

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Studium populací *Melampyrum nemorosum* v oblasti
kontaktní zóny dvou linií s odlišnou geografickou distribucí**

Bakalářská práce

Petr Drahník

Školitel: Ing. Milan Štech, Ph.D.

České Budějovice 2013

DRAHNÍK P. (2013): Studium populací *Melampyrum nemorosum* v oblasti kontaktní zóny dvou linií s odlišnou geografickou distribucí. [Study of population *Melampyrum nemorosum* in the contact zone of two lineages with different geographic distribution. Bc. Thesis, in Czech] - počet stránek 51 počet stránek přílohy 10, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Melampyrum nemorosum agg. je nejproblematictější skupinou poloparazitického rodu *Melampyrum* s více než 15 druhy s hlavním centrem diverzity na Balkánském poloostrově. Byla studována kontaktní zóna mezi dvěma molekulárně podpořenými liniemi druhu *M. nemorosum* s. str. Byly sekvenovány 3 úseky cpDNA (trnT^{UGU}-trnL^{UAA}, psbA-trnH^{GUG}, rpl32-trnL^{UAG}). Studována byla také velikost genomu a variabilita morfologických znaků a jejich odlišnosti mezi molekulárně podpořenými skupinami.

Melampyrum nemorosum agg. is the most problematic group of hemiparasitic genus *Melampyrum* with more than 15 species with the main centre diversity in the Balkan Peninsula. A contact zone between two molecular supported lineages of the *M. nemorosum* s. str. was studied. Three cpDNA regions (trnT^{UGU}-trnL^{UAA}, psbA-trnH^{GUG}, rpl32-trnL^{UAG}) were sequenced. Differentiation in genome size and variability in morphological characters among molecular supported groups was studied.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské 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 13. 12. 2013

.....
Podpis studenta

Poděkování

V této části bych chtěl poděkovat všem lidem, co při mě stáli a jakoukoliv mírou podporovali při zrodu této práce. Nejvíce bych chtěl poděkovat mému školiteli Milanovi Štechovi za ochotu a pevné nervy. Vždy mi ochotně poradil, pomohl a občas dodal nějaký ten optimismus. Dále bych chtěl poděkovat mé rodině, převážně rodičům za ohromnou podporu, bez které by ani tato práce nevznikla. Další děkuju patří 100 % „pančelce“ Šárce Svobodové za uvedení do tajů laborky a za dobíravé poznámky, které mi vždy pozvedly náladu. Jirkovi Košnarovi za pomoc a rady v laborce a také guru průtokové cytometrie Petru Kouteckému za pomocnou ruku při analyzování mých rostlinek a poskytnutí funkcí pro program R. a dalším lidem na poli botaniky, kteří mi pomohli se sběry a dalšími věcmi.

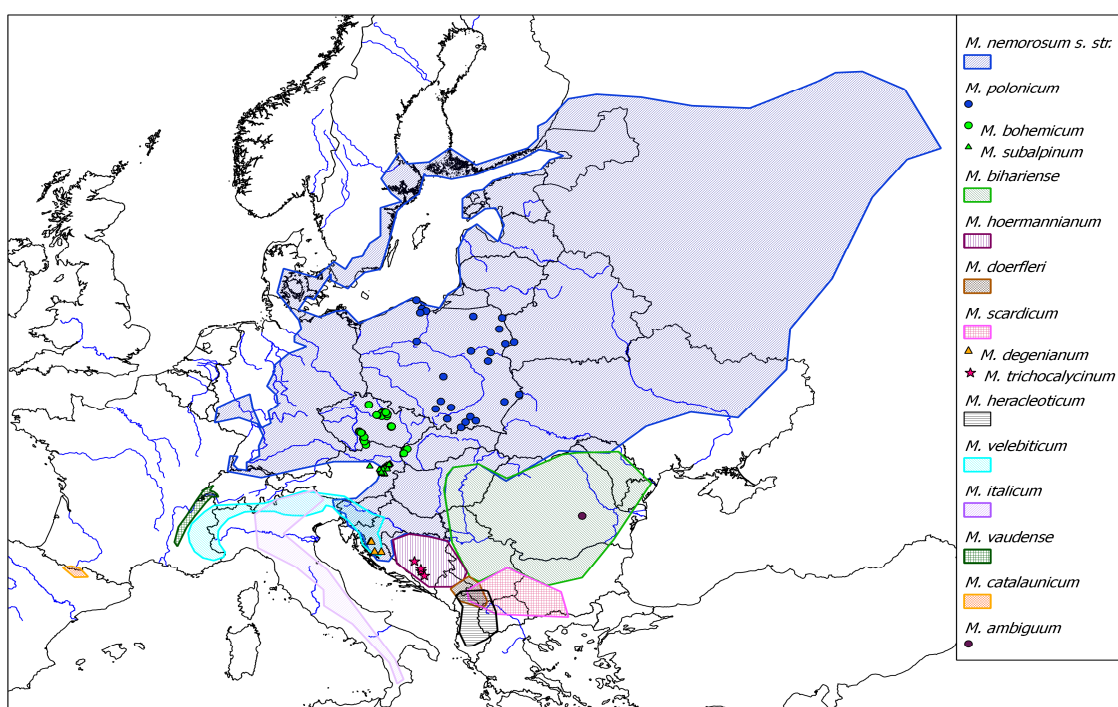
V neposlední řadě bych také chtěl poděkovat mým přátelům za odreagování a podporu mimo školu, Martinu Hůlkovi za grafickou úpravu obrázků a také paní učitelce Procházkové, která mě přivedla již na základní škole na dráhu biologie. Posledním slovem, lidičky DĚKUJU....!!!

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Cíle práce	4
2. Literární přehled	5
2.1. Charakteristika rodu <i>Melampyrum</i>	5
2.1.1. Vymezení skupiny <i>M. nemorosum</i>	8
2.1.2. Vymezení jednotlivých druhů skupiny <i>M. nemorosum</i>	8
2.1.3. Charakteristika <i>Melampyrum nemorosum</i>	9
2.1.4. Sezónní proměnlivost	10
2.2. Jaderný genom a jeho velikost	11
2.2.1 Vnitrodruhová variabilita velikosti genomu	13
2.2.2 Průtoková cytometrie	14
3. Metodika	15
3.1. Sběr materiálu	15
3.2. Molekulární analýzy	16
3.2.1. Izolace DNA	16
3.2.2. PCR, purifikace a příprava sekvenční směsi	17
3.3. Průtoková cytometrie	19
3.3.1. Měření	19
3.3.2. Analýza dat	20
3.3.3. Výpočet AT bází u <i>M. nemorosum</i>	21
3.4. Morfometrické analýzy	21
3.4.1. Statistické zpracování dat	24
4. Výsledky	25
4.1. Molekulární analýzy	25
4.2. Cytometrická analýza	26
4.2.1. Výpočet AT bází	29
4.3. Morfometrické analýzy	31
4.3.1. Shluková analýza	32
4.3.2. Analýza hlavních komponent	32
4.3.3 Kanonická diskriminační analýza	35
4.3.4 Klasifikační diskriminační analýza	38
5. Diskuze	40
6. Závěr	43
7. Použitá literatura	44
Přílohy	52

1. Úvod

Rod *Melampyrum* byl v minulosti řazen do čeledi *Scrophulariaceae*. Na základě molekulárních analýz je v současnosti společně s ostatními poloparazitickými rody, náležejícími původně do této čeledi, řazen do čeledi *Orobanchaceae* (OLMSTEAD et al. 2001). Větší část středoevropských druhů tohoto rodu má jasné vymezení a je snadno poznatelná (např. *M. arvense*, *M. cristatum*, *M. pratense*). Tyto druhy lze od sebe poměrně snadno rozeznat díky mnoha znakům. Mezi nejdůležitější znaky patří např. tvar koruny, tvar a odění kalicha, pukání tobolky aj. Navzdory řadě dobře vymezených druhů, rod obsahuje několik kritických skupin, mezi které patří např. *M. nemorosum* agg. a *M. sylvaticum* agg. Rozlišení těchto skupin nečiní velké potíže, ale to již neplatí o vymezení jednotlivých druhů uvnitř skupin. Právě vymezení jednotlivých druhů dělá skupinu *Melampyrum nemorosum* tak obtížnou. Celá skupina bývá členěna do několika podskupin (např. SOÓ 1927, SOÓ WEBB & 1972). Různí autoři, zabývající se tímto rodem, se ve svých koncepcích a závěrech zřetelně rozcházejí.

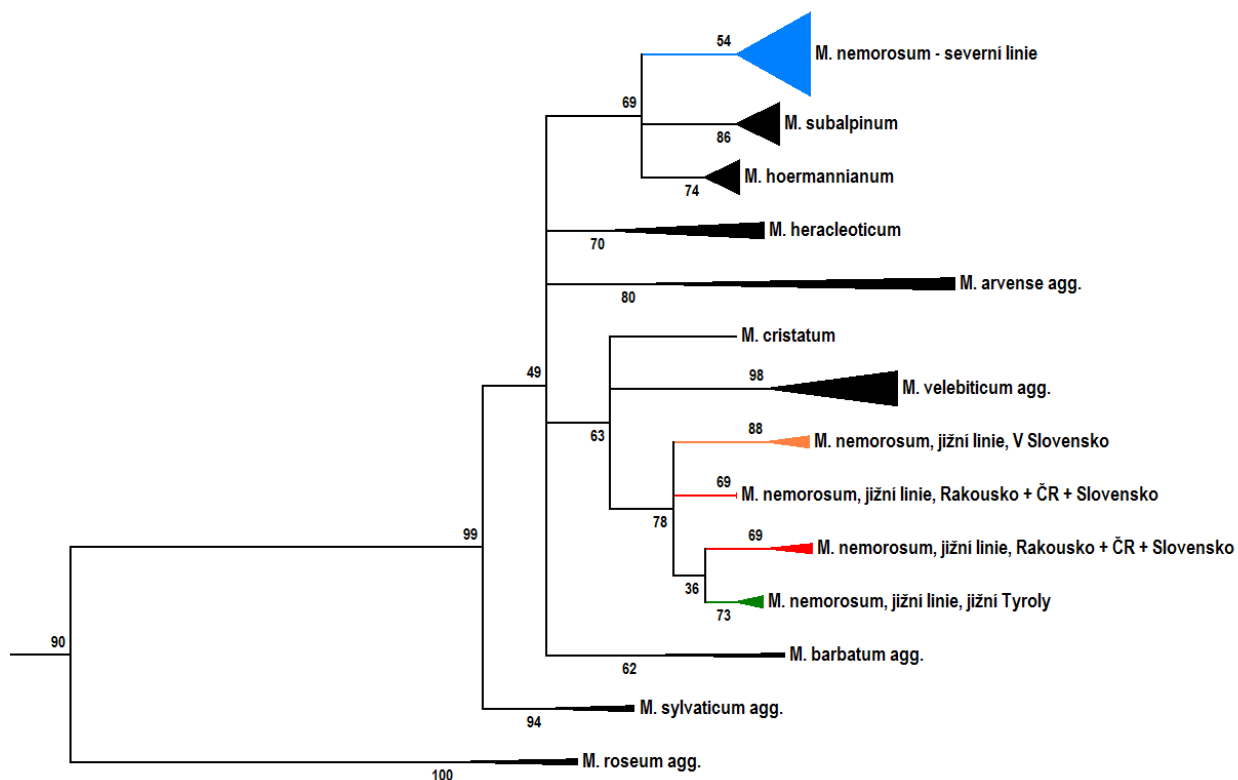


Obr. 1: Rozšíření jednotlivých druhů skupiny *Melampyrum nemorosum* v Evropě podle Soó (1926 – 1927).

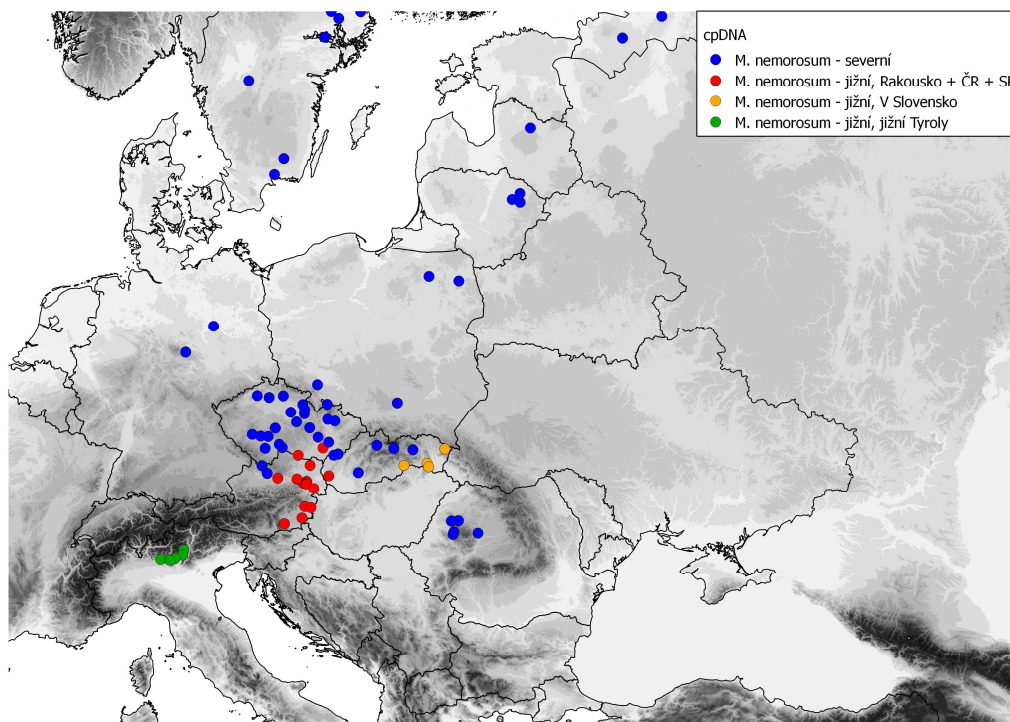
Ve 20. století se tímto rodem zabývali především Ronniger (1910, 1918), Beauverd (1916) a Soó (1926–1927). Beauverd a Soó zpracovali kompletní rodové monografie, jejichž koncepce se však významně liší. Beauverd (1916) všechny dnes rozlišované druhy shrnul do jediného druhu s mnoha poddruhy a varietami, zatímco Soó (1926 – 1927) rozdělil celý agregát (ve svém pojetí ser. *Eunemorosa*) na 15 samostatných druhů. Za centrum diverzity této skupiny lze považovat Balkánský poloostrov (viz Obr. 1). V průběhu let se Soóva monografie stala základem pro většinu budoucích zpracování rodu po celé Evropě (SOÓ & WEBB 1972). Nové studie však naznačují, že vymezení druhů přijaté v pracích Soóa neodpovídá skutečné variabilitě a evoluční historii skupiny (ŠTECH 1998, CHLUMSKÝ 2007).

Probíhající studie zabývající se fylogenezí rodu *Melampyrum* odhalila, že ani druh *Melampyrum nemorosum* v úzkém Soóově pojetí není jednotný. Analýzou třech úseků chloroplastové DNA bylo zjištěno, že rostliny v nedávné minulosti určované jako *M. nemorosum* L. obsahují dvě skupiny haplotypů s odlišným geografickým rozšířením. Podle předběžných analýz se zdá, že tyto dvě skupiny haplotypů nejsou ani sesterskými skupinami (Obr. 2). Haplotypy rozšířené v severní části Evropy a v České republice tvoří jednu skupinu, která tvoří monofyletickou skupinu s haplotypy druhů *M. hoermannianum* a *M. subalpinum* s. l. Haplotypy populací z jižního a východního okraje Alp a východního Slovenska tvoří druhou samostatnou jednotku, která vychází jako sesterská k *M. velebiticum* agg. V rámci této skupiny jsou poměrně dobře podpořeny i geograficky vymezené skupiny populací z jižních Tyrol a východního Slovenska (Obr. 2, 3).

V oblastech východního úpatí Alp, jižní Moravy, jižního, východního Slovenska, severního Maďarska a západního Rumunska zřejmě dochází ke kontaktu těchto skupin haplotypů.



Obr. 2: 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).



Obr. 3: Rozšíření jednotlivých skupin *M. nemorosum* podle cpDNA.

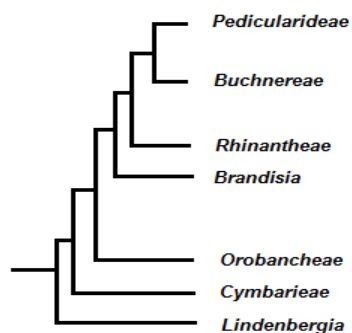
1.1. Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo na základě analýzy chloroplastové DNA u dalších populací detailněji popsat rozšíření jednotlivých haplotypových skupin v kontaktní zóně od Rakouska po východní Slovensko. U skupin vymezených na základě podobnosti cpDNA otestovat rozdíly ve velikosti genomu a zjistit možnost morfologického rozlišení. Dále pokusit se nalézt případné směsné populace a možnou hybridizaci. Do analýz bylo zařazeno i několik populací mimo kontaktní zónu z důvodu získání materiálu severního typu bez potencionálního vlivu hybridizace.

2. Literární přehled

2.1. Charakteristika rodu *Melampyrum*

Rod *Melampyrum* byl v minulosti společně s dalšími poloparazitickými rody (např. *Rhinanthus*, *Euphrasia*, *Odontites*) řazen do podčeledi *Rhinanthoideae* čeledi *Scrophulariaceae* (HARTL 1974). Na základě molekulárních analýz bylo zjištěno, že čeleď *Scrophulariaceae* je v tradičním vymezení polyfyletická (OLMSTEAD et REEVES 1995) a poloparazitické rody byly zařazeny do čeledi *Orobanchaceae* (OLMSTEAD et al. 2001, WOLFE et al. 2005, BENETT at MATTHEWS 2006). Čeleď *Orobanchaceae* představuje v současnosti největší monofyletickou skupinu obsahující poloparazitické a parazitické rostliny (HEIDE-JØGENSEN 2008). V recentních studiích týkajících se této čeledi (např. WOLFE et al. 2005, BENETT at MATTHEWS 2006, MCNEAL et al. 2013) se jasně ukazuje rozdělení na několik velkých monofyletických linií. Rozlišeno bylo celkem 6 linií a *Brandisia* (Obr. 4). Dvě menší linie *Cymbarieae* a *Lindenbergia*, která je jedinou neparazitickou linií uvnitř čeledi. Tato linie tvoří bazální linii celé čeledi a je sesterskou skupinou ke všem parazitickým rodům. Dále byly rozlišeny 4 větší linie, které se dělí na další linie. *Pedicularideae* je rozdělována na 3 hemiparazitické linie, zatímco *Orobancheae* obsahuje pouze druhy holoparazitické. *Buchnereae* obsahuje 3 linie subtropických a tropických rodů jižní polokoule. Poslední linií je *Rhinantheae*, kterou podrobněji zkoumal např. Těšitel (2010) a Scheunert (2012). Ukázalo se, že v Rhinanthoidní linii lze rozlišit 3 hlavní linie, přičemž rod *Melampyrum* je bazální větví a tvoří sesterskou linii ke zbylým dvěma. Ty jsou tvořeny rody *Rhinanthus*, *Rhynchosorys*, *Lathraea* na jedné straně a na druhé straně rody *Bartsia*, *Euphrasia* a *Odontites* s. l.



Obr. 4: Fylogeneze čeledi *Orobanchaceae* (podle MCNEAL a kol. 2013)

Do rodu *Melampyrum* patří výhradně jednoleté poloparazitické rostliny, které podobně jako ostatní kořenoví poloparazité vytvářejí na svých jednoduchých kořenech zvláštní útvary zvané haustoria. Pomocí haustorií se tyto rostliny napojují na xylém kořene svého hostitele. Z xylému odčerpávají potřebné minerální látky a vodu (SLAVÍKOVÁ 1986, IRVING & CAMERON 2009), ale zřejmě také uhlík, jak ve své studii na *Euphrasia rostkoviana* a *Rhinanthus minor* prokázali Těšitel a kol. (2010). Protože se jedná o poloparazity, mají zachovanou vlastní fotosyntetickou aktivitu. Díky fotosyntéze zprostředkovávané slunečním zářením rostlina nemusí přijímat uhlík a další látky pouze z hostitelské rostliny (PRESS 1989). Příjem živin od hostitele je umožňován pomocí průduchů a s nimi spojenou transpirací (PRESS 1989). Rostliny nejsou schopné zcela uzavřít své průduchy, tudíž dochází ke zvýšení transpirační aktivity. Tento proces má za následek mnohonásobné snížení vodního potenciálu v tkáni parazita oproti tkáni hostitelské rostliny. Nízký potenciál umožňuje intenzivnější nasávání vody z hostitelské rostliny, čímž je umožněn větší přísun živin (PRESS 1988, PRESS 1989, JIANG 2003, EHLERINGER 1995).

Zástupci rodu *Melampyrum* jsou fakultativními poloparazity, což znamená, že nejsou přímo závislí na hostiteli. Pokud ovšem nedojde k připojení na hostitele, rostlina není schopna normálního růstu a nekvete, tudíž ani neplodí (CANTLON et al. 1963). Takovéto rostliny nemusí ihned uhynout a přetrvávají po celou dobu vegetačního období ve vegetativní formě, přičemž na konci období hynou (CANTLON et al. 1963, SVENSSON et al. 2001). Rostliny zdárně připojené rychleji rostou, více se větví, mají více listů, kvetou a jsou celkově vitálnější. Jelikož se jedná převážně o lesní druhy (např. *M. sylvaticum* a *M. nemorosum*), hostitelskými rostlinami tohoto rodu jsou převážně dřeviny (např. *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae* aj.). Nicméně druhy rostoucí na loukách nebo ve stepních porostech (např. *M. arvense*) se připojují převážně na byliny (např. *Rosaceae*) a trávy (*Poaceae*) (HARTL 1974). ADAMEC (2012) zjistil, že *M. nemorosum* hojně napadá rostliny z čeledí *Rubiaceae*, *Rosaceae* a *Fabaceae*. Zjistil však také, že poměrně často dochází k napojení haustorií na kořeny vlastního druhu. Podle mého názoru však není tento způsob efektivní.

Společnými znaky rodu *Melampyrum* jsou přímé a různě bohatě větvené lodyhy a vstřícné, přisedlé, až krátce řapíkaté, převážně celokrajné listy. Listeny jsou zpravidla zubaté a horní často nápadně zbarvené. Květy jsou souměrné, v květenstvích na hlavní lodyze a zpravidla též na tlustších větvích. Kalich je trubkovitý, až zvonkovitý se 4 cípy, vytrvávající i v době plodu. Koruna je dvoupyská s dlouhou a často zahnutou

trubkou, na povrchu někdy jemně papilnatá, až kratičce chlupatá. Horní pysk je přilbovitý, z boku mírně zploštělý na okraji s krátce chlupatým lemem. Dolní pysk je plochý, anebo mírně vyklenutý, trojzubý až trojlaločný. Tyčinky jsou čtyři, dvoumocné, s lysými nebo krátce papilnatými až chlupatými nitkami, které jsou s korunou dlouze srostlé. Prašníky jsou nezřetelně šípovité. Pylová zrna mají lepkavou konzistenci, jak tomu bývá u entomogamních rostlin (HARTL 1974). Semeník vzniká ze dvou plodolistů, na spodní straně má různě velké nektárium. Čnělka je dlouhá, niťovitá, blizna malá, nezřetelně dvoulaločná. Tobolky jsou 1–4 semenné, pouzdrosečné, pukající pouze na hřbetní nebo i na břišní straně. Semena jsou velká, elipsoidní, hladká bělavá s masíčkem (elaiosom).

K šíření rostlin napomáhají mravenci způsobem zvaným myrmekochorie. Semena obsahují na povrchu tzv. elaisom, který slouží mravencům jako zdroj potravy (GIBSON 1993a). Způsobem rozšiřování semen se u rodu *Melampyrum*, zabývalo několik autorů. Například Heinken (2004) zjistil, že maximální vzdálenost disperze semen u *M. pratense* je 6,48 m a Gibson (1993a) u *M. lineare* 4,5 m. Nicméně Chlumský a kol. (2012) zjistili, že mravenci druhu *Formica polyctena*, jsou schopni přenášet semena *M. pratense* až na vzdálenost 36 m. Tato vzdálenost je jedna z největších, co byla u myrmekochorie zaznamenána. Chlumský dále zjistil, že semena jsou schopná projít neporušena trávicím traktem velkých přežvýkavců, což může napomáhat šíření semen na velké vzdálenosti.

V rodě *Melampyrum* se podle různých taxonomických pojetí rozlišuje 20–40 druhů, které se vyskytují ve třech samostatných areálech. Největší je evropská odkud areál rodu zasahuje výskytem několika druhů úzkým pásem až na střední Sibiř, na Kavkaz, kde je jedno z center diverzity, a do Malé Asie. Druhá arela zahrnuje východní Asii. Třetí arelou je Severní Amerika, kde se vyskytuje jediný druh a to *M. lineare* (SOÓ 1926-1927, ŠÍPOŠOVÁ 1997, ŠTECH 2000). Největší druhové zastoupení a pravděpodobně vývojové centrum rodu se nachází v jihovýchodní Evropě, a to zejména na Balkánském poloostrově a v jihovýchodních Alpách. Předpokládá se, že k diferenciaci rodu a odlišení podsekcí došlo pravděpodobně koncem terciéru (SOÓ 1927, WOLFE 2005).

V celém rodě se vyskytuje entomogamie. Lákadlem pro opylovače je nektar, který produkuje nektárium umístěné při bázi pestíku. Nejčastějšími opylovači rodu jsou čmeláci, kteří mají dostatečně dlouhý sosák. Délka sosáku také určuje způsob získávání nektaru a s ním spojené opylování. Často dochází k tzv. vykrádání, kdy opylovači

s kratším sosákem, prokoušou korunní trubku a dostávají se k nektaru bez opylení květů (KWAK 1988).

2.1.1. Vymezení skupiny *M. nemorosum*

V tradičním pojetí současné době je celý agregát *M. nemorosum* členěn na 15 samostatných druhů (SOÓ & WEBB 1972). K vymezení agregátu *M. nemorosum* jsou většinou používány znaky podle Soóa (1927). Jedná se o převážně o zbarvení listenů a způsob pukání tobolek. Listeny bývají modré až fialové výjimečně růžové nebo bílé. Tobolky pukají po obou stranách. Dalšími vymezeními znaky skupiny jsou tvar listů a tvar a zubatost listenů. Mnoho znaků je variabilních i na vnitropopulační úrovni. Znaky považované za taxonomicky významné jsou uvedeny v následující kapitole 2.1.2.

2.1.2. Vymezení jednotlivých druhů skupiny *M. nemorosum*

Za taxonomicky významné morfologické znaky rozlišující jednotlivé druhy komplexu jsou uváděny především: velikost koruny, otevřenost ústí koruny, poměr určitých částí koruny s částmi kalicha apod. Za nejvýznamnější znaky jsou považovány především odění kalicha a jeho tvar. Především na základě těchto znaků je celá skupina členěna na několik podskupin (SOÓ 1927).

- podskupina *Melampyrum nemorosum* – celý kalich hustě chlupatý, chlupy dlouze odstálé (Obr. 5).
- podskupina *Melampyrum velebiticum* – celý kalich s krátkými přitisklými chlupy, v horní části směřujícími vpřed a v dolní části nazpět (Obr. 6).
- podskupina *Melampyrum subalpinum* a *M. bihariense* – kratší odstálé chlupy pouze na žilkách a na okraji kalicha jinak kalich olysalý až lysý (Obr. 7 a 8).



Obr. 5: Odění kalicha *M. nemorosum*



Obr. 6: Odění kalicha *M. velebeticum*



Obr. 7: Odění kalicha *M. subalpinum*



Obr. 8: Odění kalicha *M. bihariense*

2.1.3. Charakteristika *Melampyrum nemorosum*

Druh *Melampyrum nemorosum* L. byl popsán ze Skandinávie Linném. Jedná se o 10–70 cm vysokou bylinu. Rostlina je přímá, občas bohatě větvená. Listy jsou celokrajné, podlouhle kopinaté až vejčité, dlouhé až 10 cm a široké 0,5–5 cm. Květy vytvářejí 10–50 ti květé jednostranné hrozny. Dolní listeny jsou podobné listům, zpravidla zelené, vejčité až hrálovité na bázi většinou s několika zuby. Horní listeny jsou zpravidla zubaté, široce vejčité až kopinaté se srdčitou bází, většinou s úzce trojúhelníkovitými až šídlovitými zuby na okraji a nejčastěji modrofialové zbarvené, vzácně bílé, zelené nebo červené. Listeny jsou pokryty na celé ploše kratičkými chlupy, zatímco na spodní straně jsou chlupy delší, horní listeny jsou obvykle v dolní části a na žilkách hustě dlouze chlupaté. Na spodní straně nalezneme světlé nenápadné přisedlé žlázy. Kalich je 8–15 mm dlouhý po celé ploše, ale především na kališní trubce hustě

dlouze kadeřavě chlupatý. Kališní trubka je zelená mezi žilkami někdy bělavá nebo nafialovělá, úzce nálevkovitá. Koruna je 15–25 mm dlouhá většinou žloutkově žlutá, v dolní části korunní trubky a někdy i na jiných místech rezavá. Korunní trubka je zpravidla 2x delší než kalich, na bázi nápadně ohnutá, horní pysk ze stran silně zmáčknutý, dolní pysk je delší než horní má rovný okraj a je k hornímu přiblížený, v době plného květu mírně oddálený. Prašníky jsou cca 3–4 mm dlouhé, většinou světle žluté, na okrajích chlupaté, se zelenavým konektivem; semeník zelený, lysý s poměrně velkým bazálním nektáriem, čnělka někdy pod bliznou řídce chlupatá, jinak lysá mající kulovitou bliznu. Tobolky jsou elipsoidní, až 11 mm dlouhé, stejně dlouhé jako kalich, jen mírně ze stran zmáčknuté, často se zploštělou, široce zobanitou koncovou částí, lysé, se zřetelnou žilnatinou, pukající na hřbetní i břišní straně, obvykle 2–4 semenné. Semena jsou 4–6 mm dlouhá. Rostlina kvete od května do října. Nadzemní části rostliny obsahují iridoidní sloučeninu aukubin, která způsobuje to, že rostlina při sušení černá. Od této specifické vlastnosti je odvozeno české rodové jméno „černýš“ (DEYL 1956).

2.1.4. Sezónní proměnlivost

Kromě výše uvedené mezidruhové variability je taxonomie celé skupiny značně komplikována dalším problémem zvaným sezónní variabilita. Tento termín je již od 19. století znám v zoologii. Využívá se k označení morfologicky odlišných jedinců v rámci jednoho druhu (ZELLER 1849, WEISMANN 1875). Později byl tento jev popsán i v botanice a je typický pro některé čeledě či rody rostlin. Jednou skupinou rostlin, která se vyznačuje sezónní proměnlivostí, jsou poloparazitické rostliny z čeledi *Orobanchaceae* (ZOPFI 1995, 1998b), do níž patří studovaný rod *Melampyrum*. Mnohé druhy tohoto rodu jsou vysoce variabilní v mnoha morfologických znacích svázaných s dobou květu, což se v současnosti označuje jako tzv. pseudosezónní polymorfismus. Tento jev se projevuje tvorbou odlišných typů, tzv. ekotypů uvnitř jednoho druhu, které jsou ovlivněny ekologicko – sociologickými podmínkami (SOÓ 1926-1927). Jednotlivé morfotypy se liší především dobou květu a tzv. sezónními znaky, které ji ovlivňují. Mezi nejvýznamnější znaky patří hlavně počet lodyžních článků (ZOPFI 1993b), který rozhoduje o nodu prvního květu, přítomnost děložních listů v době květu, počet, délka a směr odstávání větví, případně jejich rozvětvení do vyšších řádů (ŠTECH 1998, TĚŠITEL 2005).

Na základě sezónní variability bylo v minulosti popsáno velké množství taxonů (dokonce i na druhové úrovni), které jsou v současnosti považovány za vnitrodruhové ekotypy. Například Ronniger (1911) rozlišoval 3 sezónní varianty *Melampyrum nemorosum* a to aestivální typ – *M. nemorosum* subsp. *moravicum*, dále autunnální typ *M. nemorosum* subsp. *nemorosum* a montánní podruh *M. nemorosum* subsp. *silesiacum*. Daleko propracovanější je však Sóova teorie (SÓO 1926-1927, 1929), ve které v případě *M. nemorosum* rozlišoval stejný počet sezónních typů. Jeho teorie se však lišila hypotézou o vzniku a diferenciaci těchto typů. Na rozdíl od Ronnigera, který zohlednil pouze klimatické podmínky a lidský zásah (kosení), Soó bral v úvahu také edafické a biologické faktory. Štech (2000) se zabýval sezónní variabilitou druhu *M. nemorosum* a na rozdíl od předchozích autorů rozlišil pouze 2 sezónní typy. Časně kvetoucí (*M. nemorosum* var. *praecox*) a pozdně kvetoucí (*M. nemorosum* var. *nemorosum*). Typy označované Ronnigerem a Soóem za montánní poddruh *M. nemorosum* subsp. *silesiacum* považuje Štech za extrémně časně kvetoucí rostliny pozdního ekotypu. Dále zjistil, že typová položka jména *M. moravicum* H. Braun náleží rovněž k pozdním populacím a proto bylo nutno popsat časně kvetoucí ekotyp nově jako *M. nemorosum* var. *praecox* Štech.

2.2. Jaderný genom a jeho velikost

Pojem jaderný genom nám udává celkový obsah deoxyribonukleových kyselin, které mají pro organismus informační hodnotu a jsou také druhově specifické. Genom dělíme na jaderný, mitochondriální a chloroplastový.

Specifitou je samotná velikost genomu. Nicméně definice této hodnoty je velice komplikovaná a může vyjadřovat velmi rozdílné věci. Swift v roce 1950 zavedl pro tento parametr výraz C hodnota. Tato hodnota udává množství DNA v nereplikovaném haploidním jádře gamety s n chromosomy, bez ohledu na úroveň ploidie (např. LEITCH and BENNETT 2004; DOLEŽEL and BARTOŠ 2005). Dále se uvádí termín 2C, což je obsah DNA v somatické buňce, která neprochází dělením a má 2n chromosomů. Hodnota, která zohledňuje ploidní stupeň je označována Cx hodnotou a udává množství jaderné DNA monoploidní chromosomové sádky. Hodnoty C a Cx si jsou u diploidních druhů rovny, zatímco u polyploidních druhů je C-hodnota vyšší než Cx hodnota (GREILHUBER et al. 2006).

Ačkoliv je tato hodnota velice užitečná, a nyní používána v různých vědeckých disciplínách, je známa pouze pro 8510 druhů rostlin včetně nahosemenných rostlin, kapradin, mechů a řas (BENNETT and LEITCH 2012). Množství DNA je tradičně udáváno buďto v pikogramech (pg) nebo v počtu bází (bp) (DOLEŽEL and BARTOŠ 2005). Z důvodu srovnání lze tyto hodnoty mezi sebou převádět. Udává se, že 1 pg DNA je přibližně roven 987 Mbp (DOLEŽEL et al. 2003).

Rozsah hodnot velikosti genomu je u krytosemenných rostlin a kapradin obrovský, dosahující až 2400 násobku, zatímco u nahosemenných rostlin a mechorostů je velmi nízký (LEITCH a BENNETT 2007, TEMSCH et al. 2010). Díky značným rozdílům velikosti genomu mezi taxonomickými skupinami, je tato vlastnost považována za taxonomický znak. Tento znak nám také poskytuje užitečný nástroj pro zkoumání kryptických taxonomických diferenciací uvnitř určité taxonomické jednotky (GREILHUBER 1998). Rostlina s dosud nejmenším známým genomem je *Genlisea aurea* (*Lentibulariaceae*) s hodnotou 0,065 pg/1C DNA (GREILHUBER et al 2006), zatímco rostlina s genomem největším je *Paris japonica* (*Melanthiaceae*) s hodnotou 152,23 pg/1C (PELLICER et al. 2010).

Velikost genomu je ovlivňována několika aspekty. Bylo zjištěno, že velikost genomu je pozitivně korelována s velikostí chromosomů, velikostí jádra a velikostí buněk (BENNETT et al. 1983). Nicméně toto zjištění je vcelku logické, velké genomy potřebují větší jádra a větší čas na replikaci (GREGORY 2002). Knight a kol. (2005) testovali, zdali velikost genomu ovlivňuje také fotosyntetickou aktivitu a odhalili výraznou negativní korelaci. Druhy s velkým genomem mají nižší fotosyntetickou aktivitu, což bylo také paralelně pozorováno u zvířat, kde je negativní korelace mezi velikostí genomu a metabolickou aktivitou (GREGORY 2002).

Dalšími faktory ovlivňující velikost genomu jsou životní cyklus a životní strategie rostliny. Bennett ve svých studiích (1972, 1998) prokázal, že druhy s malými genomy jsou většinou rostliny jednoleté a plevelné, zatímco druhy s velkými genomy rostliny vytrvalé. Rejmánek (1996) také uvádí, že invazní rostliny mají menší genom, díky kterému produkují mnohonásobně více malých a lehkých semen, což napomáhá k jejich úspěchu osidlovat nové prostředí. Tento koncept také potvrdila Kubešová a kol. (2010).

Podmínky prostředí jsou také významným parametrem majícím vliv na velikost genomu (BENNETT 1976; KNIGHT et al. 2005). Tímto aspektem se zabývalo mnoho autorů. Rayburn (1990) díky své studii na kukuřici přišel s názorem, že druhy s větším

genomem se vyskytují spíše ve středních nadmořských výškách, zatímco druhy s malým genomem se vyskytují jak při úrovni moře, tak i ve vysokých nadmořských výškách. Toto zjištění naznačuje, že vztah mezi velikostí genomu a nadmořskou výškou není lineární a je vyjádřen unimodální distribucí. Toto popisuje i Knight a kol. (2005) kteří se snažili prokázat vztah mezi velikostí genomu, teplotou a srážkami. Jejich zjištění opět ukazuje, že rostliny s velkým genomem jsou vyloučeny z extrémního prostředí (nízké nebo vysoké maximální červnové teploty a pokles ročních srážek). Dalšími autory jsou Levin a Fundenburg (1979), kteří měřením genomu tropických a temperátních druhů zjistili, že temperátní druhy mají téměř dvojnásobnou velikost genomu.

2.2.1 Vnitrodruhová variabilita velikosti genomu

Velikost genomu je dnes z větší části považována za stabilní vlastnost druhu. Toto tvrzení víceméně platí už od roku 1950, kdy jej poprvé vyslovil Swift. Nicméně nověji vznikající studie založené na variabilitě velikosti genomu, přicházely s výsledky odporující stabilitě této vlastnosti. Jedná se např. o studie na lnu (EVANS et al. 1966), břečťanu (SCHÄFFNER & NAGL 1979), slunečnici (MICHAELSON et al. 1991b) a mnohých dalších druhích rostlin. Greilhuber (1998) však přezkoumal několik takových studií a zjistil, že byly založeny na chybné metodice, či technických nedostatcích a, že vnitrodruhová variabilita je méně častá, než se zdálo.

O variabilitě velikosti genomu bylo napsáno již mnoho studií, nicméně nemáme stále úplně jasno o všech procesech utvářející tento parametr (ŠMARDA & BUREŠ 2010). Příčin vzniku vnitrodruhové variability velikosti genomu je několik. Důležité rozdíly ve velikosti genomu jsou generovány procesy na molekulární úrovni. Především je spojována s rozdílným obsahem nekódující repetitivní DNA, a to zejména v důsledku dynamiky transpozómů (FLAVELL et al. 1977; ŠMARDA & BUREŠ 2010). Transpozómy jsou často pod selekčním tlakem, čím dochází ke snížení velikosti genomu. K tomu však také dochází, pokud převažuje podíl delecí nad insercemi (MORGAN 2001). Snížení velikosti genomu je ovšem vzácná věc a jen pár linií rostlin s ní má zkušenost (KNIGHT et al. 2005). Dále může být variabilita způsobena různými chromosomálními odchylkami, mající původ v mitóze či meióze. Tyto odchylky způsobují náhlé a velké změny ve velikosti genomu (ŠMARDA & BUREŠ 2010).

Důležitými procesy ovlivňující velikost genomu jsou chromozomální změny např. aneuploidie, přítomnost B chromosomů a pohlavních chromosomů. Nejvýznamnějším procesem v rámci chromozomálních změn je polyploidie. Při tomto procesu dochází k náhlému zdvojnásobení počtu chromosomů a tedy celé velikosti genomu (BENNETZEN et al. 2005). Wendel (2000) tvrdí, že většina kvetoucích rostlin je polyploidních nebo má polyploidní původ.

I přesto, že víme poměrně dost o procesech způsobující změnu velikosti genomu, stále není uspokojivě vysvětleno, proč dochází ke změnám velikosti a rozrůznění mezi jednotlivými druhy. Tímto nedostatkem se zabývali např. Bennetzen a kol. (2005), kteří se ptali na otázku: „Pokud mají rostliny stejné mechanismy podílející se na variabilitě genomu, proč se jejich velikost genomu liší?“ Nicméně na tuto otázku prozatím nikdo nedokázal spolehlivě odpovědět.

2.2.2 Průtoková cytometrie

Dnes nejvyžívanější a nejdostupnější analytickou metodou ke zjištění obsahu jaderné DNA je průtoková cytometrie (dále FCM). Jedná se o efektivní způsob analyzování optických vlastností (např. fluorescence, světelný rozptyl) jednotlivých částic v suspenzi. Jednotlivé částice se pohybují v úzkém proudu kapaliny přes silný paprsek světla (SHAPIRO 2004). Zaznamenané optické signály mohou být následně použity k odvození vlastností procházejících částic. Tato metoda byla vyvinuta v 50tých letech 20. století pro lékařské účely k rychlému počítání krvinek a analýze buněk obsažených v krvi (SHAPIRO 2007). Díky technickému pokroku a nalezení nových technik fluorescenčního barvení se průtoková cytometrie stala důležitým přístrojem na poli biologie. Cestu k botanice si tato metoda našla během posledních dvaceti let a její využití stále stoupá, stejně jako přibývá vědeckých publikací, ve kterých je metodicky využita (DOLEŽEL 1998). Převážná většina FCM použití v botanice je na základě fluorescenční intenzity barvených jader. K barvení DNA se používá buďto DAPI (4',6-diaminido-2-phenylindole) nebo PI (propidium jodid), které se liší podle vazby na DNA. Barvivo DAPI se v DNA váže pouze na AT báze, zatímco PI na celou DNA. Využití FCM v botanice je široké, viz (Suda 2005). Jedná se především o stanovení ploidního stupně (např. KOUTECKÝ et al. 2012), detekce hybridizace (např. JESCHKE et al. 2003) a vzácných cytotypů (např. KOUTECKÝ et al. 2012), detekce způsobu rozmnožování (např. LEPSÍ et al. 2013) a analýza a třídění chromosomů.

Díky velkému rozvoji FCM a plošnému měření velikosti genomu mohly vzniknout databáze shromažďující údaje o velikosti genomů zkoumaných rostlin. K nejvýznamnějším patří databáze Královské botanické zahrady v Kew (<http://data.kew.org/cvalues/>).

3. Metodika

3.1. Sběr materiálu

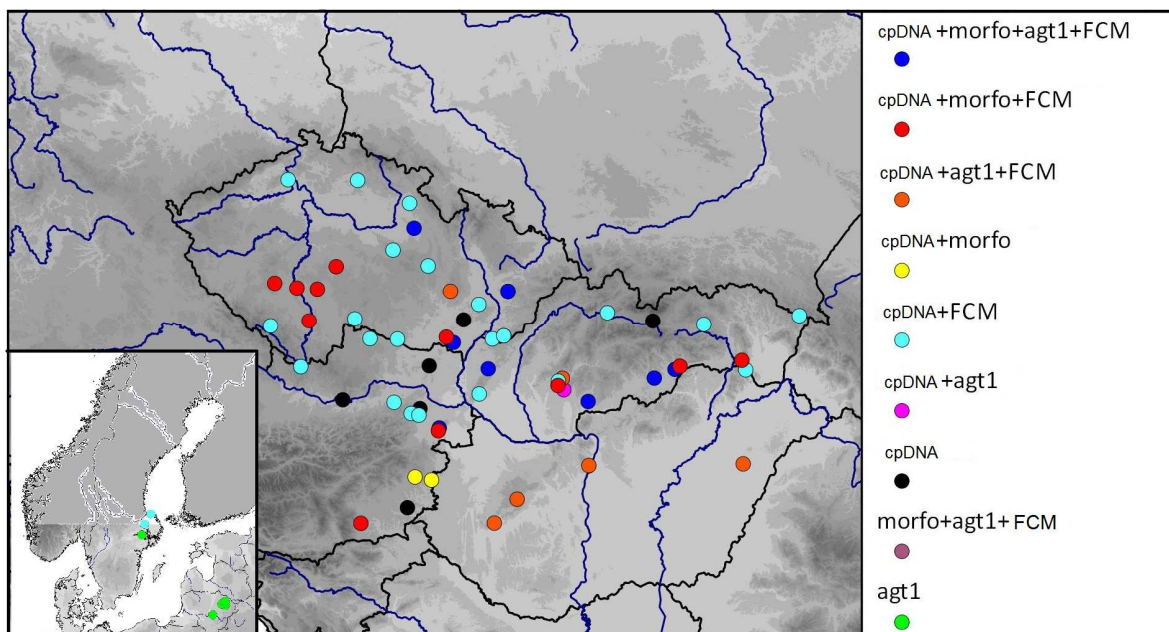
Pro účely jednotlivých analýz (viz níže) byly sesbírány vzorky z celkem 64 lokalit z 6 zemí (Česká republika, Slovenská republika, Rakousko, Litva, Švédsko a Maďarsko, viz Obrázek č. 9; detailní přehled lokalit v příloze 1). Osobně jsem sbíral vzorky ve čtyřech z uvedených zemí.

Pomocí průtokové cytometrie bylo analyzováno 57 populací (Obr. 9). Při sběru rostlin se zohledňovala velikost populace, od které se odvíjel počet vzorků. Pokud byla populace dostatečně velká, bylo sbíráno obvykle 20 rostlin, zatímco u malých populací ca 5 rostlin. Z každé rostliny byly sbírány listy, které byly následně uschovány v lednici.

Rostlinný materiál pro účely molekulárních analýz byl sesbírán celkem na 64 lokalitách (Obr. 9). Počet sebraných rostlin byl 1 – 3. Z každé rostliny bylo odebráno ca 5 listů a uschováno v silikagelu a dlouhodobě skladováno v mrazáku při -20 °C.

Pro morfometrické účely byly sesbírány rostliny celkem z 21 lokalit (Obr. 9) v počtu 5 až 20 rostlin. Počet sesbíraných rostlin byl opět závislý na velikosti a stavu populace.

Z každé studované populace pro jednotlivé metody je alespoň jedna rostlina doložena herbářovou položkou v herbáři PřFJU (CBFS).



Obr. 9: Mapa lokalit analyzovaných populací *M. nemorosum* (FCM = průtoková cytometrie, morfo = morfometrika).

3.2. Molekulární analýzy

3.2.1. Izolace DNA

DNA byla izolována z listenů metodou NaOH. Hydroxid sodný naruší buněčné stěny, DNA se uvolní do roztoku a stává se denaturovanou. Do označené eppendorfky byla vložena tkáň přibližně 0,5 cm² (empiricky vyzkoušeno) a byly přidány 2 wolframové kuličky. Takto připravené vzorky byly drceny na oscilačním mlýnku (Retsch MM400) po dobu 2 min s frekvencí 30 kmitů/sek. Poté bylo do eppendorfky přidáno 20 µl NaOH (c = 0,5 M), vše bylo promícháno a tekutá část vzorku převedena do nové zkumavky. Vzorek byl centrifugován (Hettich Universal 320r) po dobu 2,5 minuty při frekvenci 13800 otáček/min a teplotě 22 °C. Centrifugací došlo k oddělení nežádoucích pevných složek vzorku. V posledním kroku bylo přepipetováno 5 µl supernatantu do nové eppendorfky a k němu bylo přidáno 45 µl pufru Tris – HCl s pH 8,3 (c = 100mM). Takto izolovaná DNA byla uložena do mrazáku (-20 °C) k následnému použití.

3.2.2. PCR, purifikace a příprava sekvenční směsi

Ke zjištění genetické variability druhu *M. nemorosum* byly vybrány úseky: trnT^{UGU}-trnL^{UAA}, psbA-trnH^{GUG}, rpl32-trnL^{UAG} (cpDNA), které se osvědčili při rozlišování jednotlivých skupin *M. nemorosum* agg. v předchozích analýzách. Ke studiu jaderné DNA byl rovněž vybrán úsek použitý v předchozích analýzách – část genu agt1 (Li et al. 2008). V tabulce 1 jsou uvedeny primery použité při amplifikaci výše uvedených úseků.

Po izolaci DNA následovala amplifikace vybraných úseků DNA pomocí PCR (polymerase chain reaction). Chloroplastové úseky i jaderný gen byly osekvenovány u 1 až 3 rostlin z populace.

Příprava PCR směsi:

- 1) Podle počtu vzorků bylo smícháno odpovídající množství PCR vody, primerů a Master Mixu (na jeden vzorek připadá 2,2 µl PCR vody, 1,2 µl forward primeru, 1,2 µl reverse primeru a 5 µl Master Mix Top Bio (50 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva).
- 2) Do označených zkumavek bylo napipetováno 9,6 µl směsi (bod 1) a přidáno 0,4 µl vzorku DNA.

Tab. 1: Přehled použitých primerů

Název primeru	Primerové 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
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	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	Sang et al. 1997
trnH^{GUG}	CGC GCA TGG ATT CAC AAT CC	Tate et Simpson 2003
rpl32F	CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C	Shaw et al. 2007
trnL^{UAG}R	CTG CTT CTT AAG AGC AGC GT	Shaw et al. 2007

Koncentrace všech primerů byla 2,5 pmol/μl. Amplifikace probíhala v termocycleru (BIOER xp thermal gradient). Počet cyklů i reakční podmínky PCR jsou pro jednotlivé úseky DNA uvedeny v Tabulce 2.

Tab. 2: PCR cykly pro jednotlivé úseky

	Agt1F-Agt1R		rpl32-trnL ^{UAG}		trnT ^{UGU} trnL ^{UAA}		psbA-trnH ^{GUG}	
	Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)
Počáteční amplifikace	95	180	95	180	95	300	94	300
Cykly	95	45	95	45	95	60	94	30
	50	40	51	60	62	60	57	30
	72	60	72	60	72	60	72	60
Konečná elongace	72	420	72	600	72	600	72	600
Počet cyklů	46		35		32		35	

Úspěšnost amplifikace byla ověřena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu (1,5 %) v pufru TBE společně s ladderem (100 bp, New England BioLabs). Detekce probíhala pomocí barviva GelRed, kdy se k 3 μl vzorku přidalo 0,8 μl barviva. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V ca 20 minut. Po skončení elektroforézy byl gel se vzorky vyfotografován pod UV zářením pomocí programu Scion VisiCapture. Amplifikovaná DNA byla přečištěna pomocí látky ExoSap (Exonuclease I (20U/μl), Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/ul)). Do zkumavek bylo napipetováno 1,5 μl ExoSapu a do každé přidáno 5 μl amplifikované DNA. Zkumavky byly promíchány a krátce stočeny. Takto připravené vzorky byly vloženy do termocycleru (BIOER xp thermal gradient) a byl zvolen program na purifikaci (viz Tab. 3).

Tab. III: Podmínky purifikace

	Purifikace (ExoSap)	
	Teplota (°C)	Čas (min)
Cyklus 1	37	15
Cyklus 2	85	15

Po purifikaci byla připravena sekvenční směs. Pro všechny analyzované úseky byly použity stejné poměry. Byla připravena směs 5,5 μl PCR vody a primeru, podle analyzovaného úseku. Primeru bylo vždy 2,5 μl za koncentrace 10 pmol/μl. Do řádně

promíchané směsi bylo přidáno 2 µl purifikované DNA. Takto připravená směs byla zaslána do sekvenčního centra v mém případě sekvenačního centra společnosti SEQme s.r.o se sídlem v Dobříši.

Získané sekvence byly manuálně zeditovány buďto v programu BioLign v. 4.0.6.2 (HALL 2000) nebo FinchTV v. 1.4.0 (GEOSPIZA Inc., 2006). 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 v. 7 (KAZUTAKA 2013) za těchto nastavení: algoritmus hledání alignmentu G-INS-i, skórovací matice pro nukleotidové sekvence 1PAM k=2, postih za otevření gapu = 1. Vytvořené alignmenty jednotlivých úseků byly spojeny v programu FaBox (VILLESEN 2007) a následně převedeny do vhodného formátu pro program TCS v. 1.18 (CLEMENT et al. 2000). V programu TCS byla pomocí statistické parsimonie vytvořena haplotypová síť. Na 90 % spojovacím limitu byla vytvořena jednotná síť. Indely byly v této analýze pominuty.

3.3. Průtoková cytometrie

3.3.1. Měření

Vlastní analýzy probíhaly v Laboratoři molekulární biologie rostlin PřF JU v Českých Budějovicích a část starších analýz byla provedena v Botanickém ústavu AV ČR v Průhonicích. Vzorky byly barveny jak interkalačním barvivem PI (propidium jodid) a měřeny na cytometru CyFlow SL (zdroj světla: laser o vlnové délce 532 nm), tak AT selektivním barvivem DAPI (4',6-diaminido-2-phenylindole) na cytometru Partec PAII (zdroj světla: rtuťová výbojka). Cytometry byly nastaveny tak, aby standard byl na kanálu 100 (u některých vzorků, zvláště pražských na kanálu 200) na 1024-kanálové škále. U barvení pomocí DAPI bylo zaznamenáváno 3000 částic a u PI 5000 částic. Jako interní standard sloužila *Bellis perennis* (velikost genomu 2C = 3,60 pg). Měřeným parametrem byla fluorescence částic (jader). Při přípravě vzorku byl použit dvoustupňový postup jaderné izolace a barvení (OTTO 1990), avšak s mírnou úpravou pro rostlinné tkáně (SUDA et al. 2007).

Příprava vzorku:

- 1) Podle počtu vzorků a typu barvení byl připraven barvicí roztok.
- 2) Při barvení AT specifickým barvivem DAPI byl připraven roztok z 25 ml citrát-fosfátového (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 4 μ g/ml. Při barvení interkalačním barvivem 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 50 μ g/ml.
- 3) Do Petriho misky bylo připraveno ca 0,5 cm² tkáň listu vzorku a přibližně 3-5x méně tkáň sedmikrásky, přidáno 400 μ l vychlazeného pufru Otto I (0,1 M kyselina citronová, 0,5 % detergent Tween20). Vše společně nasekáno žiletkou na homogenní směs.
- 4) Směs byla přefiltrována přes filtr 42 μ m (Uhelon 130T), filtrát byl zkontrolován, zda neobsahuje nečistoty a směs byla ponechána 2–3 min stát.
- 5) Po odstání bylo do filtrátu přidáno 800 μ l barvicího roztoku Otto II (podle typu barvení). Obsah přefiltrovaného Otto I a barvicího roztoku Otto II musí být v poměru ca 1:4.
- 6) Vzorek byl poté pro stanovení velikosti genomu vložen do průtokového cytometru.

3.3.2. Analýza dat

Na základě analýz cpDNA byly studované populace rozděleny do 3 skupin a to jižní, severní a JV slovenský. Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu FlowJo 7.6.5 (TREE STAR, Inc. 1997 – 2012). Ze zjištěných průměrných poloh píků vzorku a standardu byl pro každý analyzovaný vzorek vypočten poměr Vzorek / Standard. Analýzy, u kterých přesáhla hodnota CV 4, byly vyloučeny. Z poměrů byl vypočítán průměrný poměr pro jednotlivé skupiny populací. Pro každou skupinu byla také vypočtena variabilita. Další analýzy byly provedeny v programu STATISTICA verze 10 (STATSOFT. Inc. 2011). Rozdíly ve velikosti genomu mezi jednotlivými skupinami byly testovány analýzou variance (ANOVA) a Tukyeho testem. Dále byla spočtena velikost genomu jednotlivých vzorků *M. nemorosum* (poměr fluorescencí vzorek/standard* 2C

obsah DNA standardu; u *Bellis perennis* (3,60 pg) a ta následně zprůměrována pro jednotlivé rozlišované skupiny.

3.3.3. Výpočet AT bází u *M. nemorosum*

Srovnáním výsledků analýz stejných vzorků barvených nespecifickým interkalačním barvivem PI a AT specifickým barvivem DAPI lze odhadnout zastoupení AT bází v analyzovaných vzorcích. Pro výpočet „Dye Fakoru (dále DF)“, který umožňuje další výpočty byl použit vzorec: podíl vzorku (poměr fluorescence standardu barveného DAPI) / podíl vzorku: (poměr fluorescence standardu barveného PI), podle (BAROW and MEISTER 2002: vzorec 6). Tento vzorec pro výpočet DF byl vytvořen pro analýzy s interním standardem hráchem. Proto bylo potřeba modifikovat ho pro použití interního standardu sedmikráska. Modifikace byla provedena výpočtem DF kdy standard byl hrách a vzorek sedmikráska. Výpočet byl proveden podle Barow and Meister (2002: vzorec 7 a 8) v automatizované Excelové tabulce s využitím matematické aproximace metodou *regula falsi*. Vazebná délka pro DAPI byla rovná 4 Barow and Meister (2002). Tabulka je v online verzi <http://www.sci.muni.cz/botany/systemgr/Data/Festuca/ATGCFlow.xls>. Tato tabulka byla také použita pro výpočet zastoupení AT bází u jednotlivých populací *M. nemorosum*. Vypočtený DF pro sedmikrásku a vazebná délka DAPI následně sloužili jako konstanty.

3.4. Morfometrické analýzy

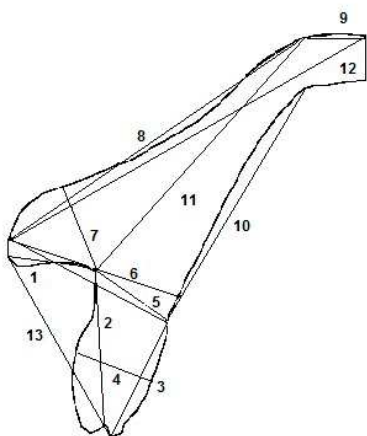
Z každé rostliny *M. nemorosum* sebrané pro morfometrickou analýzu byl odebrán květ, kalich, 1. a 5. listen. Odebrané části jsem poté nalepil pomocí průhledné lepicí pásky do sešitu (Obr. 10). U nalepených vzorků bylo měřeno 24 znaků (Obr. 11–13; Tab. 4-6). Tyto znaky jsou považovány za taxonomicky významné pro studovaný rod. Listy s nalepenými vzorky byly naskenovány v rozlišení 600 dpi a následně měřeny v programu tpsDig, verze 2.16 (ROHLF 2010). Pro kalibraci měření bylo použito pravítko.



Obr. 10: Způsob nalepení zkoumaných částí rostlin (zleva koruna, 5. listen, 1. listen a kalich)

Tab. 4: Měřené morfologické znaky na koruně

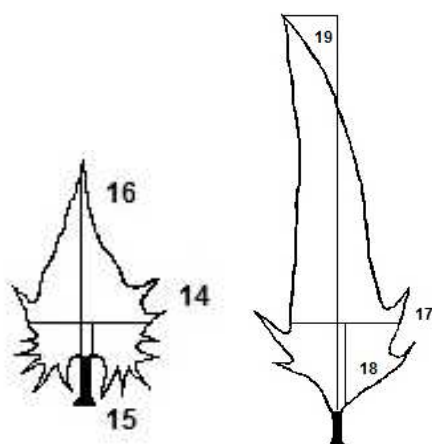
Číslo znaku	Zkratka znaku	Popis znaku
1	DHP	Délka horního pysku
2	DDP	Délka dolního pysku
3	DSDP	Délka spodní strany dolního pysku
4	VDP	Výška dolního pysku
5	SDP	Šířka dolního pysku
6	VC	Výška koruny
7	VHP	Výška horního pysku
8	DCB	Délka koruny bez báze
9	DBCT	Délka báze korunní trubky
10	DLCT	Délka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



Obr. 11: Zobrazení měřených morfologických znaků na koruně

Tab. 5: Měřené morfologické znaky na 1. a 5. listenu

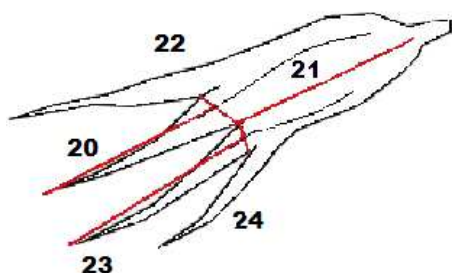
Číslo znaku	Zkratka znaku	Popis znaku
14	SL5	Šířka 5. listenu v nejširším místě
15	V5	Vzdálenost nejširšího místa od báze listenu
16	DL5	Délka 5. listenu
17	SL1	Šířka 1. listenu v nejširším místě
18	V1	Vzdálenost nejširšího místa od báze listenu
19	DL1	Délka 1. listenu



Obr. 12: Zobrazení měřených morfologických znaků na 1. a 5. listenu

Tab. 6: Měřené morfologické znaky na kalichu

Číslo znaku	Zkratka znaku	Popis znaku
20	DHCK	Délka horního cípu kalicha
21	KT	Délka kališní trubky
22	SHCK	Šířka horního cípu kalicha
23	DDKC	Délka dolního kališního cípu
24	SDKC	Šířka dolního kališního cípu



Obr. 13: Zobrazení měřených morfologických znaků na kalichu

3.4.1. Statistické zpracování dat

Získaná data byla analyzována v několika programech. Základní statistické analýzy byly provedeny pomocí programu STATISTICA (STATSOFT 2011), zatímco mnohorozměrné analýzy v programech R 2.15.3 (R CORE TEAM 2013) a Canoco for Windows vs. 5.00 (BRAAK & ŠMILAUER 2012). Na základě analýz cpDNA byly opět populace apriory klasifikovány do tří skupin.

Prvním krokem bylo pročištění dat vyloučením vzorků s nekompletními daty. U měřených znaků byla vypočtena korelační matice, z důvodu odhalení korelace mezi jednotlivými znaky. Ze znaků, které byly korelované více než ($r \geq 0,9$) byl vždy jeden zde dvojice vyloučen. Dále byly vypočteny populační průměry jednotlivých znaků, které byly použity pro shlukovou analýzu. Pro účely diskriminační analýzy bylo nutné ověřit normalitu rozložení (MARHOLD & SUDA 2002). Rozdělení všech měřených znaků se blížilo normálnímu rozdělení, tudíž nebylo nutné hodnoty transformovat. Na základě euklidovských vzdáleností populačních průměrů byla provedena v programu RStudio 0.97.336 (R CORE TEAM, 2013) shluková analýza, pomocí které byly zjištěny vztahy mezi jednotlivými populacemi. Použitým shlukovacím algoritmem byla Wardova metoda, která optimalizuje homogenitu shluků podle určitého kritéria, kterým je minimalizace zvyšování chyby sumy čtverců odchylek bodů shluku od jeho průměru (centroidu)-(MARHOLD & SUDA 2001). Pro tuto metodu musela být veškerá data standardizována. K zjištění euklidovských vzdáleností byla použita funkce `dist` z balíku `stats` a k vytvoření shlukovací analýzy funkce `hclust`, opět z balíku `stats`. Dále byla provedena v programu R 2.15.3 (R CORE TEAM 2013) klasifikační diskriminační analýza (CDA). Tato metoda testuje jakým způsobem klasifikovat objekty a následně je identifikuje (MARHOLD et SUDA, 2001). Jako klasifikační znak byl použit kód skupiny. Crossvalidace byla počítána funkcí LDA z balíku MASS.

V programu CANOCO 5.0 (BRAAK & ŠMILAUER 2012) byla provedena analýza hlavních komponent (PCA, *principal component analysis*) k zjištění základního rozdělení populací i jednotlivých vzorků. Analýza hlavních komponent je ordinační metoda umožňující redukovat počet dimenzí v euklidovském znakovém prostoru tak, aby došlo k minimální ztrátě informace (MARHOLD & SUDA 2001). Pro zjištění, které znaky nejspolehlivěji oddělují jednotlivé typy *M. nemorosum*, byla provedena lineární diskriminační analýza (LDA) pomocí `forward selection`. Tato metoda rozděluje objekty

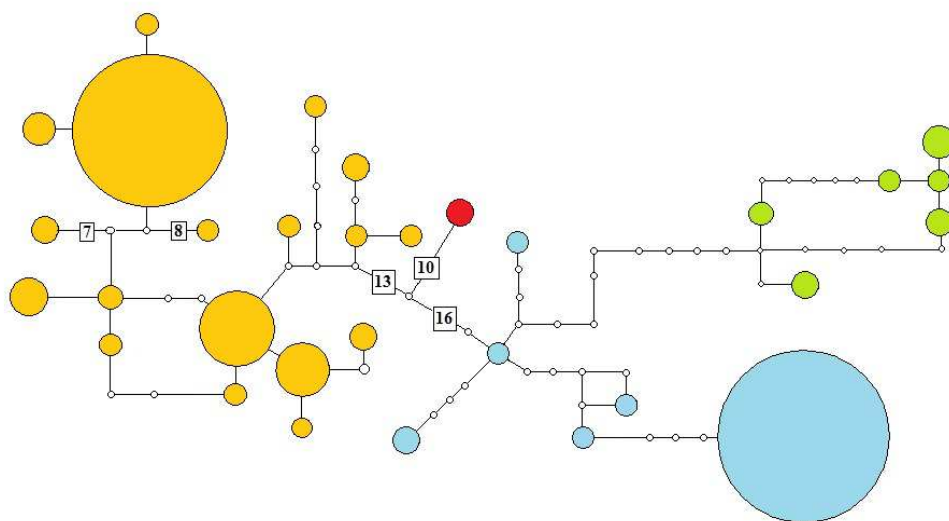
na základě určitých vlastností či znaků a určuje, které znaky nejvíce odlišují dané skupiny (MARHOLD et SUDA, 2001).

4. Výsledky

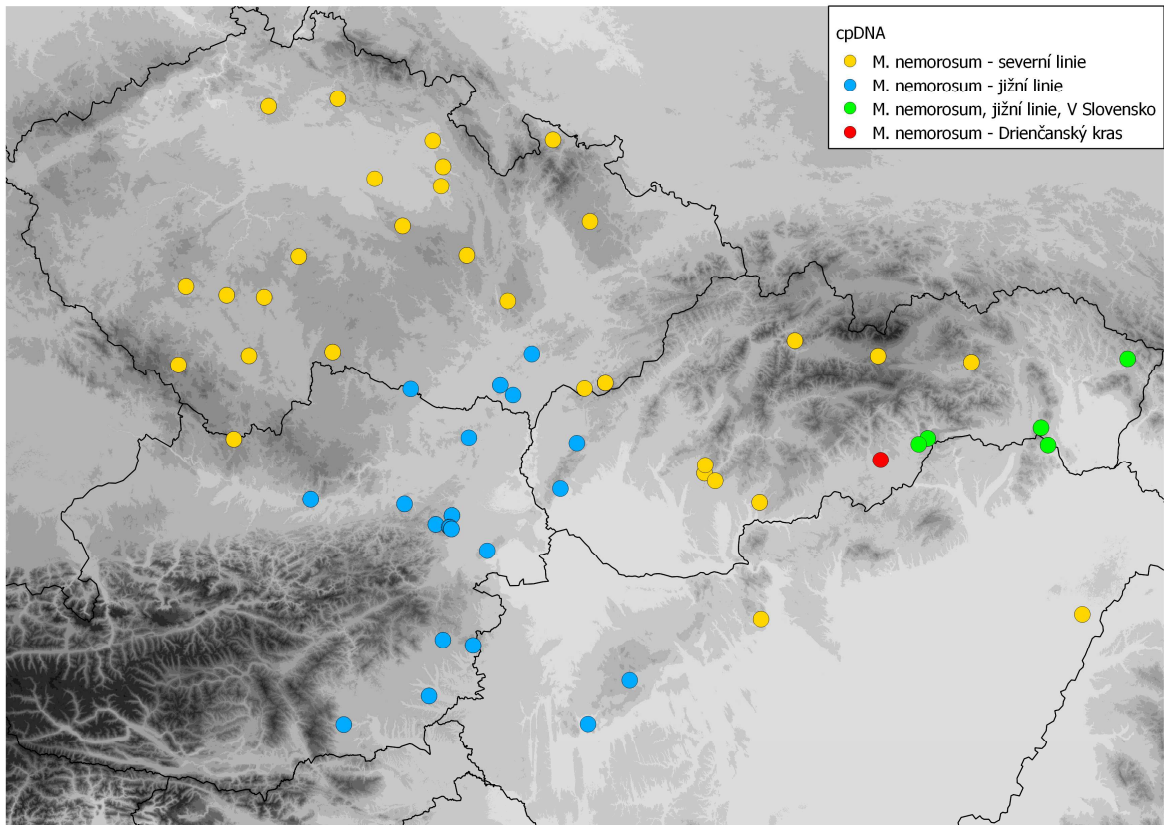
4.1. Molekulární analýzy

Do molekulárních analýz bylo zahrnuto celkově 54 populací a celkově 83 rostlin *M. nemorosum*. Spojením všech tří chloroplastových úseků vznikl celkový alignment o délce 2700 bp. V celém alignmentu bylo zjištěno 700 variabilních míst se substitucemi nebo různě dlouhými indely a jedna inverze.

Program TCS našel 33 haplotypů, které při 90% spojovacím limitu, spojil do jedné haplotypové sítě (Obr. 14). Většina populací byla rozdělena na dvě základní skupiny haplotypů. Skupina severních haplotypů (na Obr. 14 oranžově) je poměrně variabilní, ale až na výjimky si jednotlivé haplotypy nejsou příliš vzdálené. Naopak ve skupině haplotypů rozšířených v jižní části studovaného území jsou patrné dvě podskupiny. Jedna s haplotypy vyskytujícími se v populacích východního Slovenska (zelená) a druhá s haplotypy populací východního Rakouska, jižní Moravy a JZ Slovenska (modrá). Zcela izolovaně vzdálen od obou základních skupin stojí haplotyp nalezený u dvou rostlin z Drienčanského krasu (červená). Geografické rozšíření všech skupin je patrné z Obrázku 15.



Obr. 14: Haplotypová síť zkoumaných úseků cpDNA (trnT^{UGU} - trnL^{UAA} , psbA - trnH^{GUG} , rpl32 - trnL^{UAG}).



Obr. 15: Rozšíření jednotlivých skupin *M. nemorosum* podle cpDNA.

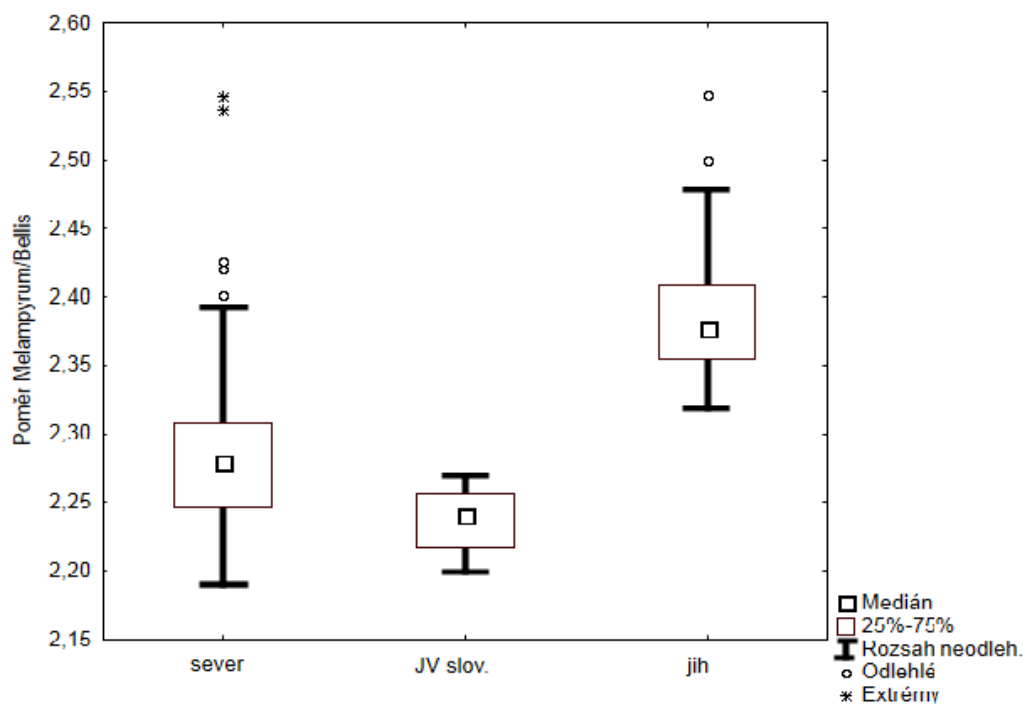
4.2. Cytometrická analýza

Na základě molekulárních analýz byly populace rozděleny do 3 typů (severní, jižní a JV slovenský). U studovaných populací byla pomocí poměru fluorescence vzorku a standardu určena velikost genomu a následně vypočtena mezipopulační variabilita. Největší mezipopulační variabilita byla zjištěna u severního typu, u kterého dosáhla 15,5 % u analýz barvených DAPI a 12,5 % u analýz barvených PI. V tabulce 7 jsou uvedena základní statistická data na úrovni rozlišovaných skupin. Vypočtené poměry mezi vzorkem a standardem jsou pro jednotlivé typy vyneseny do grafů (Obr. 16 a 17).

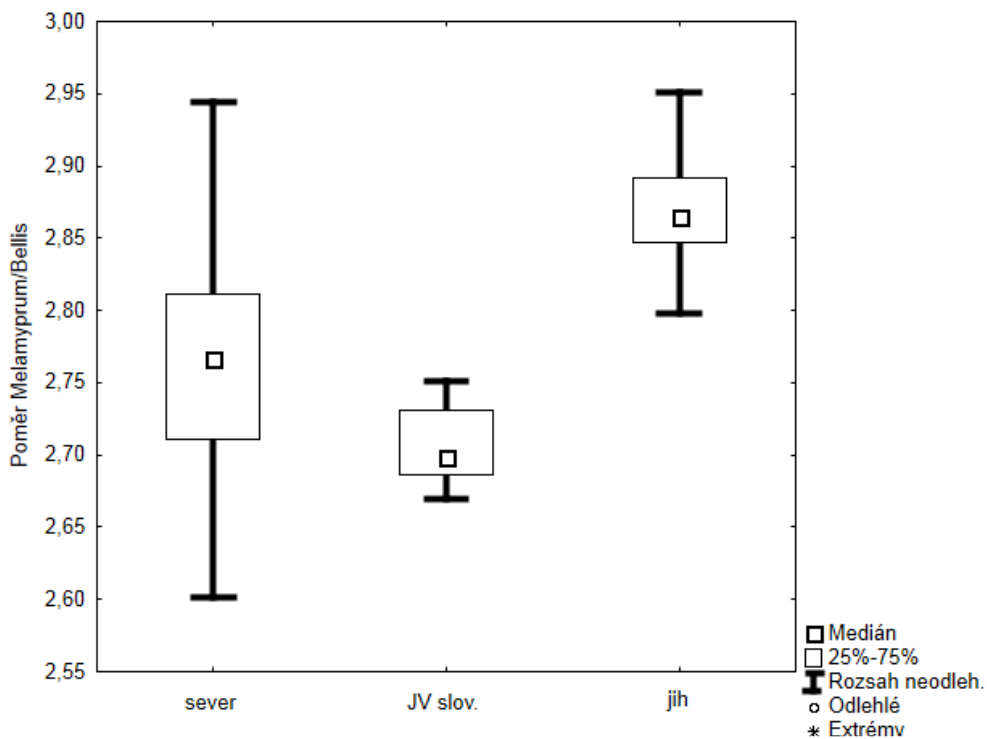
Tab. 7: Výsledky analýz velikosti genomu u jednotlivých molekulárně vymezených skupin *M. nemorosum*. Barveno DAPI a PI.

Typ	Severní		Jižní		JV slovenský	
	DAPI	PI	DAPI	PI	DAPI	PI
Počet měření	134	112	55	26	16	18
Poměr min	2,191	2,601	2,319	2,798	2,199	2,670
Poměr max	2,546	2,945	2,548	2,951	2,270	2,751
Poměr průměr	2,285	2,760	2,387	2,867	2,237	2,707
Variabilita (%)	15,536	12,463	9,594	5,337	3,174	2,992

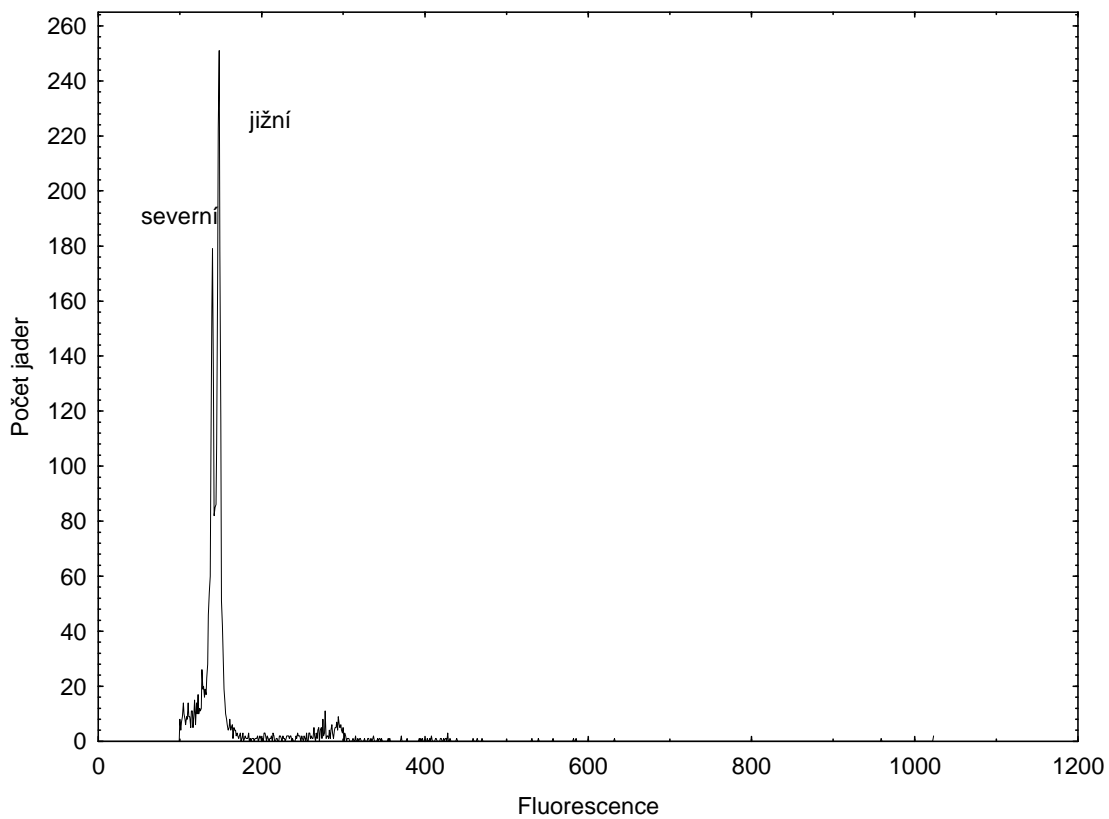
Ze všech analyzovaných vzorků pomocí barviva PI byl spočten relativní obsah DNA. Největší obsah DNA má skupina jižní 2C = 10,375 pg, zatímco skupina severní 9,918 pg a skupina JV slovenská 9,745 pg.



Obr. 16: Velikost genomu vyjádřená poměrem fluorescence vzorku a standardu *Bellis*, barvení DAPI vázající se na skupiny AT párů.



Obr. 17: Velikost genomu vyjádřená poměrem fluorescence vzorku a standardu *Bellis*, barvení interkalačním barvivem PI vázající se všechny báze.



Obr. 18: Společná analýza vzorků severní a jižní skupiny (populace Nitra a Buková), barvení DAPI.

Jak je patrné z obr. 16 a 17 populace s jižními haplotypy mají zřetelně největší genom, zatímco populace z východního Slovenska mají genom nejmenší.

ANOVA prokázala, že velikost genomu vyjádřená poměrem fluorescence k *Bellis* se v rámci studovaných skupin statisticky průkazně liší pro DAPI (DF= 2, F= 22,687 p<0,00001) i pro PI (DF = 2, F= 9,123 p<0,00203). Z mnohonásobného porovnání Tukeyho HSD testem vyplývá, že se jižní skupina odlišuje od obou zbylých, které se však vzájemně již průkazně neliší (viz Tab. 8).

Tab. 8: Výsledky 95 % Tukeyho HSD testu

DAPI				PI		
Typ	Počet	Průměr	Homogenní skupiny	Počet	Průměr	Homogenní skupiny
JV slovenská	3	2,2277	A	2	2,7075	A
severní	35	2,2817	B	14	2,7606	B
jižní	12	2,3813	A	4	2,8718	A

Rozdíl ve velikosti genomu na úrovni ca 6% mezi populacemi severní a jižní linie *Melampyrum nemorosum* ukazuje i výstup ze společné analýzy 2 rostlin z těchto skupin (obr. 18)

4.2.1. Výpočet AT bází

Do této analýzy bylo zahrnuto celkově 12 populací (Tab. 9), u kterých bylo provedeno měření jak s DAPI, tak i s PI. Výsledky obou měření jsou nutná k výpočtu.

Na základě srovnání níže uvedených čísel pro *Pisum* a *Bellis* byl vypočítán obsah bází u *Bellis*, a ten poté použit pro výpočet obsahu bází u *Melampyrum nemorosum*.

$$Pisum/Bellis - 2,524 \rightarrow 1/2,524 = 0,39619651 \text{ (PI)}$$

$$Pisum/Bellis - 2,344 \rightarrow 1/2,344 = 0,42662116 \text{ (DAPI)}$$

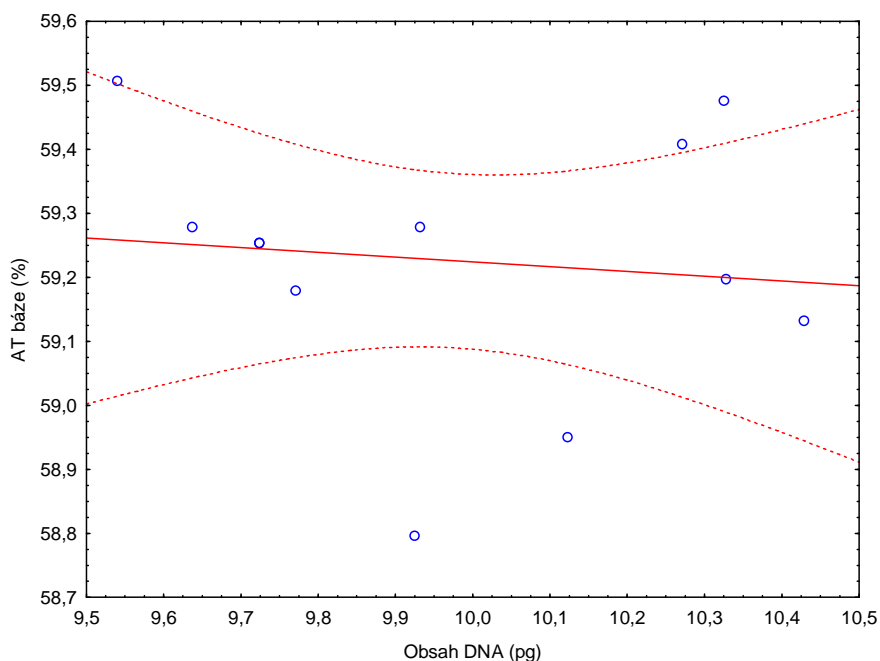
\rightarrow **DF** = 0,39619651 / 0,42662116 = **1,07679182**. Dosazením tohoto faktoru do výpočetní tabulky jsem obdržel Base kontent of *Bellis* AT, což je **0,630062**. Naměřené

fluorescence jednotlivých vzorků byly dosazeny do automatizované Excelové tabulky, tímto byly vypočteny DF pro jednotlivé populace (Tab. 9), a následně zastoupení % AT bází.

Tab. 9: Přehled analyzovaných lokalit a potřebných dat pro výpočet obsahu AT bází

Kód lokality	Fluorescence Dapi	Fluorescence PI	DF	AT Báze (%)	2C obsah jaderné DNA (pg)
DEBRN	2,223	2,650	0,8388	59,5052	9,540
HLUBN	2,287	2,759	0,8289	59,2781	9,932
KAPRN	2,291	2,812	0,8147	58,9498	10,123
MAYEN	2,368	2,869	0,8253	59,1952	10,328
BUKN	2,381	2,853	0,8345	59,4068	10,271
GOMN	2,236	2,701	0,8278	59,2528	9,724
NITRN	2,219	2,677	0,8289	59,2781	9,637
PAVLN	2,402	2,868	0,8375	59,4755	10,325
DROZDN	2,236	2,701	0,8278	59,2528	9,724
SLANN	2,238	2,174	1,0294	63,6096	7,826
OSTFN	2,228	2,757	0,8081	58,7960	9,925
ROTKN	2,383	2,897	0,8225	59,1305	10,429

Vztah obsahu DNA a procenta AT bází jednotlivých populací *M. nemorosum* je patrný z obrázku 19. Výsledky byly statisticky zhodnoceny jednoduchou lineární regresí. Vztah těchto parametrů je zcela neprůkazný ($p < 0,7266$).



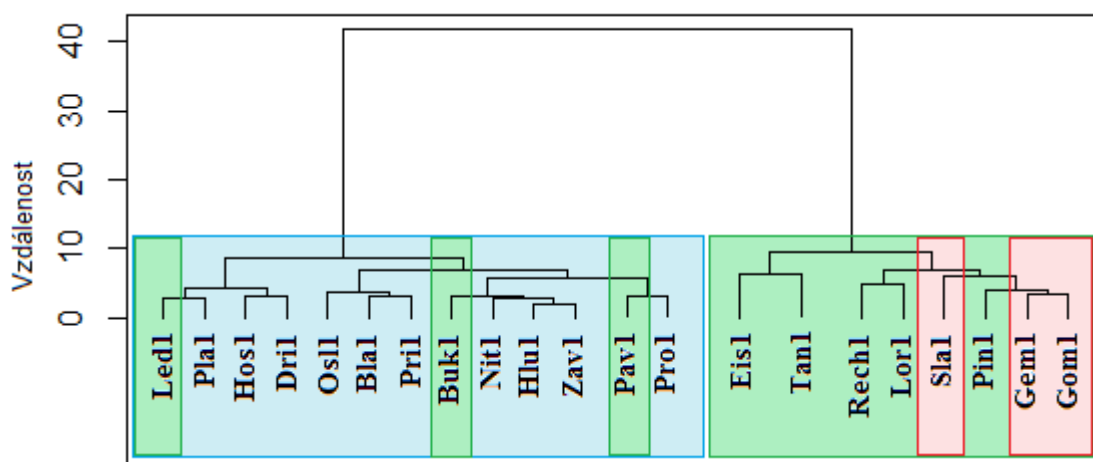
Obr. 19: Závislost velikosti genomu na obsahu AT bází. Regresní rovnice ($y = 59,9713 - 0,0747 * x$), ($R^2 = 0,0128$, $p < 0,7266$, $F_{(1,11)} = 0,12937$).

4.3. Morfometrické analýzy

Mezi měřenými znaky byla vypočtena korelační matice znaků. Na květu to byla délka koruny bez báze (DCB), která byla korelována s délkou korunní trubky bez báze (DCTB; $r = 0,920$) a také s délkou koruny (DC; $r = 0,925$). Ze zkoumaných znaků na kalichu byla vyloučena délka horního cípu kalicha (DHCK), která byla korelována s délkou dolního kališního cípu (DDKC; $r = 0,925$). Do následujících analýz bylo tudíž zahrnuto 22 znaků z 24. Korelační matice znaků je uvedena v Příloze 2. Data nebyla transformována, jelikož se jejich rozdělení neodlišovalo výrazně od normálního, byla pouze standardizována.

4.3.1. Shluková analýza

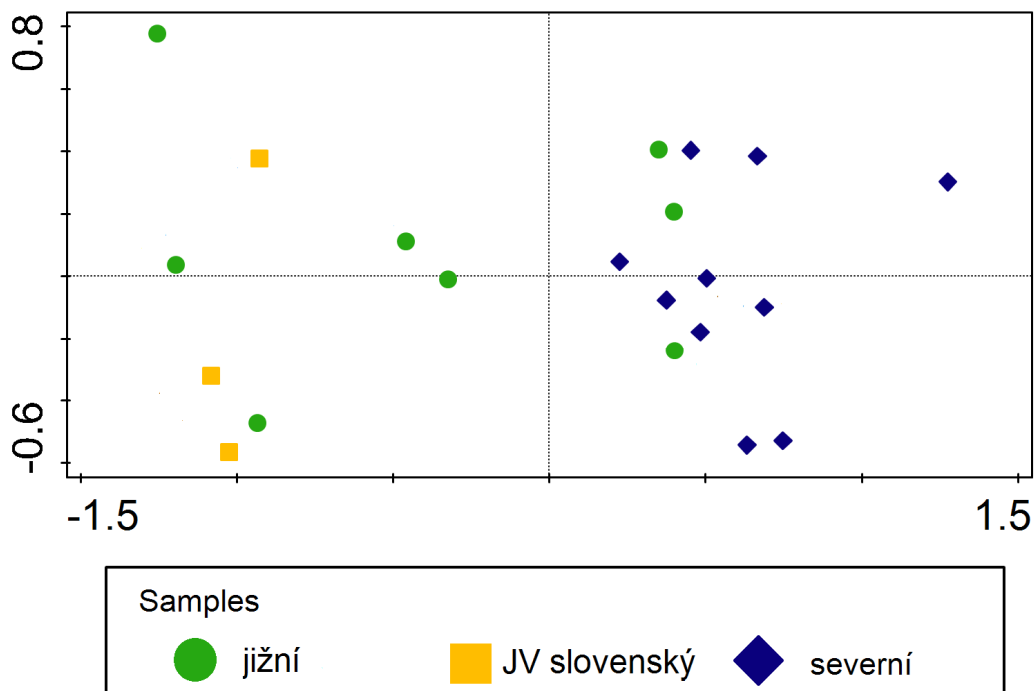
Shluková analýza Wardovou metodou rozdělila studované populace do dvou skupin. Toto rozdělení je nápadně korelováno se skupinami vymezenými na základě molekulárních analýz. Do jedné skupiny jsou spojeny všechny populace z východního Slovenska s větší částí dalších populací jižního typu. V druhé skupině jsou sdruženy všechny populace severní a pouze 3 populace jižního typu. Jedná se o populace z Pavlova, Bukové a Lednice.



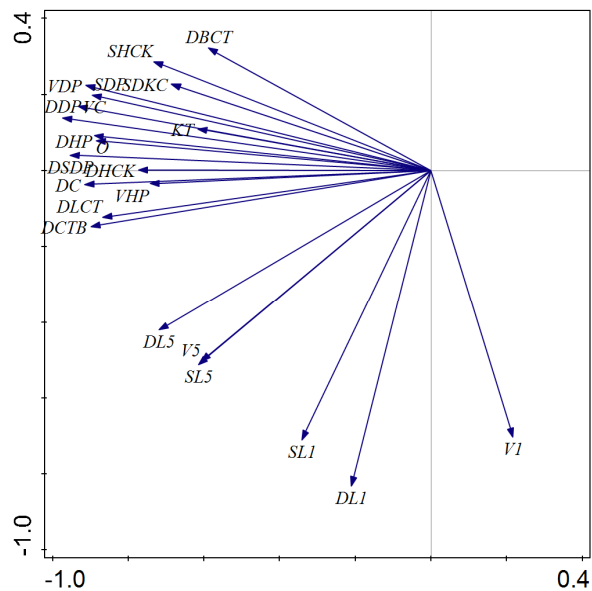
Obr. 20: Shluková analýza populací (Wardova metoda, Euklidovská vzdálenost) s vyznačenými molekulárně vymezenými skupinami. Modrá – severní typ, zelená – jižní typ, červená JV slovenský typ.

4.3.2. Analýza hlavních komponent

Rozmístění analyzovaných populací v ordinačním prostoru (Obr. 21) ukazuje podobnou strukturu jako shluková analýza. V levé části obr. 21 se nacházejí populace z východního Slovenska a větší část populací jižních. V pravé části ordinačního diagramu jsou všechny populace se severními haplotypy cpDNA a 3 populace s jižními haplotypy. Opět se jedná o populace z Pavlova, Bukové a Lednice. Na Obrázku 22 lze vidět, rozmístění jednotlivých znaků v ordinačním prostoru.

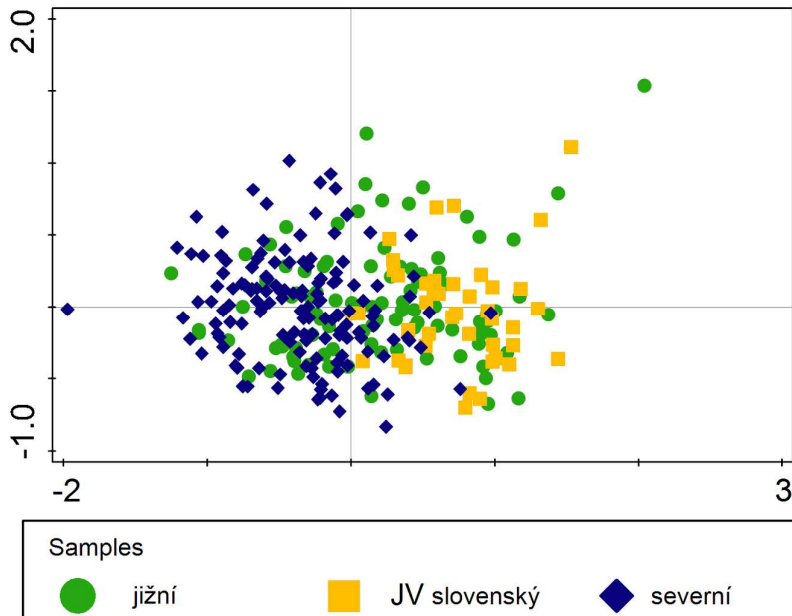


Obr. 21: Rozmístění jednotlivých populací na základě analýzy populačních průměrů znaků v PCA prostoru. První ordinační osa vysvětluje 57,6 % a druhá 12,83 % variability. První dvě osy vysvětlují 70,43 % variability.

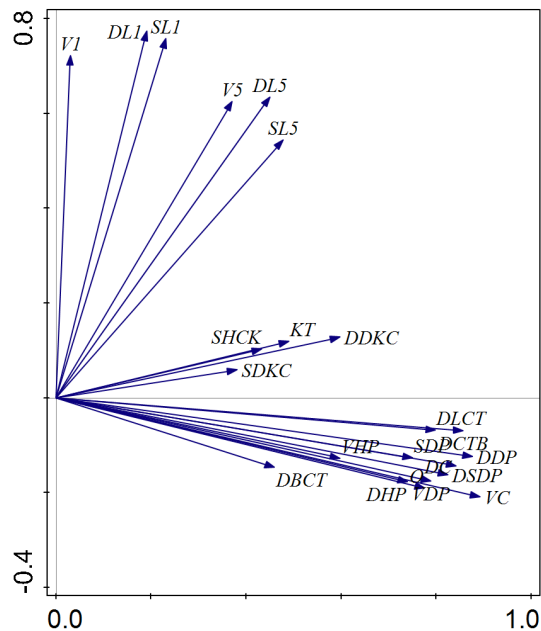


Obr. 22: Rozmístění 22 zkoumaných znaků v PCA prostoru. První ordinační osa vysvětluje 57,6 % a druhá 12,83 % variability. První dvě osy vysvětlují 70,43 % variability.

V dalším kroku byla provedena analýza PCA u všech 322 zkoumaných rostlin (Obr. 23-24). Ze souboru dat byly vyřazeny rostliny s neúplnými daty (vzorky Pla6, Pla14, Gem7 Hofst).



Obr. 23: Rozmístění jednotlivých rostlin na základě 22 znaků v PCA prostoru. První ordinační osa vysvětluje 40,10 % a druhá 14,06 % variability. První dvě osy vysvětlují 54,17 % variability.

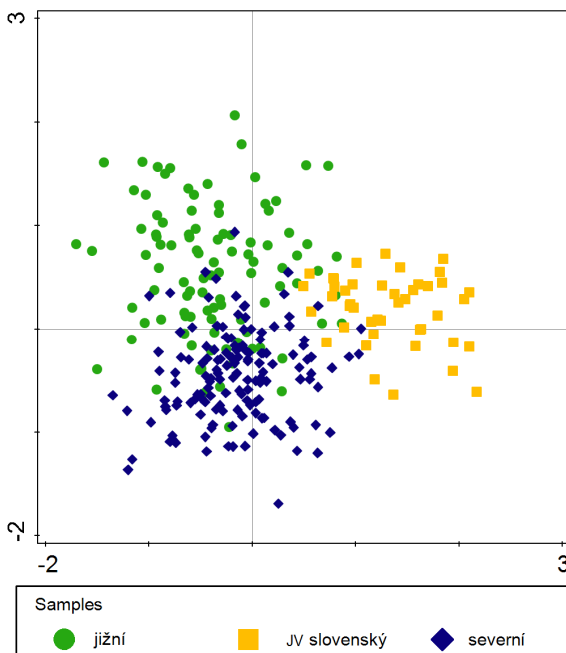


Obr. 24: Rozmístění jednotlivých znaků v PCA prostoru. První ordinační osa vysvětluje 40,10 % a druhá 14,06 % variability. První dvě osy vysvětlují 54,17 % variability.

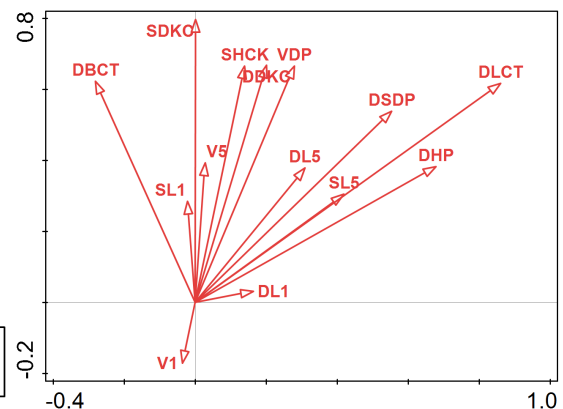
Na rozmístění jednotlivých rostlin v ordinačním prostoru je patrné, že všechny rostliny tvoří spíše kontinuum. Přesto je patrné, že rostliny se severními haplotypy jsou soustředěny v jedné části ordinačního diagramu, zatímco rostliny z východoslovenských populací jsou v druhé části. Rostliny z populací s jižními haplotypy jsou pak zastoupeny v obou polovinách ordinačního diagramu (Obr. 23).

4.3.3 Kanonická diskriminační analýza

Podstatně lépe než ordinační analýza odlišuje rostliny náležící do jednotlivých molekulárně vymezených skupin kanonická diskriminační analýza. Výsledek analýzy je zobrazen na obrázku 24. Na obr. 25 je patrné rozložení nejvýznamnějších znaků, které oddělují jednotlivé skupiny a v Tab. 10 jsou uvedeny koeficienty diskriminační funkce pro nejvýznamnější znaky. Podél první kanonické osy jsou především rozděleny populace východoslovenské od ostatních. Druhá osa pak částečně odděluje rostliny severního a jižního typu. Pro odlišení východoslovenských rostlin jsou významné především znaky délka horního pysku (DHP), délka spodní linie korunní trubky (DLCT) a délka spodního kališního cípu (DSDP). Severní populace mají užší horní kališní cípy (SHCK). Dalším znakem přispívající k oddělení severních populací je výška dolního pysku (VDP).

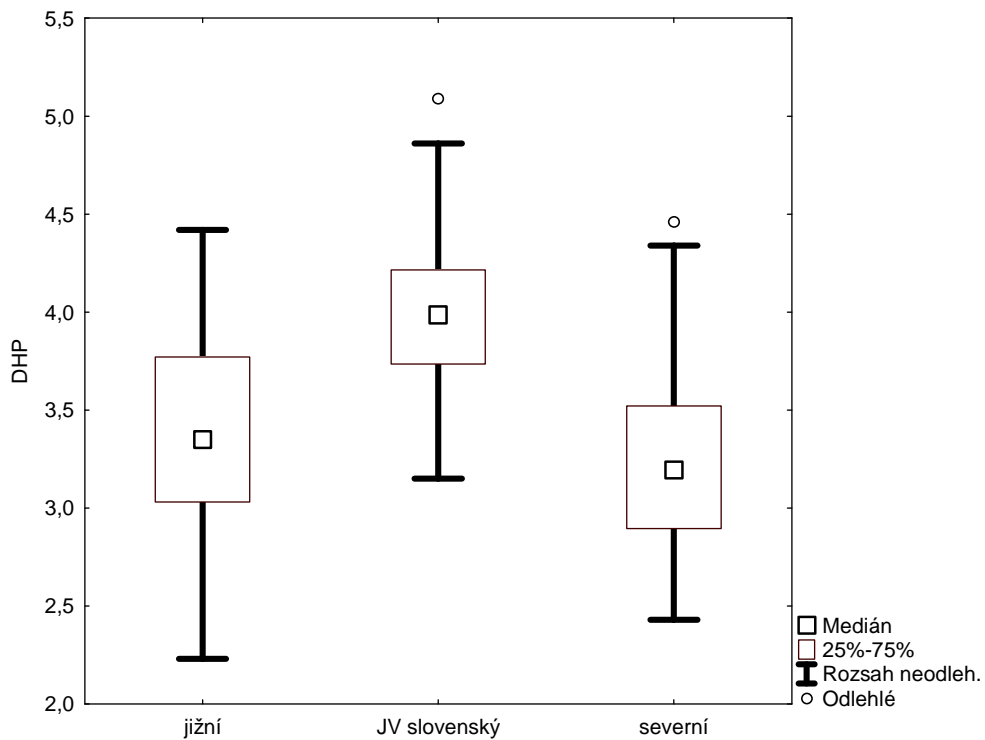


Obr. 24: Kanonická diskriminační analýza jednotlivých typů *M. nemorosum*

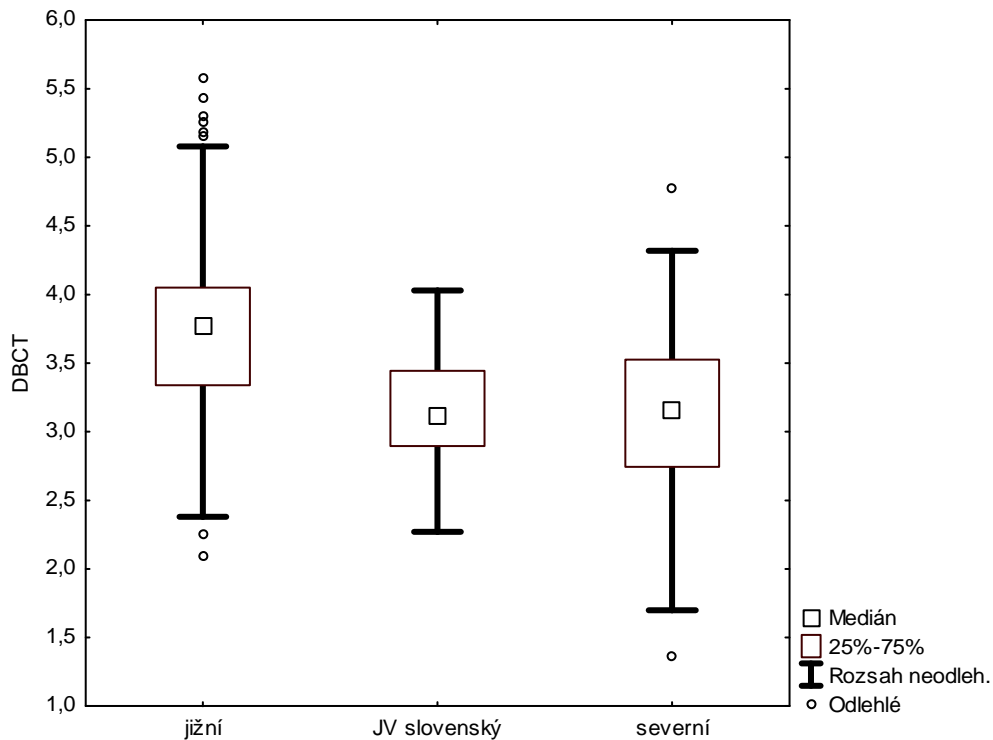


Obr. 25: Rozložení nejvýznamnějších znaků rozdělující jednotlivé skupiny

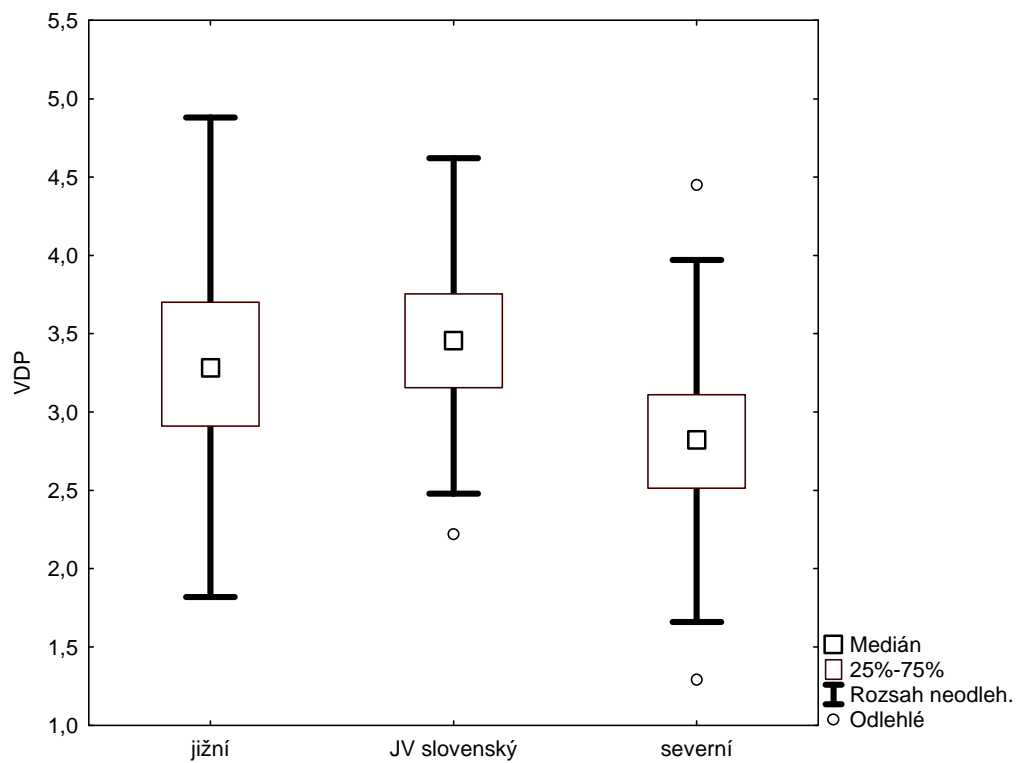
Na obrázcích 26-29 jsou zobrazeny Box & Whiskers plots znaků mající největší skóre pro kořen 1 a 2 v diskriminační funkci (viz Tab. 10).



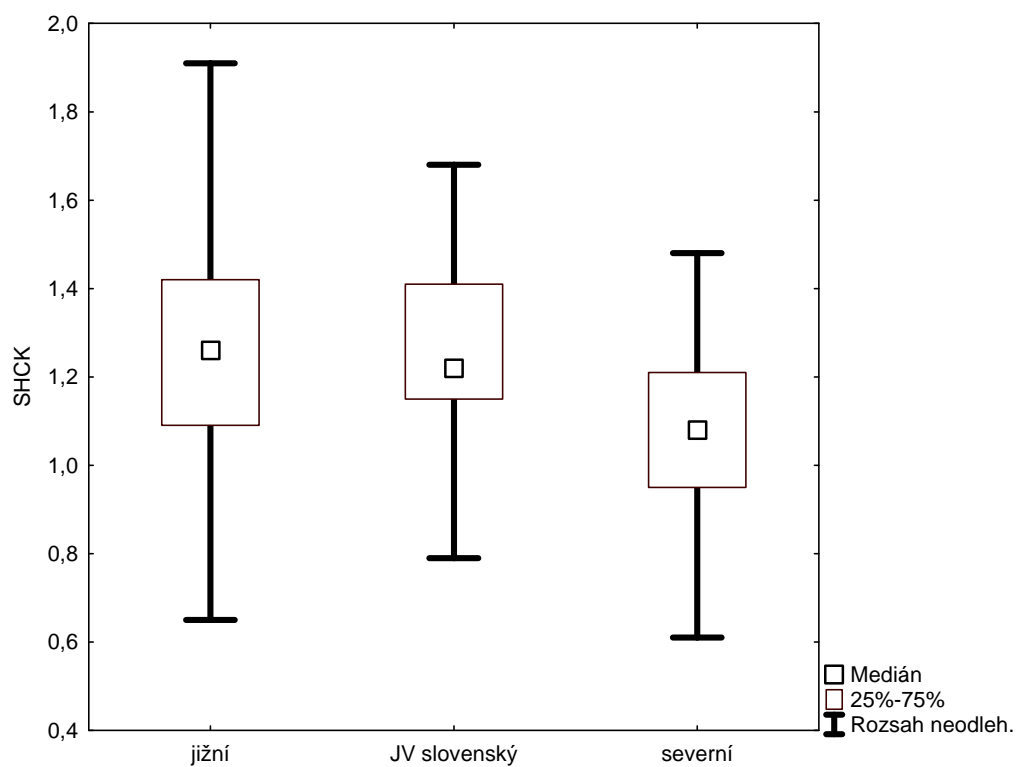
Obr. 26: Box & Whiskers plot délky horního pysku (DHP) v závislosti na typu.



Obr. 27: Box & Whiskers plot délky báze korunní trubky (DBCT) v závislosti na typu.



Obr. 28: Box & Whiskers plot výšky dolního pysku (VDP) v závislosti na typu.



Obr. 29: Box & Whiskers plot šířky horního kališního cípu (SHCK) v závislosti na typu.

Tab. 10: Koeficienty diskriminační funkce nejvýznamnějších znaků

Znak	Kořen 1	Kořen 2
DHP	0,643855	-0,0871922
DSDP	0,506222	-0,0002794
VDP	-0,549981	0,262568
DBCT	-1,02451	0,434265
DLCT	0,538029	0,153712
SL5	0,251291	-0,290776
V5	-0,319592	0,162951
DL5	-0,0032454	0,145935
SL1	-0,116086	0,148708
V1	-0,0950294	-0,11756
DL1	0,0692367	-0,0363118
SHCK	0,464322	1,09277
DDKC	-0,317704	0,193105

4.3.4 Klasifikační diskriminační analýza

Tato metoda byla použita k sestavení klasifikační funkce pro jednotlivé typy. Takto získané funkce následně sloužili ke zpětné klasifikaci (*posterior probabilities*) jednotlivých populací a rozlišovaných typů. Byla provedena crossvalidace, při níž byl použit jako klasifikační znak kód skupiny. Procento úspěšně klasifikovaných populací je vidět v Tabulce 11, v Tabulce 12 je uvedena klasifikace rozlišovaných typů.

Tab. 11: Procento úspěšně klasifikovaných populací do jednotlivých typů (neúspěšná klasifikace < 60 % je zvýrazněna)

Populace	Očekávaný typ	Klasifikovaný typ			N	Procento úspěšnosti
		jižní	JV slov.	severní		
Blaník	Severní	3	2	10	15	66,66
Buková	jižní	2	0	13	15	13,333
Drienč. k.	Severní	0	3	12	15	80
Eisenstadt	jižní	5	0	0	5	100
Gemer	JV slov.	2	11	1	14	78,57
Gombasek	JV slov.	2	12	1	15	80
Hluboká	Severní	1	0	14	15	93,33
Hostýn	Severní	1	0	14	15	93,33
Lednice	jižní	8	1	6	15	53,33
Loretto	jižní	2	1	2	5	40
Nitra	Severní	2	4	9	15	60
Oslov	Severní	0	0	11	11	100
Pavlov	jižní	6	0	9	15	40

Pinkafeld	jižní	4	10	3	17	23,53
Plaš'ovce	Severní	5	1	7	13	53,85
Příběnice	Severní	3	0	12	15	80
Prochody	Severní	7	1	7	15	46,66
Rechnitz	jižní	16	1	0	17	94,12
Slanec	JV slov.	1	13	1	15	86,66
Tanzensdorf	jižní	9	1	0	10	90
Závišín	Severní	3	0	12	15	80

Tab. 12: Klasifikace jednotlivých typů

Typ	jižní	JV slov.	severní	N	Procento úspěšnosti
jižní	52	14	33	99	52,5
JV slov.	5	36	3	44	81,8
severní	25	11	108	144	75
Celkově	82	61	144	287	68,3

Klasifikační diskriminační analýzou bylo určeno procento správně přiřazených rostlin v jednotlivých populacích. Nejlépe byly klasifikovány populace Eisenstadt a Oslov, ve kterých byly všechny rostliny přiřazeny správně. Úspěšnost přiřazení ve většině ostatních populací se pohybovala mezi 60–90 %. Úspěšnost u 7 analyzovaných populací bylo výrazně nižší. Nápadně chybně byly přiřazeny rostliny v populacích Buková (13,333 %), která byla klasifikována jako populace severního typu namísto jižního a populace z Pinkafeldu (11,765 %), která byla překlasifikována z populace jižního typu na typ jihovýchodního Slovenska. Průměrné procento úspěšné determinace jedinců podle typu dosáhlo 68,3 % (viz Tab. 12).

5. Diskuze

Zjištěná variabilita ve zkoumaných úsecích chloroplastové DNA víceméně odpovídá předchozím analýzám a potvrzuje zřetelnou diferenciaci a geografickou vikarianci dvou skupin haplotypů. Tento jev má s velkou pravděpodobností historické důvody a zřejmě se jedná o poměrně staré původně izolované linie, které se lokálně mohly dostat do sekundárního kontaktu. V této souvislosti je třeba upozornit na koncentraci výskytu jižních haplotypů v regionech považovaných za významná glaciální refugia, jako je např. Slovenský kras (JANKOVSKÁ et POKORNÝ 2008) nebo východní úpatí Alp (TRIBSCH & SCHÖNSWETTER 2003). Poměrně zřetelné oddělení JV slovenských a ostatních jižních haplotypů může mít rovněž historické důvody, jak naznačuje skutečnost, že oblasti výskytu obou těchto skupin jsou od sebe pravděpodobně odděleny územím s výskytem populací se severním haplotypem v okolí Budapešti. Překvapením je objev dalšího izolovaného haplotypu v Drienčanském krase. Za zmínku stojí, že tento haplotyp je velmi podobný haplotypům *M. sylvaticum* (Štech, nepublikovaná data) a vzhledem k pravděpodobné sesterské pozici *M. sylvaticum* k celé skupině *M. nemorosum* se může jednat o ancestrální polymorfismus. Další výzkum je třeba zaměřit mimo jiné na rozšíření tohoto haplotypu v blízkých regionech, odkud se zatím nepodařilo získat materiál, zejména z Muráňské planiny známé vysokým endemismem a výskytem reliktnů.

Průtokovou cytometrií bylo zjištěno, že rostliny jižních populací Alp mají prokazatelně větší genom než populace severní a JV slovenské. Tento rozdíl může být dalším dobrým indikátorem morfologicky nenápadné diferenciaci (GREILHUBER 1998). Je zajímavé, že se liší podskupiny populací jižního typu. Jednou z možných hypotéz by mohla být historická hybridizace mezi druhy *M. nemorosum* a *M. subalpinum*, které je rozšířené na východních obvodech Alp a má výrazně větší genom než byl zjištěn u severních a JV slovenských populací *M. nemorosum*. Vzácná introgrese *M. nemorosum* byla prokázána v populacích *M. subalpinum* v nejbližším okolí Vídně (ŠTECH, in prep.).

Morfometrická analýza ukazuje, že rozlišení jednotlivých molekulárně vymezených skupin je na základě studovaných morfologických znaků jen obtížně možné, zejména na úrovni jednotlivých rostlin. Přesto jsou zřetelné tendence a rozlišení na úrovni populací obvykle možné je. Možným důvodem velké morfologické variability a zamlžení potenciálních morfologických rozdílů mezi molekulárně vymezenými

skupinami může být fenotypová plasticita. Ovlivnění vegetativních znaků (včetně některých studovaných) v rodě *Melampyrum* vlivem prostředí je poměrně známé (ŠTECH 1998). Při studiu přírodních populací je však obtížné oddělit tuto složku variability od geneticky fixované taxonomicky významnější složky této variability. Možná by k odlišení jednotlivých typů přispělo zařazení dalších znaků například v odění kalicha. Tento znak nebyl zařazen, jelikož jeho hodnocení je velice obtížné. Odění je během vegetační sezony proměnlivé. Na jaře bývají kalichy chlupatější než na konci léta a navíc metodika hodnocení tohoto znaku není stále zoptimalizována.

Druhou potenciální možností stírání morfologických rozdílů mezi původně odlišnými typy je hybridizace na sekundární kontaktní zóně. V rámci mé bakalářské práce měl být zkoumán i tento jev. Pro jeho studium byla zvolena část jaderného genu *agt1*, která byla mimo jiné testována na rodě *Melampyrum* (LI et al. 2008), a která byla také úspěšně použita pro studium hybridizace u druhu *M. subalpinum*. (ŠTECH in prep.). Bohužel během mé práce nastaly komplikace s amplifikací tohoto úseku a u řady důležitých populací nebyly získány uspokojivé výsledky. Ke špatné amplifikaci vzorků mohlo dojít několika způsoby. Jedním z důvodů může být změna metody izolace DNA (NAOH) oproti studii na *M. subalpinum* (izolace kitem). V sekvenovaných vzorcích byly zřetelně přítomny krátké nespecifické úseky, které znemožňovaly správnou interpretaci sekvencí. Dalším možným vysvětlením je opakovaná kontaminace vzorků, které si však nejsem vědom. Optimalizace sekvenace úseku *agt1* bude probíhat v rámci dalších analýz a zkoumání možné hybridizace mezi jednotlivými typy.

Za nepřímou podporu dávné hybridizace lze snad považovat skutečnost chybné klasifikace 3 jižních populací. Jedná se o populace z Pálavy, okolí Lednice a střední části Malých Karpat, tedy území z úplného severního okraje rozšíření jižních populací, kde je největší pravděpodobnost potenciální hybridizace s rostlinami severních populací. Řada rostlin z těchto populací byla v klasifikační diskriminační analýze přiřazena k severnímu typu a populace byly na základě populačních průměrů zařazeny do shluku se severními populacemi v klastrové analýze a podobně jsou zobrazeny i v ordinačním prostoru analýzy hlavních komponent.

Přestože tedy nejsou rozeznatelné molekulárně i cytometricky podpořené skupiny spolehlivě morfologicky rozeznatelné za pomoci zkoumaných znaků, bylo by možno do budoucna uvažovat o taxonomickém hodnocení těchto skupin. Žádná z dosavadních vnitrodruhových klasifikací nezmiňovala tuto geografickou diferenciaci. V dosavadních klasifikacích byla především zdůrazňována sezónní proměnlivost bez zřetelné

geografické struktury (RONNIGER 1911, SOÓ 1927, ŠÍPOŠOVÁ 1997) anebo nejsou vnitrodruhové jednotky uváděny jako samostatné taxony (FISCHER et al. 2008, ROTHMALER 2011). Jedinou výjimkou hodnocenou tradičně na úrovni poddruhu je *M. nemorosum* subsp. *debreceniense* popsaná jako taxon písků v oblasti Debrecenu v Maďarsku (SOÓ 1927). Tento typ je nápadný především úzkými listy. Vzhledem k tomu, že se nachází v blízkosti kontaktní zóny, byly rostliny zařazeny do mých analýz, nicméně nebylo možno získat dostatečné množství rostlin pro morfometrickou analýzu z důvodu ohrožení expanzí neofytů v oblasti jejího výskytu. Na základě cpDNA tento typ patří ke skupině severních haplotypů. Pravděpodobně má návaznost na další populace této skupiny rozšířené v západní části Rumunska. Studium populací z tohoto regionu však nebylo zařazeno do mé bakalářské práce vzhledem ke zjevné složitosti celé problematiky v této oblasti a nedostatečnému sběru. Taxonomickou hodnotu jižních skupin haplotypů je třeba řešit v celkovém kontextu populací a druhů z jižních částí Evropy, ke kterým mají tyto typy na základě předběžných fylogenetických analýz celé skupiny *M. nemorosum* zjevný vztah. Pokud se skutečně potvrdí dávné oddělení jižní skupiny haplotypů, které vyplývá z předběžných fylogenetických analýz celého rodu, bude taxonomické hodnocení těchto populací potřebné.

6. Závěr

Výsledkem bakalářské práce je detailnější zmapování výskytu haplotypových skupin cpDNA v populacích *M. nemorosum* v oblasti kontaktní zóny. Na základě zřetelné diferenciaci jednotlivých haplotypových skupin lze předpokládat, že k jejich odlišení došlo poměrně dávno a studovaná zóna má spíše sekundární charakter.

Skupina populací jižního typu se liší velikostí genomu od populací se severními haplotypy a od zřejmě příbuznějších populací rozšířených na JV Slovensku.

Morfologicky se jednotlivé skupiny nedají zcela spolehlivě odlišit. Přesto v některých případech je odlišení možné, rostliny z JV Slovenska mají poněkud větší horní pysky koruny než zbylé skupiny. Naopak rostliny severních populací mají obvykle užší kališní cípy.

Pro další posun ve studiu celé problematiky je nutno vyřešit otázku historické hybridizace mezi jednotlivými skupinami pomocí vhodnějšího molekulárního markeru.

7. 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.
- Atsatt PR. & Strong, DR.** (1970): The population biology of annual grassland hemiparasites. 1. The host environment. – *Evolution* 24:278-291.
- Barow M, Meister A.** (2002): Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. *Cytometry* 47: 1–7.
- Beattie A.** (1978): Plant-animal interactions affecting gene flow in *Viola*. In *The pollination of flowers by insects*, ed. A. J. Richards, pp. 151-64, Linnean Society Symposium Series 6. London: Academic Press.
- Beauverd G.** (1916): Monographie du genre *Melampyrum* L. – *Mém. Soc. Phys. Hist. Natur. Genève* 38: 261-657.
- Bennett MD.** (1972): Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. - *Proceedings of the Royal Society, Series B* 181: 109–135.
- Bennett MD.** (1976): DNA amount, latitude and crop plant distribution.- *Environmental and Experimental Botany* 16: 93–108.
- Bennett MD, Heslop-Harrison JS, Smith JB, Ward JP.** (1983): DNA density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals. - *Journal of Cell Science* 63: 173–179.
- Bennett MD, Leitch IJ, Hanson L.** (1998): DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. - *Annals of Botany* 82 (Suppl. A): 121–134.
- Bennett MD. & Leitch IJ.** (2005a): Genome size evolution in plants. – In: Gregory T. (ed.), *The evolution of the genome*, p. 89–162, Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Bennett JR. & Mathews S.** (2006): Phylogeny of the parasitic plant family *Orobanchaceae* inferred from phytochrome A. - *American Journal of Botany*. 93: 1039-1051.
- Bennett MD. and Leitch IJ.** (2012): Plant DNA C-values Database:<http://data.kew.org/cvalues/>

- Bennetzen et al.** (2005): Mechanism of recent genome size variation in flowering plants. - *Annals of Botany* 95:127-132.
- ter Braak CJF. and Šmilauer P.** (2012). Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer Power, Ithaca, USA, 496 pp.
- Bureš P. et al** (2004): Genome size variation in Central European of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids. - *Annals of Botany* 94: 353-363.
- Cantlon JE., Curtis EJC. & Malcolm WM.** (1963): Studies of *Melympyrum lineare*. – *Ecology* 44: 466-474.
- Clement M, Posada D. and Crandall K.** (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.
- Doležel J.** (1998): Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. – In: Lelley T.[ed.]: Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement: 80-90. – Universitätsverlag, Vienna.
- Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J.** (2003). "Letter to the editor: Nuclear DNA Content and Genome Size of Trout and Human". *Cytometry* 51A (2): 127–128.
- Doležel J. and Bartoš J.** (2005): Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. – *Annals of Botany* 95: 99-110.
- Ehleringer, JR., Marshall JD.** (1995): Water relations, p. 125-140. In MC. Press and JD. Graves (eds.), *Parasitic Plants*, 125-140.
- Evans GM, Durrant A, Rees H.** (1966): Associated nuclear changes in the induction of flax genotrophs. - *Nature* 212: 697-699.
- Fischer M. A., Oswald K. & Adler W.** (2008): Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. Ed. 3. – Land Oberösterreich & Biologiezentrum der OÖ Landesmuseen, Linz.
- Flavell RB, Rimpau J, Smith DB.** (1977): Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes. - *Chromosoma* 63: 205–222.
- Geospiza Research Team** (2004): FinchTV (Finch Trace Viewer) Version 1.4.0. Geospiza, Inc. Seattle, USA.
- Gibson W.** (1993a): Selectivity advantages to hemiparasitic-annuals, genus *Melampyrum*, of seed-dispersal mutualism involving ants: I. Favorable nest sites. – *Oikos* 67: 334-344.
- Greilhuber J.** (1998): Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. - *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 27 - 35.

- Greilhuber et al.** (2006): Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. - *Plant Biol* 8: 770 – 777.
- Gregory TR.** (2002): A bird's-eye view of the C-value enigma: genome size, cell size, and metabolic rate in the class aves. - *Evolution* 56: 121–130.
- Gregory TR.** (2005): The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. – *Ann. Bot.* 95: 133-146.
- 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.
- Heide-Jørgensen HS** (2008): *Parasiti flowering plants*. Koninklijke Brill NV, Leiden.
- Heinken T.** (2004): Migration of an annual myrmecochore: a four year experiment with *Melampyrum pratense* L. - *Plant Ecol* 170:55–72.
- Heinken T., Winkler E.** (2007): Spread of an ant-dispersed annual herb: an individual-based simulation study on population development of *Melampyrum pratense* L. – *Ecological Modelling* 203: 424-438.
- Chabert A.** (1899): Étude sur le genre *Rhinanthus* L 1,2. – *Bull. Herb. Boss.*, ser. 1, 7: 425-450, 497-517.
- Chlumský J.** (2007): Srovnání *Melampyrum bohemicum* s příbuznými taxony a revize aktuálního rozšíření. - *Magisterská diplomová práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice*.
- Chlumský et al.** (2012): Roles of species-preferential seed dispersal by ants and endozoochory in *Melampyrum* (*Orobanchaceae*). – *Journal of Plant Ecology*, doi: 10.1093/jpe/rts039: 1-8.
- Irving LJ. & Cameron DD.** (2009): You are what you eat. – *Advances in Botanical Research* 50: 88-138.
- Jäger J.** (ed.) (2011): *Rothmaler Excursionsflora von Deutschland: Gefäßpflanzen: Grundband*, 20. ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Jankovská V. & 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.
- Jeschke MR, Tranel PJ, Rayburn AL** (2003): DNA content analysis of smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) and tall waterhemp (*A-tuberculatus*): implications for hybrid detection. - *WEED SCIENCE* 51: 1-3.

- Jiang F., Jeschke WD and Wolfram Hartung** (2003): Water flows in the parasitic association *Rhinanthus minor*/*Hordeum vulgare*. - *Journal of Experimental Botany* 54: 1985-1993.
- Karlsson T.** (1976): Euphrasia in Sweden: hybridization, parallelism and species koncept. - *Botanical Notiser* 129: 49-60.
- Kazutaka Katoh and Daron M. Standley** (2013): "MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability", *Mol. Biol. Evol.* 30 (4): p. 772-780.
- Knight CA., Molinari NA. & Petrov DA.** (2005): The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. – *Ann. Bot.* 95: 177–190.
- Koutecký P., Tuleu G., Baďurová T. et al.** (2012): Distribution of cytotypes and seasonal variation in the *Odontites vernus* group in central Europe. – *Preslia* 84: 887-904.
- Koutecký P., Štěpánek J., Baďurová T.** (2012): Differentiation between diploid and tetraploid *Centaurea phrygia*: mating barriers, morphology and geographic distribution. – *Preslia* 84: 1-32.
- Kubešova M., Moravcova L., Suda J., Jarošik V. & Pyšek P.** (2010): Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora. – *Preslia* 82: 81–96.
- Kwak MM.** (1988): Pollination ecology and seed-set in the rare annual species *Melampyrum arvense* L. (*Scrophulariaceae*). - *Acta Botanica Neerlandica* 37: 153-163.
- Lawrence ME.** (1985): *Senecio* L. (*Asteraceae*) in Australia: nuclearDNA amounts. – *Aust. J. Bot.* 33: 221–232.
- 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 reconstructions of closely related plant species. – *Cladistics* 24: 1–19.
- Leitch IJ. and Bennett MD.** (2004): Genome downsizing in polyploid plants. – *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651-663.
- Leitch IJ. & Bennett MD.** (2007): Genome size and its uses: the impact of flow cytometry. – In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (eds), *Flow cytometry with plant cells*, p. 153–176, Wiley-VCH, Weinheim.

- Lepší M., Lepší P., Sádlo J. et al.** (2012): *Sorbus pauca* species nova, the first endemic species of the *Sorbus hybrida* group for the Czech Republic. – *Preslia* 85: 63 – 82.
- Levin DA, Funderburg SW.** (1979): Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. - *American Naturalist* 114: 784–795.
- Marhold, K. & Suda J.** (2001): Analýza multivariačních dat v taxonomii (Fenetické metody), verze 0.2. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra Botaniky, Praha.
- Marhold K. & Suda J.** (2002): Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). – Karolinum, Praha.
- McNeal JR, Bennett JR, Wolfe AD and Mathews S.** (2013): Phylogeny and origins of holoparasitism in Orobanchaceae. - *American Journal of Botany* 100(5):1-13.
- Michaleson M., Price HJ. et al.** (1991): Variation of nuclear DNA content in *Helianthus annuus* (Asteraceae).- *American Journal of Botany* 78(9): 1238-1243.
- Morgan MT.** (2001): Transposable element number in mixed mating populations. - *Genetical Research* 77: 261–275.
- Ohri D.** (1998): Genome size variation and plant systematics.- *Annals of Botany* 82: 75 -83.
- Olmstead RG., and Reeves PA.** (1995): Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. - *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82 : 176 – 193 .
- Olmstead RG. & Reeves PA.** (2001): Disintegration of Scrophulariaceae. – *Amer. J. Bot.* 88: 348-361.
- Otto F.** (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. – In: Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. (eds), *Methods in cell biology*, Vol. 33, p. 105–110, Academic Press, New York.
- Pellicer J, Fay MF, Leitch IJ** (2010): The largest eukariotic genome of them all? – *Bot J Linn Soc* 164: 10-15.
- Press MC.** (1989): Autotrophy and heterotrophy in root hemiparasites.- *Trends in Ecology and Evolution* 4:258-263.
- Rayburn AL.** (1990): Genome size variation in Southwestern United States Indian maize adapted to various altitudes. - *Evolutionary Trends in Plants* 4: 53–57. [non vidi]
- Rejmánek M.** (1996): A theory of seed plant invasiveness: the first sketch. – *Biol. Cons.* 78: 171–181.

- Rohlf F. J.** (2010a): TpsDig, version 2.16, Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. Available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Ronniger K.** (1911): Die Schweizerischen Arten und Formen der Gattung *Melampyrum* L. - Vierteljahrsschr. Naturforsch. Ges. Zürich 55 (1910):300-330.
- R Core Team** (2013): R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Sang, T., Crawford, D. J. & Stuessy, T. F.** (1997): Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). - American Journal of Botany 84: 1120-1136.
- Shapiro H.** (2004): Practical flow cytometry. – Wiley-Liss, New York.
- Shapiro H.** (2007): Cytometry and cytometers: development and growth. – In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J.(eds), Flow cytometry with plant cells, p. 1–17, Wiley-VCH, Weinheim.
- Schäffner & Nagl** (1979): Differential DNA replication involved in transition from juvenile to adult phase in *Hedera helix* (Araliaceae). – Pl. Syst. Evol., Suppl. 2: 105-110.
- Scheunert & al.** (2012): Phylogeny of tribe Rhinanthae (Orobanchaceae) with a focus on biogeography, cytology and re-examination of generic concepts. – Taxon 61(6): 1269–1285.
- Shaw, J., E. Lickey, J. Beck, S. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. Winder, E. E. Schilling, and R. Small.** (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. American Journal of Botany 92(1):142-166.
- Shaw, J., Lickey, EB., Schilling, EE. & Small, RL.** (2007): Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. -American Journal of Botany 94: 275-288.
- Slavíková J.** (1986): Ekologie rostlin. – SPN, Praha.
- Soó R.** (1927): Systematische Monographie der Gattung *Melampyrum*. III – Feddes Repert. 24: 127-193.
- Soó R. v. et Webb DA.** (1927): *Melampyrum* L. - In Tutin T. G. et al. [ed.]: Flora Europaea 3: 253-257. Cambridge.
- Soó R. von & Webb DA.** (1992): *Melampyrum* L. – In Tutin T. G. et al. (eds.), Flora

- Europeae 3, p. 253-257, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- StatSoft Team** (2011): STATISTICA (data analysis software system) version 10. StatSoft, Inc.
- Suda J** (2005): Co se skrývá za rostlinou průtokovou cytometrií. *Živa*, 1: 46-54.
- Sterneck J. v.** (1901): Monographie der Gattung *Alectorophus*. – Abh. Zool.-Bot. Ges. Sien, 1(2): 1-150.
- Svensson BM., Seel WE., Nilsson, CH. & Carlsson BA.** (2001): Roles played by timing of seedling development and host identity in determining fitness of an annual, subarctic, hemiparasiti plant. - *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 33: 299-305.
- Swift H.** (1950): The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 36: 643–654.
- Šípošová H.** (1997): *Melampyrum* L. - Čermel' - In: Goliášová K. [ed.]: *Flóra Slovenska V/2*: 301-328. Veda, Bratislava.
- Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Foggi, B. & Rossi, G.** (2008): Genome size and GC content evolution of *Festuca*: ancestral expansion and subsequent reduction. – *Annals of Botany* 101: 421-433.
- Šmarda & Bureš** (2010): Understanding intraspecific variation in genome size in plants. - *Preslia* 82: 41 – 61.
- 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): *Melampyrum* L. – černýš – In: Slavík B. [ed.]: *Květena ČR* 6: 412-428. – Academia Praha.
- Štech M.** (2000): Seasonal variation in *Melampyrum nemorosum*.- *Preslia*, Praha, 72:345-368.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J.** (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. - *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tate, JA. & Simpson, BB.** (2003): Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origin of the polyploid species. - *Systematic Botany* 28: 723-737.
- Temsch EM., Greilhuber J. & Krisai R.** (2010): Genome size in liverworts. – *Preslia* 82: 63–80.

- 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 Jihočes. Univ., České Budějovice. [49 pp.]
- Těšitel J., Plavcová L. & Cameron DD.** (2010): Heterotrophic carbon gain by the root hemiparasites, *Rhinanthus minor* and *Euphrasia rostkoviana* (*Orobanchaceae*). – *Planta* 231:1137-1144.
- Tešitel J. et al.** (2010): Phylogeny, life history evolution and biogeography of the Rhinanthoid *Orobanchaceae*. - *Folia Geobotanica* 45: 347 – 367.
- Těšitel J. et al.** (2010): Heterotrophic carbon gain by the root hemiparasites *Rhinanthus minor* and *Euphrasia rostkoviana* (*Orobanchaceae*). - *Planta* 231: 1137-1144.
- Tribsch A. & Schönswetter P.** (2003): Patterns of endemism and comparative phylogeography confirm palaeoenvironmental evidence for Pleistocene refugia in the Eastern Alps. – *Taxon* 52: 477-497.
- 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
- Weismann A.** (1875): Über den Saison-Dimorphismus der Schmetterlinge. Studien zur Descendent – Theorie 1. – Leipzig. [non vidi]
- Wendel JF.** (2000): Genome evolution in polyploids. - *Plant Molecular Biology* 42: 225–249.
- Wettstein R.** (1895): Der Saison-Dimorphismus als Ausgangspunkt für die Bildung neuer.
- Wolfe A., Randle CP., Liu L. & Steiner KE.** (2005): Phylogeny and biogeography of *Orobanchaceae*. – *Folia Geobotanica* 40: 115-134.
- Zeller PC.** (1849): Ueber die Artrechte des *Polyommatus Amyntas* und *Polysperchon*. – *Stettiner Ent. Ztg.*, 177. [non vidi]
- Zopfi HJ.** (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 HJ.** (1995): Life history, variation and intraspecific heterochromy in *Rhinanthus glacialis* (*Scrophulariaceae*). - *Plant Systematics and Evolution* 198: 209-233.
- Zopfi HJ.** (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

Příloha 2: Korelační matice znaků

Příloha 3: Průměrné populační hodnoty zkoumaných znaků

Příloha 4: a) *M. nemorosum* jižního typu z populace Buková

b) *M. nemorosum* severního typu z populace Plášťovce

Kód lokality	Lokalita	Nadmořská výška (m.n.m.)	Zeměpisná šířka (WGS 84)	Zeměpisná délka (WGS 84)
ASCHN	Aschberg: okraj lesa podél silnice ca 890 m JZ od obce; Rakousko	370	48,172258	15,811982
BLANN	Louňovice pod Blaníkem: okraj lesa podél silnice ca 1,8 km VJV od obce; Česko	490	49,631640	14,870060
BRANN	Branisko: křoviny podél cesty ca 200 J od sedla Branisko; Slovensko	760	49,015803	20,858078
BUDAN	Budapešť, Budaörs: lískové křoviny pod skalou v ulici Edvi Illes ca 3,8 km SV od města	260	47,482300	18,985750
BUKN	Plavecký Peter, vodní nádrž Buková: les kolem vrcholu kopce Ježovka cca 900m Z od nádrže; Slovensko	380	48,535440	17,346140
BUKVN	Bukovské vrchy, Jalová: les u křižovatky silnic ca 1,1 km VJV od obce; Slovensko	961	49,1035902	22,249448
BYSTN	Byšta: Křoviny podél cesty ca 770 m J od obce; Česko	270	48,523638	21,540963
BYSTRN	Bystrá: les ca 1,2 km S od obce Bystrá; Česko	640	49,518666	15,368820
CAJKN	Stiavnické vrchy, Čajkov: doubrava ca 2,5 km SZ od obce Čajkov; Slovensko	290	48,308861	18,577833
CERTN	Čertoryje: louka podél cesty v Čertoryjské rezervaci; Česko	410	48,859025	17,414231
DEBREN	Szenttmna-Pusztá-Debrecen, leg. Baschant; Maďarsko	105	47,510540	21,845850
DRIENN	Drienčanský Kras, Dražice: les podél silnice ca 1 km Z od obce; Slovensko	360	48,43403	20,05116

Kód lokality	Lokalita	Nadmořská výška (m.n.m.)	Zeměpisná šířka (WGS 84)	Zeměpisná délka (WGS 84)
DROZDN	Pohronský Inovec, Drozdovo: křoviny na louce u meze se stromy v obci Drozdovo; Slovensko	640	48,431639	18,555583
EISEN	Eisenstadt: okraj lesa podél silnice ca 2,2 km SV od města; Rakousko	260	47,863020	16,533850
EBRN	Ebersdorf: křovisko podél cesty ca 0,3 km S od obce; Rakousko	270	47,016366	16,030321
GIESN	Gießhübel: osada Tyrolerhof, les JV 420 m od lomu na SV okraji obce; Rakousko	420	48,103507	16,234047
GEMEN	Gemerská Hôrka: okraj lesa podél silnice ca 1 km VJV od obce; Slovensko	220	48,528430	20,389080
GOMBN	Gombasek: okraj lesa ca 200 m VSV od jeskyně Gombasecká jeskyňa; Slovensko	290	48,563547	20,469970
HALLN	Kvarnbo: světlý les podél silnice ca 1,3 km V od autobusové zastávky Kvarnbo; Švédsko	9	60,511378	17,937255
HAMRN	Bystré Hamry: les podél silnice ca 1,75 SV od křižovatky mezi obcemi Bystré, Bystré – Hamry, Jedlová; Česko	560	49,638777	16,367247
HARDEN	Čížov: křoviny podél cesty do města Hardegg, ca 2,5 km J od obce; Česko	360	48,856217	15,867244
HLUBN	Hluboká nad Vltavou: severovýchodní břeh Mounického rybníka ca 680 m od kostela	380	49,053896	14,427402
HOSTN	Hostýn, Brusné : okraj lesa u silnice ca 2,5 km ZJZ od vrcholu Sv. Hostýn; Česko	360	49,369757	17,667447

Kód lokality	Lokalita	Nadmořská výška (m.n.m.)	Zeměpisná šířka (WGS 84)	Zeměpisná délka (WGS 84)
JB1	Vyžuonos: les ca 2,2 km VSV od obce; Litva	109	55,589333	25,527916
JB4	Mikieriai: les na břehu řeky Šventaja ca 500 m J od obce; Litva; Litva	84	55,658972	25,179222
JB7	Kamajai: les ca 1,8 km JV od obce; Litva	128	55,806500	25,522277
JB10	Šveicaria: les v obci; Litva	100	55,044583	24,264916
KAPRN	Kaproun: okraj lesa ca 690 m ZJZ od obce; Česko	700	49,075520	15,172370
KNOBN	Knobložka: křoviny podél stepní louky ca 500 m JZ od obce Knobložka; Česko	290	50,540210	14,086354
LEISN	Leiser Berge: křoví podél cesty ca 0,45 km SV od obce; Rakousko	390	48,567513	16,385279
LEDNN	Lednice: okraj lesa ca 2,8 km SZ od města Lednice; Česko	170	48,819977	16,778015
LITEN	Litenčické vrchy, Morkovice-Slížany: okraj lesa ca 2,5 km SZ od obce; Česko	370	49,230910	17,192470
LOREN	Loretto, Stotzing: okraj lesa ca 1,5 km J od obce; Rakousko	290	47,893012	16,548276
MACON	Macoča: okraj lesa poblíž parkoviště ca 250 m JV od hospody u propasti Macoča; Česko	480	49,370953	16,731178

Kód lokality	Lokalita	Nadmořská výška (m.n.m.)	Zeměpisná šířka (WGS 84)	Zeměpisná délka (WGS 84)
MÄLEN	Mälären: okraj lesa podél silnice ca 240 m S od jezera Mälären, Švédsko	30	59,448167	17,022146
MARKN	Márkó: okolí skalek v řídkém lese ca 1,2 km J od obce; Maďarsko	290	47,110750	17,816570
MAYEN	Mayerling: okraj lesa ca 780 m SZ od obce, Česko	330	48,050930	16,090551
NITRN	Olichov: les podél silnice ca 660 m V od obce; Slovensko	270	48,354250	18,483253
OBYCN	Pohronský Inovec, Obyce : okraj lesa ca 3,8 km JV od obce Obyce; Slovensko	650	48,402222	18,488889
OSLON	Oslov: okraj lesa ca 1,4 km VSV od obce; Česko	400	49,404402	14,229045
OSTFN	Granlunda: les u křižovatky silnic 272 a silnice Östflora ca 2 km JV od obce Granlunda; Švédsko	65	60,002652	17,303033
PAVLON	Pavlov: křoviny na jihovýchodním úpatí kopce Děvín ca 670 m SZ od kostela v obci; Česko	280	48,878260	16,664580
PINKN	Pinkafeld: okraj lesa ca 3 km JV od obce; Rakousko	390	47,356086	16,154200
PLASTN	Plášťovce: Křoviny na lučním okraji ca 2,4 km S od obce; Slovensko	170	48,181070	18,973220

Kód lokality	Lokalita	Nadmořská výška (m.n.m.)	Zeměpisná šířka (WGS 84)	Zeměpisná délka (WGS 84)
PRIBN	Příběnice: les kolem zříceniny hradu Příběnice; Česko	420	49,392450	14,562440
PRLOUN	Přední louky: Suchovské mlýny okraj luční enklávy Přední louky cca 1,9 km SV od křižovatky v obci; Česko	480	48,891781	17,599897
PROCHODN	Prochody: hráze rybníka Svatba u obce Prochody; Česko	293	50,035278	16,137500
RADON	Radhostice: malý pahrbek s lesíkem (spíš křovinami) na vápencové vložce SSZ od obce; Česko	712	49,050780	13,521280
RAPON	Raposka: les na západním svahu kopce Szent György ca 1,7 km V od obce; Maďarsko	280	46,845510	17,445680
RECHN	Rechnitz: okraj lesa podél silnice ca 2,3 km SSV od města; Rakousko	520	47,322445	16,422480
RE - I	Rotes Kreuz: okraj lesa ca 2 km JJV od obce Gaaden poblíž křižovatky Rotes Kreuz; Rakousko	380	48,033551	16,216251
SLANN	Slanec: okraj lesa při silnici, cca 1 km J od středu obce; Slovensko	330	48,626885	21,478041
SPEIN	Speisendorf: okraj smrkového lesa ca 0,7 km ZJZ od obce; Rakousko	500	48,861713	15,420618
STERN	Sternstein, Schwarzbauer: okraj lesa podél silnice ca 100 m severně od poustevny; Rakousko	910	48,558257	14,292871
STRAN	Rohozná: okraj lesa ca 1,3 km Z od obce; Česko	610	49,806786	15,795161

Kód lokality	Lokalita	Nadmořská výška (m.n.m.)	Zeměpisná šířka (WGS 84)	Zeměpisná délka (WGS 84)
SUCHN	Suchovské Mlýny: les ca 1,75 km VSV od křižovatky v obci; Česko	480	48,891519	17,598001
SVAJN	Svätý Júr: světlina v lese na SZ okraji osady Neštich; Slovensko	250	48,262802	17,199736
TANZN	Tanzelsdorf: okraj lesa ca 0,8 km Z od obce, Rakousko	340	46,842801	15,271305
UHRIN	Uhřice: les při hlavní silnici cca 1,5 km S od obce; Česko	330	49,064679	16,944769
VALDN	Valašská dubová: louky podél silnice ca 0,4 km Z od centra obce; Slovensko	660	49,141958	19,287597
VAZEN	Važec: okraj louky ca 3,6 km V od obce	890	49,051964	20,028578
VIDLN	Vidlák: Borek pod Troskami, okraj silnice cca 990 m Z od železniční zastávky; Česko	300	50,533835	15,218285
ZAVIN	Závišín: světlý les na levém břehu Závišínského potoka 1,7 km SSZ od železniční zastávky Bezdědovice; Česko	460	49,454649	13,866600
ZBYTN	České Meziříčí: okraj lesa PR Zbytka, 1,75 km SV od kostela v obci; Česko	260	50,295680	16,064018

Příloha 2:

	DHP	DDP	DSDP	VDP	SDP	VC	VHP	DBCT	DCB	DLCT	DCTB	O
DHP	*	0,653872	0,661568	0,551945	0,429659	0,808540	0,662733	0,309760	0,698784	0,540557	0,616665	0,740363
DDP	0,653872	*	0,819080	0,772036	0,710874	0,803649	0,429116	0,488923	0,705843	0,652048	0,688619	0,852710
DSDP	0,661568	0,819080	*	0,721789	0,697710	0,802027	0,457959	0,457266	0,694687	0,525600	0,661979	0,674702
VDP	0,551945	0,772036	0,721789	*	0,777423	0,792646	0,426734	0,486260	0,612966	0,548762	0,608488	0,634271
SDP	0,429659	0,710874	0,697710	0,777423	*	0,810186	0,297338	0,441052	0,590616	0,554425	0,596044	0,544343
VC	0,808540	0,803649	0,802027	0,792646	0,810186	*	0,580685	0,475236	0,793955	0,659116	0,729350	0,737433
VHP	0,662733	0,429116	0,457959	0,426734	0,297338	0,580685	*	0,238329	0,569324	0,442203	0,538976	0,590499
DBCT	0,309760	0,488923	0,457266	0,486260	0,441052	0,475236	0,238329	*	0,363761	0,278452	0,330417	0,339268
DCB	0,698784	0,705843	0,694687	0,612966	0,590616	0,793955	0,569324	0,363761	*	0,875379	0,919716	0,624041
DLCT	0,540557	0,652048	0,525600	0,548762	0,554425	0,659116	0,442203	0,278452	0,875379	*	0,867490	0,547030
DCTB	0,616665	0,688619	0,661979	0,608488	0,596044	0,729350	0,538976	0,330417	0,919716	0,867490	*	0,653762
O	0,740363	0,852710	0,674702	0,634271	0,544343	0,737433	0,590499	0,339268	0,624041	0,547030	0,653762	*
DC	0,671147	0,719273	0,700870	0,639753	0,624827	0,798718	0,544000	0,547076	0,925667	0,835545	0,772587	0,588100
SL5	0,276684	0,292101	0,272702	0,256709	0,223902	0,286386	0,296401	0,060443	0,334086	0,277334	0,417974	0,258259
V5	0,214978	0,382500	0,311525	0,353470	0,330608	0,307463	0,137953	0,303680	0,238668	0,204402	0,299586	0,257179
DL5	0,274054	0,365487	0,321521	0,332722	0,305733	0,327120	0,207126	0,210443	0,326294	0,286673	0,374905	0,281125
V1	-0,035969	-0,010639	-0,040700	-0,114140	-0,038617	-0,040852	-0,112246	-0,096755	0,016574	0,026981	-0,031848	-0,041591
SL1	0,151985	0,185209	0,160550	0,177558	0,161651	0,160531	0,157978	0,043306	0,130917	0,108317	0,131577	0,152693
DL1	0,127598	0,133263	0,117267	0,032343	0,047861	0,082342	0,052748	-0,028106	0,149595	0,164674	0,101616	0,103340
DHCK	0,417808	0,536625	0,545490	0,498125	0,476977	0,505205	0,285654	0,348045	0,459516	0,450051	0,440815	0,353878
KT	0,324302	0,447602	0,466467	0,431803	0,437591	0,436334	0,247940	0,234935	0,388263	0,334491	0,363635	0,319865
SHCK	0,303092	0,376247	0,387257	0,408274	0,364200	0,364991	0,285768	0,372979	0,267916	0,255280	0,282259	0,277027
DDKC	0,402421	0,540588	0,530189	0,510923	0,489492	0,499818	0,264131	0,376974	0,467892	0,469200	0,441767	0,349820
SDKC	0,279794	0,408692	0,364110	0,395153	0,356282	0,347900	0,245524	0,360325	0,241163	0,232065	0,239836	0,285138
DC	SL5	V5	DL5	V1	SL1	DL1	DHCK	KT	SHCK	DDKC	SDKC	
0,671147	0,276684	0,214978	0,274054	-0,035969	0,151985	0,127598	0,417808	0,324302	0,303092	0,402421	0,279794	
0,719273	0,292101	0,382500	0,365487	-0,010639	0,185209	0,133263	0,536625	0,447602	0,376247	0,540588	0,408692	
0,700870	0,272702	0,311525	0,321521	-0,040700	0,160550	0,117267	0,545490	0,466467	0,387257	0,530189	0,364110	
0,639753	0,256709	0,353470	0,332722	-0,114140	0,177558	0,032343	0,498125	0,431803	0,408274	0,510923	0,395153	
0,624827	0,223902	0,330608	0,305733	-0,038617	0,161651	0,047861	0,476977	0,437591	0,364200	0,489492	0,356282	
0,798718	0,286386	0,307463	0,327120	-0,040852	0,160531	0,082342	0,505205	0,436334	0,364991	0,499818	0,347900	
0,544000	0,296401	0,137953	0,207126	-0,112246	0,157978	0,052748	0,285654	0,247940	0,285768	0,264131	0,245524	
0,547076	0,060443	0,303680	0,210443	-0,096755	0,043306	-0,028106	0,348045	0,234935	0,372979	0,376974	0,360325	
0,925667	0,334086	0,238668	0,326294	0,016574	0,130917	0,149595	0,459516	0,388263	0,267916	0,467892	0,241163	
0,835545	0,277334	0,204402	0,286673	0,026981	0,108317	0,164674	0,450051	0,334491	0,255280	0,469200	0,232065	
0,772587	0,417974	0,299586	0,374905	-0,031848	0,131577	0,101616	0,440815	0,363635	0,282259	0,441767	0,239836	
0,588100	0,258259	0,257179	0,281125	-0,041591	0,152693	0,103340	0,353878	0,319865	0,277027	0,349820	0,285138	
*	0,204774	0,214273	0,267075	0,023691	0,149025	0,168452	0,504464	0,412592	0,327119	0,524533	0,314889	
0,204774	*	0,646599	0,773134	0,103564	0,410525	0,230020	0,293076	0,178583	0,235628	0,272341	0,185515	
0,214273	0,646599	*	0,768289	0,203574	0,409520	0,286679	0,386601	0,279712	0,313847	0,375572	0,287022	
0,267075	0,773134	0,768289	*	0,218751	0,373760	0,385654	0,381814	0,240358	0,244789	0,377634	0,167619	
0,023691	0,103564	0,203574	0,218751	*	0,587220	0,815801	0,012213	0,052793	-0,076142	0,023411	-0,046360	
0,149025	0,410525	0,409520	0,373760	0,587220	*	0,721903	0,200180	0,231048	0,253576	0,227540	0,265272	
0,168452	0,230020	0,286679	0,385654	0,815801	0,721903	*	0,198777	0,192500	0,072816	0,218455	0,079667	
0,504464	0,293076	0,386601	0,381814	0,012213	0,200180	0,198777	*	0,534723	0,433811	0,925142	0,444512	
0,412592	0,178583	0,279712	0,240358	0,052793	0,231048	0,192500	0,534723	*	0,486161	0,539400	0,487607	
0,327119	0,235628	0,313847	0,244789	-0,076142	0,253576	0,072816	0,433811	0,486161	*	0,433307	0,541515	
0,524533	0,272341	0,375572	0,377634	0,023411	0,227540	0,218455	0,925142	0,539400	0,433307	*	0,492859	
0,314889	0,185515	0,287022	0,167619	-0,046360	0,265272	0,079667	0,444512	0,487607	0,541515	0,492859	*	

Příloha 3:

Znak	Jižní	JV slovenský	severní	Znak	Jižní	JV slovenský	severní
DHP	3,49	3,99	3,24	O	7,83	8,92	6,98
DDP	6,79	7,25	5,83	SL5	9,38	11,58	8,54
DSDP	6,35	6,94	5,63	V5	3,47	3,06	2,53
VDP	3,39	3,41	2,79	DL5	16,83	18,57	14,27
SDP	3,30	3,42	2,91	SL1	20,48	19,41	18,29
VC	6,82	7,38	6,24	V1	10,03	10,40	11,25
VHP	3,71	4,10	3,55	DL1	46,78	51,19	47,46
DCB	13,15	15,14	12,26	DHCK	4,61	4,69	3,61
DBCT	3,90	3,15	3,12	KT	3,38	3,41	3,00
DLCT	9,25	11,39	8,3	SHCK	1,31	1,25	1,07
DCTB	11,38	13,42	10,38	DDKC	4,43	4,32	3,27
DC	16,41	17,96	14,88	SDKC	1,17	1,04	0,90

Příloha 4 - a:

Příloha 4 - b:

