

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Sezónní proměnlivost druhů *Euphrasia stricta* a *Euphrasia nemorosa* na Šumavě a v Předšumaví

Bakalářská práce

Pavla Kunzová

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

České Budějovice 2022

Kunzová P. (2022) Sezónní proměnlivost druhů *Euphrasia stricta* a *Euphrasia nemorosa* na Šumavě a v Předšumaví. [Seasonal variation of *Euphrasia stricta* and *Euphrasia nemorosa* in Šumava and its foothill. Bc. Thesis, in Czech] – 51p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Euphrasia is a taxonomically complicated genus of hemiparasitic plants. It is able to form morphologically different aestival and autumnal types. In this thesis new type of aestival plants recently found in Šumava Mts. was studied and compared with geographically close species *E. stricta* and *E. nemorosa*. Seasonal variation of these two species and aestival type and differences between populations of *E. stricta* from Šumava Mts. and from its foothill were also studied.

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

V Českých Budějovicích, 12. 4. 2022

.....
Pavla Kunzová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména svému školiteli Milanu Štechovi za vedení celé práce, poskytnutí fotografií světlíků, cenné rady, připomínky, podporu a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Alžbětě Manukjanové a Jiřímu Košnarovi za pomoc s prací v laboratoři a Jiřímu Košnarovi také za pomoc s vyhodnocením dat z fragmentační analýzy. Poděkování patří také Petru Kouteckému, který mi pomohl se statistickým zpracováním dat a v neposlední řadě všem, kteří mě v průběhu tvorby práce a celého studia podporovali. NP Šumava děkuji za udělení výjimky ze zákazu sbírání rostlin v NP. Analýza mikrosatelitů byla podpořena Projektem 216, Květena Šumavy/Flora des Böhmerwaldes z programu přeshraniční spolupráce Česká republika - Svobodný stát Bavorsko, Cíl EÚS 2014 – 2020.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	3
2.1. Rod <i>Euphrasia</i>	3
2.2. Problémy druhového vymezení	5
2.3. Sezónní proměnlivost	7
2.4. Analýza mikrosatelitních úseků.....	9
3. Materiál a metody.....	10
3.1. Sběr a příprava materiálu.....	10
3.2. Analýza sezónních znaků.....	11
3.3. Morfometrická měření na květech a listenech	12
3.4. Analýza mikrosatelitů	14
3.5. Statistické zpracování	15
4. Výsledky.....	16
4.1. Morfologická podobnost časného typu a druhů <i>E. stricta</i> a <i>E. nemorosa</i>	16
4.2. Rozdíly mezi populacemi <i>E. stricta</i> ze Šumavy a Předšumaví	18
4.3. Sezónní proměnlivost	19
4.4. Mnohorozměrné analýzy morfologických znaků	20
4.5. Analýza mikrosatelitů	24
5. Diskuse	27
6. Závěr.....	31
7. Seznam použité literatury	32
8. Přílohy	37

1. Úvod

Rod *Euphrasia* L. (světlík) je složitý komplex poloparazitických rostlin vyskytující se převážně v mírném pásu severní, okrajově i jižní polokoule (Hartl 1974, Smejkal & Dvořáková 2000, Gussarova 2008). Jedná se o taxonomicky komplikovaný rod, jehož výzkum má dlouhou historii (např. Wettstein 1896, Smejkal 1963a, Hartl 1974, Karlsson 1976, 1986, Yeo 1968, 1978, Zopfi 1997). Rozlišování jednotlivých druhů komplikuje řada faktorů. Jako u mnoha dalších poloparazitických rostlin (např. Sterneck 1901, Soó 1926, Zopfi 1993, Bolliger 1996, Jonstrup et al. 2016), i u světlíků najdeme velikou fenotypovou plasticitu v závislosti na hostiteli a stanovišti, což značně komplikuje jejich druhové vymezení (Brown et al. 2020). V různých zemích jsou podle tradice přijímány různé druhové koncepce. Na jedné straně stojí úzké pojetí s mnoha taxony rozlišenými na základě drobných odchylek, které je v současnosti přijímáno zejména ve Velké Británii (Metherell & Rumsey 2018). Na druhé straně pak stojí velmi široký druhový koncept, přijímaný tradičně v severní a v současnosti i ve střední Evropě, který zahrnuje širší pojetí druhů s větším podílem vnitrodruhové variability (Karlsson 1976, Krok 2013, Vitek 2005, 2011, 2020, Štech 2019). V Květeně České republiky Smejkal & Dvořáková (2000) přijali spíše užší druhovou koncepci a navázali tak na předchozí práce Smejkala (1963a). Aktuální zpracování v Klíči ke květeně České republiky (Štech 2019) akceptuje spíše širší druhový koncept.

Jednotlivé druhy jsou také schopné se mezi sebou křížit a vytvářet životaschopné hybridy, což dále zvyšuje taxonomickou složitost celého rodu (Yeo 1956, 1966, 1968, 1976, Vitek 1982, Metherell & Rumsey 2018).

U světlíků se také vyskytují fenologicky i morfologicky odlišné časně a pozdní typy (např. Smejkal 1963b). Časně typy bývají nevětvené nebo v horní části jen málo větvené a vyznačují se menším počtem dlouhých lodyžních článků. Pozdní typy bývají naopak větvené více již od spodní části rostliny a mají větší počet kratších lodyžních článků (Wettstein 1895, Smejkal 1963b, Smejkal & Dvořáková 2000). Podobnou sezónní variabilitu můžeme nalézt také u dalších příbuzných rodů např. *Melampyrum* (Soó 1926, Štech 2000), *Rhinanthus* (Sterneck 1901, Zopfi 1993), či *Odontites* (Bolliger 1996, Koutecký et al. 2012).

Ve své práci se zabývám světlíky především na Šumavě a v Předšumaví, odkud jsou udávány druhy *E. officinalis* subsp. *rostkoviana* (Hayne) F. Towns., *E. nemorosa* (Pers.) Wallr., *E. stricta* J. F. Lehm. a z Předšumaví také druh *E. micrantha* Rchb., který je však v území s nejvyšší pravděpodobností vyhynulý (Smejkal & Dvořáková 2000, Pladias – Chytrý et al. 2021, Wild et al. 2019). *E. officinalis* subsp. *rostkoviana* je velkokvětý, diploidní taxon

se žláznatými trichomy, který lze od zbylých dvou snadno rozeznat. Vyskytuje se v celé ČR a ve své práci se jím nezabývám. Zbylé dva druhy jsou tetraploidní, mají menší květy a určují se mnohem obtížněji. V mém zájmovém území jsou zastoupeny pozdními typy, doba květu se pohybuje od července do září, vzácně až do října (Smejkal & Dvořáková 2000). Zatímco druh *E. nemorosa* je v území morfologicky poměrně jednotný, populace *E. stricta* jsou značně variabilní a vcelku nápadný rozdíl lze pozorovat v celkovém habitu i velikosti květů zejména mezi Šumavou a Předšumavím.

Nedávno byly na Šumavě nalezeny časně kvetoucí populace světlíků, které plně kvetou již v červnu. (M. Štech unpubl.). Morfologicky tyto rostliny odpovídají rostlinám časného typu. Na tyto populace jsem se zaměřila ve své bakalářské práci. Jejím cílem je

- a) zjistit morfologické odlišnosti těchto časných populací od geograficky blízkých populací *E. stricta* a *E. nemorosa*,
- b) srovnat morfologické znaky *E. stricta* ze Šumavy a Předšumaví,
- c) prozkoumat vnitropopulační proměnlivost morfologických znaků u jednotlivých taxonů během sezóny,
- d) zjistit genetickou podobnost jednotlivých populací pomocí mikrosatelitních markerů.

2. Literární přehled

2.1. Rod *Euphrasia*¹

Euphrasia L. (světlík) je rod poloparazitických rostlin patřící dnes do čeledi *Orobanchaceae* (Tank et al. 2006., Těšitel et al. 2010). Vznikl zřejmě v Eurasii (Gussarova et al. 2008), ale dnes světlíky rostou zejména v temperátních oblastech severní, méně i jižní polokoule. Centrum jejich diverzity je především v horách. Rostou také ve vysokých horách Oceánie a na Azorských ostrovech (Yeo 1978, Smejkal & Dvořáková 2000, Gussarova et al. 2008). Na jižní polokouli je v rámci rodu větší morfologická variabilita, vyskytuje se zde více růstových forem, jedno i víceleté rostliny, liší se tvar listů, korun, prašníků a tobolek (Gussarova et al. 2008). Na severní polokouli jsou rostliny uniformnější, jedná se téměř výhradně o jednoleté byliny, přesto se zde vyskytuje většina popsanych druhů. Předpokládaným důvodem této druhové bohatosti je především rychlá radiace v pozdním pliocénu a v pleistocénu díky novým ekologickým podmínkám a (dodnes probíhající) mezidruhová hybridizace (Gussarova et al. 2008).

Většina zástupců rodu *Euphrasia* jsou jednoleté byliny se slabě vyvinutými kořeny. Listy jsou vstřícné nebo téměř vstřícné, přisedlé až krátce řapíkaté s pilovitě zubatým, řidčeji pilovitě vroubkovaným okrajem. Květy vyrůstají po jednom v úžlabí listenů a tvoří koncové hrozny, popř. klasy (Smejkal & Dvořáková 2000). Dolní listeny jsou obvykle vzhledem podobné listům, horní se pak mohou lišit tvarem nebo zubatostí (Karlsson 1976). Květy jsou téměř přisedlé, s dvoupyskou korunou. Horní korunní pysk je přilbovitý, mírně klenutý, s dvouzubým až dvoulaločným, nazpět ohrnutým okrajem, dolní pysk je obvykle delší než horní, plochý, trojcípý, často s úzkými fialovými proužky a se žlutou skvrnou při ústí korunní trubky. Světlíky mají malá, podélně žebernatá semena (Smejkal & Dvořáková 2000). Odhadovaný celkový počet druhů se pohybuje přibližně od 150 do 350, u různých autorů se odhady velmi liší (Hartl 1974, Smejkal & Dvořáková 2000, Gussarova et al. 2008).

Ve střední Evropě se světlíky vyskytují ve dvou ploidních úrovních jako diploidní (např. *E. officinalis*, *E. tatrae*) nebo tetraploidní (např. *E. stricta*, *E. nemorosa*, *E. micrantha*; Gussarova et al. 2008).

Důležitým faktorem rozhodujícím o variabilitě populace je velikost květů, která souvisí s podílem autogamie. Bylo zjištěno, že v populacích s většími květy převažuje allogamie, zatímco malokvěté populace jsou spíše autogamické. V autogamických populacích

¹ Nomenklatura byla sjednocena podle Klíče ke květeně České republiky (Štech 2019)

pak může vzrůstat homozygotnost a genetická odlišnost od ostatních populací (French et al. 2005).

V České republice je podle aktuálního zpracování akceptováno 6 druhů světlíků, několik vnitrodruhových taxonů a 6 mezidruhových hybridních kombinací (Štech 2019).

V této bakalářské práci jsem studovala především druhy *E. stricta* a *E. nemorosa*, proto jim zde bude věnována větší pozornost.

Euphrasia stricta

Euphrasia stricta (světlík tuhý) je druh s květy dlouhými (5–)6–10(–11) mm. Má obvykle dlouhé větve svírající s lodyhou ostrý úhel (Smejkal & Dvořáková 2000). Listy a listeny jsou zelené nebo naředle zelené, poněkud lesklé, na rubu ploché a hladké, zřídka slabě svraskalé, úplně lysé, vzácně na okraji, popř. i na žilnatině, s velmi řídkými a krátkými štětinatými chlupy. Na listech i listenech jsou výrazné, často pokroucené osinky. Zuby na listenech jsou delší než široké včetně koncového zubu. Nejdolejší květ se vyvíjí na (4.–)7.–14.(–18.) uzlině (Smejkal & Dvořáková 2000). Toto rozpětí může být dané tím, že jsou v tomto druhu akceptovány společně časně i pozdní typy [Smejkal (1963a) je rozlišuje jako subsp. *stricta* a subsp. *suecica*]. Barva koruny je obvykle bledě fialová, liláková nebo bělavá, řidčeji modravá nebo téměř fialová (Smejkal & Dvořáková 2000). Roste na suchých loukách, pastvinách, vřesovištích, mezích, travnatých okrajích cest, v travnatých lesních světlinách, lesních lemech a křovinatých stráních. Tímto charakterem rozšíření se podobá *E. officinalis*, avšak proti ní *E. stricta* preferuje výslunnější a sušší stanoviště (Smejkal & Dvořáková 2000). V České republice byl tento druh historicky rozšířen roztroušeně po celém území (Smejkal & Dvořáková 2000, Pladias – Chytrý et al. 2021, Wild et al. 2019), v důsledku změn obhospodařování krajiny však zřetelně ustoupil (Štech 2013). Nejhojnější je v planárním, kolinním a submontánním stupni, ale vyskytuje se i ve vyšších horských polohách (Smejkal 1964).

Euphrasia nemorosa

Euphrasia nemorosa [světlík hajní (s. větvený)] je malokvětý druh s délkou koruny (4–)5–6(–7) mm. Má výrazně tlustou, většinou bohatě, obvykle již od báze větvenou, lodyhu. Větve odstávají od lodyhy přibližně v úhlu 45° a mohou být opětovně větvené. Listy a listeny jsou poměrně malé, sytě a tmavě zelené, za živa výrazně lesklé, za sucha pak nelesklé a vrásčité svraskalé. Listeny mají špičaté, avšak neosinkaté nebo sotva zřetelně osinkaté zuby (Smejkal 1963a). Koncový zub listenu je vejčité trojúhelníkovitý, o málo delší než široký.

Nejdolejší květ se objevuje na (5.–)8.–12.(–14.) lodyžní uzlině. Koruna je bělavá nebo (spíše na horním pysku) lehce namodralá až nafialovělá. Roste na suchých loukách, pastvinách a vřesovištích, mezích a svazích úvozových cest, v travnatých lesních enklávách, lemech lesů a lesních cest (Smejkal & Dvořáková 2000). Může se vyskytovat také v lemech polních cest a v ruderalizovaných trávnících vesnických návsi, na sušších travnatých okrajích rybníků a sušších vyvýšených písčitých okrajích letněných rybníků. Oproti *E. stricta* jeví nitrofilnější charakter (Smejkal & Dvořáková 2000). Těžiště výskytu je v pohorích a pahorkatinách atlantské a subatlantské Evropy. Vyskytuje se nejčastěji v nadmořských výškách 400–700 m. n. m., nejvyšších poloh v ČR dosahuje v Moravskoslezských Beskydech (1100 m. n. m.; Smejkal & Dvořáková 2000).

Druhy časného typu v ČR

Přestože dříve bylo časných taxonů světlíků udáváno více (Smejkal 1963a, Smejkal & Dvořáková 2000), v současné době je v České republice na druhové úrovni akceptován pouze jeden taxon zřetelně časných rostlin. (Štech 2019). Jedná se o *E. coerulea* Tausch (světlík modravý), který se kromě typicky časného vzhledu (dlouhé lodyžní články, chudé nebo žádné větvení, nejdolejší květ na 3.–9. uzlině) vyznačuje také přítomností krátce stopkatých žlázek s rovnou stopkou. Jedná se o druh, který je poměrně variabilní a pravděpodobně endemický pro střední Evropu od Krušných hor po Západní Karpaty. Některé časné rostliny, které byly vymezovány jako druhy, poddruhy či variety, jsou zahrnuty do jiných druhů v rámci jejich vnitrodruhové variability a nejsou nijak oddělovány. To se týká např. *E. slovacca* (Yeo) Holub, kterou Smejkal & Dvořáková (2000) oddělovali jako samostatný druh s charakteristickým žláznatým oděním. V práci Svobodové (et al. 2016) nebyla *E. slovacca* jako samostatný druh molekulárně podpořena. Na základě toho a také na základě přítomnosti žláznatých rostlin *E. stricta* v severských oblastech přiřazuje Štech (2019) *E. slovacca* k druhu *E. stricta*. Poměrně nápadný časný typ tvoří *E. officinalis*. Je označován jako *E. officinalis* var. *monticola* (Silverside) ined. a jeho vzácný výskyt je vázán zejména na druhově bohaté horské a podhorské louky převážně v karpatské oblasti (Smejkal & Dvořáková 2000).

2.2. Problémy druhového vymezení

Světlíky se v Evropě řadí k taxonomicky velmi složitým skupinám. Hranice mezi druhy je nejasná. Rozplývá se jednak v důsledku konvergence, kdy rostliny různých druhů mohou v extrémních podmínkách, například v horách, vypadat morfologicky velmi podobně (Svobodová et al. 2016). Zároveň dochází k časté hybridizaci, tvorbě hybridních rojů či lokálních endemických typů (Smejkal 1963a, Karlsson 1984, Smejkal & Dvořáková 2000).

Smejkal (1963a) uvádí v tehdejší ČSSR 13 hybridních kombinací, Stace et al. (2015) v Británii 71. Hybridizace probíhá především v rámci jedné ploidní úrovně. Meziploidní hybridní rostliny byly také zaznamenány, děje se to ale vzácně (Yeo 1956, Becher et al. 2021). Jako velmi častý je v našich podmínkách udáván hybrid *E. × haussknechtii*, který by měl být schopný tvořit celé hybridní roje v místě styku obou rodičovských druhů (*E. stricta* a *E. nemorosa*; Smejkal 1963a). Práce Svobodové (et al. 2016) však naznačuje, že hybridizace nemusí být tak běžná, jak se doposud udávalo.

Kromě běžných faktorů ovlivňujících fenotyp rostliny je u poloparazitů velmi významné, na kterého hostitele jsou rostliny napojeny. Různí hostitelé mohou ovlivňovat množství biomasy, architekturu rostliny a reprodukční úspěšnost poloparazita (Brown et al. 2020). U světlíků je hostitelem nejvíc ovlivněn počet větví, výška rostliny, začátek kvetení a délka internodia. Nejmenší variabilitu v závislosti na hostiteli naopak vykazuje počet nodů k nejdolejšímu květu (Brown et al. 2020). Zároveň rostliny, které jsou připojeny k hostiteli, na kterém se jim daří (např. jetel), kvetou dříve, v době prvního květu jsou větší a mají větší květy. Na opačné straně jsou rostliny, které nejsou připojeny k žádnému hostiteli. Ty jsou i tak schopné růstu, jsou však velmi malé, kvetou později a mají menší květy. Většina rostlin v populacích se nachází někde mezi těmito extrémy, v rámci populace se tedy jednotliví jedinci mohou i výrazně lišit (Brown et al. 2020).

Obtížná je také interpretace výsledků z experimentálních podmínek, neboť mnoho znaků se za těchto okolností liší od rostlin rostoucích v přírodě. V experimentu Browna et al. (2020) koreloval s rostlinami z přírody pouze počet nodů k nejdolejšímu květu, ostatní znaky se v průměru odlišovaly od znaků zjištěných na planě rostoucích rostlinách. Jednalo se zejména o velikost koruny, počet zubů na spodních listenech, délku internodií a počet větví.

Další komplikací při vymezení druhů je tvorba odlišných sezónních typů (viz dále). U jiných rodů lze různé sezónní typy snadno spolehlivě přiřadit k jednomu druhu na základě morfologických znaků (např. *Melampyrum*, *Rhinanthus*; Štech 2019) nebo, jako v případě rodu *Odontites*, dokonce odlišného počtu chromozomů (Koutecký et al. 2012). U světlíků je toto často komplikované, neboť diagnostických znaků neovlivněných sezónností je méně a morfologická konvergence různých druhů je velmi výrazná. Hodnocení sezónních typů je pak různorodé. Např. Smejkal (1963b) doporučoval hodnotit vyhraněné sezónní typy jako poddruhy, Karlsson (1976) je nehodnotí vůbec a Metherell & Rumsey (2018) naopak hodnotí časné typy jako samostatné druhy.

Spolu s akceptováním mnoha druhů na základě drobných, nejen sezónních odchylek Metherell & Rumsey (2018) také rozeznávají mnoho hybridních kombinací (71; Vitek 2020).

Tyto skutečnosti vytváří z britských světlíků mimořádně složitý komplex. V současných britských pracích je pak často využíván postup, kdy jsou rostliny nasbírány a poté určeny specialistou. Toto určení pak není zpochybňováno, ani když vymezené taxony nejsou podpořeny molekulárními analýzami. Autoři rezignují na vymezení druhů na základě jejich evoluční historie a drží se morfologického konceptu (např. Brown et al. 2019, Becher 2021).

2.3. Sezónní proměnlivost

U některých skupin rostlin se setkáváme se sezónní diferenciací. Tento pojem označuje přítomnost fenologicky a morfologicky odlišných typů uvnitř jednoho druhu. První teorii o vzniku sezónní diferenciacie (sezónního dimorfismu) formuloval Wettstein (1895), který považoval za hlavní faktor diferenciacie pravidelnou seč. Tato teorie předpokládá, že časné typy urychlily svůj vývoj a dokončily ho ještě před sečí. Pozdní typy naopak teprve po seči znovu vyhnaly větve a dokončily svůj vývoj později. K názoru Wettsteina se v průběhu minulého století někteří autoři přiklonili (např. Zopfi 1998), někteří pak přicházeli s odlišnými teoriemi. Nejvýznamnější alternativní teorie předpokládá hlavně vliv pleistocenního klimatu, kdy poblíž ledovce dokázaly přežít pouze časné typy. Pozdní typy, které pro svůj vývoj potřebují delší vegetační sezónu, byly omezeny na stanoviště vzdálenější od ledovce. S touto teorií jako první přišel Schwarz (1935) a dále byla zastávána např. Smejkalem (1963b, Smejkal & Dvořáková 2000). Smejkal & Dvořáková (2000) zdůvodňují tuto teorii tím, že časné druhy rostou ve vyšších nadmořských výškách nebo severnějších zeměpisných šířkách oproti pozdním typům, které preferují spíše otevřenější, sušší a výslunnější stanoviště.

Sezónní diferenciacie je kromě rodu *Euphrasia* známá u řady dalších rodů, zejména poloparazitických *Orobanchaceae* (např. *Melampyrum*, *Rhinanthus*, *Odontites*; Soó 1926, Sterneck 1901, Bolliger 1996, Štech 2019). Fenologie v závislosti na prostředí je dobře zdokumentovaná u rodu *Rhinanthus* (Zopfi 1993, 1998). Přizpůsobení rodů *Rhinanthus* a *Euphrasia* se v mnohém podobá, jsou zde však některé odlišnosti. Oproti kokrhelům kvetou světlíky v pozdě sečených trávnicích později, v horských pastvinách naopak dříve. Světlíky mají také celkově delší periodu kvetení jedince (7 a více týdnů) a uchycují se k hostiteli asi o měsíc později. Výsledkem tohoto pozdějšího uchycení pak je, že kvetoucí světlíky nenajdeme dříve než v červnu (Zopfi 1998).

V rámci sezónní variability různé populace často vytváří řadu morfotypů, které jsou fenologicky i morfologicky adaptovány ke konkrétním podmínkám stanoviště (Zopfi 1997). Na okrajích tohoto gradientu stojí časné a pozdní typy. Časné typy vyrostou, vykvetou a odplodí již na jaře a v časném létě. Díky tomu se mohou vyhnout kompetici, herbivorům, sečení, letnímu suchu a dalším stresům, které se objevují později v sezóně. Hlavní nevýhodou

rychlého vývoje je tvorba menšího množství semen a pak také méně zdrojů, kvůli menšímu počtu haustoriálních připojení, která se stihnou rozvinout (Zopfi 1998, Brown et al. 2020). Obecnou vlastností časných typů je řidčeji, pouze v horní polovině větvená lodyha s menším počtem delších lodyžních článků. Dolní listy a dělohy bývají ještě za květu zachovalé. Důležitým znakem je také malý počet nodů k nejdolejšímu květu. Pozdní typy jsou naopak větší, mívají větvenější lodyhy už od báze či v dolní polovině a mají více kratších lodyžních článků. Dolní listy a dělohy jsou za květu opadané a jen výjimečně přetrvávají (Karlsson 1984, Zopfi 1998, Smejkal & Dvořáková 2000). U časných typů světlíků by měl nejdolejší květ rozkvétat na (2.–)3.–5.(–6.) lodyžní uzlině. Zuby na horních lodyžních listech a listenech jsou u časných typů tupější, neosinkaté nebo kratičce osinkaté (Smejkal 1963b). Pozdní typy pak mají horní lodyžní listy a listeny s více zuby, které jsou špičatější a někdy zřetelně až nápadně osinkaté. Nejdolejší květ rozkvétá obvykle výše než na 5.(–6.) lodyžní uzlině (Karlsson 1984, Smejkal & Dvořáková 2000, Brown et al. 2020).

Podrobnou studii sezónnosti *E. officinalis* subsp. *rostkoviana* v závislosti na typu prostředí zpracoval Zopfi (1998). Dle jeho výsledků doba kvetení a vzhled rostliny výrazně korelují s managementem dané lokality, který pro světlíky jako jednoleté rostliny představuje velmi silný selekční tlak. Bez tohoto tlaku je výhodnější nejprve investovat do růstu, neboť s počtem větví roste také počet květů a celková reprodukční úspěšnost. Časně kvetoucí rostliny se vyskytovaly ve třech typech trávníků. Tím prvním byly lokality, kde neprobíhala ani pastva ani seč, anebo probíhala v pozdním létě. Na těchto plochách je vysoká kompetice o světlo a pro rostliny je tedy výhodné vyrůst co nejdříve. Dalším typem pak byly lokality kosené brzy na jaře, kdy byly rostliny ještě natolik malé, že je seč výrazně nepoškodila. Rostliny, které mají po této časně seči rychlý vývoj, pak mají selekční výhodu, neboť dokážou rychle využít náhlý dostatek světla a před další sečí stihnout vyvinout semena. Třetím habitatem byly alpské louky ve vysokých nadmořských výškách, které byly intenzivně spásané v časném létě. Časné typy tak byly jediné, které stihly vyvinout květy a semena dostatečně rychle. Intermediární rostliny se vyskytovaly v horských pastvinách, které byly intenzivně spásané pozdě na jaře a pak znovu na podzim. Rostliny zde tedy potřebovaly využít čas mezi obdobími intenzivní pastvy. Pozdě kvetoucí druhy byly nalezeny ve dvou různých podmínkách. Prvním stanovištěm byly pastviny ve vysokých horách, které jsou intenzivně pasené na velké ploše po dlouhou dobu v létě. Rostliny na těchto místech měly mnoho nahuštěných internodií při zemi a tvořily hodně větví. Druhým typem lokalit byly živinami chudé louky sečené jednou v létě. Tamější rostliny také měly při zemi mnoho internodií a listů. Po seči pak vytvořily několik dlouhých internodií, větví a brzy vykvetly. Vzhledem k tomu, že rozdíl mezi rostlinami

z lokalit s různým managementem přetrvávaly i v experimentálních podmínkách, Zopfi (1998) předpokládá, že toto přizpůsobení je geneticky fixované.

Sezónní variabilita může mít i některé další dopady, jako například váhu semen nebo dobu klíčení. Zopfi (1998) předpokládá, že se těžší semena rychleji uchytí na hostiteli a rostliny z nich vyrostlé nejrychleji kvetou. Zároveň však pozoroval u rostlin z velkých semen nejdelší interval mezi kvetením na hlavním stonku a na bočních větvích a také tyto rostliny potřebovaly více času na dozrání semen na hlavním stonku. Těžší semena se vyskytovala u rostlin, které byly méně větvené a měly tedy méně květů a semen. Více větvené rostliny měly více květů a tedy i semen, která však byla menší, zřejmě kvůli trade-off mezi velikostí a počtem semen (Zopfi 1998).

Některé znaky na rostlinách se také mohou měnit v průběhu jedné sezóny v závislosti na době kvetení. Podle Browna (et al. 2020) rostliny, které dříve vykvetou, mají větší pravděpodobnost, že dorostou do větší velikosti a budou na konci sezóny více větvené. Naopak rostliny, které vykvetly později, bývají již za prvního květu menší, jsou méně větvené a také mají méně zubů na listech a menší květy.

2.4. Analýza mikrosatelitních úseků

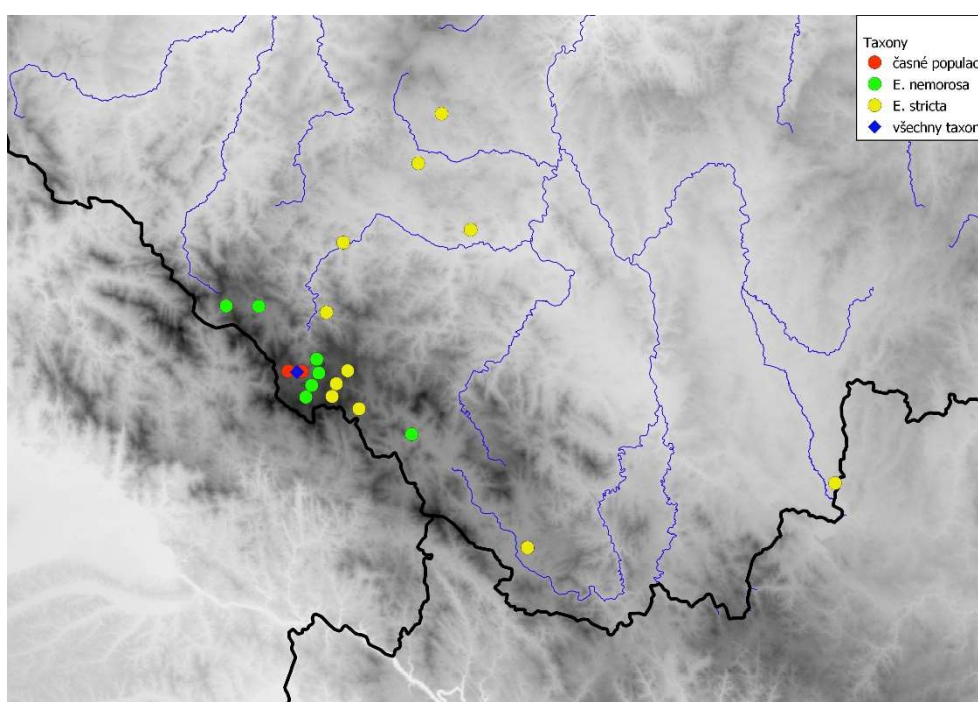
Mikrosatelity jsou úseky několika málo (1–9) bazí vyskytujících se mnohokrát za sebou, které jsou vysoce variabilní (Vieira et al. 2016). Vyskytují se převážně v nekódujících úsecích DNA, ale mohou se vyskytovat i v místech, kde mají důsledky pro morfologii organismů (Gemayel et al. 2012). Jejich variabilita je dána zejména chybami, tzv. sklouznutím DNA polymerázy při replikaci, a nerovnoměrným crossing-overem (Gemayel et al. 2012, Vieira et al. 2016). (Ne)stabilita mikrosatelitních úseků je dána zejména jejich délkou. U delších úseků je větší pravděpodobnost, že dojde ke sklouznutí polymerázy při replikaci a následné změně počtu repetice. Čím delší úseky, tím větší tedy vykazují variabilitu (Gemayel et al. 2012).

Díky jejich vysoké variabilitě jsou mikrosatelity v taxonomii využívány například pro studium toku genů, populační struktury, evolučních procesů a vztahů na vnitrodruhové úrovni (Vieira et al. 2016). Byly využity i v rodě *Euphrasia*, např. pro zjištění vztahu mezi velikostí květů a podílem autogamie (French et al. 2005), taxonomické hodnocení některých druhů v České republice (Svobodová et al. 2016) nebo pro populačně genetické studie dvou druhů z Azorských ostrovů (Moura et al. 2018).

3. Materiál a metody

3.1. Sběr a příprava materiálu

Terénní sběry probíhaly od června do září v letech 2020 a 2021. Mapa lokalit je na Obr. 1, jejich seznam pak v Příloze 1. Na každé lokalitě bylo odebráno několik rostlin, které byly ještě týž nebo následující den zpracovány. Rostliny byly přiřazeny k druhům *E. stricta*, *E. nemorosa* nebo k časnému typu zejména na základě doby květu, velikosti a barvy květů, habitu rostlin, tloušťky lodyhy, postavení větví, postavení a zbarvení listenů a přítomnosti osinek na zubech listenů.



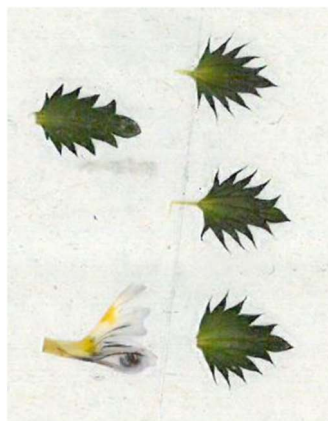
Obr. 1: Mapa studovaných populací

Na několika lokalitách byly rostliny sbírané v různých částech sezóny pro sledování posunu znaků. Konkrétně se jednalo o sběry z 2. 7. 2021, 23. 7. 2021 a 17. 8. 2021 z lokalit Ryb, Ryb497, Ryb807, Ryb808 (pouze časné rostliny), PJP, Ant, FiH, BoL, VIJ, Kvi a Ols. Jedná se pouze o populace ze Šumavy, předšumavské populace nebyly do tohoto porovnání zahrnuty. Pro sledování posunu znaků byly jednotlivé rostliny rozříděny podle druhové příslušnosti a zároveň podle data sběru (viz Tab. I).

Tab. I: Přehled zkratk pro porovnání znaků v různých částech sezóny

Druh	Datum sběru	Označení	Počet rostlin
Časný typ	2. 7. 2021	cZAC	19
Časný typ	23. 7. 2021	cKON	3
<i>E. stricta</i>	23. 7. 2021	sZAC	20
<i>E. stricta</i>	17. 8. 2021	sKON	20
<i>E. nemorosa</i>	23. 7. 2021	nZAC	20
<i>E. nemorosa</i>	17. 8. 2021	nKON	25

Z většiny lokalit bylo analyzováno v jednom sběru 5 rostlin. Výběr jedinců nebyl náhodný, ale byl prováděn tak, aby vybrané rostliny co nejlépe pokryly variabilitu populace. Na morfometrická měření byl z rostlin odebrán, pokud to bylo možné, květ, list ze středu lodyhy, první, třetí a pátý listen. Tyto byly přitisknuty na bezbarvou lepicí pásku a nalepeny na papír (viz Obr. 2). Dále bylo z každé rostliny odebráno několik dalších listů nebo listenů, které byly uchovány v silikagelu a následně využity pro izolaci DNA a analýzu mikrosatelitů. Zbytek rostliny byl zpracován jako standardní herbářová položka a byly na něm měřeny další morfologické znaky (dále nazývané souhrnně jako sezónní, viz analýza sezónních znaků).



Obr. 2: Způsob nalepení částí rostliny (květ, list, odsponu 1., 3. a 5. listen)

3.2. Analýza sezónních znaků

Znaky měřené na vylisovaných rostlinách jsou uvedené v Tab. II. Jako první nodus byl označen první nad děložními listy. Za větve byly považovány i malé výrůstky, kde již byly rozpoznatelné listy a stonek. Měření výšky a úhlů bylo prováděno pravítkem a úhloměrem. Úhel větví byl hodnocený na ordinační škále v hodnotách 0 – 30°, 30° – 60° a 60° – 90°. Podobně i pro tvar větví jsem si vytvořila 4 kategorie: a) pouze krátké výrůstky, b) spíše obloukovité, c) několikrát zakřivené, d) spíše přímé. Tvar větví byl vždy posuzován jako

převažující na dané rostlině. Přesto bylo toto hodnocení dosti problematické, zvláště při vysokém počtu větví a při přítomnosti různě tvarovaných větví na jedné rostlině. Často také bylo třeba rozlišit, zda daný tvar a úhel větví rostlina měla i v přírodě, nebo se jedná jen o artefakt vzniklý lisováním. Údaje o úhlu i tvaru větví byly poté převedeny na binární data (0/1 pro přítomnost/nepřítomnost daného typu) a jeden (poslední) sloupec byl odstraněn kvůli zachování stupňů volnosti. Tyto znaky se neobjevují v analýzách, které neumí pracovat s binárními daty.

Tab. II: Přehled měřených sezónních znaků

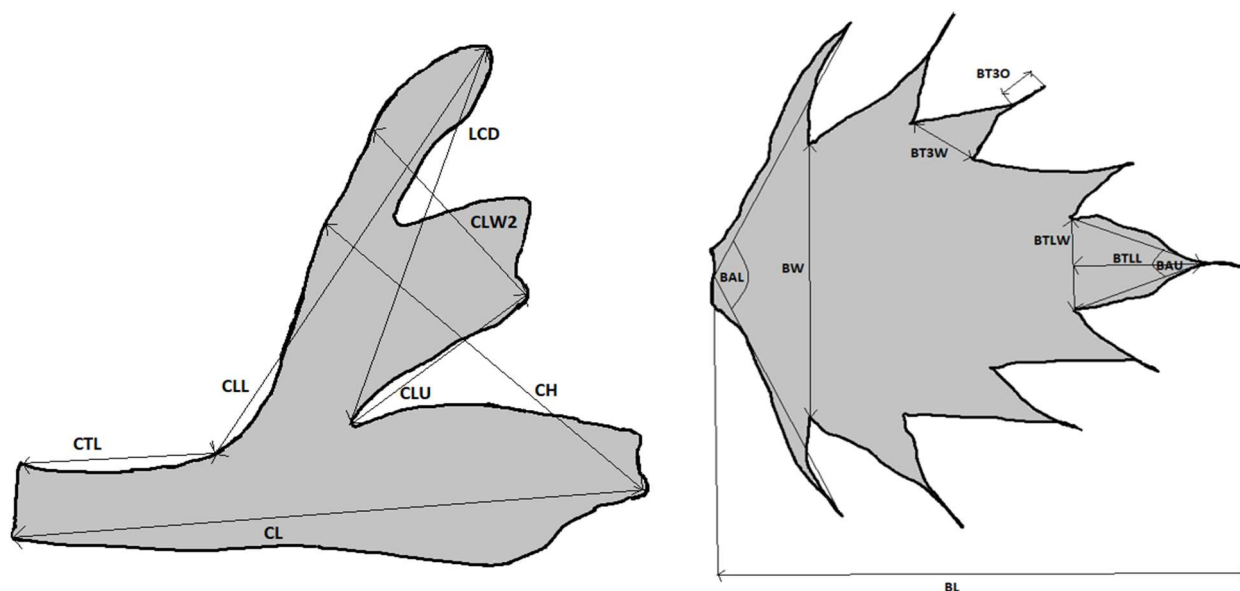
V	Výška rostliny (vzdálenost mezi dělohami a nejdolejším květem)
NK	Nodus s nejdolejším květem
N1V	Nodus s nejdolejší větví
NMV	Nodus s nejdelší větví
NVV	Nodus s nejhořejší větví
UV	Úhel větví
TV	Tvar větví
PV	Počet větví

3.3. Morfometrická měření na květech a listenech

Nalepené květy, listy a listeny byly naskenovány v rozlišení 600 dpi. Znaky pro měření byly vybrány na základě práce Svobodové (2008), která zkoumala větší množství znaků a jejich vliv na odlišení druhů *E. stricta* a *E. nemorosa*. Pro moji práci byly vybrány jen znaky, které se ukázaly jako nejvhodnější k odlišení studovaných druhů. Tímto výběrem zcela vypadly znaky na listech. Přehled měřených znaků je uveden v Tab. III a jejich znázornění na Obr. 3. Měření probíhalo v programu ImageJ (Schneider et al. 2012).

Tab. III: Přehled měřených znaků na květech a listenech

CL	délka koruny
CTL	délka korunní trubky
CH	výška koruny
CLL	délka dolního korunního pysku
CLU	délka okraje dolního korunního pysku
LCD	diagonála dolního korunního pysku
CLW2	polovina šířky dolního korunního pysku
BL	délka listenu
BW	šířka listenu v nejširším místě
BTLW	šířka koncového zubu listenu
BTLL	délka koncového zubu listenu
BT3W	šířka třetího zubu listenu
BT3O	délka osinky na 3. zubu listenu
BAL	úhel u báze listenu
BAU	úhel na vrcholu koncového zubu listenu



Obr. 3: Vyznačení znaků měřených na květech a listenech.

K těmto měřeným znakům byly ještě přidány další 2 odvozené poměrové znaky a to: BL/BW a BTLL/BTLW.

Po naměření vzorků za rok 2020 byly znaky zrevidovány, zda odlišují studované druhy, jak velká je jejich variabilita mezi populacemi a jestli nejsou vzájemně korelovány. Na základě toho byly vyřazeny znaky na prvním a pátém listenu. Přestože korelace se znaky na 3. listenu nebyly extrémně vysoké (většinou ne větší než 0,9), vykazovaly stejný trend, a proto byly z dalšího měření vypuštěny.

3.4. Analýza mikrosatelitů

Izolace DNA většiny vzorků probíhala pomocí metody NaOH (Werner et al. 2002). Na izolaci byl použit většinou jeden spíše menší listen. Homogenizace byla prováděna pomocí mlýnku Retsch 400MM při frekvenci 29 kmitů/s v 1,5 ml mikrozkumavkách spolu se 2 ocelovými kuličkami o průměru 3mm. Do mikrozkumavek bylo následně přidáno 40 μ l 0,5M NaOH, mikrozkumavky byly protřepány a umístěny do centrifugy na 13 200 RPM po dobu 2 minut. Z mikrozkumavek byly odebrány 4 μ l čiré kapaliny do 40 μ l roztoku 100mM Tris HCl, pH 8,3. Izoláty byly následně ještě 10x naředěny vodou (1 μ l izolátu v 10 μ l vody). Některé vzorky byly izolovány podle standardního protokolu komerčním kitem Macherey Nagel NucleoSpin Plant II Kit.

Na vzorcích bylo zkoumáno 8 mikrosatelitních úseků podle Svobodové et al. (2016), pouze s jiným objemem PCR reakce (5,5 μ l). Pět lokusů (Ene 1, Ene 2, Ene 3, Ene 4 a Ene 5) bylo fluorescenčně barveno přímo pomocí značených primerů, u tří lokusů (En-G, En-B, En-I) bylo využito barvení pomocí značeného M13 primeru (Schuelke 2000). Množství reagensů pro jednu PCR reakci je uvedeno v Tab. IV.

Tab. IV: Množství reagensů na jednu PCR reakci pro zkoumané lokusy

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

Lokus En-I byl při počátečních amplifikacích problematický, proto byl dále pro PCR tohoto lokusu využíván Combi PP Master Mix (Top-Bio), se kterým měla reakce lepší a stabilní výsledky. Reakční podmínky PCR jsou uvedené v Tab. V.

Tab. V: Reakční podmínky PCR

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

Úspěšnost PCR reakce byla ověřena elektroforézou na agarózovém gelu a u vzorků, u kterých nebyl viditelný PCR produkt, byla provedena nová PCR. Z úspěšných PCR produktů jednotlivých lokusů pro každý vzorek byly smíchány směsi (1 µl PCR produktů lokusů Ene 1, Ene 2, Ene 3, Ene 5, En-I a 1,5 µl PCR produktů lokusů Ene 4, En-G a En-B) a odeslány na fragmentační analýzu do firmy SEQme s.r.o, kde byly analyzovány s velikostním standardem GeneScan™-600 LIZ®.

Výsledky byly odečítány v programu GeneMarker ver. 1.80 (SoftGenetics, LLC, USA) a pro další zpracování převedeny na dominantní data (0/1).

3.5. Statistické zpracování

Morfometrická analýza

Pro statistické vyhodnocení dat byl využit program R (R core team 2020) v prostředí RStudio (RStudio Team 2021) a skripty MorphoTools (Koutecký 2015). Pro morfologické znaky byla provedena analýza hlavních komponent (PCA) pro zjištění celkové variability a diskriminační analýza pro hledání znaků, které nejlépe odlišují mnou definované skupiny (*E. stricta*, *E. nemorosa*, časný typ). Pokud u některého jedince nebyly přítomny všechny znaky, byl z analýzy vyloučen.

Analýza mikrosatelitů

Z binárních dat odečtených z výsledků fragmentační analýzy byly v programu FAMD 1.20 beta (Schlüter & Harris 2006) spočítány distance pomocí Jaccardova koeficientu. Ty byly dále využity pro analýzu hlavních koordinát (PCoA). Ordinační skóre z této analýzy byla vyexportována a dále zobrazena opět v programu R.

4. Výsledky

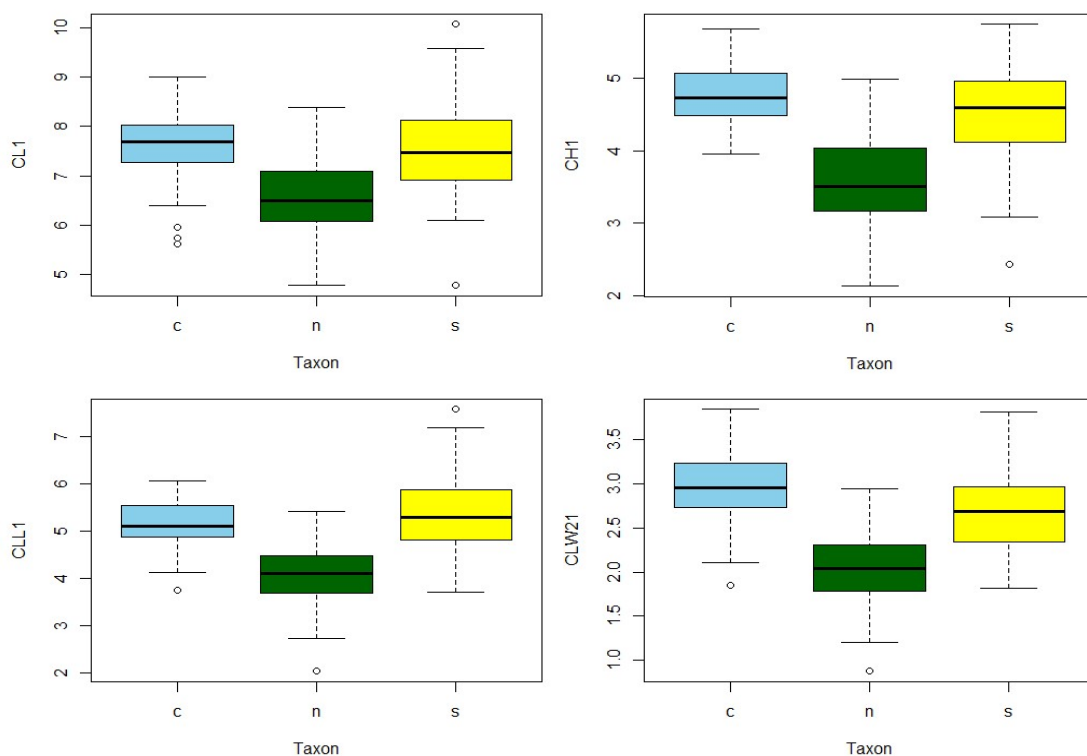
Celkem bylo morfometricky změřeno a analyzováno 199 rostlin z 23 lokalit. Na dvou lokalitách (Ryb807 a Ryb808) se vyskytovaly společně *E. stricta*, *E. nemorosa* i časné rostliny. Na všech ostatních lokalitách se vyskytoval pouze jeden taxon. Rostliny časného typu byly sbírány na 5 lokalitách, *E. nemorosa* na 9 lokalitách a *E. stricta* na 13 lokalitách.

4.1. Morfologická podobnost časného typu a druhů *E. stricta* a *E.*

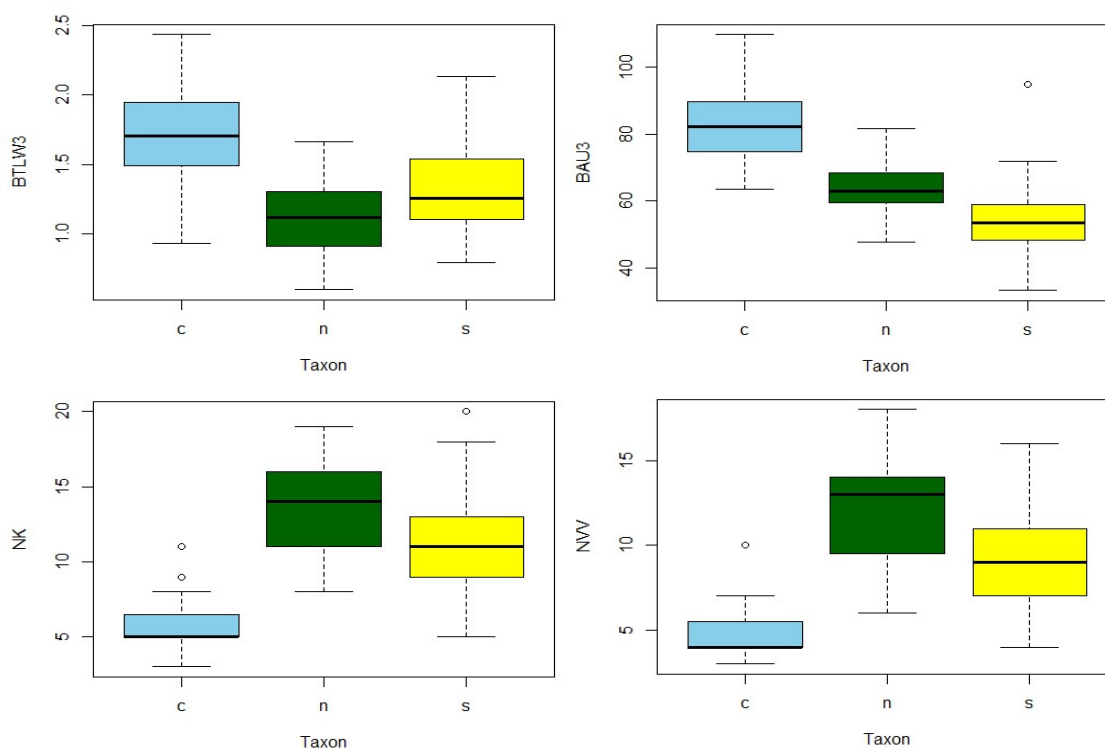
nemorosa

Při srovnání zkoumaných znaků mezi *E. stricta*, *E. nemorosa* a časným typem bylo zjištěno, že velikostí květu (CL, CTL, CH, CLL, CLU, LCD, CLW2) je časný typ bližší *E. stricta* (Obr. 4). Ve znacích na listenech je v některých znacích specifický. Má širší třetí i koncový zub třetího listenu (BT3W3 a BTLW3), větší úhel na koncovém zubu listenu (BAU3) a také širší listeny v poměru k délce (BL3/BW3). Rostliny jsou celkově spíše menší a kvetou na nižším nodu než zbylé dva druhy. Mají také méně větví, které, pokud se vyvíjejí, také rostou z nižších nodů (Obr. 5). Porovnání všech znaků je uvedeno v Příloze 2.

Přestože primárním cílem bylo porovnání časného typu, zajímavým výsledkem bylo i srovnání *E. stricta* a *E. nemorosa*. Zkoumané znaky na květech a listenech byly převzaty z práce, která se zabývala rozdíly mezi těmito dvěma druhy, zjištěné rozdíly tedy nebyly žádným překvapením. Novým výsledkem jsou však rozdíly v sezónních znacích, které byly dosud v České republice zkoumány jen okrajově. Oba druhy mají podobnou výšku k nejdolejšímu květu (V), v ostatních sezónních znacích se však *E. stricta* jeví jako mírně časnější. Kvetou na nižším nodu (NK), počet nodů k větvím [nejdolejší (N1V), nejdelší (NMV), nejhořejší (NVV)] je nižší a větví bývá méně (PV; Obr. 5). Pozorované rozdíly však nejsou příliš velké.



Obr. 4: Rozdíly v délce koruny (CL1), výšce koruny (CH1), délce dolního korunního pysku (CLL1) a polovině šířky dolního korunního pysku (CLW21) mezi časným typem a druhy *E. stricta* a *E. nemorosa*.

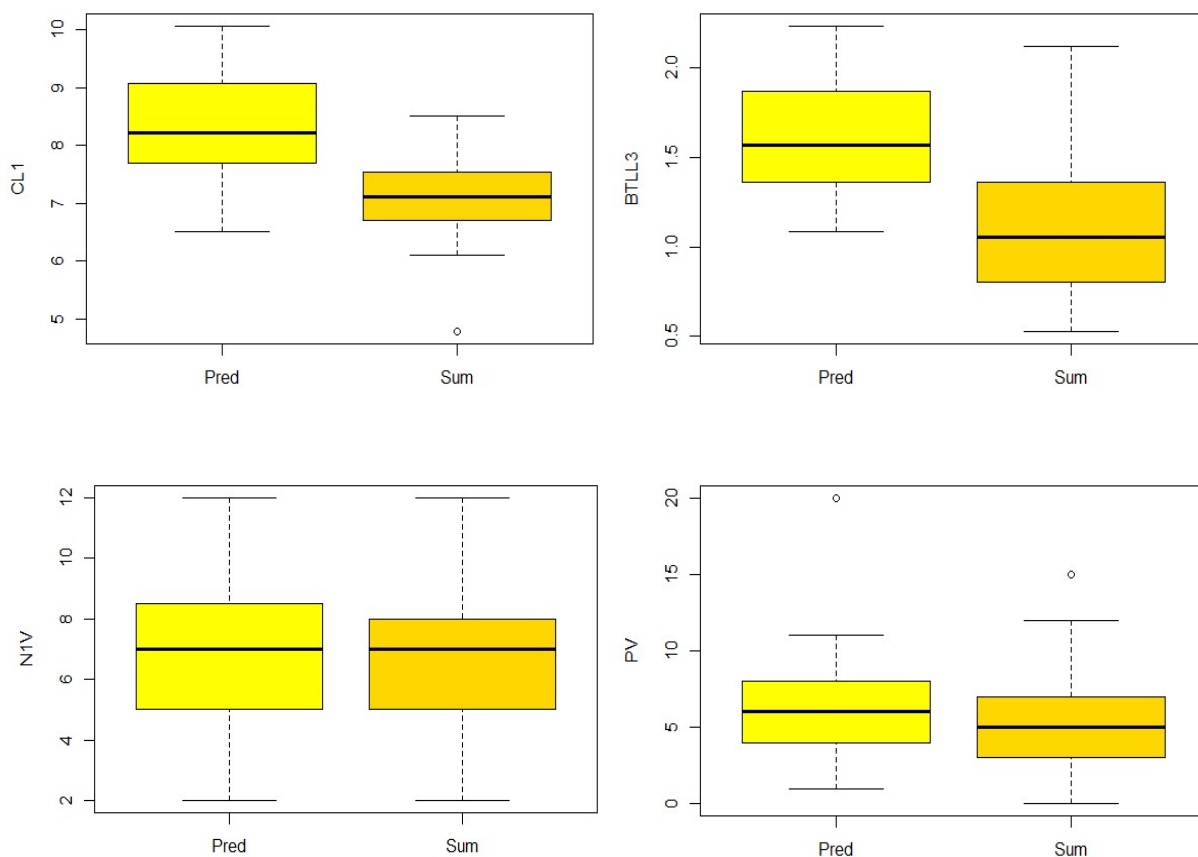


Obr. 5: Rozdíly v šířce koncového zubu listenu (BTLW3), úhlu na posledním zubu listenu (BAU3), nodu s nejspodnějším květem (NK) a nodu s nejhořejší větví (NVW) mezi časným typem a druhy *E. stricta* a *E. nemorosa*.

4.2. Rozdíly mezi populacemi *E. stricta* ze Šumavy a Předšumaví

Vzhledem k tomu, že jsem měla vzorky *E. stricta* sbírané na Šumavě v polohách nad 900 m. n. m., ale i v nižší nadmořské výšce, bylo možné tyto dva soubory dat porovnat mezi sebou. Smyslem bylo porovnat rostliny z vyšších a vlhčích a nižších a sušších poloh, které se zřejmě morfologicky liší. Lokality mimo NP Šumava budu dále nazývat předšumavskými. Celkem byla *E. stricta* sbírána na 13 lokalitách, z toho 6 bylo šumavských a 6 předšumavských. Lokalita Hal706 z Třeboňska nebyla do tohoto porovnání zahrnuta.

Zatímco počet větví (PV) a počet nodů [ke květu (NK), k 1. větvi (N1V), k nejdelší větvi (NMV) a k nejhořejší větvi (NVV)] byl u obou skupin velmi podobný, v řadě dalších znaků se obě skupiny populací opravdu lišily (Obr. 6). Nejvýraznější rozdíly byly patrné u znaků na květech (CL, CTL, CH, CLL, CLU, LDC, CLW2), kdy populace ze Šumavy měly květy menší. U znaků na listenech byl také patrný rozdíl, odlišnost však byla u jednotlivých znaků různá. Listeny šumavských rostlin měly zřejmě kratší koncový zub listenu, protože největší odlišnosti měly znaky, které s tímto rozměrem souvisí – kromě samotné délky koncového zubu listenu (BTLL) také úhel na koncovém zubu listenu (BAU) a poměr délky a šířky koncového zubu listenu (BTLL/BTLW). Dále měly šumavské populace kratší osinky na 3. zubu listenu (BT3O) a měly menší výšku k nejdolejšímu květu (V). Srovnání všech znaků je v Příloze 3.

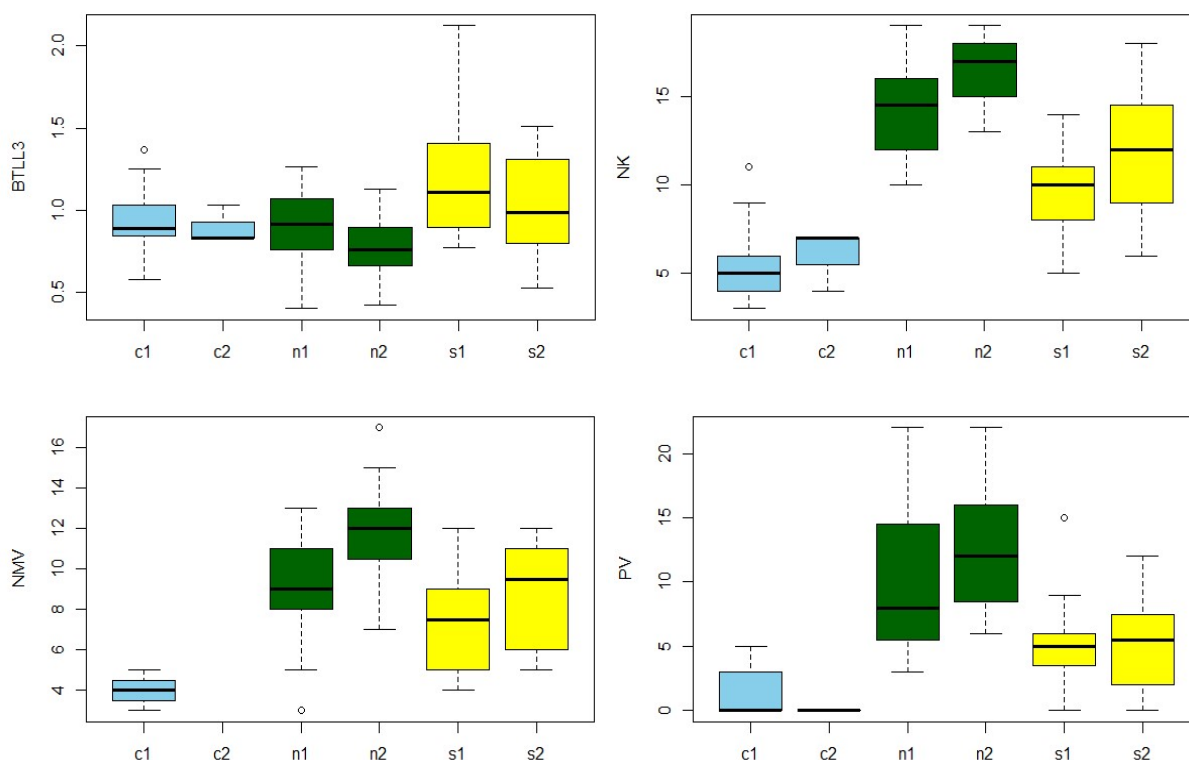


Obr. 6: Srovnání šumavských a předšumavských populací *E. stricta* pro délku koruny (CL1), délku koncového zubu 3. listenu (BTLL3), počet nodů k 1. větvi (N1V) a počet větví (PV).

4.3. Sezónní proměnlivost

23. 7. 2021 byl bohužel časný typ převážně odkvetlý, a tak byly rostliny sbírány pouze na jedné lokalitě (Ryb807). Z konce sezóny časných typů bylo tedy možné použít jen 5 rostlin. Později se ještě ukázalo, že 2 rostliny z tohoto sběru byly špatně určené (viz analýza mikrosatelitů) a byly z analýz vyřazeny, tudíž výsledky z konce sezóny časných typů (c2) můžou být dosti zkreslené.

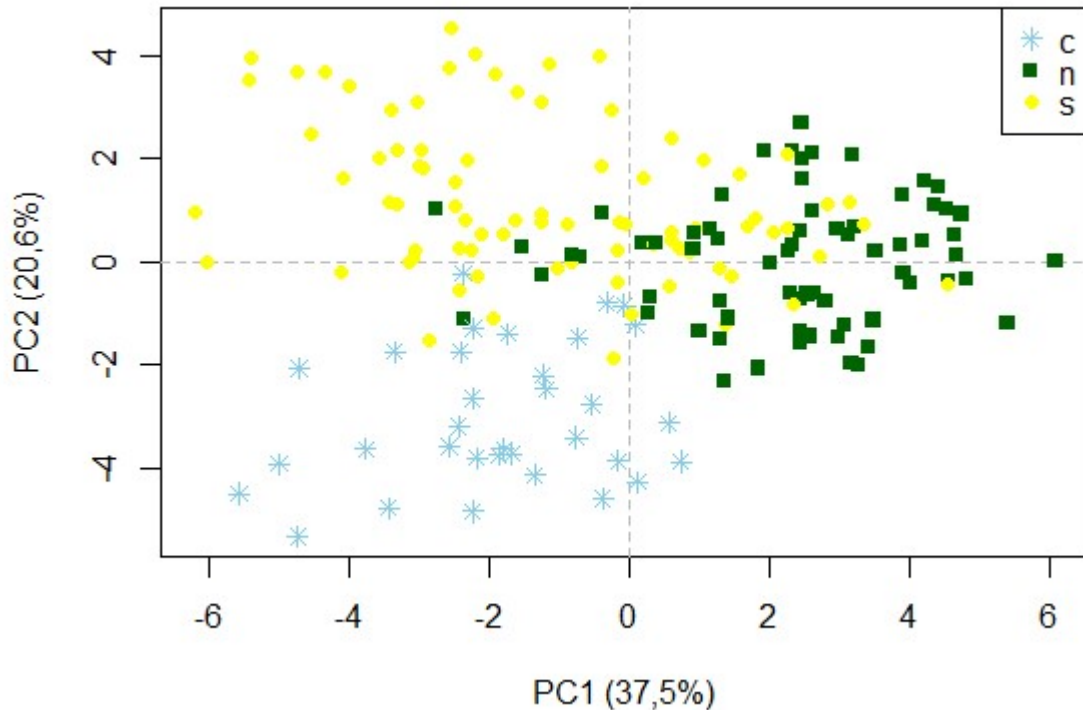
Ve znacích na květech a listenech byla většina rozdílů mezi sběry na začátku a později v sezóně nevýrazná nebo nebyla u všech taxonů stejná. Konstantní a zaznamatelný rozdíl byl pouze u délky koncového zubu listenu (BTLL), který byl později v sezóně kratší. U všech sezónních znaků byl však zaznamenán posun určitým směrem. Jedinci sbíraní později v sezóně byli v průměru vyšší, kvetli na vyšším nodu, měli větší počet nodů k nejdolejší, nejhořejší i nejdelší větvi a měli více větví (Obr. 7). Největší rozdíly byly zaznamenány u *E. nemorosa*, která mívá více nodů, vytváří nejvíce větví, a je zde tedy největší prostor pro variabilitu. Porovnání pro všechny znaky je v Příloze 4.



Obr. 7: Srovnání délky koncového zubu 3. listu (BTLL3), počtu nodů k 1. květu (NK), počtu nodů k nejdelší větvi (NIV) a počtu větví (PV) na začátku a později v sezóně, c1 = časný typ, začátek sezóny, c2 = časný typ, později v sezóně, n1 = *E. nemorosa*, začátek sezóny, n2 = *E. nemorosa*, později v sezóně, s1 = *E. stricta*, začátek sezóny, s2 = *E. stricta*, později v sezóně.

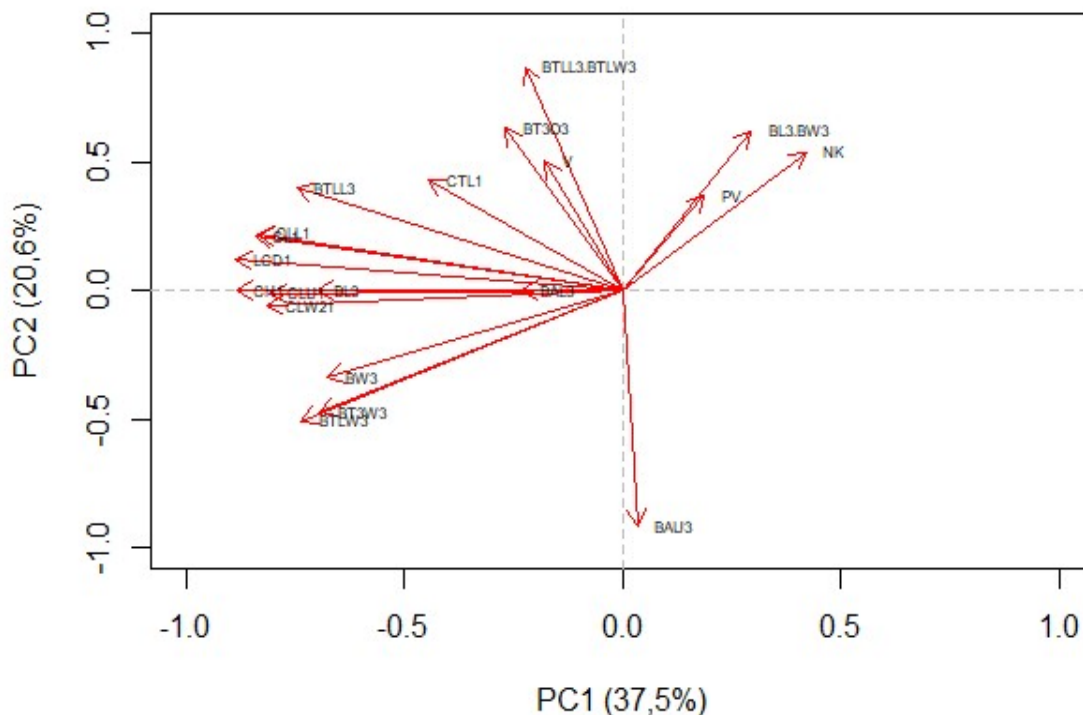
4.4. Mnohorozměrné analýzy morfologických znaků

Pro mnohorozměrné analýzy bylo využito 197 ze 199 měřených rostlin. Dvě rostliny z populace Ryb807 určené původně jako časný typ byly na základě výsledků analýzy mikrosatelitů z těchto analýz vyřazeny. Nejprve byla provedena analýza hlavních komponent (PCA) pro všechny znaky a všechny rostliny. Protože však u velké části časných rostlin nebyly přítomny větve, nemohly u nich být použity znaky na větvích a mnoho časných rostlin kvůli tomu nebylo do analýzy vůbec zahrnuto. Následně proto byla provedena další PCA s vypuštěním znaků na větvích (NIV, NMV, NVV, UV, TV). Ordinační diagram z této analýzy je na Obr. 8.



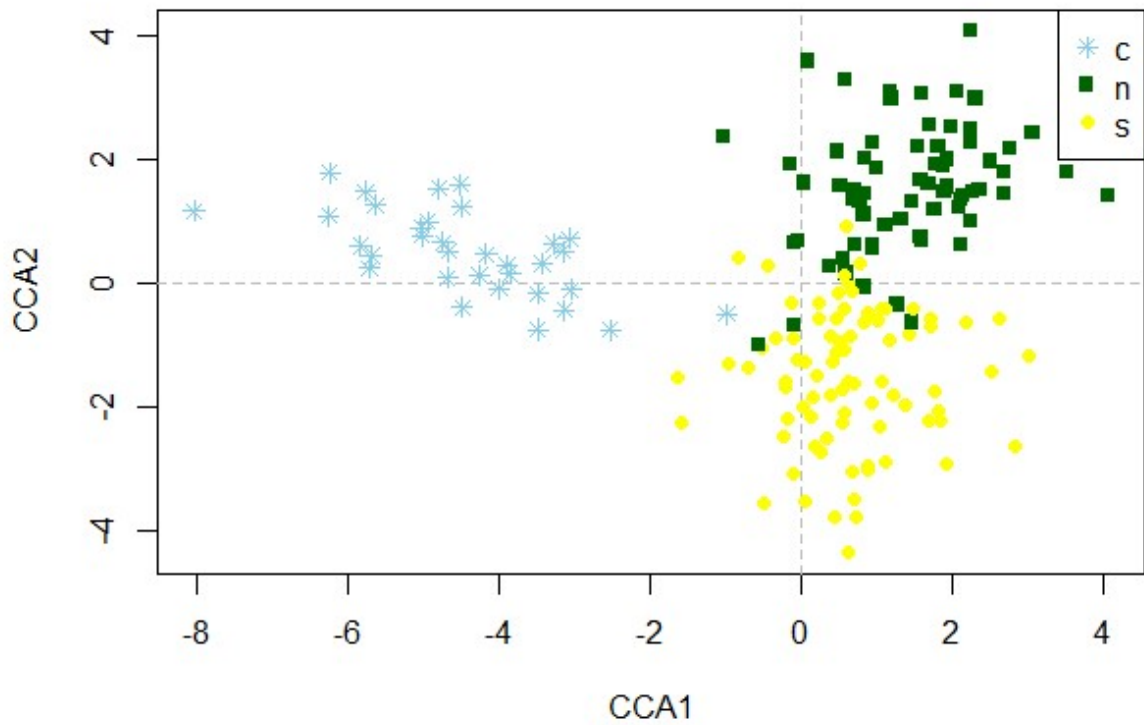
Obr. 8: Rozmístění měřených rostlin v ordinačním prostoru PCA analýzy pro znaky s vyloučením znaků na větvích (N1V, NMV, NVV, UV, TV), c = rostliny časného typu, n = *E. nemorosa*, s = *E. stricta*. První osa vysvětluje 37,5% variability, druhá osa 20,6% variability.

Výsledek PCA analýzy pro jednotlivé znaky je na Obr. 9. S první ordinační osou jsou korelovány zejména znaky na květech (CL, CTL, CH, CLL, CLU, LDC, CLW21) a délka koncového zubu listenu (BTLL3). S druhou osou je nejvíce korelován úhel na koncovém zubu listenu (BAU3), poměr délky a šířky posledního zubu listenu (BTLL/BTLW), výška k nejdolejšímu květu (V) a délka osinky na 3. zubu listenu (BT3O3).

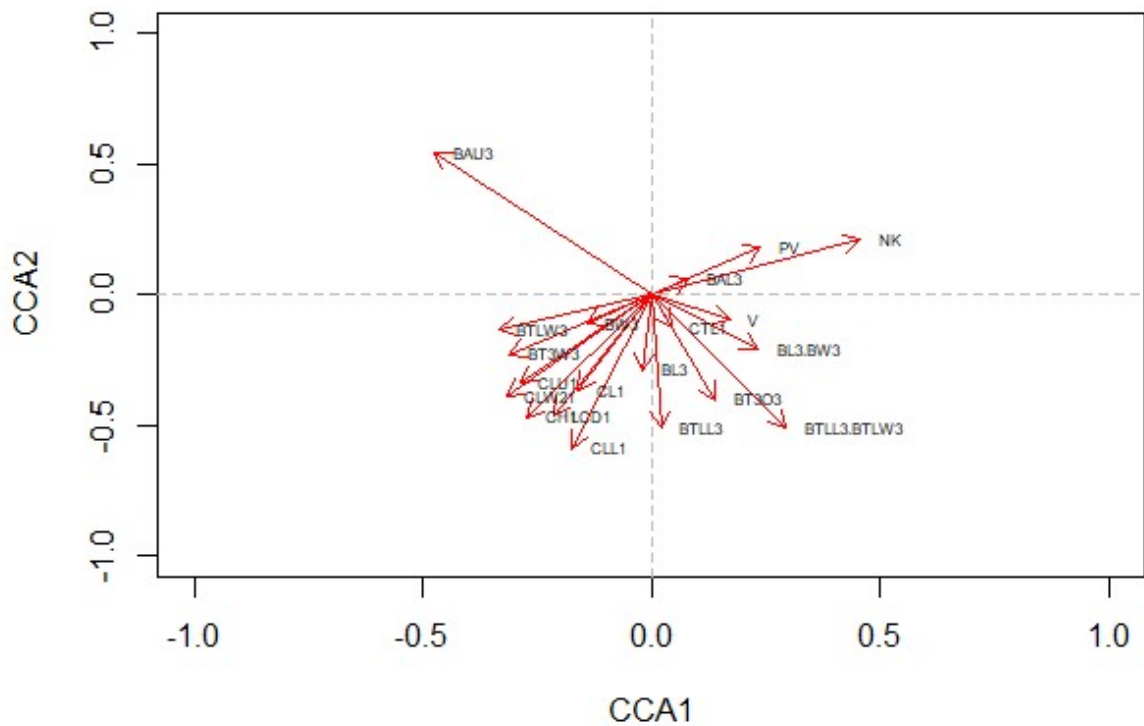


Obr. 9: Korelace měřených znaků s ordinačními osami PCA analýzy pro znaky s vyloučením znaků na větvích (NIV, NMV, NVV, UV, TV).

Následně provedená diskriminační analýza odlišila definované skupiny (časný typ, *E. nemorosa*, *E. stricta*) ještě lépe (Obr. 10). I pro tuto analýzu nebyly použity znaky na větvích ze stejného důvodu jako u analýzy hlavních komponent. Diskriminační analýza pro vliv jednotlivých znaků je na Obr. 11. Největší vliv na oddělení podle první osy má úhel na koncovém zubu listenu (BAU) a počet nodů ke květu (NK). Na odlišení podle druhé osy má největší vliv délka dolního korunního pysku (CLL) a opět úhel na koncovém zubu listenu (BAU). Velký vliv má také délka koncového zubu listenu (BTLL) a poměr délky a šířky koncového zubu listenu (BTLL/BTLW). Příspěvek znaků k jednotlivým diskriminačním osám je uveden v Příloze 5. Výpovědní hodnoty znaků na základě testů jsou zobrazeny v Tab. VI. Nejprve jsou zde uvedeny hodnoty pro jednotlivé znaky samostatně a následně pro unikátní příspěvek každého znaku v modelu se všemi znaky.



Obr. 10: Rozmístění všech měřených rostlin v ordinačním prostoru diskriminační analýzy pro znaky (bez znaků na větvích – N1V, NMV, NVV, UV, TV), c = rostliny časného typu, n = *E. nemorosa*, s = *E. stricta*.



Obr. 11: Korelace morfologických znaků s osami diskriminační analýzy pro znaky (bez znaků na větvích – N1V, NMV, NVV, UV, TV).

Tab. VI: Hodnoty testů diskriminační analýzy pro samostatné znaky a pro unikátní příspěvek znaků.

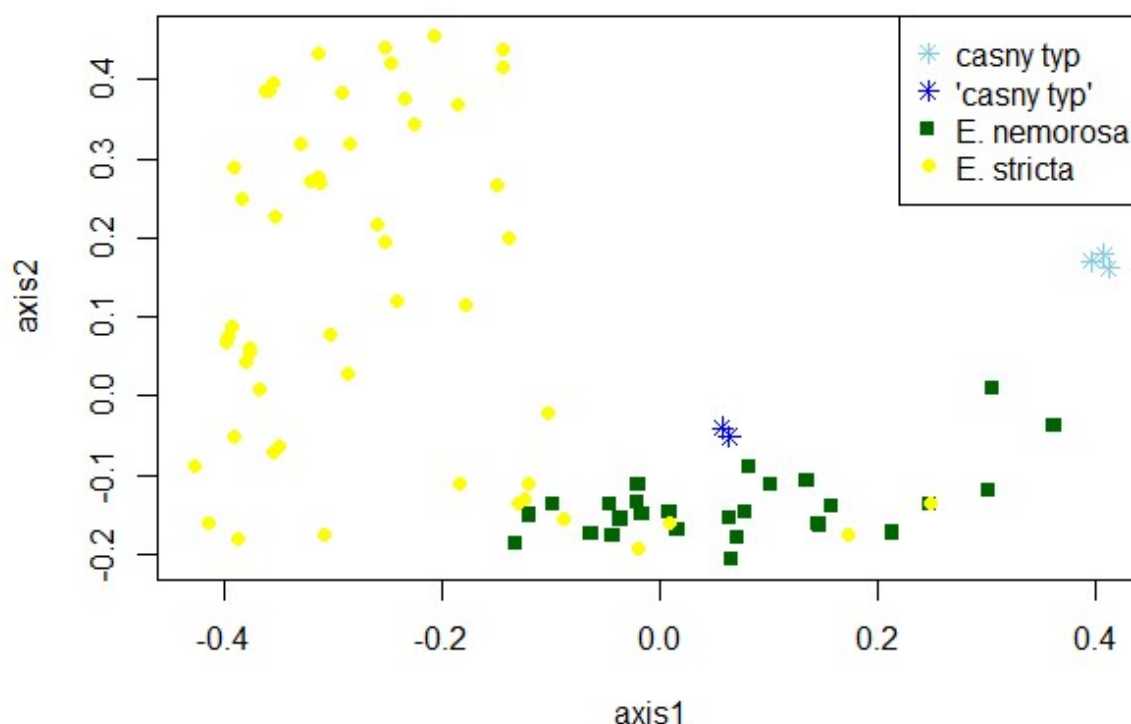
znak	znaky samostatně		unikátní příspěvek	
	F	p	F	p
CL1	22,68	0,005	1,34	0,261
CTL1	2,36	0,135	5,79	0,009
CH1	33,53	0,005	5,01	0,007
CLL1	36,10	0,005	10,17	0,001
CLU1	24,37	0,005	9,18	0,001
LCD1	28,33	0,005	6,09	0,003
CLW21	29,51	0,005	7,39	0,002
BL3	13,03	0,005	2,28	0,102
BW3	12,90	0,005	0,26	0,779
BTLW3	23,50	0,005	6,07	0,003
BTLL3	26,68	0,005	1,52	0,231
BT3W3	22,82	0,005	1,50	0,223
BT3O3	15,16	0,005	3,27	0,045
BAL3	0,68	0,540	1,96	0,112
BAU3	41,89	0,005	6,31	0,002
BL3/BW3	12,74	0,005	0,03	0,980
BTLL3/BTLW3	24,86	0,005	1,70	0,193
V	2,29	0,110	0,50	0,635
NK	22,30	0,005	4,03	0,023
PV	11,06	0,005	4,15	0,019

4.5. Analýza mikrosatelitů

Pro analýzu mikrosatelitů bylo využito 203 rostlin, oproti morfometrickým analýzám byly navíc zahrnuty rostliny sbírané na lokalitě Ryb808 v době, kdy již nebyly pro morfometrická měření použitelné. Analýza 8 mikrosatelitních lokusů u všech jedinců odhalila celkem 41 alel (8 pro Ene 1, 3 pro Ene 2, 8 pro Ene 3, 3 pro Ene 4, 4 pro Ene 5, 2 pro En-G, 8 pro En-B a 5 pro En-I). Málo informace přinášel lokus En-G, kde se objevily dvě alely, jedna fixovaná u všech vzorků a druhá naopak vzácná, vyskytující se pouze u jedné populace. U *E. nemorosa* se vyskytovaly 3 privátní alely, u *E. stricta* 4 a časný typ neměl žádnou privátní alelu. Žádná z privátních alel nebyla fixovaná.

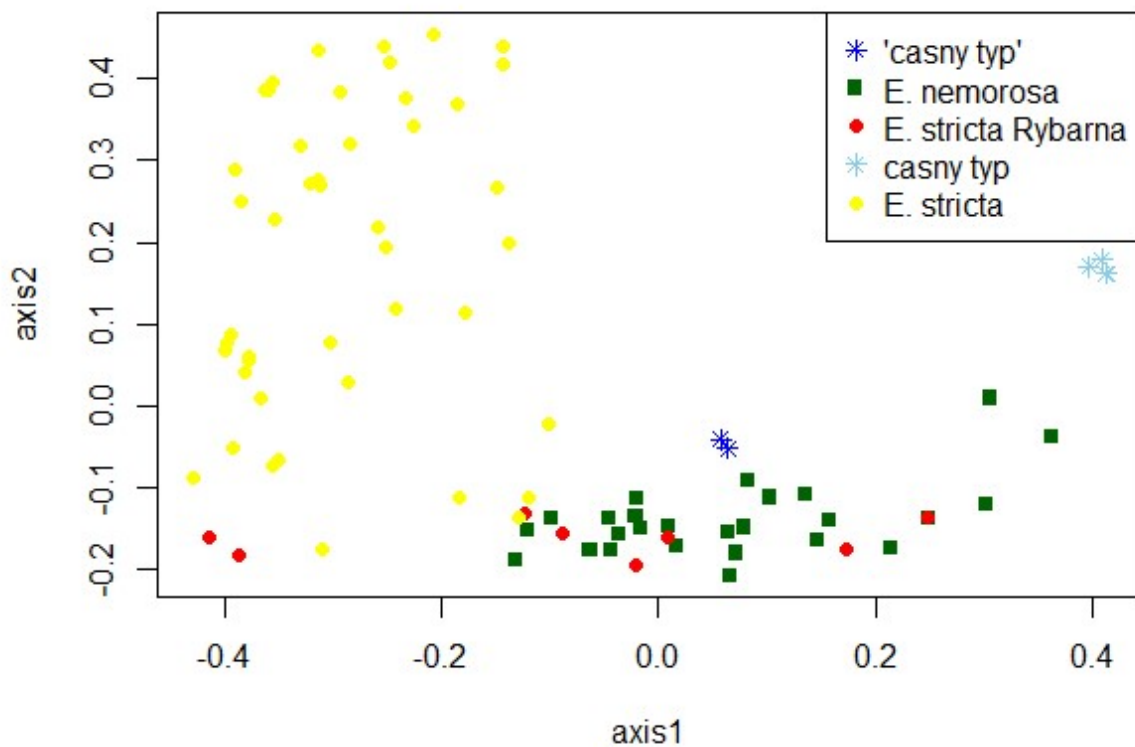
Rostliny časného typu byly nápadně uniformní. Jejich genotyp definovaný mikrosatelitními markery byl identický téměř u všech rostlin a odchylky se vyskytly jen velmi vzácně.

Na Obr. 12 je grafický výstup z analýzy hlavních koordinát (PCoA). Hlavní shluky *E. stricta* a *E. nemorosa* jsou vcelku dobře oddělené, časný typ leží na okraji skupiny *E. nemorosa*, od které je jen velmi slabě oddělený. Dvě rostliny určené v terénu jako časný typ se na základě mikrosatelitů od ostatních časných rostlin výrazně odlišují (Na Obr. 12 vyznačené tmavě modrou barvou). Tyto rostliny pochází z populace Ryb807, kde se vyskytují všechny tři taxony světlíků. Rostliny byly sbírány 23. 7. 2021, kdy již časný typ pomalu odkvétal a zároveň rostliny *E. stricta* a *E. nemorosa* už začínaly kvést.



Obr. 12: Rozmístění zkoumaných jedinců v ordinačním prostoru PCoA podle první a druhé osy. První osa vysvětluje 41,8% variability, druhá osa 15,8%.

Do shluku *E. nemorosa* spadají některé rostliny určené v terénu jako *E. stricta*. Při zobrazení jednotlivých populací bylo zjištěno, že tento překryv je způsoben rostlinami *E. stricta* z populací od Rybárny (Ryb807, Ryb808; viz Obr. 13). Na těchto lokalitách se vyskytovaly oba druhy světlíků i časný typ. Je zde tedy možná jak chyba při určování, tak mezidruhovú hybridizace ovlivňující genetickou i morfologickou variabilitu rostlin.



Obr. 13: Rozmístění zkoumaných jedinců v ordinačním prostoru PCoA podle první a druhé osy se zvýrazněním populací od Rybárny (Ryb807 a Ryb808; červeně).

5. Diskuse

Rod *Euphrasia* je známý rychlou speciací a tvorbou endemických i velmi lokálních typů (Sell & Yeo 1970, Yeo 1978, Kolseth & Lönn 2005, Metherell & Rumsey 2018). Příčinou může být jednoletost rostlin spolu s velmi rychlou selekcí na konkrétní prostředí. Tyto faktory jsou významné i u příbuzných poloparazitických rodů. Kromě rodu *Euphrasia* byla zatím největší pozornost věnována rodům *Melampyrum* a *Rhinanthus* (Zopfi 1993). Adaptace na konkrétní prostředí se často projevuje optimalizací životního cyklu. Výsledkem je sezónní proměnlivost, která zásadním způsobem ovlivňuje množství a dobu zralosti semen a úzce souvisí s délkou vegetační sezóny v daných podmínkách (Zopfi 1998). Krátká vegetační sezóna může být způsobena přirozeně (hlavně klimatem) nebo i v důsledku činnosti člověka, například kosením.

Časné typy jsou často vázány na horské prostředí, kde je vegetační doba zpravidla velmi krátká (Smejkal & Dvořáková 2000). Dalším biotopem s časnými typy jsou často druhově bohaté luční porosty s vegetační dobou uměle zkrácenou sečí (Karlsson 1984, Zopfi 1998). V České republice je časný druh *E. coerulea* udáván pouze ze sudetských a karpatských pohoří z vyšších poloh nebo druhově bohatých horských a podhorských luk. *Euphrasia officinalis* var. *monticola* se také vyskytuje spíše ve vyšších polohách (Štech 2019). Nově nalezený časný typ není v tomto ohledu výjimkou. Všechny lokality tohoto typu se nacházejí v blízkosti Roklanského a Javořího potoka ve vrcholové části Šumavy. Obecně však vazba časných typů na horské prostředí není striktní, mohou se vyskytovat i v nižších polohách jako např. některé druhy Velké Británie (Metherell & Rumsey 2018).

Zopfi (1998) zmiňuje mimo další biotopy výskyt časných rostlin *E. rostkoviana* (= *E. officinalis* subsp. *rostkoviana*) také v alpínských pastvinách vysokých poloh, které jsou intenzivně spásané v časném létě. Časné typy tam stihnou vyvinout semena včas, což jim přináší selekční výhodu. Lokality na Šumavě s výskytem časného typu se nacházejí podél cest, k pastvě zde tedy nedochází. Bylo však pozorováno, že zde dochází k seči a případně mulčování porostu v těsné blízkosti turistické trasy. Výhoda krátké vegetační doby časného typu by tak mohla být v těchto místech obdobná. Odpovídalo by to zjištění Karlssona (1976), který zaznamenal korelaci mezi počtem internodií k nejdolejšímu květu (jeden z hlavních rozlišovacích znaků časných rostlin) a délkou vegetační sezóny. V jeho případě byla vegetační sezóna zkrácena právě sečí.

Doba květu časného typu je od ostatních dvou pozdních druhů poměrně výrazně odlišná. K jistému překryvu sice dochází, ale je velmi mírný. Tato reprodukční izolovanost může mít za následek pozorovanou genetickou jednotu časných rostlin. Přestože se u světlíků

často vyskytuje autogamie, její podíl je větší u malokvětých druhů (French et al. 2005). Časný typ má však květy spíše středně velké, podobně jako *E. stricta*, nelze tedy předpokládat převažující autogamii. Příčinou genetické uniformity by pak mohl být např. extrémní founder effect s následnou izolací způsobenou dobou květu.

Izolovanost populací časného typu od ostatních druhů však zřejmě není úplná. K hybridizaci může docházet zvláště s druhem *E. stricta*, který je mírně časnější a kvetoucí rostliny obou taxonů se mohou na lokalitě vyskytovat současně. Příkladem toho jsou dvě rostliny určené v terénu jako časný typ, které však podle analýzy mikrosatelitů vyšly odlišně. Při zpětné revizi těchto dvou rostlin se ukázalo, že byly chybně určeny především proto, že měly dlouhá internodia a nacházely se již v pozdní fázi kvetení. Ostatní rostliny pozdních typů tou dobou teprve začínaly kvést. Na druhou stranu jedna chybně určená rostlina byla bohatě větvená a měla výrazně ostřejší zuby na listenu, včetně koncového zubu. Druhá rostlina větvená nebyla, ostřejší zuby na listenu však měla také, i když zde byl méně výrazný rozdíl. Vzhledem k tomu, že tyto dvě rostliny sdílejí část znaků s časným typem a část s některým z pozdějších druhů, dá se předpokládat, že se jedná o hybridní jedince. Podle PCoA byly tyto rostliny nejbližší druhu *E. nemorosa*. Pokud bychom však sledovali rozdělení pouze podle první osy, nacházejí se přesně mezi časným typem a *E. stricta*. Hybridizace s *E. stricta* se jeví jako pravděpodobnější možnost, protože není očekáván překryv doby kvetení časného typu a *E. nemorosa*.

Pokud je předpoklad o hybridním původu rostlin pravdivý a mezi taxony není jiná než fenologická reprodukční bariéra, lze předpokládat, že k hybridizaci bude i nadále docházet a může dojít i k vytvoření postupného gradientu. Ovšem probíhající seč může naopak selekčně působit proti vzniku hybridů kvetoucích právě v její obvyklé době.

Původ zkoumaného časného typu s velmi omezeným rozšířením není jasný. Vzhledem k veliké plasticitě rostlin a schopnosti rodu *Euphrasia* tvořit poměrně rychle nové populace (Vitek 1998, Zopfi 1998) lze předpokládat, že by mohl být odvozen od jiných druhů rostoucích v jeho blízkosti. Morfologicky se zkoumaný časný typ od obou potenciálních rodičovských druhů *E. stricta* a *E. nemorosa* významně liší. Největší rozdíly jsou v sezónních znacích a ve tvaru listenů, zejména pak ve tvaru posledního zubu listenu. Tupější zuby na listenech u časných typů zmiňuje např. Smejkal (1963b), tradičně je však pro odlišování používán zejména nodus s nejdolejším květem, přítomnost a charakter větvení a zachovalost děloh za květu (Smejkal 1963b, Smejkal & Dvořáková 2000, Štech 2019). Tyto znaky jsou používány pro odlišení časných typů i u jiných rodů s podobnou strukturou variability (např. *Rhinanthus* – Zopfi 1993, *Melampyrum* – Štech 2000).

Na základě analýzy mikrosatelitů časné populace odpovídají spíše druhu *E. nemorosa*. Toto zařazení je komplikované kvůli genetické homogenitě všech časných rostlin. V konkrétních alelách se však časné rostliny nejvíce podobají *E. nemorosa* z populací Ryb807 a Ryb808. Jedná se o smíšené populace, kde se vyskytují všechny tři taxony a potenciálně o populace, kde šumavský časný typ vznikl. Všechny časné typy totiž sdílejí alelu B-193, která se jinak vyskytuje u obou dalších druhů, ale výhradně v těchto populacích. Tvarem listenů se časný typ také blíží spíše *E. nemorosa*, avšak zde je v některých ohledech unikátní. Časný typ má oproti *E. nemorosa* větší květy, což je ovšem skutečnost, která pro časné typy zřejmě platí obecně (Štech 1998). Pokud by tedy časný typ vznikl z *E. stricta*, lze předpokládat, že by měl květy ještě větší.

Morfologicky blízké rostliny se vyskytují v sudetských pohořích a v Karpatech a jsou řazeny k druhu *E. coerulea*. Podobně jako šumavský časný typ, i *E. coerulea* se zdá být podle analýzy mikrosatelitů poněkud bližší *E. nemorosa*, na rozdíl od šumavských rostlin je však geneticky variabilní (Svobodová et al. 2016). Kromě jiné oblasti výskytu se *E. coerulea* od šumavského časného typu liší také oděním. To však může být dosti variabilní a Svobodová (et al. 2016) i Štech (2019) zmiňují existenci i téměř lysých forem. Srovnání šumavského časného typu s druhem *E. coerulea* po stránce morfologické a především genetické by tak bylo velice vhodné, zejména před rozhodnutím o taxonomickém hodnocení šumavského časného typu.

E. stricta je velice variabilní druh. Najdeme zde žláznaté i lysé formy jak časných, tak i pozdních typů (Smejkal 1963a, Karlsson 1984). Značně variabilní je zejména v severských oblastech, zvláště ve východních pobřežních oblastech (Karlsson 1976). Velká část této variability nemusí být geneticky daná. Kolseth & Lönn (2005) pozorovali na Gotlandu geneticky jednotné populace pozdních typů, které se mezi sebou morfologicky lišily v závislosti na prostředí. Podobně Karlsson (1984) zaznamenal v závislosti na prostředí tendenci ke zmenšování květů. Morfologické rozdíly, zvláště ve velikosti květu, byly pozorovány i mezi populacemi na Šumavě a populacemi v nižších polohách. Příčiny těchto rozdílů však nejsou jasné. Může se jednat o stanovištní modifikace, či o mírně odlišné sezónní typy, které se liší nejen habitem a počtem lodyžních článků, ale také velikostí květů. Moje studie ukázala, že geneticky se většina populací *E. stricta* ze Šumavy neodlišuje od populací z Předšumaví. Rozdíly nebyly zjištěny ani v sezónních znacích, rostliny se lišily pouze výškou a velikostí květů a listenů. Menší květy, listeny a výška rostlin je tak spíše adaptací na horské podmínky Šumavy. Vzhled poloparazitických rostlin může být také ovlivněn nepřímo přes hostitele, kteří mohou mít v Předšumaví lepší podmínky.

Většina studovaných populací šla, s trochou zkušenosti, vcelku dobře určit. Problémy s určováním se projevily ve smíšených populacích Ryb807 a Ryb808, kde analýza PCoA přiřadila část rostlin původně určených jako *E. stricta* do blízkosti *E. nemorosa*. Jedním z možných vysvětlení je převaha druhu *E. nemorosa* na lokalitě a chyby při určování v terénu způsobené především netypickým vzhledem *E. stricta* ve vysokých polohách. Druhou možností je přítomnost hybridních rostlin, které geneticky ani morfologicky úplně neodpovídají ani jednomu z rodičovských druhů. Vzhledem k tomu, že hybridizace je mezi světlíky považována za běžný jev, zvláště při kontaktu obou rodičovských druhů (např. Smejkal 1963a), považuji tuto možnost za pravděpodobnější. Na základě srovnání konkrétních alel v analýze mikrosatelitů však nelze vyloučit, že v některých případech došlo i k chybnému určení.

Byl pozorován posun v průběhu sezóny především u sezónních znaků a tvaru posledního zubu listenu. U ostatních znaků nebyl posun žádný nebo nebyl jednoznačný. Pozorované změny však probíhaly pouze v určitém rozmezí daného taxonu. Podobné změny byly již dříve zaznamenány např. u druhu *Melampyrum nemorosum* (Štech 2000).

6. Závěr

Tato práce se zabývá rostlinami časného typu na Šumavě a jejich srovnáním s geograficky blízkými populacemi druhů *E. stricta* a *E. nemorosa*. Dále se zaměřuje na sezónní variabilitu obou druhů i časných rostlin a rozdíly mezi populacemi *E. stricta* sbíranými na Šumavě a v Předšumaví.

Rostliny časného typu jsou morfologicky unikátní. Od druhů *E. stricta* a *E. nemorosa* je lze nejlépe odlišit malým počtem lodyžních článků a tvarem listenů, zejména zřetelně větším úhlem na koncovém zubu listenu. Geneticky jsou časný typy velmi jednotné a s velkou pravděpodobností bližší rostlinám *E. nemorosa* rostoucím na stejné lokalitě. Nalezeny byly zatím jen na několika málo lokalitách podél Roklanského a Javořího potoka na Šumavě. Taxonomické zhodnocení šumavského časného typu bude možné až po srovnání s dalšími časnými typy světlíků i mimo zájmové území.

Dále bylo zkoumáno, zda u sledovaných taxonů dochází k posunu znaků v průběhu sezóny. U druhů *E. stricta* a *E. nemorosa* byl zaznamenán posun v délce koncového zubu listenu, v tzv. sezónních znacích, a také celkově časnější charakter *E. stricta* proti *E. nemorosa*.

Sezónní znaky byly také jediné, které se nelišily u rostlin *E. stricta* mezi Šumavou a Předšumavím. V ostatních znacích, zejména ve velikosti květů, byly zjištěny rozdíly.

7. Seznam použité literatury

- Becher H., Powell R. F., Brown M. R., Metherell C., Pellicer J., Leitch I. J. & Twyford A. D. (2021) The nature of intraspecific and interspecific genome size variation in taxonomically complex eyebrights. – *Annals of Botany* 128: 639–651.
- Bolliger M. (1996) Monographie der Gattung *Odontites* (*Scrophulariaceae*) sowie der verwandten Gattungen *Macrosyringion*, *Odontitella*, *Bornmuellerantha* und *Bartsiella*. – *Willdenowia* 26: 37–168.
- Brown M. R., Frachon N., Wong E. L. Y., Metherell C. & Twyford A. D. (2020) Life history evolution, species differences, and phenotypic plasticity in hemiparasitic eyebrights (*Euphrasia*). – *American Journal of Botany* 107(3): 1–10.
- French G. C., Ennos R. A., Silverside A. J. & Hollingsworth P. M. (2005) The relationship between flower size, inbreeding coefficient and inferred selfing rate in British *Euphrasia* species. – *Heredity* 94(1): 44–51.
- Gemayel R., Cho J., Boeynaems S. & Verstrepen K. J. (2012) Beyond Junk-Variable Tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. – *Genes* 3(3): 461–480.
- Gussarova G., Popp M., Vitek E. & Brochmann C. (2008) Molecular phylogeny and biogeography of the bipolar *Euphrasia* (Orobanchaceae): Recent radiations in an old genus. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(2): 444–460.
- Hartl D. (1974) *Euphrasia* L. In: Hartl D. & Wagenitz G. (eds) *Hegi's Illustrierte Flora von Mitteleuropa* 6/1: 335–373. 2nd Ed. Munich, Carl Hanser.
- Chytrý M., Danihelka J., Kaplan Z., Wild J., Holubová D., Novotný P., Řezníčková M., Rohn M., Dřevojan P., Grulich V., Klimešová J., Lepš J., Lososová Z., Pergl J., Sádlo J., Šmarda P., Štěpánková P., Tichý L., Axmanová I., Bartušková A., Blažek P., Chrtek J. Jr., Fischer F. M., Guo W.-Y., Herben T., Janovský Z., Konečná M., Kühn I., Moravcová L., Petřík P., Pierce S., Prach K., Prokešová H., Štech M., Těšitel J., Těšitelová T., Večeřa M., Zelený D. & Pyšek P. (2021) *Pladias Database of the Czech Flora and Vegetation*. – *Preslia* 93: 1–87.
- Jonstrup A., Hedrén M. & Andersson S. (2016) Host environment and local genetic adaptation determine phenotype in parasitic *Rhinanthus angustifolius*. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 180: 89–103.

- Karlsson T. (1976) *Euphrasia* in Sweden: hybridization, parallelism and species concept. – *Botaniska Notiser* 129: 49–60.
- Karlsson T. (1984) Early-flowering taxa of *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*) on Gotland, Sweden. – *Nordic Journal of Botany* 4: 303–326.
- Karlsson T. (1986) The evolutionary situation of *Euphrasia* in Sweden. *Symbolae Botanicae Upsalienses* 27: 61–71.
- Kolseth A.-K. & Lönn M. (2005) Genetic structure of *Euphrasia stricta* on the Baltic island of Gotland, Sweden. – *Ecography* 28:443–452.
- Koutecký P., Tuleu G., Bad'urova T., Košnar J., Štech M. & Těšitel J. (2012) Distribution of cytotypes and seasonal variation in the *Odontites vernus* group in central Europe. – *Preslia* 84: 887–904.
- Koutecký P. (2015) MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. – *Plant Systematics and Evolution* 301: 1115–1121.
- Krok T., Almqvist S., Jonsell L. & Jonsell B. (2013) *Svensk flora. – Fanerogamer och kärlkryptogamer*, 29th Ed. Stockholm, Liber AB.
- Metherell C. & Rumsey F. J. (2018) *Eyebrights (Euphrasia) of the UK and Ireland*. – BSBI Handbook No. 18, Bristol.
- Moura M., Dias E. F. & Belo Maciel M. G. (2018) Conservation genetics of the highly endangered Azorean endemics *Euphrasia azorica* and *Euphrasia grandiflora* using new SSR data. – *Conservation Genetics* 19: 1211–1222.
- Pladias – databáze české flóry a vegetace, www.pladias.cz, přístup 27. 1. 2022.
- R Core Team (2020) *R: A language and environment for statistical computing*. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org/>.
- RStudio Team (2021) *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, PBC, Boston, MA, <http://www.rstudio.com/>.
- Sell P. D. & Yeo P. F. (1970) A revision of the North American species of *Euphrasia* L. (*Scrophulariaceae*). – *Botanical Journal of the Linnean Society* 63(3): 189–234.

- Schlüter P. M. & Harris S. A. (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. – *Molecular Ecology* 6: 569–572.
- Schneider C., Rasband W. & Eliceiri K. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. – *Nature Methods* 9: 671–675.
- Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. – *Nature Biotechnology* 18: 233–234.
- Schwarz O. (1935) Ueber einige *Euphrasia*- und *Rhinanthus*-Arten des hoechstens Erzgebirges. – *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis* 36: 43–48.
- Smejkal M. (1963a) Taxonomické studie československých druhů rodu *Euphrasia* L. – *Biologické práce, Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied, Bratislava* 9 (9): 1–83.
- Smejkal M. (1963b) Zum Problem der Art, Entstehung und taxonomischen Bewertung der Saisonvikaristen in der Gattung *Euphrasia*. – *Spisy Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně, Brno* 442: 169–193.
- Smejkal M. (1964) Rozšíření a ekologicko-fyocenologická charakteristika československých světlíků (*Euphrasia* L.). – *Spisy Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně, Brno* 452: 173–217.
- Smejkal M. & Dvořáková M. (2000) *Euphrasia* L. – In Slavík B. [ed.] (2000): *Květena České republiky* 6, 430–449, Academia, Praha.
- Soó R. v. (1926) Systematische Monographie der Gattung *Melampyrum* I., II., III. – *Feddes Repertorium*, 1926–1927.
- Stace C. A., Preston C. D. & Pearman D.A. (2015) *Hybrid flora of the British Isles*. – *Botanical Society of Britain & Ireland*, Bristol.
- Sterneck J. v. (1901) Monographie der Gattung *Alectorolophus*. – *Abhandlungen Zoologische -Botanische Gesellschaft*, Wien.
- Svobodová Š. (2008) Morfologická variabilita druhů *Euphrasia stricta* a *Euphrasia nemorosa*. [Morphological variability of species *Euphrasia stricta* and *Euphrasia nemorosa*. Bc. Thesis, in Czech] – 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

- Svobodová Š., Košnar J., Koutecký P. & Štech M. (2016) Microsatellite analysis of four similar *Euphrasia* (*Orobanchaceae*) species changes the traditional view of this group. – *Plant Ecology and Evolution* 149(1): 45–58.
- Štech M. (2000) Seasonal variation in *Melampyrum nemorosum*. – *Preslia* 72: 345–368.
- Štech (2013) *Euphrasia* L. – In: Lepší P., Lepší M., Boublík K., Štech M., & Hans V. (Eds) Červená kniha květeny jižní části Čech: 195–196, Jihočeské muzeum v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Štech M. (2019) *Euphrasia* L. – In: Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds) Klíč ke květeně České republiky: 908–912, Ed. 2, Academia, Praha.
- Tank D. C., Beardsley P. M., Kelchner S. A. & Olmstead R. G. (2006) Review of the systematics of *Scrophulariaceae* s. l. and their current disposition. – *Australian Systematic Botany* 19: 289–307.
- Těšitel J., Říha P., Svobodová Š., Malinová T. & Štech M. (2010) Phylogeny, Life History Evolution and Biogeography of the Rhinanthoid *Orobanchaceae*. – *Folia Geobotanica* 45: 347–367.
- Vieira, M. L. C., Santini L., Diniz A. L. & Munhoz C. F. (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. – *Genetics and molecular biology* 39,3: 312–328.
- Vitek E. (1982) Zwei neue Hybriden in der Gattung *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*). – *Plant Systematics and Evolution* 139: 319–322.
- Vitek E. (1998) Are the taxonomic concepts of agamospermous genera useful for autogamous groups – a critical discussion using the example of *Euphrasia* (*Scrophulariaceae*). – *Folia Geobotanica* 33:349–352.
- Vitek E. (2005) Augentrost / *Euphrasia*. In: Fischer M. A., Adler W. & Oswald K. (eds) Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol: 751–753, Linz, Oberösterreichisches Landesmuseum.
- Vitek E. (2011) *Euphrasia*. In: Jäger E. J. (ed.) Rothmaler - Exkursionsflora von Deutschland. Gefäßpflanzen: Grundband, Auflage: 20. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

- Vitek E. (2020) Book review: Metherell C. & Rumsey F. J., *Eyebrights (Euphrasia) of the UK and Ireland*. – *Willdenowia* 50: 77–78.
- Werner O., Ros R. M. & Guerra J. (2002) Direct amplification and NaOH extraction: two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). – *Journal of Bryology* 24: 127–131.
- Wettstein R. (1895) Der Saison-Dimorphismus als Ausgangspunkt fuer die Bildung neuer Arten im Pflanzenreiche. – *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 13: 303–313.
- Wettstein R. (1896) Monographie der Gattung *Euphrasia*. Leipzig.
- Wild J., Kaplan Z., Danihelka J., Petřík P., Chytrý M., Novotný P., Rohn M., Šulc V., Brůna J., Chobot K., Ekrt L., Holubová D., Knollová I., Kocián P., Štech M., Štěpánek J. & Zouhar V. (2019) Plant distribution data for the Czech Republic integrated in the Pladias database. – *Preslia* 91: 1–24.
- Yeo P. F. (1956) Hybridization between diploid and tetraploid species of *Euphrasia*. – *Watsonia* 3: 253–269.
- Yeo P. F. (1966) The breeding relationships of some european *Euphrasiae*.
- Yeo P. F. (1968) The evolutionary significance of the speciation of *Euphrasia* in Europe. – *Evolution* 22(4):736–747.
- Yeo P. F. (1976) Artificial hybrids between some European diploid species of *Euphrasia*. – *Watsonia* 11:131–135.
- Yeo P. F. (1978) A taxonomic revision of *Euphrasia* in Europe – *Botanical Journal of the Linnean Society* 77: 223–334.
- Zopfi H.-J. (1993) Ecotypic variation in *Rhinanthus alectorolophus* (Scopoli) Pollich (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management: I. Morphological delimitations and habitats of seasonal ecotypes. – *Flora* 188: 15–39.
- Zopfi H.-J. (1997) Ecotypic variation of *Euphrasia rostkoviana* Hayne (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management. – *Flora* 192: 279–195.
- Zopfi H.-J. (1998) Life-history variation among populations of *Euphrasia rostkoviana* Hayne (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management. – *Biological Journal of the Linnean Society* 64(2): 179–205.

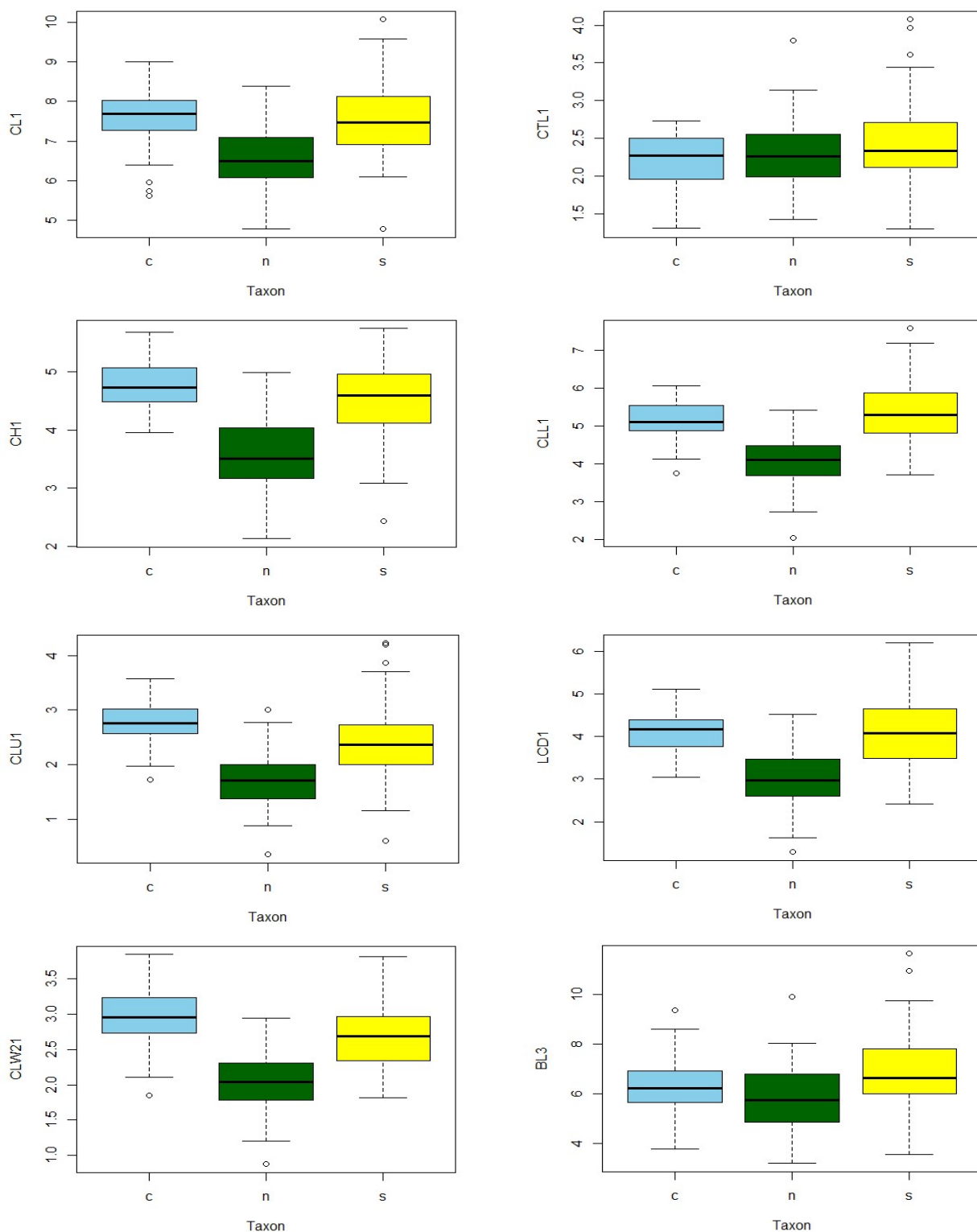
8. Přílohy

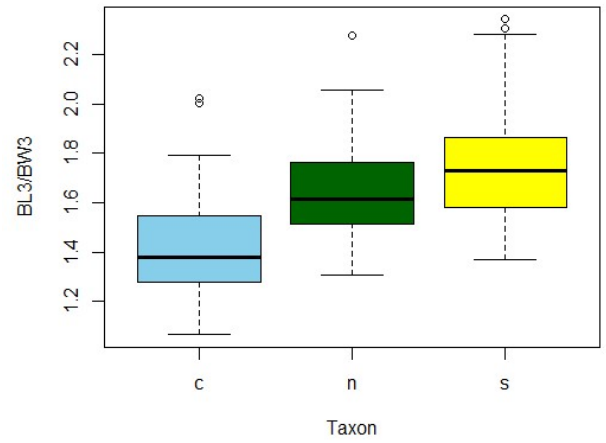
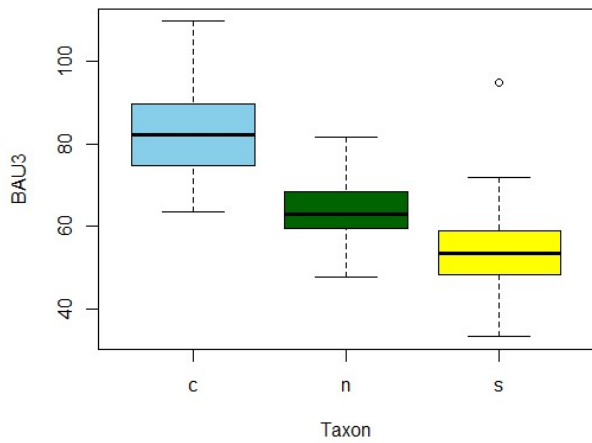
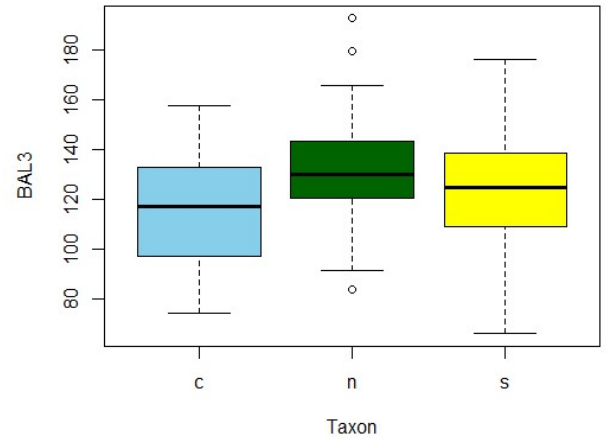
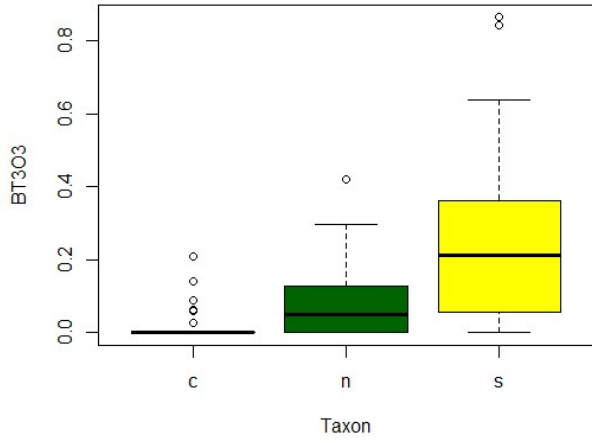
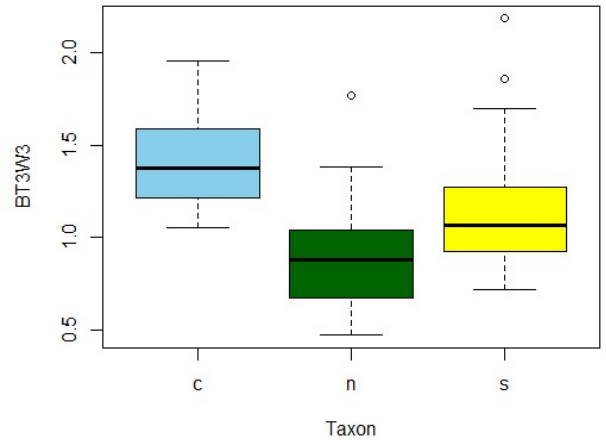
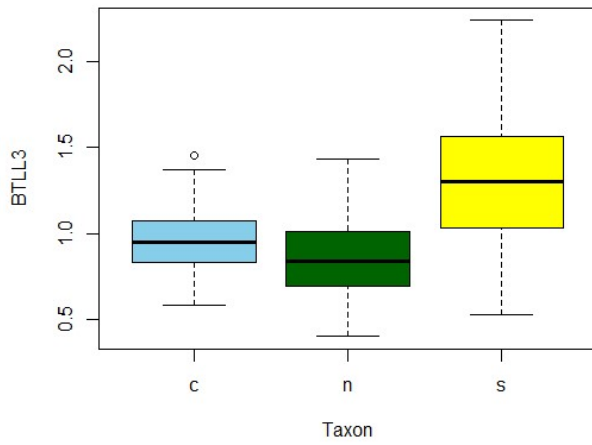
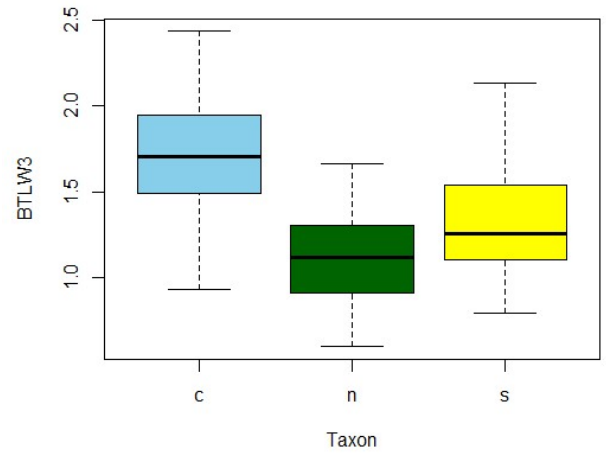
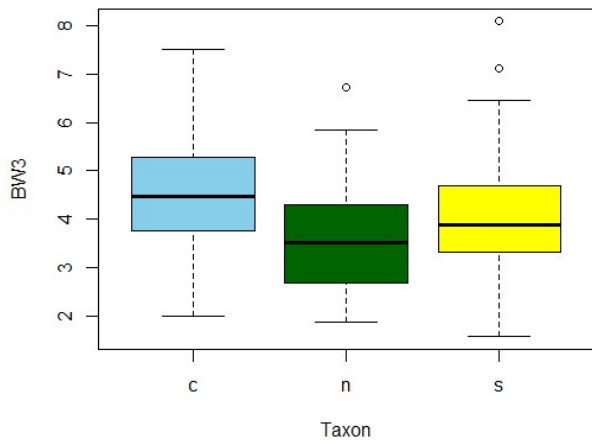
Příloha 1: Seznam lokalit

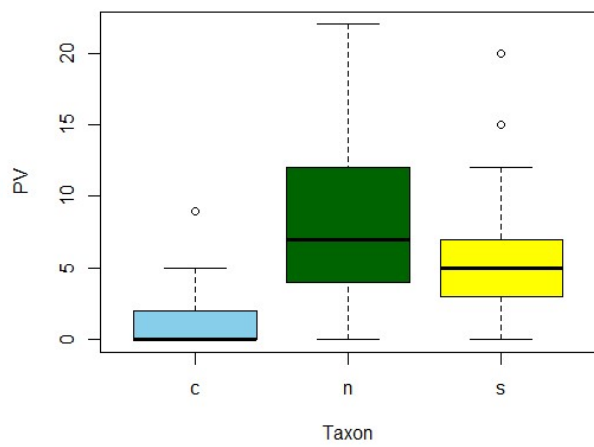
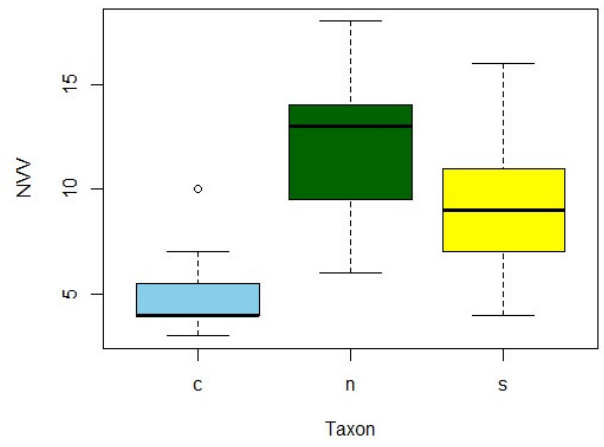
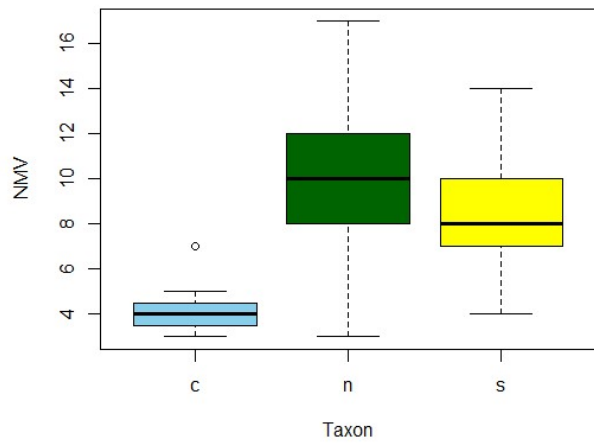
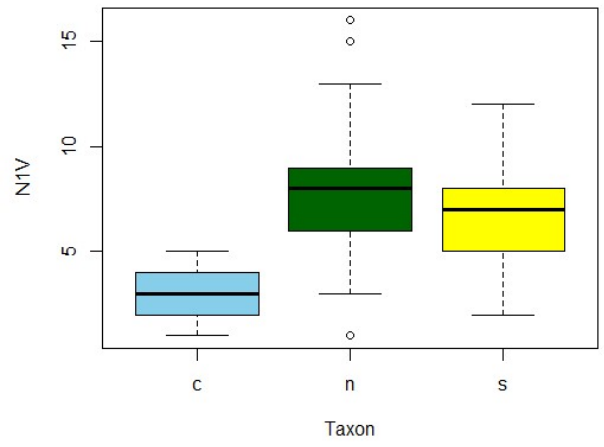
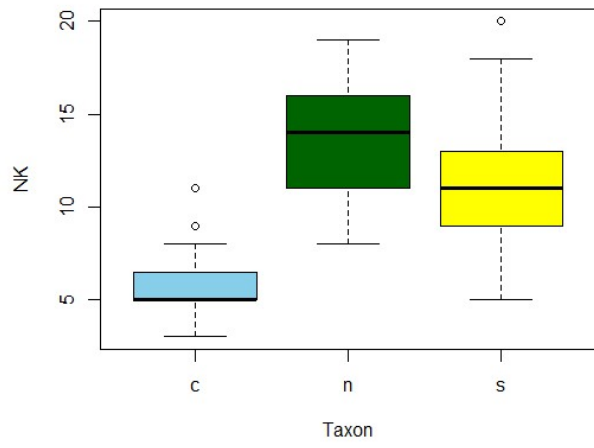
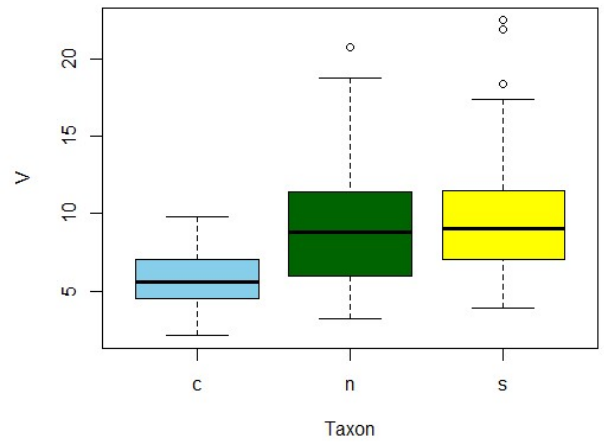
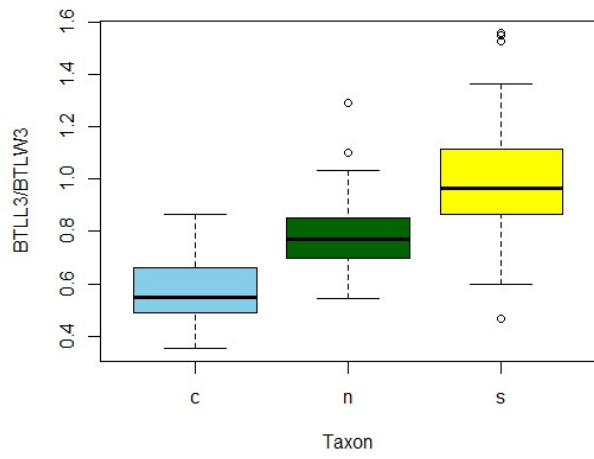
Zkratka	Popis lokality	Souřadnice	Přítomné druhy	Nadmořská výška (m. n. m.)	Datum	Počet analyzovaných rostlin	Šumava / Předšumaví (pro <i>E. stricta</i>)
Ryb	Modrava: okraj cesty v údolí Roklanského potoka 450 m Z turistického rozcestí Rybárna asi 2.35 km SZ od soutoku Roklanského a Modravského potoka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

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

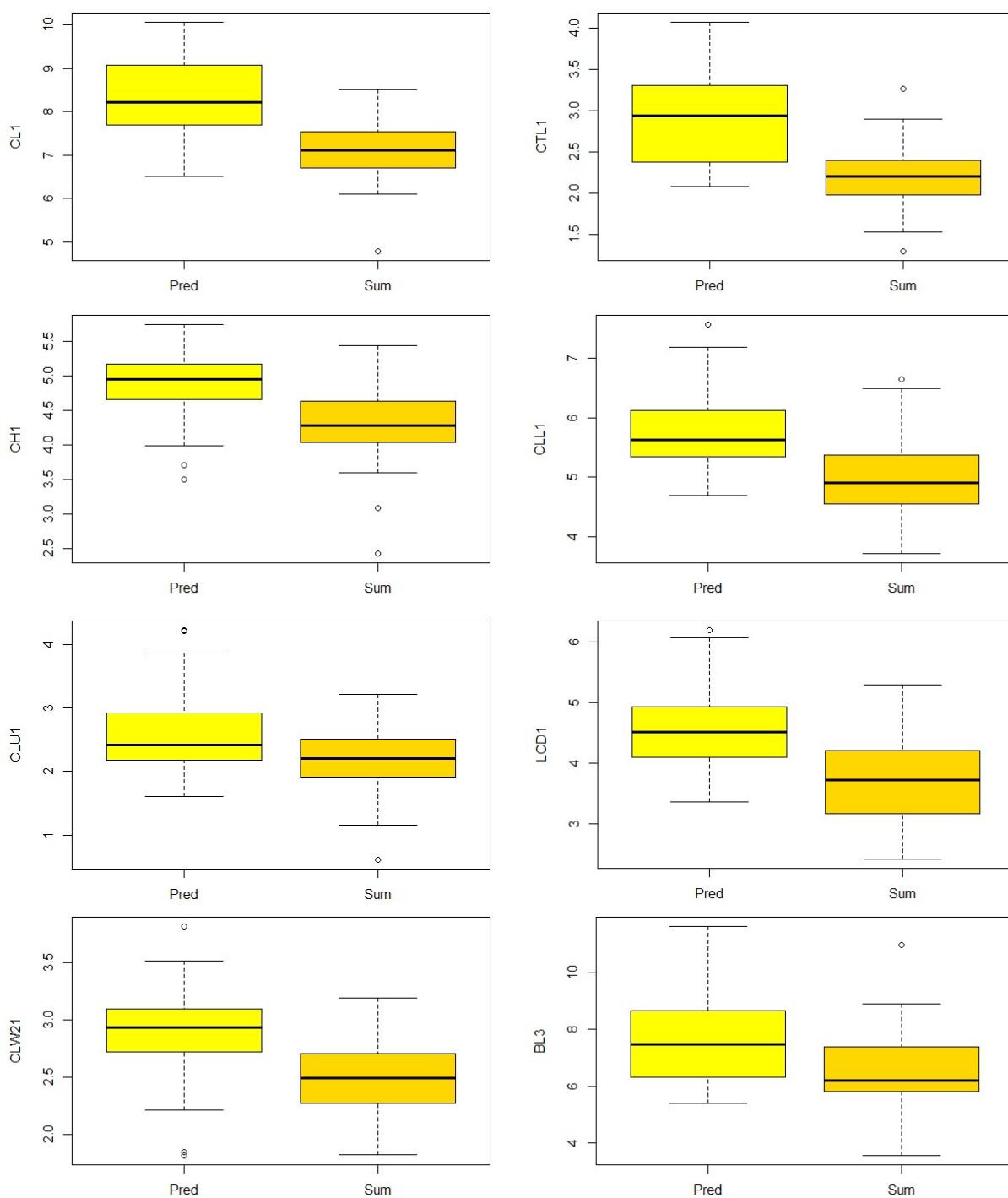
Příloha 2: Srovnání časného typu (c), *E. nemorosa* (n) a *E. stricta* (s) pro jednotlivé znaky, CL1 = délka koruny, CTL1 = délka korunní trubky, CH1 = výška koruny, CLL1 = délka dolního korunního pysku, CLU1 = délka okraje dolního korunního pysku, LCD1 = diagonála dolního korunního pysku, CLW21 = polovina šířky dolního korunního pysku, BL3 = délka listenu, BW3 = šířka listenu v nejšířším místě, BTLW3 = šířka koncového zubu listenu, BTLL3 = délka koncového zubu listenu, BT3W3 = šířka třetího zubu listenu, BT3O3 = délka osinky na 3. zubu listenu, BAL3 = úhel u báze listenu, BAU3 = úhel na vrcholu posledního zubu listenu, V = výška rostliny, NK = nodus s nejdolejším květem, PV = počet větví

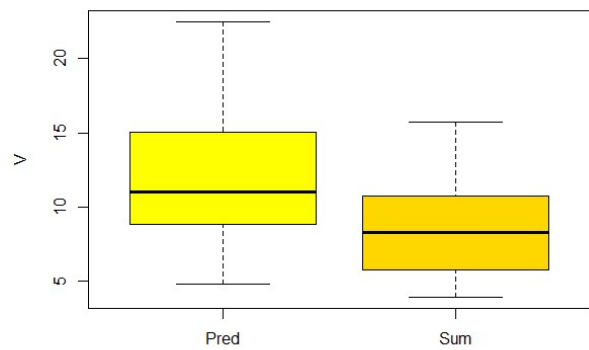
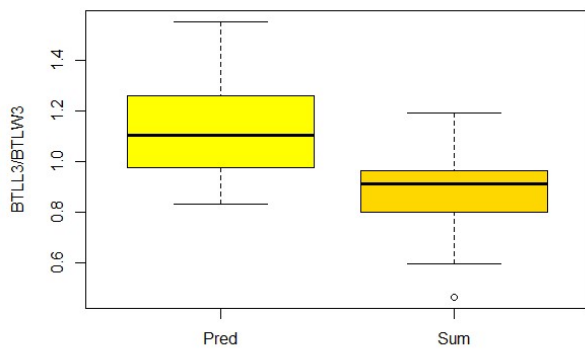
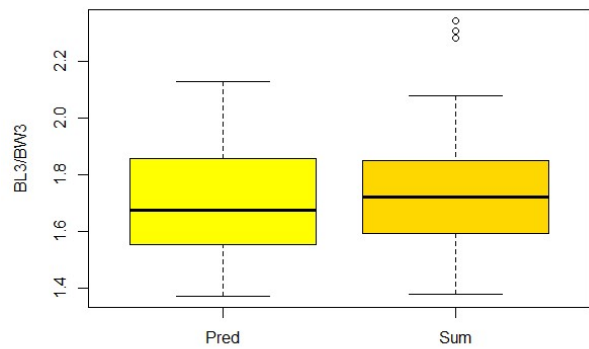
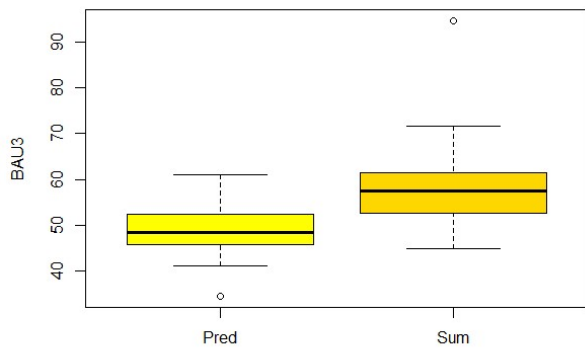
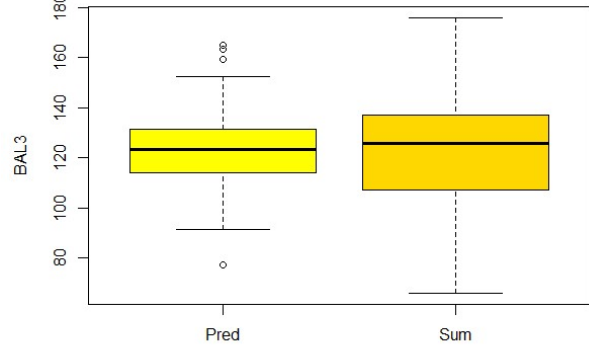
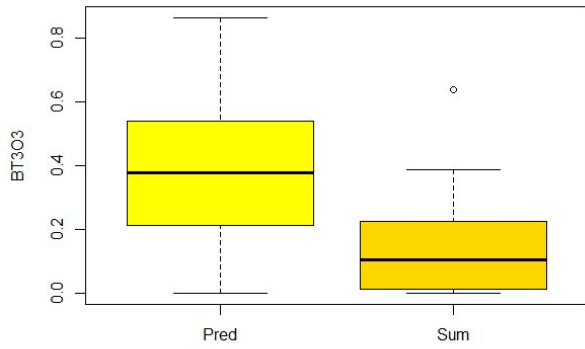
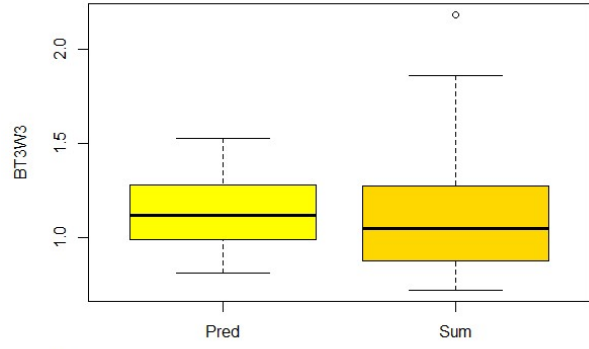
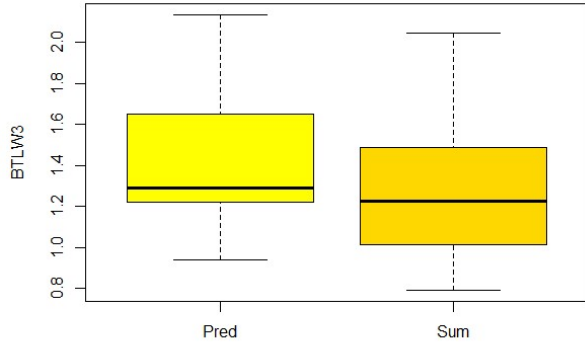
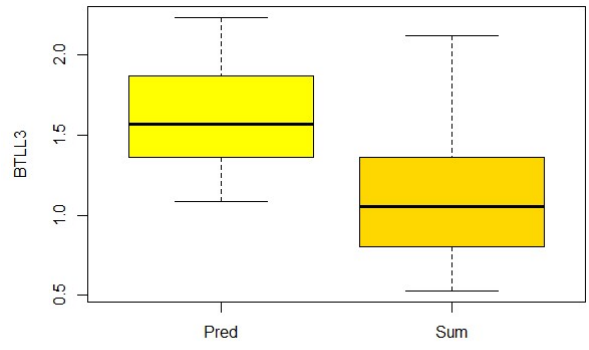
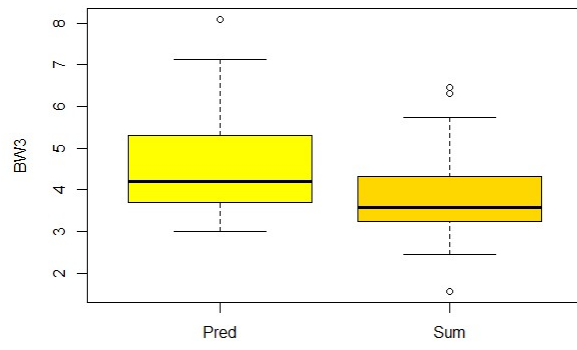


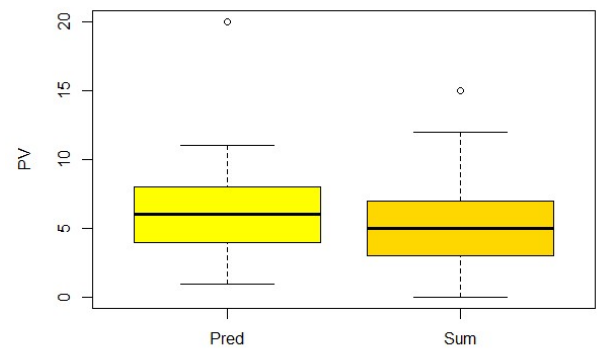
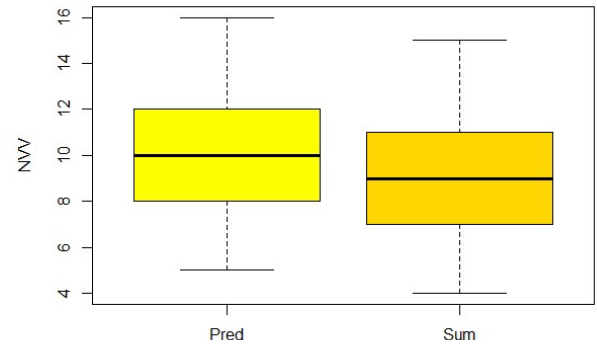
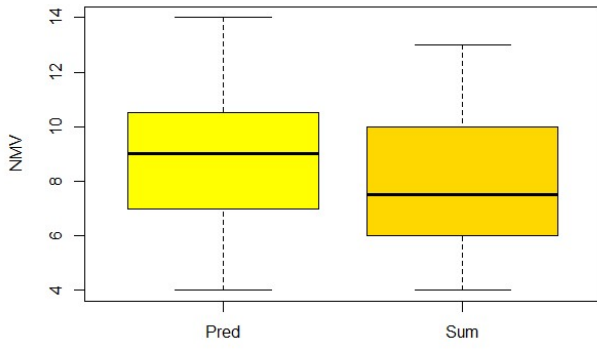
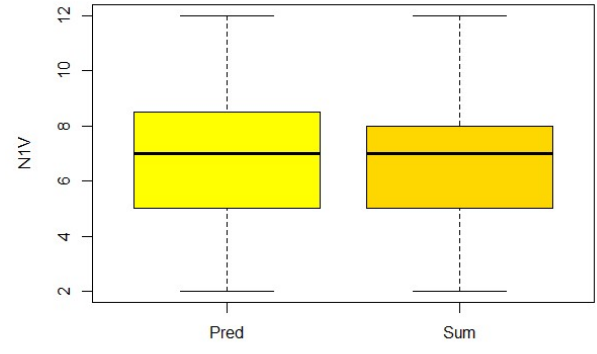
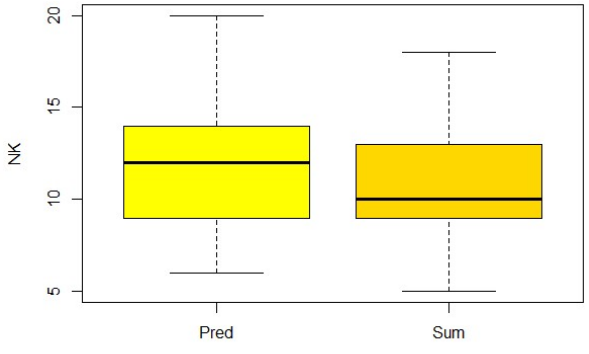




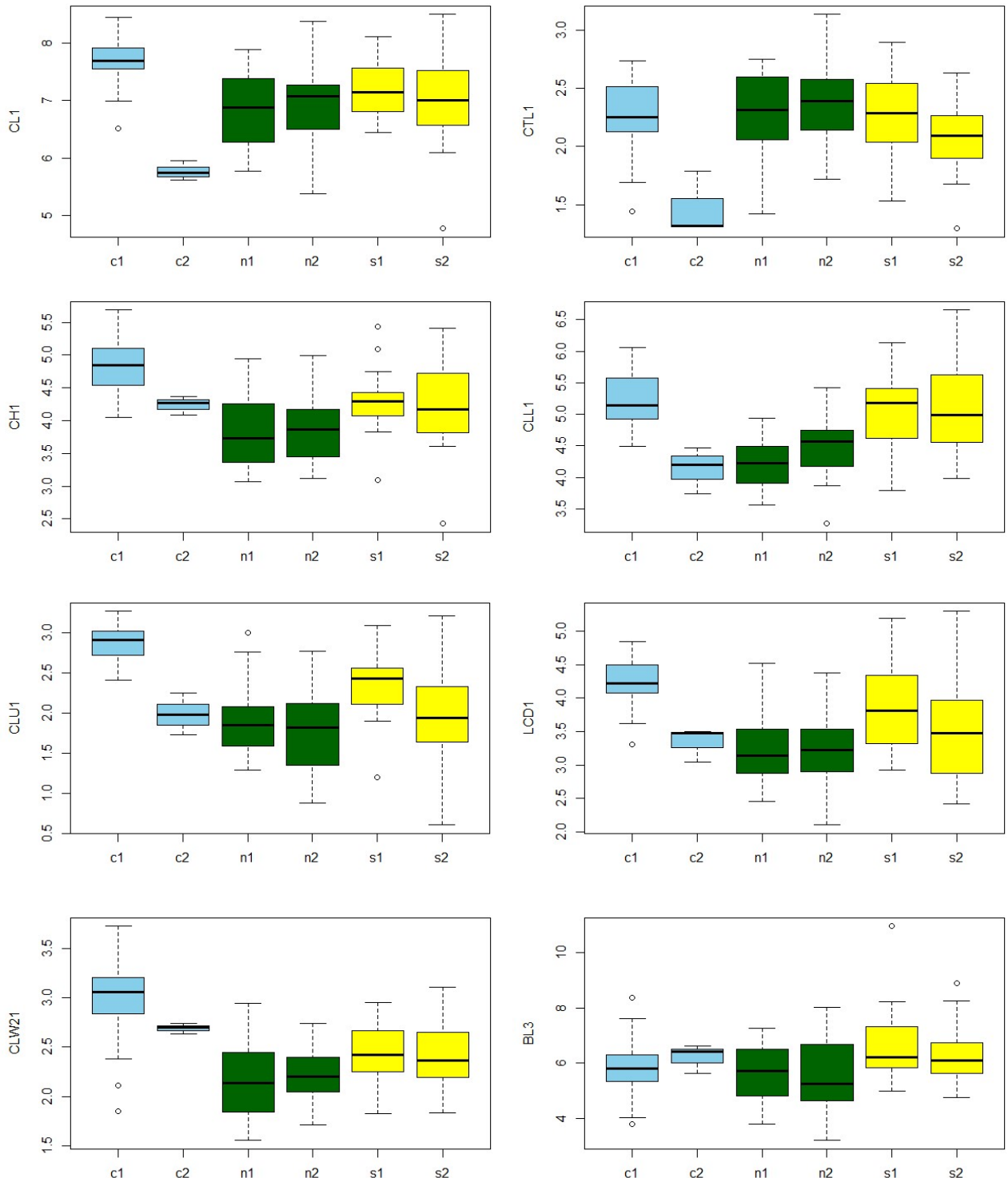
Příloha 3: Srovnání populací *E. stricta* ze Šumavy (Sum) a Předšumaví (Pred) pro jednotlivé znaky, CL1 = délka koruny, CTL1 = délka korunní trubky, CH1 = výška koruny, CLL1 = délka dolního korunního pysku, CLU1 = délka okraje dolního korunního pysku, LCD1 = diagonála dolního korunního pysku, CLW21 = polovina šířky dolního korunního pysku, BL3 = délka listenu, BW3 = šířka listenu v nejširším místě, BTLW3 = šířka koncového zubu listenu, BTLL3 = délka koncového zubu listenu, BT3W3 = šířka třetího zubu listenu, BT3O3 = délka osinky na 3. zubu listenu, BAL3 = úhel u báze listenu, BAU3 = úhel na vrcholu posledního zubu listenu, V = výška rostliny, NK = nodus s nejdolejším květem, PV = počet větví

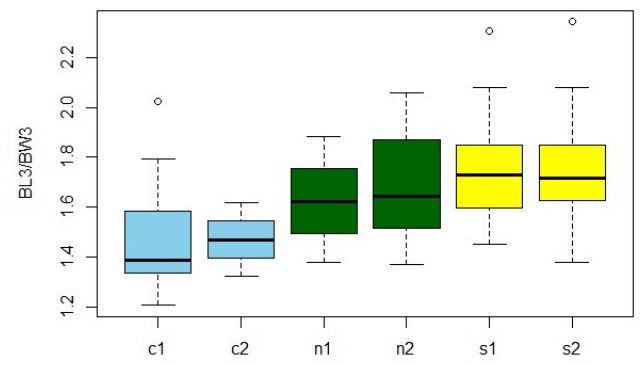
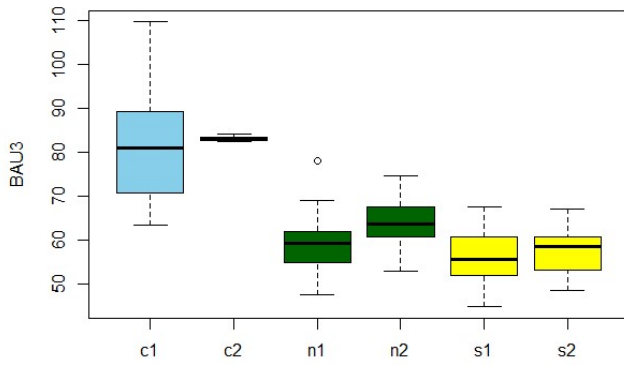
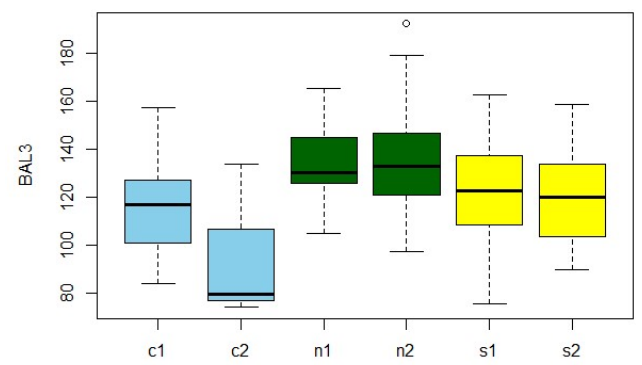
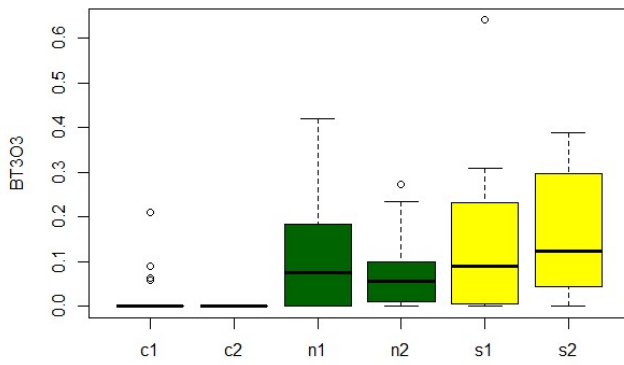
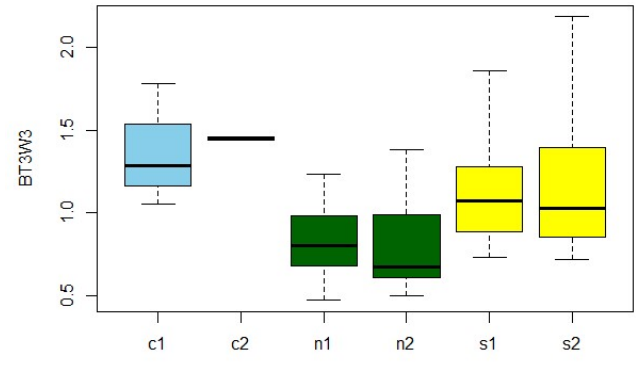
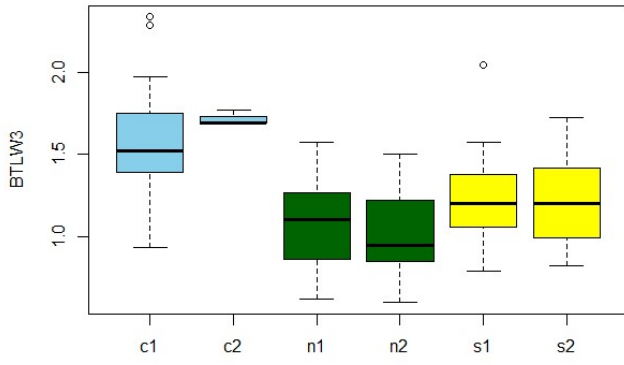
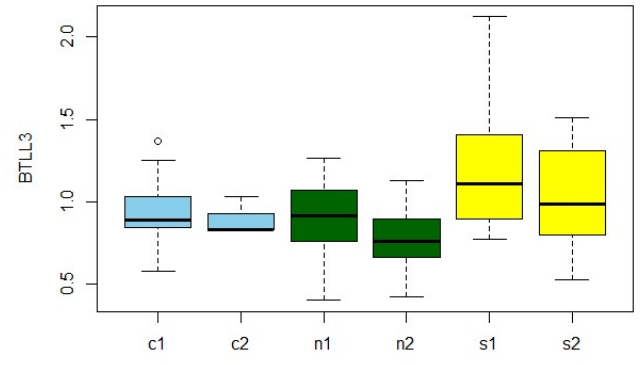
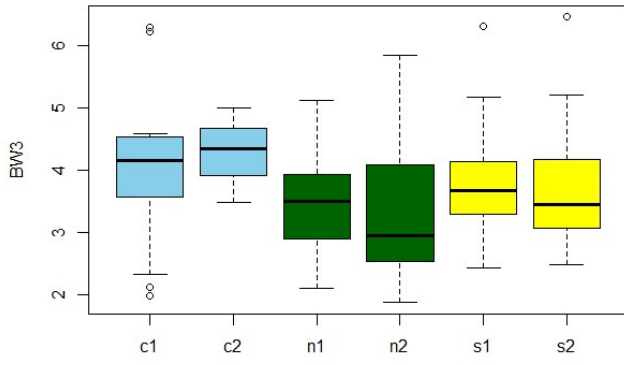


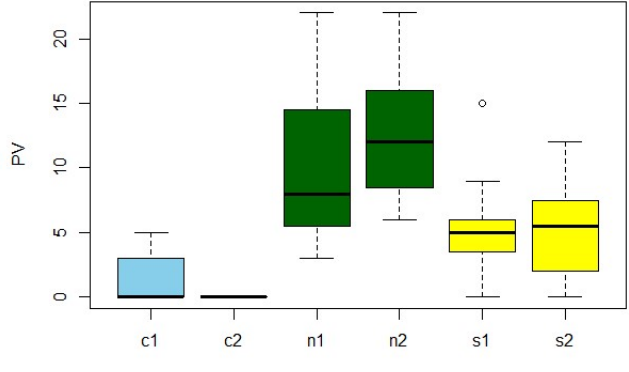
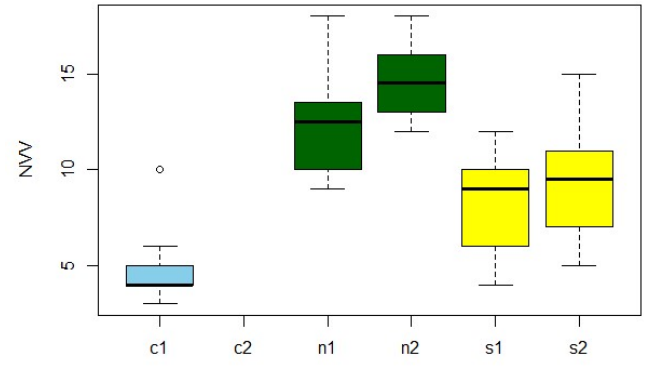
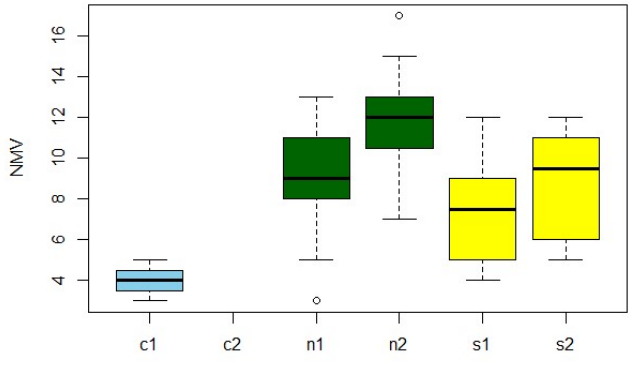
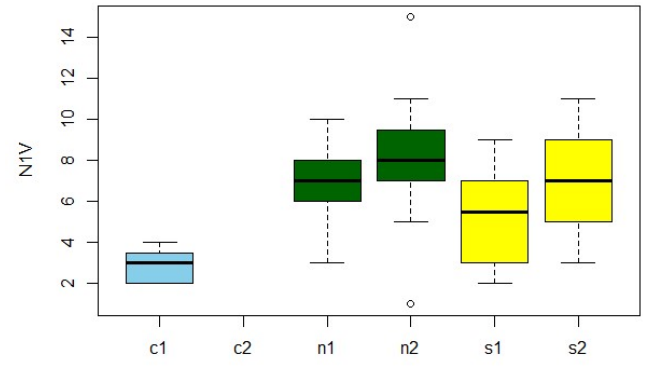
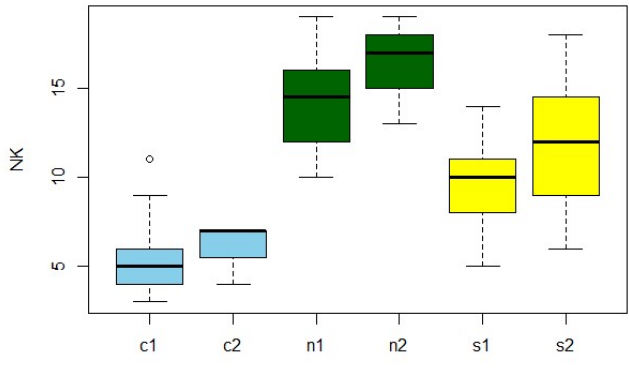
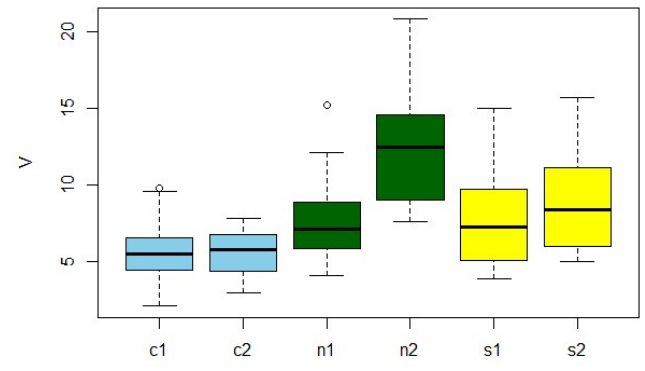
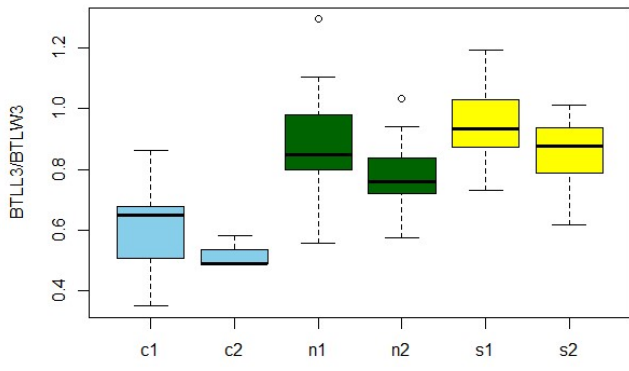




Příloha 4: Posun znaků v průběhu sezóny, c1 = časný typ, začátek sezóny, c2 = časný typ, později v sezóně, n1 = *E. nemorosa*, začátek sezóny, n2 = *E. nemorosa*, později v sezóně, s1 = *E. stricta*, začátek sezóny, s2 = *E. stricta*, později v sezóně, CL1 = délka koruny, CTL1 = délka korunní trubky, CH1 = výška koruny, CLL1 = délka dolního korunního pysku, CLU1 = délka okraje dolního korunního pysku, LCD1 = diagonála dolního korunního pysku, CLW21 = polovina šířky dolního korunního pysku, BL3 = délka listenu, BW3 = šířka listenu v nejširším místě, BTLW3 = šířka koncového zubu listenu, BTLL3 = délka koncového zubu listenu, BT3W3 = šířka třetího zubu listenu, BT3O3 = délka osinky na 3. zubu listenu, BAL3 = úhel u báze listenu, BAU3 = úhel na vrcholu posledního zubu listenu, V = výška rostliny, NK = nodus s nejdolejším květem, PV = počet větví







Příloha 5: Příspěvek znaků k jednotlivým diskriminačním osám

Znak	CCA1	CCA2
CL1	-0,16109	-0,3645
CTL1	0,043154	-0,1241
CH1	-0,27312	-0,46818
CLL1	-0,17407	-0,58779
CLU1	-0,28744	-0,33605
LCD1	-0,2149	-0,46115
CLW21	-0,31736	-0,38589
BL3	-0,01912	-0,28733
BW3	-0,14192	-0,10993
BTLW3	-0,33477	-0,13573
BTLL3	0,021889	-0,51062
BT3W3	-0,30947	-0,22631
BT3O3	0,140857	-0,39975
BAL3	0,082738	0,061007
BAU3	-0,4738	0,546294
BL3/BW3	0,233468	-0,20675
BTLL3/BTLW3	0,295548	-0,50715
V	0,172888	-0,09679
NK	0,457881	0,2117
PV	0,238988	0,183498

Euphrasia, časný typ



25. 6. 2020, Rybárna



23. 7. 2021, Rybárna



17. 8. 2021, Rybárna

Euphrasia nemorosa



25. 6. 2020, *Euphrasia* sp., pozdní typ, Rybárna

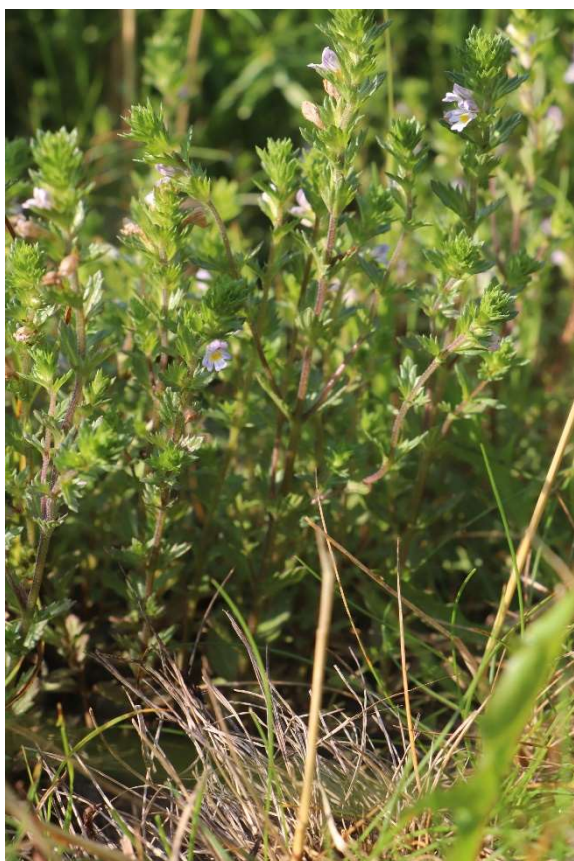


23. 7. 2021, Antýgl



17. 8. 2021, Antýgl

Euphrasia stricta



23. 7. 2021, Rybárna



17. 8. 2021, Rybárna



rostlina z Předšumaví, Rabí