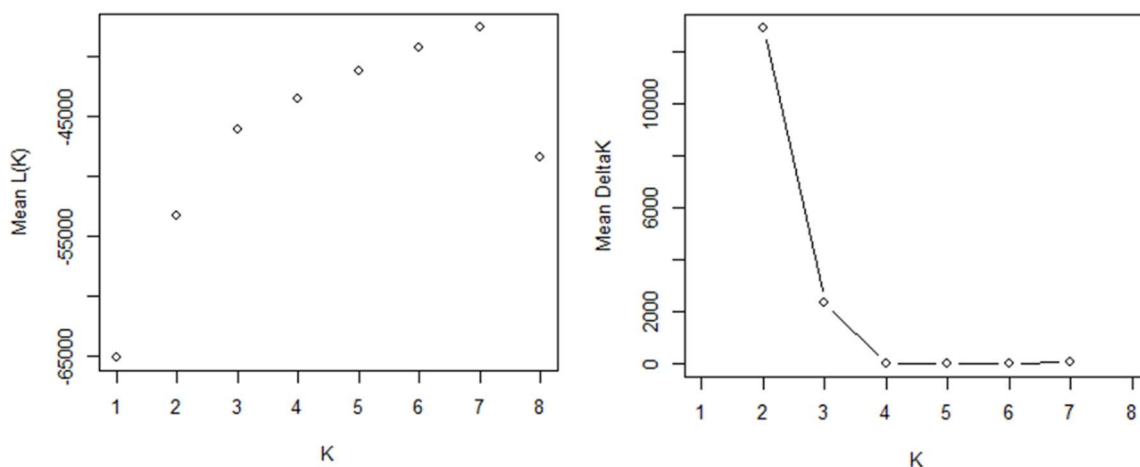
Lokus	Počet alel	Lokus	Počet alel
Ene 1	17	Ene 5	8
Ene 2	4	En-G	3
Ene 3	9	En-B	41
Ene 4	4	En-I	5

Tab. VI: Počet privátních alel zkoumaných druhů.

Druh	Počet privátních alel
<i>E. nemorosa</i>	8
<i>E. coerulea</i>	4
<i>E. stricta</i>	10
<i>E. micrantha</i>	0

Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) i Bayesovského shlukování v programu Structure byly velmi podobné. Obě analýzy rozlišily tři genetické skupiny odpovídající druhům *E. nemorosa*, *E. stricta* a *E. coerulea*. Přestože ze statistik využitých k odhadu optimálního K v Bayesovském shlukování by mohlo být uvažováno i o 4 skupinách, 3 skupiny jsou lepší volbou ze dvou důvodů: 1) Čtvrtá odlišená skupina nebyla konstantní. V 9 z 10 opakování pro K=4 (v datasetu DP+BP) byly odděleny populace časných rostlin ze Šumavy spolu s různým podílem dalších populací *E. nemorosa*. V jednom opakování byla jako čtvrtá skupina vyčleněna část rostlin *E. stricta*. 2) Časné rostliny jsou geneticky velmi homogenní a spíše než o samostatnou skupinu se jedná o mladý morfotyp nově vyselektovaný z místní

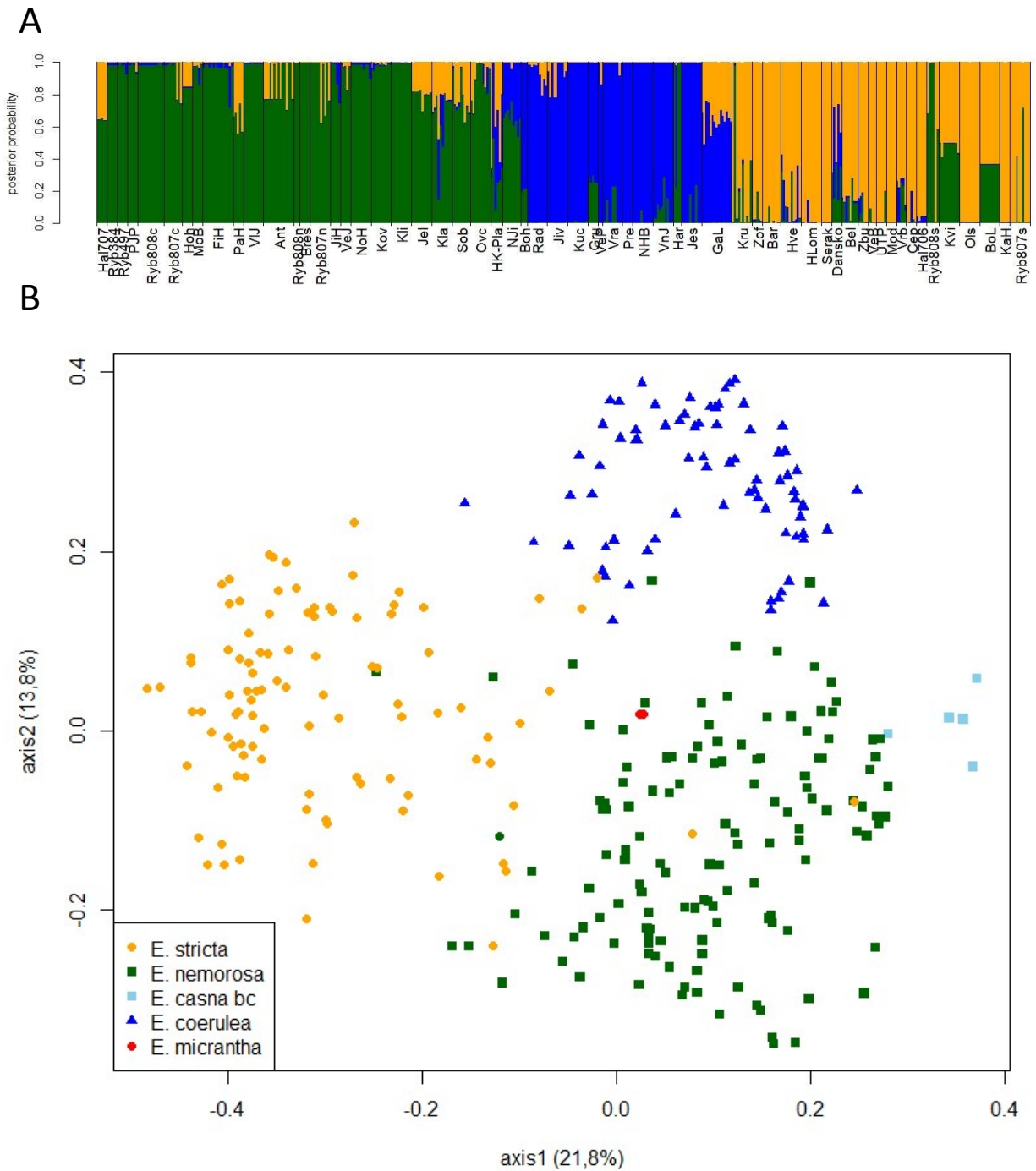
populace *E. nemorosa*. Část výsledků z programu Structure používaných pro odhad ideálního K je na Obr. 3. Výstupy pro oba datasety (DP+BP i DP+BP+S) byly téměř totožné, zobrazen je proto pouze výstup pro dataset spojených dat (DP+BP+S).



Obr. 3: Mean L(K) a Mean DeltaK podle Evanno (et al. 2005) používané k odhadu optimálního K. Výsledky pro dataset DP+BP+S.

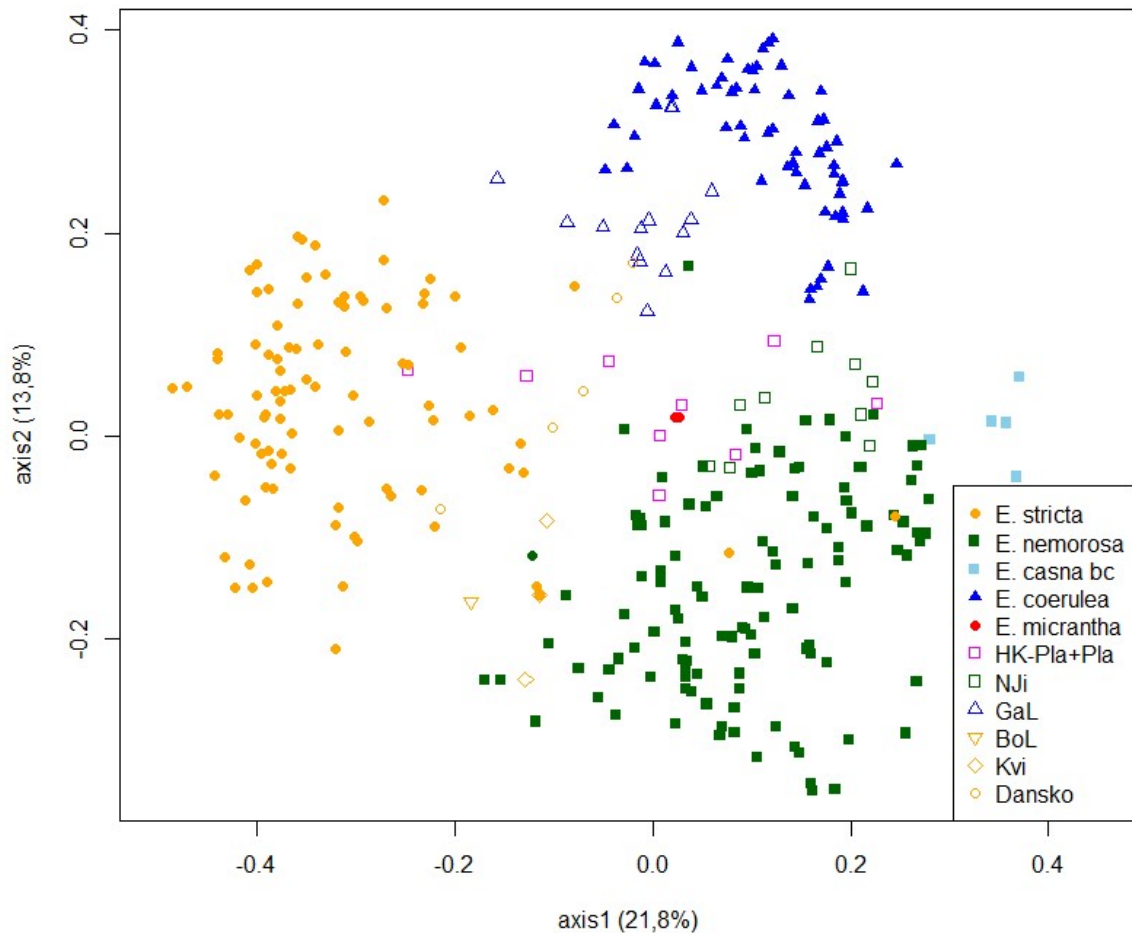
4.2.1 Analýza vlastních dat (DP+BP)

Na Obr. 4 je grafický výstup z programu Structure pro K=3 (průměr všech 10 nezávislých běhů) a výstup z analýzy hlavních koordinát (PCoA) pro dataset DP+BP. Jedinci v PCoA byli obarveni na základě převažujícího genotypu v populaci [výjimkou jsou oddělené časné rostliny ze Šumavy a populace Ryb807 a Ryb808, kde byli posuzováni jednotliví jedinci – jedná se o směsné populace časného typu, *E. stricta* a *E. nemorosa* a při sběru zřejmě došlo k determinačním chybám, viz bakalářská práce (Kunzová 2022)].



Obr. 4: A: Výstup z programu Structure pro K=3 (průměr všech 10 nezávislých běhů), zelená = *E. nemorosa*, modrá = *E. coerulea*, žlutá = *E. stricta*, B: výstup z analýzy hlavních koordinát (PCoA) pro dataset DP+BP, první osa vysvětluje 21,8 % variability, druhá osa vysvětluje 13,8 % variability.

Podle analýz šumavský časný typ genetiky nejvíce odpovídá druhu *E. nemorosa*. Na Obr. 5 jsou v ordinačním prostoru PCoA znázorněny nejvýraznější hybridní populace.



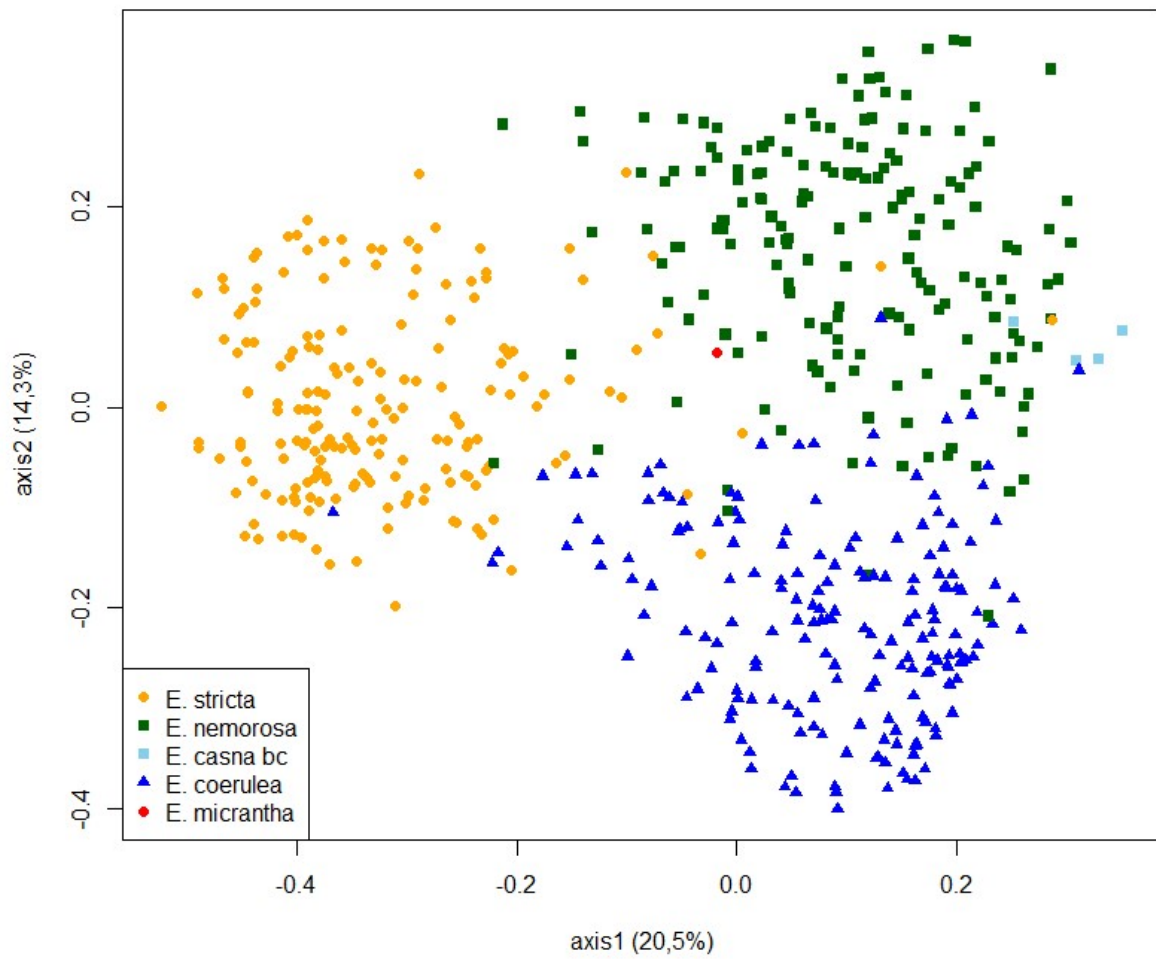
Obr. 5: Výstup z analýzy hlavních koordinát (PCoA) s vyznačením nejvýraznějších hybridních populací, první osa vysvětluje 21,8 % variability, druhá osa vysvětluje 13,8 % variability.

Nejvýraznější hybridní populací je populace Hradec Králové-Na Plachtě (HK – Pla, Pla), která se nachází na rozhraní všech tří zkoumaných druhů. Dalšími významnými hybridními populacemi jsou NJi (*E. nemorosa* × *E. coerulea*), GaL (*E. coerulea* × *E. stricta*), Kvi, BoL (*E. stricta* × *E. nemorosa*) a Dansko (*E. stricta* × *E. coerulea* × *E. nemorosa*).

Jak je vidět, při označení hybridních populací tvoří ostatní vzorky jasně odlišené skupiny. Několik dalších bodů *E. stricta* ve skupině *E. nemorosa* patří jednotlivým rostlinám z populací jinak spadající do skupiny *E. stricta*.

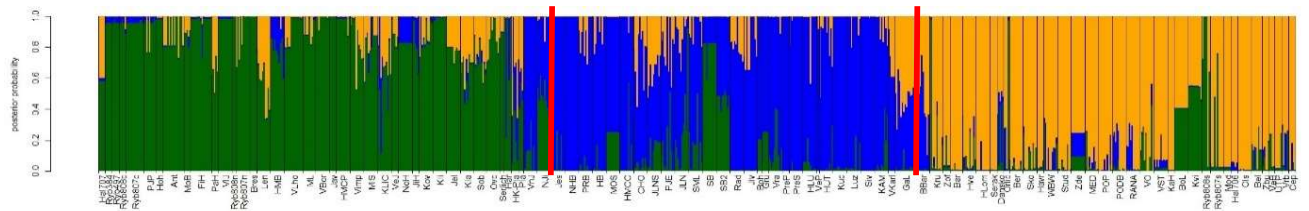
4.2.2 Analýza spojených dat (DP+BP+S)

Při zahrnutí dat z práce Svobodové (et al. 2016) zůstává základní schéma beze změny (Obr. 6, Obr. 7). Stále jsou rozlišovány 3 skupiny, u PCoA dochází pouze k větším překryvům kvůli několika dalším hybridním populacím (Obr. 8) či jedincům.

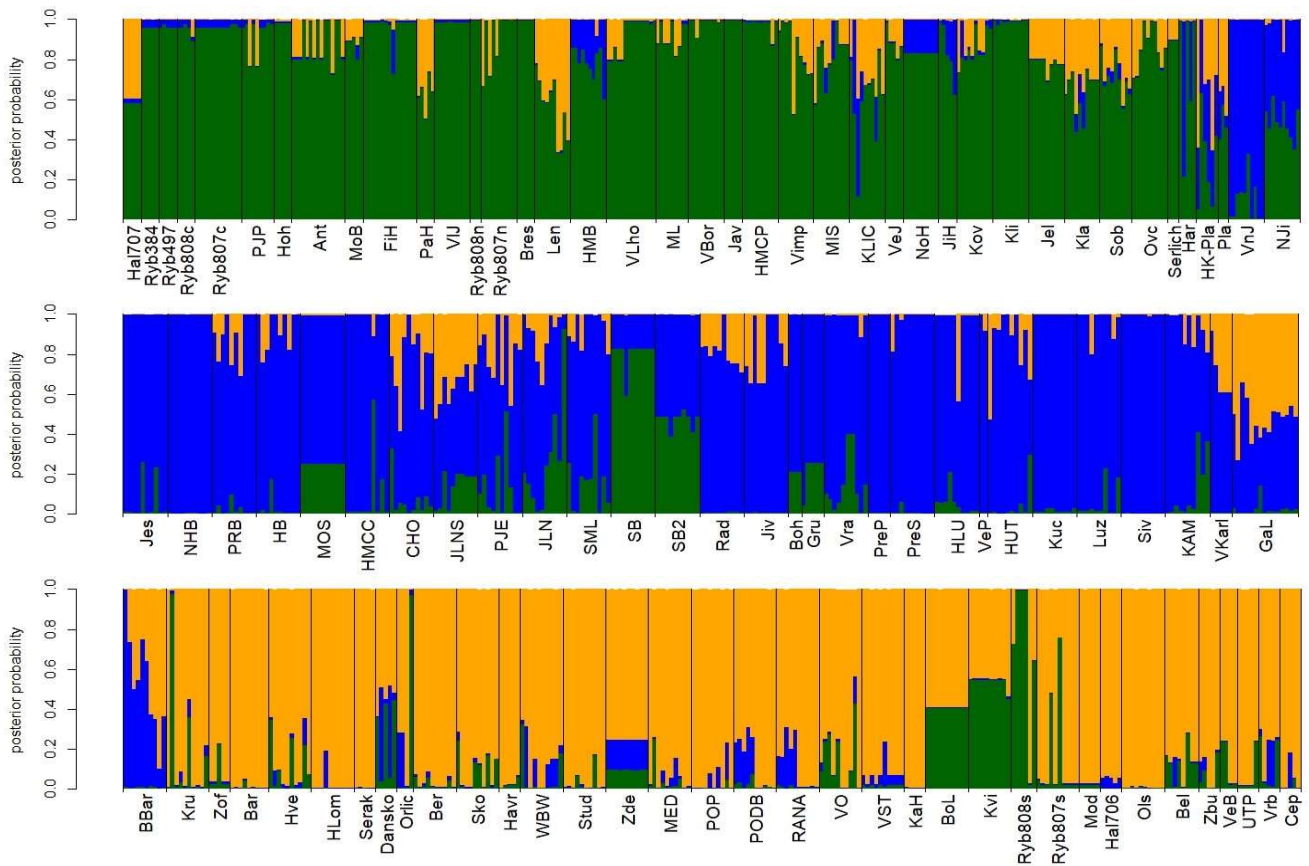


Obr. 6: Výstup z analýzy hlavních koordinát (PCoA) pro dataset DP+BP+S, první osa vysvětluje 20,5 % variability, druhá osa vysvětluje 14,3 % variability.

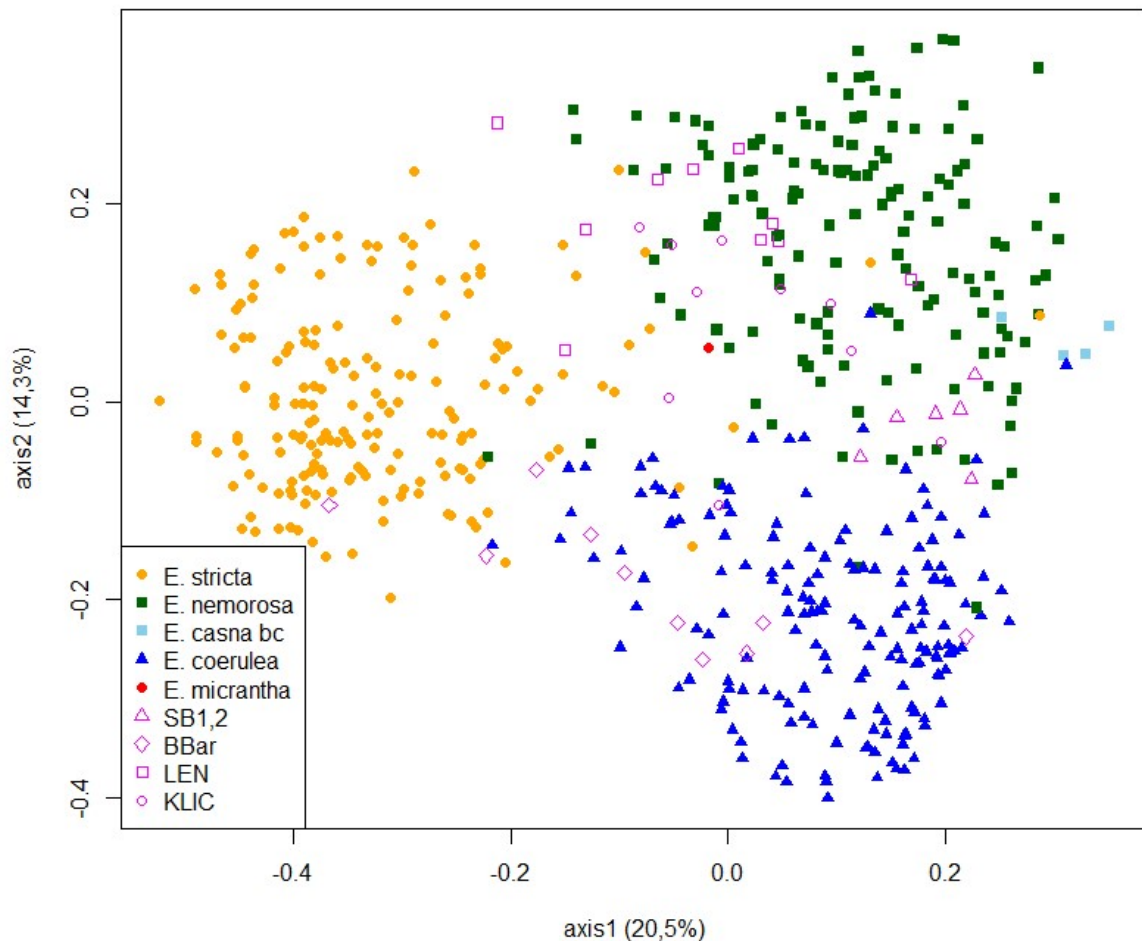
A



B



Obr. 7: Výsledek analýzy programu Structure pro dataset DP+BP+S (průměr všech 10 nezávislých běhů). V části A je celý výsledek, pod ním pak v části B tři jeho výřezy (v části A označeny červenými čarami). Zelená = *E. nemorosa*, modrá = *E. coerulea*, žlutá = *E. stricta*.



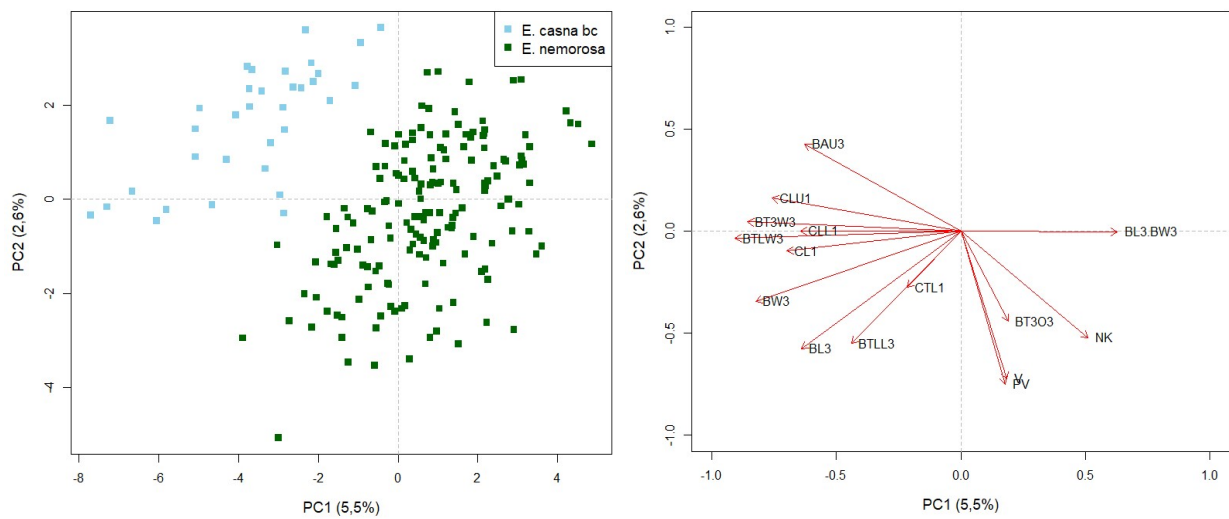
Obr. 8: Výstup z analýzy hlavních koordinát (PCoA) pro dataset DP+BP+S s vyznačením významných hybridních populací, první osa vysvětluje 20,5 % variability, druhá osa vysvětluje 14,3 % variability.

4.3 Morfometrické analýzy

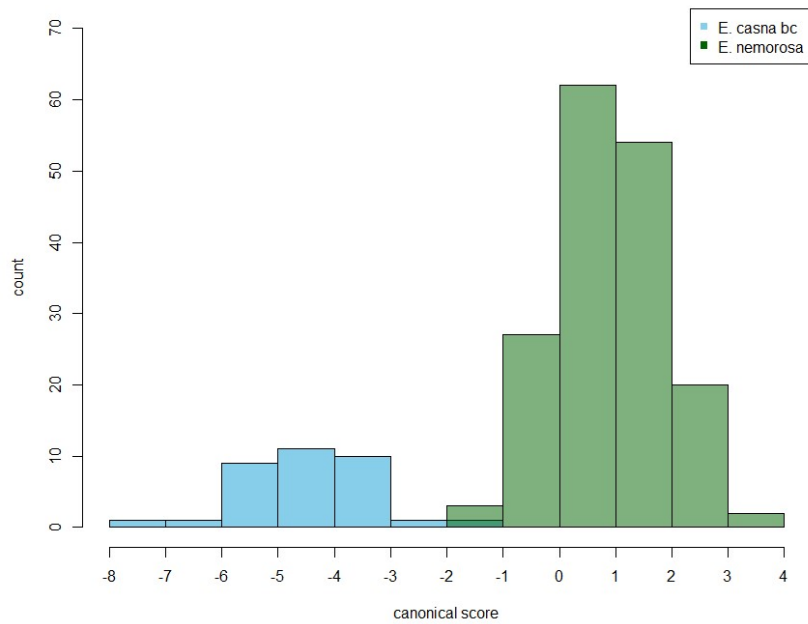
Pro morfometrické analýzy byl využíván především dataset DP+BP, tj. data z této a z bakalářské práce. Taxonomická příslušnost pro morfometrické analýzy byla určena na základě výsledků genetických analýz, kromě šumavského časného typu, který byl hodnocen jako samostatná skupina.

4.3.1 Šumavský časný typ

Šumavský časný typ vyšel podle genetických analýz jako *E. nemorosa*. Morfologicky se však od ostatních rostlin *E. nemorosa* výrazně liší. Tato odlišnost je vidět už v PCA (Obr. 9). Diskriminační analýza jí jasně potvrzuje (Obr. 10) a jako hlavní rozlišovací znaky identifikuje zejména znaky na zubech listenů (BAU3 – úhel koncového zubu, BTLW3 – šířka koncového zubu, BT3W3 – šířka 3. zubu), počet nodů ke květu (NK) a délku okraje dolního korunního pysku (CLU1; Tab. VII).



Obr. 9: Výsledek analýzy hlavních komponent (PCA) šumavského časného typu (*E. casna bc*) a *E. nemorosa*, první osa (PC1) vysvětluje 5,5 % variability, druhá osa (PC2) vysvětluje 2,6 % variability.

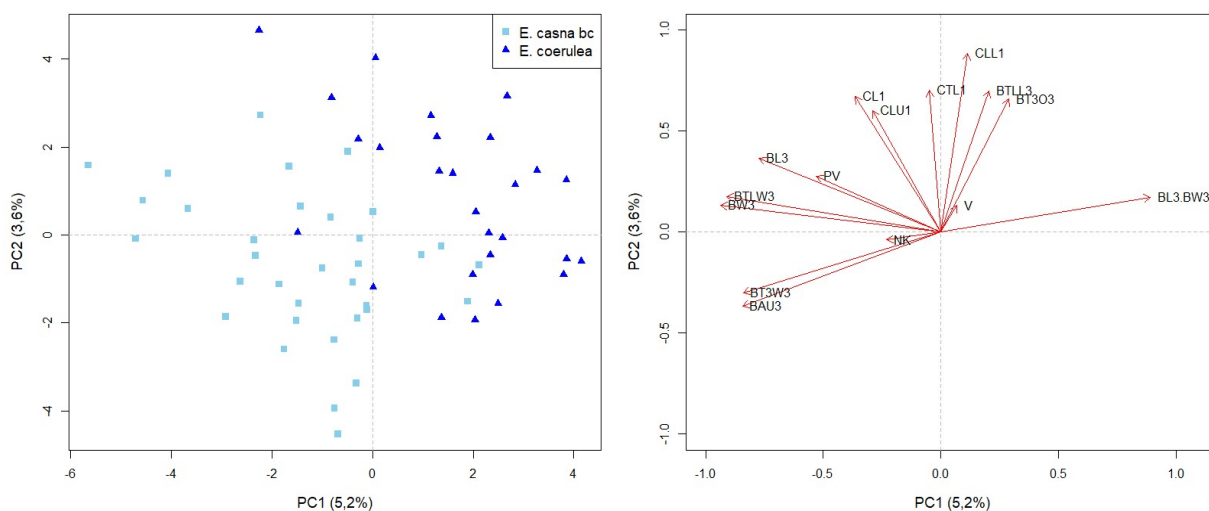


Obr. 10: Výsledek diskriminační analýzy šumavského časného typu (*E. casna bc*) a *E. nemorosa*.

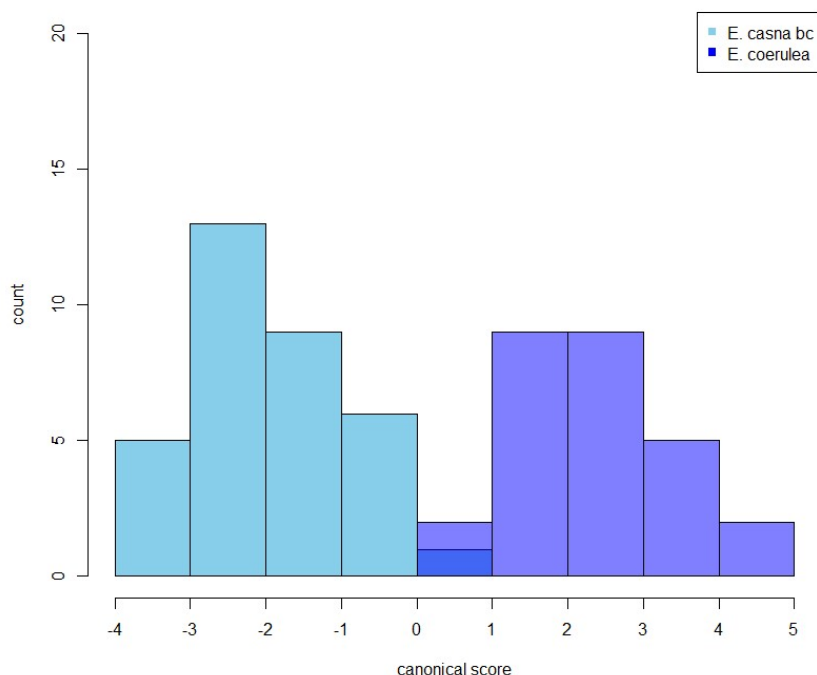
Tab. VII: Tabulka příspěvků znaků k ose diskriminační analýzy (CCA1) pro šumavský časný typ a *E. nemorosa*, nejvýznamnější znaky jsou vyznačeny tučně.

Znak	CCA1	Znak	CCA1	Znak	CCA1
CL1	-0,26203	BW3	-0,21509	BAU3	-0,45425
CTL1	0,02416	BTLW3	-0,43939	BL3.BW3	0,230789
CLL1	-0,25597	BTLL3	-0,02432	V	0,196447
CLU1	-0,42582	BT3W3	-0,43176	NK	0,424274
BL3	-0,07319	BT3O3	0,193098	PV	0,216417

Důležité je srovnání šumavských časných rostlin s rostlinami *E. coerulea* z Beskyd, které jsou jim fenologicky i habituelně nejpodobnější. Přestože se v obou případech jedná o většinou drobné, nevětvené nebo jen málo větvené rostliny, podle dalších morfologických znaků se liší. Podle PCA je zde jen malý překryv, viz. Obr. 11. Podle diskriminační analýzy (Obr. 12) se šumavské časné rostliny od beskydských rostlin *E. coerulea* liší zejména v úhlu na koncovém zubu listenu (BAU3) a šířce třetího zubu listenu (BT3W3), viz Tab. VIII.



Obr. 11: Výsledek analýzy hlavních komponent (PCA) šumavského časného typu (*E. casna bc*) a časného typu *E. coerulea* z Beskyd (*E. coerulea*), první osa vysvětluje 5,2 % variability, druhá osa vysvětluje 3,6 % variability.



Obr. 12: Výsledek diskriminační analýzy šumavského časného typu (*E. casna bc*) a časného typu *E. coerulea* z Beskyd (*E. coerulea*).

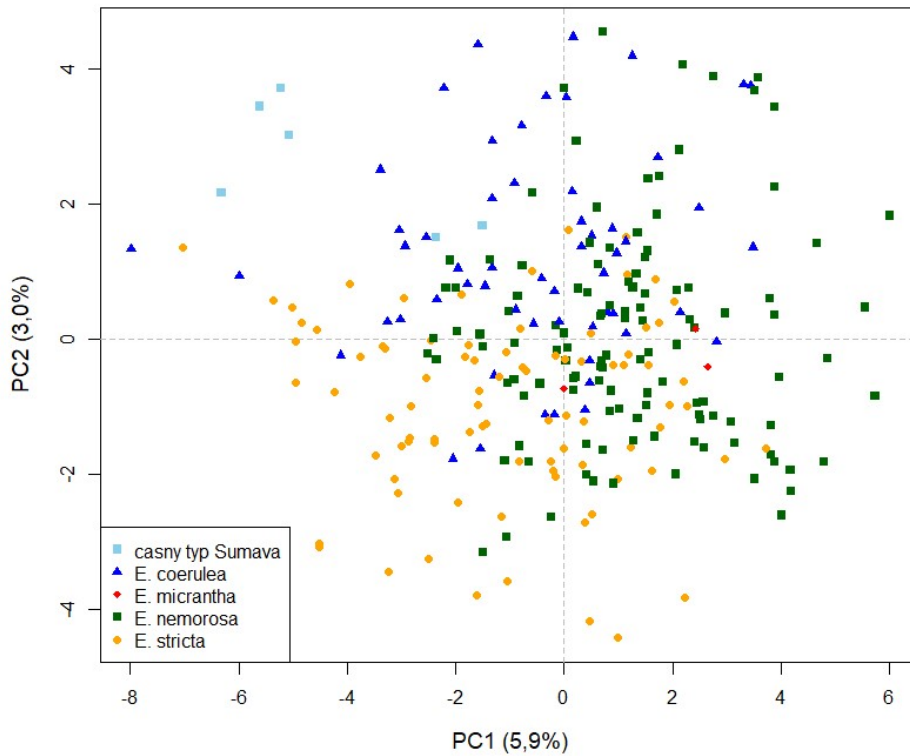
Tab. VIII: Tabulka příspěvků znaků k ose diskriminační analýzy (CCA1) pro šumavský časný typ a časný typ *E. coerulea* z Beskyd, nejvýznamnější znaky jsou vyznačeny tučně.

Znak	CCA1	Znak	CCA1	Znak	CCA1
CL1	-0,09233	BW3	-0,2391	BAU3	-0,67399
CTL1	0,033984	BTLW3	-0,24321	BL3.BW3	0,416636
CLL1	0,233607	BTLL3	0,395245	V	0,191744
CLU1	-0,07181	BT3W3	-0,5099	NK	-0,12
BL3	-0,0843	BT3O3	0,268131	PV	-0,0086

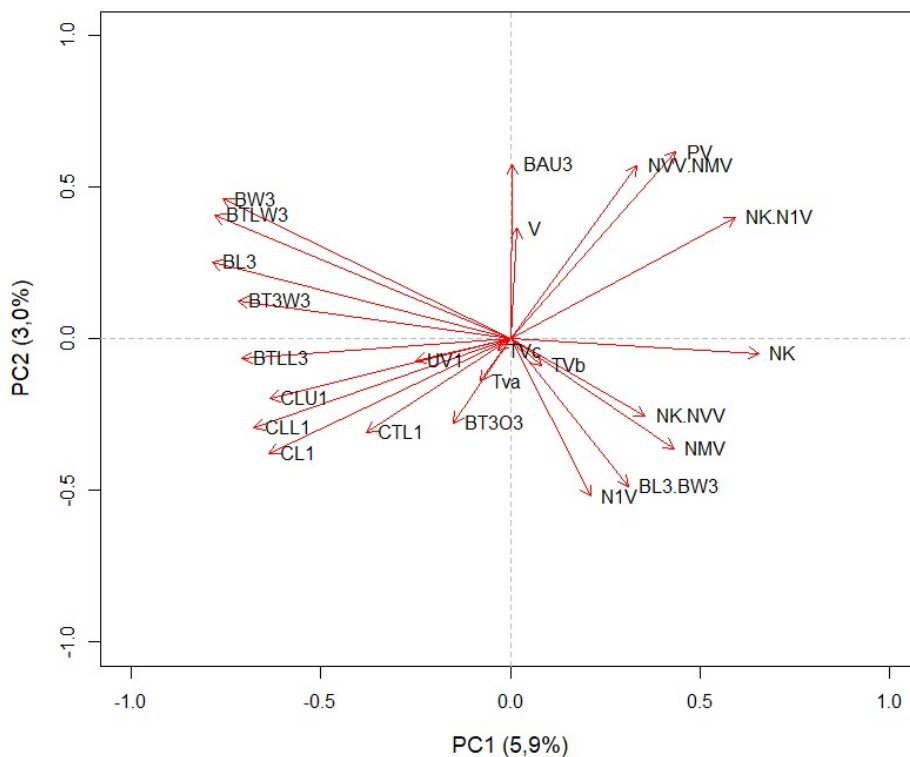
Při srovnávání šumavských časných rostlin nebyly použity znaky na větvích (N1V, NMV, UV, TV, NK-NVV, NVV-NMV, NK-N1V), protože většina rostlin žádné větve neměla a vypadla by tak kvůli chybějícím hodnotám z analýz. Mezi *E. coerulea* z Beskyd nebyla zahrnuta populace GaL, kde byla geneticky prokázána hybridizace s druhem *E. stricta*.

4.3.2 Analýza hlavních komponent

Analýza hlavních komponent (PCA) ukázala jen slabou diferenciaci mezi zkoumanými taxony. Její výsledek pro dataset DP+BP je na Obr. 13 a Obr. 14.

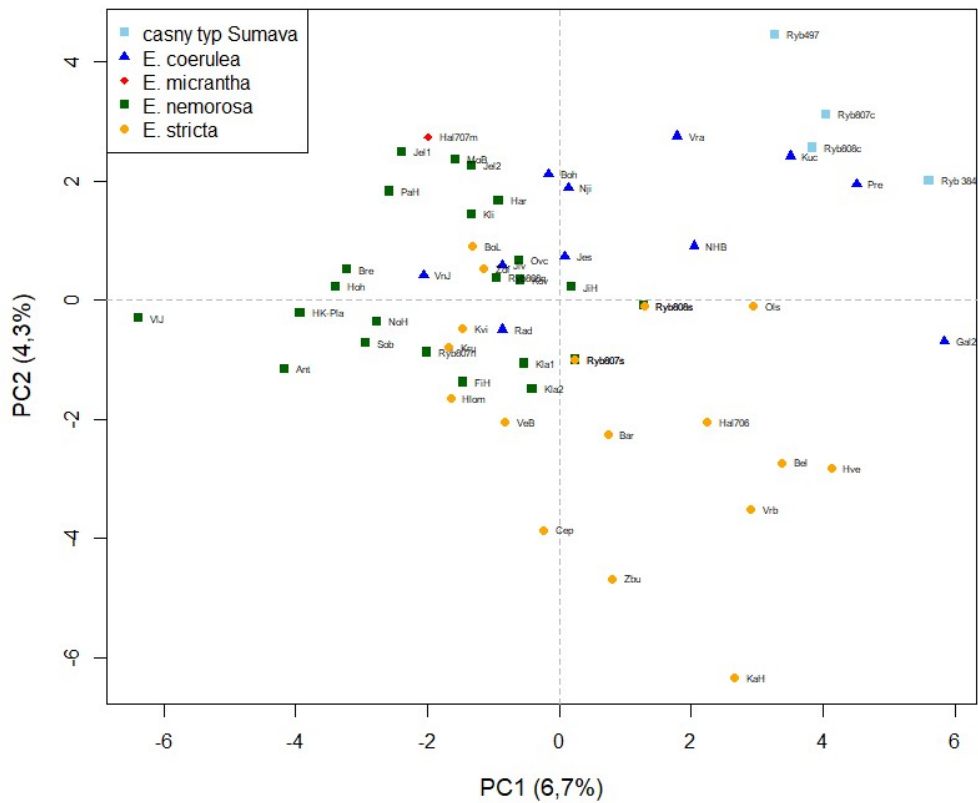


Obr. 13: Výsledek analýzy hlavních komponent (PCA) datasetu DP+BP, první osa vysvětluje 5,9 % variability, druhá osa vysvětluje 3 % variability.

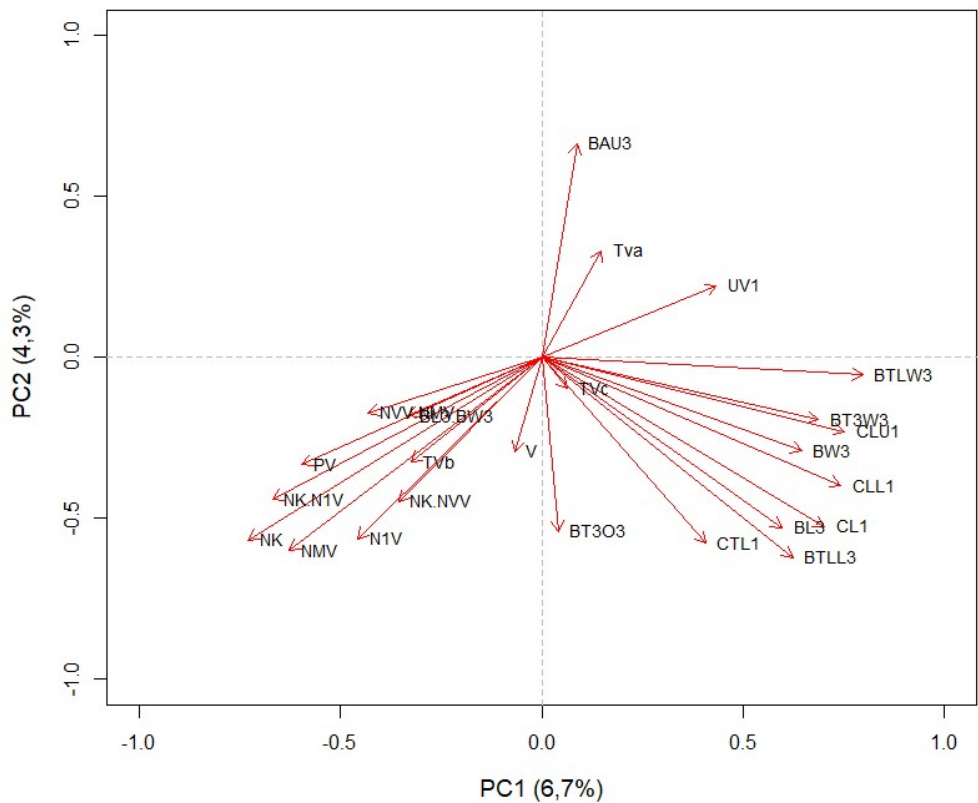


Obr. 14: Korelace znaků s osami PCA analýzy datasetu DP+BP.

Lepší oddělení skupin lze vidět na Obr. 15 a Obr. 16 kde je znázorněn výsledek PCA pro populační průměry jednotlivých populací (dataset DP+BP).



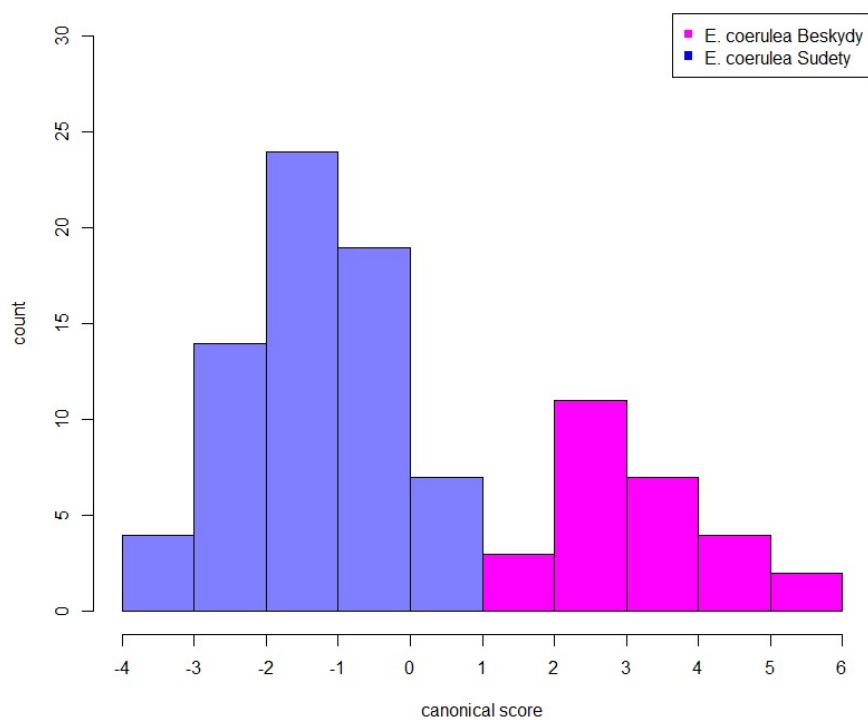
Obr. 15: Výsledek analýzy hlavních komponent (PCA) populačních průměrů datasetu DP+BP, první osa vysvětluje 6,7 % variability, druhá osa vysvětluje 4,3 % variability.



Obr. 16: Korelace znaků s osami PCA analýzy populačních průměrů datasetu DP+BP.

4.3.3 Variabilita *E. coerulea*

Obzvlášť velký rozptyl lze vidět u *E. coerulea*. To je způsobeno tím, že u *E. coerulea* se vyskytují dva odlišné morfotypy – časný, který je morfologicky bližší šumavským časným typům a pozdnější, který je morfologicky bližší *E. nemorosa*. Tyto dva morfotypy jsou dobře geograficky oddělené, kdy časný typ se vyskytuje pouze v Beskydech a pozdní typ v Sudetských pohorích. Oba typy jsou dobře rozlišitelné i morfologicky, v diskriminační analýze (Obr. 17) nedochází k překryvu. Diskriminační analýza také označila jako nejlepší určovací znaky počet nodů k 1. květu (NK), znaky na květu (CL1, CLL1, CLU1) a poměr délky a šířky listenu (BL3.BW3; Tab. IX). U této analýzy opět nebyly použity znaky na větvích (N1V, NMV, UV, TV, NK-NVV, NVV-NMV, NK-N1V), protože u velké části časných rostlin větve chyběly.



Obr. 17: Výsledek diskriminační analýzy pro *E. coerulea* z Beskyd a Sudet.

Tab. IX: Tabulka příspěvků znaků k ose diskriminační analýzy (CCA1) pro *E. coerulea* z Beskyd a Sudet.

Znak	CCA1	Znak	CCA1	Znak	CCA1
CL1	0,375251	BW3	-0,25842	BAU3	-0,23311
CTL1	0,060019	BTLW3	-0,02392	BL3.BW3	0,370436
CLL1	0,403652	BTLL3	0,167029	V	-0,20341
CLU1	0,372426	BT3W3	-0,02914	NK	-0,60426
BL3	-0,15477	BT3O3	-0,10019	PV	-0,29002

Zajímavé je srovnání počtu nodů k prvnímu květu u populací *E. coerulea* z Beskyd a Sudet s výsledky práce Svobodové (et al. 2016, nepublikovaná data). I v její práci byl znatelný rozdíl mezi populacemi z Beskyd a Sudet, průměrný počet nodů k prvnímu květu u sudetských populací je ale v mé práci výrazně vyšší (viz Tab. X).

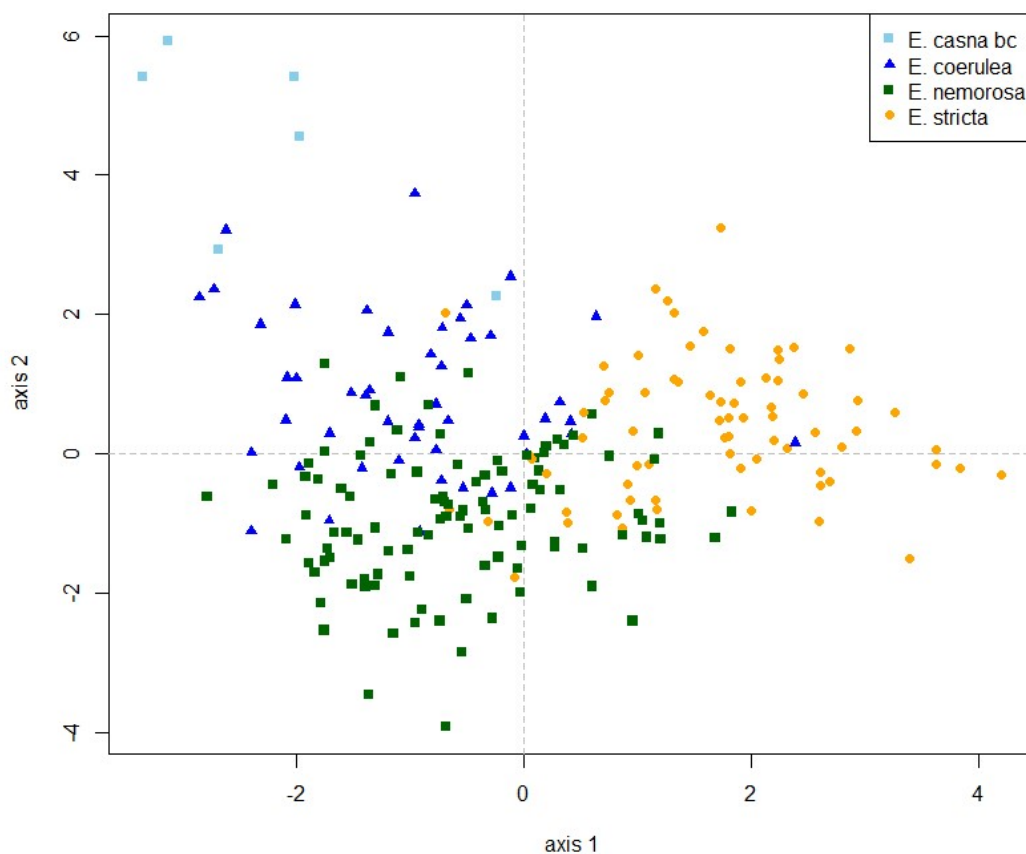
Tab. X: Počet nodů k prvnímu květu u zkoumaných populací *E. coerulea* a srovnání průměrných hodnot s průměrnými hodnotami z práce Svobodové (et al. 2016, nepublikovaná data). NK=průměrný počet nodů k prvnímu květu v populaci, DP = průměrný počet ze všech populací z této práce, S = průměrný počet ze všech populací z práce Svobodové (et al. 2016, nepublikovaná data).

Sudety		Beskydy	
Populace	NK	Populace	NK
Jes	9,9	Kuc	4,7
NHB	7,6	VeP	4
VnJ	11,7	Vra	5,4
Rad	11,7	Pre	4,8
Jiv	11	GaL	5,6
Boh	13		
Průměr		Průměr	
DP	10,81667	DP	4,9
S	7,357143	S	5,277273

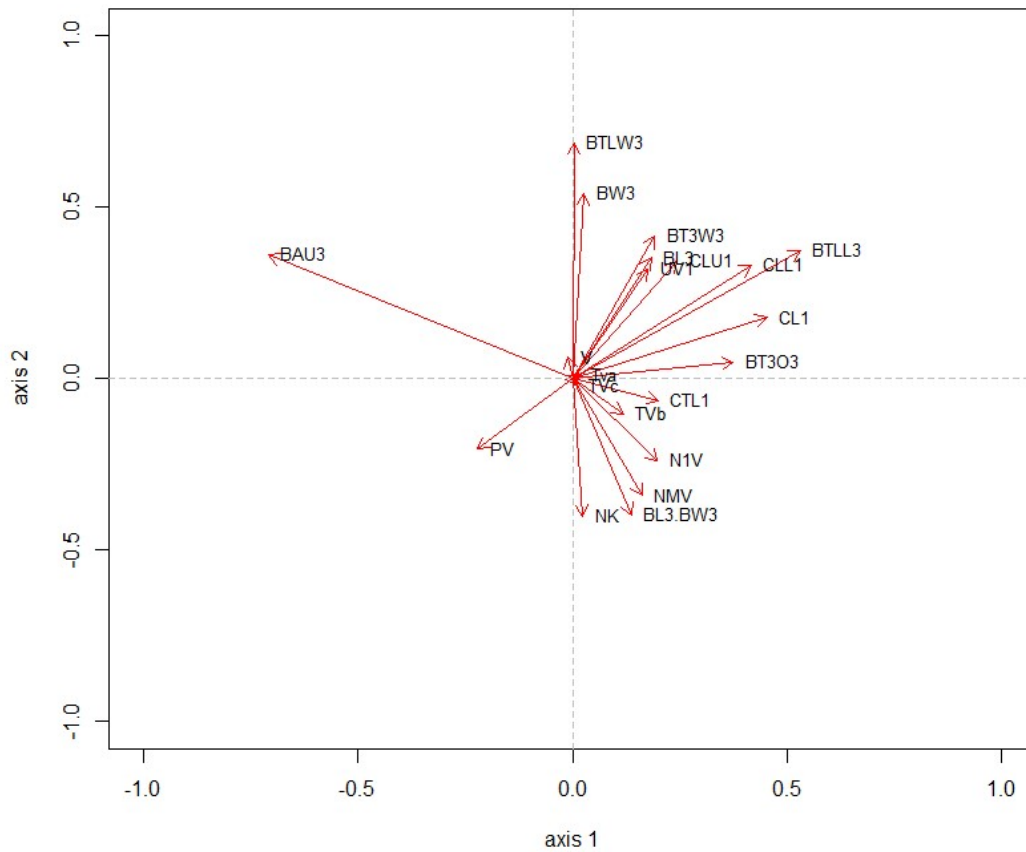
Protože podle genetických analýz vyšly časný i pozdní typ *E. coerulea* jednotně, byl tento druh brán jednotně i při dalších analýzách.

4.3.4 Diskriminační analýza

Do diskriminační analýzy nebyl zahrnutý druh *E. micrantha* kvůli malému počtu analyzovaných rostlin. Dále také nebyly zahrnuty odvozené znaky na větvích (NK-NVV, NVV-NMV, NK-N1V) kvůli problémům, které způsobovaly při počítání testu unikátního příspěvku znaků. Při počítání analýzy byly též vyloučeny hybridní populace a jedinci geneticky odlišní od zbytku populace (Kla1/4, Har2, Kru2). Směsné populace *E. stricta* a *E. nemorosa* z Rybárny (Ryb807 a Ryb808) byly rozděleny na subpopulace (Ryb807s, Ryb807n, Ryb808s a Ryb808n) podle výsledků genetických analýz. Diskriminační analýza poměrně dobře odlišila časně kvetoucí typ rostlin ze Šumavy (Obr. 18), zejména na základě úhlu koncového zubu listenu (BAU3; Obr. 19).

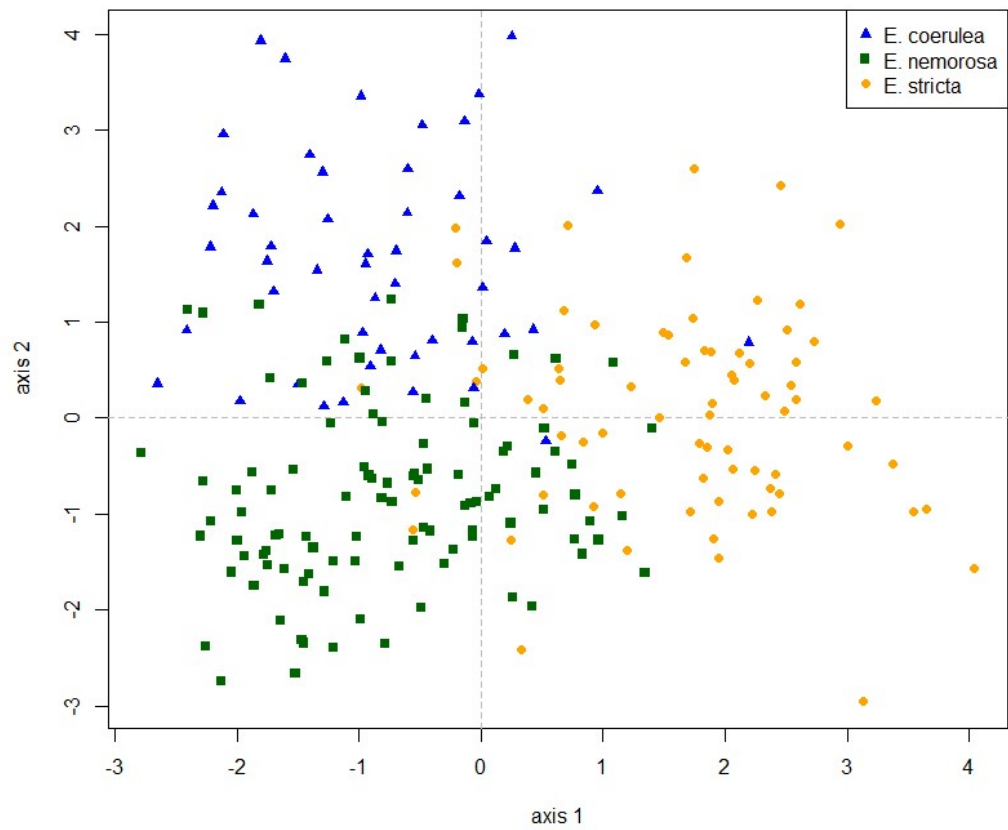


Obr. 18: Výsledek diskriminační analýzy pro šumavský časný typ (*E. casna bc*), *E. coerulea*, *E. nemorosa* a *E. stricta*.

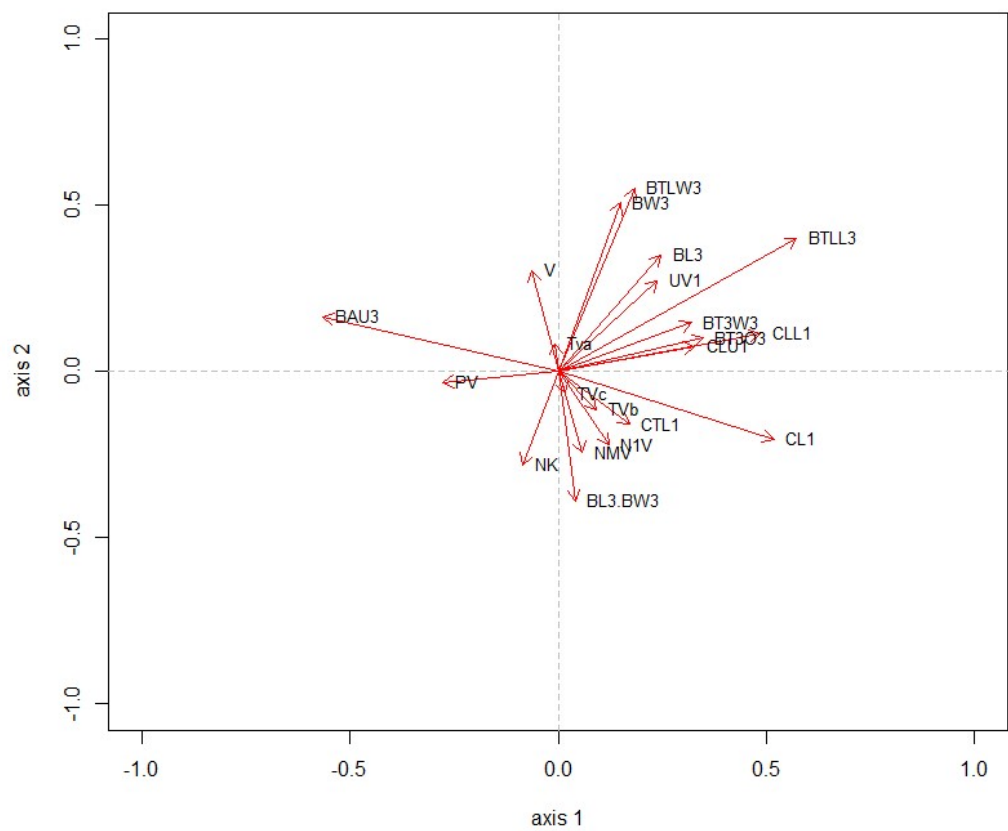


Obr. 19: Korelace znaků s osami diskriminační analýzy pro šumavský časný typ, *E. coerulea*, *E. nemorosa* a *E. stricta*.

Pro hledání znaků nejlépe odlišujících zbylé tři skupiny (*E. coerulea*, *E. stricta*, *E. nemorosa*) byla diskriminační analýza zopakována jen pro tyto tři skupiny, bez časných šumavských rostlin. Výsledek této analýzy je na Obr. 20 a Obr. 21.



Obr. 20: Výsledek diskriminační analýzy *E. coerulea*, *E. stricta* a *E. nemorosa*



Obr. 21: Korelace znaků s osami diskriminační analýzy *E. coerulea*, *E. stricta* a *E. nemorosa*

Z výsledných grafů je zřejmé, že podle první osy se odděluje druh *E. stricta*, zejména na základě délky koruny (CL1) a dolního korunního pysku (CLL1), délky koncového zubu listenu (BTLL3) a úhlu na koncovém zubu listenu (BAU3). Druhá osa odděluje druhy *E. nemorosa* a *E. coerulea*, zejména na základě znaků na koncovém zubu listenu (BTLL3 – délka a BTLW3 – šířka), šířky listenu (BW3 – šířka a BL3.BW3 – poměr délky a šířky) a počtu nodů k prvnímu květu (NK).

Všechny znaky z této analýzy byly dále testovány pro zjištění jejich příspěvku k rozlišení daných skupin (*E. coerulea*, *E. stricta*, *E. nemorosa*). Testovány byly znaky jednotlivě i unikátní příspěvek jednotlivých znaků. Hodnoty těchto testů a průkaznost jednotlivých znaků jsou v Tab. XI.

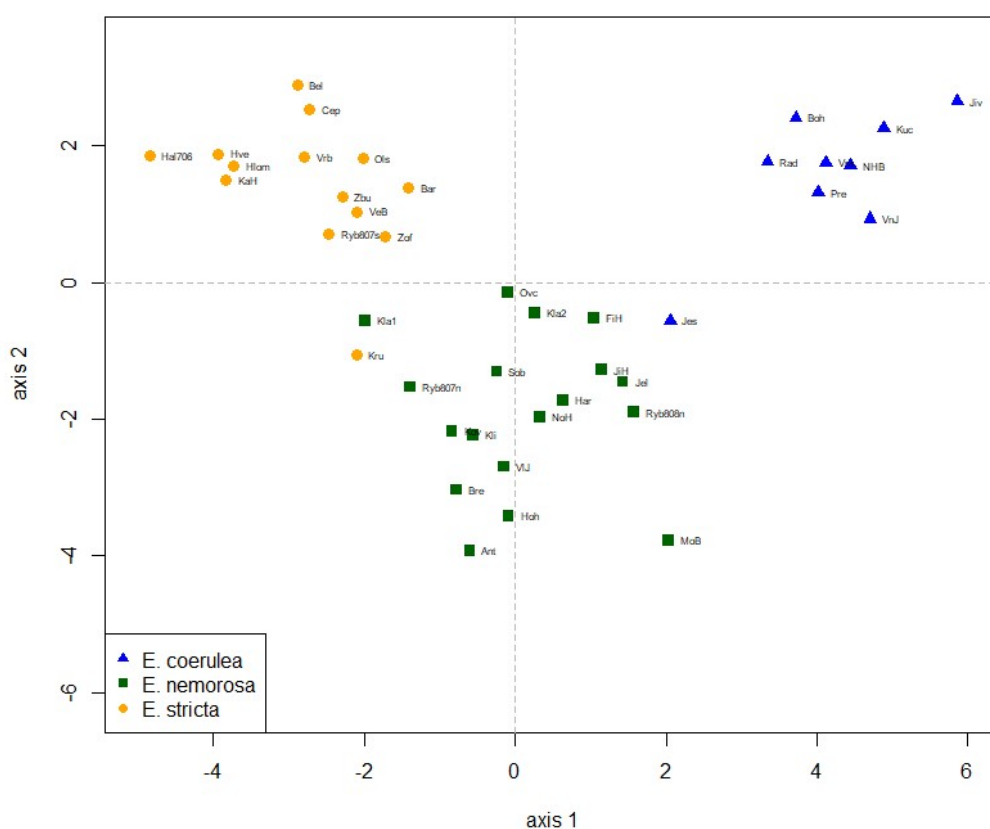
Tab. XI: Průkaznost znaků pro rozlišení skupin v diskriminační analýze *E. coerulea*, *E. stricta* a *E. nemorosa*. Uvedená je hodnota pseudo F-statistiky (F) a hladina signifikance (p) pro znaky samostatně a pro unikátní příspěvek znaků, hodnoty $p < 0,05$ jsou zvýrazněny tučně.

Znak	znaky samostatně		unikátní příspěvek znaků	
	F	p	F	p
CL1	37,3965	0,005	22,05402	0,001
CTL1	7,400591	0,005	4,934114	0,01
CLL1	32,01528	0,005	7,432432	0,001
CLU1	16,80515	0,005	1,611756	0,213
BL3	19,76878	0,005	0,565833	0,556
BW3	26,16291	0,005	0,872162	0,418
BTLW3	30,8264	0,005	2,322381	0,105
BTLL3	50,35674	0,005	0,878738	0,425
BT3W3	15,67107	0,005	7,569836	0,001
BT3O3	17,67741	0,005	4,290585	0,013
BAU3	40,86415	0,005	1,556759	0,217
BL3.BW3	14,60881	0,005	0,457672	0,625
V	8,844987	0,005	5,738703	0,003
NK	8,745575	0,005	0,108146	0,913
N1V	7,162243	0,005	0,644815	0,539
NMV	6,410069	0,01	1,392282	0,25
UV1	15,03724	0,005	8,89918	0,002
Tva	0,71871	0,5	0,047266	0,942
TVb	2,453338	0,095	1,802992	0,173
TVc	0,452105	0,74	0,557587	0,571
PV	10,97478	0,005	0,738482	0,488

Z testu znaků samostatně vychází, že kromě tvaru větví (Tv) mají všechny znaky průkazný vliv na odlišení zkoumaných skupin. Průkazný unikátní příspěvek mají znaky na koruně (CL1, CTL1, CLL1), na listenu (BT3W3, BT3O3) i sezónní znaky (V, UV1).

Při zpětné revizi studovaných položek bylo zjištěno, že pro odlišení druhu *E. coerulea* lze využít i další znaky, které zde nebyly hodnocené, zvláště odění – výrazně štětinaté rostliny, někdy i pozdnějšího charakteru, odpovídají rostlinám určeným na základě analýzy mikrosatelitů jako *E. coerulea*.

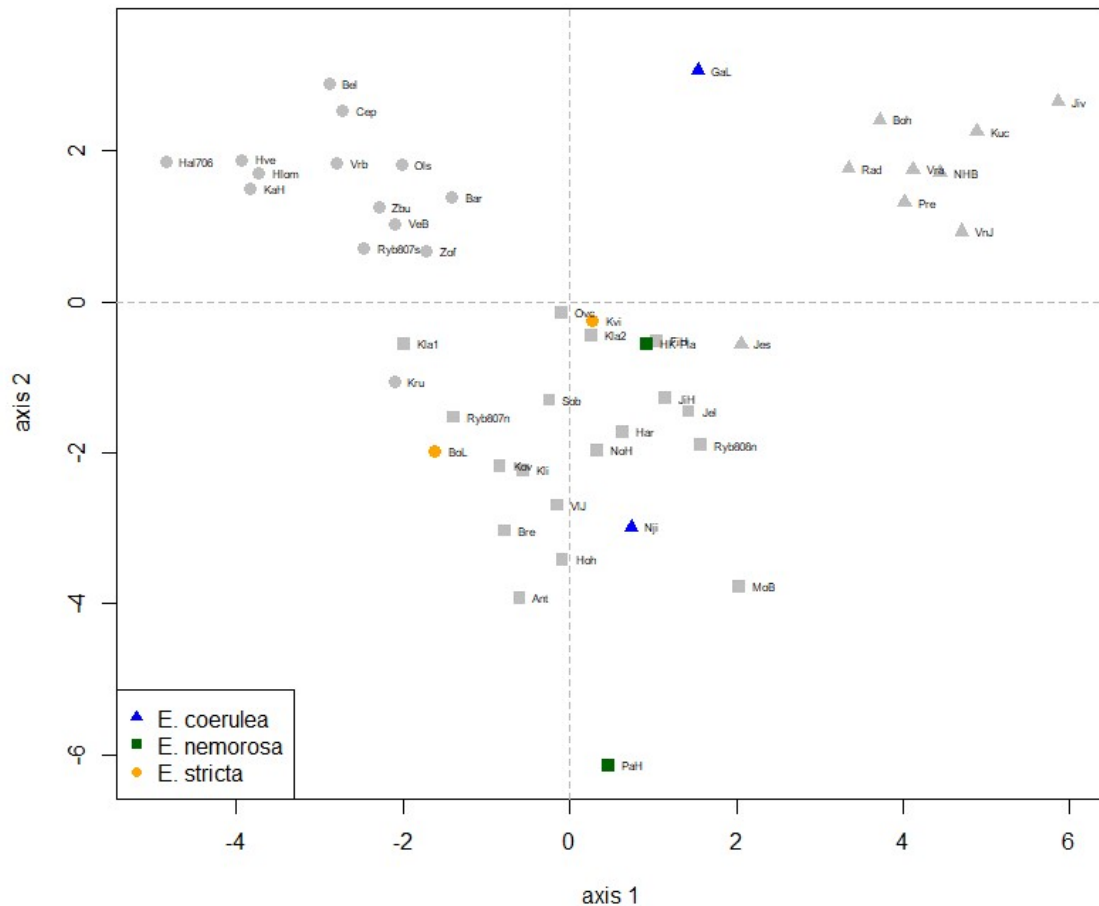
Při použití populačních průměrů již diskriminační analýza sledované druhy odděluje víceméně spolehlivě, viz Obr. 22.



Obr. 22: Výsledek diskriminační analýzy populačních průměrů druhů *E. coerulea*, *E. nemorosa* a *E. stricta*

Z oddělených skupin se vymykají populace Jes a Kru. U populace Kru je podle genetických analýz u některých rostlin část genomu od *E. nemorosa*, daný posun tedy může být daný tímto. Populace Jes je však podle genetických analýz jasná *E. coerulea* a odchylka je tedy pouze morfologická.

Hybridní populace nebyly zahrnuty do počítání diskriminační analýzy, ale byly do ordinačního prostoru zpětně promítnuty (Obr. 23).



Obr. 23: Hybridní populace promítnuté do ordinačního prostoru diskriminační analýzy druhů *E. coerulea*, *E. nemorosa* a *E. stricta*.

Jak je vidět, hybridní populace se chovají různě. Některé jsou svými znaky očekávaně intermediární mezi rodičovskými druhy (GaL), většinou jsou ale morfologicky podobné některému z rodičovských druhů (PaH, NJi, HK-Pla, Kvi, BoL).

4.3.5 Klasifikační diskriminační analýza

Do klasifikační diskriminační analýzy nebyly zahrnuty rostliny odlišného genotypu oproti zbytku populace (Kla1/4, Har2, Kru2) a také populace *E. micrantha* (Hal707). Směsné populace *E. stricta* a *E. nemorosa* z Rybárny (Ryb807 a Ryb808) byly rozděleny na subpopulace (Ryb807s, Ryb807n, Ryb808s a Ryb808n) podle výsledků genetických analýz. Klasifikační diskriminační analýza byla počítána bez znaků na větvích, aby mohly být zahrnuty i rostliny bez větví. Do training setu nebyly zahrnuty hybridní populace (PaH, HK-Pla, NJi, GaL, BoL, Kvi). Výsledek klasifikační diskriminační analýzy pro jednotlivé druhy a časný typ je v Tab. XII.

Tab. XII: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy pro šumavský časný typ (c), *E. coerulea* (co), *E. nemorosa* (n) a *E. stricta* (s), řádky zobrazují skutečnou taxonomickou příslušnost, sloupce pak přiřazení klasifikační diskriminační analýzou, N = celkový počet jedinců v dané skupině.

Taxon	c	co	n	s	N	Úspěšnost (%)
c	32	1	0	1	34	94,12
co	2	84	19	15	120	70
n	0	18	145	15	178	81,46
s	1	7	38	72	118	61,02
Celkem	35	110	202	103	450	74

Zajímavější informaci dává klasifikační diskriminační analýza pro jednotlivé populace (Tab. XIII). Výrazně nízkou úspěšnost klasifikace můžeme vidět u některých hybridních populací (BoL, GaL, Kvi, NJi). Nízkou úspěšnost měly také některé populace *E. stricta* a *E. nemorosa* z Rybárny, kde se vyskytují oba druhy společně a jsou těžko poznatelné. Překvapením je nízká úspěšnost klasifikace u některých populací, které byly v terénu určované s jistotou, zejména Zof a Kru. V obou případech se jedná o populace *E. stricta*. Populace Zof morfologicky odpovídá typům *E. stricta* z Novohradských hor, které jsou mírně odlišné. Ve zkoumaném datasetu však žádná další populace tohoto typu zahrnutá není. V populaci Kru genetické analýzy odhalily jednu rostlinu *E. nemorosa* a několik rostlin se známkami hybridizace. Klasifikovaných jako *E. nemorosa* jich zde však bylo více než kolik bylo podle genetických analýz hybridních.

Tab. XIII: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy pro jednotlivé populace, N = celkový počet zkoumaných jedinců v populaci, zkratky taxonů: c = šumavský časný typ, co = *E. coerulea*, n = *E. nemorosa*, s = *E. stricta*, populace s úspěšností klasifikace $\leq 50\%$ jsou znázorněny tučně.

Populace	Taxon	c	co	n	s	N	Úspěšnost (%)
Ant	n	0	0	15	0	15	100
Bar	s	0	0	1	9	10	90
Bel	s	0	0	0	7	7	100
Boh	co	0	1	0	0	1	100
BoL	s	0	0	9	1	10	10
Bre	n	0	0	5	0	5	100
Cep	s	0	0	1	4	5	80
FiH	n	0	0	10	1	11	90,90909
GaL	co	0	7	0	8	15	46,66667
Hal706	s	0	0	0	5	5	100
Har	n	0	0	4	0	4	100
HK-Pla	n	0	1	4	0	5	80
Hlom	s	0	0	1	9	10	90
Hoh	n	0	0	5	0	5	100

Populace	Taxon	c	co	n	s	N	Úspěšnost (%)
Hve	s	1	0	3	6	10	60
Jel	n	0	3	11	0	14	78,57143
Jes	co	0	6	3	1	10	60
JiH	n	0	1	3	1	5	60
Jiv	co	0	19	0	0	19	100
KaH	s	0	0	0	4	4	100
Kla	n	0	0	9	9	18	50
Kli	n	0	1	8	0	9	88,88889
Kov	n	0	1	8	1	10	80
Kru	s	0	0	7	1	8	12,5
Kuc	co	1	8	0	1	10	80
Kvi	s	0	1	8	1	10	10
MoB	n	0	0	4	0	4	100
NHB	co	0	9	0	1	10	90
Nji	co	0	4	6	0	10	40
NoH	n	0	0	8	1	9	88,88889
Ols	s	0	2	1	7	10	70
Ovc	n	0	6	3	1	10	30
PaH	n	0	0	5	0	5	100
PJP	c	4	1	0	0	5	80
Pre	co	0	4	1	0	5	80
Rad	co	0	13	3	3	19	68,42105
Ryb 384	c	5	0	0	0	5	100
Ryb497	c	5	0	0	0	5	100
Ryb807c	c	6	0	0	1	7	85,71429
Ryb807n	n	0	0	11	1	12	91,66667
Ryb807s	s	0	0	4	4	8	50
Ryb808c	c	12	0	0	0	12	100
Ryb808n	n	0	4	3	0	7	42,85714
Ryb808s	s	0	0	0	1	1	100
Sob	n	0	0	10	0	10	100
UTP	s	0	0	1	1	2	50
VeB	s	0	0	1	3	4	75
VeJ	n	0	1	9	0	10	90
VeP	co	0	1	0	1	2	50
VIJ	n	0	0	10	0	10	100
VnJ	co	0	3	6	0	9	33,33333
Vra	co	1	9	0	0	10	90
Vrb	s	0	0	0	5	5	100
Zbu	s	0	1	0	3	4	75
Zof	s	0	3	1	1	5	20

5 Diskuse

Svobodová (et al. 2016) ve své práci rozlišila tři typy tetraploidních světlíků: časný typ, *E. stricta* a *E. nemorosa*. V této práci, která na zmíněnou studii navazuje, byly zkoumány populace morfologicky nejasné. I tyto populace zachovávají koncept navržený Svobodovou (et al. 2016), a to jak při samostatné analýze, tak při spojení s daty ze zmíněné práce. Bylo tak podpořeno aktuální rozlišování tetraploidních druhů *E. stricta*, *E. nemorosa* a *E. coerulea* na našem území (Štech in Kaplan et al. 2019).

Světlíky jsou mladou skupinou s velmi rychlou a aktivní evolucí (French et al. 2008, Gussarova et al. 2008, Pan et al. 2019, Hartmann et al. 2021). Nové druhy či typy mohou vznikat např. hybridizací (Yeo 1968), nezávislým přechodem k autogamii (Pan et al. 2019) nebo adaptací na lokální ekologické podmínky (Zopfi 1997, 1998). Rychlá selekce ekotypů v závislosti na prostředí je známá např. i u příbuzného rodu *Rhinanthus* (Zopfi 1993). Mezi ekotypy jsou u světlíků rozlišovány zejména dva krajní případy – časné a pozdní typy. Ke vzniku časných typů dochází opakovaně a jsou často vázané na tradičně obhospodařované louky. Při zániku managementu na lokalitě pak jejich populace rychle mizí (Karlsson 1984). V České republice byly časné typy známé např. i v Orlických horách, kde se dnes již nevyskytují (M. Štech, ústní sdělení). Stejně tak aktuálně nejsou známé časné rostliny z Krušných hor, o kterých se v literatuře dosti diskutovalo, ke kterému druhu patří (Smejkal 1963a, Smejkal & Dvořáková 2000, Štech in Kaplan et al. 2019). Jediná populace časných rostlin *E. stricta* v ČR, Zděchov (Svobodová et al. 2016), byla navštívena při sbírání vzorků pro tuto práci, žádné světlíky tam však již nebyly nalezeny. Je tedy zřejmé, že populace časných typů jsou velmi ohrožené kvůli jejich vazbě na ustupující a ohrožené biotopy (Karlsson 1984). Populace šumavských časných rostlin je známá zatím několik let a zůstává otázkou, jaká je její historie i budoucí vývoj.

U většiny časných typů je známá jejich k příbuznost s pozdními typy, ať už jsou hodnoceny v jednom druhu (Karlsson 1984) nebo jako samostatné druhy (Becker 1926, Smejkal 1963a). U světlíků dochází ke vzniku ekotypů stále a opakovaně (Vitek 1998). Důkazem toho jsou i nálezy velmi časných rostlin, někdy definovaných jako samostatné druhy (např. Becker 1926, Smejkal 1963a). Nedávný nový nález časných typů světlíků na Šumavě (Kunzová 2022) tuto rychlou selekci ekotypů zřejmě potvrzuje. Morfologicky se šumavský časný typ liší od časných rostlin *E. coerulea*, které jsou nejběžnějšími světlíky časného typu v ČR. Podle genetických dat se jedná o druh *E. nemorosa*. Nejspíše jde o mladý morfotyp, nově vyselektovaný z místní populace *E. nemorosa* udržovaný místním managementem. Tento

časný typ se totiž nachází povětšinou v blízkosti turistické cesty, jejíž okraje jsou pravidelně sečeny. Jako časný typ od *E. nemorosa* byla Beckerem (1926) popsána *E. preussiana*. Toto označení by tak sedělo na šumavský časný typ nejlépe. Aktuálně ale v Německu, odkud byl tento taxon popsán a udáván, rozlišován není a podobně jako ostatní časné typy je zahrnut v synonymice pozdního typu, tedy *E. nemorosa* (Vitek in Müller et al. 2021). V České republice je aktuálně přijímán stejný druhový koncept jako ve zmíněném Německu, kdy časné a pozdní typy bez dalšího morfologického rozdílu nejsou taxonomicky rozlišovány (Štech in Kaplan et al. 2019). Šumavský časný typ je tedy součástí druhu *E. nemorosa* jako jeho časný typ. Nejvýraznější odlišnosti šumavského časného typu od ostatních populací *E. nemorosa* jsou totiž v počtu nodů k prvnímu květu, ve znacích na zubech listenů a v délce okraje dolního korunního pysku i dalších znacích na květu. Počet nodů je tradičně využívaný znak k rozlišení sezónních typů nejen v rodě *Euphrasia* a u počtu a tvaru zubů na listech a listenech je také u světlíků známá korelace se sezónností (Karlsson 1976, Smejkal & Dvořáková 2000). Tvar a zubatost listů, listenů i velikost květů jsou uváděny jako sezónní znaky i u příbuzných rodů *Rhinanthus* (Zopfi 1995, Skála & Štech 2000) a *Melampyrum* (Štech 1998).

V souladu s aktuálním širokým druhovým konceptem převažujícím ve střední Evropě (Vitek in Müller et al. 2021, Vitek in Fischer et al. 2008, Štech in Kaplan et al. 2019) jsou i výsledky pro druh *E. coerulea*. K tomuto druhu, považovanému za aestivální (Štech in Kaplan et al. 2019), byly v této práci geneticky přiřazeny i rostliny autumnálního charakteru. Přestože je tedy *E. coerulea* v ČR jediným tetraploidním druhem s převahou časných populací, celková sezónní variabilita tohoto druhu zahrnuje i značně pozdní typy převažující u jiných druhů. Podobnou situaci lze pozorovat v rodě *Rhinanthus*. U druhu *R. major* na našem území převažují pozdní typy a časné typy jsou vzácné, podobně jako u *Euphrasia nemorosa* a *E. stricta*. Naopak u druhu *Rhinanthus minor* na našem území převažují časné typy a výrazně pozdní typy jsou vzácné, podobně jako u *Euphrasia coerulea* (Skála & Štech 2000). Sezónní diferenciaci *E. coerulea* zmiňuje už i Svobodová (et al. 2016), ale rozdíly v sezónních znacích zjištěné v této práci jsou ještě výraznější. Všechny sudetské populace řazené k druhu *E. coerulea* jsou pozdního charakteru a stejně tak populace Gru z Beskyd. Na této lokalitě se v době sběru nacházely pouze mladé, nekvetoucí rostliny. Sbírány byly přitom ve stejné době jako rostliny z ostatních populací z Beskyd, které byly tou dobou v plném květu. Geneticky byla tato populace určena jako *E. coerulea* s příměsí *E. nemorosa*. Jedná se zřejmě také o pozdní typ *E. coerulea*, a tedy v současné době o jedinou známou lokalitu pozdní *E. coerulea* v Beskydech.

Protože je sezónní diferenciacce u světlíků velmi nápadná, byla používána jako důležitý diagnostický znak rozlišující jednotlivé druhy (např. Smejkal 1963a) a někdy je mechanicky používána dodnes (Metherell & Rumsey 2018). Jak se ale ukazuje, sezónnost je poměrně proměnlivá a jednotlivé sezónní typy nejsou vždy geneticky podpořeny (kromě této práce i Svobodová et al. 2016). Jak upozorňuje i Vitek (2020), počet nodů k prvnímu květu (typicky používaný pro rozlišení sezónních typů) má tak často jen malý význam pro rozlišení druhů. Sezónní typy je vždy potřeba hodnotit spolu se znalostí jejich genetické podstaty a vzájemného vztahu jednotlivých typů. Počet nodů k prvnímu květu může mít i význam pro rozlišení druhů (Kunzová 2022), zřejmě však mnohem menší, než se dosud předpokládalo. Podobně jako dříve odění (např. Smejkal 1963a), ani sezónnost tak nemůže být brána jako znak taxonomicky významnější než jiné znaky. Rostliny je třeba vždy hodnotit komplexně, na základě kombinace více znaků a hledat taxonomickou strukturu, která je geneticky podpořená. Odchylnost v jednom znaku totiž může rychle vzniknout a zaniknout i v jediné populaci (Vitek 1998).

Morfologické rozdíly mezi druhy *E. stricta*, *E. nemorosa* (Svobodová 2008, 2011), *E. coerulea* (Svobodová et al. 2016) i šumavským časným typem (Kunzová 2022) již byly dříve zkoumány. Z morfologických analýz je tak v této práci nejpodstatnější rozlišení druhu *E. coerulea*, který je zde na základě genetických výsledků šířeji vymezen. Nejlépe ho lze poznat pomocí počtu nodů k prvnímu květu (zejména časné typy) a pomocí znaků na koncovém zubu listenu (BTLL, BTLW) a na listenu (BW, BL/BW). Ve srovnání s aktuálním vymezením (Štech in Kaplan et al. 2019) nelze potvrdit, že se jedná o rostliny obvykle nevětvené nebo jen málo větvené s nejdolejším květem obvykle na 3. – 9. uzlině. Platí ale, že se jedná o rostliny s listy a listeny ± hustě štětinatě chlupatými a často také s krátce stopkatými žlázkami. Na základě tohoto znaku lze rostliny pozdního typu *E. coerulea* vcelku dobře odlišit od podobné *E. nemorosa*. V diplomové práci tento znak hodnocen nebyl, ale při zpětné revizi zkoumaných rostlin se jeví jako spolehlivý. Téměř všechny zkoumané znaky se prokázaly jako užitečné při rozlišování zkoumaných druhů a typů. Jediný znak bez významu byl tvar větvi a jen malý význam měl počet nodů k první větvi a počet větví.

Významným zdrojem variability u světlíků je hybridizace, která je v tomto rodě považována za velmi častou (Wettstein 1896, Yeo 1978), zvláště v místech kontaktu druhů (Vitek 1998). U příbuzného rodu *Rhinanthus* (konkrétně druhů *R. minor* a *R. angustifolius*) bylo zjištěno, že míra hybridizace souvisí s dobou, která uběhla od prvního kontaktu druhů (Ducarme & Wesselingh 2005). Časem totiž může jeden druh v populaci převládnout. Populace pak nese v genomu známky bývalé hybridizace, přestože se již na lokalitě vyskytuje pouze jeden druh (Ducarme & Wesselingh 2005). Různý podíl hybridizace či introgrese byl

pomocí mikrosatelitních markerů zjištěn i u mnoha zkoumaných populací v této práci. Toto zjištění je v rozporu s prací Svobodové (et al. 2016), která zaznamenala u zkoumaných populací malou míru hybridizace. Větší podíl hybridizace byl v této práci při spojení datasetů zjištěn i u některých populací původně zpracovávaných Svobodovou (et al. 2016). [srovnáván byl admixture model Structure analýzy – u Svobodové (et al. 2016) nepublikovaný]. Je tedy možné, že zahrnutí sporných populací v této práci částečně setřelo rozdíly mezi druhy a analýzy pak nevyhází tak přesvědčivě. Rozdíl v míře hybridizace byl u některých populací zaznamenán i mezi analýzami pouze vlastních dat a spojených dat (např. u populace NJi).

Nejvýraznější hybridní populací byla populace z Hradce Králové – Na Plachtě (HK-Pla, Pla). U této populace byly zjištěny genotypy všech tří zkoumaných taxonů (*E. stricta*, *E. nemorosa*, *E. coerulea*). Morfologicky je tato populace blízká druhu *E. nemorosa*, kam byla i s velkou úspěšností zařazena klasifikační diskriminační analýzou. Nabízí se otázka, zda by tato populace nemohla mít vztahy ke čtvrtému tetraploidnímu druhu v ČR – *E. micrantha*, nachází se totiž v nižší nadmořské výšce a některé rostliny se v některých znacích tomuto druhu blíží (rostliny s velmi tenkými větvemi, dlouhými lodyžními články a drobnými květy a listeny, viz Příloha 4). Na této lokalitě se také v minulosti mohl nacházet biotop vhodný pro *E. micrantha*. Metherell & Rumsey (2018) udávají hybridní rostliny mezi *E. nemorosa* a *E. micrantha* jako časté a zmiňuje se o nich i Smejkal & Dvořáková (in Slavík et al. 2000). Proti této teorii se však staví přítomnost genotypu *E. coerulea* v populaci HK-Pla i Pla. V populaci *E. micrantha* (Hal707) byly totiž rozeznány genotypy pouze *E. nemorosa* a *E. stricta*. V současné chvíli s použitými mikrosatelitními markery nelze na otázku příbuznosti populací HK-Pla, Pla a *E. micrantha* spolehlivě odpovědět kvůli malému množství materiálu *E. micrantha*.

Druhou populací, kde byly identifikovány genotypy všech tří taxonů (*E. stricta*, *E. nemorosa*, *E. coerulea*) je populace z Dánska. Analýza hlavních koordinát jí sice přiřadila nejbližší k *E. stricta*, ale s velkým rozmezím variability a mírným překryvem s druhem *E. coerulea*. Je tedy třeba předpokládat, že variabilita *E. stricta* v celém jejím areálu je nejen morfologická (Karlsson 1976, 1984), ale též genetická a výsledky této práce by neměly být příliš zobecňovány nad rámec zkoumaného geografického území.

Další významnou hybridní populací je populace Nad Jizerkou (NJi). Jedná se o hybridní populaci mezi *E. nemorosa* a *E. coerulea*. Tato populace je významná tím, že pochází z Jizerských hor, tedy z oblasti popisu druhu *E. coerulea* (Szelag 2014). Blízko této lokality byla sbírána další populace (JiH), která se zdá být čistou populací druhu *E. nemorosa*. Lze

tedy předpokládat, že v Jizerských horách čistá *E. coerulea* existuje či minimálně existovala v blízké minulosti a pouze se takovou populaci nepodařilo při sběru dat zachytit.

U několika dalších populací (Kvi, Bol, GaL a Kru) bylo zjištění hybridizace překvapením, protože morfologicky tyto populace nebyly považovány za výrazně problematické. Zvláště populace Kru se v terénu jevila jako jasná *E. stricta*. Podle genetických analýz však byla jedna rostlina z této populace přiřazena k druhu *E. nemorosa* a u několika rostlin byla identifikovaná část genomu od *E. nemorosa*. Také klasifikační diskriminační analýza měla u této populace jen malou úspěšnost.

Míra hybridizace udávaná molekulárními analýzami nebyla vždy v souladu s morfologickými charakteristikami populací. Pouze jedna populace (GaL) byla morfologicky intermediární mezi rodičovskými druhy *E. coerulea* a *E. stricta*. Všechny ostatní výrazně hybridní populace (PaH, NJi, HK-Pla, Kvi, BoL) morfologicky spadaly k jednomu z rodičovských druhů, v tomto případě k *E. nemorosa*. Určování druhů pro molekulární analýzy pouze na základě morfologie bez zpětné revize druhového konceptu tak může být velmi problematické. Toto je bohužel případ většiny moderních genetických analýz rodu *Euphrasia* (Wang et al. 2018, Becher et al. 2021, 2022, Brown et al. 2022, Garrett et al. 2022). Nesoulad morfologie a genetické podstaty tak může být jednou z příčin jejich slabého rozlišení na druhové úrovni. Rostliny považované za čistou linii některého druhu v sobě totiž mohou nést část genotypu od jiného druhu (jako např. Kvi, BoL). Naopak rostliny definované morfologicky jako hybridní mohou být pouze morfologickou odchylkou geneticky jinak čistého druhu (jako např. Jes). Zároveň ani u hybridních populací, které jsou morfologicky intermediární, a tedy poznatelné, nelze určit podíl rodičovských genotypů a míru hybridizace. Zkoumání genetické podstaty je tak nutné k pochopení taxonomie a příbuzenských vztahů světlíků (Kolseth & Lönn 2005, Pan et al. 2019, Hartmann et al. 2021). Podobná situace je známá i u příbuzného rodu *Rhinanthus*, kde Ducarme & Wesselingh (2005) upozorňují na morfologickou nerozlišitelnost hybridů.

Snaha zahrnout do studie i čtvrtý tetraploidní druh ČR nebyla příliš úspěšná. *E. micrantha* byla nalezena pouze na jedné lokalitě a na výsledky tedy neměla téměř žádný vliv. Neověření výskytu i na poměrně recentních lokalitách v okolí Staňkova na Třeboňsku a Horní Lhoty na Jindřichohradecku (Pladias – Chytrý et al. 2021, Wild et al. 2019) tak pouze ukazuje, že tento druh je u nás bezprostředně ohrožen vyhynutím.

6 Závěr

Tato diplomová práce navazuje na výzkum tetraploidních populací rodu *Euphrasia* zpracovaný Š. Svobodovou (et al. 2016) a doplňuje data o morfologicky problematických populacích z ČR. Morfologicky nejasné populace zapadají do konceptu navrženého Svobodovou (et al. 2016). Byly identifikované tři genetické skupiny odpovídající druhům *E. coerulea*, *E. nemorosa* a *E. stricta*. U druhu *E. coerulea* byla zjištěna větší sezónní variabilita než bylo dosud předpokládáno. Jako *E. coerulea* byly genetickými analýzami označeny i rostliny autumnálního charakteru. Tato práce tedy ukazuje na menší význam sezónnosti při rozlišování druhů světlíků. I v pojetí, které zahrnuje časně i pozdní typy se ale dá *E. coerulea* morfologicky poznat, zejména podle znaků na listenech a v odění.

Molekulárními analýzami bylo potvrzeno, že šumavský časný typ patří k druhu *E. nemorosa*, jak bylo navrženo v bakalářské práci (Kunzová 2022). Morfologicky je však unikátní a odlišný od pozdních typů *E. nemorosa*. Od časných typů *E. coerulea* se šumavský časný typ liší geneticky i morfologicky.

Ve zkoumaném území byly detekované některé významné hybridní populace. Morfologicky byly tyto populace většinou více podobné jednomu z rodičovských druhů a jen zřídka byly morfologicky intermediární.

Z několika území ČR byly doplněny geneticky podpořené údaje o výskytu jednotlivých druhů a v Jeseníkách byl poprvé potvrzen výskyt druhu *E. nemorosa*. Současný výskyt druhu *E. micrantha* byl potvrzen pouze na jedné lokalitě.

7 Seznam použité literatury

- Becker W. (1926) Die Vorsommerform der *Euphrasia nemorosa* Pers. – Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis. Centralblatt für Sammlung und Veröffentlichung von Einzeldiagnosen neuer Pflanzen. [Edited by Friedrich Fedde] 22: 303.
- Becher H., Powell R. F., Brown M. R., Metherell C., Pellicer J., Leitch I. J. & Twyford A. D. (2021) The nature of intraspecific and interspecific genome size variation in taxonomically complex eyebrights. – *Annals of Botany* 128: 639–651.
- Becher H., Sampson J. & Twyford A. D. (2022) Measuring the Invisible: The Sequences Causal of Genome Size Differences in Eyebrights (*Euphrasia*) Revealed by k-mers. – *Frontiers in Plant Science* 13:818410.
- Brown M. R., Frachon N., Wong E. L. Y., Metherell C. & Twyford A. D. (2020) Life history evolution, species differences, and phenotypic plasticity in hemiparasitic eyebrights (*Euphrasia*). – *American Journal of Botany* 107(3): 1–10.
- Brown M. R., Moore P. G. P. & Twyford A. D. (2021) Performance of generalist hemiparasitic *Euphrasia* across a phylogenetically diverse host spectrum. – *New Phytologist* 232(5):2165–2174.
- Brown M. R., Becher H., Williams S., & Twyford A. D. (2022) Is there hybridization between diploid and tetraploid *Euphrasia* in a secondary contact zone? – *American Journal of Botany* 110: e16100.
- Ducarme V. & Wesselingh R. A. (2005) Detecting hybridization in mixed populations of *Rhinanthus minor* and *Rhinanthus angustifolius*. – *Folia Geobotanica* 40: 151–161.
- Ducarme V., Vrancken J. & Wesselingh R. A. (2010) Hybridization in Annual Plants: Patterns and Dynamics During a Four-Year Study in Mixed *Rhinanthus* Populations. – *Folia Geobotanica* 45: 387–405.
- Dvořáková M. (1999) *Euphrasia corcontica*, eine endemische Art aus dem Gebirge Krkonoše (Riesengebirge, Westsudeten). – *Preslia* 71: 33–35.
- Ehrich D. 2006. AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. – *Molecular Ecology Notes* 6: 603–604.

- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. – *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Falush D., Stephens M., & Pritchard J. K. (2003) Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. – *Genetics* 164:1567–1587.
- Falush D., Stephens M., & Pritchard J. K. (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. – *Molecular Ecology Notes* 7:574– 578.
- Fischer M. A., Oswald K., & Adler W. (2008) *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol*. Ed. 3. – Land Oberösterreich, OÖ Landesmuseen, Linz.
- French G. C., Hollingsworth P. M. & Ennos R. A. (2003) Isolation of polymorphic microsatellite markers for British *Euphrasia* L. – *Molecular Ecology Notes* 3: 626–628.
- French G. C., Ennos R. A., Silverside A. J. & Hollingsworth P. M. (2005) The relationship between flower size, inbreeding coefficient and inferred selfing rate in British *Euphrasia* species. – *Heredity* 94(1): 44–51.
- French G. C., Hollingsworth P. M., Silverside A. J. & Ennos R. A. (2008) Genetics, taxonomy and the conservation of British *Euphrasia*. – *Conservation Genetics* 9:1547–1562.
- Garrett P, Becher H, Gussarova G, dePamphilis C. W., Ness R. W., Gopalakrishnan S. & Twyford A. D. (2022) Pervasive Phylogenomic Incongruence Underlies Evolutionary Relationships in Eyebrights (*Euphrasia*, *Orobanchaceae*). – *Frontiers in Plant Science* 13:869583.
- Gómez J. M. (2002) Self-pollination in *Euphrasia willkommii* Freyn (*Scrophulariaceae*), an endemic species from the alpine of the Sierra Nevada (Spain). – *Plant Systematics and Evolution* 232: 63–71.
- Gussarova G., Popp M., Vitek E. & Brochmann C. (2008) Molecular phylogeny and biogeography of the bipolar *Euphrasia* (*Orobanchaceae*): Recent radiations in an old genus. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(2): 444–460.
- Hartmann J., Silbernagl L., Schneeweiss G. M., Barfuss M. H. J., Weiss-Schneeweiss H. & Schönswetter P. (2021) *Euphrasia ultima*, a new locally endemic diploid species from the Ortler/Ortles range (Italy), is a close relative of widespread allotetraploid *E.minima*. – *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*.

- Chytrý M., Danihelka J., Kaplan Z., Wild J., Holubová D., Novotný P., Řezníčková M., Rohn M., Dřevojan P., Grulich V., Klimešová J., Lepš J., Lososová Z., Pergl J., Sádlo J., Šmarda P., Štěpánková P., Tichý L., Axmanová I., Bartušková A., Blažek P., Chrtek J. Jr., Fischer F. M., Guo W.-Y., Herben T., Janovský Z., Konečná M., Kühn I., Moravcová L., Petřík P., Pierce S., Prach K., Prokešová H., Štech M., Těšitel J., Těšitelová T., Večeřa M., Zelený D. & Pyšek P. (2021) Pladias Database of the Czech Flora and Vegetation. – Preslia 93: 1–87.
- Jonstrup A., Hedrén M. & Andersson S. (2016) Host environment and local genetic adaptation determine phenotype in parasitic *Rhinanthus angustifolius*. – Botanical Journal of the Linnean Society 180: 89–103.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds). (2019) Klíč ke květeně České republiky, Ed. 2, Academia, Praha.
- Karlsson T. (1976) *Euphrasia* in Sweden: hybridization, parallelism and species concept. – Botaniska Notiser 129: 49–60.
- Karlsson T. (1984) Early-flowering taxa of *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*) on Gotland, Sweden. – Nordic Journal of Botany 4: 303–326.
- Kolseth A. K. & Lönn M. (2005) Genetic structure of *Euphrasia stricta* on the Baltic island of Gotland, Sweden. – Ecology 86: 443–452.
- Koutecký P., Tuleu G., Bad'urova T., Košnar J., Štech M. & Těšitel J. (2012) Distribution of cytotypes and seasonal variation in the *Odontites vernus* group in central Europe. – Preslia 84: 887–904.
- Koutecký P. (2015) MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. – Plant Systematics and Evolution 301: 1115–1121.
- Krok T., Almqvist S., Jonsell L., Jonsell B. (2013) Svensk flora. Fanerogamer och kärlkryptogamer. 29th Ed. Stockholm, Liber AB.
- Kunzová P. (2022) Sezónní proměnlivost druhů *Euphrasia stricta* a *Euphrasia nemorosa* na Šumavě a v Předšumaví. [Seasonal variation of *Euphrasia stricta* and *Euphrasia nemorosa* in Šumava and its foothill. Bc. Thesis, in Czech] – 51p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

- 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 Systematics and Evolution* 255: 193–214.
- Liebst B. (2008) Do they really hybridize? A field study in artificially established mixed populations of *Euphrasia minima* and *E. salisburgensis* (*Orobanchaceae*) in the Swiss Alps. – *Plant Systematics and Evolution* 273: 179–189.
- Metherell C. & Rumsey F. J. (2018) *Eyebrights (Euphrasia) of the UK and Ireland*. – BSBI Handbook No. 18, Bristol.
- Müller F., Ritz C. M., Welk E., & Wesche K. (Eds). (2021) *Rothmaler - Exkursionsflora von Deutschland. Gefäßpflanzen: Grundband. Ed. 22*. – Springer Spektrum.
- Pan D., Schönswetter P., Moser T., Vitek E. & Schneeweiss G. M. (2019) Ancestral remnants or peripheral segregates? Phylogenetic relationships of two narrowly endemic *Euphrasia* species (*Orobanchaceae*) from the eastern European Alps. – *AoB PLANTS* 11: plz007.
- Pladias – databáze české flóry a vegetace, www.pladias.cz, přístup 7. 4. 2024.
- Posz E. (2014) Rodzaj *Euphrasia* L. w Polsce. Taksonomia i rozmieszczenie. (Genus of *Euphrasia* L. in Poland. Taxonomy and distribution).
- Posz E. (2017) *Euphrasia corcontica* (*Orobanchaceae*) — Is it Really Extinct? – *Annales Botanici Fennici* 54(1–3): 131-134.
- POWO (2024) "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/>, Retrieved 14 March 2024."
- Pritchard J. K., Stephens M., & Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. – *Genetics* 155: 945–959.
- R Core Team (2020) *R: A language and environment for statistical computing*. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org/>.
- RStudio Team (2021) *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, PBC, Boston, MA, <http://www.rstudio.com/>.
- Schlüter P. M. & Harris S. A. (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. – *Molecular Ecology Notes* 6: 569-572.

- Schneider C., Rasband W. & Eliceiri K. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. – *Nature Methods* 9: 671–675.
- Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. – *Nature Biotechnology* 18: 233–234.
- Skála Z. & Štech M. (2000) *Rhinanthus* L. – kokrhel. – In: Slavík B., Chrtek J. jun. & Štěpánková J. (eds), *Květena České republiky* 6, p. 462–471, Academia, Praha.
- Smejkal M. (1963a) Taxonomické studie československých druhů rodu *Euphrasia* L. – *Biologické práce, Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied, Bratislava* 9 (9): 1–83.
- Smejkal M. (1963b) Zum Problem der Art, Entstehung und taxonomischen Bewertung der Saisonvikaristen in der Gattung *Euphrasia*. – *Spisy Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně, Brno* 442: 169–193.
- Smejkal M. & Dvořáková M. (2000) *Euphrasia* L. – světlík. – In: Slavík B., Chrtek J. jun. & Štěpánková J. (eds), *Květena České republiky* 6, p. 430–449, Academia, Praha.
- Snogerup B. (1982) Host influence on northwest European taxa of *Odontites* (*Scrophulariaceae*). – *Annales Botanici Fennici*, 19(1), 17–30.
- Stace C. A., Preston C. D. & Pearman D. A. (2015) *Hybrid flora of the British Isles*, Botanical Society of Britain & Ireland, Bristol.
- 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.
- Svobodová Š. (2011) Morfologická a genetická diferenciacie druhů *Euphrasia stricta* a *E. nemorosa*. [Morphological and genetical differentiation of species *Euphrasia stricta* and *Euphrasia nemorosa*. Mgr. Thesis, in Czech] – 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Svobodová Š., Košnar J., Koutecký P. & Štech M. (2016) Microsatellite analysis of four similar *Euphrasia* (*Orobanchaceae*) species changes the traditional view of this group. – *Plant Ecology and Evolution* 149(1): 45–58.
- Szeląg Z. (2014) Nomenclatural notes on *Euphrasia coerulea* Tausch (*Orobanchaceae*). – *Phytotaxa* 166: 160–162.

- Štech M. (1998) Variabilita vybraných znaků druhů sekce *Laxiflora* (Wettstein) Soó 1927 a revize rodu *Melampyrum* L. v České republice. – Doktorská disertační práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- Štech M. (2000) Seasonal variation in *Melampyrum nemorosum*. – *Preslia* 72: 345–368.
- Tausch I. F. (1834) *Plantae selectae Florae bohemicae*, fasc. secundus. – *Flora* 17: 444–447.
- Vitek E. (1998) Are the taxonomic concepts of agamospermous genera useful for autogamous groups – a critical discussion using the example of *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*). – *Folia Geobotanica* 33:349–352.
- Vitek E. (2020) Book review: Metherell C. & Rumsey F. J., *Eyebrights (Euphrasia) of the UK and Ireland*. – *Willdenowia* 50: 77–78.
- Wang K.-H., Wu M.-J., Chiang T.-Y., Chou C.-H. (2009) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite DNA markers for *Euphrasia nankotaizanensis* (*Orobanchaceae*) and cross amplification in another *Euphrasia* L. – *Conservation Genetics* 10: 1163–1165.
- Wang X., Gussarova G., Ruhsam M., de Vere N., Metherell C., Hollingsworth P. M. & Twyford A. D. (2018) DNA barcoding a taxonomically complex hemiparasitic genus reveals deep divergence between ploidy levels but lack of species-level resolution. *AoB PLANTS* 10: ply026.
- Werner O., Ros R. M. & Guerra J. (2002) Direct amplification and NaOH extraction: two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). – *Journal of Bryology* 24: 127–131.
- Wettstein R. (1895) Der Saison-Dimorphismus als Ausgangspunkt fuer die Bildung neuer Arten im Pflanzenreiche. – *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 13: 303–313.
- Wettstein R. (1896) *Monographie der Gattung Euphrasia*, Leipzig.
- Wettstein R. (1901) Descendenztheoretische Untersuchungen. I. Untersuchungen über den Saisondimorphismus im Pflanzenreiche. – *Denkschriften der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften* 70:305–346.
- Wild J., Kaplan Z., Danihelka J., Petřík P., Chytrý M., Novotný P., Rohn M., Šulc V., Brůna J., Chobot K., Ekrt L., Holubová D., Knollová I., Kocián P., Štech M., Štěpánek J. &

- Zouhar V. (2019) Plant distribution data for the Czech Republic integrated in the Pladias database. – *Preslia* 91: 1–24.
- Wilkins D. (1963) Plasticity and establishment in *Euphrasia*. – *Annals of Botany* 27: 533–552.
- Yeo P. F. (1954) The cytology of British species of *Euphrasia*. – *Watsonia* 3:101-108.
- Yeo P. F. (1966) The breeding relationships of some european *Euphrasiae*. – *Watsonia* 6:216-245.
- Yeo P. F. (1968) The evolutionary significance of the speciation of *Euphrasia* in Europe. – *Evolution* 22(4):736–747.
- Yeo P. F. (1978) A taxonomic revision of *Euphrasia* in Europe – *Botanical Journal of the Linnean Society* 77: 223–334.
- Zopfi H.-J. (1993) Ecotypic variation in *Rhinanthus alectorolophus* (Scopoli) Pollich (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management: I. Morphological delimitations and habitats of seasonal ecotypes. – *Flora* 188: 15–39.
- Zopfi H.-J. (1995) Life history variation and infraspecific heterochrony in *Rhinanthus glacialis* (*Scrophulariaceae*). – *Plant Systematics and Evolution* 198:209-233.
- Zopfi H.-J. (1997) Ecotypic variation of *Euphrasia rostkoviana* Hayne (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management. – *Flora* 192: 279–195.
- Zopfi H.-J. (1998) Life-history variation among populations of *Euphrasia rostkoviana* Hayne (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management. – *Biological Journal of the Linnean Society* 64(2): 179–205.

8 Přílohy

Příloha 1: Seznam nových lokalit, N_{SSR} = počet rostlin analyzovaný pomocí mikrosatelitních markerů, N_{MORFO} = počet rostlin analyzovaných morfometricky, Druh = druhové určení na základě výsledků genetických analýz.

Název lokality	Zkratka	Souřadnice	Nadmořská výška (m)	Datum	Druh	N_{SSR}	N_{MORFO}
Velký Javor	VeJ	49.0983700N, 13.1343600E	1210	02.08.2022	<i>E. nemorosa</i>	5	10
Nová Huť	NoH	50.8292167N, 14.5730333E	510	19.07.2023	<i>E. nemorosa</i>	10	10
Kovářská	Kov	50.4300500N, 13.0403000E	850	19.07.2023	<i>E. nemorosa</i>	10	10
Klíny	Kli	50.6601900N, 13.5424500E	820	19.07.2023	<i>E. nemorosa</i>	10	10
Jelení 1	Jel1	50.3994500N, 12.6469833E	920	19.07.2023	<i>E. nemorosa</i>	5	5
Jelení 2	Jel2	50.3969000N, 12.6302000E	940	19.07.2023	<i>E. nemorosa</i>	5	10
Kladské sedlo 1	Kla1	50.2182800N, 16.9241700E	735	19.08.2023	<i>E. nemorosa</i>	5	10
Kladské sedlo 2	Kla2	50.2162400N, 16.9220300E	700	19.08.2023	<i>E. nemorosa</i>	5	10
Sobíňov	Sob	49.6957833N, 15.7623667E	520	20.08.2023	<i>E. nemorosa</i>	10	10
Ovčárna	Ovc	50.0706900N, 17.2395500E	1300	24.08.2023	<i>E. nemorosa</i>	10	10
Šerlich	Serlich	50.3233800N, 16.3906400E	990	03.09.2015	<i>E. nemorosa</i>	3	0
Harrachov	Har	50.7949000N, 15.4281500E	930	18.07.2023	<i>E. nemorosa</i>	5	5
Hradec Králové - Na Plachtě	HK-Pla	50.1869600N, 15.8587200E	240	25.07.2022	<i>E. nemorosa</i>	6	6
Na Plachtě	Pla	50.1869600N, 15.8587200E	240	16.10.2017	<i>E. nemorosa</i>	3	0
Jizerka - před hospodou (pastvina)	JiH	50.8182000N, 15.3455400E	865	18.07.2023	<i>E. nemorosa</i>	5	5
Nad Jizerkou	NJi	50.8325333N, 15.3517667E	940	18.07.2023	<i>E. coerulea</i>	10	10
Vysoké nad Jizerou	VnJ	50.6925167N, 15.3934500E	700	18.07.2023	<i>E. coerulea</i>	10	10
Ještěd	Jes	50.7348333N, 14.9989167E	720	18.07.2023	<i>E. coerulea</i>	10	10
Nad Hřiběcí boudou	NHB	50.6829167N, 15.6266000E	870	18.07.2023	<i>E. coerulea</i>	10	10
Radvanice	Rad	50.5680000N, 16.0504900E	550	25.07.2022	<i>E. coerulea</i>	5	10
Radvanice - sjezdovka	Rad-sj	50.5682600N, 16.0446500E	565	25.07.2022	<i>E. coerulea</i>	5	10

Jívka	Jiv	50.6072700N, 16.0966900E	585	25.07.2022	<i>E. coerulea</i>	5	10
Jívka - na kopci	Jiv-kop	50.6034100N, 16.0912900E	640	25.07.2022	<i>E. coerulea</i>	5	10
Bohdašín	Boh	50.6004400N, 16.2131000E	480	25.07.2022	<i>E. coerulea</i>	3	1
Malá Vranča	Vra	49.3088333N, 18.2096000E	650	10.06.2023	<i>E. coerulea</i>	10	10
Přelač	Pre	49.5144000N, 18.6444500E	810	10.06.2023	<i>E. coerulea</i>	5	5
Velký potok	VeP	49.4757167N, 18.4123333E	550	10.06.2023	<i>E. coerulea</i>	2	2
Gruň	Gru	49.4885333N, 18.4837833E	810	10.06.2023	<i>E. coerulea</i>	5	0
U Kučků	Kuc	49.2382167N, 18.0487667E	650	09.06.2023	<i>E. coerulea</i>	10	10
Galovské lúky 1	GaL1	49.2777500N, 18.1247667E	750	09.06.2023	<i>E. coerulea</i>	10	10
Galovské lúky 2	GaL2	49.2764333N, 18.1320833E	710	09.06.2023	<i>E. coerulea</i>	5	5
Krupka	Kru	50.6775167N, 13.8366667E	290	19.07.2023	<i>E. stricta</i>	10	10
Žofinka	Zof	48.8116792N, 14.8893603E	470	18.07.2023	<i>E. stricta</i>	5	5
Bartoušov	Bar	49.5760833N, 15.6397667E	440	20.08.2023	<i>E. stricta</i>	10	10
Hvězda	Hve	50.0640500N, 17.3001300E	730	24.08.2023	<i>E. stricta</i>	10	10
Horní Lomná	HLom	49.5358700N, 18.6386400E	570	23.08.2023	<i>E. stricta</i>	10	10
Šerák (Jeseníky)	Serak	50.1866100N, 17.1088700E	1325	16.08.2023	<i>E. stricta</i>	5	0
Olešnice v Orlických horách	Orlic	50.3616400N, 16.3467000E	890	10.09.2016	<i>E. stricta</i>	4	0
severní Dánsko, Skagen	Dansko	57.7426600N, 10.6344300E	10	06.08.2023	<i>E. stricta</i>	5	0
Halámky	Hal707	48.8294200N, 14.9602400E	475	20.07.2021	<i>E. micrantha</i>	5	5

Příloha 2: Seznam lokalit z bakalářské práce (Kunzová 2022).

Zkratka	Popis lokality	Souřadnice	Přítomné druhy	Nadmořská výška (m. n. m.)	Datum	Počet analyzovaných rostlin
Ryb	Modrava: okraj cesty v údolí Roklanského potoka 450 m Z turistického rozcestí Rybárna asi 2.35 km SZ od soutoku Roklanského a Modravského potoka na Modravě	49.03486N, 13.46805E	časný typ	1010	25. 06. 2020	5
Ryb497	Modrava: okraj cesty v údolí Roklanského potoka 50 m JV turistického rozcestí Rybárna asi 1.93 km SZ od soutoku Roklanského a Modravského potoka na Modravě	49.03486N, 13.47468E	časný typ	1000	02. 07. 2021	5
PJP	Modrava: okraj cesty nad údolím Javořího potoka 2780 m Z od turistického rozcestí Rybárna asi 4.55 km ZSZ od soutoku Roklanského a Modravského potoka na Modravě	49.03563N, 13.43611E	časný typ	1050	02. 07. 2021	5
Ryb807	Modrava: okraj cesty v údolí Roklanského potoka 870 m Z turistického rozcestí Rybárna asi 2.69 km ZSZ od soutoku Roklanského a Modravského potoka na Modravě	49.03396N, 13.46217E	<i>E. stricta</i> (10), <i>E. nemorosa</i> (10), časný typ (10)	1010	02. 07. 2021, 23. 07. 2021, 17. 8. 2021	30
Ryb808	Modrava: okraj cesty v údolí Roklanského potoka 1070 m Z turistického rozcestí Rybárna asi 2.84 km ZSZ od soutoku Roklanského a Modravského potoka na Modravě	49.03350N, 13.45972E	<i>E. stricta</i> (10), časný typ (13), <i>E. nemorosa</i> (3)	1010	25. 06. 2020, 18. 09. 2020, 02. 07. 2021, 23. 07. 2021, 17. 08. 2021	22 na morfometriku, 26 na analýzu mikrosatelitů
Ant	Antýgl: okraj cesty se žlutou turistickou značkou nad údolím Hamerského potoka 460 m JV od mostu přes Vydru v severní části enklávy Antýgl	49.05676N, 13.51536E	<i>E. nemorosa</i>	960	15. 09. 2020, 23. 07. 2021, 17. 08. 2021	15
MoB	Modrava: okraj cesty podél Modravského potoka 710 m SZ od turistického rozcestí "Na ztraceném" ca 4.16 JJZ od soutoku Roklanského a Modravského potoka na Modravě	48.98818N, 13.48554E	<i>E. nemorosa</i>	1080	16. 09. 2020	5
FiH	Filipova Huť: okraj cesty ca 190 m S od křižky ve středu obce	49.03207N, 13.52133E	<i>E. nemorosa</i>	1125	17. 09. 2020, 23. 07. 2021, 17. 08. 2021	15
PaH	Železná Ruda: dno opuštěného lomu u bývalé Pamferovy Huti ca 1.6 km JZ od křižovatky Gerlova Huť	49.15408N, 13.26359E	<i>E. nemorosa</i>	900	09. 09. 2020	5

Hoh	Nová Hůrka: okraj cesty jižně od samoty Höhal 2.16 km VSV od křižovatky v obci	49.15345N, 13.35443E	<i>E. nemorosa</i>	860	09. 09. 2020	5
VIJ	Vlčí Jámy: zarůstající plochy po těžbě rašeliny 210 m V od kříže v obci	48.92024N, 13.78005E	<i>E. nemorosa</i>	775	23. 07. 2021, 17. 08. 2021	10
Bre	Modrava: okraj cesty u soutoku Modravského a Černožského potoka ca 1.75 km JJ(V) od soutoku Roklanského a Modravského potoka na Modravě	49.00957N, 13.50159E	<i>E. nemorosa</i>	1010	17. 08. 2021	5
UTP	Kvilda: okraj cesty nad Teplou Vltavou ca 3.68 km JJZ od kostela v obci	48.98935N, 13.55847E	<i>E. stricta</i>	1125	17. 09. 2020	5
BoL	Borová Lada: stará cesta u cesty z Borových Lad na Knížecí Pláně ca 3.25. km JJZ od středu obce	48.96676N, 13.63332E	<i>E. stricta</i>	990	23. 07. 2021, 17. 08. 2021	10
Kvi	Kvilda: cesta nad údolím Teplé Vltavy ca 1010 m JZ od kostela v obci	49.01246N, 13.57030E	<i>E. stricta</i>	1080	23. 07. 2021, 17. 08. 2021	10
Ols	Nové Hutě: okraj cesty nad pramennou oblastí potoka Olšinka ca 3.26 Z od kostela v obci	49.03621N, 13.60177E	<i>E. stricta</i>	1120	23. 07. 2021, 17. 08. 2021	10
Vrb	Vrbno: lada jižně od lesíka ca 1.27 km SSZ od kaple v obci	49.41272N, 13.79852E	<i>E. stricta</i>	480	27. 07. 2020	5
Bel	Bělčice: úpatí zarostlých lad ca 1 km Z od kostela v obci	49.50234N, 13.86330E	<i>E. stricta</i>	500	27. 07. 2020	8
Cep	Čepice: dno starého lomu ca 360 m ZSZ od kaple v obci	49.26920N, 13.58959E	<i>E. stricta</i>	470	27. 07. 2020	5
VeB	Bližná: okraj lesní cesty přes PP Velké Bahno ca 1.1 km JJV od autobusové zastávky v obci	48.71273N, 14.10272E	<i>E. stricta</i>	760	26. 07. 2020	4
Zbu	Rovná: lada na západním úpatí pahorku Zbuš ca 950 m SZ od kaple v obci	49.29222N, 13.94419E	<i>E. stricta</i>	430	27. 07. 2020	5
KaH	Kašperské Hory: okraj cesty v SZ části Šibeničního vrchu ca 950 m Z(J)Z od kostela ve městě	49.14252N, 13.54283E	<i>E. stricta</i>	800	17. 08. 2021	5
Hal	Halámky: staré dráty podél cesty nedaleko Halámeckého potoka 1.18 m SZ od hraničního přechodu Halámky/Nagelberg	48.83106N, 14.95885E	<i>E. stricta</i>	475	20. 07. 2021	5

Příloha 3: Seznam lokalit z práce Š. Svobodové (et al. 2016), Spec. prelim. = původní druhové určení, Genet. group = genetická skupina podle výsledků z programu STRUCTURE, N = počet studovaných jedinců z populace.

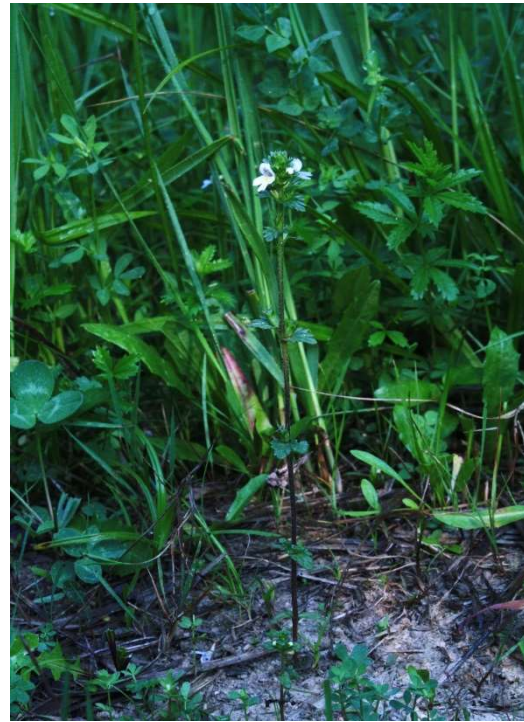
Spec. prelim.	Genet. group	Pop ID	Country	Population	Latitude	Longitude	Altitude (m)	N
<i>E. stricta</i>	<i>E. stricta</i>	MED	Czech Republic	Měděnec	50°25'28.5"N	13°06'40.8"E	905	10
<i>E. stricta</i>	<i>E. stricta</i>	BER	Czech Republic	Beroun	49°58'25.1"N	14°04'59.8"E	280	10
<i>E. stricta</i>	<i>E. stricta</i>	STUD	Czech Republic	Studánky	48°35'24.9"N	14°18'51.0"E	750	10
<i>E. stricta</i>	<i>E. stricta</i>	POP	Slovakia	Popradské pleso	49°07'24.6"N	20°04'28.6"E	1240	10
<i>E. stricta</i>	<i>E. stricta</i>	PODB	Slovakia	Podbanské	49°09'28.5"N	19°55'28.3"E	990	10
<i>E. stricta</i>	<i>E. stricta</i>	SKO	Czech Republic	Skoupý	49°34'56.2"N	14°20'51.6"E	545	10
<i>E. stricta</i>	<i>E. stricta</i>	RANA	Czech Republic	Raná	50°24'38.7"N	13°46'23.3"E	340	10
<i>E. stricta</i>	<i>E. stricta</i>	WBW	Austria	Weinsberger Wald	48°26'24.6"N	14°43'29.3"E	660	10
<i>E. stricta</i>	<i>E. stricta</i>	HAVR	Czech Republic	Havraníky	48°49'01.8"N	16°00'36.3"E	315	5
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. stricta</i>	VO	Czech Republic	Lužnice	49°03'46.8"N	14°48'09.3"E	445	10
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	VLH2	Czech Republic	Velká Lhota 2	49°08'35.3"N	15°19'34.3"E	470	5
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	KLI	Czech Republic	Klínovec	50°23'47.0"N	12°58'15.7"E	1210	10
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	MIS	Czech Republic	Horní Mísečky	50°44'0.8"N	15°34'09.8"E	1000	10
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	HMCP	Czech Republic	Medvědín - late flow.	50°44'0.8"N	15°34'28.9"E	1035	10
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	VIMP	Czech Republic	Vimperk	49°03'44.9"N	13°43'49.2"E	900	10
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	VBOR	Czech Republic	Velký Bor	49°06'09.5"N	13°25'49.3"E	890	11
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	VLH	Czech Republic	Velká Lhota	49°08'50"N	15°19'38.7"E	600	9
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	ML	Czech Republic	Mariánské lázně	49°59'32.5"N	12°41'49.9"E	520	10
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	LEN	Czech Republic	Lenora	48°55'58.7"N	13°47'46.2"E	765	10
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	HMB	Czech Republic	Hory matky Boží	49°15'46.3"N	13°26'16.9"E	685	10
<i>E. nemorosa</i>	<i>E. nemorosa</i>	JAV	Germany	Javor	49°06'57"N	13°07'59.1"E	1320	5
<i>E. coerulea</i>	early flow.	SML	Czech Republic	Nad Spáleným mlýnem	50°42'36.2"N	15°47'58.4"E	775	10
<i>E. coerulea</i>	early flow.	PJE	Czech Republic	Pod Jelenkou	50°44'29.8"N	15°47'45.0"E	1035	10

<i>E. coerulea</i>	early flow.	JLN	Czech Republic	Jelenka	50°44'31.5"N	15°46'41.8"E	1255	10
<i>E. coerulea</i>	early flow.	CHO	Czech Republic	Černá hora	50°38'33.6"N	15°45'27.8"E	1070	10
<i>E. coerulea</i>	early flow.	MOS	Czech Republic	Modré sedlo	50°43'39.7"N	15°41'37.4"E	1410	10
<i>E. coerulea</i>	early flow.	JLN2	Czech Republic	Jelenka 2	50°44'31.5"N	15°46'39.3"E	1260	10
<i>E. coerulea</i>	early flow.	SB	Czech Republic	Slezská Bouda 1	50°44'21.7"N	15°43'41.5"E	1390	10
<i>E. coerulea</i>	early flow.	SB2	Czech Republic	Slezská Bouda 2	50°44'20.3"N	15°43'43.1"E	1385	10
<i>E. coerulea</i>	early flow.	PRB	Czech Republic	Přední Renerovy boudy	50°41'42.8"N	15°39'22.6"E	1225	10
<i>E. coerulea</i>	early flow.	HB	Czech Republic	Husí Boudy	50°41'08.4"N	15°39'32.8"E	1040	10
<i>E. coerulea</i>	early flow.	HMCC	Czech Republic	Medvědín - early flow.	50°44'0.8"N	15°34'28.9"E	1036	10
<i>E. coerulea</i>	<i>E. stricta</i>	VST	Poland	Velký Stav	50°45'20.2"N	15°41'28.4"E	1405	10
<i>E. slovaca</i>	<i>E. stricta</i>	ZDE	Czech Republic	Zděchov	49°15'10.3"N	18°05'34.0"E	660	10
<i>E. slovaca</i>	early flow.	SIV	Czech Republic	U Sivků	49°19'17.5"N	18°05'37.3"E	640	10
<i>E. slovaca</i>	early flow.	HLU	Czech Republic	Horní Lomná - Úpaloný	49°31'18.3"N	18°37'56.2"E	605	10
<i>E. slovaca</i>	early flow.	PREL	Czech Republic	Přelač	49°31'0.7"N	18°38'31.3"E	780	10
<i>E. slovaca</i>	early flow.	BBAR	Czech Republic	Baraní	49°27'42.0"N	18°30'5.8"E	575	8
<i>E. slovaca</i>	early flow.	KAM	Czech Republic	Pod Kamenitým	49°33'16.9"N	18°38'51.3"E	685	10
<i>E. slovaca</i>	early flow.	HUT	Czech Republic	Staré Hamry	49°28'32.2"N	18°24'44.3"E	535	10
<i>E. slovaca</i>	early flow.	VKAR	Czech Republic	Velké Karlovice	49°23'20.9"N	18°17'03.5"E	715	5
<i>E. slovaca</i>	early flow.	LUZ	Czech Republic	Lužná	49°14'18.5"N	18°2'55.9"E	660	10

Euphrasia coerulea, časný typ



Malá Vranča (Vra)



Staré Hamry (HUT)

Euphrasia coerulea, pozdní typ



Ještěd (Jes)



Vysoké nad Jizerou (VnJ)

Euphrasia nemorosa



Ovčárna (Ovc)



Antýgl (Ant)

Euphrasia stricta



Krupka (Kru)



Měděnec (Med)

Hybridní populace



Hradec Králové – Na Plachtě (HK-Pla), zjištěny genotypy *E. nemorosa*, *E. stricta* i *E. coerulea*



Nad Jizerkou (NJi), *E. nemorosa* × *E. coerulea*