

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Genetická a morfologická variabilita skupiny
Melampyrum nemorosum

Diplomová práce

Bc. Petr Drahník

Školitel: Ing. Milan Štech, Ph.D.

České Budějovice 2016

DRAHNÍK P. (2016): Genetická a morfologická variabilita skupiny *Melampyrum nemorosum*. [Genetic and morphological variability of *Melampyrum nemorosum*. Mgr. Thesis, in Czech] - počet stránek 55, počet stránek přílohy 25, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Melampyrum nemorosum agg. je značně komplikovaná skupina poloparazitických rostlin. Podle tradičního pojetí se rozlišuje na 15 druhů. Molekulární analýzy z posledních let ukazují potřebu moderní taxonomické revize. Problematika celé skupiny je komplexní v důsledku pravděpodobné historické hybridizace a složité evoluční historie celé skupiny. Sekvence 3 úseků cpDNA (trnT^{UGU}-trnL^{UAA}, psbA-trnH^{GUG}, rpl32-trnL^{UAG}) a 2 úseků jaderné DNA (Agt1 a At103) rozlišila několik geneticky odlišených skupin, u kterých byly provedeny morfologické a cytometrické analýzy.

Annotation

Melampyrum nemorosum agg. is very complicated group of hemiparasitic plants. According to the traditional concept, 15 species is distinguished. Recent molecular analyses show a need of critical taxonomic revision of group and a potential importance of ancient hybridization. Analysis of 3 regions of cpDNA (trnT^{UGU}-trnL^{UAA}, psbA-trnH^{GUG}, rpl32-trnL^{UAG}) and 2 regions of nuclear DNA (Agt1 and At103) reveals well supported lineage with limited geographical distribution. Morphology and genome size of genetically supported lineages were compared.

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

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

V Českých Budějovicích 21. 4. 2016

.....
Podpis studenta

*„Dříve než budu pokračovat, udělám několik pokusů,
protože zamýšlím nejprve uvést, co praví zkušenost,
a pak s pomocí úsudku dosvědčit,
proč zkušenost koná právě tak.*

*A tímto pravidlem se musí řídit každý, kdo bádá o jevech
přírody.“*

Leonardo da Vinci, kol. 1513

Poděkování

Mou milou povinností je poděkovat všem, kteří se podíleli na zrodu této práce. Především bych chtěl poděkovat mému školiteli Milanu Štechovi za ochotu, cenné rady, trpělivost a přemíru času, který mi věnoval. Petru Kouckému za cenné připomínky ohledně průtokové cytometrie a poskytnutí funkcí pro Erko, Jirkovi Košnarovi za pomoc a rady v laboratoři. Rád bych také poděkoval těm, kteří se jakýmkoliv způsobem podíleli na sbírání mých vzorků.

V neposlední řadě bych rád poděkoval rodičům, prarodičům a sestře za skálopevnou podporu jak při mém studiu, tak i v osobním životě.

***** DĚKUJI *****

Práce byla z části financována grantem Studentské grantové agentury Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích 2015.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Vymezení rodu <i>Melampyrum</i>	1
1.2. <i>Melampyrum nemorosum</i> agg.	3
1.3. Morfologická variabilita	4
1.3.1. Sezónní variabilita	4
1.3.2. Variabilita ovlivněná hostitelem	5
1.4. Nové poznatky o skupině <i>M. nemorosum</i>	6
1.4.1. Analýzy chloroplastové DNA	6
1.4.2. Cytometrické analýzy	10
1.4.3. Morfometrické analýzy	11
1.5. Cíle práce	12
2. Metodika	13
2.1. Sběr materiálu	13
2.2. Sekvenování	14
2.2.1. Izolace DNA	14
2.2.2. PCR, purifikace a příprava sekvenační směsi	15
2.3. Průtoková cytometrie	18
2.3.1. Měření a příprava vzorků	18
2.3.2. Zpracování a hodnocení dat	19
2.4. Morfometrické analýzy	20
2.4.1. Měření morfologických znaků	20
2.4.2. Statistické zpracování dat	23
3. Výsledky	25
3.1. Molekulární analýzy	25
3.1.1. Chloroplastová DNA	25
3.1.2. Jaderná DNA	28
3.1.2.1. Agt1	28
3.1.2.2. At103	31
3.2. Cytometrické analýzy	32
3.3. Morfometrické analýzy	38

3.3.1. Analýza hlavních komponent.....	39
3.3.2. Kanonická diskriminační analýza.....	40
4. Diskuze.....	45
5. Závěr.....	48
6. Použitá literatura.....	49
Přílohy.....	56

1. Úvod

1.1. Vymezení rodu *Melampyrum*

Rod *Melampyrum* L. je morfologicky proměnlivý poloparazitický rod z čeledi *Orobanchaceae* (OLMSTEAD et al. 2001, WOLFE et al. 2005, BENETT et MATTHEWS 2006). Do této čeledi patří společně s dalšími poloparazitickými rody jako např. *Rhinanthus*, *Euphrasia* a *Odontites*. Původně byly tyto rody řazeny do čeledi *Scrophulariaceae* (HARTL 1974, SOÓ et WEBB 1972, ZOPFI 1995) až do doby, kdy molekulární analýzy prokázaly polyfyletičnost této čeledi a poloparazitické rody byly přesunuty do čeledi *Orobanchaceae*. V recentních studiích je tato čeleď označována za největší monofyletickou skupinu zahrnující jak poloparazitické tak i parazitické druhy (HEIDE-JØGENSEN 2008).

V současnosti se do rodu *Melampyrum* řadí podle různých taxonomických pojetí 20–40 druhů. Rod se vyskytuje ve třech samostatných arelech (Obr. 1), přičemž největší z nich je na území Evropy a zasahuje výskytem několika druhů až na Sibiř, Kavkaz a do Malé Asie. Druhá arela zahrnuje východní Asii (WU et RAVEN 1998) a třetí arela se nalézá na území Severní Ameriky, kde roste pouze jediný druh, a to *M. lineare* (BRITTON et BROWN 1913, SOÓ 1926–1927). Vývojová centra rodu a oblasti s největším druhovým zastoupením se nacházejí v jihovýchodní Evropě, a to především na Balkánském poloostrově, v jihovýchodních Alpách a na Kavkaze (SOÓ 1926–1927).

K hlavní diverzifikaci rodu s největší pravděpodobností došlo v období třetihor, kdy se zřejmě roztrhl evropský a asijský areál. Další diverzifikace poté probíhaly v pleistocénu díky kvartérním klimatickým změnám, izolaci a následné postglaciální migraci (SOÓ 1927, WESSELINGH et VAN GROENENDAEL 2005, WOLFE et al. 2005, TĚŠITEL 2005).

V celém rodě se vyskytují pouze jednoleté poloparazitické druhy s jednotným diploidním počtem chromosomů ($2n=18$).

Většina druhů rodu *Melampyrum* je na území větší části Evropy morfologicky dobře vymezena. Těmito druhy jsou například *M. arvense*, *M. cristatum* a *M. pratense*, které lze

snadno rozeznat díky mnoha znakům ve tvaru koruny, tvaru a odění kalicha, pukání tobolky a jiných.

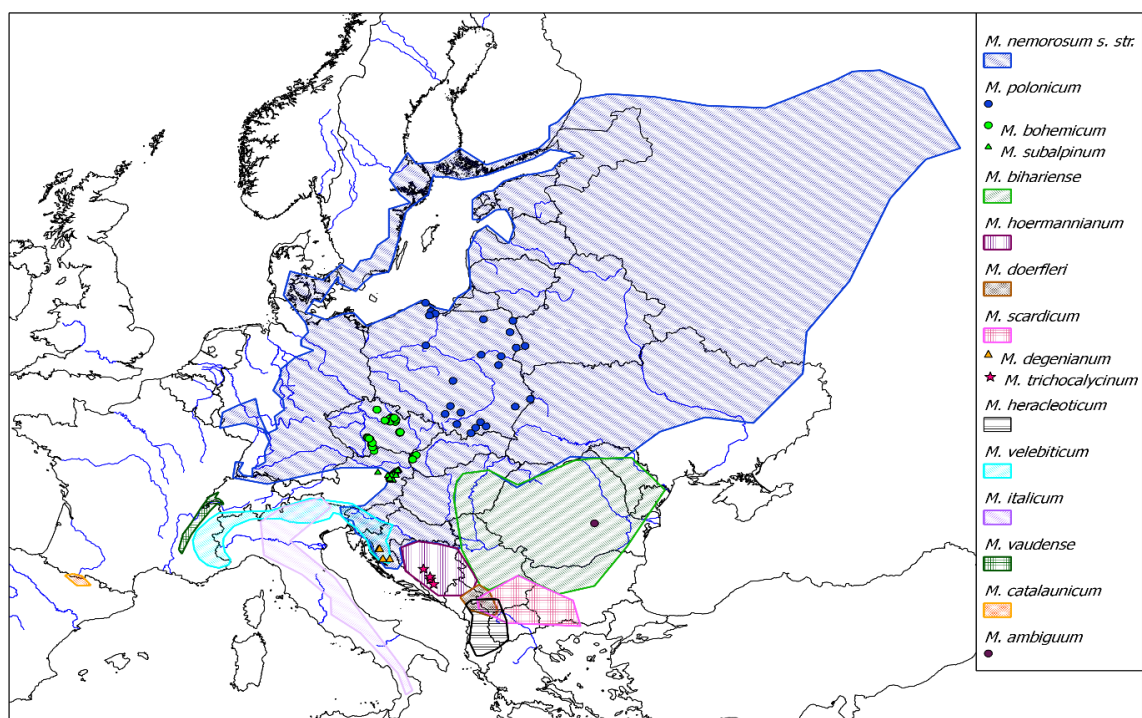


Obr. 1: Rozšíření rodu *Melampyrum*

Vedle těchto druhů se na území střední Evropy vyskytuje několik taxonomicky kritických skupin, mezi které patří např. *M. nemorosum* agg. a *M. sylvaticum* agg. Samotné rozlišení skupin nečiní potíže, problém nastává, pokud chceme rozlišit jednotlivé druhy uvnitř skupin. Díky velkým nejasnostem ve vymezení jednotlivých druhů uvnitř skupiny je okruh *Melampyrum nemorosum* tak komplikovaný a zajímavý. Celá skupina byla v minulosti členěna na několik podskupin, ale koncepce a klasifikace různých autorů se výrazně liší. V minulém století se touto problematikou zabývali převážně Ronniger (1911, 1918), Beauverd (1916) a Soó (1926–1927). Jejich koncepce se převážně liší v druhovém vymezení. Zatímco Beauverd (1916) zahrnul všechny dnes rozlišované druhy do jediného druhu s mnoha varietami a poddruhy, Soó (1926–1927) rozdělil celou skupinu (v jeho pojetí ser. *Eunemorosa*) na 15 samostatných druhů. Tato Sóova druhová koncepce se během let prosadila a stala se základem zpracování rodu pro *Flora Europaea* (SOÓ et WEBB 1972). Dosavadní molekulární analýzy však naznačují, že Soóvo zpracování rodu *Melampyrum* neodpovídá skutečnosti a vztahy mezi jednotlivými druhy uvnitř skupiny jsou znatelně odlišné. To samé se týká evoluční historie skupiny (ŠTECH 1998, CHLUMSKÝ 2007, LI et al. 2008).

1.2. Melampyrum nemorosum agg.

Skupina *M. nemorosum* je poměrně velkou skupinou, která bývá podle tradiční Sóovy klasifikace členěna do 15 samostatných druhů. (Soó et WEBB 1972). Centrem její diverzity je Balkánský poloostrov a jihovýchodní Alpy (Obr. 2). Celá skupina je rozdělena do 4 podskupin na základě mnoha znaků, které jsou ovšem značně variabilní i na vnitropopulační úrovni. Jedná se o podskupiny *M. nemorosum*, *M. velebiticum*, *M. subalpinum* a *M. bihariense* (Soó et WEBB 1972). Tyto podskupiny jsou nejčastěji vymezovány pomocí znaků na kalichu. Jedná se především o přítomnost či nepřítomnost chlupů, délku chlupů a způsob jejich odstávání a rozmístění na kalichu.



Obr. 2: Rozšíření jednotlivých druhů skupiny *Melampyrum nemorosum* v Evropě podle Soó (1926-1927)

Dalšími rozlišujícími znaky je zbarvení, tvar a zubatost listenů. Nejčastější zbarvení listenů je modré a fialové, ve výjimečných případech růžové až bílé. Detailní rozdíly mezi podskupinami zmiňuje ve své studii Soó (1927) a také Drahník (2013). Je však potřeba zmínit, že znaky v odění jsou rovněž variabilní, částečně se mění v závislosti na ontogenezi rostliny a také existují přechodné typy.

1.3. Morfologická variabilita

1.3.1. Sezónní variabilita

Poměrně významným faktorem ovlivňující vnitrodruhovou variabilitu druhů je sezónní dimorfismus (ZELLER 1849, WEISMANN 1875), který je v případě rodu *Melampyrum* v současnosti spíše označován pseudosezónní polymorfismus. Tento jev je poměrně častý u všech rodů poloparazitických rostlin z čeledi *Orobanchaceae* (ZOPFI 1995, 1998b). Sezónní polymorfismus se však také vyskytuje u některých jednoletých částečně mykotrofních druhů z čeledi *Gentianaceae* (RONNIGER 1911, KARLSSON 1974, ZOPFI 1991, LENNARTSSON 1997). Jedná se o jev, kdy lze během jednoho vegetačního období rozlišit dva a více fenologicky odlišných typů tzv. ekotypů v rámci téhož druhu. Ve většině případů se jedná se o časný (aestivální) a pozdní (autumnální) typ. Předpokládá se, že vznik těchto dvou typů je ovlivněn ekologicko – sociologickými podmínkami (SOÓ 1926–1927, KOUTECKÝ et al. 2012). Rostliny časného typu se vyznačují časným kvetením (V–VI), nevětvenou či málo větvenou lodyhou. Pokud jsou vyvinuty větve, zpravidla nekvetou. Dalším významným znakem je počet a délka lodyžních a interkalárních článků, přičemž interkalární články jsou ty, které se nachází mezi nejhořejší větví a nejspodnějším květem. Listy a listeny jsou poměrně široké a květy velké (ZOPFI 1993b). Častá je přítomnost děložních listů v době květu. Jinak je tomu u rostlin pozdního typu, které kvetou znatelně později (VI–IX), lodyha je bohatě větvená, lodyžních a interkalárních článků je více a jsou kratší. Děložní lístky jsou navíc v době květu již opadané. Dalšími variabilními znaky jsou také počet, délka a směr odstávání větví, případně jejich rozvětvení do vyšších řádů. Listy a listeny bývají značně užší a květy drobnější (ŠTECH 1998, TĚŠITEL 2005).

Teorií na vznik sezónních typů je řada a v určitých pohledech se liší. Nejstarší teorií byla Wettsteinova (WETTSTEIN 1895a, 1896a), která považovala za hlavní faktor kosení luk, nicméně rozličné ekotypy se vyskytují i v oblastech kde senoseč není běžná. V průběhu let vznikaly další teorie. Jednou z takových je, že za vznik ekotypů můžou ledovce, které v pleistocénu pokrývaly značnou část Evropy. Z rostlin rostoucích v periglaciálním klimatu se vyčlenil časný typ, zatímco z rostlin rostoucích v oblastech vzdálených od ledovce se vyčlenil pozdní typ (SMEJKAL 1963). Názory na sezónní variabilitu a druhovou diferenciaci se také značně liší u autorů, kteří se zabývali přímo taxonomií rodu *Melampyrum*. Tito autoři popsali

řadu nových taxonů, které jsou v dnešním taxonomickém pojetí často považovány pouze za ekotypy. Například Ronniger (1911), považoval za příčiny rozrůznění klimatické podmínky a lidský zásah (např. kosení). Rozlišoval 3 sezónní typy *Melampyrum nemorosum*, a to *M. nemorosum* subsp. *moravicum* (časný typ), *M. nemorosum* subsp. *nemorosum* (pozdní typ) a *M. nemorosum* subsp. *silesiacum* (montánní typ). V případě Sóoa (Soó 1926–1927, 1929) jenž rozdělil *M. nemorosum* stejně jako Ronniger na 3 typy bylo jeho hodnocení skupin rozsáhlejší, jelikož do svých úvah zahrnul navíc edafické a biologické faktory, které mohly hrát důležitou roli při vzniku jednotlivých ekotypů. Štech (2000) rozlišil pouze dva sezónní typy. *M. nemorosum* var. *praecox* (časný typ) a *M. nemorosum* var. *nemorosum* (pozdní typ). Montánní podruh *M. nemorosum* subsp. *silesiacum* Štech označil za extrémně časně kvetoucí jedince pozdního typu. Zároveň díky jeho zjištění, že typová položka *M. moravicum* H. Braun patří taxonu považovaného za časný ekotyp a představuje pozdní populace, popsal časně kvetoucí ekotyp nově jako *M. nemorosum* var. *praecox* Štech.

1.3.2. Variabilita ovlivněná hostitelem

Habitus rostliny není vždy ovlivňován pouze vlivem genotypu, v mnohých případech je ovlivňován abiotickými faktory, jakými jsou například množství světla, živin a vody, ale také kompeticí s okolní vegetací (SCHLICHTING 2002). Právě kompetice s okolní vegetací je poměrně důležitý faktor ovlivňující výšku a celkově mohutnost rostliny (HELLSTRÖM et al 2004). Zvláštním případem jsou parazitické a poloparazitické rostliny, které jsou ve většině případů životně vázány na hostitelskou rostlinu. Hostitelská rostlina ovšem neovlivňuje pouze životnost, ale také vzhled a fertilitu. Takováto závislost se vyskytuje u většiny poloparazitických rodů čeledi *Orobanchaceae* např. u *Euphrasia* (HELLSTRÖM et al 2004), *Rhinanthus* (JONSTRUP et al. 2016) a *Melampyrum* (ŠTECH 1998, 2000).

U studovaného rodu *Melampyrum* se závislost na hostitelské rostlině projevuje tak, že pokud dojde k připojení na hostitele, rostliny rychleji rostou, více se větví, mají více listů, kvetou a jsou celkově vitálnější než rostliny, které nenaleznou žádného hostitele. Takovéto rostliny nemají dostatek živin umožňujících normální růst, tudíž nekvetou, neplodí a mnohdy hynou (CANTHLON et al. 1963, SVENSSON et al. 2001). Hostitelskými rostlinami jsou

zpravidla dřeviny (*Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae* aj.), byliny (např. *Rosaceae*) a v neposlední řadě trávy (*Poaceae*) (HARTL 1974).

V mnohých případech dochází k napojování na kořeny vlastního druhu (ADAMEC 2012). Některé z recentních studií také zmiňují určitou druhovou specifitu při výběru hostitelské rostliny. Například Jonstrup et al. (2016) uvádí, že mezi nejlepší hostitelské rostliny patří rostliny z čeledi *Fabaceae* (např. *Trifolium* sp.), což ukazuje ve své studii na rodu *Rhinanthus*. Na takovémto hostiteli jsou rostliny celkově vyšší a statnější, větvenější nežli tomu je u méně vhodného druhu hostitele např. trávy.

Výše uvedené závislosti mezi poloparazitickou a hostitelskou rostlinou značně umocňují vznik variability ve fenotypovém projevu. Na základě této variability bylo v historii popsáno značné množství samostatných taxonů, které ovšem nemají velkou taxonomickou hodnotu, tudíž by bylo vhodné uvažovat o jejich přehodnocení.

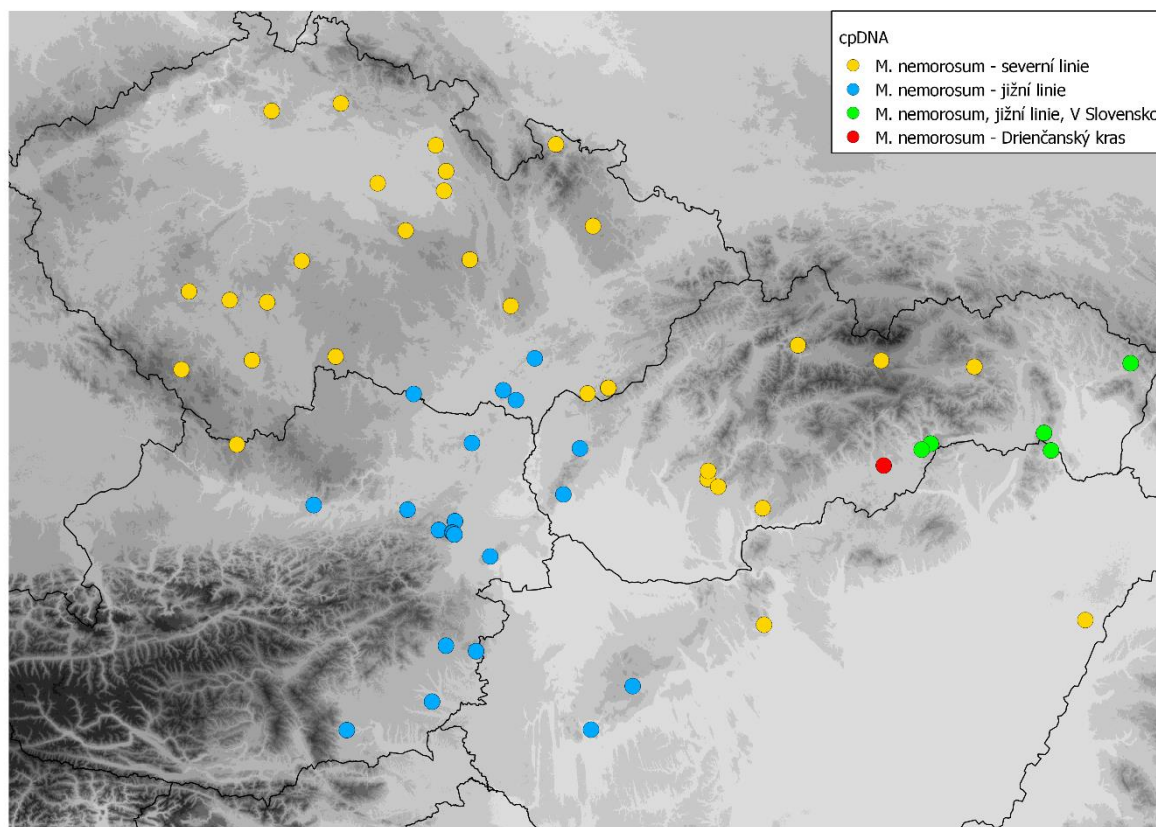
1.4. Nové poznatky o skupině *M. nemorosum*

Současné analýzy zabývající se fylogenezí rodu *Melampyrum* odhalily, že okruh *Melampyrum nemorosum* podle tradičního Sóova vymezení není geneticky uniformní a je zřejmě tvořen dvěma hlavními liniemi (LI et al. 2008, ŠTECH nepublikovaná data). V současnosti se jeví jako velmi potřebné nové taxonomické vymezení jednotlivých druhů ve skupině *M. nemorosum*. Další potřebou je také objasnění významu a rozsahu hybridizace, ke které pravděpodobně dochází v oblastech, kde se skupiny a jednotlivé druhy střetávají.

1.4.1. Analýzy chloroplastové DNA

Analýza chloroplastové DNA u rodu *Melampyrum* se jeví jako vhodný prostředek pro odhalení vzájemných vztahů jednotlivých druhů. Některé druhy skupiny jsou dobře vymezeny, jak je tomu v případě

M. velebiticum nebo *M. subalpinum*. (SOÓ et WEBB 1972). To však už neplatí o komplikovaném *M. nemorosum* s. str., kde analýzy cpDNA odhalily prozatím 2 skupiny haplotypů s odlišným geografickým rozšířením (Obr. 3) a pravděpodobně starou diferenciací (DRAHNÍK 2013). Jedna skupina haplotypů se zdá být rozšířena v populacích vyskytujících se v severní Evropě a v severní části Evropy střední, což odpovídá haplotypu *nemorosum*. Druhá skupina byla pak zaznamenána v populacích z jižního a východního úpatí Alp, východního Slovenska a severní části Balkánu. V této skupině je zastoupeno více skupin haplotypů mezi nimiž se nachází i haplotyp *degenianum*. Druh *M. degenianum* byl Soóem (1926–1927) považován za přechodný typ od *M. nemorosum*. Tato geografická vikariance má pravděpodobně historické důvody a zřejmě se jedná o poměrně staré původně izolované linie, které se zřejmě dostávají do sekundárního kontaktu.



Obr. 3. Rozšíření jednotlivých skupin *M. nemorosum* podle cpDNA (DRAHNÍK 2013)

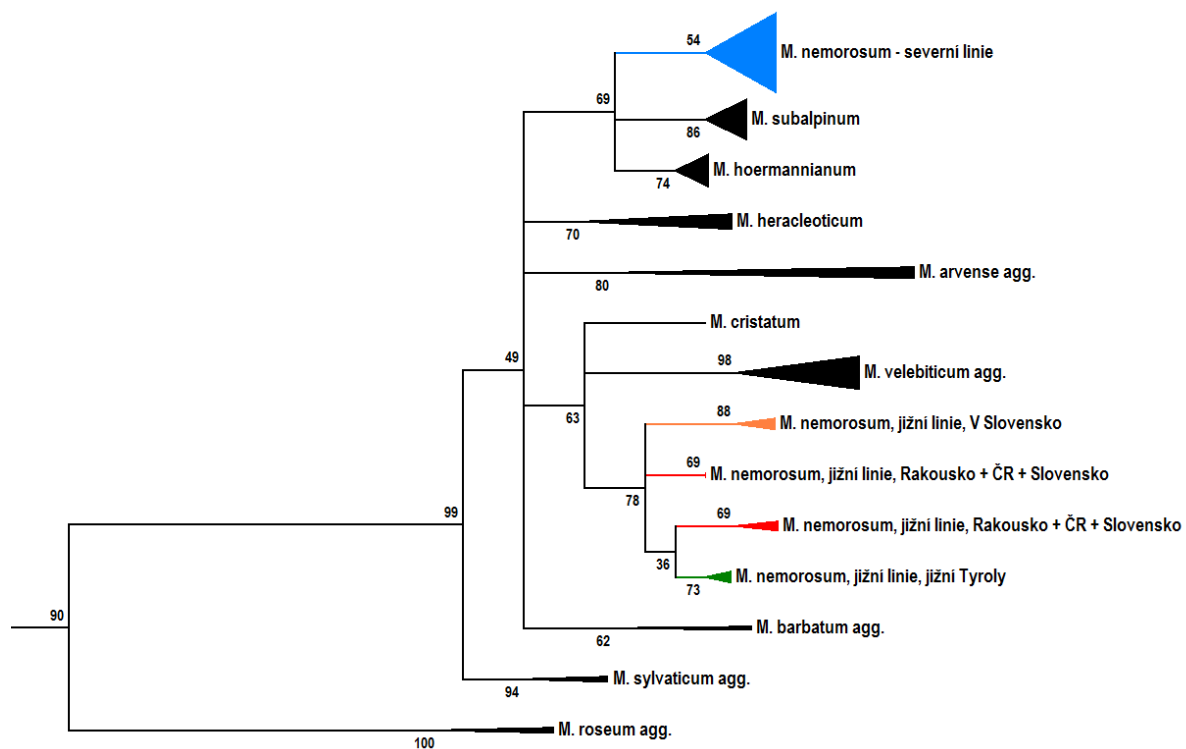
Při studiu chloroplastové DNA byly také odhaleny izolované haplotypy (blízké cpDNA haplotypu příbuzného druhu *M. sylvaticum*, ŠTECH in prep.), které byly nalezeny v reliktní oblasti jižně od Muráňské planiny na Slovensku (Obr. 3, červený symbol). Vzhledem k pravděpodobné sesterské pozici *M. sylvaticum* k celé skupině *M. nemorosum* se může jednat o ancestrální polymorfismus (DRAHNÍK 2013).

K pravděpodobnému kontaktu zkoumaných skupin zřejmě dochází na území severně od Alp v Rakousku, na jižní Moravě, jižním Slovensku, v severním Maďarsku a na východním Slovensku. Je také pravděpodobné, že současné rozšíření haplotypů *Melampyrum nemorosum* odráží glaciální refugia a postglaciální migraci celé skupiny. S existencí mnoha refugií na území Evropy jsou spojovány především čtvrtohory. Během čtvrtohor se v pravidelných intervalech střídaly glaciály a interglaciály (HEWITT 1999). Glaciály (trvající cca 100 000 let) se vyznačovaly chladnými a relativně suchými podmínkami a interglaciály (trvající 10 000 let) teplejšími a vlhčími podmínkami. V období posledního glaciálního maxima (LPG) byla velká část střední Evropy pokryta ledovci, což mělo zásadní vliv na rozšíření rostlin a živočichů. Rostliny a živočichové se stahovali do území s příhodnými podmínkami, kde mohli růst a přežívat mrazivé období (TZEDAKIS et al. 2013). Tato území se nazývají glaciální refugia a podle molekulárních a fosilních dat se jich nachází v Evropě několik. Refugia ovšem nemusela představovat pouze rozsáhlá území, ale také velmi malé plochy s vhodnými mikroklimatickými podmínkami.

Pohledy na glaciální refugia se v poslední době poměrně vyvíjí. Mezi první teorie patří koncept tří hlavních jihoevropských refugií, které se nacházejí na Iberském, Apeninském a Balkánském poloostrově (HEWITT 1999, TRIBSCH et SCHÖNSWETTER 2003, TRIBSCH 2004). Podle dřívějších hypotéz tato území sloužila po ústupu ledovce jako zdroj druhů ke kolonizaci střední a severní Evropy. Hewitt (1999) rozlišoval 3 hlavní postglaciální směry migrace a to výhradně z balkánského poloostrova (*Alnus glutinosa*, *Fagus sylvatica* aj.), ze všech tří refugií naráz (*Quercus* sp.) a z balkánského a pyrenejského poloostrova, což je často dokládáno u živočichů (*Ursus arctos*) (DÖPPES et PACHER 2014). V důsledku postglaciální migrace docházelo k sekundárnímu kontaktu odlišných genetických linií v rámci druhu nebo druhů samotných. Tento kontakt vytváří novou genetickou variabilitu v důsledku zvýšení intenzity speciálních procesů, kterými jsou např. hybridizace, polyploidizace a opakované zakládání nových populací, kde dochází k potlačení méně frekventovaných alel (HEWITT 1996 a 1999, KELLER et al. 2014). Díky těmto speciálním procesům došlo mnohdy i ke

vzniku nových druhů jako v případě *Saxifraga osloensis* (BROCHMANN et al. 1996). Mnoho dnešních studií ukazuje, že přítomnost více genotypů v rámci populace či samotného druhu je způsobeno splynutím rozdílných genetických linií původem z jiných refugií (LAIT et BURG 2013). Podle nejnovějších fylogeografických a paleoekologických studií je však situace refugií podstatně komplikovanější a ukazuje se, že mnoho refugií není homogenních. Také vznikají teorie, které tvrdí, že některé z tradičně uváděných refugií jsou značně strukturovaná (STEWART et al. 2010). Tyto teorie pojednávají o mimořádné geografické a klimatické různorodosti v rámci třech hlavních jižních glaciálních refugií (viz výše). Dále se také ukázalo, že řada temperátních druhů např. *Fagus sylvatica* (MAGRI 2006), *Alnus glutinosa* (HAVRDOVÁ et al. 2015), *Salix sp.* (TZEDAKIS et al. 2013) aj. mohla přežívat v refugiích mnohem více na sever (krytická refugia), než se předpokládalo a to na území Maďarska, jižní Moravy a Karpat (STEWART et LISTER 2001, SCHMITT et VARGA 2012). Tyto teorie jsou podpořeny na základě fylogeografických analýz temperátních rostlin např. *Rosa pendulina* (FÉR et al. 2007), *Lonicera nigra* (DANECK et al. 2011), *Pulsatilla vernalis* (RONIKIER et al. 2008), *Rhinanthus major* (VRANCKEN et al 2012) *Cyclamen purpurascens* (SLOVÁK et al. 2012) a mnoho dalších.

Podle předběžných analýz zabývajících se fylogenezí okruhu *M. nemorosum* (Obr. 4) se zdá, že studované skupiny haplotypů jsou odlišeny poměrně výrazně a jejich geografické rozšíření pravděpodobně odráží přežívání a následné šíření z rozdílných refugií. Skupina haplotypů nalezených u rostlin *M. nemorosum* ze severní části Evropy a v České republice je nejvíce příbuzná skupině haplotypů vyskytujících se u *M. hoermannianum* a *M. subalpinum*. Druhá skupina haplotypů se vyskytuje v populacích *M. nemorosum* jižního a východního okraje Alp a východního Slovenska. Tato skupina je bližší skupině haplotypů nalezených u rostlin z okruhu *M. velebiticum*.

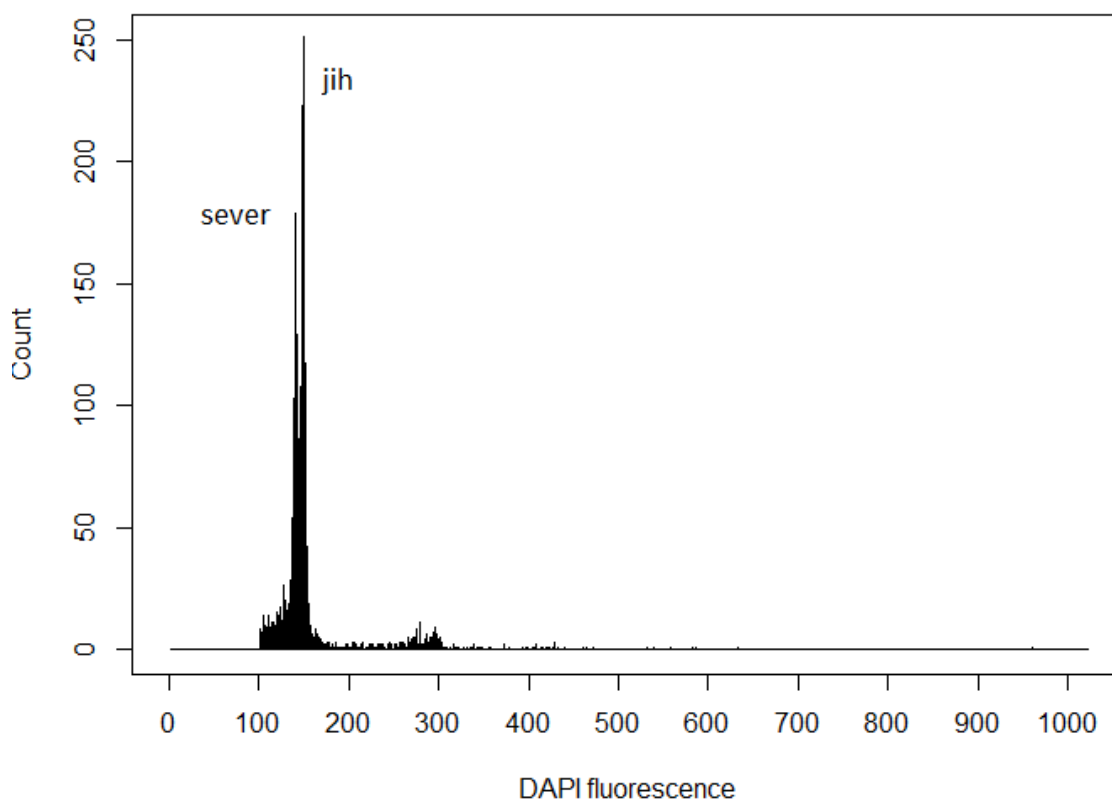


Obr. 4: Předběžné vzájemné vztahy mezi jednotlivými taxony skupiny *Melampyrum nemorosum* agg. na základě analýz 3 úseků cpDNA. Metoda Maximum likelihood, s bootstrapovými podporami (Štech nepublikovaná data)

1.4.2. Cytometrické analýzy

Analýza velikosti genomu ukazuje poměrně výraznou variabilitu v populacích *M. nemorosum*, která je zřetelně korelována s rozeznanými skupinami haplotypů (severní a jižní). Rozlišované skupiny se liší ve velikosti genomu o ca 6%. Rostliny jižní linie z podhůří Alp mají prokazatelně větší genom než populace severní linie (Obr. 5). V rámci jižní skupiny se navíc poměrně dobře separují populace z oblasti JV Slovenska, které se velikostí genomu podobají severní linii. Diferenciaci na jižní a severní linii mohla pravděpodobně způsobit historická hybridizace mezi *M. nemorosum* a *M. subalpinum*. Právě *M. subalpinum*, které se hojně vyskytuje na východních svazích Alp má výrazně větší genom než je tomu u jižních a severních typů. Tuto hypotézu poměrně dobře podporují současné studie (CHLUMSKÝ et al. 2016, ŠTECH et al., in prep.), které potvrdily introgresi druhu *M. nemorosum* do *M. subalpinum*. Rozdíl ve velikosti genomu mezi rozlišovanými liniemi *M. nemorosum* není

příliš zřetelný u populací vyskytujících se v blízkosti nebo přímo v kontaktní zóně, což může být dalším důkazem hybridizace (DRAHNÍK 2013).



Obr. 5: Společná analýza vzorků severní a jižní skupiny (populace Nitra a Buková), barvení DAPI

1.4.3. Morfometrické analýzy

Dosavadní morfologické analýzy odhalily, že jednotlivé molekulárně vymezené skupiny lze rozpoznat velice obtížně, především na úrovni jednotlivých rostlin. Určitého rozlišení na úrovni populací se však zdá být možné. Vymežujícími znaky jsou především znaky na kalichu (šířka kališních cípů) a horním pysku koruny (výška horního pysku). Ukazuje se, že rostliny severních populací mají oproti jižním populacím užší kališní cípy a menší horní korunní pysk.

Vzhledem ke zřetelným genetickým rozdílům v cpDNA se navzdory malým morfologickým rozdílům otevírá otázka možného taxonomického hodnocení odlišných skupin. Dosavadní vnitrodruhové členění zdůrazňovalo především sezónní variabilitu

(RONNIGER 1911, SOÓ 1927, ŠÍPOŠOVÁ 1997). Doposud byl kladem malý důraz na geografické rozrůznění populací *M. nemorosum* s. str., které koreluje s tradiční koncepcí vikariance drobných druhů tohoto okruhu (SOÓ 1926–1927). Je zjevné, že výsledky dosavadních molekulárních analýz ukazují nezbytnou potřebu nové taxonomické koncepce celé skupiny, která bude založena jak na molekulárních analýzách, tak na morfologických charakteristikách geneticky dobře podpořených taxonů.

1.5. Cíle práce

Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci (DRAHNÍK 2013), která využívala pouze cytometrii, morfometriku a cpDNA a byla omezena na menší území. Pro magisterskou práci bylo území výrazně rozšířeno a rovněž zahrnuty další taxony agregátu. Dále byla pozornost věnována vybranému úseku jaderné DNA.

Byly stanoveny tyto cíle:

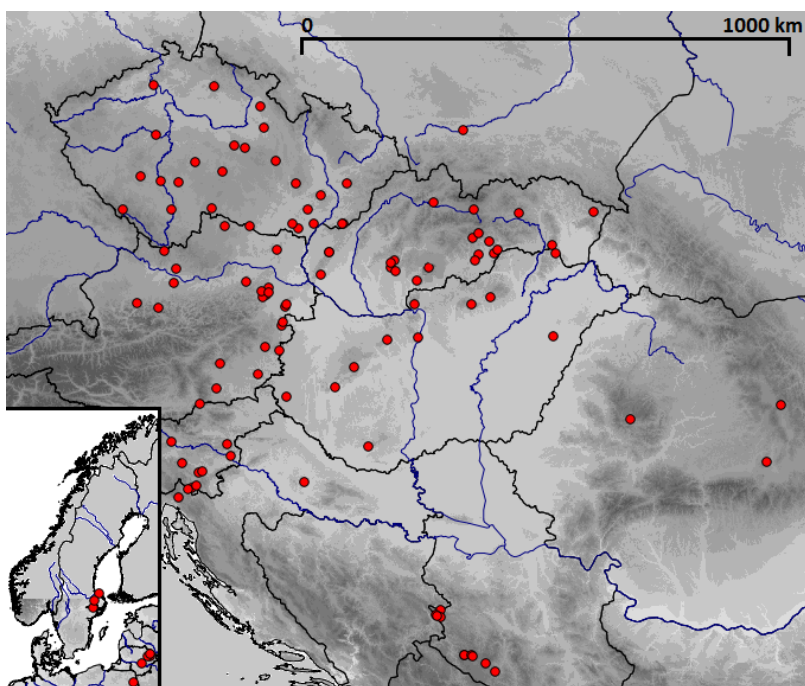
- 1) Rozšíření dat o nové populace z oblastí s neznámou genetickou strukturou.
- 2) Vymezení skupin na základě analýzy cpDNA
- 3) Srovnání informací z chloroplastové a jaderné DNA
- 4) Detailnější studium kontaktních zón vymezených skupin a nalezení vhodných jaderných markerů pro studium potenciální hybridizace na kontaktních zónách různých haplotypových skupin cpDNA.
- 5) Srovnání rozdílů v morfologických znacích a velikosti genomu mezi geneticky podpořenými skupinami.

2. Metodika

Metodická část diplomové práce je z větší části převzata z bakalářské práce (DRAHNÍK 2013). U některých analýz byly provedeny drobné změny, které jsou vždy v úvodu jednotlivých metod uvedeny.

2.1. Sběr materiálu

Rostlinný materiál z agregátu *M. nemorosum* byl získán ze 118 populací na území 11 zemí (CZE, SVK, POL, HUN, AUT, ROU, SRB, HRV, LTU, SWE, SLO). Do analýz bylo zařazeno také 64 populací, které byly zpracovány již pro účely bakalářské práce. Analyzované populace jsou zobrazeny na obrázku 6. Detailní přehled lokalit i s použitými metodami je uveden v příloze 1. Osobně jsem se podílel na sběru materiálu ze 43 populací a 7 zemí. Minimálně jedna rostlina z každé studované populace je doložena herbářovou položkou v herbáři PřFJU (CBFS).



Obr. 6: Mapa analyzovaných populací *M. nemorosum*

2.2. Sekvenování

Sekvenace byla provedena celkově u 75 populací (Příloha 1). Z každé populace bylo sebráno 1–5 rostlin a z nich bylo odebráno ca 5 listenů. Listeny byly uchovány v silikagelu a dlouhodobě skladovány při – 20 °C. Vlastní sekvenace byla v naprosté většině provedena u 2–5 rostlin z populace.

Pro studium genetické variability druhu *M. nemorosum* byly vybrány chloroplastové i jaderné úseky. Použité chloroplastové úseky trnT^{UGU}-trnL^{UAA}, psbA-trnH^{GUG} a rpl32-trnL^{UAG} se osvědčily při rozlišování jednotlivých skupin *M. nemorosum* agg. již v předchozích analýzách a také v mé bakalářské práci (DRAHNÍK 2013). Při hledání vhodných jaderných markerů se vycházelo ze studie (LI et al. 2008), ve které byl rod *Melampyrum* použit jako jedna z modelových skupin pro nalezení vhodných single copy genů pro fylogenetické studie na úrovni rodů.

2.2.1. Izolace DNA

Z předem vysušených listenů byla odebrána tkáň o velikosti přibližně 0,5 – 0,75 cm². Vzorek byl vložen společně se dvěma wolframkarbidovými kuličkami do označené eppendorfky. Eppendorfky byly vloženy do oscilačního mlýnku (Retsch MM400) a po dobu 2 minut při frekvenci 30 kmitů/sek. byl vzorek drcen. Poté bylo přidáno 20 µl NaOH (c = 0,5 M; WANG et al. 1993). Díky hydroxidu sodnému dochází k narušení buněčné stěny, DNA je následně uvolněna do roztoku a denaturuje. Směs byla promíchána a tekutá část převedena do nové popsané zkumavky. Následně byl vzorek centrifugován (Hettich Universal 320r) při teplotě 22 °C po dobu 2,5 min při frekvenci 13800 otáček/min. Centrifugace oddělila nežádoucí pevné složky od zbytku roztoku. Z tekutého supernatantu bylo přepipetováno 5 µl do finální SAFE-LOCK zkumavky a bylo přidáno 45 µl pufru Tris – HCl (pH 8,3; c = 100mM). Takto izolovaná DNA byla skladována při -20 °C pro následné analýzy.

2.2.2. PCR, purifikace a příprava sekvenční směsi

Metodika PCR a sekvenování cpDNA úseků byla bez jakýchkoliv změn převzata z dřívějších analýz. Nově bylo potřeba optimalizovat metodiku PCR a sekvenaci úseků jaderné DNA (nDNA), především poměry jednotlivých složek PCR směsi a reakční podmínky vlastní PCR. Optimalizace a následné analýzy byly provedeny na jaderných úsecích Agt1, AroB, At103 a Eif3E. Zde došlo k jediné změně u převzaté metodiky (Li et al. 2008), a to náhradou nested PCR za běžnou PCR. Primery použité při amplifikaci chloroplastových úseků a jaderných úseků jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Tab. 1: Přehled použitých primerů při amplifikaci cpDNA úseků

Primer	Sekvence úseku 5'-3'	Citace
trnT ^{UGU} 2F	CAA ATG CGA TGC TCT AAC CT	Shaw et al. 2005
trnL ^{UAA} R	TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	Taberlet et al. 1991
psbA	ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	Sang et al. 1997
strnH ^{GUG}	CGC GCA TGG ATT CAC AAT CC	Tate et Simpson 2003
rpl32F	CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTTC	Shaw et al. 2007
trnL ^{UAG} R	CTG CTT CTT AAG AGC AGC GT	Shaw et al. 2007

Tab. 2: Přehled použitých primerů při amplifikaci nDNA

Primer	Sekvence úseku 5'-3'	Citace
Agt1F	GAT TTC CGH ATG GAT GAN TGG GG	Li et al. 2008
Agt1R	CCA YTC CTC CTT CTG HGT GCA GTT	Li et al. 2008
AroBF	GCA TTC TAC CAA RCW CAR TGT GT	Barten and Meyer 1998
AroBR	GCTTTGTTTTACATGAWCKCTTDTAGCA	Barten and Meyer 1998
At103F	CTT CAA GCC MAA GTT CAT CTT CTA	Rzeznicka et al. 2005
At103R	TTGGCAATCATTGAGGTACATNGTMACATA	Rzeznicka et al. 2005
Eif3EF	TTTGAATGTGGCAACTAYTCTRGTGCTGC	Yahalom et al. 2001
Eif3ER	ACCTCTTCACACTCYTTCATCTT	Yahalom et al. 2001

PCR reakce probíhaly v objemu 10 μ l. Na reakční směs bylo smícháno (na 1 vzorek) 2,2 μ l PCR vody, 1,2 μ l forward a revers primeru (oba $c= 2,5$ pmol/ μ l) a 5 μ l Master Mix Top Bio (složení je následující: 50 mM Tris-HCl (pH 8,8, při 25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva). K takto smíchané směsi bylo přidáno 0,4 μ l DNA vzorku. Amplifikace probíhala v termocycleru (BIOER xp thermal gradient). Reakční podmínky pro zkoumané úseky cpDNA jsou uvedeny v tabulce 3 a pro jaderné úseky v tabulce 4.

Tab. 3: Reakční podmínky pro amplifikované úseky cpDNA

	rpl32-trnL ^{UAG}			trnT ^{UGU} -trnL ^{UAA}			psbA-trnH ^{GUG}		
	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Denaturace	95	180	35	95	300	32	94	300	35
Cykly	95	45		95	60		94	30	
	51	60		62	60		57	30	
	72	60		72	60		72	60	
Konečná elongace	72	600		72	600		72	600	

Tab. 4: Reakční podmínky pro amplifikované úseky nDNA

	Agt1, AroB, At103, Eif3E		
	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Denaturace	95	180	46
Cykly	95	45	
	50	40	
	72	60	
Konečná elongace	72	420	

Elektroforézou byla na agarózovém gelu (1,5%) a v pufru TBE ověřena úspěšnost amplifikace. Jako standard byl použit ladder (100 bp, New England BioLabs) a k detekci barvivo GelRed. Ke každému vzorku (3 μ l) bylo přidáno 0,8 μ l barviva. Elektroforéza probíhala pod napětím 120 V přibližně 20 minut. Po skončení elektroforézy byl gel nasnímán pomocí UV kamery v programu Scion VisiCapture. Amplifikovaná DNA byla dále purifikována pomocí látky ExoSap (Exonuclease I (20U/ μ l), Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/ μ l). K 5 μ l amplifikované DNA bylo přidáno 1,5 μ l ExoSapu, vše bylo řádně promícháno a krátce stočeno. Takto připravené vzorky byly vloženy do termocycleru (BIOER xp thermal gradient) a byl zvolen program na purifikaci. Purifikace se stávala ze dvou cyklů (1. cyklus – teplota 37° C a 15 minut; 2. cyklus – teplota 85 °C a 15 minut).

Sekvenační směs byla smíchána z 5,5 μ l PCR vody a 2,5 μ l primeru (10 pmol/ μ l; druh primeru závisel na druhu analyzovaného úseku). Do řádně promíchané směsi bylo přidáno 2 μ l purifikované DNA (pro všechny úseky stejný poměr). Takto purifikovaná směs byla zaslána do sekvenačního centra společnosti SEQme s.r.o. se sídlem v Dobříši nebo do centra společnosti GATC Biotech se sídlem v Německu.

Získané sekvence byly manuálně zeditovány v programu BioLign v. 4.0.6.2. (HALL 2000) a v programu Geneious, verze 9.0.4 (KEARSE et al. 2012). K rychlému určení

homologií jednotlivých pozic sekvencí byl vytvořen v programu BioLign alignment pomocí funkce Clustal W. Alignment celého souboru sekvencí byl proveden v programu Mafft version 7 (KATO et STANDLEY 2013) za těchto nastavení: algoritmus hledání alignmentu GINS-i, skórovací matice pro nukleotidové sekvence 1PAM $k = 2$, postih za otevření gapu = 1. Při zpracování sekvencí úseků cpDNA byly pomocí programu SeqState version 1.4.1 (MÜLLER 2005) zakódovány indely metodou Simple coding (SIMMONS et OCHOTERENA 2000). Tyto indely byly následně ručně zakódovány jako nukleotidy A/T. Jednotlivé alignmenty zkoumaných úseků byly pospojovány v programu FaBox (VILLESEN 2007) a převedeny webovým převaděčem Bugaco (BUGACO.COM 2000–2013) do formátu nexus vhodného pro program PopART 1.7 (LEIGH et BRYANT 2015). Z takto upravených alignmentů byla v programu PopART vytvořena haplotypová síť pomocí metody TCS Networks (CLEMENT et al. 2002).

Obdobným způsobem byly zpracovány sekvence jaderných úseků. V tomto případě se nevyskytovaly indely. Důležité je také zmínit, že k mému souboru dat byly při tvorbě alignmentu a následné tvorbě sítí použity starší sekvence (stejně úseky cpDNA a nDNA) zpracované pro rozsáhlou analýzu celého komplexu (seznam lokalit viz Příloha 4).

2.3. Průtoková cytometrie

Průtokovou cytometrií bylo analyzováno 96 populací (Příloha 1). Počet vzorků na populaci se odvíjel od velikosti populace (5–20 jedinců). Nasbírané listy byly krátkodobě uchovány v uzavíratelném igelitovém sáčku v lednici.

2.3.1. Měření a příprava vzorku

Většina analýz byla provedena v Laboratoři molekulární biologie rostlin PřF JU v Českých Budějovicích. Starší část vzorků byla měřena v Botanickém ústavu AV ČR v Průhonicích. Vzorky byly barveny dvojnásobným způsobem a to pomocí interkalačního barviva PI (propidium jodid) a AT selektivním barvivem DAPI (4',6-diaminido-2-phenylindole). Vzorky barvené pomocí PI byly analyzovány na průtokovém cytometru CyFlow SL (zdrojem světla je laser o

vlnové délce 532 nm) a vzorky barvené pomocí DAPI na cytometru Partec PAII (zdrojem světla je rtuťová výbojka). Interním standardem byla *Bellis perennis* s velikostí genomu $2C = 3,60$ pg. Během analýz byly cytometry nastaveny, tak aby byl standard na kanálu 100 (starší část pražských vzorků na kanálu 200) na 1024 kanálové stupnici. Při barvení DAPI bylo zaznamenáváno 3000 částic a při PI 5000 částic. Měřeným parametrem byla fluorescence částic, v našem případě fluorescence jader. K přípravě vzorků byl použit upravený dvoustupňový postup jaderné izolace a barvení (DOLEŽEL et al. 2007a).

Příprava barvicího roztoku se odvíjela především podle typu barvení a také počtu vzorků. Při barvení pomocí DAPI byl připraven roztok z 25 ml citrátfosfátového (0,4 M) pufru Otto II, 50 μ l antioxidantu 2-merkapt ethanolu (2 μ l/ml M) a 1 ml roztoku DAPI (1 mg/ml). Výsledná koncentrace roztoku 4 μ g/ml. Při přípravě roztoku pro měření pomocí PI byl připraven roztok z 20 ml pufru Otto II, 50 μ l antioxidantu 2-merkapt ethanolu (2 μ l/ml M) a 1 ml roztoku PI (100 mg/ml) a 1 ml RNasy (100 mg/ml). Výsledná koncentrace roztoku 50 μ g/ml. Dalším krokem byla příprava tkáně. Do Petriho misky bylo připraveno ca 0,5 cm² tkáně listu a přibližně 3–5 \times méně listu sedmikrásky (empiricky vyzkoušeno). K rostlinnému materiálu bylo přidáno 400 μ l vychlazeného pufru Otto I (0,1 M kyselina citronová, 0,5 % detergent Tween20) a vše společně nasekáno žiletkou na homogenní směs. Tato směs byla dále přefiltrována přes filtr 42 μ m (Uhelon 130T). Filtrát byl sensoricky zkontrolován, zda neobsahuje zbytky tkáně či jiné nečistoty a směs byla ponechána 2-3 minuty stát. Po odstání filtrátu bylo přidáno 800 μ l připraveného barvicího roztoku Otto II podle typu barvení. Poměr mezi přefiltrovaným Otto I a barvicím roztokem Otto II musí být v poměru ca 1:4. Takto připravený vzorek byl vložen do průtokového cytometru a byla měřena fluorescence.

2.3.2. Zpracování a zhodnocení dat

Získaná data z cytometru byla zpracována v programu FlowJo 10 (TREE STAR 2015) a také ve statistickém programu STATISTICA verze 12 (STATSOFT Inc. 2013). Zkoumané populace skupiny *M. nemorosum* byly rozděleny do 5 skupin podle geografického původu. Dále pak byly rozděleny do několika skupin podle přítomnosti jednotlivých haplotypů chloroplastové DNA. Z průměrných poloh píků vzorku a standardu byl pro každý analyzovaný vzorek (při barvení pomocí DAPI se jednalo se směsný vzorek ca 5 ti rostlin) stanoven poměr

fluorescence vzorek/ standard. Nekvalitní analýzy, u kterých přesáhla hodnota CV vzorku (koeficient variace) hodnotu 4, byly z dalších analýz vyloučeny. Z poměrů byl vypočítán průměr, a také určena minimální

a maximální hodnota pro jednotlivé skupiny populací. Také byla vypočtena variabilita uvnitř

vymezených skupin podle vzorce: Variabilita [%] =
$$\frac{\text{Poměr max} - \text{Poměr min}}{\text{Poměr průměr}} \times 100$$
.

Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly testovány analýzou variance (ANOVA) a Tukeyho testem.

2.4. Morfometrické analýzy

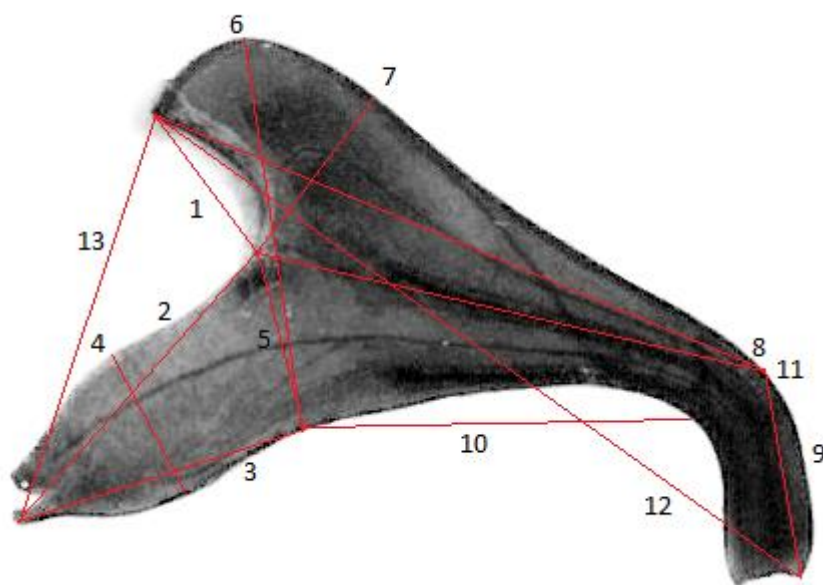
Rostliny použité pro morfometrické analýzy byly sbírány v 59 populacích (Příloha 1). Při sběru materiálu byl opět brán zřetel na velikost populace. Počet sbíraných rostlin se tudíž pohyboval mezi 5 a 20 rostlinami. Při sběru rostlin bylo žádoucí vybírat takové rostliny, které byly co nejméně poškozené a vývojově v optimální fázi.

2.4.1. Měření morfologických znaků

Z každé zkoumané rostliny byl odebrán květ s kalichem a 1. a 5. listen. Tyto části byly jednotlivě nalepeny pomocí průhledné lepicí pásky do sešitu. Vždy bylo měřeno 26 znaků. Na koruně bylo měřeno 13 znaků, na 1. a 5. listenu vždy po 4 znacích a na kalichu 5 znaků (Obr. 7–9; Tab. 5–7). Vybrané znaky jsou i přes fenotypovou plasticitu studovaného rodu považovány za taxonomicky významné. Sešity s nalepenými vzorky byly naskenovány v rozlišení 600 dpi a následně měřeny v programu tpsDig verze 2.16 (ROHLF 2010). Jako kalibrace bylo použito centimetrové pravítko, které bylo naskenováno společně se vzorky. Sešity s nalepenými částmi rostlin jsou uloženy na katedře botaniky PřF JU v Českých Budějovicích.

Tab. 5: Přehled měřených morfologických znaků na koruně

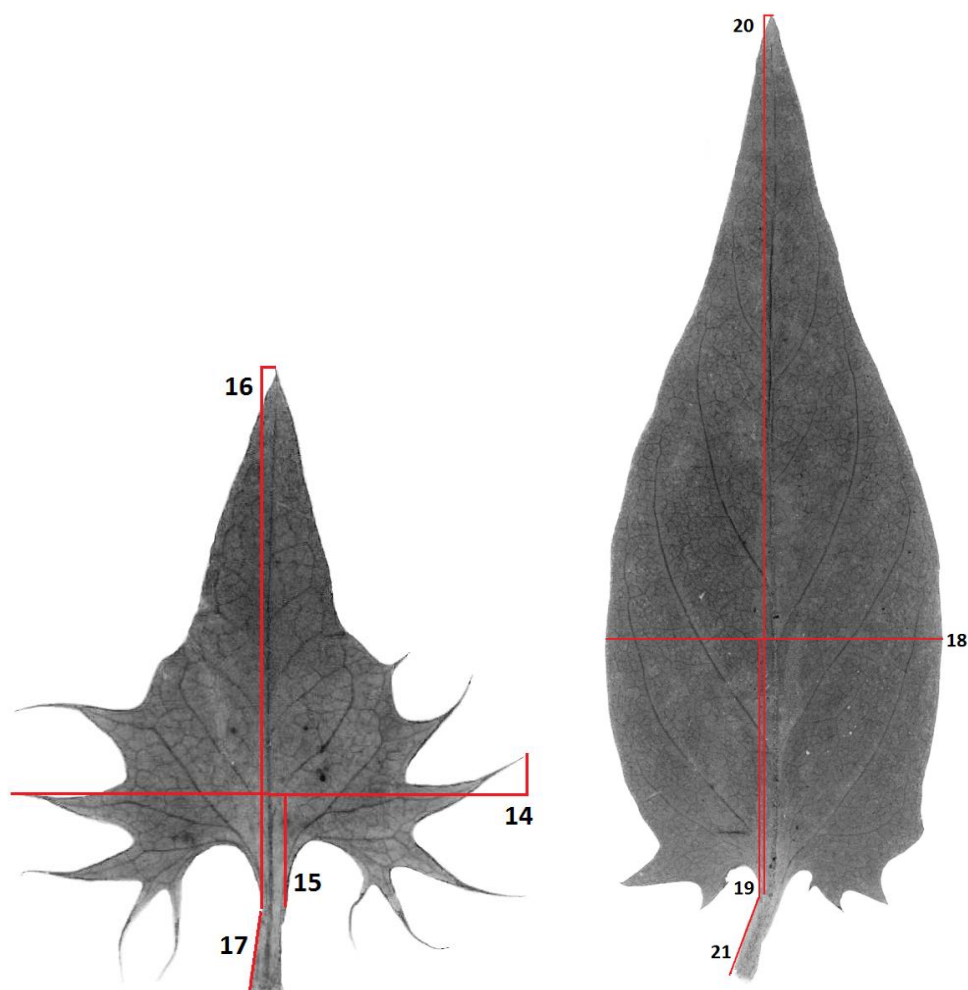
Číslo znaku	Kód znaku	Popis
1	DHP	Délka horního pysku
2	DDP	Délka dolního pysku
3	DSDP	Délka spodní strany dolního pysku
4	VDP	Výška dolního pysku
5	SDP	Šířka dolního pysku
6	VC	Výška koruny
7	VHP	Výška horního pysku
8	DCB	Délka koruny bez báze
9	DBCT	Délka báze korunní trubky
10	DLCT	Délka spodní linie korunní trubky
11	DCTB	Délka korunní trubky bez báze
12	DC	Délka koruny
13	O	Otevření



Obr. 7: Zobrazení měřených morfologických znaků na koruně

Tab. 6: Přehled měřených morfologických znaků na 5. a 1. listenu

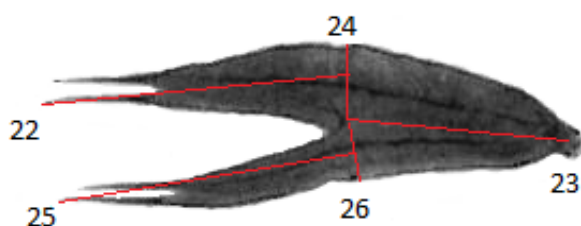
Číslo znaku	Kód znaku	Popis
14	SL5	Šířka 5. listenu v nejširším místě
15	V5	Vzdálenost nejširšího místa od báze 5. listenu
16	DL5	Délka 5. listenu
17	DRL5	Délka řapíku 5. listenu
18	SL1	Šířka 1. listenu v nejširším místě
19	V1	Vzdálenost nejširšího místa od báze 1. listenu
20	DL1	Délka 1. listenu
21	DRL1	Délka řapíku 1. listenu



Obr. 8: Zobrazení morfologických znaků na 1. a 5. listenu

Tab. 7: Přehled měřených morfologických znaků na kalichu

Číslo znaku	Kód znaku	Popis
22	DHKC	Délka horního kališního cípu
23	DKT	Délka kališní trubky
24	SHKC	Šířka horního kališního cípu
25	DDKC	Délka dolního kališního cípu
26	SDKC	Šířka dolního kališního cípu



Obr. 9: Zobrazení měřených morfologických znaků na kalichu

2.4.2. Statistické zpracování dat

Před samotným statistickým vyhodnocením morfometrických dat byly populace rozděleny do 5 geografických skupin a 6 dalších skupin podle výsledků cpDNA. Základní statistické analýzy jako např. korelační matice znaků, populační průměry aj. byly počítány v programu STATISTICA verze 12 (STATSOFT Inc. 2013). Mnohorozměrné analýzy byly provedeny v programech R 2.15.3 (R CORE TEAM 2013) a CANOCO for Windows verze 5 (BRAAK & ŠMILAUER 2012).

Nejprve byla data pročištěna, a to především ta, kde nebyly změřené všechny zkoumané znaky (okus, morfologická změna, opad, uvadnutí). Takovéto rostliny byly z dalších analýz odstraněny. Pro zjištění korelace mezi měřenými znaky byla vypočítána korelační matice. Z dvojice silně korelovaných znaků ($r \geq 0,9$) byl vždy jeden vyloučen. V mém případě byly vyloučeny tyto znaky: O, DCB, DCTB a DHKC. Pro účely diskriminační analýzy byly

vypočteny populační průměry jednotlivých znaků a také byla ověřena normalita rozložení (MARHOLD & SUDA 2002). Data se blížila normálnímu rozdělení, a proto nebylo potřeba transformace.

K zjištění základního rozdělení populací i jednotlivých vzorků byla v programu CANOCO 5.0 (BRAAK & ŠMILAUER 2012) provedena analýza hlavních komponent (PCA). Jedná se o ordinační metodu umožňující redukovat počet dimenzí v euklidovském znakovém prostoru tak, aby došlo k minimální ztrátě informace (MARHOLD & SUDA 2001).

Pomocí programu CANOCO 5.0 (BRAAK & ŠMILAUER 2012) a v některých případech RStudio 0.97.336 (R CORE TEAM 2013) s předem definovanými funkcemi (KOUTECKÝ 2016) byly zjištěny znaky, které nejlépe oddělují jednotlivé skupiny *M. nemorosum* definované na základě molekulárních výsledků nebo definované geograficky. Použitou metodou byla lineární diskriminační analýza (LDA) za použití forward selection. Lineární diskriminační analýza je metoda, která hledá rozdíly mezi a priori definovanými skupinami. Určuje, které znaky nejlépe odlišují zkoumané skupiny. Takovéto znaky poté mohou sloužit pro determinaci daných skupin (MARHOLD & SUDA 2001).

3. Výsledky

3.1. Molekulární analýzy

Sekvence byly získány ze 75 populací *M. nemorosum*, přičemž u 43 populací byly analyzovány jak chloroplastové úseky DNA (trnT^{UGU}-trnL^{UAA}, psbA-trnH^{GUG}, rpl32-trnL^{UAG}), tak i jaderné úseky DNA (Agt1, At103). Amplifikace úseků AroB a Eif3E byla opakovaně neúspěšná za různých podmínek, a proto byly tyto úseky z dalších analýz vyřazeny.

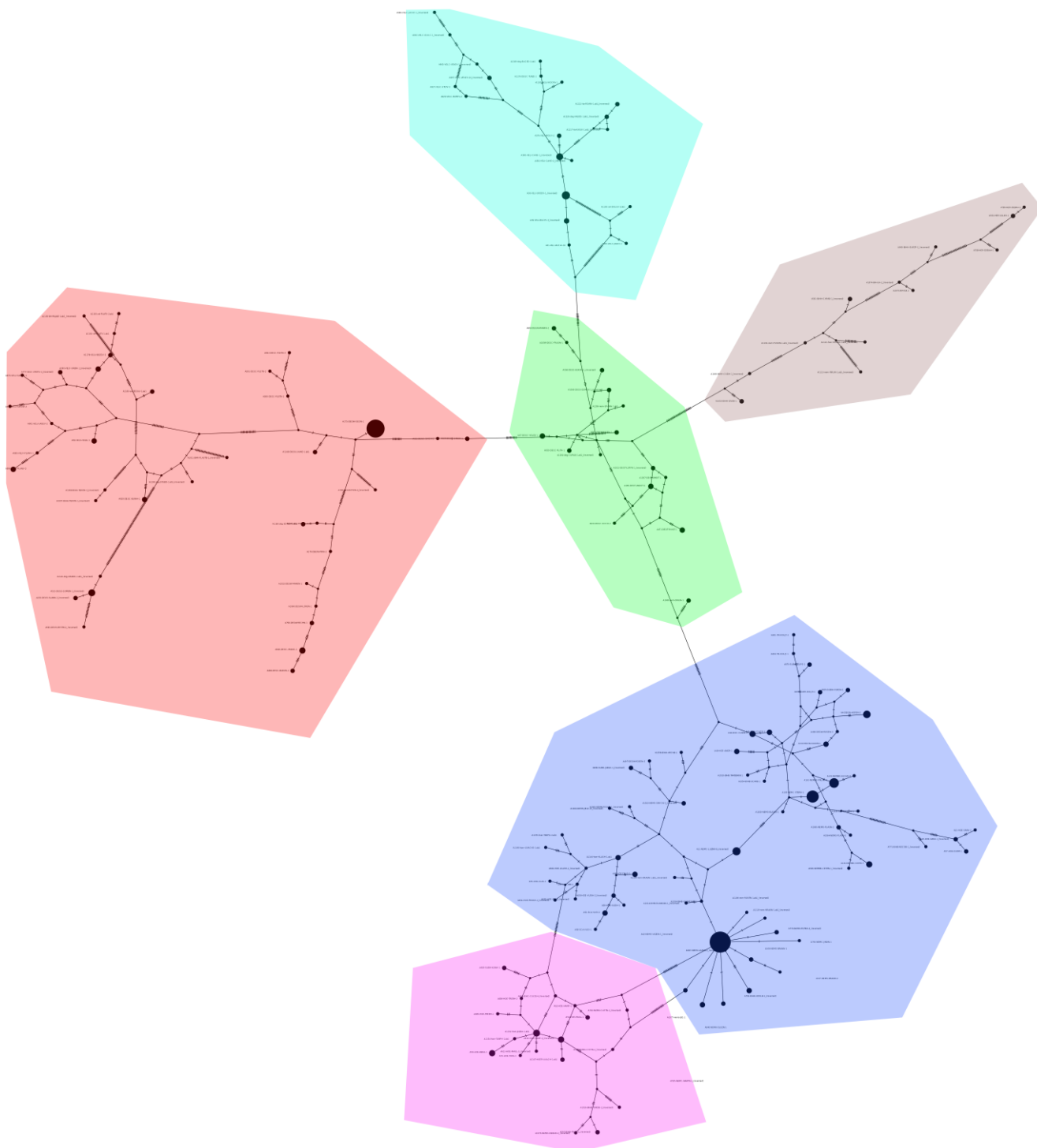
3.1.1. Chloroplastová DNA

Alignovaná délka úseku trnT-trnL je 825 bp, psbA-trnH 670bp a rpl32-trnL 708bp. Spojením 580 sekvencí všech tří chloroplastových úseků vznikl aligment o délce 2203 bp. V aligmentu bylo obsaženo 1035 variabilních míst se substitucemi a různě dlouhými indely. V úseku psbA-trnH byla také zjištěna jedna 7bázová inserce. Program Fabox v aligmentu odhalil 217 haplotypů. Z nich byla vytvořena haplotypová síť (Obr. 10) v programu PopART funkcí TCS network při 90% spojovacím limitu.

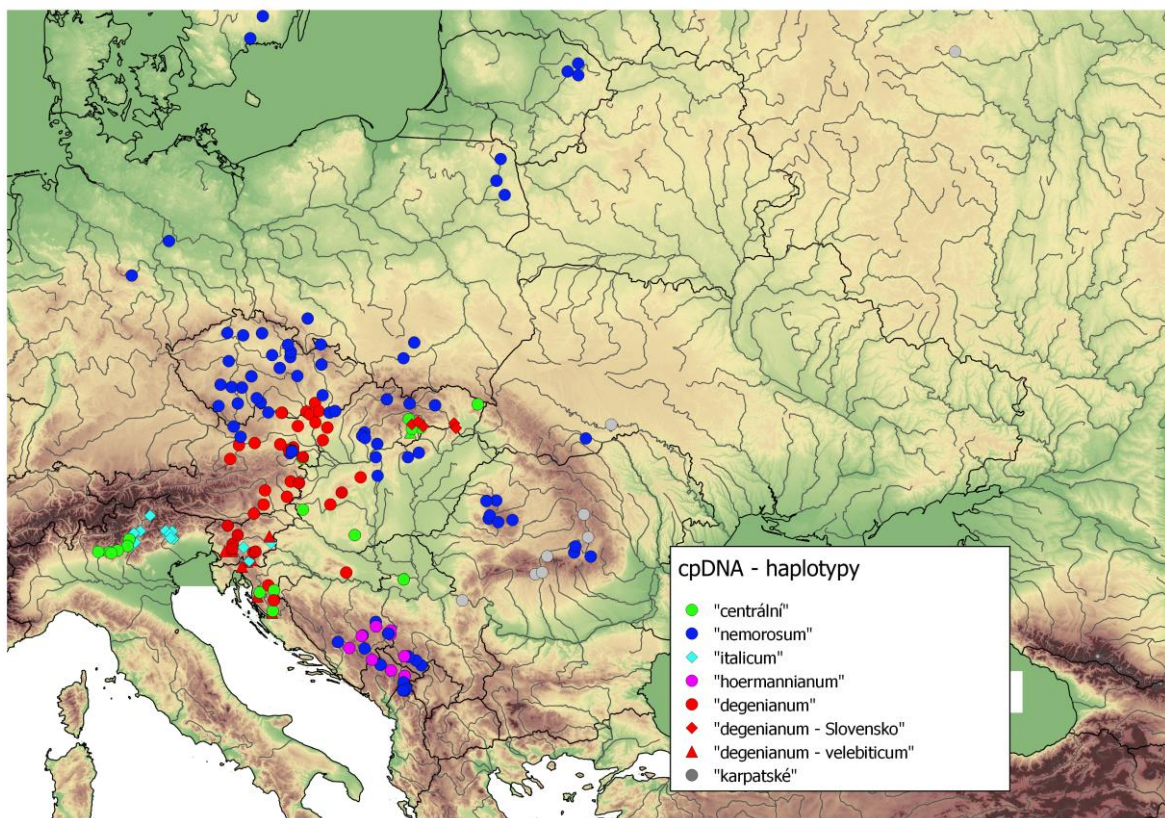
Vzniklá haplotypová síť je značně komplikovaná, přesto ukazuje poměrně zřetelnou strukturu. Lze rozlišit zhruba 6 skupin haplotypů, které zčásti odpovídají taxonomickému členění a geografickému původu lokalit. Centrální skupina haplotypů („haplotypy centrální“, obrázek 10 - zelená barva) byla zjištěna v populacích rozšířených po obvodu Panonské nížiny, v SZ Chorvatsku a na jižním úpatí Alp. Poměrně izolovanou pozici v rámci této skupiny má haplotyp populace z Drienčanského krasu. Druhá skupina („haplotypy *nemorosum*“, obrázek 10 - modrá barva) je značně komplexní a zahrnuje populace z různých regionů i populace různých druhů. Poměrně kompaktní je zde skupina haplotypů rozšířená v populacích *M. nemorosum* z ČR, Slovenska a severní Evropy. Do této druhé skupiny však také patří haplotypy zjištěné u druhu *M. subalpinum* a u několika populací označených jako *M. degenianum* z kontaktní zóny mezi *M. subalpinum* a *M. nemorosum* s. l. v oblasti Vídeňského lesa a také populace z pohoří Bihar a podhůří Karpat. Další podskupinou jsou haplotypy *M.*

hoermannianum ze Srbska. K těmto srbským haplotypům je připojena 3. skupina („haplotypy *hoermannianum*“, obrázek 10 – růžová barva), která je oddělena řadou mutací a obsahuje též haplotypy *M. hoermannianum* ze Srbska. Další velkou skupinou je 4. skupina („haplotypy *degenianum*“ obrázek 10 – červená barva), která je tvořena několika podskupinami, převážně ze severovýchodního podhůří Alp, západního Slovenska a Maďarska a z Chorvatska. V této skupině také tvoří podskupinu haplotypy některých populací z východního Slovenska, konkrétně z populace Slanec (SLANN), Gombasek (GOMBN), Byšta (BYSTN) a Ochtinná (HRADD). Do této skupiny se ještě řadí část haplotypů z rostlin morfologicky odpovídajících *M. velebiticum* ze Slovinska a Chorvatska. Pátá a šestá skupina (obrázek 10 - tyrkysová a šedivá barva) jsou poměrně malé skupiny, přičemž do 5. skupiny („haplotypy *italicum*“) patří haplotypy z rostlin morfologicky odpovídajících *M. velebiticum* agg. ze Slovinska a italských Alp. Šestou skupinu tvoří haplotypy („haplotypy karpatské“) z hřebenové části Karpat a jejich podhůří. K této skupině haplotypů patří i haplotyp zjištěný u rostlin získaných z evropské části Ruska i od Irkutsku na Sibiři, kde však je *Melampyrum nemorosum* považováno pouze za zavlečené. Geografické rozšíření jednotlivých skupin haplotypů je patrné z obrázku 11.

Populace byly podle zjištěných haplotypových skupin rozděleny pro účely morfometrických a cytometrických analýz do různých skupin. Vzhledem ke známým rozdílům ve variabilitě rostlin se stejnými haplotypy, ale z různých regionů, byly populace rostlin rozděleny do geografických skupin se zřetelem na kontaktní zóny jednotlivých haplotypových skupin. Bylo vytvořeno 5 skupin obsahujících různý počet haplotypových skupin. 1) Skupina populací severně od Alp zahrnující rakouské a české rostliny (Rakousko/Česko; haplotypové skupiny „*nemorosum*“ a „*degenianum*“), 2) skupina populací ze Slovenska, Maďarska a JV Rakouska (Slovensko/Maďarsko; „centrální“ „*nemorosum*“, „*degenianum*“, *degenianum* - Slovensko), 3) Karpaty („*nemorosum*“ „*karpatské*“), 4) Slovinsko („*degenianum*“, „*velebiticum*“ a „*italicum*“) a skupina Srbsko („*hoermannianum*“ a „*nemorosum*“).



Obr. 10: Haplotypová síť analyzovaných úseků cpDNA ($\text{trnT}^{\text{UGU}}\text{-trnL}^{\text{UAA}}$, $\text{psbA-trnH}^{\text{GUG}}$, $\text{rpl32-trnL}^{\text{UAG}}$)



Obr. 11: Geografické rozšíření jednotlivých haplotypových skupin v populacích *M. nemorosum* agg

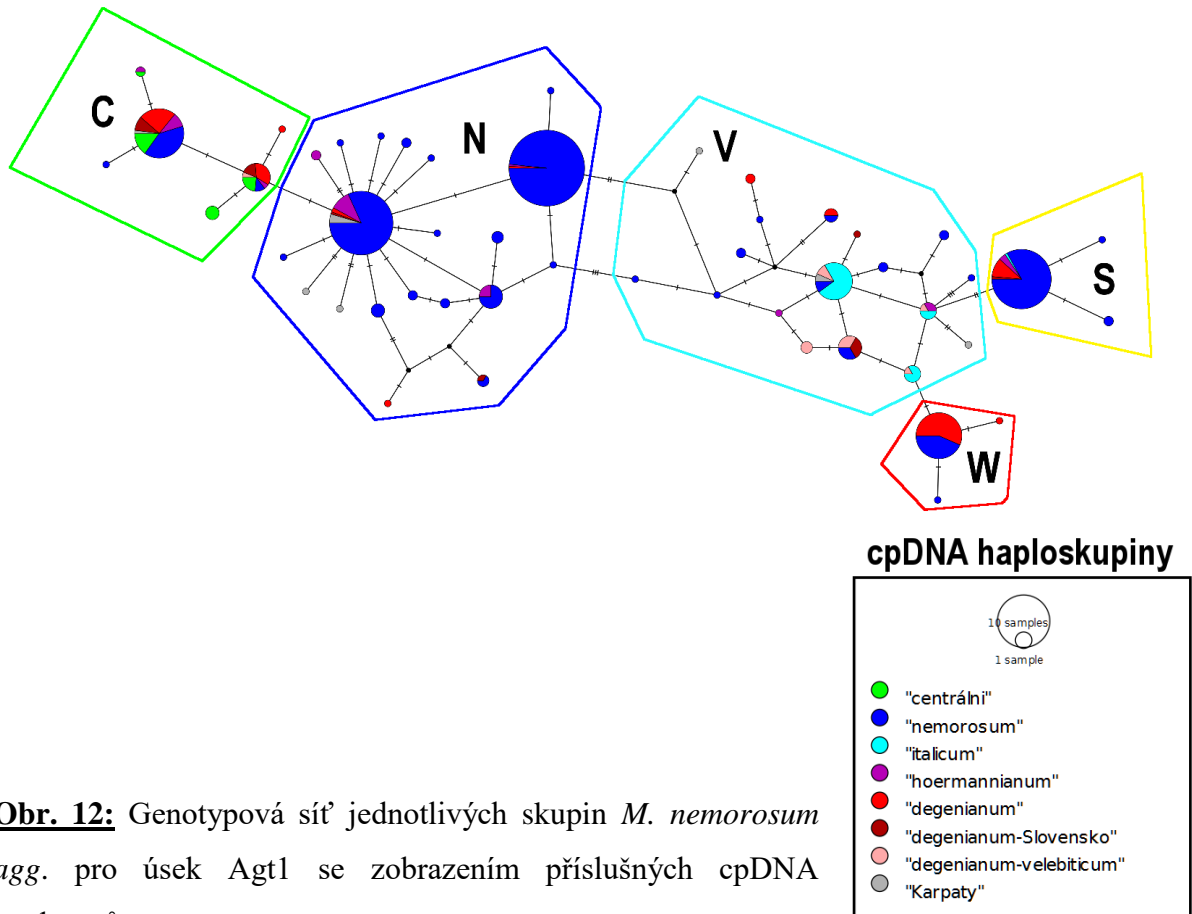
3.1.2. Jaderná DNA

3.1.2.1. Agt1

Celková délka aligmentu úseku Agt1 je 253 bp. Tento úsek se ukázal pro analýzy velmi vhodný, i když analýza výsledků je poměrně obtížná. Ze zjištěných alel byla sestavena síť, která ukazuje složitou strukturu vzájemných vztahů (Obr. 12) V mnohých případech se podařilo sestavit sekvence s degenerovanými bázemi složením 2 alel (Obr. 13), takže lze předpokládat jejich výskyt ve zkoumaných rostlinách.

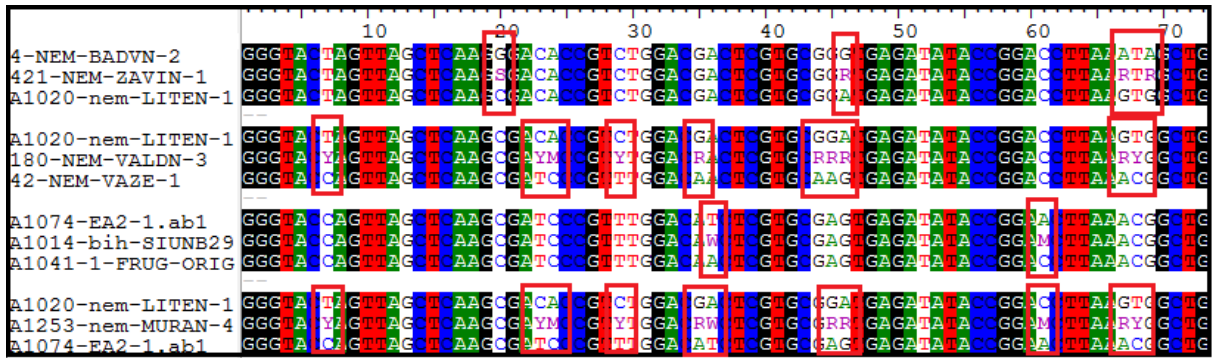
Na obrázku 12 jsou také vyneseny příslušné haplotypové skupiny cpDNA, z čehož je patrné, že většina alel byla nalezena u více haplotypových skupin a proto se struktura zdá na první pohled chaotická. Avšak při podrobném pohledu lze nalézt jasné trendy. Skupina alel C byla nalezena v rostlinách s *centrálními* haplotypy a dále u větší části haplotypů *degenianum*, ale také *nemorosum* a *hoermanianum*. Skupina N obsahovala především haplotypy

nemorosum, *hoermannianum* a *karpatské*. Ve skupině V jsou soustředěny především haplotypy *italicum* a *velebiticum*, ale také *nemorosum* a část *karpatských*. Ve skupině W je pak významná část haplotypů *degenianum*, společně s částí *nemorosum* a ve skupině S převažuje haplotyp *nemorosum*.



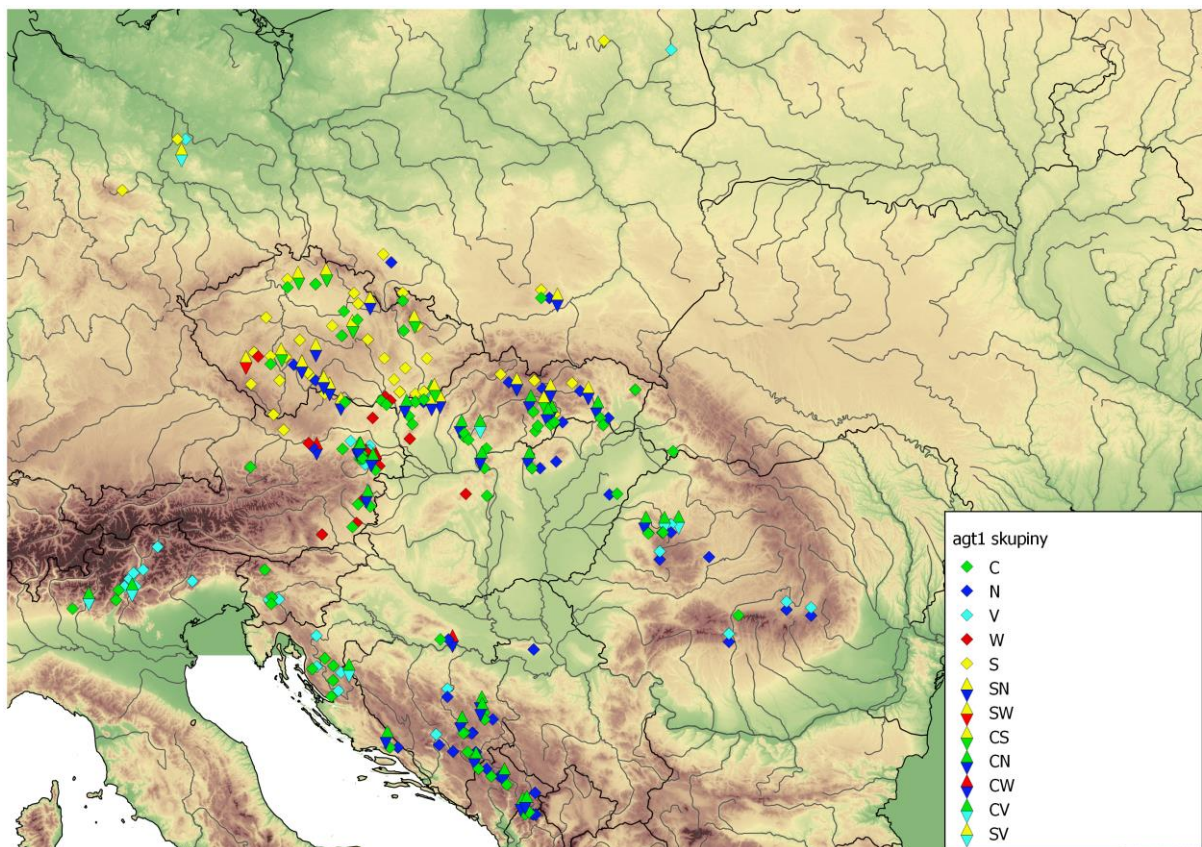
Obr. 12: Genotypová síť jednotlivých skupin *M. nemorosum* agg. pro úsek Agt1 se zobrazením příslušných cpDNA haplotypů

Ještě zajímavější výsledky zjistíme, když tyto rozlišené skupiny alel úseku Agt1 vyneseme do mapy (Obr. 14). Rozšíření skupiny C je nápadně podobné rozšíření cpDNA haplotypů „centrální skupiny“ a části haplotypů *degenianum* (Obr. 15). Rozšíření skupiny N se také nápadně shoduje s rozšířením haplotypů *nemorosum* a *degenianum*. Obě skupiny však zasahují podstatně více k severu než příslušné haplotypové skupiny. Alely ze skupiny V byly překvapivě zjištěny nejen v oblasti výskytu haplotypů *velebiticum* a *italicum*, ale také v Karpatech a pohoří Bihor.

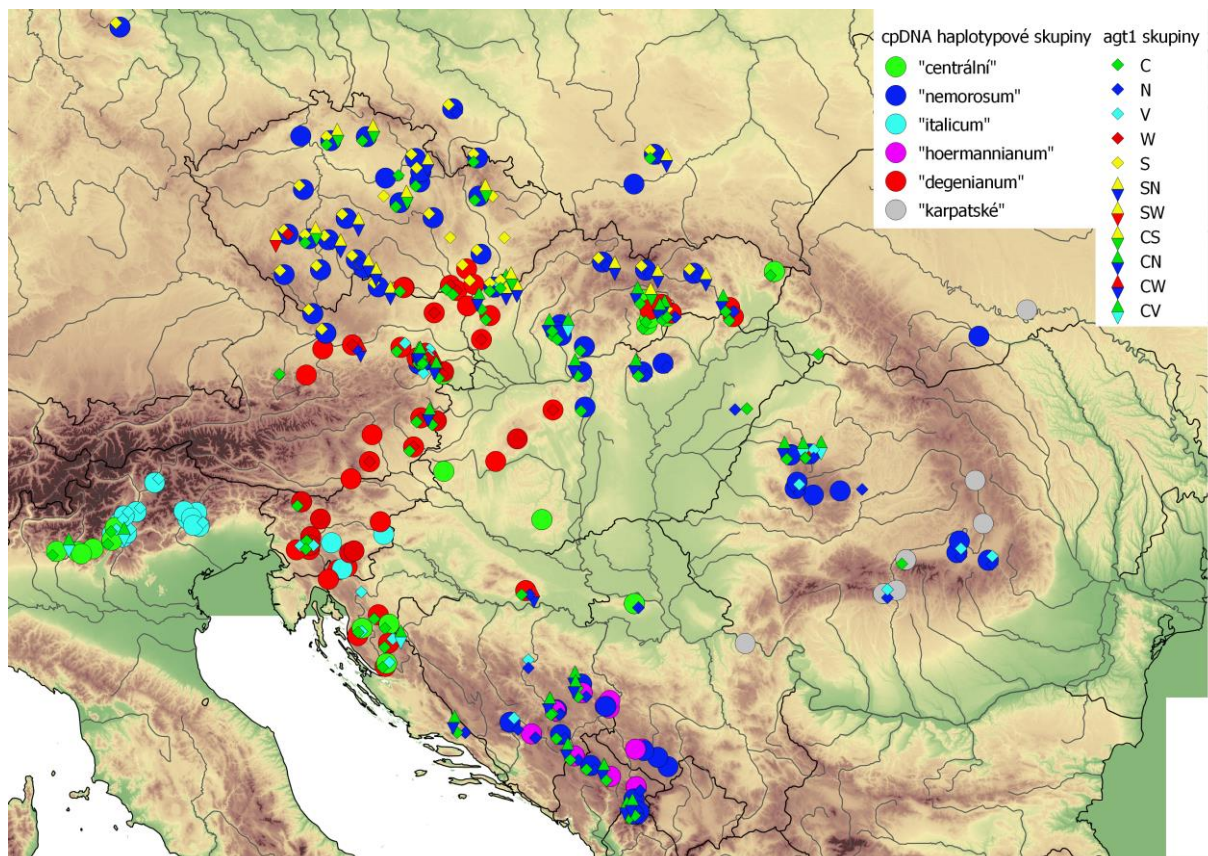


Obr. 13: Degenerované báze v sekvencích jaderného úseku Agt1 u rostlin *M. nemorosum* agg

Skupina alel W je nápadně vázaná na SV podhůří Alp, zatímco skupina S představuje severní skupinu alel, které byly zjištěny pouze severně od Dunaje. Jižní hranice jejich výskytu prochází jižní Moravou a středním Slovenskem (Obr. 14).



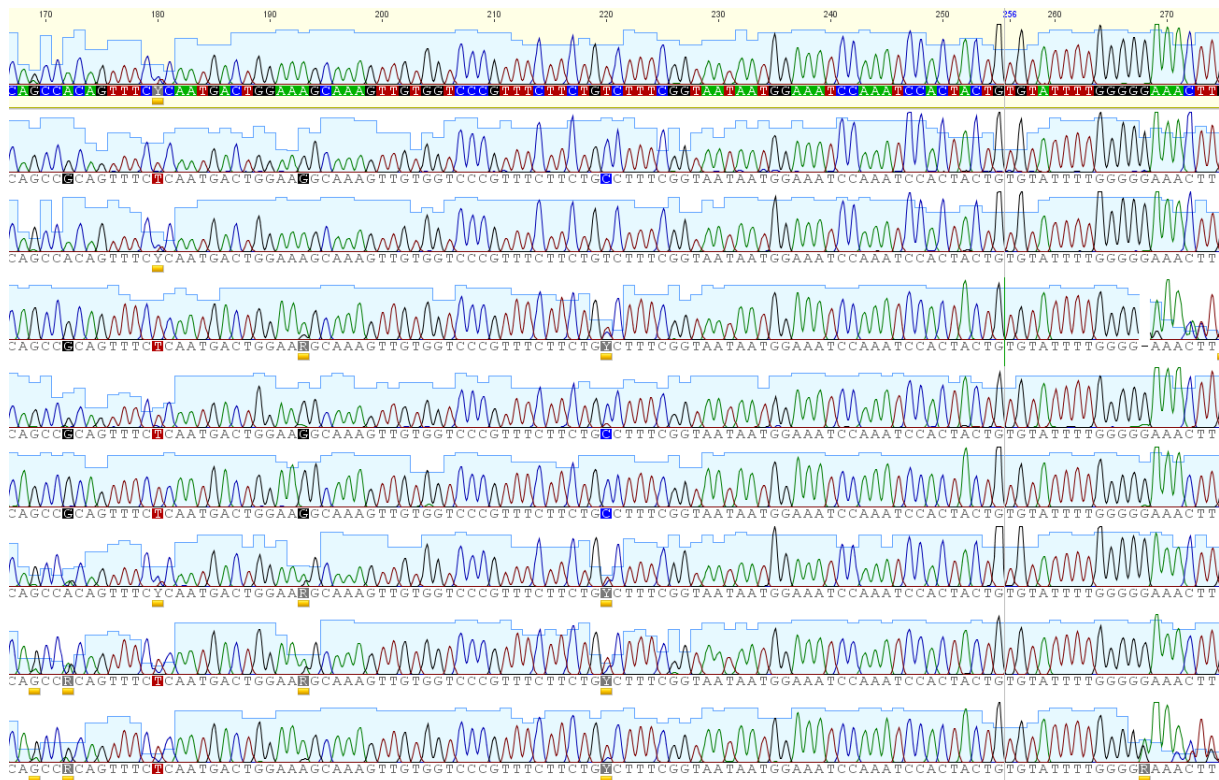
Obr. 14: Geografické rozšíření alel v populacích *M. nemorosum* agg



Obr. 15: Geografické rozšíření alel v populacích *M. nemorosum* agg. se zobrazením příslušných haplotypových skupin

3.1.2.2. At103

Celková délka aligmentu úseku At103 je 350 bp. Tento úsek se ukázal jako velice variabilní, sekvence obsahují velké množství variabilních míst a indelů. Například v populaci Zbrod (ZBROD) bylo zjištěno u 10 rostlin 7 různých genotypů (Obr. 16). Tato ohromná vnitropopulační variabilita ukazuje, že tento úsek není vhodný pro požadované analýzy.

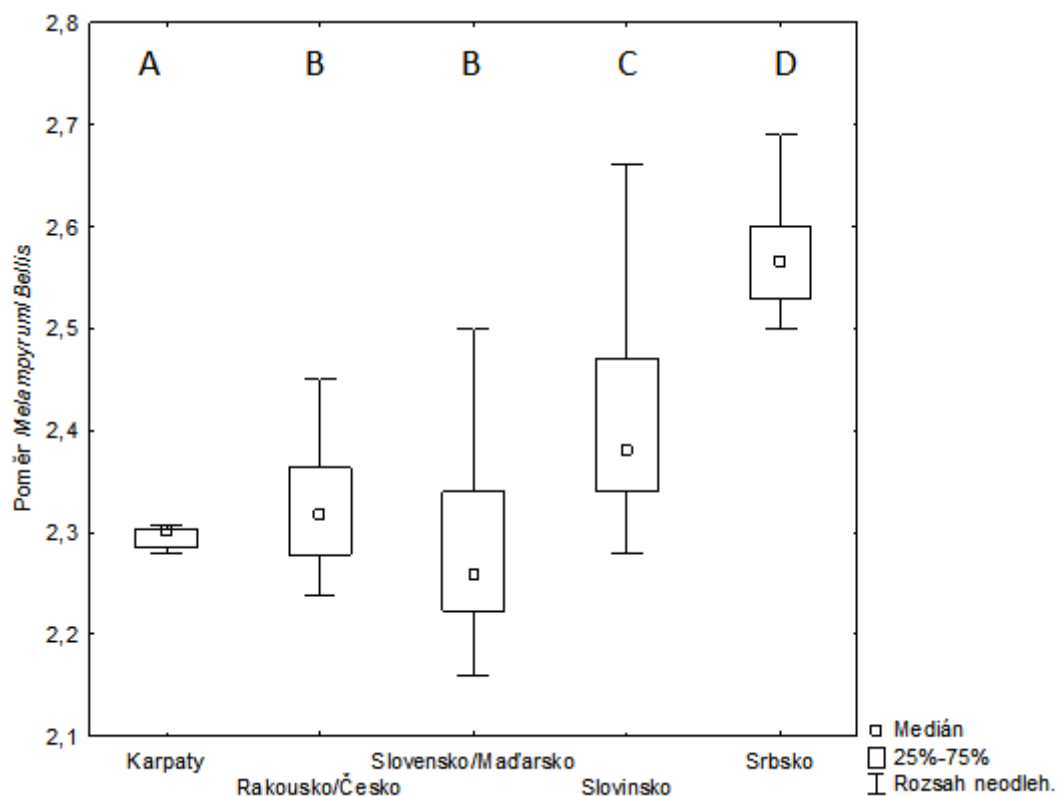


Obr. 16: Zobrazení hypervariability v sekvencích jaderného úseku At103 v populaci Zbrod

3.2. Cytometrické analýzy

Cytometrická data byla rozdělena do jednotlivých výše zmíněných regionů (Karpaty, Rakousko/Česko, Slovensko/Maďarsko, Slovinsko, Srbsko) a dále do zjištěných haplotypových skupin

U všech analyzovaných populací byla na základě poměru fluorescence *Melampyrum* a *Bellis* stanovena velikost genomu. Poměr fluorescencí mezi *Melampyrum* a *Bellis* pro jednotlivé skupiny je vyneseno do grafu (Obr. 17). Dále byla vypočtena pro každou skupinu mezipopulační variabilita (Tabulka 8).



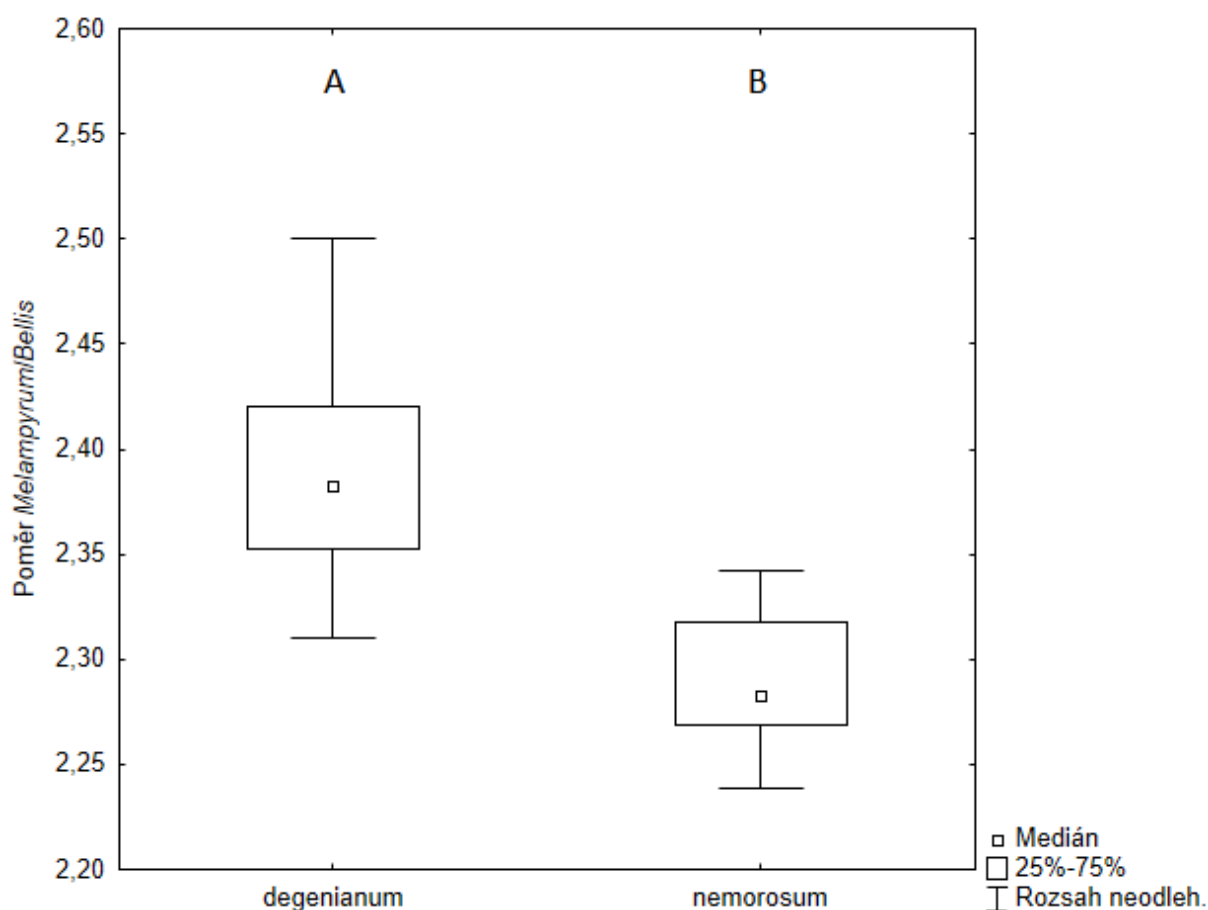
Obr. 17: Velikost genomu u geograficky vymezených skupin vyjádřená poměrem fluorescence *Melampyrum* a *Bellis*, barveno DAPI. Se zahrnutím výsledků Tukeyho testu

Tab. 8: Statistické výsledky analýz velikosti genomu u geograficky vymezených skupin *M. nemorosum*

Skupina	Karpaty	Rakousko/ Česko	Slovensko/ Maďarsko	Slovinsko	Srbsko
Barvení	DAPI	DAPI	DAPI	DAPI	DAPI
Počet měření	10	75	73	58	22
Sample CV mean	1,737	2,279	2,241	2,713	2,689
Standard CV mean	1,806	2,643	2,601	3,426	3,151
Poměr min	2,279	2,239	2,160	2,280	2,310
Poměr max	2,307	2,57	2,548	2,660	2,720
Poměr průměr	2,295	2,331	2,282	2,403	2,569
Variabilita (%)	1,22	14,19	17,00	15,81	15,95

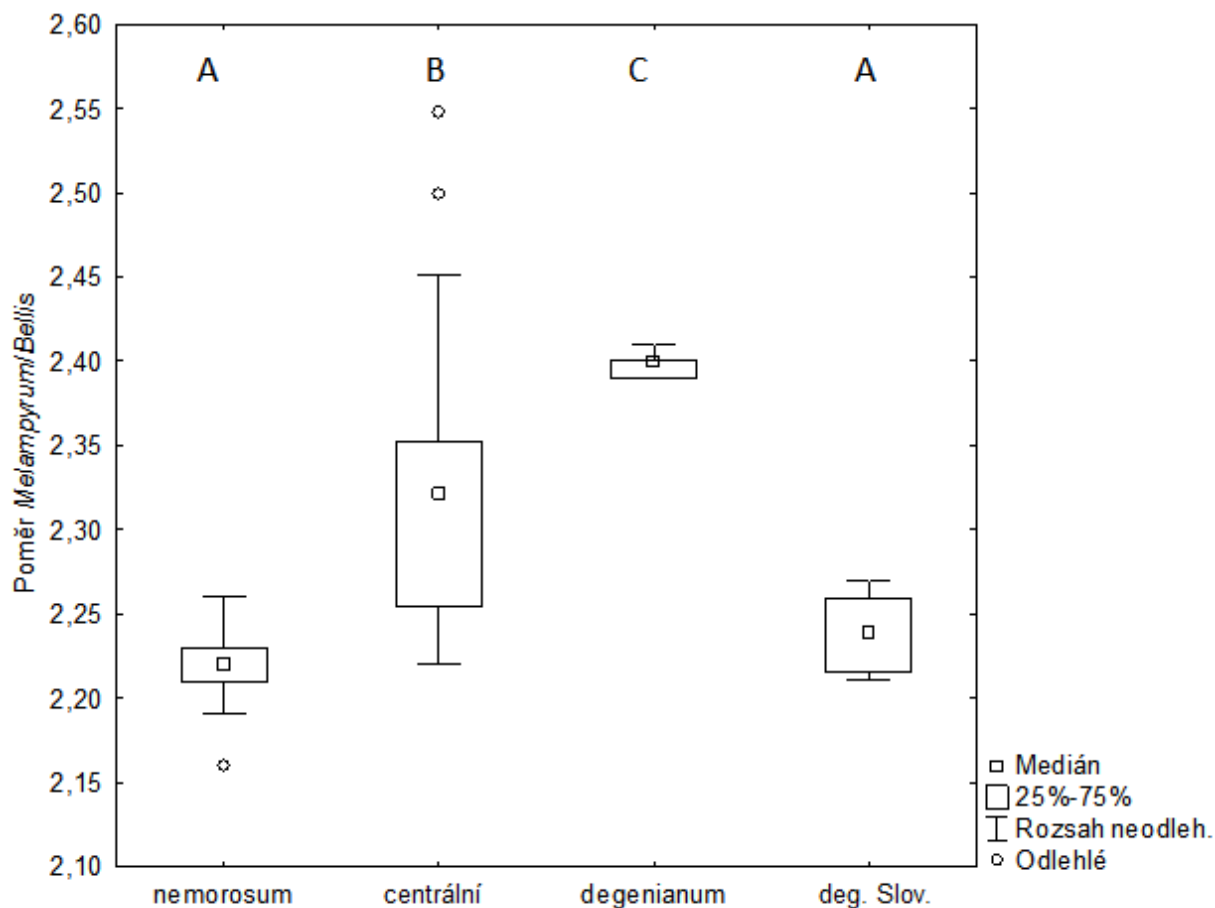
Na obrázku 17 je vidět, že skupina Srbsko, která obsahuje pouze haplotypy *hoermannianum* má zřetelně největší genom. Ostatní skupiny obsahují více než jednu skupinu haplotypů a tudíž je velikost genomu variabilní (ANOVA; DF = 4, F= 70,4, p < 0,001). To se ukazuje také při výpočtu mezipopulační variability ve velikosti genomu v tabulce 8. Největší variabilitu má skupina Slovensko/Maďarsko obsahující haplotyp *degenianum*, který má poměrně velký genom a haplotypy části slovenských populací (např. Slanec), které mají genom nejnižší.

Pro jednotlivé geografické oblasti byla provedena analýza velikosti genomu podle jednotlivých chloroplastových haplotypů. Vždy byla provedena separátní analýza dané skupiny a poměry *Melampyrum/Bellis* pro jednotlivé haplotypy byly vyneseny do grafů. Skupina Rakousko/Česko (Obr. 18), Slovensko/Maďarsko (Obr. 19) a skupina Slovinsko (Obr. 20).



Obr. 18: Velikost genomu haplotypů „*degenianum*“ a „*nemorosum*“ v rámci geografické skupiny Rakousko/Česko vyjádřená poměrem fluorescence *Melampyrum* a *Bellis*, barveno DAPI. Se zahrnutím výsledků Tukeyho testu

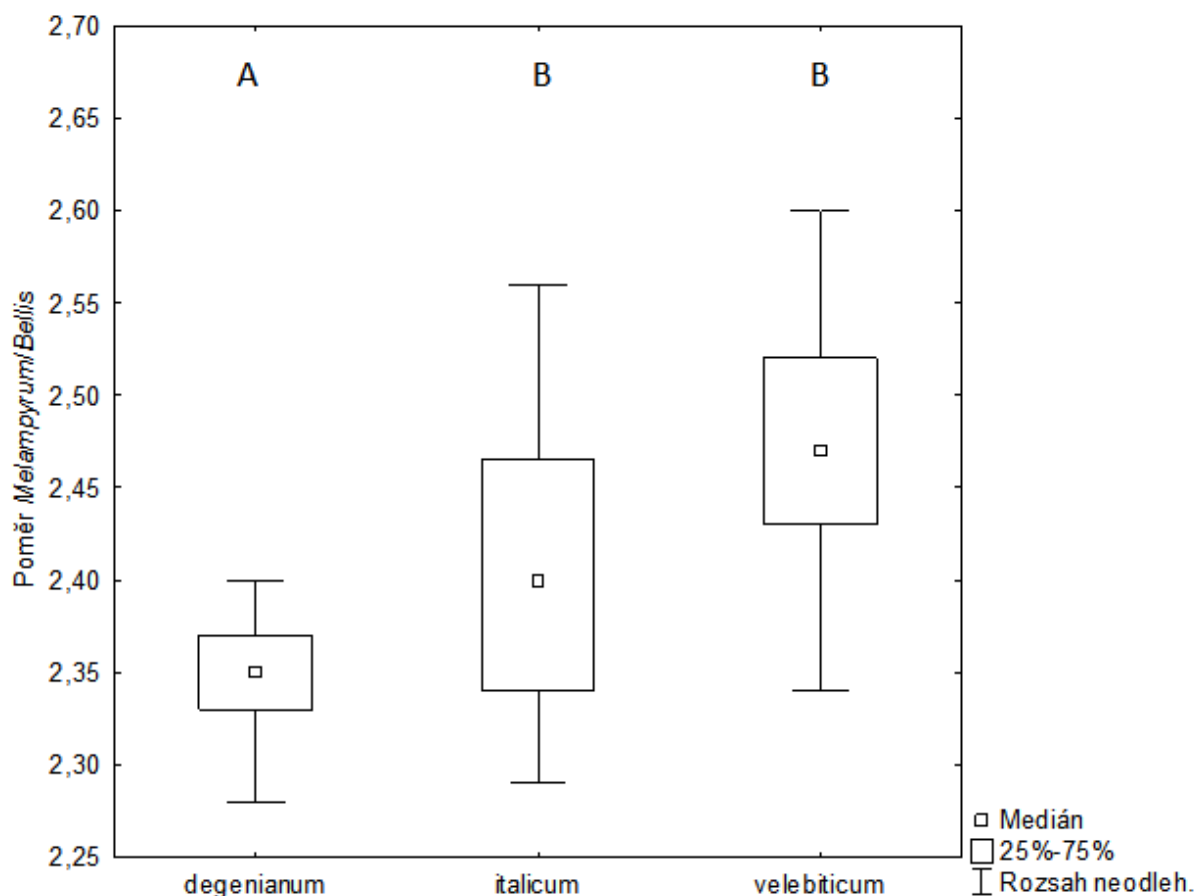
Ve skupině Rakousko/Česko jsou zastoupeny dva haplotypy – *degenianum* a *nemorosum*. Z obrázku 18 je patrné, že se v území velikost genomu u populací s různými haplotypy značně liší, což potvrdila i ANOVA (DF = 1, F = 57,6, p < 0,0000001).



Obr. 19: Velikost genomu haplotypů *nemorosum*, *centrální*, *degenianum* a *degenianum Slovensko* v rámci geograficky vymezené skupiny Slovensko/Maďarsko vyjádřená poměrem fluorescence *Melampyrum* a *Bellis*, barveno DAPI. Se zahrnutím výsledků Tukeyho testu

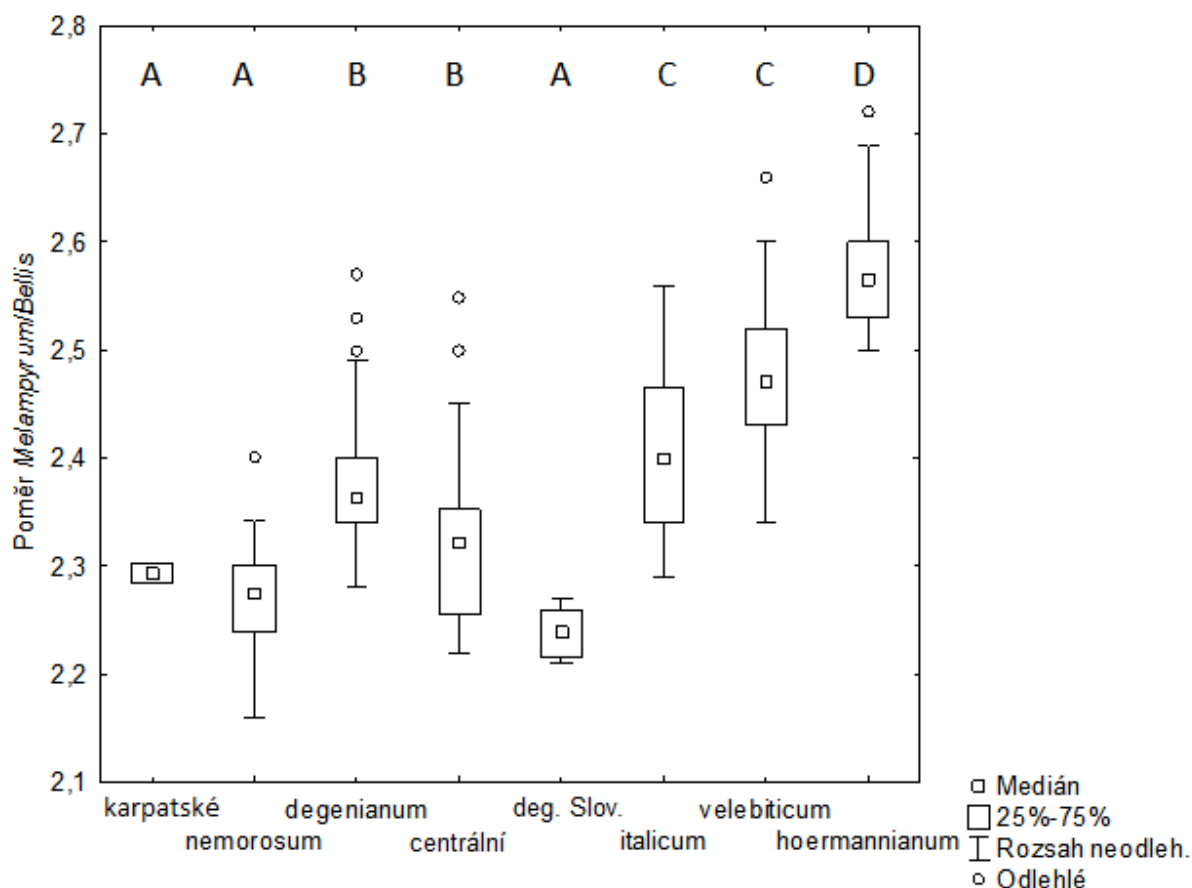
Velikost genomu se liší také u haplotypů obsažených ve skupině Slovensko/Maďarsko (Obr. 19), kde dosahuje průměrně největších hodnot haplotyp *degenianum*. Haplotypy centrální skupiny dosahují středních hodnot mezi haplotypem *nemorosum* a rostlinami s haplotypem ze skupiny *degenianum* z východního Slovenska (ANOVA, DF = 3, F= 20,97, p < 0,0000001).

V rámci skupiny Slovinsko se dva ze tří haplotypů (*italicum* a *velebiticum*) velikostí genomu značně podobají. Pouze haplotyp *degenianum* se od již zmíněných haplotypů velikostí genomu liší (Obr. 20) (ANOVA DF = 2, F= 14,33, p< 0,000001).



Obr. 20: Velikost genomu haplotypů *degenianum*, *italicum* a *velebiticum* v rámci geograficky vymezené skupiny Slovinsko vyjádřená poměrem fluorescence *Melampyrum* a *Bellis*, barveno DAPI. Se zahrnutím výsledků Tukeyho testu

Posledním krokem bylo zobrazení velikosti genomu všech populací (vyjádřené poměrem fluorescence *Melampyrum* k *Bellis*) podle zjištěných haplotypů, bez ohledu na jejich geografickou polohu.



Obr. 21: Velikost genomu zkoumaných haplotypů napříč všemi molekulárně vymezenými skupinami vyjádřená poměrem fluorescence *Melampyrum* a *Bellis*, barveno DAPI. Se zahrnutím výsledků Tukeyho testu

Z obrázku 21 je zřetelné, že velikost genomu se mezi jednotlivými haplotypy napříč geografickými skupinami liší. Nejvyšší hodnoty mají populace s haplotypem *hoermannianum* ze Srbska. Naopak nejmenší genom mají populace s haplotypy karpatskými, *nemosum* a *degenianum* – Slovensko (ANOVA DF = 7, F = 70,7, p < 0,001). U jednotlivých haplotypů byla na základě statistických údajů vypočtena variabilita ve velikosti genomu (Tab. 9). U některých haplotypů byla zjištěna poměrně velká variabilita. Jedná se především o haplotyp *nemosum* (16,97 %) a *hoermannianum* (15,95 %). Nejnižší hodnota byla zaznamenána u karpatských haplotypů a *degenianum* – Slovensko, ta je ovšem způsobena pravděpodobně malým počtem analyzovaných vzorků.

Tab. 9: Statistické výsledky analýz velikosti genomu pro jednotlivé haplotypy okruhu *M. nemorosum*

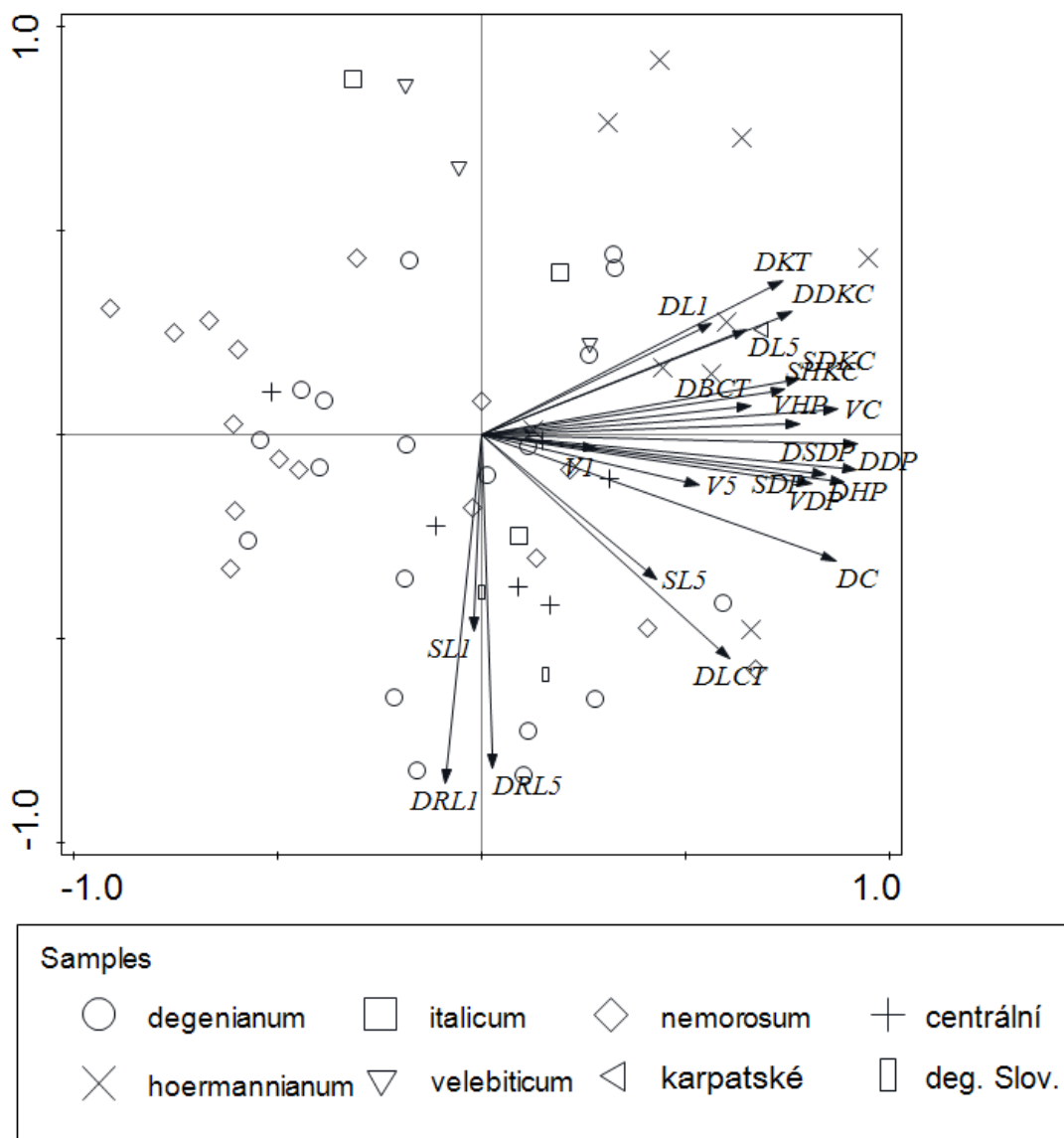
haplotyp	karp.	degen.	hoerm.	ital.	centr.	nem.	vel.-Slo.	veleb.
Barvení	DAPI	DAPI	DAPI	DAPI	DAPI	DAPI	DAPI	DAPI
Počet měření	4	59	22	16	36	74	11	16
Sample CV mean	1,737	2,552	2,689	2,148	2,106	2,266	2,402	2,840
Standard CV mean	1,806	2,708	3,151	2,780	2,448	2,316	2,590	2,750
Poměr min	2,285	2,280	2,310	2,290	2,220	2,160	2,210	2,340
Poměr max	2,303	2,570	2,720	2,560	2,548	2,546	2,269	2,660
Poměr průměr	2,294	2,375	2,569	2,405	2,318	2,274	2,236	2,476
Variabilita (%)	0,784	12,21	15,95	11,22	14,15	16,97	2,63	12,92

3.3. Morfometrické analýzy

Před vlastními analýzami byla pro všech 26 znaků vypočtena korelační matice (Příloha 2), která odhalila 4 vysoce korelované znaky. Jednalo se o znaky na květu a kalichu. Na květu to bylo otevření (O), které korelovalo s délkou dolního pysku (DDP; $r = 0,919$), délka koruny bez báze (DCB) korelující s délkou korunní trubky bez báze (DCTB; $r = 0,951$) a s délkou koruny (DC; $r = 0,945$). Délka koruny byla korelována také s délkou korunní trubky bez báze ($r = 0,930$). Ze znaků na kalichu byla korelována pouze jedna dvojice znaků. Jednalo se o délku horního kališního cípu (DHCK) s délkou dolního kališního cípu (DDKC; $r = 0,949$). Pro analýzu hlavních komponent byly proto vyloučeny tyto znaky O, DCB, DCTB a DHCK. U zbývajících dat byl proveden test normality rozložení. Test odhalil, že se rozložení zkoumaných znaků výrazně neodlišovalo od normálního rozložení a tudíž nebylo nutné data transformovat. Data byla pouze standardizována.

3.3.1. Analýza hlavních komponent

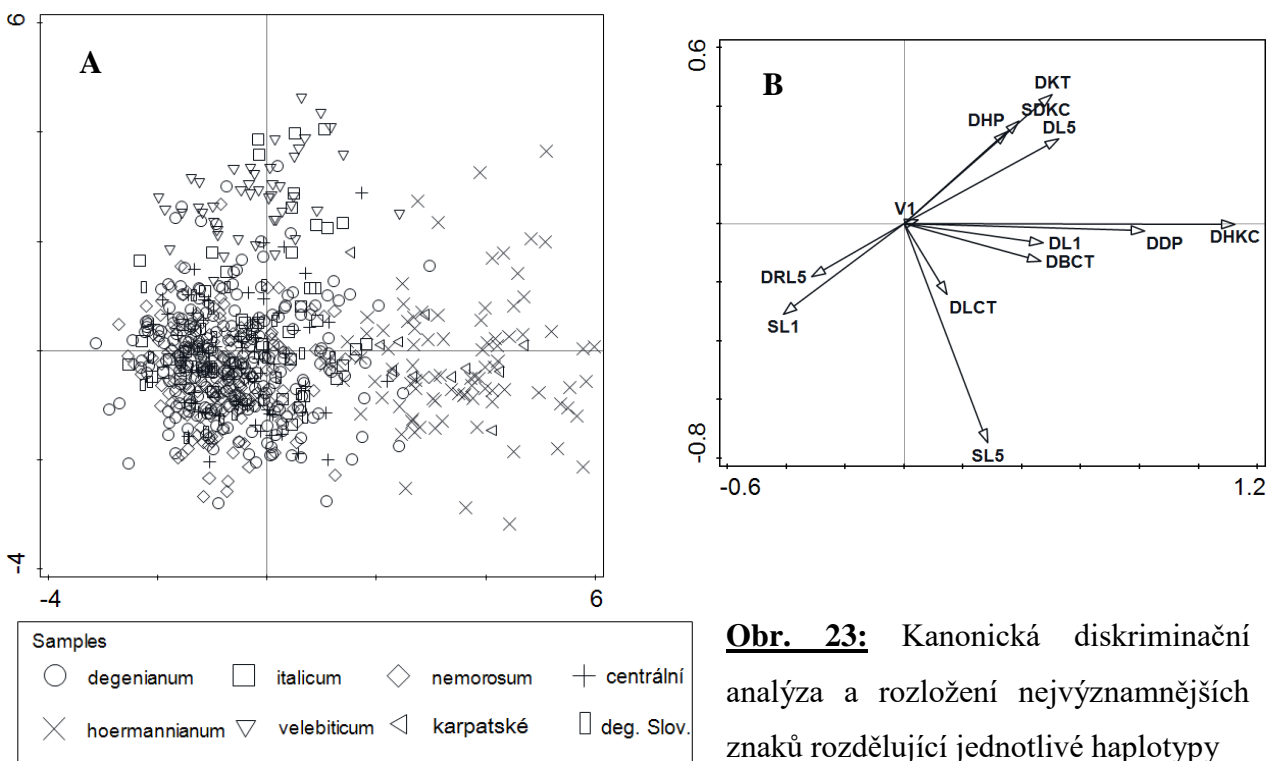
Analýza hlavních komponent měla odhalit, zdali lze nalézt v získaných datech nějakou strukturu. Analýza zčásti odhalila určitou diferenciaci mezi některými skupinami haplotypů. Na obrázku 22 jsou v ordinačním prostoru zobrazeny populace podle přítomnosti jednotlivých haplotypů. Zatímco levou část ordinačního prostoru zaplňují především populace haplotypu *nemorosum* a *degenianum*, pravou část zaplňují haplotypy *hoermannianum*. Zbylé skupiny haplotypů se víceméně nacházejí v celém ordinačním prostoru. Rozmístění jednotlivých znaků v ordinačním prostoru je také na obrázku 22.



Obr. 22: Rozmístění zkoumaných haplotypů na základě populačních průměrů znaků a rozmístění 23 zkoumaných znaků v PCA prostoru (1. osa vysvětluje 42,27 %, 2. osa 59,22%)

3.3.2. Kanonická diskriminační analýza

Ani při kanonické diskriminační analýze nedošlo k úplnému rozdělení jednotlivých haplotypů. Jak lze na obrázku 23a vidět, pouze haplotypy *hoermannianum*, *karpatské*, *velebiticum* a *italicum* jsou odděleny od skupiny zbylých haplotypů v levé spodní části diagramu. Haplotypy *hoermannianum* a *karpatské* haplotypy jsou umístěny v pravé části diagramu, zatímco *velebiticum* a *italicum* v horní části (převážně horní levé) diagramu. Populace se zbylými haplotypy tvoří poměrně velký a komplikovaný shluk v levé spodní části prostoru. První kanonická osa do určité míry odděluje haplotypy *hoermannianum* a *karpatské* od zbytku haplotypů. V obrázku 23b je zobrazeno rozložení nejvýznamnějších znaků, které částečně oddělují jednotlivé haplotypy. Významnými znaky jsou především délka horního kališního cípu (DHKC), délka dolního pysku (DDP) a délka kališní trubky (DKT). Druhá kanonická osa částečně odděluje rostliny s haplotypem *velebiticum*. V tomto případě je významným znakem šířka 5. listenu (SL5). V tabulce 10 jsou uvedeny koeficienty diskriminační funkce pro nejvýznamnější znaky.

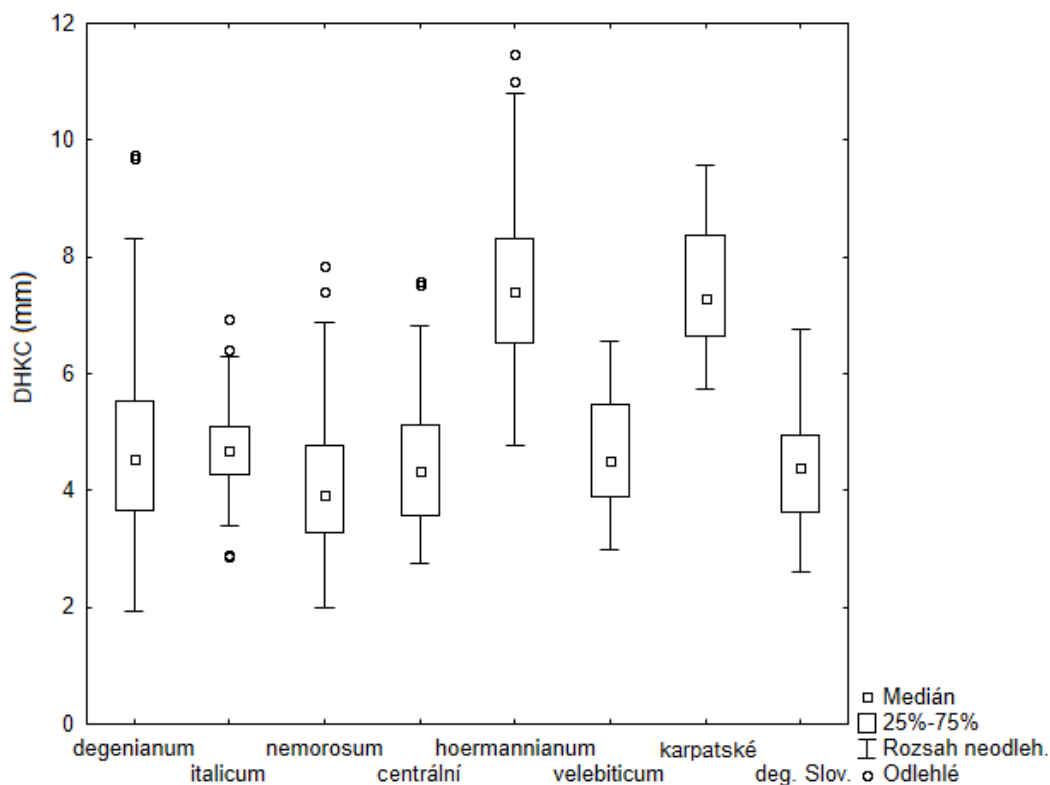


Obr. 23: Kanonická diskriminační analýza a rozložení nejvýznamnějších znaků rozdělující jednotlivé haplotypy

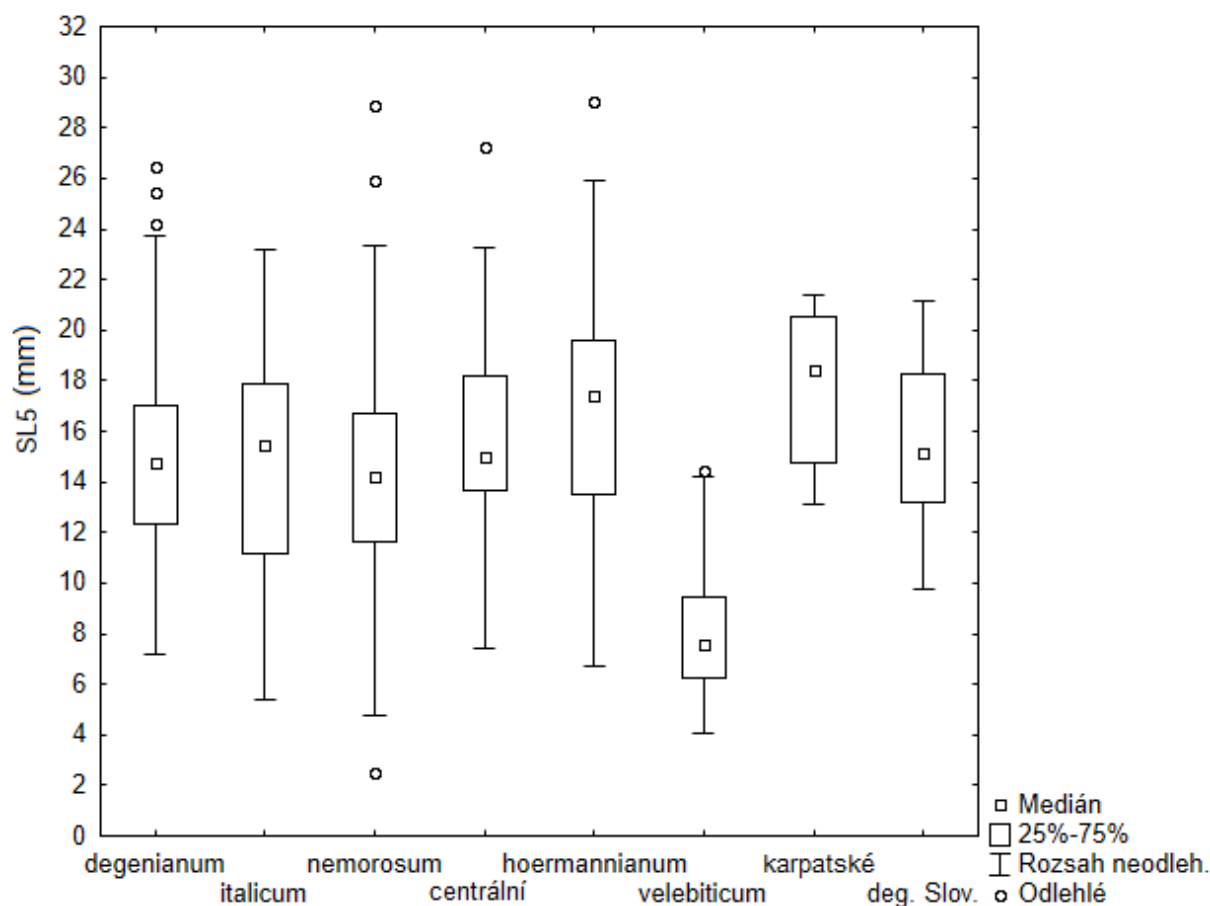
Tab. 10: Koeficienty diskriminační funkce nejvýznamnějších znaků

Znak	Osa 1	Osa 2	Osa 3	Osa 4
DHP	-0,41598	0,663602	-0,74213	-0,245604
DDP	0,543815	-0,02548	0,245302	0,000859094
DBCT	0,261177	-0,36423	0,729764	0,295987
DLCT	-0,16803	-0,11989	-0,237079	-0,578481
SL5	0,04391	-0,21198	-0,0587122	0,0224392
DL5	0,010076	0,114948	0,0294495	-0,0884036
DRL5	-0,33441	-0,0721	0,21115	-0,217459
SL1	-0,12621	-0,0069	0,148397	-0,0092508
V1	-0,08669	0,041689	-0,0266738	0,163154
DL1	0,067265	-0,02574	-0,0430667	-0,0111517
DHKC	0,415558	-0,20759	0,166531	0,193835
DKT	-0,15152	0,872972	0,0998628	-0,0535913
SDKC	-0,1847	0,985463	1,59001	0,0432151

Znaky odlišující haplotypy *hoermannianum*, *karpatské* a *velebiticum* jsou vyneseny na obrázcích 24 a 25.

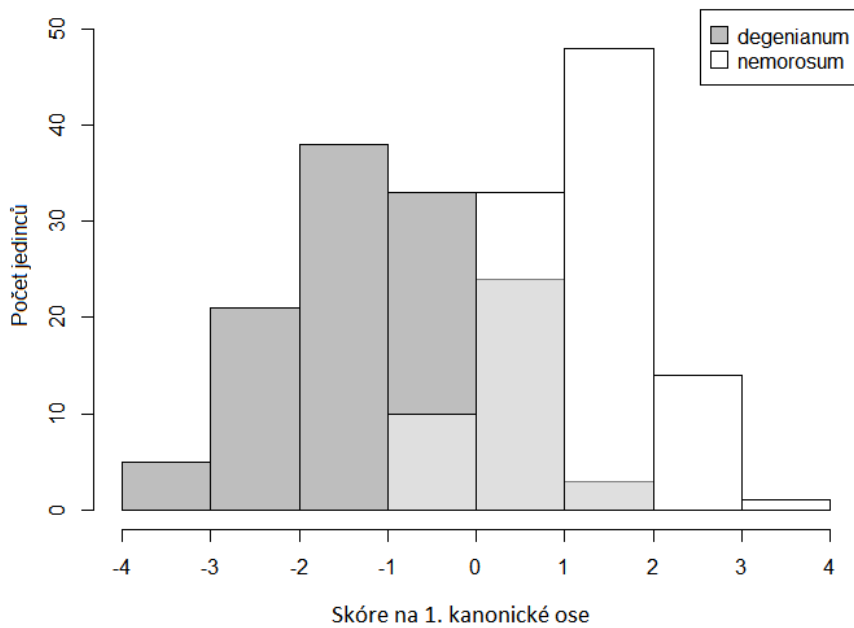


Obr. 24: Box & Whiskers plot délky horního kališního cípu (DHKC) v závislosti na haplotypu

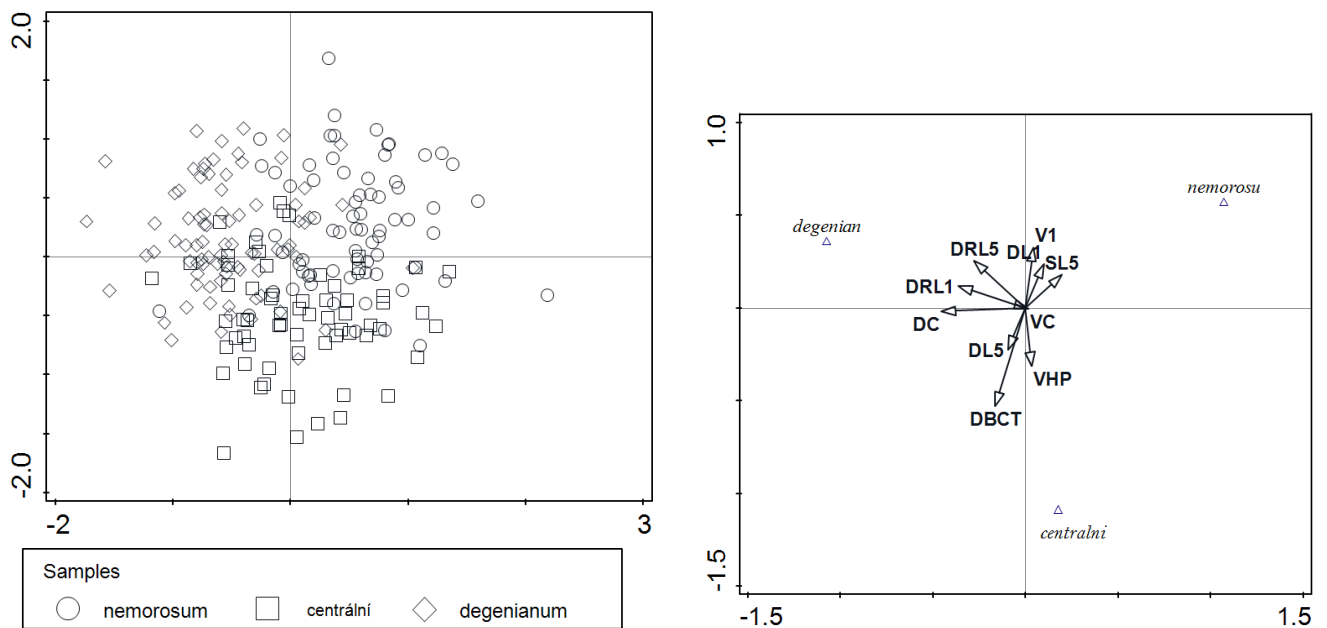


Obr. 25: Box & Whiskers plot šířky 5. listenu (SL5) v závislosti na haplotypu

Jelikož kanonická diskriminační analýza odhalila, že polovina zkoumaných haplotypů tvoří shluk a nelze je od sebe odlišit, bylo potřeba provést separátní analýzy na úrovni jednotlivých geografických skupin (kromě Srbska pouze haplotyp *hoermannianum*). Diskriminační analýza ve skupině Rakousko/Česko od sebe poměrně dobře odlišila dvojici haplotypů *nemosum* a *degenianum* (Obr. 26). Tyto dva haplotypy jsou odděleny především znaky na dolním pysku koruny, hlavně jeho výškou (VDP) a spodních a horních kališních cípech (SDKC, DDKC, SHKC a DHKC). Skupina Slovensko/Maďarsko zahrnuje 4 typy haplotypů, nicméně pro účely diskriminační analýzy byly rostliny s haplotypem ze skupiny *degenianum* z východního Slovenska začleněny do haplotypu *degenianum*. Na výsledcích diskriminační analýzy skupiny Slovensko/Maďarsko (Obr. 27) je vidět poměrně dobré rozdělení 3 haplotypů, přičemž haplotyp *centrální* je vymezen znaky na koruně DHP a DBCT, zatímco *nemosum* znaky na listenech DL1, V1 a SL5 a *degenianum* DRL1 a DRL5.



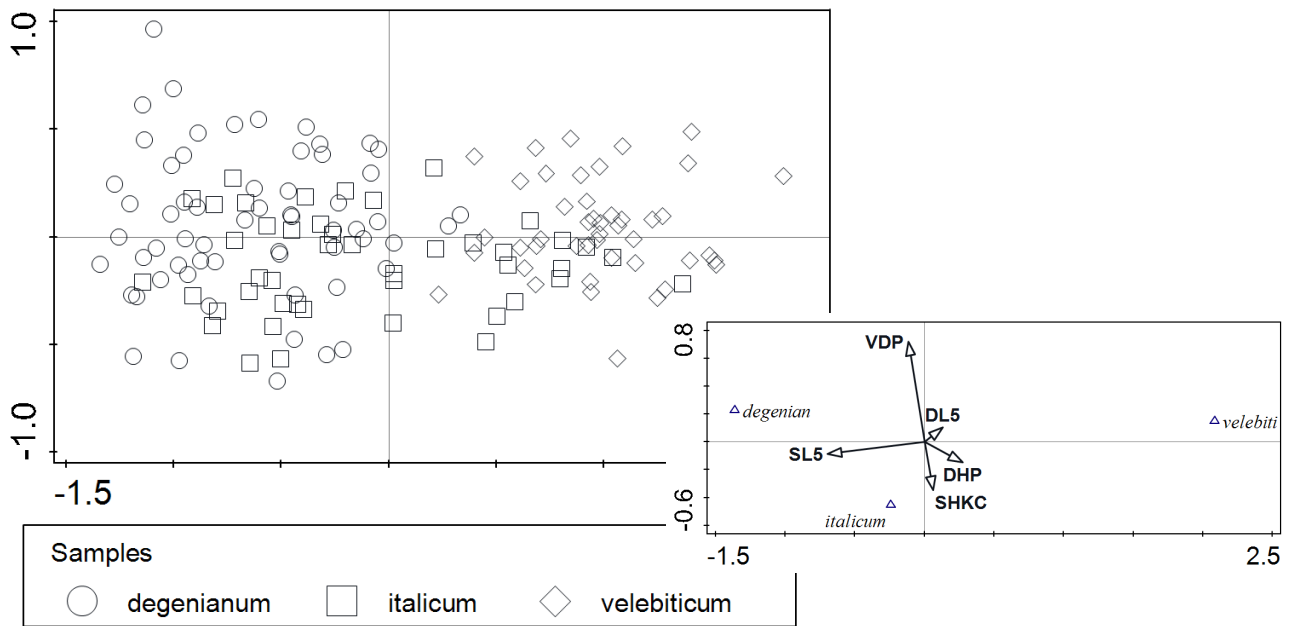
Obr. 26: Kanonická diskriminační analýza jednotlivých haplotypů ve skupině Rakousko/ Česko



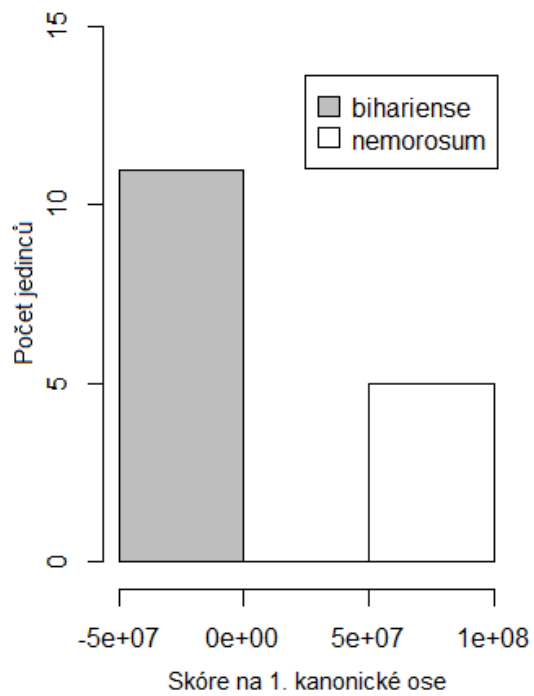
Obr. 27: Kanonická diskriminační analýza jednotlivých haplotypů ve skupině Slovensko/ Maďarsko

U skupin Slovinsko došlo k jasnému rozdělení haplotypů *degenianum* a *velebiticum*. Rostliny haplotypu *italicum* nevykazují žádnou diferenciaci a míchají se s oběma předešlými

haplotypy (Obr. 28). Poměrně jasné rozdělení haplotypů lze také vidět na obrázku 29, kde jsou zobrazeny haplotypy skupiny Karpaty.



Obr. 28: Kanonická diskriminační analýza jednotlivých haplotypů ve skupině Slovinsko



Obr. 29: Kanonická diskriminační analýza jednotlivých haplotypů ve skupině Karpaty

4. Diskuze

Zjištěná genetická diferenciace jasně ukazuje na komplikovanou evoluční historii celé skupiny *M. nemorosum*. Evoluční historie této skupiny je značně ovlivněna poslední dobou ledovou a přítomností ledovce v některých částech Evropy. Při pohledu na dnešní rozšíření jednotlivých haplotypových skupin je vidět vazba na určité regiony, které jsou považovány za glaciální refugia, které poskytovaly v dobách nepříznivých podmínek rostlinám i živočichům příhodnější podmínky k přežití. Co se týče našich výsledků, tak jsou tyto regiony charakteristické výskytem specifických haplotypů i alel jaderného úseku *Agt1*. Jedná se o oblast jižních Alp a SV okraje Alp, kde je existence refugií dobře doložena (TRIBSCH et SCHÖNSWETTER 2003, TRIBSCH 2004). Za podobně významné oblasti lze považovat i Slovenský kras, Muráňskou planinu (JANKOVSKÁ et POKORNÝ 2008) dále rumunské Karpaty zejména oblast Bihoru (KRAMP et al 2008, Těšitel 2010) a také Balkánský poloostrov (TZEDAKIS 2004). V důsledku dlouhodobé izolace a také díky pravděpodobně vysoké speciální rychlosti u těchto jednoletých rostlin dochází k rychlé genetické diferenciaci populací (AVISE 2000). Právě vysokou speciální rychlostí můžeme vysvětlit značný počet haplotypových skupin v rámci *M. nemorosum* agg.

Dalším výsledkem genetické diferenciace je zřejmě vnitrodruhová variabilita ve velikosti genomu. Touto problematikou se zabývala řada autorů při studiu mnoha evropských druhů rostlin. Přestože velikost genomu je obvykle považována za stabilní (GREILHUBER 1998), variabilita uvnitř druhu v rámci jedné ploidie byla často prokázána jako následek odlišné evoluční historie různých vnitrodruhových linií. Vnitrodruhová variabilita ve velikosti genomu byla prokázána například u *Festuca pallens* (ŠMARDA et BUREŠ 2006) dále u *Knautia arvensis* agg. (KOLÁŘ et al. 2009) a také u *Galium pusillum* (KOLÁŘ et al. 2013). V této studii Kolář přímo dává do souvislosti velikost genomu populací *G. pusillum* s přítomností či nepřítomností glaciálního zalednění. Jasnou diferenciací ve velikosti genomu také vykazuje námi studovaná skupina *M. nemorosum*, kde dochází k diferenciaci velikosti genomu jak na úrovni geografických regionů, tak i v rámci jednotlivých haplotypů uvnitř molekulárně vymezených skupin.

Ústup ledovce na konci doby ledové a následné zlepšení podmínek umožnilo původně izolovaným populacím rostlin a živočichů šíření do dříve nehostinných oblastí. To ovšem

znamená, že v mnoha případech docházelo ke kontaktu různých populací téhož druhu a zřejmě také k hybridizaci. Díky hybridizaci došlo ke vzniku mnoha druhů jako například *Saxifraga osloensis* (BROCHMANN et al. 1996) a mnoha druhů rodu *Salix* (BRANDOVÁ 2010). Výskyt hybridních zón a celkovou hybridizaci mezi jednotlivými liniemi *M. nemorosum* poměrně dobře potvrzují naše výsledky. V rámci některých populací vyskytujících se na kontaktu rozlišovaných linií jsou obsaženy různé kombinace haplotypů a také alel jaderného úseku *Agt1*. Právě tyto kombinace jsou zřetelným důkazem toho, že v rámci jednotlivých linií skupiny *M. nemorosum* dochází k hybridizaci. Poměrně nedávno byla molekulárními daty spolehlivě prokázána hybridizace u druhu *M. subalpinum* (CHLUMSKÝ 2016) v oblasti Wienerwaldu. Získané data však naznačují přítomnost dalších kontaktních oblastí a rozsáhlejší význam hybridizace v celém komplexu. Je ovšem nutno zmínit, že se jen velice těžko dá rozlišit, zdali se skutečně ve všech případech jedná o hybridizaci a nejedná se pouze o ancestrální polymorfismus způsobený incomplete lineage sorting (GURUSHIDZE 2010).

Genetická diferenciace jednotlivých skupin *M. nemorosum* a následná hybridizace, ke které dochází v některých kontaktních zónách, je zřejmě hlavní příčinou taxonomických potíží. Tyto komplikace rod *Melampyrum* doprovázejí již od počátku jeho studia. Základ taxonomického konceptu skupiny *M. nemorosum* položil již SÓO (1926–1927). Tuto skupinu rozdělil na 15 samostatných druhů. Toto vymezení do značné míry akceptováno i dnes. Na základě morfologických podobností byly vymezeny další podskupiny (SÓO et WEBB 1972, HARTL 1974).

Výsledky této studie představují značný posun ve znalostech genetické variability zkoumané skupiny. Ukazuje se, že i přes složitost celé skupiny jsou zjevné některé trendy. Jednotlivé skupiny vykazují diferenciaci ve velikosti genomu a v některých případech i v morfologii. Například populace s haplotypem *hoermannianum* mají prokazatelně nejvyšší genom a také se mají dlouhé kališní cípy. Zdá se tak, že je tato skupina poměrně dobře vymezená, přestože z oblasti je udáváno několik taxonů. Některými z nich se zabývala ve své bakalářské práci i Baďurová (2009). Nejistila však žádné podstatné rozdíly mezi populacemi řazenými podle literatury k různým druhům z okruhu *M. hoermannianum*.

Určité rozdíly je možné nalézt i mezi skupinami s haplotypy označovanými jako *degenianum* a *nemorosum*. Ovšem v tomto případě není morfologické rozlišení ostré. Obsahují značné množství populací, které zastírají rozdíly v morfologických znacích. Lepšího rozlišení mezi haplotypovými skupinami lze dosáhnout, pokud se podíváme na velikost genomu v rámci jednotlivých regionů. Haplotypy *velebiticum* a *italicum* se do jisté míry rozrůžňují na

výškovém gradientu, přičemž haplotyp *velebiticum* je rozšířen v populacích z vyšších poloh, zatímco haplotyp *italicum* se drží podhorských oblastí. Tomu odpovídá i celková morfologie. *Melampyrum italicum* je ve srovnání s *M. velebiticum* popisováno jako mohutnější rostlina (Soó 1923–1924)

Pro účely této diplomové práce měly být zkoumány také tyto jaderné úseky AroB a Eif3E, které byly mimo jiné testovány již dříve na rodě *Melampyrum* (Li et al 2008). Bohužel u těchto jaderných genů nedošlo k úspěšné amplifikaci. Úspěchu jsme nedocílili ani při opakování s jinými poměry při míchání PCR směsi či nastavení průběhu PCR. Neúspěšnou amplifikaci si můžeme vysvětlovat několika možnými příčinami, a to nevhodně zvolenou metodou izolace (NaOH) nebo také změnu metodiky PCR. V mých analýzách bylo použito běžné PCR naproti nested PCR použité při vzorové studii Li et al. (2008).

Do jisté míry se podařila amplifikace úseku At103, ovšem při analýze se ukázalo, že je tento úsek pro naše účely příliš variabilní. Zde bude nutné odhalit, zdali je takto vysoká variabilita přítomna i v populacích mimo kontaktní zóny a zdali není míra vnitropopulační variability podstatně menší.

M. nemorosum agg. představuje díky své pomalé migraci (např. těžká semena a způsob jejich šíření) velmi vhodnou skupinu umožňující rekonstrukci evoluční historie. Možnosti této rekonstrukce jsou ovšem značně ztíženy přítomnou hybridizací jednotlivých skupin. Proto je třeba do budoucna uvažovat o některých pokročilých metodách studia genomu jako například o celogenomovém sekvenování.

5. Závěr

Výsledky této diplomové práce značně prohlubují poznatky o složité skupině *M. nemorosum* a ukazují na příčiny obtížného taxonomického hodnocení skupiny. Při studiu této skupiny byl detailněji zmapován výskyt jednotlivých genetických skupin na území širší střední Evropy.

Výsledky molekulárních analýz (cpDNA i nDNA) ukazují poměrně zřetelnou separaci jednotlivých genetických linií. Tato separace je podpořena ve větší míře i velikostí genomu, kde se většina rozlišovaných haplotypů velikostí genomu liší. Výsledky zřejmě dobře odrážejí evoluční historii celé skupiny. Výskyt populací se specifickými haplotypy a alelami je ve většině případů soustředěn do oblastí považovaných za významná glaciální refugia. V některých z populací byly také odhaleny různé kombinace alel pocházející z různých haplotypových linií, což nasvědčuje možné hybridizaci. Je ovšem nutné odlišit případy kde by se mohlo jednat o ancestrální polymorfismus.

Morfologické výsledky již nejsou zdaleka tak uspokojující a stále se nedaří nalézt způsob, který by jednotlivé molekulárně vymezené skupiny přesvědčivě oddělil. Určité možnosti rozlišení jsou pouze na úrovni celých populací, nikoliv jednotlivých rostlin. V každém dílčím regionu mají však skupiny s podobnými cpDNA haplotypy poněkud odlišné vlastnosti.

Pro další posun v problematice skupiny *M. nemorosum* bude nutné využít i sofistikovanějších molekulárních metod například celogenomové sekvenování.

6. Použitá literatura

- Adamec V.** (2012): Biologie poloparazitického druhu *Melampyrum nemorosum*. [Biology of hemiparasitic *Melampyrum nemorosum*. Mgr. Thesis in Czech.] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Avise J. C.** (2000): Phylogeography. The History and Formation of Species – Harvard University Press, Cambridge.
- Bad'urová T.** (2009): Literární rešerše a analýza dostupných dat *Melampyrum nemorosum* agg. na území Balkánského poloostrova. - Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Česká republika, 43 p. + přílohy 3 p.
- Beauverd G.** (1916): Monographie du genre *Melampyrum* L. – Memoires de la Société de physique et d'histoire naturelle de Genève 38: 261-657.
- Bennett J. R. et Mathews S.** (2006): Phylogeny of the parasitic plant family *Orobanchaceae* inferred from phytochrome A. – American Journal of Botany 93: 1039-1051.
- Braak C. J. F. et Šmilauer P.** (2012). Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. – Microcomputer Power, Ithaca, USA, 496 pp.
- Brandová B.** (2010): Hybridizace horských druhů vrb na příkladu vrby hrotolisté ve Velké kotlině. Diplomová práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 54 pp., v češtině.
- Britton N. L. et Brown A.** (1913): An illustrated flora of the northern United States. – Canada and the British Possessions. 3. vols. Charles Scribner's Sons, New York. Vol. 3: 224.
- Brochmann C., Nilsson T. et Gabrielsen T. M.** (1996): A classic example of postglacial allopolyploid speciation re-examined using RAPD markers and nucleotide sequences: *Saxifraga osloensis* (*Saxifragaceae*). – Symbolae Botanicae Upsalienses 31(3): 75–89.
- Bugaco.com** (2000—2013): Online sequence conversion, dostupné z: <http://www.bugaco.com/converter/biology/sequences>, 16. 4. 2016.
- Cantlon J. E., Curtis E. J. C. et Malcolm W. M.** (1963): Studies of *Melampyrum lineare*. – Ecology 44: 466-474.
- Clement M, Posada D. et Crandall K.** (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. – Molecular Ecology 9(10): 1657–1660.

- Daneck H., Abraham V., Fér T. et Marhold K.** (2011): Phylogeography of *Lonicera nigra* in Central Europe inferred from molecular and pollen evidence. – *Preslia* 83: 237–257.
- Döppes D. et Pacher M.** (2014): 10,000 years of *Ursus arctos* in the Alps e A success story? Analyses of the Late Glacial and Early Holocene brown bear remains from Alpine caves in Austria. – *Quaternary International* 339-340 (2014): 266–274.
- Doležel J., Greilhuber J. et Suda, J.** (2007a): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nature Protocols* 2, 2233–2244.
- Drahník P.** (2013): Studium populací *Melampyrum nemorosum* v oblasti kontaktní zóny dvou linií s odlišnou geografickou distribucí. – Bc. thesis, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- Fér T., Vašák P., Vojta J. et Marhold K.** (2007): Out of the Alps or Carpathians? Origin of Central European populations of *Rosa pendolina*. – *Preslia* 79: 367-376.
- Greilhuber J.** (1998): Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. – *Annals of Botany* 82 (Suplment A): 27–35.
- Gurushidze M., Fritsch R. et Blattner F. R.** (2010): Species-level phylogeny of *Allium* subgenus *Melanocrommyum*: Incomplete lineage sorting, hybridization and trnF gene duplication. – *Taxon* 59: 829–840(12).
- Hall T.** (2000): <http://en.bio-soft.net/dna/BioLign.html>.
- Hartl D.** (1974): *Melampyrum* L. – In: Hartl D. & Wagenitz G. (eds.), *Gustav Hegi Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Ed. 2, 6/1: 403–451, Carl Hanser, München.
- Havrdová A., Douda J., Krak K., Vít P., Hadincová V., Zákřavský P. et Mandák B.** (2015): Higher genetic diversity in recolonized areas than in refugia of *Alnus glutinosa* triggered by continent-wide lineage admixture. – *Molecular Ecology* 24: 4759–4777.
- Heide-Jørgensen H. S.** (2008): *Parasiti flowering plants*. Koninklijke Brill NV, Leiden.
- Hellström K., Rautio P., Hutha A. K. et Tuomi J.** (2004): Tolerance of an annual hemiparasite, *Euphrasia stricta* agg., to simulated grazing in relation to the host environment. – *Flora* 199: 247–255.
- Hewitt G. M.** (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. – *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- Hewitt G. M.** (1999): Post-glacial re-colonization of European biota. – *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.

- Chlumský J.** (2007): Srovnání *Melampyrum bohemicum* s příbuznými taxony a revize aktuálního rozšíření. – Magisterská diplomová práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- Chlumský J., Koutecký P., Plačková I. et Štech M.** (2016): Is genetic diversity congruent with morphological diversity across the distribution range of the *Melampyrum subalpinum* group (*Orobanchaceae*)? – *Flora* 220: 74–83.
- Jankovská V. et Pokorný P.** (2008): Forest vegetation of the last full-glacial period in the Western Carpathians (Slovakia and Czech Republic) Lesní vegetace v období posledního vrcholného glaciálu v Západních Karpatech. – *Preslia* 80: 307–324.
- Jonstrup A., Hedrén M. et Andersson S.** (2016): Host environment and local genetic adaptation determine phenotype in parasitic *Rhinanthus angustifolius*. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 180: 89–103.
- Karlsson T.** (1974): Recurrent ecotypic variation in *Rhinantheae* and *Gentianaceae* in relation to hemiparasitism and mycotrophy. – *Botanical Notes* 127: 527–539.
- Katoh et Standley** (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. (outlines version 7). – *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., et Drummond, A.** (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. – *Bioinformatics* 28(12): 1647–1649.
- Keller S. R., Fields P., Berardi A. et Taylor D.** (2014): Recent admixture generates heterozygosity-fitness correlations during the range expansion of an invading species. – *Journal of Evolution Biology* 27: 616–627.
- Kolář F., Štech M., Trávníček P., Rauchová J., Urfus T., Vít P., Kubešová M. et Suda J.** (2009): Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (*Dipsacaceae*) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. – *Annals of Botany* 103: 963–974.
- Kolář F., Lučanová M., Vít P., Urfus T., Chrtek J., Fér T., Ehrendorfer F. et Suda J.** (2013): Diversity and endemism in deglaciated areas: ploidy, relative genome size and niche differentiation in the *Galium pusillum* complex (*Rubiaceae*) in Northern and Central Europe. – *Annals of Botany* 111(6): 1–14.

- Koutecký P., Tuleu G., Baďurová T., Košnar J., Štech M., et 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; doi 10.1007/s00606-014-1153-2.
- Kramp K., Huck S., Niketić M., Tomović G. et Schmitt T.** (2009): Multiple glacial refugia and complex postglacial ranges shift of the obligatory woodland plant *Polygonatum verticillatum* (*Convallariaceae*). – *Plant Biology* 11: 392–404.
- Lait L. A. et Burg T. M.** (2013): When east meets west: population structure of a high-latitude resident species, the boreal chickadee (*Poecile hudsonicus*). – *Heredity* 111: 321–329.
- Leigh J. W. et Bryant D.** (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. – *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1110–1116.
- Lennartsson T.** (1997): Seasonal differentiation – a conservative reproductive barrier in two grassland *Gentianella* (*Gentianaceae*) species. *Plant Systematics and Evolution* 208: 45–69.
- Li M., Wunder J., Bissoli G., Scarponi E., Gazzani S., Barbaro E., Saedler H. et Varotto C.** (2008): Development of COS genes as universally amplifiable markers for phylogenetic reconstruction of closely related plant species. – *Cladistic* 24: 1–19.
- Magri D., Vendramin G. G., Comps B., Dupanloup I., Geburek T., Gömöry D. S., Litt T., Paule L., Roure J. M. et Tantau I.** (2006): A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. – *New Phytologist* 171(1): 199–221.
- Marhold K. et Suda J.** (2001): Analýza multivariačních dat v taxonomii (Fenetické metody), verze 0.2. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra Botaniky, Praha.
- Marhold K. et Suda J.** (2002): Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). – Karolinum, Praha.
- Müller K.** (2005): SeqState - primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. – *Applied Bioinformatics* 4: 65–69.
- Olmstead R. G. et Reeves P. A.** (2001): Disintegration of Scrophulariaceae. – *American Journal of Botany* 88: 348–361.
- R Core Team** (2013): R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

- Rohlf F. J.** (2010): TpsDig, vs 2.16, Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Ronikier M., Costa A., Aguilar J. F., Feliner G. N., Küpfer P. et Mirek Z.** (2008): Phylogeography of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (*Ranunculaceae*): chloroplast DNA reveals two evolutionary lineages across central Europe and Scandinavia. – *Journal of Biogeography* 35: 1650–1664.
- Ronniger K.** (1911): Die Schweizerischen Arten und Formen der Gattung *Melampyrum* L. – *Naturforschenden Gesellschaft in Zürich* 55 (1910): 300–330.
- Ronniger K.** (1918): *Melampyrum* L. – In FRITSCH K.: Neue Beiträge zur Flora der Balkanhalbinsel, insbesondere Serbiens, Bosniens und der Herzegowina. – *Mitteilungen des Naturwissenschaftlichen Vereines für Steiermark* 54: 286–295.
- Schmitt T. et Varga Z.** (2012): Extra-Mediterranean refugia: The rule and not the exception? – *Frontiers in Zoology* 9: 1–12.
- Schlichting C. D.** (2002): Phenotypic plasticity in plants. *Plant Species Biology* 17: 85–88.
- Simmons M. P. et Ochoterena H.** (2000): Gaps as characters in Sequence Based phylogenetic analyses. – *Systematic Biology* 49 (2): 369–381
- Soó R. von** (1926-1927): Systematische Monographie der Gattung *Melampyrum* I., II., III. – *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis* 23: 159–176 a 385–397, 24: 127–193.
- Soó R. von** (1929): Die mittel und südosteuropäischen Arten und Formen der Gattung *Rhinanthus* und ihre Verbreitung in Südosteuropa. – *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis* 26: 179–219.
- Soó R. von et Webb D. A.** (1972): *Melampyrum* L. – In Tutin T. G. et al. (eds.), *Flora Europae* 3, p. 253–257, Cambridge University Press, Cambridge
- Smejkal M.** (1963): Taxonomické studie československých druhů rodu *Euphrasia* L. *Biologické listy při Slovenské Akademii věd* 9(9): 1–83.
- Slovák M., Kučera J., Turis P., et Zozomová-Lihová J.** (2012): Multiple glacial refugia and postglacial colonization routes inferred for a woodland geophyte, *Cyclamen purpurascens*: patterns concordant with the Pleistocene history of broadleaved and coniferous tree species. – *Biological Journal of the Linnean Society* 105: 741–760.
- StatSoft, I.** (2015). STATISTICA 12 (data analysis software system).

- Stewart, J. R. et Lister, A. M.** (2001): Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. – *Trends in Ecology and Evolution* 16(11): 608–613.
- Stewart J. R., Lister A. M., Barnes I. et Dalén L.** (2010): Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. – *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 277(1682): 661–71.
- Svensson B. M., Seel W. E., Nilsson C. H. et Carlsson B. A.** (2001): Roles played by timing of seedling development and host identity in determining fitness of an annual, subarctic, hemiparasitic plant. – *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 33: 299–305.
- Šípošová H.** (1997): *Melampyrum* L. - Čermel' - In: Goliášová K. [ed.]: *Flóra Slovenska* V/2: 301–328: Veda, Bratislava.
- Šmarda P. et Bureš P.** (2006): Intraspecific DNA content variability in *Festuca pallens* on different geographical scales and ploidy levels. – *Annals of Botany* 98: 665–678.
- Štech M.** (1998): Variabilita vybraných znaků druhů sekce *Laxiflora* (Wettstein) Soó 1927 a revize rodu *Melampyrum* L. v České republice. – *Disertační práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.*
- Štech M.** (2000): Seasonal variation in *Melampyrum nemorosum*. – *Preslia, Praha* 72: 345–368.
- Těšitel J.** (2005): Variabilita *Melampyrum sylvaticum* agg. v části Střední Evropy [Variability of *Melampyrum sylvaticum* agg. in a part of Central Europe]. – BSc thesis, Biologická Fakulta Jihočeské. Univerzity, České Budějovice. [49 pp.]
- Těšitel J.** (2010): Phylogeny, life history evolution and biogeography of the Rhinanthoid *Orobanchaceae*. – *Folia Geobotanica* 45: 347–367.
- TreeStar, I.** (2015). FlowJo 10.0.8.
- Tribsch A. et Schönswetter P.** (2003): Patterns of endemism and comparative phylogeography confirm palaeoenvironmental evidence for Pleistocene refugia in the Eastern Alps. – *Taxon* 52: 477–497.
- Tribsch A.** (2004): Areas of endemism of vascular plants in the Eastern Alps in relation to Pleistocene glaciation. – *Journal of Biogeography* 31: 747–760.
- Tzedakis P. C., Emerson B. C. et Hewitt G. M.** (2013): Cryptic or mystic? Glacial tree refugia in northern Europe. – *Trends in Ecology and Evolution* 28: 696–704.

- Vrancken J., Brochmann CH. et Wesselingh R. A.** (2012): A European phylogeography of *Rhinanthus minor* compared to *Rhinanthus agustifolius*: unexpected splits and signs of hybridization. – *Ecology and Evolution* 2(7): 1531–1548.
- Villesen P.** (2007): *FaBox: an online toolbox for fasta sequences*. – *Molecular Ecology Notes* 7 (6), 965–968. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x
- Wang H, Qi M. et Cutler AJ** (1993): A simple method of preparing plant samples for PCR. – *Nucleic Acids Research* 21: 4153–4154.
- Weismann A.** (1875): Über den Saison-Dimorphismus der Schmetterlinge. Studien zur Descendent – Theorie 1. – Leipzig. [non vidi]
- Wesselingh R. A. et van Groenendael J. M.** (2005): The biology of non-weedy hemiparasitic *Orobanchaceae*: synthesis and perspectives. – *Folia Geobotanica* 40: 311–318.
- Wettstein R. von** (1895a): Der Saison-Dimorphismus als Ausgangspunkt fuer die Bildung neuer Arten im Pflanzenreiche. – *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 13: 303–313.
- Wettstein R. von** (1896a): Monographie der Gattung *Euphrasia*. – Leipzig.
- Wolfe A., Randle C. P., Liu L. et Steiner K. E.** (2005): Phylogeny and biogeography of *Orobanchaceae*. – *Folia Geobotanica* 40: 115–134.
- Wu Z. Y. et P. H. Raven, eds.** (1998): *Flora of China. Vol. 18 (Scrophulariaceae through Gesneriaceae)*. – Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. 450 pp.
- Zeller P. C.** (1849): Ueber die Artrechte des *Polyommatus Amyntas* und *Polysperchon*. – *Stettiner Entomological Zeitung* 177 [non vidi].
- Zopfi H. J.** (1991): Aestival and autumnal vicariadsin *Gentianella* – a myth?. – *Plant Systematics and Evolution* 174: 139–158.
- Zopfi H. J.** (1993b): Ecotypic variation in *Rhinanthus alectorolophus* (Scopoli) Pollich (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management, II. The genotypic basis of seasonal ecotypes. – *Flora* 188: 153–173.
- Zopfi H. J.** (1995): Life history, variation and intraspecific heterochromy in *Rhinanthus glacialis* (*Scrophulariaceae*). – *Plant Systematics and Evolution* 198: 209–233.
- Zopfi H. J.** (1998b): Life-history variation among population of *Euphrasia rostkoviana* Hayne (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management. – *Biological Journal of the Linnean Society* 64: 179–205.

Přílohy:

Příloha 1: Detailní přehled lokalit s použitými analýzami pro jednotlivé populace

Příloha 2: Korelační matice zkoumaných morfologických znaků

Příloha 3: Fotografické snímky vybraných druhů *M. nemorosum* agg

Příloha 4: Přehled starších lokalit použitých při analýze cpDNA a nDNA

Příloha 1

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
ASCHN	RČ/D	+	/	/	/	/	/	/	Rakousko, Aschberg: okraj lesa podél silnice ca 890 m JZ od obce, 370 m. n. m., 48,172258 N, 15,811982 E; 16. 9. 2009, Štech M.
BAKOD	SM/D	/	/	+	+	+	/	/	Maďarsko, Bakonya: Pécs, kvadrát 9974a, okraj lesa u veřejné silnice ca 2 km SZ od obce, 330 m. n. m., 46,09805556 N, 18,06638889 E; 2. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
BESTN	RČ/N	+	/	+	/	/	+	+	Česko, Běstvina: hráz Hlubošského rybníka JV části obce Hluboš, 325 m. n. m., 49,8332578 N, 15,5849519 E; 2. 7. 2015, Štech M.
BEZGV	SL/V	+	+	+	+	+	/	/	Slovinsko, Bezgarska planina, Bezgovica: okolo silnice v horském sedle ca 1,3 km VSV od obce, 970 m. n. m., 45,5533 N, 14,7249 E; 23. 7. 2014, Štech M.
BLANN	RČ/N	+	+	/	/	/	/	/	Česko, Louňovice po Bláníkem: okraj lesa podél silnice ca 1,8 km VJV od obce, 490 m. n. m., 49,631640 N, 14,870060 E; 13. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
BRANN	SM/N	+	/	/	/	/	/	/	Slovensko, Branisko: křoviny podél cesty ca 200 m J od sedla Branisko, 760 m. n. m., 49, 015803, N 20,858078 E; 5. 7. 2008, Štech M.
BUCED	SL/I	+	+	+	+	+	+	/	Slovinsko, Bučerca, Bučerca: křoviny a okraje louky ca 570 m SV od středu obce, 45,97861 N, 15,51574 E; 23. 7. 2014, Štech M.
BUDAN	SM/N	+	/	+	+	+	+	/	Maďarsko, Budapešť, Budaörs: lískové křoviny pod skalou v ulici Edvi Illes ca 3,8 km SV od města, 260 m. n. m., 47, 482300 N, 18, 985750 E; 7. 9. 2011, Drahník P. et Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
BUKGD	SM/N	+	+	+	+	+	+	+	Maďarsko, Bükk, Szarvaskő: okraj lesa na JZ okraji obce 240 m. n. m., 47,988371 N, 20,329287 E; 29. 7. 2014, Koutecký P. et Otisková V.
BUKON	RČ/D	+	+	+	+	+	+	+	Slovensko, Plavecký Peter, vodní nádrž Buková: les kolem vrcholu Ježovka cca 0,9 km Z od nádrže, 380 m. n. m., 48,535440 N, 17,346140 E; 19. 8. 2013, Koutecký P.
BUKVN	SM/D	+	/	/	/	/	/	/	Slovensko, Bukovské vrchy, Jalová: les u křižovatky silnic ca 1,1 km VJV od obce, 961 m. n. m., 49,1035902 N, 22,249448 E; 14. 7. 2009, Koutecký P.
BYSTN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Česko, Byšta, křoviny podél cesty ca 770 m J od obce, 270 m. n. m., 48, 523638 N, 21, 540963 E; 12. 7. 2009, Štech M.
BYSTRN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Česko, Bystrá: les ca 1,2 km S od obce, 640 m. n. m., 49,518666 N, 15, 368820 E; 27. 6. 2011, Drahník P. et Štech M.
CAJKN	SM/N	/	/	+	+	+	+	/	Slovensko, Stiavnické vrchy, Čajkov: doubrava ca 2,5 km SZ od obce, 290 m. n. m., 48, 308861 N, 18, 577833 E; 3. 7. 2012, Koutecký P.
CUPAD	SM/C	+	+	+	+	+	+	/	Maďarsko, Cup: okraj lesa poblíž křižovatky ca 600 m JZ od obce, 190 m. n. m., 47,729313 N, 16,551841 E; 5. 9. 2014, Drahník P. et Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
DEBRN	SM/N	+	/	+	+	+	+	+	Maďarsko, Szenttmna-Pusztá-Debrecen, leg. Baschant, 105 m. n. m., 47, 510540 N, 21, 845850 E; 14. 7. 1937
DOLGV	SL/V	+	+	+	+	+	+	/	Slovensko, Dolga Vas, Zajčje Polje: příkop u silnice ca1 km JZ od obce, 570 m. n. m., 45,58897 N, 14,88405 E; 23. 7. 2014, Štech M., Košnar J., Laburdová J.
DOLPH	SR/H	+	+	+	+	+	+	/	Srbsko, Duga Poljana: křoviny nad silnicí ca 780 m východně obce, 43,24843604 N, 20,2363314 E; 25. 6. 2014, Drahník P. et Štech M.
DOMAN	SM/D	+	/	/	/	/	/	/	Česko, Domašov: okraj lesa 1.2 km JJZ od obce, 490 m n. m., 49.73194 N, 17.44149 E; 10. 8. 2009, Koutecký P.
DRIEN	SM/C	+	+	+	+	+	+	+	Slovensko, Drienčanský Kras, Dražice: les podél silnice ca 1 km Z od obce, 360 m. n. m., 48, 43403 N, 20,05116 E; 20. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
DRINH	SR/H	+	+	+	+	+	/	/	Srbsko, Beserovina: svahy nad řekou Drina ca 750 m JS od hráze údolní nádrže Perucacko Jezero, 415m n. m., 43,95730097 N, 19,41282797 E; 29. 6. 2014, Drahník P. et Štech M.
DROZDN	RČ/N	+	/	+	+	+	/	/	Slovensko, Prohronský Inovec, Drozdovo: křoviny na louce u meze se stromy v obci Drozdovo, 640 m. n. m., 48, 431639 N, 18, 555583 E; 6. 7. 2012, Koutecký P.
DUBRN	RČ/N	+	/	+	+	+	+	+	Česko, Dubrava, hájovna Zbrod: okraje lesní cesty ca 170 m VSV od hájovny, 180 m n. m., 48,8892383 N, 17,0708214 E; 7. 7. 2014, Koutecký P.
EBRN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Rakousko, Ebersdorf: křovisko podél cesty ca 0,3 km S od obce, 270 m. n. m., 47, 016366 N, 16, 030221 E; 21. 8. 2010, Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
EISEN	SM/C	+	+	/	/	/	/	/	Rakousko, Eisenstadt: okraj lesa podél silnice ca 2,2 km SV od města, 260 m. n. m., 47,863020 N, 16,533850 E; 23. 6. 2008, Štech M.
FRAUD	RČ/D	+	+	+	+	+	+	/	Rakousko, Frauenstein: nad silnicí poblíž křižovatky silnice 140 a odbočky do obce Frauenstein, 440 m. n. m., 47,852998 N, 14,18186098 E; 5. 9. 2014 Drahník P. et Štech M.
GAADN	RČ/D	/	+	/	/	/	/	/	Rakousko, Rosental: křoviny podél silnice ca 1,7 km JJV od obce, 260 m. n. m., 48,017786 N, 16,191156 E; 25. 6. 2008, Chlumský J.
GEMEN	SM/C	+	+	+	+	+	+	+	Slovensko, Gemerská Hôrka: okraj lesa podél silnice ca 1 km VJV od obce, 220 m. n. m., 48,528430 N, 20,389080 E; 20. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
GIESN	RČ/D	+	/	/	/	/	/	/	Rakousko, Giesshübel: osada Tyrolerhof, les 420 m JV od lomu na SV okraji obce, 420 m. n. m., 48,103507 N, 16,234047 E; 21. 8. 2008, Štech M.
GMUND	RČ/N	+	/	+	+	+	+	+	Rakousko, Gmunden, Villa Toscana: pobřeží Traunsee ca 225 m J od budovy Villa Toscana, 425 m. n. m., 47,90721601 N, 13,78905701 E; 29. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
GOMBN	SM/DS	+	+	/	/	/	+	+	Slovensko, Gombasek: okraj lesa ca 200 m VSV od jeskyně Gombasecká jeskyňa, 290 m. n. m., 48,563547 N, 20,469970 E; 20. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
GORBD	SM/D	/	/	+	+	/	/	/	Maďarsko, Sopron, obec Görbehalom (8364b): okraj lesa u silnice, na JZ okraji obce, 335 m. n. m., 47,66722222 N, 16,49527778 E; 1. 8. 2011, Žíla V.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
HADEH	SR/H	+	+	+	+	+	+		Srbsko, Aljinoviči: lesní okraje nad silnicí ca 2,2 km S od obce, 1340 m. n. m., 43,34991398 N, 19,853888103 E; 26. 6. 2014, Drahník P. et Štech M.
HALLN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Švédsko, Kvarnbo: světlý les podél silnice ca 1,3 km V od autobusové zastávky Kvarnbo, 9 m. n. m., 60, 511378 N, 17, 937255 E; 15. 8. 2009, Štech M. et Štechová T.
HAMRN	RČ/N	+	+	/	/	/	/	/	Česko, Bystré Hamry: les podél silnice ca 1,75 km SV od křižovatky mezi obcemi Bystré, Bystré – Hamry, Jedlová, 560 m. n. m., 49, 638777 N, 16, 367247 E; 21. 8. 2009, Štech M.
HARDN	RČ/D	+	+	+	+	+	/	/	Česko, Čížov: křoviny podél cesty do města Hardegg, ca 2,5 km J od obce, 360 m. n. m., 48, 856217 N, 15, 867244 E; 12. 6. 2014, Drahník P. et Štech M.
HARDNR	RČ/D	+	+	+	+	+	/	/	Rakousko, Hardegg: vyhlídka na hrad ca 220 m ZJZ od hradu, 310 m n. m., 48.852543 N, 15.854905 E; 12. 6. 2014, Drahník P. et Štech M.
HELED	RČ/D	/	/	+	+	+	/	/	Rakousko, Mattersburg, obec Ritzing Helenschacht (8364d): okraj lesa nad silnicí do obce Ritzing, 335 m. n. m., 47,63305556 N, 16,47722222 E; 1. 8. 2011, Žíla V.
HLUBN	RČ/N	+	+	/	/	/	/	/	Česko, Hluboká nad Vltavou: SV břeh Mounického rybníka ca 0,68 km od kostela, 380 m. n. m., 49, 053896 N, 14,427402 E; 13. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
HOFSTN	RČ/D	+	+	/	/	/	/	/	Rakousko, Bad Vöslau, Großau: les podél silnice ca 4,3 km ZSZ od obce Großau, 380 m. n. m., 47,979991 N, 16,122234 E; 29. 7. 2009, Štech M.
HOSIN	RČ/N	/	/	+	+	+	+	+	Česko, Hostim: les podél silnice ca 1 km J od vsi, 280 m. n. m., 49,951797 N, 14,131361 E; 16. 8. 2014, Štech M. et Štechová T.
HOSTN	RČ/N	+	+	+	+	+	+	+	Česko, Hostýn, Brusné: okraj lesa u silnice ca 2,5 km ZJZ od vrcholu Sv. Hostýn, 360 m. n. m., 49,369757 N, 17,667447 E; 13. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
HRADD	RČ/D	/	/	+	+	+	/	/	Slovensko, Ochtinná, Hrádok: les ca 280 m JZ Ochtínské aragonitové jeskyně 48,66272222 N, 20,30611111 E; 15. 6. 2013, Kolář F.
IZVOB	K/K	/	+	+	+	+	+	/	Rumunsko, Izvoru Muresului: horské louky ca 950 m ZJZ od Pasul Izvoru Muresului, 880 m. n. m., 46,62153 N, 25,70949 E; 11. 6. 2012, Drahník P. et Štech M.
JB1	RČ/N	/	/	+	+	+	/	/	Litva, Vyžuonos: les ca 2,2 km VSV od obce, 109 m. n. m., 55,589333 N, 25,527916 E; 2013, Bradáčová J.
JB10	RČ/N	/	/	+	+	+	+	/	Litva, Šveicaria: les v obci, 100 m. n. m., 55,044583 N, 24,264916 E; 2013, Bradáčová J.
JB4	RČ/N	/	/	+	+	+	+	/	Litva, Mikieirai: les na břehu řeky Šventaja ca 0,5 km J od obce, 84 m. n. m., 55,658972 N, 25,179222 E, 2013, Bradáčová J.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
JB7	RČ/N	/	/	+	+	+	/	/	Litva, Kamajai: les ca 1,8 km JV od obce: 128 m. n. m., 55,806500 N, 25,522277 E; 2013, Bradáčová J.
JEZEH	SR/H	+	+	+	+	+	/	/	Srbsko, Zaovine: sutě v údolí potoka ca 870 m VSV od obce, 43,86354603 N, 19,40008203 E; 850 m n. m., 28. 6. 2014, Štech M.
KAPRN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Česko, Kaproun: okraj lesa ca 0,69 km ZJZ od obce, 700 m. n. m., 49,075520 N, 15,172370 E; 10. 10. 2009, Štech M.
KLASH	SR/H	+	+	+	+	+	/	/	Srbsko, Šavci, klášter Sopočani: křoviny na sutích na úpatí svahu ca 3,7 km VSV od kláštera Sopočani, 43,13130498 N, 20,41460797 E; 25. 6. 2014 Drahník P. et Štech M.
KNOBN	RČ/N	+	/	+	+	+	+	/	Česko, Knobložka: křoviny podél stepní louky ca 0,5 km JZ od obce, 290 m. n. m., 50,540210 N, 14,086354 E; 6. 9. 2012, Štech M.
KOCR V	SL/I	+	+	+	+	+	/	/	Slovinsko, Kočerska Reka: okraj silnice ca 1 km J od obce, 560 m. n. m., 45,56575 N, 14,80028 E; 23. 7. 2014, Štech M., Košnar J., Laburdová J.
KOSPN	SM/N	+	+	+	+	+	+	+	Maďarsko, Esztergom, obec Kóspallag (8179b): okraj lesa, ca 1,5 km JJZ od obce, 325 m. n. m., 47,89138889 N, 18, 92722222 E; 6. 9. 2014, Drahník P. et Štech M.
KRAKN	RČ/N	+	/	+	+	+	/	/	Polsko, Krakow, Tynec: les ca 1,4 km VJV od centra obce, 260 m. n. m., 50,012434 N, 19,82838697 E; 28. 9. 2013, Štech M. et Koutecký P.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
KRASN	RČ/N	/	/	+	/	+	/	/	Polsko, Krasne Stare: okraj lesa u silnice ca 53,31937702 N, 23,12868297 E; 20. 6. 2013, Hadincová V.
LAVAD	SL/D	+	+	+	+	+	/	/	Rakousko, Lavamund, okřoviny na úpatí svahu na SV okraji obce, 360 m. n. m., 46,6405 N, 14,95125 E; 17. 7. 2014, Štech M.
LEDNN	RČ/D	+	+	+	+	/	+	+	Česko, Lednice: okraj lesa ca 2,8 km SZ od města, 170 m. n. m., 48,819977 N, 16,778015 E; 19. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
LEISN	RČ/D	+	/	/	/	/	/	/	Rakousko, Leiser Berge: křoví podél cesty ca 0,45 km SV od obce, 390 m. n. m., 48,567513 N, 16,385279 E; 18. 8. 2010, Štech M.
LITEN	RČ/N	+	/	+	+	+	+	/	Česko, Litenčické vrchy, Morkovice - Slížany: okraj lesa ca 2,5 km SZ obce, 370 m. n. m., 49,230910 N, 17,192470 E; 10. 6. 2011, Drahník P. et Štech M.
LOREN	SM/D	/	+	+	+	+	+	/	Rakousko, Loretto, Stotzing: okraj lesa ca 1,5 km J od obce, 290 m. n. m., 47,893012 N, 16,548276 E; 20. 8. 2010, Štech M.
MACON	RČ/N	+	/	+	/	/	/	/	Česko, Macocha: okraj lesa poblíž parkoviště ca 0,25 km JV od hospody u propasti Macocha, 480 m. n. m., 49,370953 N, 16, 731178E; 9. 9. 2010, Štech M.
MAIEB404	K/N	+	+	+	+	+	+	/	Rumunsko, Măieruş: les nad silnicí ca 8 km Z od obce, 690 m. n. m., 45,900503 N, 25,436404 E; 16. 6. 2012, Drahník P. et Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
MALEN	RČ/N	/	/	+	+	/	+	/	Švédsko, Mäleren: okraj lesa podél silnice ca 0,24 km S od jezera Mäleren, 30 m. n. m., 59, 448167 N, 17, 022146 E; 10. 7. 2013, Štech M.
MARKN	SL/D	+	/	+	+	+	+	/	Maďarsko, Márkó: okolí skalek v řídkém lese ca 1,2 km J od obce; 290 m. n. m., 47, 110750 N, 17, 816570 E; 7. 9. 2011, Drahník P. et Štech M.
MATRD	SM/N	+	+	+	+	+	+	+	Maďarsko, Mátraháza: okraj silnice ca 2,5 km S od obce, 620 m. n. m., 47,889847 N, 19,97492 E; 29. 7. 2014, Koutecký P., Otisková V.
MAYEN	RČ/D	+	/	/	/	/	/	/	Rakousko, Mayerling: okraj lesa ca 0,78 km SZ od obce, 330 m. n. m., 48,050930 N, 16,090551 E; 27. 8. 2009, Štech M.
MURAN	SM/C	+	+	+	+	+	+	+	Slovensko, Muráň: křoviny podél silnice ca 4,2 km JZ od obce, 460 m. n. m., 48,71622 N, 20,00372 E; 6. 9. 2014, Drahník P. et Štech M.
NITRN	SM/N	+	+	/	/	/	/	/	Slovensko, Olichov: les podél silnice ca 0,66 km V od obce, 270 m. n. m., 48,354250 N, 18,483253 E; 19. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
OBYCN	RČ/N	+	/	+	+	+	/	/	Slovensko, Pohronský Inovec, Obyce: okraj lesa ca 3,8 km JV od obce, 650 m. n. m., 48,402222 N, 18,488889 E; 3. 7. 2012, Koutecký P.
OSLON	RČ/N	+	+	/	/	/	/	/	Česko, Oslov: okraj lesa ca 1,4 km VSV od obce, 400 m. n. m., 49,404402 N, 14,229045 E; 13. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
OSTFN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Švédsko, Granlunda: les u křižovatky silnic 272 a silnice, Östflora ca 2 km JV od obce, 65 m. n. m., 60,002652 N, 17,303033 E; 21. 8. 2009, Štech M.
PAVLN	RČ/D	+	+	/	/	/	/	/	Česko, Pavlov: křoviny na JV úpatí kopce Děvín ca 0,67 km SZ od kostela v obci, 280 m. n. m. 48,878260 N, 16,664580 E; 19. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
PINKN	SM/D	/	+	/	/	/	/	/	Rakousko, Pinkafeld: okraj lesa ca 3 km JV od obce, 390 m. n. m., 47,356086 N, 16,154200 E; 23. 6. 2008, Štech M.
PLASN	SM/N	+	+	+	+	+	+	/	Slovensko, Plášťovce: křoviny na lučním okraji ca 2,4 km S od obce, 170 m. n. m., 48,181070 N, 18,973220 E; 20. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
PLATV	SL/V	/	/	+	+	+	/	/	Chorvatsko, Platak-Goslica: okraj lesa ca, 1120 m. n. m., 45,439463 N, 14,561855 E; Datum, 26. 7. 2014, Pejcha V. et Kadlčková E.,
POLIN	RČ/N	+	/	+	+	+	+	/	Česko, Soutok, Polínka: řídká suchá doubrava v nejvyšší části hrúdu, 48,64534 N, 16,95799 E; 7. 6. 2014, Koutecký P.
PREDD	SM/C	+	/	+	+	/	/	/	Slovensko, Murán, Predná Hora: okraj lesa u silnice SZ osady, 48,76930556 N, 20,10611111 E; 15. 6. 2013, Kolář F.
PRIBN	RČ/N	+	+	/	/	/	/	/	Česko, Příběnice: les kolem zříceniny hradu Příběnice, 420 m. n. m., 49,392450 N, 14,562440 E; 13. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
PRLON	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Česko, Přední louky: Suchovské mlýny, okraj luční enklávy Přední louky ca 1,9 km SV od křižovatky v obci, 480 m. n. m., 48,891781 N, 17,599897 E; 2008, Štech M.
PROCN	RČ/N	+	+	+	+	+	+	/	Česko, Prochody: hráze rybníka Svatba u obce Prochody, 293 m. n. m., 50,035278 N, 16,137500 E; 3. 9. 2013 Koutecký Petr
RADON	RČ/N	+	/	+	+	+	+	/	Česko, Radhostice: malý pahrbek s lesíkem (spíše křovinami) na vápencové vložce SSZ od obce, 712 m. n. m., 49,050780 N, 13,521280 E; Paulič R.
RAPON	RČ/D	+	/	+	+	+	+	/	Maďarsko, Raposka: les na západním svahu Szent György Hill ca 1,7 km V od obce, 280 m. n. m., 46,84551 N, 17,44568 E; 7. 9. 2011, Drahník P. et Štech M.
RECHN	SM/D	/	+	/	/	/	/	/	Rakousko, okraj lesa podél silnice ca 2,3 km SSV od města, 520 m. n. m., 47,322445 N, 16,422480 E; 23. 6. 2008, Štech M. et Kolář F.
ROTKN	RČ/D	+	/	/	/	/	/	/	Rakousko, Rotes Kreuz: okraj lesa ca 2 km JJV od obce Gaaden poblíž křižovatky Rotes Kreuz, 380 m. n. m., 48,033551 N, 16,216251 E; 27. 8. 2009, Štech M.
SCHMID	RČ/D	+	+	+	+	+	+	/	Rakousko, Kronsdorf, Schieding: les na levém břehu řeky Enns ca 600 m SV od obce, 290 m. n. m., 48,153397 N, 14,46488097 E; 4. 9. 2014, Drahník P. et Štech M.
SLANN	SM/DS	+	+	/	/	/	/	/	Slovensko, Slanec: okraj lesa při silnici ca 1 km J od středu obce, 330 m. n. m., 48,626885 N, 21,478041 E; 20. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
SMUKD	SL/D	+	+	+	+	+	/	/	Slovinsko, Smuka: křoviny na jižním okraji obce, 460 m. n. m., 45,75991 N, 14,92805 E; 23. 7. 2014, Štech M., Košnar J. et Laburdová J.
SPANN	SM/C	+	+	+	+	+	+	+	Slovensko, Španie Pole: les podél silnice ca 2,1 km JZ od obce, 350 m. n. m., 48,50994 N, 20,10321 E; 6. 9. 2014, Drahník P. et Štech M.
SOTED	SL/D	+	+	+	+	+	/	/	Slovinsko, Sotěska, Drenje: svahy nad řekou Krka ca 400 m ZJZ od obce, 180 m. n. m., 45, 78207 N, 15, 00259 E; 23. 7. 2014, Štech M., Košnar J. et Laburdová J.
SPEIN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Rakousko, Speisendorf: okraj smrkového lesa ca 0,75 km ZJZ od obce, 500 m. n. m., 48,861713 N, 15,420618 E; 20. 8. 2008, Štech M.
STERN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Rakousko, Sternstein, Schwarzbauer: okraj lesa podél silnice ca 0,1 km S od poustevny, 910 m. n. m., 48,558257 N, 14,292871 E; 18. 8. 2010, Štech M.
STRAN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Česko, Rohozná, okraj lesa ca 1,3 km Z od obce, 610 m. n. m., 49 806786 N, 15,795161 E; 2009, Štechová T.
STUBD	SL/D	+	+	+	+	+	/	/	Rakousko, Stübing: okraj lesa poblíž Österreichisches Freilichtmuseum Museum Stübing, 400 m. n. m., 47,15944497 N, 15,31546502 E; 5. 9. 2014, Drahník P. et Štech M.
SUCHN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Česko, Suchovské Mlýny: les ca 1,75 km VSV od křižovatky v obci, 480 m. n. m., 48,891519 N, 17,598001 E; 2007, Štech M.
SVAJN	SM/D	+	/	/	/	/	/	/	Slovensko, Svätý Júr: světlina v lese na SZ okraji osady Neštich, 250 m. n. m., 48,262802N, 17,199736 E; 9. 9. 2010, Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
TAMBB408	K/N	+	+	+	+	+	+		Rumunsko, Munti Bihor, Tamboresci: jehličnatý les nad levým břehem řeky Arieșul Mare ca 250 m V od obce, 670 m. n. m., 46,449368 N, 22,919965 E; 17. 6. 2012, Drahník P. et Štech M.
TANZN	SL/D	/	+	/	/	/	/	/	Rakousko, Tanzelsdorf: okraj lesa ca 0,8 km Z od obce, 340 m. n. m., 46,842801 N, 15,271305 E; 21. 8. 2010, Štech M.
TARCH	SR/H	+	+	+	+	+	/	/	Srbsko, Donje Karaklije: křoviny u cesty ca 1,3 km SZ od obce, 43,892333 N, 19,32949902 E; 2014, Drahník P. et Štech M.
TARPH	SR/H	+	+	+	+	+	/	/	Srbsko, Donje Karaklije: křoviny u cesty ca 400 m JZ od obce, 43,88312699 N, 19,34413902 E; 2014, Drahník P. et Štech M
TATAD	SM/D	+	+	+	+	+	+	+	Maďarsko, Tatabánya, Vérteskozma: okraj lesa podél silnice ca 680 m JZ od obce, 325 m. n. m., 47,44869 N, 18,4325 E; 5. 9. 2014, Drahník P. et Štech M
TRNOD	SL/D	/	/	+	+	+	/	/	Chorvatsko, Garešnica, obec Trnovitički Popovac (103 67c), okraj lesa u silnice směrem k obci Veliki Prokop, 140 m. n. m., 45,635 N, 16,88583333 E; 3. 8. 2013, Žíla V.
TURJD	SL/I	+	+	+	+	+	/	/	Slovinsko, Turjak: okraj lesa podél silnice, 540 m. n. m., 45,87994 N, 14,6148 E; 23. 7. 2014, Štech M.
UHRIN	RČ/D	+	/	+	+	+	/	/	Česko, Uhřice: les při hlavní silnici ca 1,5 km S od obce, 330 m. n. m., 49,064679 N, 16,944769 E; 9. 9. 2010, Štech M.

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
UVACH	SR/H	+	+	+	+	+	/	/	Srbsko, Uvac, Družinice: svahy na řekou Uvač ca 1 KM z od obce, 43,351499 N, 19,97513699 E; 26. 6. 2014 Drahník P. et Štech M.
UVACHS	SR/H	+	+	+	+	+	/	/	Srbsko, Uvac, lískové křoviny v údolí Uvač, ca 2 km JJV od obce, 43,33246998 N, 19,99776604 E; 26. 6. 2014 Štech M.
VALDN	SM/N	+	/	/	/	/	/	/	Slovensko, Valašská Dubová: louky podél silnice ca 0,4 km Z od centra obce, 660 m. n. m., 49,141958 N, 19,287597 E; 6. 7. 2008, Štech M.
VAZEN	SM/N	+	/	/	/	/	/	/	Slovensko, Važec: okraj louky ca 3,6 km V od obce, 890 m. n. m., 49,051964 N, 20,028578 E; 10. 7. 2006, Štech M.
VIDLN	SM/N	+	/	/	/	/	/	/	Česko, Vidlák, Borek pod Troskami: okraj silnice ca 990 m Z od železniční zastávky, 300 m. n. m., 50, 533835 N, 15, 218285 E; 21. 8. 2010, Štech M.
WARTN	RČ/N	+	+	/	/	/	/	/	Rakousko, Wartberg on der Aist: okraj lesa podél silnice ca 1,5 km JJV od města, 400 m. n. m., 48,334738 N, 14,518088 E; 5. 9. 2014, Drahník P. et Štech M.
ZAVIN	RČ/N	+	+	/	/	/	/	/	Česko, Závišín: světlý les na levém břehu Závišínského potoka 1,7 km SSZ od železniční zastávky Bezdědovice, 460 m. n. m., 49,454649 N, 13,866600 E; 13. 8. 2013, Drahník P. et Štech M.
ZBIDD	SL/D	+	+	+	+	+	+	/	Slovinsko, Zbilje: okraj lesa podél silnice na pravém břehu řeky Sávy, 330 m. n. m., 46,1638N, 14,42557 E; 23. 7. 2014, Štech M.

Vysvětlivky:
 Geografický systém WGS 84
Haplotypová skupina
 RČ - Rakousko/Česko
 SM - Slovensko/Maďarsko
 SL - Slovinsko
 K - Karpaty
 SR - Srbsko
 N – nemorosum
 D – degenianum
 V – velebiticum
 H – hoermannianum
 I – italicum
 C – centrální
 DS – degenianum Slovensko
 K - karpatské

Kód lokality	Region/haplotyp	Cytometrie	Morfometrika	trnT/trnL	psbA/trnH	rpl32/trnL	Agt1	At103	Popis lokality
ZBROD	RČ/D	+	/	+	/	/	+	+	Česko, Dubrava, hájovna Zbrod: okraje lesní cesty ca 170 m VSV od hájovny, 48,8896497 N, 17,0684356 E; 28. 8. 2015, Štech M.
ZBYTN	RČ/N	+	/	/	/	/	/	/	Česko, České Meziříčí: okraj lesa PR Zbytky, 1,75 km SV od kostela v obci, 260 m. n. m., 50,295680 N, 16,064018 E; 15. 8. 2014, Štech M.
ZEGAV	SL/V	+	+	+	+	+	/	/	Slovinsko, Lesicno, okraj lesa JJV od obce, 550 m. n. m., 46,13074 N, 15,45661 E, 23. 7. 2014 Štech M., Košnar J. et Laburdová J.

Příloha 3



Melampyrum nemorosum z lokality Příběnice, Česko



Melampyrum bihariense z lokality Vlădeni, Rumunsko



Melampyrum italicum z lokality Zalbio, Itálie



Melampyrum velebiticum z pohoří Velebit, Chorvatsko



Melampyrum hoermannianum z lokality Tara, Srbsko

Příloha 4:

Číslo izolace	Kód populace	Druh	Stát	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka
1	SAST2	subalpinum	Slovensko	48,622397	17,139454
8	GUTE-st	subalpinum	Rakousko	47,87359	15,879917
11	LUZNN	nemorosum	Česko	49,393385	14,560793
17	BADF-old	subalpinum	Rakousko	47,828165	16,131299
20	SARA	subalpinum	Černá Hora	43,840954	18,493276
24	RICH	subalpinum	Rakousko	48,057828	16,276367
30	SCHN	subalpinum	Rakousko	47,777283	15,84365
38	GRODV-old	velebiticum	Itálie	46,59607	11,567926
39	BUCHI	velebiticum	Itálie	46,248783	11,249736
41	I162T	velebiticum	Itálie	45,994892	11,084839
44	VLADB	nemorosum	Rumunsko	45,761147	25,393503
45	CIUCB	nemorosum	Rumunsko	45,669658	25,933565
46	ANDR	hoermannianum	Černá Hora	42,723638	19,82905
47	VELED	degenianum	Chorvatsko	44,415258	15,56633
49	HOF5	subalpinum	Rakousko	47,992882	16,104855
51	VUSIS	hoermannianum	Černá Hora	42,530521	19,879393
52	HANP	hoermannianum	Černá Hora	44,0528972	18,9352194
53	TARA	hoermannianum	Černá Hora	43,008993	19,424935
54	MAGL	hoermannianum	Černá Hora	43,2670194	18,8010194
55	VLASH	hoermannianum	Černá Hora	44,1593944	18,9263028
56	IZBI	hoermannianum	Černá Hora	43,5332694	18,5628222
57	DURM	hoermannianum	Černá Hora	43,145922	19,081327
58	BERA	hoermannianum	Černá Hora	42,879325	19,866603
60	FRUG-orig	degenianum	Srbsko	45,1453556	19,8354722
62	VELE	velebiticum	Chorvatsko	44,3771056	15,5422889
87	WALD	subalpinum	Itálie	42,777964	13,28307
89	ZEHR	subalpinum	Česko	50,523	15,10653
91	SOPR-st	subalpinum	Česko	50,078573	15,546184
94	TYNI-st	subalpinum	Česko	50,183799	16,096776
109	LCEIT	velebiticum	Itálie	45,946511	11,013542
111	I162T	velebiticum	Itálie	45,994892	11,084839
124	CERTN08	nemorosum	Česko	48,859025	17,414231
140	HERN	subalpinum	Rakousko	47,90739	16,09479
147	KNEZ-08	subalpinum	Česko	49,59178	16,41661
153	CERB	subalpinum	Česko	50,02708	15,84278
181	SLIN	subalpinum	Rakousko	47,988656	16,161679
184	GRAB-st	subalpinum	Rakousko	47,95195	16,03504001
193	SCHWA	subalpinum	Rakousko	47,8168	15,70466
199	VYSL	subalpinum	Česko	50,15285	15,84125
203	HORJ	subalpinum	Česko	50,046802	16,12781
206	SOOß	subalpinum	Rakousko	47,987506	16,198243

209	KRIZ	subalpinum	Rakousko	48,040153	16,253575
211	RD	subalpinum	Rakousko	48,043048	16,259453
217	HAID	subalpinum	Rakousko	48,035057	16,255438
219	LANG	subalpinum	Rakousko	47,983754	16,188795
221	KIRC	subalpinum	Rakousko	47,621172	15,977228
227	MIES	subalpinum	Rakousko	47,8627	15,98945
250	UPPSN	nemorosum	Švédsko	59,852165	17,629981
261	SAJH	subalpinum	Slovensko	48,65257	17,27207
265	CERK	subalpinum	Slovensko	48,472071	17,053008
272	CHLU	subalpinum	Česko	50,134548	16,13363
277	ZDEL	subalpinum	Česko	50,1104	16,155364
279	HALA	subalpinum	Česko	48,841702	14,937304
289	KOLE	subalpinum	Česko	49,08643	14,79793
294	HEJT	subalpinum	Česko	49,331661	14,724084
301	KARD	subalpinum	Česko	49,161276	14,846136
303	PEUT	subalpinum	Rakousko	47,9557	15,154207
308	MAMA	subalpinum	Rakousko	47,831113	15,883577
318	KLOS	subalpinum	Rakousko	47,807789	15,762012
323	VIAD	subalpinum	Rakousko	47,657461	15,811143
327	NYKL	subalpinum	Česko	49,60185	16,37135
332	VELT	subalpinum	Česko	49,56416	16,387
338	OLES	subalpinum	Česko	49,57538	16,40224
342	TRPI	subalpinum	Česko	49,58455	16,39945
347	KOST	subalpinum	Česko	50,10536	16,18889
349	USTR	subalpinum	Česko	49,33371	14,67733
352	VLHA	subalpinum	Česko	50,07073	15,5953
356	DOBR	subalpinum	Česko	50,007667	16,140833
361	BELE	subalpinum	Česko	50,205788	15,926334
373	SUTE	subalpinum	Česko	50,157128	16,028933
376	MOLVI	velebiticum	Itálie	46,111974	10,952371
380	CAVEI	velebiticum	Itálie	46,200055	11,041203
385	MISOI	velebiticum	Itálie	45,990873	10,83782
390	GRENI	velebiticum	Francie	45,044211	6,129288
404	VYSB	subalpinum	Česko	50,136113	16,000492
409	SLAP	subalpinum	Česko	49,378978	14,600638
416	PUCH	subalpinum	Rakousko	47,76208	15,88695
424	KNAP	subalpinum	Rakousko	47,700711	15,787191
428	SEMM	subalpinum	Rakousko	47,640125	15,827037
434	LOSE	subalpinum	Rakousko	47,790776	15,844621
438	FALK	subalpinum	Rakousko	47,821104	15,695864
441	RE-83	subalpinum	Rakousko	48,026467	16,224985
445	BADF	subalpinum	Rakousko	47,828165	16,131299
452	HOHW	subalpinum	Rakousko	47,829357	16,052765
458	MERK	subalpinum	Rakousko	47,982949	16,133426

466	ANDOT	degenianum	Itálie	46,061271	10,889209
471	RIVAT	degenianum	Itálie	45,909738	10,831328
476	THAL	subalpinum	Rakousko	47,710917	15,849579
498	ROSEN	degenianum	Rakousko	48,028938	16,182325
511	SKALN	nemorosum	Česko	50,490587	14,602029
554	RE-III	subalpinum	Rakousko	48,025216	16,227588
563	GUMP96	subalpinum	Rakousko	48,031623	16,256589
567	EINO09Z	subalpinum	Rakousko	48,02378	16,229717
585	CERVN	nemorosum	Česko	50,300861	17,133472
586	UDOL	subalpinum	Rakousko	47,660115	15,79588
591	CAPAB	carpaticum	Rumunsko	45,266611	24,126806
596	BERA	hoermannianum	Černá Hora	42,879325	19,866603
628	VUSIH	hoermannianum	Černá Hora	42,532645	19,82008
654	PROKH	hoermannianum	Černá Hora	42,565472	19,915361
658	VUSIH-2	hoermannianum	Černá Hora	42,534173	19,819595
663	MAZU	subalpinum	Česko	50,157323	15,924848
668	MAJD	subalpinum	Česko	48,98466	14,84436
686	ALBI	subalpinum	Rakousko	47,70293	15,80113
711	MARS	subalpinum	Rakousko	47,640264	15,875794
716	HOLL	subalpinum	Rakousko	47,752678	15,748742
728	KALT	subalpinum	Rakousko	47,996171	16,163324
738	KRAN	subalpinum	Rakousko	47,644053	15,975386
764	NEVEV	velebiticum	Itálie	46,075041	12,33263
767	TRAIB	nemorosum	Rumunsko	46,93349	22,84345
769	UDOLB	nemorosum	Rumunsko	46,525714	22,606457
771	NOCOB	nemorosum	Rumunsko	46,93449	22,85498
773	PETRN	nemorosum	Rusko	59,429281	29,980906
776	GORKN	nemorosum	Rusko	59,9	31,69
777	STEPV	velebiticum	Francie	45,59664	6,871884
782	CHYTN	nemorosum	Polsko	53,711894	21,558994
793	JINDN	nemorosum	Česko	49,16843	15,04197
817	JESEN	nemorosum	Česko	49,879276	17,154727
827	STETV	velebiticum	Francie	44,284729	6,882162
829	BOREV	velebiticum	Francie	44,10507	7,267678
830	GENTN	nemorosum	Německo	52,409361	12,183556
836	TRESN	nemorosum	Německo	51,717992	10,970489
840	OLSZN	nemorosum	Polsko	50,83825	16,705194
845	DABIEN	nemorosum	Polsko	50,341083	20,179472
850	STRUN	degenianum	Rakousko	48,199729	14,976736
855	LEISN	degenianum	Rakousko	48,567513	16,385279
860	DOLJT	trichocalycinum	Bosna a Hercegovina	43,687008	17,691754
865	DOLJH	hoermannianum	Bosna a Hercegovina	43,666733	17,708535

870	ZELPS	hoermannianum	Bosna a Hercegovina	44,408605	17,938712
876	SATOV	velebiticum	Chorvatsko	44,756801	15,068007
880	BLEDN	degenianum	Slovinsko	46,36897	14,100201
885	TREBH	hoermannianum	Bosna a Hercegovina	43,829902	18,470329
890	PLETN	degenianum	Chorvatsko	45,302684	17,962582
895	PLANV	velebiticum	Slovinsko	45,798293	14,2351
901	JASEV	velebiticum	Chorvatsko	45,236919	15,060146
905	KONJH	hoermannianum	Bosna a Hercegovina	43,542791	18,062807
910	NANOV	velebiticum	Slovinsko	45,794255	14,008591
915	SVICH	degenianum	Chorvatsko	44,844914	15,144443
920	BUNIH	degenianum	Chorvatsko	44,664244	15,6003
925	SABOH	degenianum	Chorvatsko	45,009122	15,422206
930	PLITH	degenianum	Chorvatsko	44,894584	15,607619
935	VUKOH	hoermannianum	Chorvatsko	43,607676	16,851094
940	VRANN	degenianum	Slovinsko	45,952132	14,257024
950	LIPLN	degenianum	Slovinsko	45,851149	14,244487
960	MANFN	degenianum	Mađarsko	46,156891	18,242266
965	VEVEV	velebiticum	Švýcarsko	46,486183	6,845017
968	JABLH	hoermannianum	Bosna a Hercegovina	43,646629	17,756197
977	ALMEN	nemorosum	Švédsko	56,664635	15,243576
980	SHOKN	nemorosum	Švédsko	56,26667	14,83333
988	JACAC	velebiticum	Španělsko	42,55454	-0,6612937
990	SURZP	carpaticum	Ukrajina	48,6	26,6
992	GUILC	velebiticum	Španělsko	41,919942	2,517616
998	BEBRP	nemorosum	Polsko	53,593556	22,858767
1001	RIGAN	nemorosum	Lotyšsko	57,3873	25,973128
1003	SUWAN	nemorosum	Polsko	54,012925	22,9971
1006	COZIH	carpaticum	Rumunsko	45,307222	24,349444
1007	TEKON	degenianum	Ukrajina	48,138344	23,077758
1010	PETRB	nemorosum	Rumunsko	46,60062	22,64072
1012	LEFFN	degenianum	Itálie	45,77667	9,878576
1014	SIUNB298	nemorosum	Rumunsko	46,92643804	22,535608
1034	SIUNB294-5	nemorosum	Rumunsko	46,92069	22,53251
1039	PEZZT	degenianum	Itálie	45,7694	10,24783
1054	SCARB	nemorosum	Rumunsko	46,49700556	23,38175
1055	BIXAD	carpaticum	Rumunsko	46,10908333	25,84636111
1056	ARCAB	nemorosum	Rumunsko	47,08108333	24,35302778
1057	OMBIT	degenianum	Itálie	45,74731	10,30674
1058	IDROT	degenianum	Itálie	45,80723	10,50753
1059	FRUG-nove	subalpinum	Srbsko	45,1453556	19,8354722
1070	DEBHN	nemorosum	Mađarsko	47,51054	21,84585

1073	EA	carpaticum	Rumunsko	45,675382	24,514356
1074	EA	carpaticum	Rumunsko	45,675382	24,514356
1094	LAFFRV	velebiticum	Francie	45,1043833	6,2529833
1102	PUSKN	nemorosum	Rusko	56,0213181	37,8129706
1104	KRASN	nemorosum	Polsko	53,31937702	23,12868297
1106	ROSTN	nemorosum	Rusko	57,23548902	39,480213
1113	IRKUN	nemorosum	Rusko	52,08638889	103,9669444
1122	SFANH	carpaticum	Rumunsko	44,65888889	21,74694444
1142	HRADD	degenianum	Slovensko	48,66272222	20,30611111
1192	PLATV	velebiticum	Chorvatsko	45,439463	14,561855
1208	RATKN	degenianum	Chorvatsko	48,60534	20,10196
1215	SPASB	degenianum	Ukrajina	48,300161	25,77334
1217	CASAI	velebiticum	Itálie	46,15963889	12,14297222
1220	FAEDD	degenianum	Itálie	46,24189167	12,29189167
1221	ROANI	velebiticum	Itálie	46,17527778	12,204325
1222	PRATI	velebiticum	Itálie	46,25645	12,07273889
1224	CIGOI	velebiticum	Itálie	46,08848611	12,23638889