

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Morfologická variabilita plicníku měkkého (*Pulmonaria mollis*) v České republice
a na Slovensku**

Diplomová práce

Autor: **Bc. Petra Kuličková**

R170167 Botanika

prezenční studium

Vedoucí práce: **RNDr. Michal Hroneš, Ph. D.**

Konzultant práce: **Mgr. Lucie Kobrlová**

Olomouc 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Michala Hroneše, Ph. D. Uvedla jsem všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Olomouci 7. 8. 2019

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především Michalovi Hronešovi za velkou trpělivost, cenné rady při vedení práce a pomoc při sběru materiálu. Dále můj dík patří Lucii Kobrlové za pomoc při sběru materiálu a morfometrii a Petře Antesové za překlad německy psaných odborných článků a sběru materiálu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Petra Kuličková

Název práce: Morfologická variabilita plicníku měkkého (*Pulmonaria mollis*) v České republice a na Slovensku.

Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta UP

Vedoucí práce: RNDr. Michal Hroneš, Ph. D.

Rok obhajoby práce: 2019

Abstrakt: Rod plicník (*Pulmonaria* L.) patří do čeledi brutnákovité (*Boraginaceae*). Celkem se rozlišuje 18 až 21 druhů plicníků, které mají své těžiště výskytu především v Evropě. Předmětem mého studia byl plicník měkký (*Pulmonaria mollis*) a p. Murínův (*P. murinii*), které oba patří do problematického *P. mollis* agg. V rámci mé práce jsem provedla morfologickou analýzu vybraných morfologických znaků u přírodních populací v České republice a na Slovensku. Celkem bylo testováno 25 morfologických znaků. Populace taxonu *Pulmonaria murinii* byly signifikantně vyššího vzrůstu, měly signifikantně delší čepel lodyžního listu, delší kalich a delší řapík letního listu, naopak *P. mollis* měl signifikantně delší i širší čepel letního listu a delší korunu. Pomocí průtokové cytometrie byla ověřena příslušnost rostlin k danému taxonu. Byly zjištěny 2 ploidní úrovně. *Pulmonaria mollis* odpovídal dysploidnímu počtu chromozomů ($2n = 18$). *Pulmonaria murinii* odpovídal diploidnímu počtu chromozomů ($2n = 14$).

Klíčová slova: *Pulmonaria murinii*, morfologická analýza, morfologické znaky

Počet stran: 51

Počet příloh: 3

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname: Petra Kuličková

Title: Morphological variability of the lungwort *Pulmonaria mollis* in the Czech Republic and Slovakia.

Type of thesis: Master's thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University

Supervisor: RNDr. Michal Hroneš, Ph. D.

The year of presentation: 2019

Abstract: Genus *Pulmonaria* belongs to family *Boraginaceae*. In total 18 to 21 species of lungworts are recognized, with center of their occurrence in Europe. I studied *Pulmonaria mollis* and *Pulmonaria murinii*, both belonging to problematic *Pulmonaria mollis* species complex. In my work I performed morphometric analysis of selected morphological characters in plants from natural populations in the Czech Republic and Slovakia. In total 25 morphological characters were tested. Populations of *Pulmonaria murinii* were significantly higher, they had significantly longer blade of stem leaf, longer calyx and longer petiole of summer leaf, on the other hand, *Pulmonaria mollis* had longer and wider blade of summer leaf and longer corolla. Two ploidy levels were detected in analysed plant material using flow-cytometry – diploid corresponding to $2n = 14$ and dysploid corresponding to $2n = 18$.

Keywords: *Pulmonaria murinii*, morphologic analysis, morphological characters

Number of pages: 51

Number of appendices: 3

Language: Czech

Obsah

Obsah	vi
Úvod	viii
Cíle práce	ix
1. Teoretická část.....	1
1.1 Historie taxonomického pojetí <i>Pulmonaria mollis</i> agg.....	7
1.2 Popis zástupců <i>P. mollis</i> agg. ve střední Evropě	9
1.2.1 <i>Pulmonaria mollis</i> Hornem. s. str. – plicník měkký.....	9
1.2.2 <i>Pulmonaria murinii</i> J. Májovský – plicník Murínův.....	10
2. Materiál a metody.....	12
2.1 Sběr, původ a uchovávání rostlinného materiálu.....	12
2.2 Morfometrická analýza.....	12
2.3 Stanovení DNA ploidního stupně a využití průtokové cytometrie.....	13
2.4 Statistické zpracování dat	13
3. Výsledky	15
3.1 Deskriptivní statistika.....	15
3.2 Mann-Whitney U test.....	22
3.3 Analýza hlavních komponent (PCA).....	29
3.4 Kanonická diskriminační analýza (CDA)	30
3.5 Cytologická variabilita <i>Pulmonaria mollis</i> a <i>P. murinii</i>	33
4. Diskuze	35
4.1 Cytologická variabilita <i>Pulmonaria mollis</i> agg. a porovnání s jinými agregáty.....	35
4.2 Morfologická analýza <i>Pulmonaria mollis</i> a <i>P. murinii</i>	36
5. Závěr	38
6. Literatura.....	39
Seznam tabulek	43

Seznam obrázků.....	44
Seznam příloh.....	45
Příloha č. 1: Přehled studovaných lokalit <i>P. mollis</i>	46
Příloha č. 2: Přehled studovaných lokalit <i>P. murinii</i>	49
Příloha č. 3: Hodnoty Spearmanových korelačních koeficientů – 1. část	50
Příloha č. 3: Hodnoty Spearmanových korelačních koeficientů – 2. část	51

Úvod

Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci, ve které jsem se věnovala dvěma problematickým agregátům u rodu plicník (*Pulmonaria* L.). Konkrétně plicníkům z okruhu *Pulmonaria angustifolia* a z okruhu *Pulmonaria mollis*.

Předmětem mého studia v diplomové práci byl plicník měkký (*Pulmonaria mollis*) a p. Murínův (*P. murinii*), které oba patří do problematického *P. mollis* agg. Tyto dva plicníky se od sebe liší různými počty chromozomů (Májovský & Hegedušová 1993). *Pulmonaria murinii* by se od *P. mollis* měl dále lišit ve tvaru lodyžních listů, oděním kalicha a květních stopek a odlišnou barvou koruny (Májovský & Murín 1980; Křísa 2000).

V mé diplomové práci se snažím určit a otestovat morfologické znaky, které lze využít k odlišení obou taxonů.

Cíle práce

Cílem diplomové práce je zhotovení přehledu variability morfologických znaků jednotlivých taxonů z okruhu *P. mollis*, které se vyskytují na území střední Evropy pomocí excerptce české a světové literatury. K dalším cílům patří provedení morfologické analýzy vybraných morfologických znaků u vybraných přírodních populací z České republiky a Slovenska, které budou nejlépe vystihovat mezipopulační i vnitrodruhovou morfologickou variabilitu jednotlivých taxonů. Pomocí průtokové cytometrie bude ověřena příslušnost rostlin k danému taxonu.

1. Teoretická část

Rod plicník (*Pulmonaria* L.) patří do čeledi *Boraginaceae*, která je čeledí kosmopolitně rozšířenou a podle molekulárních dat tato čeleď náleží do řádu *Boraginales* (Refulio-Rodriguez & Olmstead 2014; Weigend et al. 2014; Luebert et al. 2016; Janicka 2017). Celkem se rozlišuje 18 až 21 druhů plicníků, které mají své těžiště výskytu především v Evropě, vyskytují se od severního Portugalska až po východní Asii – jejich výskyt je doložen z jižní, střední i východní Sibíře, dále se vyskytují od jižního Skotska a jižní Skandinávie po střední Řecko (Sauer 1974; Sauer 1987; Sauer 1995; Májovský & Hegedušová 1993; Meeus et al. 2016).

Na území České republiky se setkáváme se čtyřmi druhy rodu *Pulmonaria* (*Pulmonaria officinalis*, *P. obscura*, *P. angustifolia* a *P. mollis*). *Pulmonaria murinii* se vyskytuje na Slovensku (Májovský & Hegedušová 1993; Křisa 2000; Meeus et al. 2016).

Všechny rostliny rodu *Pulmonaria* jsou vytrvalé. Oddenek je plazivý, buď rozvětvený horizontálně, nebo krátce vícehlavý. Stonek je vzpřímený, řídce nebo hustě měkce chlupatý, někdy je drsně chlupatý až štětinatý, ± hustě žláznatě chlupatý (Shishkin 1953; Májovský & Hegedušová 1993; Křisa 2000). Kalich je rozeklaný do pěti krátkých trojúhelníkovitých zubů, které nejsou nikdy delší než 1/3 až 1/2 kalichu, na začátku kvetení je zvonkovitý, později se prodlužuje. Koruna je na začátku kvetení nálevkovitá, růžová až červená, později azurová, modrofialová nebo modrorůžová až fialová. Koruna se skládá z korunní trubky, která je obvykle stejně dlouhá jako kalich a z korunního lemu, který je široce zvonkovitý, 10–15 mm napříč široký, s krátkými zaokrouhlenými cípy. V ústí korunní trubky nejsou nektáriové šupiny (jako např. u rodu *Symphytum*), ale je zde prsteneček chlupů (Shishkin 1953; Sauer 1974; Májovský & Hegedušová 1993; Křisa 2000; Meeus et al. 2016). U květů, které mají dlouhou čnělku, je oblast mezi prstencem chlupů a prašníky (u květů, které mají krátkou čnělku, je tato oblast u vrchní části trubky) hustě poseta dlouhými, hustými chlupy (např. u *P. mollis*), nebo je jen řídce ochlupena (u *P. montana*, *P. saccharata*) nebo je ± lysá (u *P. angustifolia*, *P. affinis*, *P. collina* (Sauer 1974). Koruna plicníků obsahuje antokyany, což jsou barviva rozpuštěná v buněčné šťávě a měnící barvu koruny podle reakce buněčné šťávy (alkalické, kyselé; Vinter 2008).

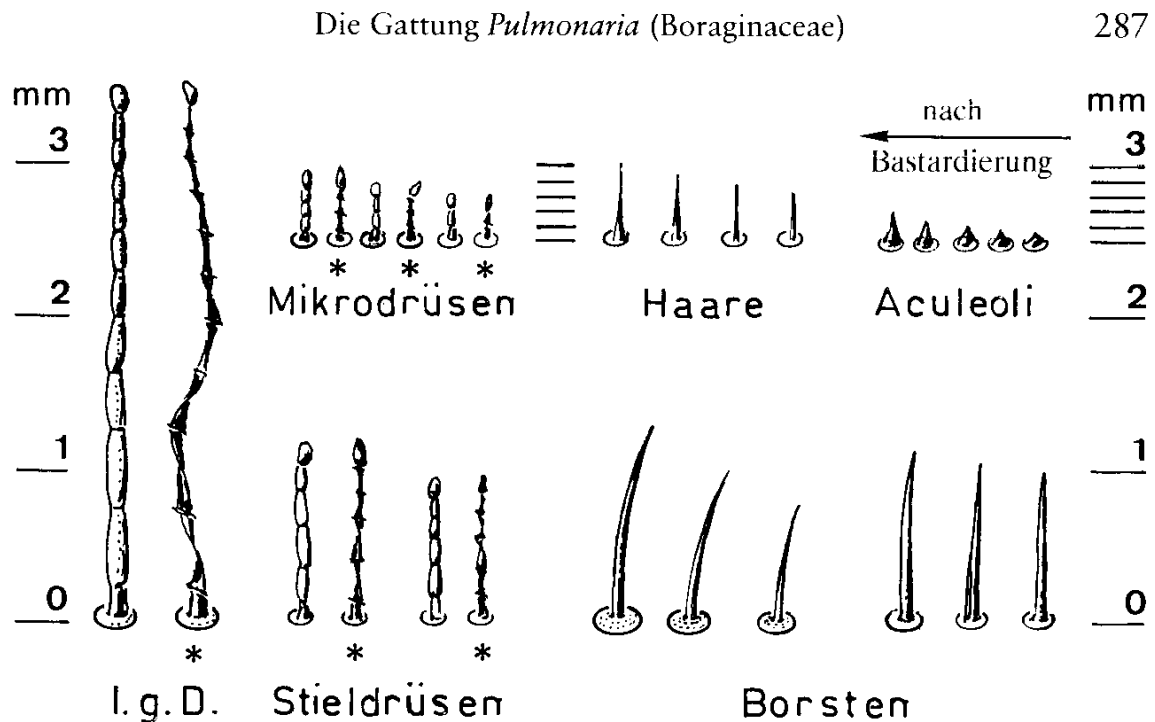
Tyčinky jsou přirostlé ke korunní trubce buď v dolní polovině, nebo v horní části. Čnělka je vždy jen 1 a je gynobazická (vyrůstá ze středu hluboce členěného semeníku; Vinter & Macháčková 2013). Pro čnělku je typická u tohoto rodu distylie, kdy čnělka je buď krátká

nebo dlouhá (Shishkin 1953; Sauer 1974; Májovský & Hegedušová 1993; Křísa 2000). Plodem jsou 4 tvrdky, které jsou vejcovité, hladké nebo chlupaté, často lesklé, tmavě hnědé až černé (Křísa 2000).

U rodu *Pulmonaria* jsou za taxonomicky nejvýznamnější považovány rozdíly ve tvarech přízemních letních listů, typu ochlupení listů a květenství a v různých počtech chromozomů. Letní přízemní listy se vyvíjejí až po odkvetení, jsou dlouze řapíkaté v přízemní růžici, se skvrnami nebo beze skvrn (Májovský & Hegedušová 1993; Křísa 2000).

U odění rostliny rozlišujeme štětiny (setae), chlupy (pili) a žláznaté chlupy (glandulae). Chlupy jsou 0,3–0,5 mm dlouhé a jsou jednobuněčné. Štětiny jsou dlouhé až 1,5 mm a jsou silnější než chlupy. U žláznatých chlupů můžeme ještě rozlišovat 2 typy – stopkaté žlázy a krátké žlázy. Stopkaté žlázy se skládají z tří- až pětibuněčné stopky a z jedné žláznaté buňky, dosahují délky od 0,75–1,0 (1,5) mm. Na květních stopkách, kalichách a listech se nachází až 1 mm dlouhé stopkaté žlázy (glandulae stipitatae). Na lodyze, řapíku nebo ose květenství se nachází 3 a více mm dlouhé stopkaté žlázy (glandulae longae stipitae), které se skládají z 6–10 vzpřímených, (\pm cylindrických), soudkovitých buněk. Nejmenšími typy žláznatých chlupů jsou krátké žlázy (glandulae minimae) a mikrožlázy, které jsou dlouhé \pm 0,2–0,5 mm. Pro skupinu *Pulmonaria obscura-officinalis* a jejich hybridy jsou charakteristické acueoli, což jsou špičaté nebo trnovité hrbolky kuželovitého tvaru, které dosahují délky 0,02–0,07 mm. Tvoří hustý lem po okraji čepele listu (Sauer 1974; Sauer 1995).

Obrázek č. 1: Typy odění u r. *Pulmonaria* (Sauer 1995). Mikrodrüsen = mikrožlázy, Haare = chlupy (pili), Acueoli = špičaté nebo trnovité hrbolky, Stieldrüsen = stopkaté žlázy (glandulae stipitatae), Borsten = štětiny (setae)



Základním chromozomovým číslem u rodu *Pulmonaria* je $x = 7$ (Májovský & Murín 1980; Meeus et al. 2016). Běžným jevem u tohoto rodu je především dysploidie a polyploidie (Bolliger 1982) a podle nejnovějších poznatků je známo deset cytotypů, které rozdělují r. *Pulmonaria* na druhy s diploidním počtem chromozomů ($2n = 2x = 14$), s tetraploidním počtem chromozomů ($2n = 4x = 28$) a dysploidním počtem chromozomů ($2n = 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 38$; Meuss et al. 2016). Dalším běžným jevem u r. *Pulmonaria* je hybridizace. Dříve než se začaly používat molekulární metody, se předpokládalo, že hybridizace u plicníků způsobuje sterilitu druhů s různými dysploidními počty chromozomů (Májovský & Hegedúšová 1993). Teprve s rozvojem molekulárních metod se zjistilo, že právě hybridizací vznikly některé druhy plicníků, a že jsou tyto druhy normálně plodné (Meeus et al. 2016). Dysploidní počet chromozomů u jednotlivých druhů rodu plicník vznikl nejspíše jako východisko z hybridního stavu (Sauer 1974; Meeus et al. 2016). Podle nejnovějších studií má hybridizace důležitou roli v procesu speciace a má podíl na tvorbě nových druhů. Mezi příbuznými druhy se vyskytuje genový tok, který způsobuje postupné snižování reprodukční izolace (Meeus et al. 2016). Hybridizace může podporovat rychlou

reprodukční izolaci sympatických druhů tím, že dochází k selekci proti vzniku nevhodného hybridního potomka a tím se urychluje speciální proces (Servedio & Noor 2003). Tok genů z jednoho rodičovského druhu přes hybrida do druhého rodičovského druhu nemůže být významně zapojen do procesu speciace (Meeus et al. 2016).

Rod plicník se podle Pawlowského (1962) dělí na 4 sekce (*Strigosae*, *Asperae*, *Molles*, *Rubrae*). Sekce *Strigosae* se vyznačuje krátkým, tlustým kořenem. Listy jsou na svrchní straně chlupaté, drsné a u řapíku zúžené. Koruna je později namodralá až fialová. Patří sem např. *P. angustifolia*, *P. longifolia*, *P. saccharata* (Pawlowski 1962).

Sekce *Asperae* se vyznačuje dost tenkým, dlouhým, plazivým kořenem. Na svrchní straně listů jsou krátké husté žláznaté chlupy s dlouhými štětiniami. Přizemní listy jsou srdčité. Koruna je později fialová. Patří sem např. *P. officinalis*, *P. obscura*, *P. affinis* (Pawlowski 1962).

Sekce *Molles* se vyznačuje krátkým, tlustým kořenem. Na svrchní straně listů jsou dlouhé štětiny se žláznatými chlupy. Listy jsou měkce chlupaté nebo málo drsné. Přizemní listy jsou jemně nebo najednou zúžené. Koruna je později fialová. Patří sem *P. mollis* (Pawlowski 1962). Lze sem zařadit i *P. murinii*, který Pawlowski nazýval *P. mollissima*.

Sekce *Rubrae* se vyznačuje dlouhým, plazivým, dost tenkým kořenem. Na svrchní straně listů jsou štětiny a roztroušené žláznaté chlupy. Přizemní listy jsou dlouze sbíhavé. Koruna je trvale červená. Patří sem *P. rubra* (Pawlowski 1962).

Jiný přístup ke klasifikaci navrhnul Sauer (1975). Rod *Pulmonaria* rozdělil do 8 skupin na základě charakteristiky morfologie druhů, jejich rozšíření a počtu chromozomů.

Skupina *Pulmonaria longifolia* je charakteristická přizemními listy, které jsou úzké až široce kopinaté nebo ± úzce vejčité kopinaté, výrazně bíle skvrnitě nebo beze skvrn. Lodyžních listů je většinou 10 a více kopinatých listů. Květenství a kalichy mají ± stejně dlouhé štětiny a početně bohaté krátké žlázy. Na květních stopkách a bázích kalichů je jen několik stopkatých žláz. Koruna je modrá nebo fialová, uvnitř lysá s prstencem chlupů (Sauer 1975).

Skupina *Pulmonaria saccharata-affinis-montana* je charakteristická přizemními listy, které jsou elipticky kopinaté. Čepel se rychle zužuje k řapíku (*P. affinis*), je skvrnitá (*P. saccharata*) nebo beze skvrn (*P. montana*). Na lodyze se nachází 5–8 lodyžních listů, které

jsou elipticky kopinaté (*P. saccharata*, *P. affinis*) nebo vejčité kopinaté s přisedlou bází (*Pulmonaria montana*). Listy mají různě dlouhé štětiny a krátké žlázy (*P. montana*), stopkaté žlázy (*P. saccharata*, *P. affinis*), krátké štětiny (*P. affinis*). Na květních stopkách a bázi kalicha je mnoho stopkatých žláz. Koruna je světle fialová (*P. saccharata*, *P. affinis*) nebo sytě fialová až modrofialová (*P. montana*). Koruna je uvnitř ochlupená (*P. montana*) nebo lysá (*P. saccharata*, *P. affinis*; Sauer 1975).

Skupina *Pulmonaria angustifolia-visiani-kernerii* je charakteristická přízemními listy, které jsou úzké až (vejčité) kopinaté, beze skvrn, pouze u *P. kernerii* s malými okrouhlými skvrnami. Lodyha má 8 až více listů. *Pulmonaria visiani* a *P. kernerii* mají většinou méně lodyžních listů, zpravidla 4–5. Lodyžní listy jsou úzce kopinaté (*P. angustifolia*) nebo vejčité kopinaté (*P. visiani*, *P. kernerii*). Květenství v době plodu má výrazně protáhlé větve a kalichy jsou většinou malé. Na listech najdeme štětiny s krátkými žlázami. Na květních stopkách a bázi kalicha se nachází stopkaté žlázy. Koruna je modrá (*P. angustifolia*, *P. visiani*), modrá až modrofialová (*P. kernerii*). Uvnitř je koruna lysá s prstencem chlupů (Sauer 1975).

Skupina *Pulmonaria dacica-filarszkyana* je charakteristická přízemními listy, které jsou úzké až široce eliptické až (vejčité) kopinaté, většinou dlouhé a jemně zašpičatělé. Čepel se postupně zužuje k řapíku, který je velmi krátký, čepel je zelená až šedozelená, beze skvrn. Lodyha má 5–9 lodyžních listů, které jsou vejčité kopinaté, zašpičatělé se zaoblenou nebo srdčitou přisedlou bází. Nejspodnější lodyžní listy jsou často silně protáhlé, až 20 cm dlouhé, díky svému tvaru se mohou snadno zaměnit s přízemními listy. Květenství má v době plodu protáhlé větve. Květenství je oděno různě dlouhými štětinkami, početně bohatými chlupy, krátkými žlázami a má většinou málo stopkatých žláz. Koruna je modrá až modrofialová (*Pulmonaria dacica*) nebo červená (*P. filarszkyana*). Koruna je uvnitř hustě chlupatá (Sauer 1975).

Skupina *Pulmonaria mollis-collina* je charakteristická druhy, které se často zaměňovaly s *P. montana*. *Pulmonaria mollis* má letní listy zelené se zřetelným šedým leskem a jsou 3–4× delší než široké. Čepel listu je zvlněná, oválně kopinatá, zašpičatělá, rychle přechází v řapík. Podzimní listy mají většinou úzce kuželovité štětiny s širokou bází, dlouhé 0,8–1 mm. Kalichy a květní stopky jsou většinou hustě chlupaté se žláznatými chlupy a velmi řídké štětinaté. Koruna je intenzivně fialová, zřídka červená (Sauer 1974). *Pulmonaria collina* má letní listy tmavě zelené bez šedivého lesku, 5–6× delší než široké. Čepel listu je rovná, elipticky kopinatá. Podzimní listy mají úzké dlouhé štětiny s úzkou bází a jsou 1,1–1,5

mm dlouhé. Květenství je oděno různě dlouhými nebo stejně dlouhými štětínami, s řídkými chlupy a dlouhými stopkatými žlázami, často lepivé. Nejvrchnější lodyžní listy a nejspodnější listeny jsou přisedlé. Letní listy jsou vždy beze skvrn s vzácnými stopkatými žlázami. Koruna je uvnitř slabě ochlupená nebo lysá (Sauer 1974).

Skupina *Pulmonaria rubra-carnica-stiriaca-vallarsae* je charakteristická přízemními listy, které jsou široce nebo úzce elipticky až oválně kopinaté, silně skvrnitě (*P. stiriaca*) nebo beze skvrn (*P. carnica*). Lodyha má 4–7 lodyžních listů., které jsou elipticky nebo oválně kopinaté, zašpičatělé, někdy přisedlé. Květní stopky jsou v době plodu protáhlé a často lepivé. Oděním jsou různě dlouhé štětiny, mnoho chlupů, stopkatých žláz a krátkých žláz. Koruna je červená (*Pulmonaria rubra*), nebesky modrá (*P. stiriaca*), intenzivně fialová až modrofialová (*P. carnica*, *P. vallarsae*). Koruna je uvnitř hustě chlupatá (Sauer 1975).

Skupina *Pulmonaria australis* je charakteristická přízemními listy, které jsou úzce vejčité kopinaté nebo (úzce) kopinaté, nejčastěji beze skvrn nebo zřídka s rozředěnými zelenými nebo bílými ohraničenými skvrnami. U řapíku je čepel úzce křídlatě zúžená. Na kalichu jsou nestejně dlouhé štětiny a krátké žlázy. Koruna je modrá nebo modrofialová (Sauer 1975).

Skupina *Pulmonaria obscura-officinalis* je charakteristická přízemními listy, které jsou vejčité kopinaté se srdčitou bází, která je výrazně oddělená od řapíku. Lodyha má 6–8 lodyžních listů, které jsou vejčité, zašpičatělé. Květenství má v době plodu protáhlé větve. Odění na svrchní straně listů je hustě žláznatě chlupaté s dlouhými štětínami, krátkými žlázami a především u *P. officinalis* se stopkatými žlázami. Na květních stopkách a bázích kalichů jsou vždy stopkaté žlázy. Koruna je lila, fialová nebo modrofialová. Koruna je uvnitř lysá s prstencem chlupů (Sauer 1975).

Bolliger (1982) rozlišoval druhy rodu *Pulmonaria* na základě morfologie, počtu chromozomů a rozšíření. Zabýval se jen druhy, které se vyskytují v západní Evropě. U *Pulmonaria longifolia* rozlišoval čtyři poddruhy – subsp. *longifolia*, subsp. *cevenensis*, subsp. *delphinensis* a subsp. *glandulosa*. Tyto poddruhy se rozlišují na základě kombinací znaků – šířky a délky a šířkových poměrů čepelí přízemních listů, skvrnitosti listů, velikosti pylových zrn a přítomnosti stopkatých žláz na listech. U *Pulmonaria montana* rozlišoval dva poddruhy – subsp. *montana* a subsp. *jurana*. Dále se věnoval druhům *Pulmonaria angustifolia*, *P. affinis*, *P. saccharata*, *P. helvetica*, *P. obscura* a *P. officinalis*.

1.1 Historie taxonomického pojetí *Pulmonaria mollis* agg.

Kerner ve své Monographii Pulmonarium rozlišoval dva druhy – *Pulmonaria mollissima* a *P. montana* neboli *P. mollis*, které se vyskytovaly v karpatsko-panonské oblasti (Kerner 1878; Májovský & Murín 1980). V další monografické práci Simonkai (1904) uvádí dva druhy, které rozlišuje pomocí drsného ochlupení (*P. montana* neboli *P. mollis*) a měkkého ochlupení (*P. mollissima*). Bohužel ani Simonkai (1904) ani další autoři jako např. Jávorka 1925, Domin 1928, Dostál 1950, Pawlowski 1962, Gusuleac 1960 nepoužívají správné taxonomické názvy druhů, ale jména přiřazují spíše intuitivně a často uvádí oba druhy ze stejné lokality (Májovský & Murín 1980).

Kerner (1878) zahrnoval pod název druhu *Pulmonaria montana* 2 druhy – *P. montana* a *P. tuberosa*. Oběma druhům připisoval podobné areály, ze kterých se tehdejší *P. montana* ve Francii měla vyskytovat dále na jih a jihozápad. Srovnání těchto údajů s výsledky Sauera ukázalo, že Kerner přiřadil jak k *P. montana*, tak k *P. tuberosa* všechny druhy s $2n = 18$, resp. také s $2n = 22$ a $2n = 24$. Podle Sauera (1974) patří všechny populace s $2n = 22$, 24 ze západního Rakouska, Švýcarska, západního Německa a Belgie k *P. montana* s. lat. Populace s $2n = 18$ z Rakouska, jihovýchodního Německa a Švýcarska patří k *P. mollis* s. lat. (Sauer 1974). Schrank (1818) popsal *P. tuberosa* nepřesně, proto aplikace jména *P. tuberosa* je nejednoznačná a může být vztažena na několik v současnosti rozeznávaných taxonů (Sauer 1974).

Dostál (1950) rozlišoval z ekologického hlediska dva poddruhy *P. mollis* – subsp. *mollis* a subsp. *mollissima*. Pro subsp. *mollis* byly typické karpatské lesy submontánního a montánního stupně a subsp. *mollissima* se vyskytovala v celých Karpatech, zvláště na jihu Slovenské nížiny. Další přístup uvádí Pawlowski (1962), který rozlišuje pouze *P. mollissima*, který ale neodráží variabilitu pro populace západního Podkarpatska z Podolí a Povolží. V kontinentální části Sibíře se používal název *P. mollissima* pro všechny populace. Popov (1953) nenašel žádné podstatné rozdíly na listech rostlin z této oblasti. Dobrocayeva (1957) se snažila rozlišit tyto populace pomocí různého typu odění a podle různé délky žláznatých chlupů. Oba ruští autoři (Popov i Dobrocayeva) popisovali pouze měkké, přitisklé chlupy bez dlouhých robustnějších chlupů (setae nebo setulae). To zřejmě odráželo skutečnost, že u rodu *Pulmonaria* nejsou žádné druhy s tvrdými chlupy na listech v kontinentální oblasti, v porovnání s druhy v západní části areálu rozšíření rodu. Díky jednotnému chromozomovému číslu u všech populací ($2n = 14$) bylo možné tyto populace odlišit od

populací *P. mollis* ($2n = 18$), které byly pozorovány v západní části areálu rozšíření rodu (Májovský & Murín 1980).

Populace *P. mollis* subsp. *mollis* s $2n = 18$ v západních Karpatech jsou vždy charakteristické oděním z měkkých chlupů (pili), mezi kterými jsou rozptýlené tvrdé delší chlupy (setae; Májovský & Murín 1980).

Na Slovensku se však vyskytují také diploidní populace ($2n = 14$), u kterých na listové čepeli převládají měkké chlupy, tvrdé chlupy se vyskytují jen ojediněle a mají stejnou délku jako měkké chlupy. Tyto populace byly ještě donedávna označovány jako *P. mollissima*. Teprve na začátku 80. let 20. století byly tyto populace popsány jako samostatný druh *P. murinii* (Májovský & Murín 1980). Listy jsou vždy měkce chlupaté, téměř plstnaté, nikdy ne drsné a obvykle bez žláznatých chlupů (Májovský & Murín 1980).

Sauer (1972) jasně prokázal, že *P. mollissima* je mladší nadbytečné jméno k *P. mollis*, a proto ho nelze používat pro jakýkoliv taxon. Proto bylo potřeba pro kontinentální (sibiřské) populace, které se od evropských liší morfologicky, cytologicky a geograficky, použít nové jméno. Jako samostatný poddruh byl popsán *P. murinii* subsp. *continentalis*, který má diploidní počet chromozomů ($2n = 14$) a pochází z geograficky poměrně izolovaných populací na Sibiři. Od *P. murinii* subsp. *murinii* se liší tím, že má pouze měkké, stejně dlouhé chlupy na lodyze, listech a kalichu (Májovský & Murín 1980).

Dalším jménem, které je občas používáno pro středoevropské populace *P. mollis* s. lat., je *P. dacica* (Simonk.) Simonk. (Sauer 1987, Valdés 2011). Rozdílný pohled na *Pulmonaria dacica* měli Májovský & Murín (1980) a Sauer (1987). Májovský & Murín (1980) rozlišovali u druhu *Pulmonaria dacica* všechny jeho diploidní populace jako samostatný druh *P. murinii*, který je odlišný od triploidních, hypertriploidních a tetraploidních populací, které považovali za *P. dacica*. Sauer (1987) měl na druh *P. dacica* velmi široký pohled. Zahrnoval do něj všechny populace, které jsou tetraploidní ($2n = 28$), diploidní ($2n = 14$), triploidní ($2n = 21$), hypertriploidní ($2n = 22$), anebo hypotriploidní ($2n = 20$), a také dysploidní ($2n = 24$). K tomuto druhu přiřazoval všechny populace ze střední, jihovýchodní, východní Evropy a ze Sibiře, které měly měkce oděné listy a neměly $2n = 18$ (Sauer 1987).

1.2 Popis zástupců *P. mollis* agg. ve střední Evropě

1.2.1 *Pulmonaria mollis* Hornem. s. str. – plicník měkký

Pulmonaria mollis je vytrvalá trsnatá rostlina vysoká 15–50 cm (Sauer 1974; Křísa 2000). Oddenek je vícehlavý, krátký, tlustý 5–12 mm (Kerner 1878; Májovský & Hegedüšová 1993; Křísa 2000). Přízemní listy jsou šedavě zelené nebo světle zelené, beze skvrn, sametově měkce chlupaté, na svrchní straně čepele jsou početné chlupy (pili) proložené štětinami (setae) a stopkatými žlázami (glandulae stipitatae; Pawlowski 1962; Merxmüller & Sauer 1972; Sauer 1974; Křísa 2000).

Letní listy jsou dlouhé 25–50 cm a široké 7–14 cm, tedy 3–4× delší než široké. Čepel letních listů je široce vejčité kopinatá, klínovitě zúžená na bázi, od řapíku zřetelně oddělená. Řapík tvoří 3/4 délky čepele nebo je stejně dlouhý jako čepel, úzce křídlatý. Podzimní listy jsou dlouhé 30–70 cm, široké 9–15 cm, 3,5× delší než široké, vejčité, obvejčité nebo vejčité kopinaté, často jemně zúžené k řapíku. Řapík tvoří 1/3–1/2 délky čepele nebo je stejně dlouhý jako čepel, široce křídlatý. Střední lodyžní listy jsou protáhlé, na bázi přisedlé, horní lodyžní listy jsou podobné listenům, vejčité kopinaté, na bázi rozšířené, krátce sbíhavé a objímavé. (Pawlowski 1962; Sauer 1974; Křísa 2000).

Květenství je zpočátku husté, po odkvětu rozvolněné. Kalich je zvonkovitý, 11–12 mm dlouhý, 4,5–5,5 mm široký, zvenku na bázi je hustě štětinatý a stopkatě žláznatý, uvnitř chlupatý. Kalich je zakončen trojúhelníkovitými širokými cípy dlouhými ca. 4 mm sahajícími až do poloviny kalichu, v době zralosti je 15–17 mm dlouhý, 8–10 mm široký, kališní cípy jsou ca. 6 mm dlouhé (Pawlowski 1962; Merxmüller & Sauer 1972; Sauer 1974; Sauer 1987; Křísa 2000). Koruna je nálevkovitá, intenzivně fialová, zřídka červená, 1,5–2,0 cm dlouhá. Uvnitř korunní trubky je prstenec delších chlupů, celá koruna je uvnitř chlupatá (Pawlowski 1962; Merxmüller & Sauer 1972; Májovský & Hegedüšová 1993; Křísa 2000).

Pylová zrna jsou zpočátku kvetení $\pm 51 \mu\text{m}$ dlouhá, $\pm 39 \mu\text{m}$ široká, za květu jsou $\pm 41 \mu\text{m}$ dlouhá, $\pm 30 \mu\text{m}$ široká. Tvrdky jsou $\pm 4,5 \text{ mm}$ dlouhé, $\pm 3,5 \text{ mm}$ široké, šikmo vejcovité, tupé, na vrcholu přitisklé, hnědočerné nebo černé barvy, zpočátku velmi krátce chlupaté, poté lysé (Pawlowski 1962; Křísa 2000).

Plicník měkký je dysploidní druh ($2n = 18$; Pawlowski 1962; Sauer 1987; Májovský & Hegedüšová 1993; Gregor & Hand 2014). Původně se u tohoto druhu myslelo, že se jedná o diploidní druh ($2n = 28$), při dalším zjišťování Wolkinger (1966) uváděl $2n = 26$. Tyto

chromozomové počty jsou ale tetraploidní. Je možné, že byly dříve považovány za diploidní, protože např. Tarnavshi uváděl různá základní chromozomová čísla u r. *Pulmonaria*: $x = 7, 8, 9, 10, 11$ a $12, 14$ (Tarnavshi 1935 sec Wolkinger 1966). Také Májovský & Murín (1980) uváděli různá základní chromozomová čísla u r. *Pulmonaria*: $x = 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13$. Konečný počet chromozomů u *P. mollis* uvádí znovu Wolkinger ($2n = 18$; 1968).

Tento druh kvete od dubna do května (Májovský & Hegedušová 1993; Křisa 2000). Je to hemikryptofyt. Vyskytuje se od planárního až po kolinní stupeň (Pawlowski 1962; Májovský & Hegedušová 1993). Preferuje hluboké i mělké půdy, minerálně bohaté, na jaře dobře zavlažené. V České republice se vyskytuje hlavně na Moravě, ostrůvkovitě se nachází v okolí Kroměříže, Brna, Znojma, v Moravském krasu a stepních Bílých Karpatech (Křisa 2000; Kuličková 2016). Na Slovensku tento druh roste ostrůvkovitě v celé karpatské oblasti, ale na jednotlivých místech není příliš hojný, dále roste v panonské oblasti, v Ipělsko-rimavské brázdě a Východoslovenské nížině, kde se střetává s *P. murinii*. Roste ve společenstvu *Quercetalia pubescenti-petraeae* jako diagnostický druh pro asociaci *Quercetum pubescenti-roboris*, dále je typický pro svaz *Fagion* a *Carpinion betuli*. Na jihovýchodní Moravě se vyskytuje v asociaci *Pruno-Ligustretum* variantě s *Inula salicina* (Májovský & Hegedušová 1993; Chytrý 2013).

U *Pulmonaria mollis* byly objeveny relativně vysoké hodnoty δ -tokoferolu (vitamínu E; více než $> 10\%$; Velasco 1999).

1.2.2 *Pulmonaria murinii* J. Májovský – plicník Murínův

Pulmonaria murinii je vytrvalá rostlina vysoká 20–50 cm. Oddenky jsou vícehlavé, krátké, tlusté, šikmé a černé (Shishkin 1953; Májovský & Murín 1980; Májovský & Hegedušová 1993). Stonek je přímý, zpočátku hojně sametově chlupatý a krátce štětinatý, později i lepkavý (Shishkin 1953; Májovský & Murín 1980). Letní přízemní listy jsou dlouhé až 50 cm a široké 8–10 cm (Shishkin 1953), tedy 3–4× delší než široké (Májovský & Murín 1980). Čepel listu je vejčité kopinatá nebo podlouhle kopinatá, šedavě zelené barvy, beze skvrn, sametově měkce chlupatá a nezláznatá. U řapíku je čepel jemně zvlněná (Shishkin 1953; Májovský & Murín 1980). Lodyžní listy jsou podlouhle vejčité až podlouhle kopinaté, většinou jsou užší než přízemní listy. Dolní lodyžní listy jsou poloobjímavé, střední se

zaokrouhlenou nebo uťatou bází a horní podobné listenům (Shishkin 1953; Májovský & Hegedúšová 1993).

Květenstvím je dvojitý, ojediněle trojitý s hustě žláznatými chlupy a výraznými štětinami (Májovský & Hegedúšová 1993). Kalich je zpočátku cylindrický, dlouhý 8–10 mm, pěticípý, málokdy je na povrchu žláznatý, spíše krátce chlupatý bez výrazných štětín. Uvnitř kalichu jsou krátké chlupy. Za plodu je zvonkovitý, dlouhý až 1,5 cm (Shishkin 1953; Májovský & Murín 1980; Májovský & Hegedúšová 1993).

Koruna je nálevkovitá, zpočátku kvetení červená, později fialově modrá, kobaltově modrá až modrofialová. Hrdlo koruny je široké, s věnečky chloupků ve svazečcích na povrchu (Shishkin 1953; Májovský & Murín 1980; Májovský & Hegedúšová 1993).

Pylová zrna jsou žlutá. Tvrdky jsou dlouhé 4,0–4,5 mm, šikmo vejcovité, tupé, hnědočerné, řídké chlupkaté (Májovský & Murín 1980; Májovský & Hegedúšová 1993).

Pulmonaria murinii má diploidní počet chromozomů ($2n = 14$; Májovský & Murín 1980; Májovský & Hegedúšová 1993). Kvete od dubna do května. Je to hemikryptoxyt. Preferuje nejčastěji vlhčí, minerálně bohaté půdy. Najdeme ho v křovinách, na pasekách a na okrajích nejteplejších lesů (Májovský & Hegedúšová 1993).

Pulmonaria murinii se vyskytuje od planárního až po kolinní stupeň (Májovský & Hegedúšová 1993). Roste v nejteplejších a nejjihnějších částech Slovenské republiky, na jihu Slovenské nížiny, východně od řeky Váh, na Kováčovských kopcích a ve Slovenském krasu (Májovský & Murín 1980) a často se nachází ve svazu *Quercion pubescenti-petraeae*, *Prunion fruticosae* a *Geranion sanguinei*. Vyskytuje se i v řádu *Festucetalia valesiacae* (Májovský & Hegedúšová 1993). Byl uváděn i ze Sibíře (cf. Májovský & Murín 1980).

2. Materiál a metody

2.1 Sběr, původ a uchovávání rostlinného materiálu

Jednotlivé rostlinné populace byly sbírány na území České republiky a Slovenska v letech 2015–2019. V České republice probíhal sběr rostlinného materiálu na 14 lokalitách (Příloha č. 1). Na Slovensku probíhal sběr rostlinného materiálu na 5 lokalitách (Příloha č. 2).

Na každé lokalitě jsme se snažili sebrat po 10 jedincích, pokud to bylo možné. Každý rostlinný jedinec musel mít minimálně čtyři květy, aby mohla být provedena morfometrická analýza.

Rostlinní jedinci byli vždy jednotlivě uloženi do mikrotenového sáčku, řádně popsáni zkratkou lokality a číslem jedince, aby nemohlo dojít k pomíchání jednotlivých korun. Tyto koruny byly potřebné ke změření vybraných morfometrických znaků.

Po změření morfologických znaků byly rostliny zasazeny jednotlivě do květináčů a pěstovány na experimentálním pozemku katedry botaniky, aby mohly být v létě změřeny další morfologické znaky na letních listech. Každá rostlina byla řádně označena štítkem, kde byla uvedena zkratka lokality a číslo jedince.

2.2 Morfometrická analýza

Morfometrická analýza byla provedena pro *Pulmonaria mollis* na 14 populacích v České republice, každá populace měla většinou 10 jedinců, u populací z Pacetluk a Prusinovic bylo měřeno pouze 5 jedinců. Dále byla provedena morfometrická analýza u 3 populací *P. mollis* ze Slovenska, populace z Koliňan měla 4 jedince, populace z Martinského lesa měla 9 jedinců a populace z Vinohrad nad Váhom měla 2 jedince. Morfologická analýza u *P. mollis* byla tedy provedena celkem na 145 jedincích (Příloha č. 1). U *Pulmonaria murinii* byla provedena morfometrická analýza na 3 populacích ze Slovenska a obsahovala 17 jedinců (Příloha č. 2). Jedna populace ze Slovenska (populace z Vinohrad nad Váhom) byla smíšená. Obsahovala 8 rostlin *P. murinii* a 2 rostliny odpovídající cytotypem *P. mollis* (Příloha 1, 2).

Celkem bylo vybráno a testováno 15 vegetativních a 10 generativních znaků. Pomocí posuvného digitálního měřítka byly změřeny vegetativní i generativní znaky hned v terénu na živých rostlinných jedincích. Zaměřila jsem se na následující znaky: výška rostliny, tloušťka

lodyhy nad 1. listem, délka a šířka 3. a 4. listu, délka a šířka báze 3. a 4. listu, u čtyř květů délka květní stopky, kalichu, délka a šířka kališního cípu, délka koruny, korunní trubky, čnělky, prašníku a semeníku. Délka prašníku byla změřena binokulární lupou při zvětšení 4×. Dále byla pomocí trojčlenné poměrné škály odhadnuta hustota chlupů na lodyze, květní stopce a kališním cípu. Rostliny jsme poté zasadili každou do jednoho květináče a nechali vyrůst letní listy. Na letních listech byla změřena délka celého letního listu, délka a šířka čepele a délka řapíku.

Tabulka č. 1: Trojčlenná poměrná škála hustoty chlupů.

Poměrná škála	1	2	3
Odhad v %	0–25%	25–50%	50–100%

2.3 Stanovení DNA ploidního stupně a využití průtokové cytometrie

Pomocí průtokových cytometrů BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose) vybaveného modrým laserem BD Accuri™ C6 Blue Laser (488 nm, 20 mW) a Partec PAS (Partec GmbH, Münster) vybaveného zeleným laserem Cobolt Samba (532 nm, 100 mW) byla stanovena DNA-ploidní úroveň (Suda et al. 2006). Vzorby byly připraveny v 1 ml pufru LB01 s PVP (polyvinylpyrrolidon) a následně obarveny 50 µl fluorochromu propidium jodid (PI; Doležel & Bartoš 2005; Doležel et al. 2007). Všechny vzorky byly připraveny podle standartního protokolu. Listy hrachu (*Pisum sativum* L.) byly použity jako rostlinný standard z důvodu známého obsahu DNA ('Ctirad' 2C = 9,09 pg; Doležel et al. 2007). Všechny rostliny byly analyzovány jednou.

2.4 Statistické zpracování dat

Většina morfologických dat byla analyzována v programu NCSS 2009 (Hintze 2008). Pro testování rozdílů mezi *Pulmonaria mollis* a *P. murinii* byl použit Mann-Whitney U test. Tento test je neparametrický a byl použit z důvodu dvou nesejně velkých skupin. Pomocí tohoto testu byly testovány rozdíly mezi taxony v jednotlivých znacích. Rozpětí variability kvantitativních znaků bylo znázorněno graficky pomocí box plotů. V programu NCSS 2009

byla použita kanonická diskriminační analýza (CDA) k testování hypotézy, zda je možné mezi sebou rozlišit jednotlivé taxony pomocí souboru sledovaných morfologických znaků (Hintze 2008).

Pouze metoda mnohorozměrné analýzy (PCA) byla provedena v programu Canoco for Windows 5.01 (ter Braak & Šmilauer 2012). V tomto programu bylo testováno, jestli spolu jednotlivé znaky korelují. Hodnoty Spearmanových korelačních koeficientů jsou uvedeny v příloze 3. Nejvíce korelovaný znak ($r > 0,9$) je zvýrazněn.

3. Výsledky

3.1 Deskriptivní statistika

Pro testování bylo použito celkem 17 populací *Pulmonaria mollis* (celkem 145 jedinců) a 3 populace *P. murinii* (celkem 17 jedinců). Byly testovány všechny vegetativní i generativní znaky u obou taxonů. Pro testování rozdílů mezi oběma taxony byl použit neparametrický Mann-Whitney U test (viz tab. 2).

Tabulka č. 2: Hodnoty průměru, směrodatné odchylky, minima, maxima a mediánu pro každý znak u *P. murinii* (2n = 14) a *P. mollis* (2n = 18).

ZNAK	MEAN	STANDART DEVIATION	MINIMUM	MAXIMUM	MEDIAN
Výška rostliny [v cm] (2n = 14)	27,9	3,930634	18,5	34,9	28,5
Výška rostliny [v cm] (2n = 18)	24,1	6,310798	11,5	46,2	23
Tloušťka rostliny [v mm] (2n = 14)	3,9	0,8818445	2,52	5,85	3,66
Tloušťka rostliny [v mm] (2n = 18)	3,8	0,9192314	1,83	6,75	3,81
Hustota chlupů na lodyze (2n = 14)	2,7	0,4775669	2	3	3

Hustota chlupů na lodyze (2n = 18)	3,0	0,201198	2	3	3
Počet listů na lodyze (2n = 14)	7,9	1,559727	5	11	8
Počet listů na lodyze (2n = 18)	7,4	1,396235	4	12	7
Délka 3. listu [v cm] (2n = 14)	9,8	1,947948	6,6	14,9	9,9
Délka 3. list [v cm] (2n = 18)	7,7	2,479793	2,9	15,9	7,4
Šířka 3. listu [v cm] (2n = 14)	2,7	0,7206235	1,8	4,2	2,5
Šířka 3. listu [v cm] (2n = 18)	2,5	0,7444215	0,5	4,5	2,5
Délka báze 3. listu [v mm] (2n = 14)	4,3	1,469893	2,19	7,56	4,22
Délka báze 3. listu [v mm] (2n = 18)	3,4	0,8988126	1,47	7,27	3,28
Šířka báze 3. listu [v mm] (2n =	4,6	1,84927	2,17	8,44	4,3

14)					
Šířka báze 3. listu [v mm] (2n = 18)	4,5	1,267061	1,93	8,53	4,43
Délka 4. listu [v cm] (2n = 14)	8,8	1,304513	6,7	10,5	9,2
Délka 4. listu [v cm] (2n = 18)	6,9	2,090214	2,3	14,5	6,8
Šířka 4. listu [v cm] (2n = 14)	2,9	0,5323456	2	4	3
Šířka 4. listu [v cm] (2n = 18)	2,6	0,7400438	0,9	4,9	2,4
Délka báze 4. listu [v mm] (2n = 14)	3,8	1,557527	2,01	7,2	3,26
Délka báze 4. listu [v mm] (2n = 18)	3,3	0,800872	1,8	6,85	3,21
Šířka báze 4. listu [v mm] (2n = 14)	4,8	1,183174	2,63	7,94	4,91
Šířka báze 4. listu [v mm] (2n = 18)	4,7	1,193023	1,62	8,59	4,65

Délka květní stopky [v mm] (2n = 14)	4,4	0,7964818	3,3425	6,47	4,2125
Délka květní stopky [v mm] (2n = 18)	4,3	0,8279311	2,8675	6,94	4,1525
Hustota štětinovitých chlupů na stopce (2n = 14)	2,8	0,2790177	2	3	3
Hustota štětinovitých chlupů na stopce (2n = 18)	2,9	0,1788771	2	3,075	3
Hustota žláznatých chlupů na stopce (2n = 14)	2,1	0,6786209	1	3	2,25
Hustota žláznatých chlupů na stopce (2n = 18)	2,7	0,6069351	1	3	3
Délka kalicha [v mm] (2n = 14)	12,9	1,602839	10,1175	16,22	12,89
Délka	12,2	1,500826	9,0675	16,4725	12,1875

kalicha [v mm] (2n = 18)					
Délka kališního cípu [v mm] (2n = 14)	4,5	0,6141227	3,3225	6,09	4,33
Délka kališního cípu [v mm] (2n = 18)	4,1	0,6662415	2,62	5,755	3,9825
Šířka kališního cípu [v mm] (2n = 14)	2,5	0,3279549	2,1	3,34	2,51
Šířka kališního cípu [v mm] (2n = 18)	2,4	0,3473794	1,58	3,38	2,35
Hustota štětinovitých chlupů na kalichu (2n = 14)	2,8	0,3677416	2	3	3
Hustota štětinovitých chlupů na kalichu (2n = 18)	2,9	0,2149118	1,25	3	3
Hustota žláznatých chlupů na kalichu (2n = 14)	2,2	0,7050362	1	3	2,25

= 14)					
Hustota	2,8	0,4200306	1	3	3
žláznatých chlupů na kalichu (2n = 18)					
Délka koruny [v mm] (2n = 14)	14,9	0,8581331	13,0625	16,33	14,85
Délka koruny [v mm] (2n = 18)	15,2	1,401914	11,2875	18,74	15,1425
Délka korunní trubky [v mm] (2n = 14)	7,2	0,4352688	6,37	7,99	7,19
Délka korunní trubky [v mm] (2n = 18)	7,7	0,7714013	5,39	10,235	7,645
Délka prašníku [v μm] (2n = 14)	7,9	0,9940466	5,9	9,7	8,2
Délka prašníku [v μm] (2n = 18)	8,0	0,9145583	5,4	9,8	8
Délka	8,5	3,005863	2,84	12,54	9,52

čnělky [v mm] (2n = 14)					
Délka	8,7	2,508539	4,17	12,7	9,8
čnělky [v mm] (2n = 18)					
Délka	1,5	0,1714404	1,22	1,8	1,51
semeníku [v mm] (2n = 14)					
Délka	1,5	0,1446726	0,92	2,06	1,54
semeníku [v mm] (2n = 18)					
Délka celého LL [v cm] (2n = 14)	31,9	6,490264	20,3	45,5	31,4
Délka celého LL [v cm] (2n = 18)	32,7	5,8361	19,8	48,7	32,35
Délka čepele LL [v cm] (2n = 14)	22,5	3,596222	16	29,5	22
Délka čepele LL [v cm] (2n = 18)	24,5	4,462487	12,1	35,9	24,55
Šířka čepele LL [v cm] (2n = 14)	9,6	1,02377	7,9	11,8	9,7
Šířka čepele LL [v cm] (2n = 18)	10,3	1,721285	6,7	15,1	10,2

Délka řapíku LL [v cm] (2n = 14)	9,5	3,765165	4,3	19	8,5
Délka řapíku LL [v cm] (2n = 18)	8,2	2,612289	3,4	18,1	7,8

3.2 Mann-Whitney U test

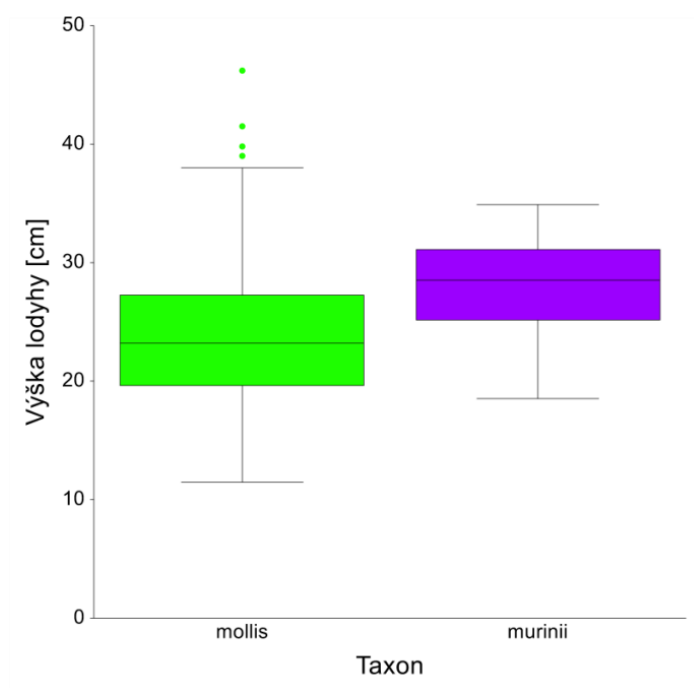
Byly testovány všechny vegetativní i generativní znaky u obou taxonů naráz kromě délky čnělky. Populace taxonu *Pulmonaria murinii* byly signifikantně vyššího vzrůstu, měly signifikantně delší čepel lodyžního listu, delší kalich a delší řapík letního listu, naopak *P. mollis* měl signifikantně delší i širší čepel letního listu a delší korunu (viz tab. 2 a 3; obr. 2–9). Rozpětí variability vybraných znaků je znázorněno na obrázcích č. 2–11.

Tabulka č. 3: Výsledek testu (Z) a probability level (P) u měřených znaků při morfometrické analýze.

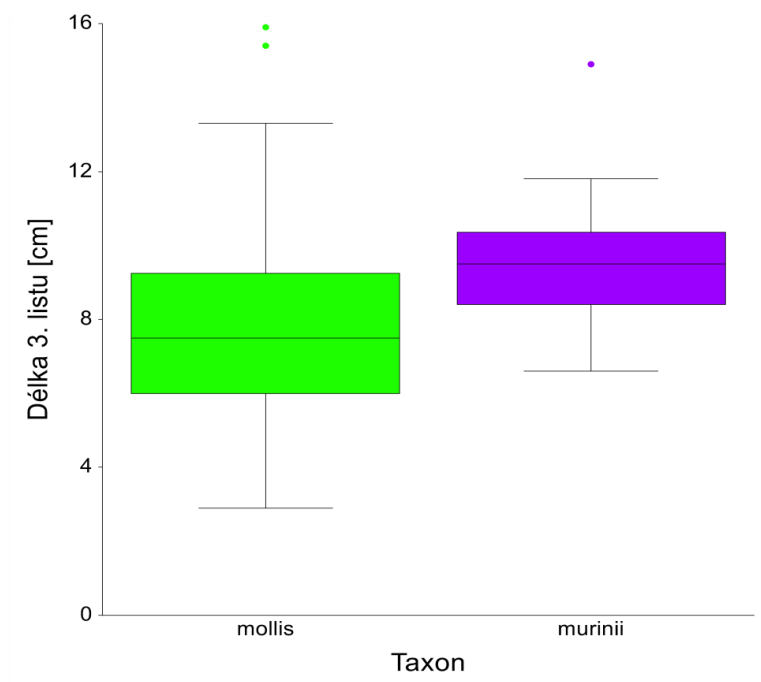
ZNAK	VÝSLEDEK TESTU (Z)	PROBABILITY LEVEL (P)
Výška rostliny	3,2485	0,001
Tloušťka lodyhy	0,1406	0,888
Hustota chlupů na lodyze	-4,2631	< 0,001
Počet listů na lodyze	1,1457	0,252
Délka 3. listu	3,8005	< 0,001
Šířka 3. listu	0,8132	0,416
Délka báze 3. listu	2,7719	0,006
Šířka báze 3. listu	-0,0573	0,954
Délka 4. listu	4,1185	< 0,001
Šířka 4. listu	2,5042	0,012
Délka báze 4. listu	0,8225	0,411
Šířka báze 4. listu	0,6975	0,485

Délka květní stopky	0,4737	0,636
Hustota štětinovitých chlupů na stopce	-2,3944	0,017
Hustota žláznatých chlupů na stopce	-5,2735	< 0,001
Délka kalicha	1,9312	0,053
Délka kališního cípu	2,4179	0,016
šířka kališního cípu	1,6971	0,090
Hustota štětinovitých chlupů na kalichu	-2,9914	0,003
Hustota žláznatých chlupů na kalichu	-5,0416	< 0,001
Délka koruny	-1,0307	0,303
Délka korunní trubky	-2,9176	0,004
Délka prašníku	-0,0703	0,944
Délka čnělky	-0,1770	0,860
Délka semeníku	-0,0807	0,936
Délka celého LL	-0,6575	0,511
Délka čepele LL	-1,8975	0,058
Šířka čepele LL	-1,5650	0,118
Délka řapíku LL	1,2293	0,219

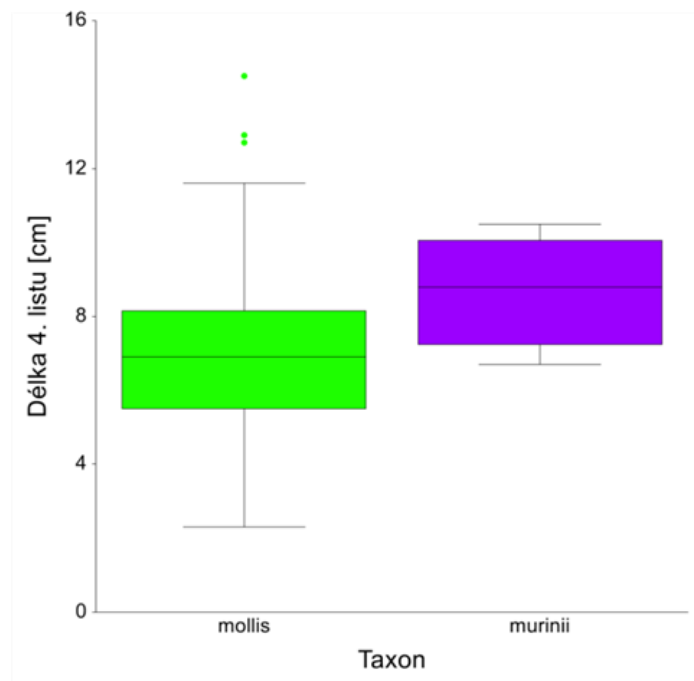
Obrázek č. 2: Variabilita výšky rostlin [v cm] (tělo box plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř těla odpovídá hodnotě mediánu a vousy značí zbytek variability a kolečka odlehlé hodnoty). Názvy na ose x představují jednotlivé cytotypy: mollis = dys



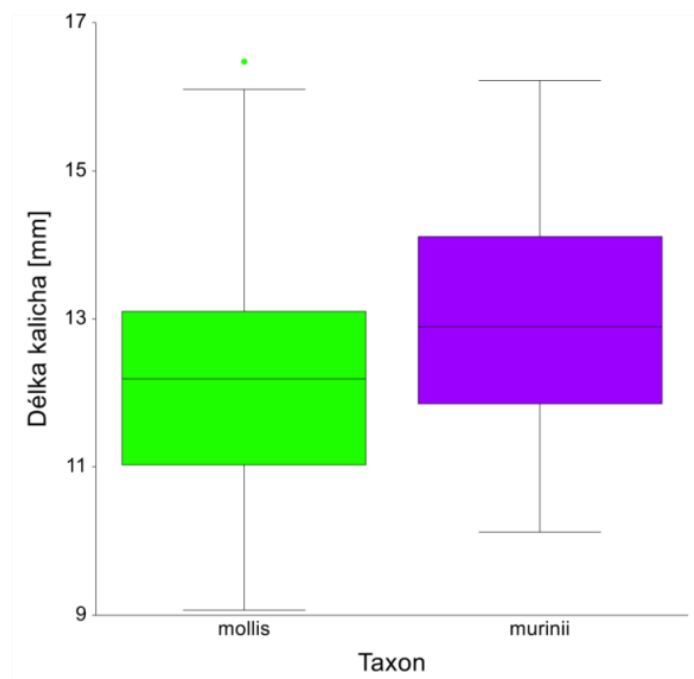
Obrázek č. 3: Variabilita délky 3. listu [v cm].



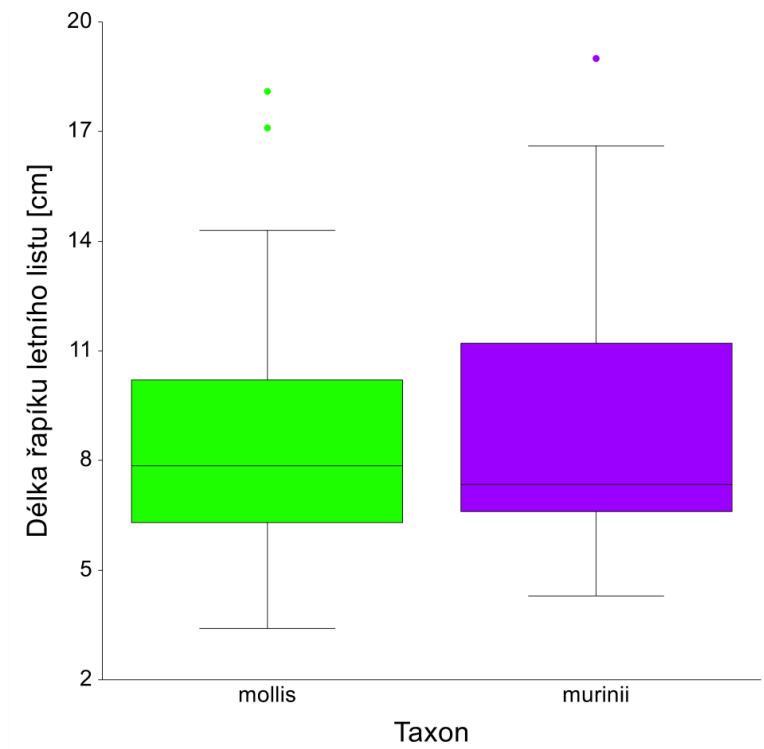
Obrázek č. 4: Variabilita délky 4. listu [v cm].



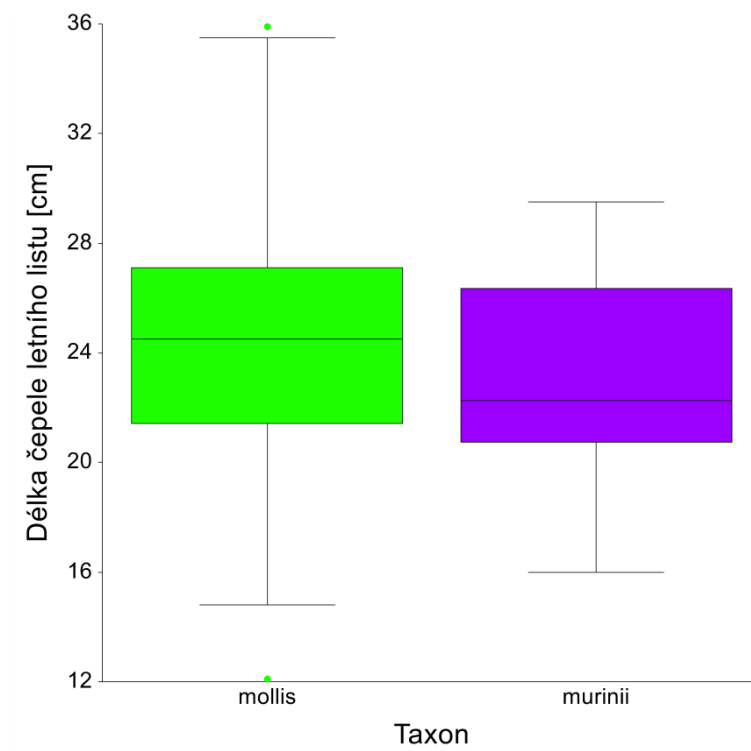
Obrázek č. 5: Variabilita délky kalicha [v mm].



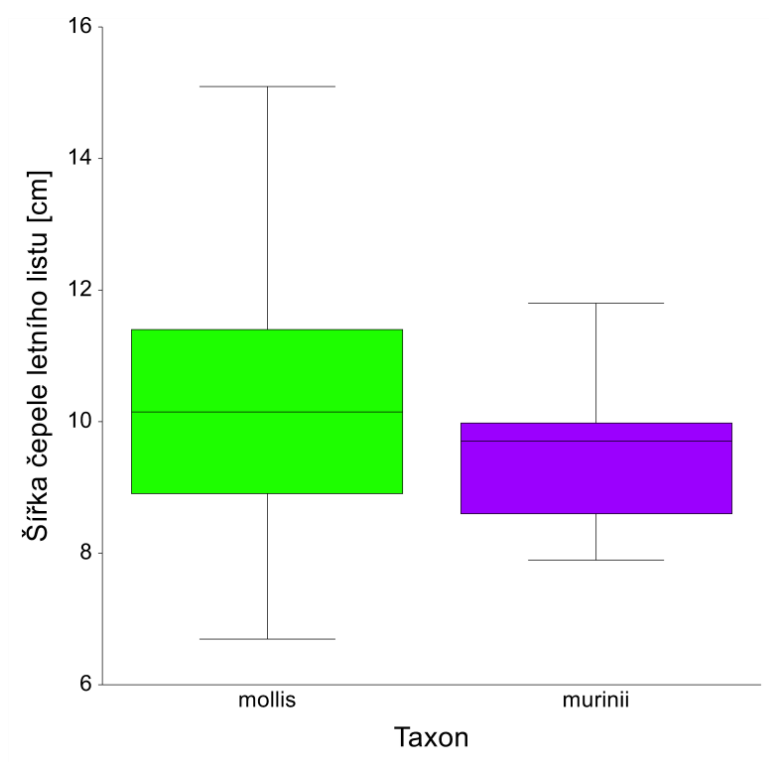
Obrázek č. 6: Variabilita délky řapíku letního listu [v cm].



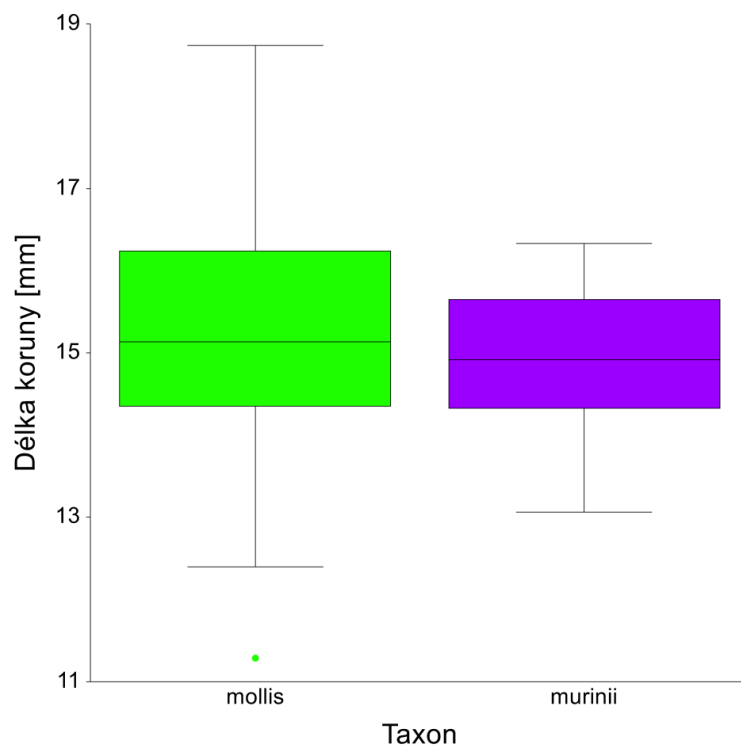
Obrázek č. 7: Variabilita délky čepele letního listu [v cm].



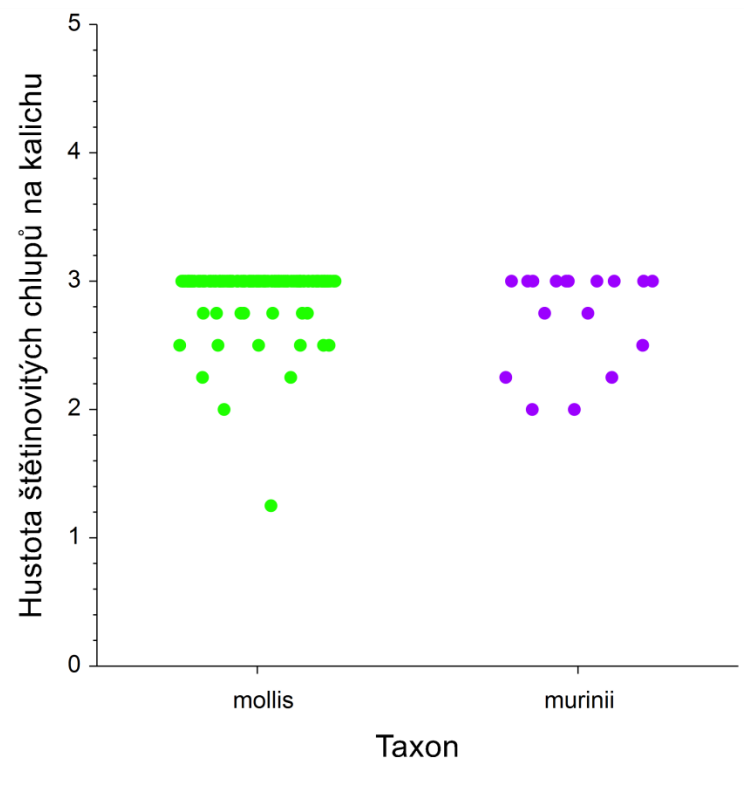
Obrázek č. 8: Variabilita šířky čepele letního listu [v cm].



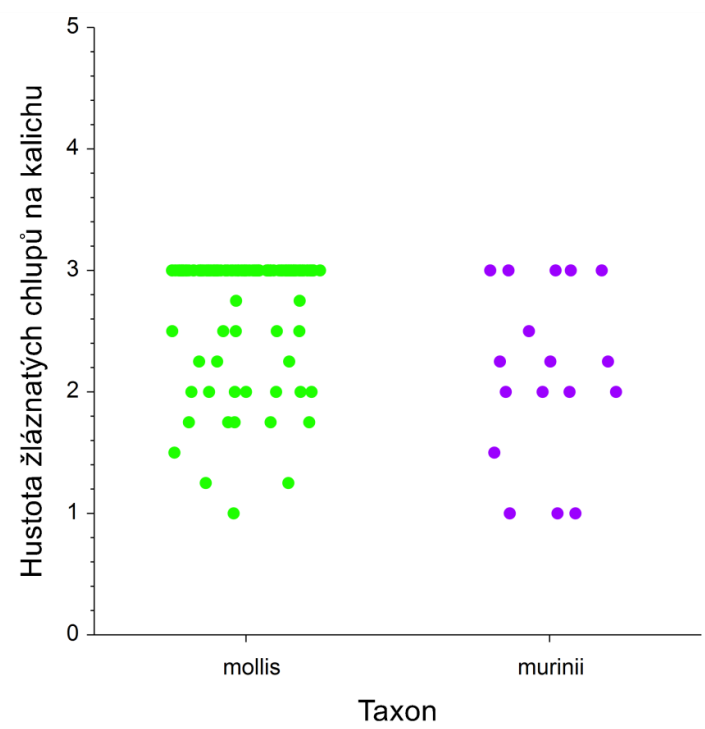
Obrázek č. 9: Variabilita délky koruny [v mm].



Obrázek č. 10: Variabilita hustoty štětinatých chlupů na kalichu.



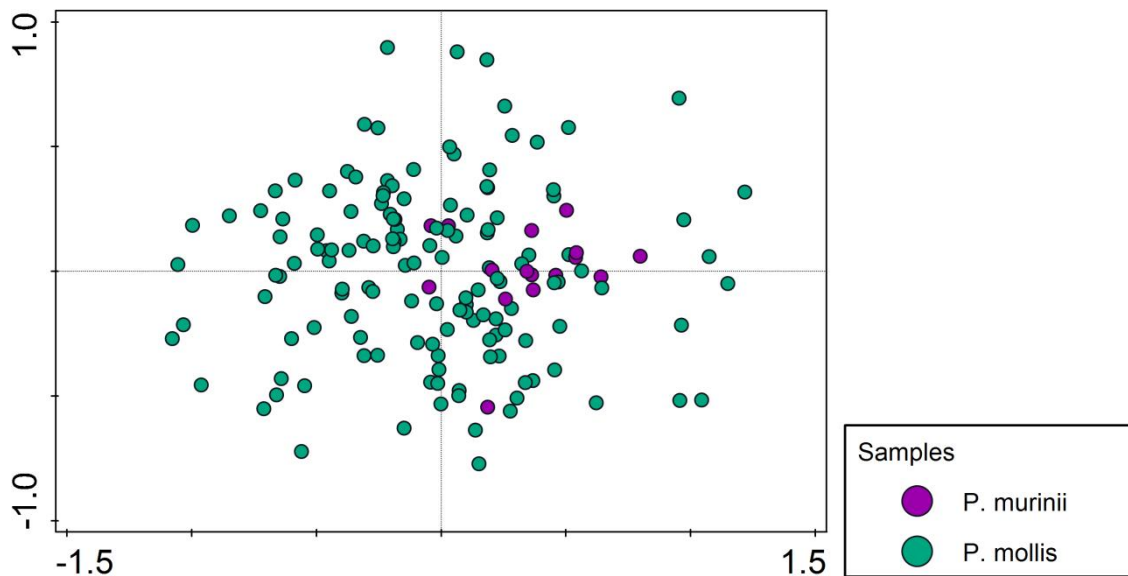
Obrázek č. 11: Variabilita hustoty žláznatých chlupů na kalichu.



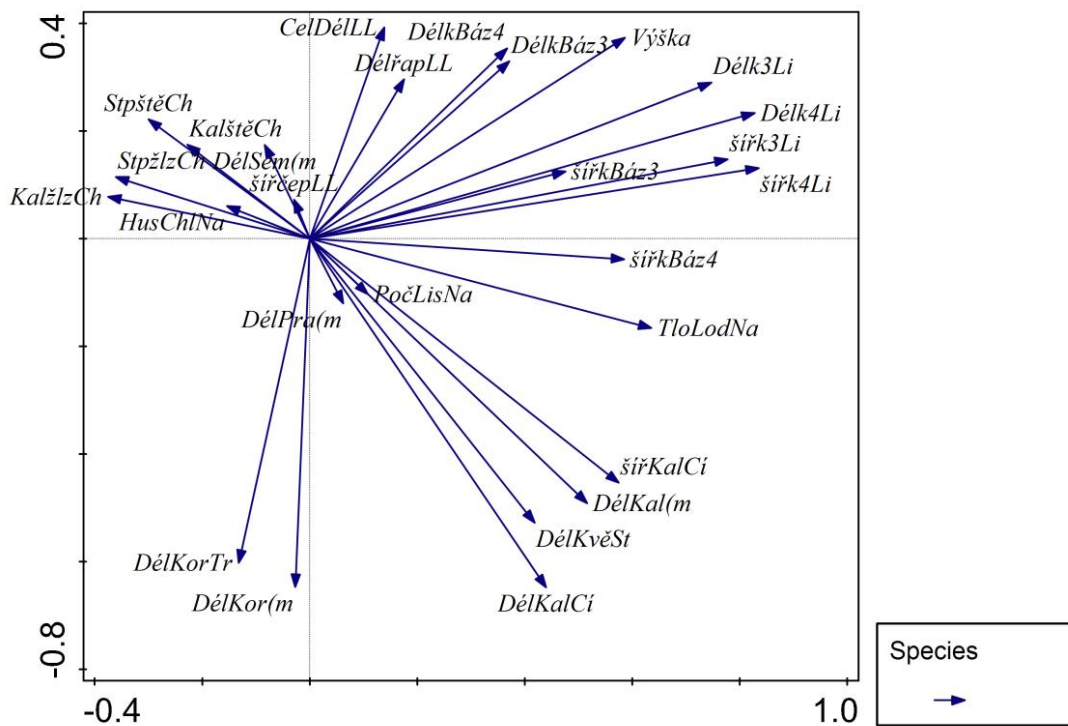
3.3 Analýza hlavních komponent (PCA)

Před provedením mnohorozměrných analýz byla testována korelace jednotlivých znaků. U znaku délka čepele letního listu docházelo k výrazné korelaci, a proto tento znak nebyl použit pro PCA (viz Příloha 3). První osa vysvětluje 20,9 % celkové variability. S touto osou nejvíce koreluje znak šířka 4. listu. Druhá osa vysvětluje 10,8 % celkové variability. S touto osou nejvíce koreluje znak šířka čepele letního listu. Z grafu není patrný rozdíl mezi studovanými cytotypy (viz obr. 12 a 13).

Obrázek č. 12: PCA ordinační diagram s použitím hodnot mediánů morfologických znaků pro jedince *P. mollis* a *P. murinii*. První dvě osy vysvětlují 31,7 % variability.



Obrázek č. 13: PCA ordinační diagram s použitím hodnot mediánů morfologických znaků pro *P. mollis* a *P. murinii*. První dvě osy vysvětlují 31,7 % variability.



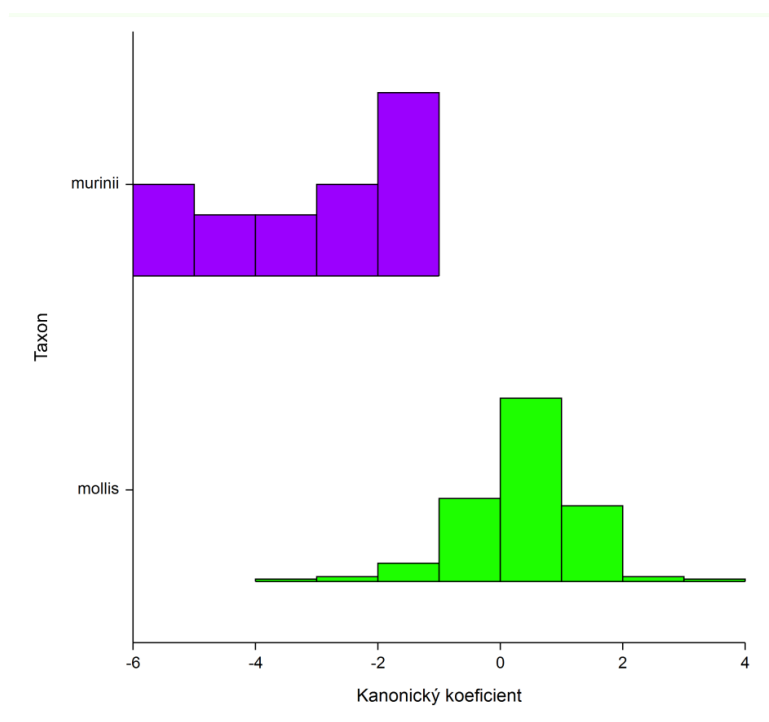
3.4 Kanonická diskriminační analýza (CDA)

Pro účely diskriminační analýzy byly použity všechny studované morfologické znaky, kromě délky čnělky. Pouze tato analýza dokázala slabě oba taxony odlišit (viz tab. 4; obr. 14).

Tabulka č. 4: Analýza kanonických proměnných v rámci hodnocení obou skupin.

F_n	F-value	DF Numer	DF Denom	P-value
1	4,9	28,0	127,0	< 0,001

Obrázek č. 14: Histogram z diskriminační analýzy.



Tabulka č. 5: Klasifikační tabulka vyjadřující účinnost diskriminační funkce pro rozlišení taxonů. Redukce v klasifikační chybě v důsledku využití diskriminační funkce, pokud by byli jedinci klasifikováni náhodně = 92,3%.

	Predikovaný <i>P.</i> <i>mollis</i>	Predikovaný <i>P.</i> <i>murinni</i>	celkem
<i>P. mollis</i>	135	5	140
<i>P. murinni</i>	1	15	16
celkem	136	20	156

Tabulka č. 6: Přehled znaků, které měly největší váhu při klasifikaci obou taxonů (označeny tučně).

Variable	P-value
Výška rostliny	0,048
Tloušťka lodyhy	0,020
Hustota chlupů na lodyze	< 0,001

Počet listů na lodyze	0,147
Délka 3. listu	0,004
Šířka 3. listu	0,908
Délka báze 3. listu	< 0,001
Šířka báze 3. listu	0,489
Délka 4. listu	0,001
Šířka 4. listu	0,257
Délka báze 4. listu	0,114
Šířka báze 4. listu	0,551
Délka květní stopky	0,958
Hustota štětinovitých chlupů na stopce	0,011
Hustota žláznatých chlupů na stopce	< 0,001
Délka kalicha	0,050
Délka kališního cípu	0,042
Šířka kališního cípu	0,058
Hustota štětinovitých chlupů na kalichu	0,006
Hustota žláznatých chlupů na kalichu	< 0,001
Délka koruny	0,314
Délka korunní trubky	0,025
Délka prašníku	0,930
Délka semeníku	0,516
Délka celého LL	0,679
Délka čepele LL	0,133
Šířka čepele LL	0,127
Délka řapíku LL	0,125

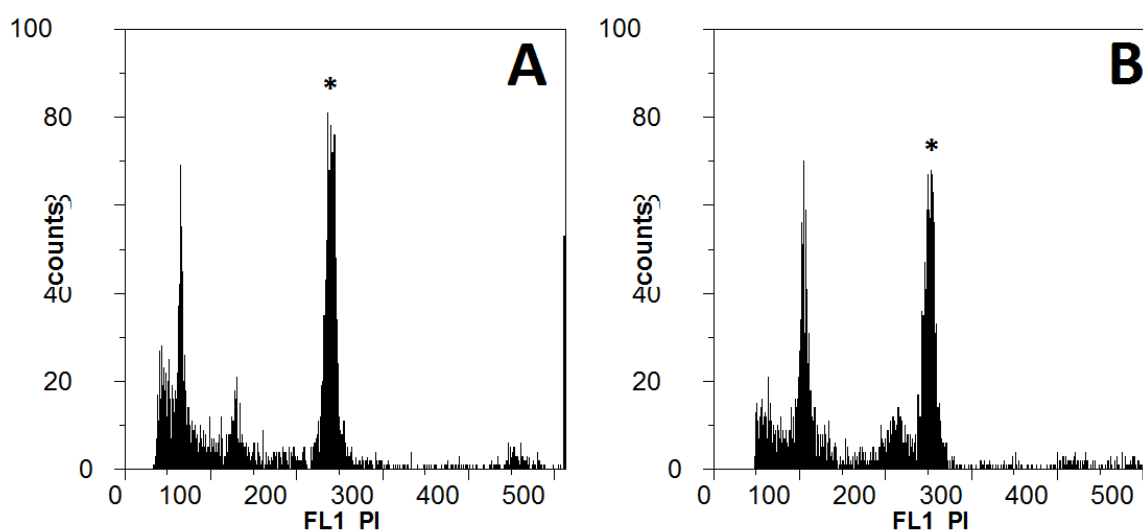
3.5 Cytologická variabilita *Pulmonaria mollis* a *P. murinii*.

Pomocí průtokového cytometru byla ověřena příslušnost rostlin k danému taxonu (obr. 16). Pro testování *Pulmonaria mollis* bylo použito 145 jedinců, které byly ze 17 lokalit České republiky a Slovenska (obr. 15B). Seznam studovaných lokalit *Pulmonaria mollis* je uveden v příloze 1. Vzdálenosti píků *P. mollis* a standardu *Pisum sativum* 'Ctirad' odpovídají dysploidnímu počtu chromozomů ($2n = 18$; Májovský & Murín 1980; Sauer 1987; Májovský & Hegedušová 1993). Pro testování *Pulmonaria murinii* byla použito 17 jedinců z 3 lokalit na Slovensku (obr. 15A). Seznam studovaných lokalit *Pulmonaria murinii* je uveden v příloze 2. Vzdálenosti píků *P. murinii* a standardu *Pisum sativum* 'Ctirad' odpovídají diploidnímu počtu chromozomů ($2n = 14$; Májovský & Murín 1980; Májovský & Hegedušová 1993).

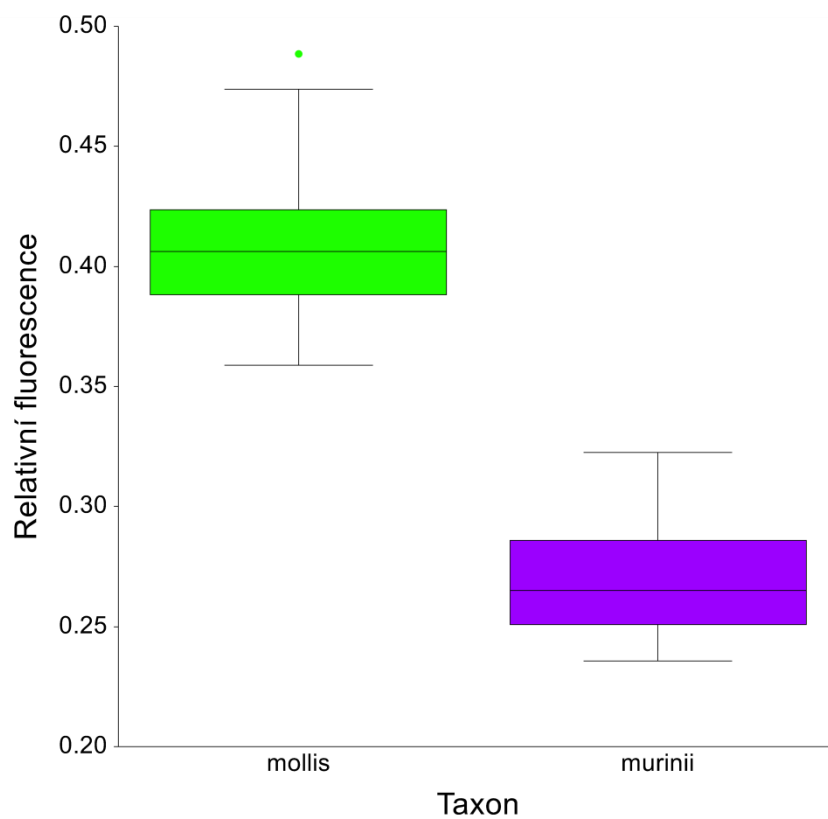
Tabulka č. 7: Hodnoty průměrů \pm s. d. u *Pulmonaria mollis* a *P. murinii*.

	Počet jedinců	Počet populací	Průměr \pm s. d.
<i>Pulmonaria mollis</i>	145	17	0,41 \pm 0,02
<i>Pulmonaria murinii</i>	17	3	0,27 \pm 0,02

Obrázek č. 15: Příklad výstupů z průtokového cytometru – A – *Pulmonaria murinii*; B – *P. mollis*; *standard *Pisum sativum* 'Ctirad'.



Obrázek č. 16: Ověření příslušnosti rostlin k danému taxonu.



4. Diskuze

4.1 Cytologická variabilita *Pulmonaria mollis* agg. a porovnání s jinými agregáty

Jelikož je u rodu *Pulmonaria* dysploidie velmi běžným jevem, jsou chromozomové počty důležitých rozpoznávacím znakem. Celkem je známo deset cytotypů. Právě dysploidie je u plicníků nejspíše východiskem z hybridního stavu (Sauer 1974; Meeus et al. 2016). V literatuře je uváděn rozdílný počet chromozomů mezi taxony *Pulmonaria mollis* a *P. murinii* jako jeden z hlavních rozeznávacích znaků. Wolkinger (1968), Sauer (1974, 1987), Májovský & Murín (1980), Májovský & Hegedušová (1993) i Křísa (2000) uvádí u *Pulmonaria mollis* dysploidní počet chromozomů ($2n = 18$). Májovský & Murín (1980) i Májovský & Hegedušová (1993) uvádí u *Pulmonaria murinii* diploidní počet chromozomů ($2n = 14$). V rámci diplomové práce byla úspěšně ověřena příslušnost rostlin k těmto taxonům pomocí průtokové cytometrie a z výsledků vyplývají 2 ploidní stupně (obr. 15). Tyto dva taxony mohou růst na některých místech Slovenska i na stejné lokalitě, důkazem je lokalita Vinohrady nad Váhom (Příloha 1, 2), kde oba taxony rostly dohromady a rozlišilo je až ověření průtokovou cytometrií.

Do stejného agregátu řadíme ještě další dva druhy *Pulmonaria montana* a *P. dacica*. U *Pulmonaria montana* je uváděn dysploidní počet chromozomů ($2n = 22, 24$; Sauer 1987; Kuličková 2016). Nejvíce komplikovaný druh z tohoto agregátu je *Pulmonaria dacica*, u kterého jsou uváděny diploidní počty chromozomů ($2n = 14$), triploidní ($2n = 21$), hypo- ($2n = 20$) a hypertriploidní ($2n = 22$), tetraploidní ($2n = 28$) i dysploidní počty chromozomů ($2n = 24$, Sauer 1987). Pokud porovnáme *Pulmonaria mollis* agg. s *P. angustifolia* agg., tak u *Pulmonaria angustifolia* agg. se vyskytuje pouze diploidní a hypotriploidní počet chromozomů. *Pulmonaria angustifolia* a *P. longifolia* mají diploidní počet chromozomů ($2n = 14$). *Pulmonaria australis* a *P. visiani* mají hypotriploidní počet chromozomů ($2n = 20$; Májovský & Murín 1980; Májovský & Murín 1987; Sauer 1987; Kook et al. 2014; Kuličková 2016). Například u agregátu *Pulmonaria officinalis* se vyskytuje diploidní a dysploidní počet chromozomů (*Pulmonaria officinalis* $2n = 16$; *P. obscura* $2n = 14$; Májovský & Hegedušová 1993; Křísa 2000).

4.2 Morfologická analýza *Pulmonaria mollis* a *P. murinii*

V rámci této práce bylo celkem testováno morfologicky i statisticky 162 jedinců, z toho 145 jedinců *Pulmonaria mollis* ze 17 lokalit České republiky a Slovenska a 17 jedinců *P. murinii* z 3 lokalit na Slovensku. Při morfometrické analýze bylo testováno 15 vegetativních a 10 generativních znaků. Podle literatury by se kromě odlišného počtu chromozomů *Pulmonaria murinii* měl dále lišit od *P. mollis* ve tvaru lodyžních listů, oděním kalicha a květních stopek a odlišnou barvou koruny (Májovský & Murín 1980; Májovský & Hegedúšová 1993; Křisa 2000). Odlišný tvar lodyžních listů se zdá být dobrým rozpoznávacím znakem. *Pulmonaria mollis* má střední lodyžní listy protáhlé a na bázi přisedlé, u *P. murinii* jsou lodyžní listy podlouhle vejčité až podlouhle kopinaté a většinou jsou užší než přízemní listy. Dolní lodyžní listy jsou poloobjímavé, střední lodyžní listy mají zaokrouhlenou nebo uťatou bázi. V literatuře je uváděno, že koruna je u plicníku měkkého více intenzivně fialová než u p. Murínova (Sauer 1974; Májovský & Hegedúšová 1993). Tento znak jsem ale netestovala. Problém nastává u oděním kalicha a květních stopek. Májovský & Hegedúšová (1993) uvádí, že u *Pulmonaria murinii* se na kalichu téměř nevyskytují štětinaté chlupy, ale při morfometrické analýze jsem štětinaté chlupy na kalichu odhadla pomocí poměrové škály v průměru 2,8, což odpovídá pokrytí štětinatých chlupů téměř 75% (viz obr. 10). Na květní stopce se podle Májovský & Hegedúšová (1993) vyskytují husté žláznaté chlupy a výrazné štětiny. Na základě morfometrické analýzy jsem zjistila, že pokrytí žláznatých chlupů je přibližně kolem 50% a pokrytí štětinatých chlupů je téměř 75%. U *Pulmonaria mollis* Májovský & Hegedúšová (1993) uvádí, že celá rostlina je hustě, měkce chlupatá s krátkými a štíhlými, někde hustšími, jinde řidšími chlupy, slabě drsná s roztroušenými delšími štětínami, na květenství se nachází husté stopkaté žláznaté chlupy. Při mém zjištění oděním květní stopky i kalicha odpovídalo hustotě chlupů téměř 75–100%. Proto si myslím, že tento znak není dobré používat pro rozlišování těchto taxonů, protože podle mých výsledků není signifikantní. Naopak u *Pulmonaria officinalis* agg. je znak oděním kalicha jedním z důležitých rozlišovacích znaků. Druh *Pulmonaria officinalis* je na kalichu více stopkatě žláznatý než *P. obscura* a tyto dlouhé žláznaté chlupy obvykle přesahují nad štětínami (Sauer 1972; Bolliger 1982; Dersch 1994).

Pokud porovnáваме *Pulmonaria mollis* agg. s *P. angustifolia* agg. je oděním kalicha a květních stopek dobrým rozlišovacím znakem, protože u agregátu *P. angustifolia* mají druhy na kalichu převážně štětinaté chlupy a buď jen roztroušené žláznaté chlupy, nebo zde žádné

žláznaté chlupy nenajdeme. Z toho vyplývá, že odění kalicha a květních stopek je dobrým rozlišovacím znakem spíše v porovnání s jinými agregáty.

Na základě provedených statistických metod se ukázalo, že ani jedna z metod, kromě kanonické diskriminační analýzy, nevykazuje valnou diferenciaci obou taxonů. Diskriminační analýza dokázala tyto taxony slabě odlišit. Ukázalo se, že tyto dva taxony jsou heterogenní samy o sobě. Můžeme si to vysvětlit dvojím způsobem, buď tyto dva taxony od sebe nelze dobře rozlišit, nebo bylo pro morfometrickou analýzu použito málo jedinců *Pulmonaria murinii*.

Podle mých výsledků populace taxonu *Pulmonaria murinii* byly signifikantně vyššího vzrůstu, měly signifikantně delší čepel lodyžního listu, delší kalich a delší řapík letního listu, naopak *P. mollis* měl signifikantně delší i širší čepel letního listu a delší korunu. Nemyslím si ale, že podle mých zjištěných signifikantních znaků by šly tyto 2 taxony jednoznačně odlišit. Domnívám se, že např. délka kalicha není dobrým znakem, kterým by tyto dva taxony od sebe daly jednoznačně odlišit. Délka kalicha se za plodu zvětšuje, a proto zjištěná vyšší hodnota délky kalicha *P. murinii* může být způsobena tím, že kalichy byly měřeny na rostlinách, které byly již v pokročilejším stádiu kvetení.

5. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala testováním morfologické variability *Pulmonaria mollis* a *P. murinii* na území České republiky a Slovenska.

V rámci morfologické analýzy byly vybrány vhodné znaky pro mezipopulační i vnitrodruhovou morfologickou variabilitu *P. mollis* a *P. murinii*. Pomocí Mann-Whitney U testu bylo celkem testováno 15 vegetativních a 10 generativních znaků na 145 jedincích *Pulmonaria mollis* a 17 jedincích *P. murinii* z přírodních populací České republiky a Slovenska. Populace taxonu *Pulmonaria murinii* byly signifikantně vyššího vzrůstu, měly signifikantně delší čepel lodyžního listu, delší kalich a delší řapík letního listu, naopak *Pulmonaria mollis* měl signifikantně delší i širší čepel letního listu a delší korunu. Jeden z hlavních znaků – odění kalicha a květní stopky, kterým by se tyto 2 taxony měly od sebe lišit, nelze jednoznačně použít. V rámci studovaného souboru nebyla nalezena značná morfologická mezidruhová variabilita. Tyto 2 taxony se od sebe liší odlišným počtem chromozomů, což bylo úspěšně potvrzeno pomocí průtokové cytometrie.

Při morfometrické analýze byly zjištěny většinou nižší hodnoty, než se uvádí v literatuře. To může být způsobeno tím, že loňskou i letošní sezónu, bylo poměrně velké sucho a rostliny neměly dostatek vody, aby vyrostly do větších rozměrů. Při morfologické analýze byly zjištěny také nižší hodnoty na letních listech. Je to nejspíše způsobeno opět suchem a také padlím, které rostliny napadalo.

6. Literatura

- BOLLIGER M. (1982): Die Gattung *Pulmonaria* in Westeuropa. – J. Cramer, Vaduz: 7–175.
- DERSCH G. (1994): Über *Pulmonaria officinalis* L., *Pulmonaria obscura* Dum. und ihren Bastard in Nordhessen und Südniedersachsen. – Hessische Floristische Briefe 43: 49–63.
- DOBROČZAYEVA D. M. (1957): *Pulmonaria* L. – In: Kotov M. I. & Barbarič A. I [eds.]: Flora USSR 8, ANURSR, Kyjev: 438–449.
- DOLEŽEL J. & BARTOŠ J. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. – Annals of Botany 95: 99–110.
- DOLEŽEL J., GREILHUBER J. & SUDA J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – Nature Protocols 2: 2233–2244.
- DOMIN K., PODPĚRA J., POLÍVKA F. (1928): Klíč k úplné květeně republiky Československé. – Olomouc: 1088.
- DOSTÁL J. (1950): Květena ČSR a ilustrovaný klíč k určení všech cévnatých rostlin. – Přírodovědecké nakladatelství, Praha.
- GREGOR T. & HAND R. (2014): Chromosomenzahlen von Farn- und Samenpflanzen aus Deutschland 8. – Kochia 8: 63–70.
- GUSULEAC M. (1960): *Pulmonaria* L. – In: Savulescu T. [red.]: Flora Republici Populare Romine 7, Academia RPR, Bucuresti: 254–271.
- HINTZE J. (2008): NCSS 2007: Number Cruncher Statistical System. – NCSS, Kaysville.
- CHYTRÝ M. [ed.] (2013): Vegetace České republiky 4, Lesní a křovinná vegetace. – Academia, Praha: 104, 316.
- JANICKA M. (2017): Ecology and chorology of *Pulmonaria mollis* Wulfen ex Kern. s.s. – spying migration routes? – Studia universitatis Babeş-Bolyai, Biologia, LXII, sp. Iss.
- JÁVORKA S. (1925): *Pulmonaria* L. – In: Magyar Flora, Studium, Budapest: 847–849.
- KERNER A. (1878): Monographia Pulmonariarum. – Oeniponte, Innsbruck: 1–75.

- KOBRLOVÁ L., HRONEŠ M., KOUTECKÝ P., ŠTECH M. & TRÁVNÍČEK B. (2016): *Symphytum tuberosum* complex in central Europe: cytogeography, morphology, ecology and taxonomy. – *Preslia* 88: 77–112.
- KOOK E., VEDLER E., PÜSSE K., KALAMEES R., REIER Ü. & PIHU S. (2014): Intra-individual ITS polymorphism and hybridization in *Pulmonaria obscura* Dumort. and *Pulmonaria angustifolia* L. (*Boraginaceae*). – *Plant Systematics & Evolution* 301: 893–910.
- KŘÍSA B. (2000): *Pulmonaria* L. – In: Slavík B. [ed.]: Květena ČR 6, Academia, Praha, 194–200.
- KULIČKOVÁ P. (2016): Rozšíření a taxonomická problematika plicníku měkkého (*Pulmonaria mollis*) a p. úzkolistého (*P. angustifolia*) v České republice a na Slovensku. – Bakalářská práce [depon. in Katedra zoologie, PřF UP, Olomouc].
- LUEBERT F., CECCHI L., FROHLICH M. W., GOTTSCHLING M., GUILLIAMS C. M., HASENSTAB-LEHMAN K. E., HILGER H. H., MILLER J. S., MITTELBACH M., NAZAIRE M., NEPI M., NOCENTINI D., OBER D., OLMSTEAD R. G., SELVI F., SIMPSON M. G., SUTORÝ K., VALDÉS B., WALDEN G. K. & WEIGEND M. (2016): Familial classification of the *Boraginales*. – *Taxon* 65: 502–522.
- MÁJOVSKÝ J. & HEGEDŮŠOVÁ Z. (1993): *Pulmonaria* L. – In: Bertová L. & Goliášová K. [eds]. Flóra Slovenska V/1, Veda, Bratislava: 57–73.
- MÁJOVSKÝ J. & MURÍN A. (1980): Cytotaxonomy of the genus *Pulmonaria* in Slovakia. – *Boletim da Sociedade Broteriana ser. 2*, 53: 725–739.
- MERXMÜLLER H. & SAUER W. (1972): *Pulmonaria* L. – In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A. [eds], *Flora Europaea*, vol. 3. Cambridge University Press, Cambridge: 100–102.
- MEEUS S., JANSSENS S., HELSEN K. & JACQUEMYN H. (2016): Evolutionary trends in the distylous genus *Pulmonaria* (*Boraginaceae*): Evidence of ancient hybridization and current interspecific gene flow. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 98: 63–73.
- PAWŁOWSKI B. (1962): Annotationes de Pulmonariis. – *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 31: 229–239.

- POPOV M. G. (1953): *Pulmonaria* L. – In: Flora URSS 19, ANSSSR, Moskva – Leningrad: 344–351.
- REFULIO-RODRIGUEZ N. F. & OLMSTEAD R. G. (2014): Phylogeny of *Lamiidae*. – American Journal of Botany 101: 287–299.
- SAUER W. (1972): Die Gattung *Pulmonaria* in Oberösterreich. – *Österreichische botanische Zeitschrift* 120: 33–50.
- SAUER W. (1974): Beitrag zur Kenntnis von *Pulmonaria montana* Lejeune und *P. mollis* Wulfen (recte: Wolff.) ex Hornemann in Mitteleuropa. – *Phyton (Horn)* 16: 239–264.
- SAUER W. (1975): Karyo-systematische Untersuchungen an der Gattung *Pulmonaria* (*Boraginaceae*): Chromosomen-Zahlen, Karyotyp-Analysen und allgemeine Hinweise auf die Entwicklungsgeschichte. – *Bibliotheca Botanica*, Stuttgart: 1–85.
- SAUER W. (1987): The *Pulmonaria dacica* group: its affinities with central and south-east European allies and with the genus *Paraskevia* (*Boraginaceae*). – *Plant Systematics & Evolution* 155: 257–276.
- SAUER W. & THIV M. (1995): Die Gattung *Pulmonaria* (*Boraginaceae*) in Baden-Württemberg. – *Jahreshefte der Gesellschaft für Naturkunde in Württemberg* 151: 281–344.
- SERVEDIO M. R. & NOOR M. A. F. (2003): The role of reinforcement in speciation: theory and data. – *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 339–364.
- SHISHKIN B. K. [ed.] (1953): Flora of the USSR, vol. 14 Tubiflorae, Akademii Nauk SSSR, Moskva – Leningrad: 258–263.
- SCHRANK F. P. 1818. *Observationum botanicarum sylloge: Genus Pulmonariae illustratum*. – *Verhandlungen der Kaiserlichen Leopoldinisch-Carolinischen Akademie der Naturforscher* 1: 94–104.
- SIMONKAI L. (1904): A magyar királyság területén honos *Pulmonaria* – fajai, fajtái és kiválóbb áletjelenségei. – *Növénytani Közlemények* 3: 100–115.
- SUDA J., KRAHULCOVÁ A., TRÁVNÍČEK P. & KRAHULEC F. (2006): Ploidy level versus DNA ploidy level: An appeal for consistent terminology. – *Taxon* 55: 447–450.

- TER BRAAK C. J. F. & ŠMILAUER P. (2012): CANOCO reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. – Microcomputer Power, Ithaca: 496.
- VALDÉS B. (2011): *Boraginaceae*. – In: Euro+Med Plantbase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity.
- VELASCO L. & GOFFMAN F. D. (1999): Chemotaxonomic significance of fatty acids and tocopherols in *Boraginaceae*. – *Phytochemistry* 52: 423–426.
- WEIGEND M., LUEBERT F., GOTTSCHLING M., COUVREUR T. L. P., HILGER H. H. & MILLER J. S. (2014): From capsules to nutlets – Phylogenetic relationships in the *Boraginales*. – *Cladistics* 30: 508–518.
- VINTER V. (2008): Rostliny pod mikroskopem (Základy anatomie cévnatých rostlin). – Vydavatelství UP Olomouc: 67.
- VINTER V. & MACHÁČKOVÁ P. (2013): Přehled morfologie cévnatých rostlin. – Univerzita Palackého v Olomouci: 62.
- WOLKINGER F. (1966): Chromosomenzahlen von *Pulmonaria maculosa*, *obscura* und *mollis*. – *Phyton (Horn)* 12: 91–95.
- WOLKINGER F. (1968): Chromosomenverhältnisse bei *Pulmonaria obscura* und *mollissima* aus der Tschechoslowakei. – *Phyton (Horn)* 13: 85–87.

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Trojčlenná poměrná škála hustoty chlupů.....	13
Tabulka č. 2: Hodnoty průměru, směrodatné odchyly, minima, maxima a mediánu pro každý znak u <i>P. murinii</i> (2n = 14) a <i>P. mollis</i> (2n = 18).....	15
Tabulka č. 3: Výsledek testu (Z) a probability level (P) u měřených znaků při morfometrické analýze.	22
Tabulka č. 4: Analýza kanonických proměnných v rámci hodnocení obou skupin.	30
Tabulka č. 5: Klasifikační tabulka vyjadřující účinnost diskriminační funkce pro rozlišení taxonů..	31
Tabulka č. 6: Přehled znaků, které měly největší váhu při klasifikaci obou taxonů (označeny tučně).	31
Tabulka č. 7: Hodnoty průměrů ± s. d. u <i>Pulmonaria mollis</i> a <i>P. murinii</i>	33

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Typy odění u r. <i>Pulmonaria</i> (Sauer 1995).....	3
Obrázek č. 2: Variabilita výšky rostlin [v cm]	24
Obrázek č. 3: Variabilita délky 3. listu [v cm].	24
Obrázek č. 4: Variabilita délky 4. listu [v cm].	25
Obrázek č. 5: Variabilita délky kalicha [v mm].	25
Obrázek č. 6: Variabilita délky řapíku letního listu [v cm].....	26
Obrázek č. 7: Variabilita délky čepele letního listu [v cm].....	26
Obrázek č. 8: Variabilita šířky čepele letního listu [v cm].....	27
Obrázek č. 9: Variabilita délky koruny [v mm].....	27
Obrázek č. 10: Variabilita hustoty štětinatých chlupů na kalichu.	28
Obrázek č. 11: Variabilita hustoty žláznatých chlupů na kalichu.	28
Obrázek č. 12: PCA ordinační diagram s použitím hodnot mediánů morfologických znaků pro jedince <i>P. mollis</i> a <i>P. murinii</i>	29
Obrázek č. 13: PCA ordinační diagram s použitím hodnot mediánů morfologických znaků pro <i>P. mollis</i> a <i>P. murinii</i>	30
Obrázek č. 14: Histogram z diskriminační analýzy.	31
Obrázek č. 15: Příklad výstupů z průtokového cytometru – A – <i>Pulmonaria murinii</i> ; B – <i>P. mollis</i> ; *standard <i>Pisum sativum</i> 'Ctirad'.	33
Obrázek č. 16: Ověření příslušnosti rostlin k danému taxonu.....	34

Seznam příloh

Příloha č. 1: Přehled studovaných lokalit <i>P. mollis</i>	46
Příloha č. 2: Přehled studovaných lokalit <i>P. murinii</i>	49
Příloha č. 3: Hodnoty Spearmanových korelačních koeficientů – 1. část.	50
Příloha č. 3: Hodnoty Spearmanových korelačních koeficientů – 2. část.	50

Příloha č. 1: Přehled studovaných lokalit *P. mollis*

Lokalita	GPS	Počet rostlin	Datum	Sběratel
CZ, Prusinovice, Kruhy u Tučap (bývalá rezervace), okraje zarostlé akátiny a přilehlá louka, 349 m n. m.	49°21'52.0"N 17°35'55.2"E	5	14. 4. 2015	LK&PK
CZ, Pacetluky, travnatá stráň u cesty nad kapličkou v obci, 423 m n. m.	49°22'54.5"N 17°33'50.5"E	5	14. 4. 2015	LK&PK
CZ, Moravský Krumlov, 900 m S od nádraží, 340 m n. m.	49°2'34.980"N, 16°20'54.194"E	10	20. 4. 2018	PK
CZ, Jaroměřice nad Rokytou, rybník Vlčák na Ostrém potoce, 450 m n. m.	49°6'22.533"N, 15°53'54.401"E	10	30. 4. 2018	PK
CZ, Jaroměřice nad Rokytou, zahrádka pod rybníkem Janák na Příložanském potoce, 425 m n. m.	49°5'32.690"N, 15°54'31.252"E	10	30. 4. 2018	PK

CZ, Hluboké Mašůvky, louka u Plenkovického potoka, 300 m n. m.	48°55'38.581"N, 16°0'38.521"E	10	21. 4. 2019	PK
CZ, Jezeřany-Maršovice, podél silnice v oboře Moravský Krumlov, 300 m n. m.	49°2'15.143"N, 16°24'40.633"E	10	21. 4. 2019	PK
CZ, Bojkovice, 300 m JV od vrchu Kamenná, 325 m n. m.	49°3'58.232"N, 17°48'35.927"E	10	27. 4. 2019	PK
CZ, Šumice, u Rudického potoka, 275 m n. m.	49°2'16.524"N, 17°45'52.317"E	10	27. 4. 2019	PK
CZ, Vrbovce, asi 200 m J od nádraží Vrbovce, 375 m n. m.	48°49'20.216"N, 17°30'59.134"E	10	27. 4. 2019	PK
CZ, Lopeník, u značky konce obce Lopeník po pravé straně, 560 m n. m.	48°56'58.872"N, 17°46'58.076"E	10	27. 4. 2019	PK
CZ, Suchovské Mlýny, louka nad obcí, 400 m n. m.	48°52'51.097"N, 17°35'5.530"E	10	27. 4. 2019	PK

SK, Vinohrady nad Váhom, v příkopu silnice na západním okraji lesa Dubník, 195 m n. m.	48°19'34.101"N, 19°0'11.834"E	2	23. 4. 2018	LK&MH
CZ, Radějov, Čertův mlýn, vlhké louky a křoviny na pravém břehu Radějovky, 280 m n. m.	48°51'35.620"N, 17°22'49.220"E	10	15. 4. 2018	LK&MH
CZ, Korytná, J okraj PP Nové louky, 545 m n. m.	48°55'4.083"N, 17°40'40.222"E	10	23. 4. 2018	LK&MH
SK, Koliňany, suché louky a okraje vinic na J svahu Koliňanského vrchu, 300–325 m n. m.	48°20'46.653"N, 18°11'37.322"E	4	23. 4. 2018	LK&MH
SK, Senec, Svätý Martin, les JV osady, 150 m n. m.	48°15'3.131"N, 17°22'40.098"E	9	23. 4. 2018	LK&MH

Příloha č. 2: Přehled studovaných lokalit *P. murinii*

Lokalita	GPS	Počet rostlin	Datum	Sběratel
SK, Vinohrady nad Váhom, v příkopu silnice na západním okraji lesa Dubník, 195 m n. m.	48°19'31.129"N, 17°46'33.696"E	8	23. 4. 2018	LK&MH
SK, Chľaba, křoviny na okraji lesa asi 800 m SZ obce, 115 m n. m.	47°50'14.895"N, 18°49'22.636"E	1	28. 4. 2019	LK&MH
SK, Devičie, suchá louka v údolí Devičianskeho potoka, asi 1,4 km SZ obce, 345 m n. m.	48°19'34.101"N, 19°0'11.834"E	8	28. 4. 2019	LK&MH

*LK – Lucie Koblrová, MH – Michal Hroneš, PK – Petra Kuličková

Příloha č. 3: Hodnoty Spearmanových korelačních koeficientů – 1. část

	výška cm	tloušťka lodyhy nad 1. listem	hustota chlupů na lodyze	počet listů na lodyze	délka 3. listu cm	šířka 3. listu cm	délka báze 3. listu	šířka báze 3. listu	délka 4. listu cm	šířka 4. listu cm	délka báze 4. listu	šířka báze 4. listu	délka květní stopky mm	stopka štětinovité chlupy hustota
výška cm	1	0,225585	-0,06518	0,101649	0,623443	0,419581	0,280911	0,248603	0,66808	0,469596	0,200872	0,239391	0,125594	-0,059063
tloušťka lodyhy nad 1. listem	0,225585	1	-0,117528	0,329729	0,354612	0,435498	0,157823	0,238017	0,453484	0,476501	0,16692	0,322853	0,332974	-0,240113
hustota chlupů na lodyze	-0,06518	-0,117528	1	-0,059081	-0,036599	0,038256	-0,176826	0,038463	-0,085494	-0,097075	0,033389	0,012821	-0,0406	0,228923
počet listů na lodyze	0,101649	0,329729	-0,059081	1	-0,00841	-0,078361	-0,052526	0,031881	0,07629	0,015911	-0,024245	0,01698	0,15679	-0,080097
délka 3. listu cm	0,623443	0,354612	-0,036599	-0,00841	1	0,666737	0,331304	0,144739	0,84786	0,617987	0,248252	0,168763	0,177838	-0,121839
šířka 3. listu cm	0,419581	0,435498	0,038256	-0,078361	0,666737	1	0,249388	0,31491	0,623236	0,792119	0,263359	0,32799	0,25672	-0,122373
délka báze 3. listu	0,280911	0,157823	-0,176826	-0,052526	0,331304	0,249388	1	0,301383	0,381002	0,228719	0,397029	0,295838	0,054331	0,078517
šířka báze 3. listu	0,248603	0,238017	0,038463	0,031881	0,144739	0,31491	0,301383	1	0,255508	0,37764	0,279532	0,618097	0,112867	-0,034493
délka 4. listu cm	0,66808	0,453484	-0,085494	0,07629	0,84786	0,623236	0,381002	0,255508	1	0,723808	0,289602	0,269627	0,239457	-0,125589
šířka 4. listu cm	0,469596	0,476501	-0,097075	0,015911	0,617987	0,792119	0,228719	0,37764	0,723808	1	0,214093	0,393236	0,246052	-0,155904
délka báze 4. listu	0,200872	0,16692	0,033389	-0,024245	0,248252	0,263359	0,397029	0,279532	0,289602	0,214093	1	0,307136	0,036977	-0,059162
šířka báze 4. listu	0,239391	0,322853	0,012821	0,01698	0,168763	0,32799	0,295838	0,618097	0,269627	0,393236	0,307136	1	0,240933	-0,06517
délka květní stopky mm	0,125594	0,332974	-0,0406	0,15679	0,177838	0,25672	0,054331	0,112867	0,239457	0,246052	0,036977	0,240933	1	-0,174018
stopka štětínovité chlupy hustota	-0,059063	-0,240113	0,228923	-0,080097	-0,121839	-0,122373	0,078517	-0,034493	-0,125589	-0,155904	-0,059162	-0,06517	-0,174018	1
stopka žláznaté chlupy hustota	-0,058027	-0,14119	0,250425	-0,065043	-0,233128	-0,141112	-0,02231	-0,054695	-0,276167	-0,223181	-0,006113	-0,196415	-0,103562	0,172155
délka kalicha mm	0,245834	0,254258	-0,057694	-0,026523	0,226979	0,287313	0,053509	0,167971	0,309469	0,390398	-0,059301	0,230591	0,443532	-0,194263
délka kališního cípu mm	-0,036328	0,406028	-0,206737	0,171277	0,114474	0,213576	-0,028961	0,067477	0,154342	0,283915	-0,084615	0,167019	0,514371	-0,319579
šířka kališního cípu mm	0,086384	0,428881	-0,135437	0,160212	0,20649	0,378963	0,067075	0,233115	0,295979	0,43937	-0,018991	0,33949	0,451185	-0,297104
kalich štětínovité chlupy hustota	-0,155216	-0,212794	0,21678	-0,078189	-0,171269	-0,138502	0,022573	-0,039094	-0,168924	-0,143899	-0,067769	-0,038889	-0,179576	0,898917
kalich žláznaté chlupy hustota	-0,066265	-0,207818	0,170814	-0,089574	-0,276144	-0,19746	-0,043837	-0,004444	-0,246876	-0,194178	-0,071292	-0,14296	-0,104714	0,241767
délka koruny mm	-0,195581	-0,023973	0,118059	-0,050733	-0,133741	-0,005921	-0,115845	-0,059075	-0,127594	-0,076802	-0,059144	0,104204	0,269475	0,093868
délka korunní trubky mm	-0,237797	-0,067396	0,162666	-0,040517	-0,188216	-0,086122	-0,249721	-0,070009	-0,227687	-0,127442	-0,191437	0,002707	0,146093	0,107311
délka prašníku mm	0,185026	0,073082	-0,021652	-0,08595	0,048323	0,002147	-0,064997	0,08452	0,024579	0,027483	-0,120121	0,064931	0,067954	0,03478
délka semeník mm	-0,074704	-0,003567	0,05157	-0,117426	0,086123	-0,020415	0,071411	-0,039205	0,003596	-0,041655	0,171755	-0,113783	-0,05007	0,01905
celá délka LL cm	0,230976	0,032808	-0,050228	0,049454	0,063524	0,048518	0,001546	0,100919	0,119458	0,134543	0,081019	0,108267	-0,048366	-0,087257
délka čepele LL cm	0,171442	0,064085	-0,058508	0,069596	0,022032	0,040204	-0,007875	0,060362	0,057859	0,09438	0,028486	0,021294	-0,093998	-0,048573
šířka čepele LL cm	-0,11658	0,091044	-0,049169	0,25629	-0,188934	-0,040682	-0,09392	0,100115	-0,139737	0,06324	-0,131012	0,059107	-0,06853	-0,052936
délka řapíku LL cm	0,179529	-0,033839	0,024586	-0,026027	0,055286	0,019412	0,012819	0,12198	0,107883	0,119368	0,112286	0,219648	0,035315	-0,070694

Příloha č. 3: Hodnoty Spearmanových korelačních koeficientů – 2. část

	stopka žláznaté chlupy hustota	délka kalicha mm	délka kališního cípu mm	šířka kališního cípu mm	kalich štětínovité chlupy hustota	kalich žláznaté chlupy hustota	délka koruny mm	délka korunní trubky mm	délka prašníku mm	délka semeníku mm	celá délka LL cm	délka čepele LL cm	šířka čepele LL cm	délka řapíku LL cm
výška cm	-0,058027	0,245834	-0,036328	0,086384	-0,155216	-0,066265	-0,195581	-0,237797	0,185026	-0,074704	0,230976	0,171442	-0,11658	0,179529
tloušťka lodyhy nad 1. listem	-0,14119	0,254258	0,406028	0,428881	-0,212794	-0,207818	-0,023973	-0,067396	0,073082	-0,003567	0,032808	0,064085	0,091044	-0,033839
hustota chlupů na lodyze	0,250425	-0,057694	-0,206737	-0,135437	0,21678	0,170814	0,118059	0,162666	-0,021652	0,05157	-0,050228	-0,058508	-0,049169	0,024586
počet listů na lodyze	-0,065043	-0,026523	0,171277	0,160212	-0,078189	-0,089574	-0,050733	-0,040517	-0,08595	-0,117426	0,049454	0,069596	0,25629	-0,026027
délka 3. listu cm	-0,233128	0,226979	0,114474	0,20649	-0,171269	-0,276144	-0,133741	-0,188216	0,048323	0,086123	0,063524	0,022032	-0,188934	0,055286
šířka 3. listu cm	-0,141112	0,287313	0,213576	0,378963	-0,138502	-0,19746	-0,005921	-0,086122	0,002147	-0,020415	0,048518	0,040204	-0,040682	0,019412
délka báze 3. listu	-0,02231	0,053509	-0,028961	0,067075	0,022573	-0,043837	-0,115845	-0,249721	-0,064997	0,071411	0,001546	-0,007875	-0,09392	0,012819
šířka báze 3. listu	-0,054695	0,167971	0,067477	0,233115	-0,039094	-0,004444	-0,059075	-0,070009	0,08452	-0,039205	0,100919	0,060362	0,100115	0,12198
délka 4. listu cm	-0,276167	0,309469	0,154342	0,295979	-0,168924	-0,246876	-0,127594	-0,227687	0,024579	0,003596	0,119458	0,057859	-0,139737	0,107883
šířka 4. listu cm	-0,223181	0,390398	0,283915	0,43937	-0,143899	-0,194178	-0,076802	-0,127442	0,027483	-0,041655	0,134543	0,09438	0,06324	0,119368
délka báze 4. listu	-0,006113	-0,059301	-0,084615	-0,018991	-0,067769	-0,071292	-0,059144	-0,191437	-0,120121	0,171755	0,081019	0,028486	-0,131012	0,112286
šířka báze 4. listu	-0,196415	0,230591	0,167019	0,33949	-0,038889	-0,14296	0,104204	0,002707	0,064931	-0,113783	0,108267	0,021294	0,059107	0,219648
délka květní stopky mm	-0,103562	0,443532	0,514371	0,451185	-0,179576	-0,104714	0,269475	0,146093	0,067954	-0,05007	-0,048366	-0,093998	-0,06853	0,035315
stopka štětínovité chlupy hustota	0,172155	-0,194263	-0,319579	-0,297104	0,898917	0,241767	0,093868	0,107311	0,03478	0,01905	-0,087257	-0,048573	-0,052936	-0,070694
stopka žláznaté chlupy hustota	1	-0,070133	-0,275203	-0,312923	0,168471	0,841329	0,096642	0,027629	0,003906	0,184676	0,19147	0,325707	0,235926	-0,100519
délka kalicha mm	-0,070133	1	0,495889	0,479561	-0,192278	-0,006282	0,347563	0,162781	0,177614	0,015358	0,019774	0,010781	-0,066131	0,013216
délka kališního cípu mm	-0,275203	0,495889	1	0,573058	-0,272628	-0,242354	0,200586	0,042483	0,080405	-0,095284	-0,157836	-0,158254	-0,027028	-0,081511
šířka kališního cípu mm	-0,312923	0,479561	0,573058	1	-0,248435	-0,253167	0,05266	0,020071	-0,028159	0,00158	-0,023314	-0,052766	0,044167	0,035338
kalich štětínovité chlupy hustota	0,168471	-0,192278	-0,272628	-0,248435	1	0,233533	0,159431	0,173346	0,004594	0,01168	-0,058583	-0,032561	0,021032	-0,038352
kalich žláznaté chlupy hustota	0,841329	-0,006282	-0,242354	-0,253167	0,233533	1	0,081318	0,023353	0,111096	0,248201	0,169895	0,280232	0,247712	-0,0644
délka koruny mm	0,096642	0,347563	0,200586	0,05266	0,159431	0,081318	1	0,64148	0,085631	-0,012788	-0,130631	-0,096683	-0,055463	-0,114
délka korunní trubky mm	0,027629	0,162781	0,042483	0,020071	0,173346	0,023353	0,64148	1	0,026488	-0,095908	-0,108175	-0,070569	-0,04798	-0,103609
délka prašníku mm	0,003906	0,177614	0,080405	-0,028159	0,004594	0,111096	0,085631	0,026488	1	0,012345	-0,061793	-0,017172	-0,096823	-0,100058
délka semeník mm	0,184676	0,015358	-0,095284	0,00158	0,01168	0,248201	-0,012788	-0,095908	0,012345	1	0,14984	0,178777	0,074966	0,036856
celá délka LL cm	0,19147	0,019774	-0,157836	-0,023314	-0,058583	0,169895	-0,130631	-0,108175	-0,061793	0,14984	1	0,9146	0,407204	0,679243
délka čepele LL cm	0,325707	0,010781	-0,158254	-0,052766	-0,032561	0,280232	-0,096683	-0,070569	-0,017172	0,178777	0,9146	1	0,50079	0,348815
šířka čepele LL cm	0,235926	-0,066131	-0,027028	0,044167	0,021032	0,247712	-0,055463	-0,04798	-0,096823	0,074966	0,407204	0,50079	1	0,041569
délka řapíku LL cm	-0,100519	0,013216	-0,081511	0,035338	-0,038352	-0,0644	-0,114	-0,103609	-0,100058	0,036856	0,679243	0,348815	0,041569	1