

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta
Katedra botaniky



Magisterská diplomová práce

**SROVNÁNÍ *MELAMPYRUM BOHEMICUM* S PŘÍBUZNÝMI
TAXONY A REVIZE AKTUÁLNÍHO ROZŠÍŘENÍ**

Jan Chlumský
2007

Školitel: Ing. Milan Štech, Ph.D.

CHLUMSKÝ J. (2007): Srovnání *Melampyrum bohemicum* s příbuznými taxony a revize aktuálního rozšíření. [Comparison of *Melampyrum bohemicum* with related taxa and revision of its actual distribution. Mgr. Thesis, in Czech] – 50p. + 28p. appendix, Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:


Melampyrum bohemicum is a member of considerably complicated group *M. subalpinum* agg. Several hypotheses were tested to solve taxonomical uncertainties in the group.

The possibility of hybridization was examined by an artificial cross pollination between *M. bohemicum* and *M. nemorosum*. Isozymic analysis and flow cytometry analysis were performed on plants from all main areas of *M. subalpinum* agg. occurrence. To find out actual state of distribution of *M. bohemicum* revision of all known historical localities has been carried out.

Genome size and isozymic characteristics are given for each studied group. List of all known localities of *M. bohemicum* in the Czech and Slovak Republic is provided.

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích dne 2.1. 2007


.....
Jan Chlumský

*Věnováno paní Květě Weissové
za probuzení zájmu a určení správného směru*

Poděkování:

Je mou milou povinností poděkovat lidem, kteří mi pomohli při tvorbě této práce. Alibisticky se předem omlouvám a děkuji všem, kteří zde nebudou uvedeni, ač by si to zasloužili. Významnou roli hraje má děravá paměť, ale také délka práce, kterou by nebylo vhodné překročit délkou poděkování.

Především bych rád poděkoval svému školiteli Milanu Štechovi za ochotu, rady, trpělivost, spoustu času, který mi obětoval a obecně za velmi zodpovědné a pečlivé vedení mé práce.

Velký dík patří Janě Svobodové, bez které bych nebyl schopen včas dokončit revizi lokalit a bez které bych patrně v depresi zemřel hlady, žízní a vyčerpáním v některé populaci *M. bohemicum*. Janě a Lucii Kučerové děkuji za pomoc při hybridizačních experimentech.

Ivaně Plačkové a ostatním dobrým duším z izozymové laboratoře v Průhonicích děkuji za starostlivý doprovod světem „bílé biologie“ a za rady při interpretaci výsledků. Také děkuji Pavlu Trávníčkovi z laboratoře průtokové cytometrie v Průhonicích za pomoc a radu při analýzách velikosti genomu.

Lucii Filipské a Pavlu Březinovi děkuji za přístřeší, stravu a příjemnou společnost, které mi poskytovali v průběhu opylování. RNDr. Alexandře Klaudivové z AOPK děkuji za poskytnutí údajů o rozšíření *M. bohemicum*. Vendule Smutkové patří dík za rady týkající se geologie.

Za mnoho podnětných připomínek, rad a doporučení děkuji Petrovi Kouteckému, Filipovi Kolářovi, Liboru Ekrtovi, Ester Hofhanzlové a Majdě Kubešové.

Obrovský dík za podporu patří mé rodině. Mamince děkuji za ušití sáčků z monofilu, za vlídné slovo, čisté prádlo, chutnou stravu a veškerou snahu o udržení (nebo vytvoření) zdání mého kulturního vzhledu. Sestře Zuzce děkuji za mnohé rady a pomoc při revizi lokalit.

Tomášovi (Hruškovi) Beštovi děkuji za udržování nadhledu v záležitostech životních, za vaření tak odpornej kávy, že mne vždy dokázala probudit a nakopnout a za to, že z „brajglu“ vzniklého při psaní této práce měl pouze radost.

Svému bývalému autu Peugeot 205 („silážní věž“, „modrá popelnice“) se omlouvám, že jsem jej prodal i přes to, že mne bezpečně dopravilo na všechny revidované lokality.

Práce byla zčásti financována ze záměru MSM6007665801 (B Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích; Ekologické, evoluční a experimentálně ekologické přístupy ke studiu vzniku a významu biodiverzity).

Obsah

Obsah	- 1 -
1. Úvod	- 3 -
1.1 Cíle práce	- 4 -
1.2 Literární přehled	- 5 -
1.2.1 Charakteristika rodu <i>Melampyrum</i>	- 5 -
1.2.2 Variabilita skupiny <i>M. subalpinum</i> agg.	- 6 -
1.2.3 Charakteristika <i>M. bohemicum</i>	- 7 -
1.2.4 Rozšíření <i>M. bohemicum</i>	- 8 -
1.2.5 Velikost jaderného genomu	- 9 -
1.2.6 Isozymová analýza	- 10 -
2. Metodika	- 11 -
2.1 Hybridizační experiment	- 11 -
2.1.1 Charakteristika pokusných lokalit	- 11 -
2.1.2 Opylování	- 11 -
2.2 Revize lokalit	- 14 -
2.3 Průtoková cytometrie	- 15 -
2.4 Isozymová analýza	- 16 -
2.4.1 Sběr vzorků	- 16 -
2.4.2 Extrakce vzorků	- 17 -
2.4.3 Elektroforéza	- 17 -
2.4.4 Barvení gelů	- 18 -
2.4.5 Zpracování dat	- 19 -
2.5 Nomenklatura	- 19 -
3. Výsledky	- 20 -
3.1 Hybridizační experiment	- 20 -
3.1.1 Reprodukční úspěšnost květů ošetřených různými zásahy	- 20 -
3.1.2 Výsevové pokusy	- 24 -
3.2 Revize lokalit	- 25 -
3.3 Průtoková cytometrie	- 30 -
3.4 Isozymová analýza	- 33 -
4. Diskuze	- 36 -
4.1 Zhodnocení hybridizačních experimentů	- 36 -
4.2 Revize lokalit	- 37 -
4.2.1 Vegetační charakteristika lokalit	- 37 -
4.3 Velikost jaderného genomu	- 39 -
4.4 Isozymová analýza	- 40 -
4.5 Návrh dalšího postupu studia skupiny	- 41 -
5. Závěr	- 43 -

6. Citovaná literatura	- 45 -
Příloha.....	- 51 -
Příloha 1.....	- 52 -
Příloha 2.....	- 54 -
Příloha 3.....	- 66 -
Příloha 4.....	- 68 -
Příloha 5.....	- 76 -

1. Úvod

Vymezení druhů v rodě *Melampyrum* většinou nečiní potíže. Jednou z výjimek je série *Eunemorosa* (SOÓ 1927) s centrem diverzity na Balkánském poloostrově. Druhy řazené do této série jsou zřejmě značně příbuzné a u některých dochází k překryvu morfologických znaků. Pro střední Evropu je z této série kritická skupina *Melampyrum subalpinum* agg. Do této skupiny lze řadit i rostliny rostoucí na území České a Slovenské republiky, označované tradičně *Melampyrum bohemicum* A. KERN.

Melampyrum bohemicum je poloparazitická jednoletá rostlina zařazená v Červeném seznamu ČR do kategorie C3 – ohrožený taxon (PROCHÁZKA 2001). Jeho rozšíření je vázáno výhradně na území střední Evropy a v minulosti byla tato rostlina považována dokonce za československého endemita (HADAČ 1966a). Rostliny z České republiky a Slovenska působí morfologicky velmi jednotným dojmem a dnes se zdá již téměř jisté, že tyto populace jsou jen okrajovým výsekem variability morfologicky mnohem proměnlivějších rakouských populací *Melampyrum subalpinum* agg. Morfologicky *M. bohemicum* odpovídá úzkolistým rakouským populacím *M. subalpinum* agg., popsáným jako *M. angustissimum* BECK, a patrně se jedná o totožný taxon (ŠTECH 2006).

Na základě předchozích prací (ŠTECH 1998, ŠTECH 2006) byla formulována hypotéza o vzniku široolistých populací označovaných tradičně jako *Melampyrum subalpinum* (JURATZKA) A. KERN. s. str. hybridizací mezi *Melampyrum angustissimum* a *Melampyrum nemorosum* L. Tuto hypotézu podporuje výskyt *M. subalpinum* s. str. výhradně v oblasti Vídeňského lesa na styku plošného výskytu populací *M. angustissimum* a *M. nemorosum* a fakt, že populace *M. subalpinum* s. str. stojí morfologicky mezi *M. angustissimum* a *M. nemorosum*. Pro vyřešení taxonomického postavení *M. bohemicum* i taxonomie celé skupiny je nutné rozřešit vztahy zejména mezi výše zmíněnými typy, jak uvádí HOLUB (1996).

Pro ověření možnosti hybridního původu *M. subalpinum* je potřebné podložit morfologická měření molekulárními analýzami a hybridizačními pokusy.

Pro jednoduchost textu budou v této práci úzkolisté populace *M. subalpinum* agg. z České republiky a ze Slovenska označovány jako *M. bohemicum*, rakouské úzkolisté populace jako *M. angustissimum* a potenciálně hybridní širolisté populace *M. subalpinum* agg. z oblasti Wienerwaldu jako *M. subalpinum* s. str.

Melampyrum bohemicum se na našem území vyskytuje vzácně a jeho populace jsou většinou malé, z čehož plyne značné ohrožení tohoto taxonu. Vzhledem k velmi malému celkovému areálu jsou znepokojující i sdělení některých floristů o ústupu tohoto taxonu na známých lokalitách.

1.1 Cíle práce

- Ověření možnosti hybridizace mezi *Melampyrum bohemicum* a *Melampyrum nemorosum*
- Revize českých a slovenských lokalit *M. bohemicum*
- Zjištění variability ve velikosti genomu u vybraných populací *M. subalpinum* agg.
- Zjištění variability mezi populacemi isozymovou analýzou

1.2 Literární přehled

1.2.1 Charakteristika rodu *Melampyrum*

Rod *Melampyrum* se spolu s dalšími poloparazitickými a parazitickými rody dnes řadí do čeledi *Orobanchaceae* (OLMSTEAD et al 2001).

Jedná se o jednoleté poloparazitické rostliny s jednoduchým kořenovým systémem, který má potlačeno jemné kořenové vlášení a bohatě vyvinutá haustoria (ŠÍPOŠOVÁ 1997). Hostitelskými rostlinami bývají především traviny a dřeviny (HARTL 1974). Lodyhy jsou na bázi často ohnuté až zkroucené, výše zpravidla přímé a různě bohatě větvené s velmi různým počtem lodyžních článků (mezi uzlinou s dělohami a uzlinou s nejdolejším květem hlavního květenství) a interkalárních článků (mezi nejhořejší vyvinutou větví a nejdolejším květem). Listy jsou vstřícné, přisedlé až krátce řapíkaté, celokrajné, horní vzácně zubaté. Listeny jsou zpravidla zubaté a horní často nápadně zbarvené. Květy jsou souměrné, přisedlé, či kratičce stopkaté ve všestranných hustých, či jednostranných řídkých květenstvích na hlavní lodyze a zpravidla též na silnějších větvích. Kalich je trubkovitý až zvonkovitý se 4 cípy, u některých taxonů nezřetelně dvoupyský, lysý nebo chlupatý, vytrvávající i v době plodu. Koruna je dvoupyská, delší než kalich, zboku mírně zploštělá, žlutá, jen u některých druhů s hnědočervenými nebo oranžovými částmi, nebo také růžová či bílá. Horní pysk je přilbovitý, vzniklý srůstem dvou adaxiálních cípů koruny, zboku mírně zploštělý na okraji s krátce chlupatým lemlem. 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. Pyl je sypký a nemá lepkavou konzistenci, jak tomu často bývá u entomogamních rostlin (HARTL 1974). Semeník vzniká srůstem dvou plodolistů a na spodní straně je opatřen různě velkým nektáriem. 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, s masíčkem, živá bělavá až světle hnědá, odumřelá černá. Zelené části a květy obsahují v různém množství iridoidní sloučeninu aukubin, která při sušení rostlin polymeruje na modročerné barvivo a způsobuje tak jejich černání. Tato vlastnost dala vznik českému názvu černýš.

Podle různých taxonomických pojetí se udává 20 – 40 druhů. Většina se vyskytuje v hlavní eurosibiřské části areálu, s významnými centry diverzity na Balkáně a na Kavkaze. Několik druhů roste ve východní Asii a 1 druh v Severní Americe (BEAUVERD 1916, SOÓ 1927, ŠTECH 2000).

Počet chromozómů u celého rodu je konstantní: $2n = 18$ (ŠÍPOŠOVÁ 1997).

U celého rodu se vyskytuje entomogamie, autogamie a myrmekochorie. Podrobné charakteristiky rodu *Melampyrum* lze nalézt také v pracích SOÓ (1927), BEAUVERD (1916), SOÓ et WEBB (1972), HARTL (1974), ŠÍPOŠOVÁ (1997), ŠTECH (2000).

1.2.2 Variabilita skupiny *M. subalpinum* agg.

Skupina *Melampyrum subalpinum* agg. je velmi proměnlivá. Významná variabilita je např. v šířce listů a listenů, ve zbarvení listenů nebo v odění kalicha. Pomineme-li balkánské taxony s nejistými vztahy k rostlinám středoevropským, je centrum diverzity této skupiny v oblasti Vídeňského lesa na severovýchodním okraji Alp. Rostliny z území Rakouska byly původně popsány Juratzkou v úrovni variety jako *M. nemorosum* var. *subalpinum* (JURATZKA 1857). Vzhledem k velké mezipopulační variabilitě byly postupně popisovány další taxony, které byly různými autory různě chápány. Rostliny objevené v Čechách byly popsány jako *Melampyrum bohemicum* A. KERN. (KERNER 1881). V roce 1882 publikoval detailní studii skupiny BECK (1882), který chápal rostliny se širokými listy jako *M. subalpinum* s. str. a úzkolisté rostliny popsal jako *M. angustissimum*, které částečně ztotožnil s *M. bohemicum* a odlišoval jej od širokolistých rakouských rostlin *M. subalpinum* s. str. a časného sezónního typu *M. subalpinum* var. *grandiflorum* (KERNER) BECK. Jeho pojetí *M. subalpinum* s. str. a *M. angustissimum* bylo akceptováno rakouskými autory do nedávné doby, zatímco *M. bohemicum* pozdější čeští i rakouští autoři považovali zpravidla za samostatný taxon.

Nejasnosti v odlišení českých a rakouských populací jsou patrné například v díle Flora Europaea (SOÓ et WEBB 1972), kde jsou tyto taxony rozlišovány jako *M. bohemicum* a *M. subalpinum*. Pro *M. bohemicum* jsou jako jeden z rozlišovacích znaků uváděny zelené horní listeny přesto, že *M. bohemicum* má často listeny fialové nebo alespoň fialově naběhlé (ŠTECH 2000, HOLUB 1996). Také se skutečností nekoresponduje udávaná šířka listů. Flora Europaea uvádí šířku listů pouze 2 mm, kdežto ve skutečnosti může mít *M. bohemicum* listy široké 2 – 9 mm (ŠTECH 2000, 2006). Naopak v případě *M. subalpinum* Flora Europaea bere v úvahu hlavně širokolisté populace, pro které uvádí šířku listů (2–)14–18 mm a o rakouských úzkolistých populacích se zvláště nezmiňuje.

Podrobně se problematikou taxonomie a nomenklatury skupiny *M. subalpinum* agg. zabývají práce HADAČ (1966), HOLUB (1996) a ŠTECH (2000, 2006).

Problematikou variability rakouských populací se zabýval Reiner (REINER 1994). Jeho řešení bylo přejato také do druhého vydání rakouského klíče (FISCHER et al. 2005). V tomto pojetí je *M. subalpinum* s. l. rozděleno na dva poddruhy založené na sezónních znacích. *M. subalpinum* subsp. *grandiflorum* je časný morfotyp úzkolistých rostlin kvetoucí v květnu až červnu a *M. subalpinum* subsp. *subalpinum* zahrnuje zbylé pozdní morfotypy kvetoucí od července po

začátek září. Tento poddruh je dále členěn na dvě variety. Varieta *M. s. subsp. subalpinum* var. *subalpinum* zahrnuje úzkolisté rostliny a varieta *M. s. subsp. subalpinum* var. *thermale* širolisté populace z oblasti Vídeňského lesa. Zcela opačné pojetí *M. subalpinum* s. str. je dáno nedořešenou problematikou typifikace jména *M. nemorosum* var. *subalpinum* JURATZKA, které Reiner navrhnul ve své diplomové práci typifikovat úzkolistými rostlinami. Zatím však řádná typifikace nebyla provedena.

ŠTECH (2006) považuje *M. bohemicum* za taxon totožný s rakouskými populacemi *M. angustissimum*. Přesto, že jsou populace *M. angustissimum* morfologicky variabilnější, dá se *M. bohemicum* chápat jako výsek variability rakouských úzkolistých rostlin. Širolisté populace *M. subalpinum* s. str. vznikly dle ŠTECHA (2006) hybridizací populací *M. angustissimum* a *M. nemorosum*.

1.2.3 Charakteristika *M. bohemicum*

Melampyrum bohemicum A. KERN., druh popsáný z České republiky, je (10–)15–40 cm vysoká rostlina s přímou, větvenou lodyhou. Větve míří šikmo vzhůru, případně až mírně dolů. Dolní větve bývají často sterilní (ŠÍPOŠOVÁ et ŠTECH 1997). Listy jsou čárkovitě kopinaté, až 10 cm dlouhé a 0,2 – 0,9 cm široké, celokrajné, po celé ploše kratičce pýřité nebo lysé. Hlavní květenství je úzké, jednostranné s dvěma květy v každém nodu, zpravidla v dolní části řídké a v horní části hustější, obvykle 10 – 30 květů. Dolní listeny jsou zelené, úzce kopinaté, podobné listům. Horní jsou zpravidla různě intenzivně modrofialově naběhlé, jen vzácně pouze zelené. [HADAČ (1966b) uvádí, že se horní listeny oproti *Melampyrum nemorosum* L. zabarvují až později v sezóně.] Bývají kopinaté až vejčité, někdy téměř se srdčitou bází. Na bázi je různý počet trojúhelníkovitých až úzce trojúhelníkovitých zubů. Zvláště horní listeny bývají v dolní části na okraji a na žilkách řídkce chlupaté. Kalich je 6 – 14 mm dlouhý, ale po odkvětu se ještě zvětšuje. Pouze na žilkách a na okraji je řídkce chlupatý, celý zelený nebo namodralý. Kališní cípy jsou úzce trojúhelníkovité a přímé. Koruna je dvoupyská, 15 – 19 mm dlouhá s otevřeným ústím, žloutkově žlutá, zpravidla na horním pysku rezavě naběhlá. V ústí kališní trubky bývá zahnutá. Horní pysk koruny je z boku zploštělý, kratší než dolní. Dolní pysk je plochý se dvěma podélnými hrboly, výrazně delší než horní. Prašníky jsou 3 – 4 mm dlouhé, žluté a na okraji krátce chlupaté. Konektiv je zelenavý. Semeník je zelený, lysý, s velkým bazálním nektáriem.

Tobolky mají proměnlivý tvar, široký až úzce elipsoidní, jsou srpovitě prohnuté a asymetrické, končí různě velkým trojúhelníkovitým zobanem. Nepřesahují kalich a jsou ze stran smáčklé, lysé, se zřetelnou střední žilkou chlupatou a síťnatou žilnatinou. Pukají na hřbetní i břišní straně. Tobolka obvykle obsahuje 2 – 4 semena, která jsou 3,5 – 6 mm dlouhá.

Rostlina kvete od června do září (ŠTECH 2000).

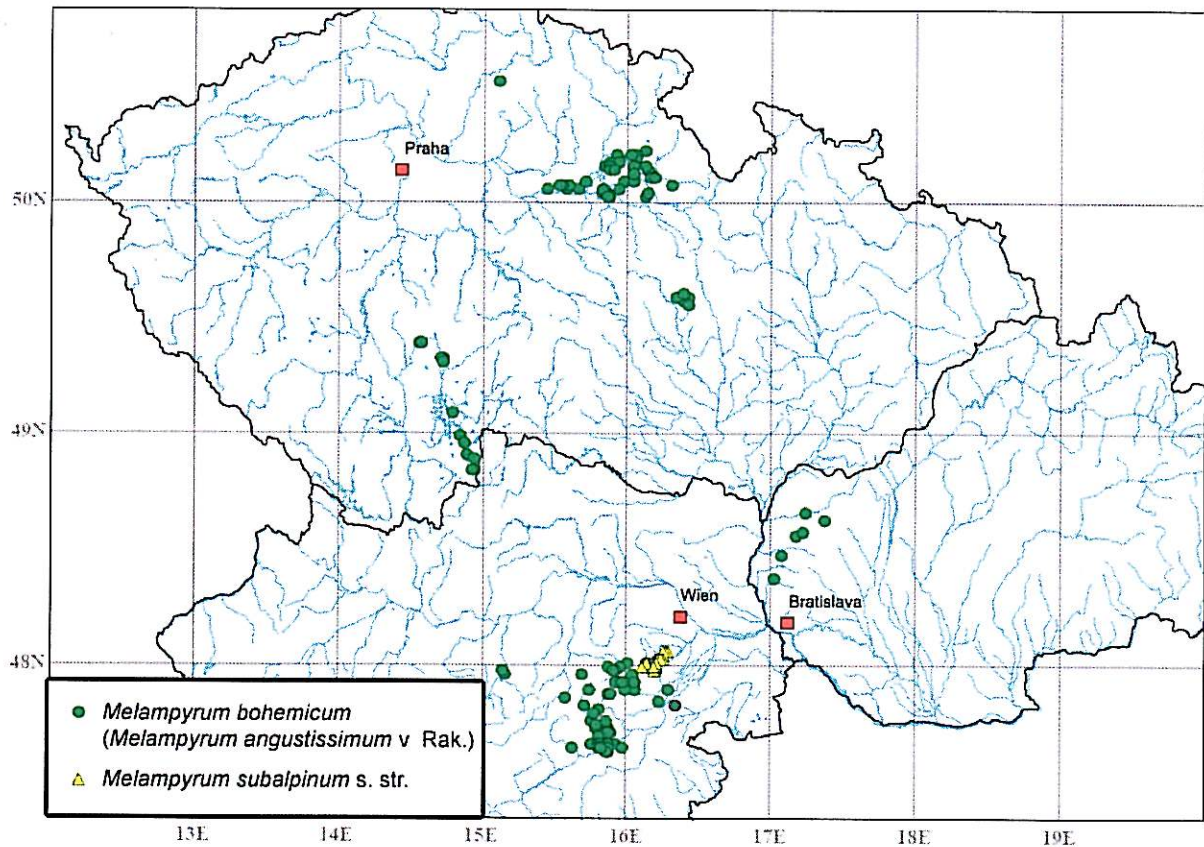
Melampyrum bohemicum je velmi málo proměnlivý taxon. ŠTECH (2000) uvádí, že poněkud větší variabilita je pouze v odění kalicha, šířce listů a listenů a v různě intenzivním zbarvení horních listenů. HADAČ (1966a) uvádí výjimečný nález několika exemplářů se zcela světlými květy: f. *pallida* HADAČ .

1.2.4 Rozšíření *M. bohemicum*

Melampyrum bohemicum se na našem území vyskytuje pouze ve východním Polabí, na Třeboňsku, podél údolí Lužnice u Tábora a v širším okolí Olešnice u Kunštátu, a na jediné lokalitě v Českém ráji. (viz obr. 1) Vyskytuje se od planárního do submontánního stupně s výškovým maximem na Českomoravské vrchovině na vrchu Fouska u Trpína (ca 660m) (ŠTECH 2000).

Na Slovensku *M. bohemicum* roste pouze na několika lokalitách v písčitéch světlých borech v oblasti Záhorí (HADAČ 1966, ŠÍPOŠOVÁ et ŠTECH 1997).

Morfologicky obdobné rostliny *M. angustissimum* se vyskytují především ve štýrsko-dolnorakouských vápencových Alpách a zasahují až do oblasti Vídeňského lesa. V tomto území se na velmi malé ploše (oblasti obcí Baden a Bad Fischau) vyskytují populace se širšími listy a listeny označované tradičně jako *M. subalpinum* s. str. (BECK 1982, ŠTECH 2000).



Obr. 1: Mapka rozšíření *Melampyrum subalpinum* agg.

1.2.5 Velikost jaderného genomu

Velikost genomu (C-hodnota) je dnes hojně využívanou charakteristikou, která má význam i pro studium hybridizace (BENNETT et LEITCH 2005a). Znalost velikosti jaderného genomu u jednotlivých taxonů *Melampyrum subalpinum* agg. může být jedním z významných vodítek pro rozřešení vztahů v této skupině.

Vhodnou a v dnešní době nejvíce využívanou metodou pro stanovení obsahu jaderné DNA je průtoková cytometrie (FCM). Původně byla tato metoda vyvinuta a využívána pro rychlé počítání a analýzu krvinek. S technickým vývojem a díky nalezení nových metod fluorescenčního barvení se FCM stala užitečným nástrojem pro biologii. Ačkoliv se FCM pro analýzu rostlinných buněk začala používat teprve na počátku osmdesátých let, počet studií využívajících tuto metodu rychle narůstá (DOLEŽEL 1998). Hlavní oblasti pro aplikaci FCM u rostlin jsou měření obsahu DNA a analýza a třídění rostlinných chromozomů (DOLEŽEL et al. 2004, SHAPIRO 2003). Průtoková cytometrie může být také využita pro rozlišení pohlaví u dvoudomých rostlin (SHAPIRO 2003).

Královská botanická zahrada v Kew má na svých internetových stránkách k dispozici databázi obsahu jaderné DNA pro vyšší rostliny (<http://www.kew.org/cval/homepage.html>). Hodnoty pro obsah DNA jsou udávány jako 1C, tedy hodnoty pro haploidní gametické jádro (SHAPIRO 2003, BENNETT et LEITCH 2005b). C-hodnota druhu *Melampyrum arvense* zjišťovaná metodou průtokové cytometrie je $1C = 8,24$ pg. Jiný druh rodu *Melampyrum* v databázi není uveden. U dalších příbuzných druhů z čeledi Orobanchaceae se hodnoty 1C v databázi pohybují mezi 0,57 pg a 3,05 pg.

Ačkoliv je u jednotlivých druhů velikost genomu většinou konstantní GREILHUBER (1998), v určitých skupinách může analýza velikosti genomu odhalit diverzitu, která není patrná z morfologických měření (OHRI 1998). Tyto rozdíly se většinou dají snadno vysvětlit insercemi, delecemi, duplikacemi a dalšími náhodnými mutacemi (GREILHUBER 1998; SOUZA et al. 2004) a nemusí mít výraznější taxonomický význam. Důvodem vnitrodruhové variability v obsahu jaderné DNA často bývá také metodická chyba při měření průtokovou cytometrií (GREILHUBER 1998, DOLEŽEL et BARTOŠ 2005, MURRAY 2005). Z výše uvedeného tedy vyplývá, že případné vnitrodruhové rozdíly ve velikosti DNA je potřeba interpretovat opatrně a s vědomím, že nemusí zákonitě znamenat taxonomické rozdíly mezi studovanými populacemi.

1.2.6 Isozymová analýza

Isozymová analýza má v rostlinné biologii velmi široké využití (SOLTIS et SOLTIS 1989, ACQUAAH 1992). S oblibou je využívána ve studiích zabývajících se například populační genetickou strukturou (IBÁÑEZ et al. 1999, PECKERT et al. 2005, MANDÁK et al. 2005, CHRTEK et PLAČKOVÁ 2005), rozmnožovacím systémem rostlin (BROWN et al. 1989, FRANCESCHINELLI et BAWA 2000, OJA 2005), evolucí a fylogenezí rostlin (BUSO et al 1998, ARZATE-FERNANDÉZ et al. 2005), variabilitou v rámci rodu (CRAWFORD 1989) a mnoha dalšími směry.

Zároveň se jedná o metodu s oblibou používanou pro studium hybridizace na diploidní i polyploidní úrovni (KAPLAN et al. 2001, NYLÉHN et al. 2003, PHILIPP et SIEGISMUND 2003, ROSENBAUMOVÁ et al. 2004, KRAHULEC et al. 2004). Jednoduchá kodominantní dědičnost isozymů umožňuje snadno rozlišit, zda alely charakteristické pro jednotlivé potenciální rodiče jsou či nejsou v potomcích zastoupeny, a může tak jednoduše rozřešit otázky týkající se hybridizace (SOLTIS et SOLTIS 1989, ACQUAAH 1992).

V rámci problematické skupiny *Melampyrum subalpinum* agg. by tedy mohla isozymová analýza napomoci k rozřešení hypotézy o hybridním původu *Melampyrum subalpinum* s. str. a k interpretaci morfologické variability mezi populacemi.

2. Metodika

2.1 Hybridizační experiment

Hybridizační experimenty byly provedeny ve vegetačních sezónách let 2004 a 2005. Metodika byla upravena s přihlédnutím k opylovacím pokusům provedeným v roce 2003 (CHLUMSKÝ 2004).

2.1.1 Charakteristika pokusných lokalit

Pokusné plochy byly založeny na dvou lokalitách. První lokalita s bohatou populací *Melampyrum bohemicum* se nachází v Doubí u Tábora. Je vzdálená asi 250 m od vlakové zastávky směrem k Táboru a nachází se na asi 20 m širokém pásu mezi kolejemi a hlavní silnicí. Souřadnice lokality jsou N49,32621° E14,71568° (WGS 84).

Stromové patro lokality tvoří druhy *Pinus sylvestris*, *Quercus robur*, *Populus tremula*, *Sorbus aucuparia* a *Corylus avellana*. Bylinné patro tvoří převážně *Avenella flexuosa*, *Calamagrostis arundinacea*, *Agrostis capillaris* a *Festuca ovina*.

Druhá lokalita s populací *Melampyrum nemorosum* se nachází asi 800 m západně od obce Haškovcova Lhota (Bechyně) na pravém břehu říčky Smutná. Populace roste na svahu s východní orientací se stromovým patrem tvořeným *Corylus avellana*, *Larix decidua*, *Quercus robur* a *Fraxinus excelsior*. Bylinné patro bylo omezené zastíněním stromy a kromě *M. nemorosum* se v něm jiné rostliny téměř nevyskytovaly.

2.1.2 Opylování

Průběh kvetení byl rozdělen do sedmi fází (viz tab. 1).

Na začátku pokusu byly vybrané rostliny zbaveny všech květů ve fázi 2 až 6 a u květů ve fázi 1 (a pokud to bylo možné i ve fázi 0) byly vytrženy tyčinky. Tyčinky byly vytrhávány pouze z mladých poupat ve fázi 0 a 1 z důvodu minimalizace rizika samoopylení při manipulaci s tyčinkami. Tyčinky a blizna jsou v květu dobře prostorově odděleny (viz obr. 2), a tedy při včasné kastraci je riziko samoopylení



Obr. 2: Poloha tyčinek a blizny ve květu černýše hajního.

minimální. Poté byly rostliny zakryty sáčky z monofilu (viz obr. 3) a ponechány dalšímu vývinu. Asi po týdnů byly na vyvinutých květech provedeny další zákroky.

Tab. 1: Popis fází kvetení u zkoumaných květů.

Číslo fáze	Popis fáze
0	Velmi mladá poupata, u kterých často nebylo možno odstranit tyčinky bez většího poškození květu.
1	Uzavřená poupata, u kterých již bylo možné snadno odstranit tyčinky.
2	Květ těsně před, nebo těsně po otevření.
3	Plně rozvinutý květ zhruba do poloviny kvetení.
4	Květ za polovinou kvetení, který již začíná odkvéstat.
5	Odkvétající květ se zasychající korunou.
6	Kalich již bez koruny, případně tobolka.

- Pokud se jednalo o dříve vykastované květy, které již postoupily do fáze 2 až 4, kdy je blizna připravena k opylení, byl na nich proveden jeden z těchto zákroků:
 - opylení pylem opačného druhu
 - opylení cizím pylem stejného druhu
 - opylení nebylo provedeno a květ byl ponechán jako kontrolní bez tyčinek
- Na květech s ponechanými tyčinkami, které se na zakrytých rostlinách vyvinuly ve fázi 2 a výše nebyl proveden žádný zákrok a byly ponechány jako kontrolní.
- Nové květy ve fázi 0 a 1, které se vyvinuly na zakrytých rostlinách byly buďto ponechány jako kontrolní s tyčinkami, nebo jim tyčinky byly vytrženy a při další kontrole na nich byl proveden jeden z výše uvedených zákroků.

Pro opylení křížem byly použity květy nasbírané týž den na druhé lokalitě. Květy byly asi dvě hodiny uchovávány v krabičkách od filmu. Pro opylení pylem stejného druhu byly použity květy sebrané z okolních rostlin na místě pokusu.

Opakované opylení květů u černýšů



Obr. 3: Pokusná rostlina zakrytá sáčkem z monofilu.

zvyšuje úspěšnost tvorby tobolek i množství semen (KWAK 1988, 1991, HIEI et SUZUKI 2001). Z těchto důvodů byl každý květ opylen dvakrát v rozmezí asi tří až čtyř hodin.

V případě, že se začala vyvíjet tobolka, bylo nutno zabránit vysypání semen po jejím dozrání a prasknutí. Větší tobolky byly proto ovázány proužky záclonoviny, které zabránily vysypání semen, ale umožnily dozrání tobolky.

Sebraná potenciálně hybridní semena byla posléze vyseta do přirozeného biotopu. Lokalita pro výsev byla vybrána u obce Mokré (České Budějovice) cca 850m Z(S)Z od křižovatky v obci v lesním průseku s náletem dřevin.

2.2 Revize lokalit

V červenci a srpnu roku 2006 byla provedena revize lokalit *Melampyrum bohemicum* v České republice a na Slovensku. Revize navazuje na práci HADAČE (1966), která se detailně zabývala rozšířením tohoto druhu. Nové floristické údaje o výskytu *M. bohemicum* byly získány z prací HOLUB (1996), TICHÝ (1996), KAPLAN (2005), ŠTECH (2005). Další údaje poskytla Agentura ochrany přírody a krajiny a Česká národní fytoocenologická databáze (CHYTRÝ et RAFAJOVÁ 2003), která je na požádání dostupná na internetové adrese (<http://www.sci.muni.cz/botany/database.htm>). Řadu údajů o recentním výskytu *M. bohemicum* mi sdělil Milan Štech.

Smyslem mapování bylo kromě zjištění aktuálního rozšíření *M. bohemicum* položit výchozí bod pro budoucí posouzení změn v populacích. Z tohoto důvodu byly některé lokality výskytu rozděleny na subpopulace. Jako subpopulace byly označovány populace, které náležely do stejného lesního celku, případně rostly podél jednoho úseku silnice a byla mezi nimi relativně malá vzdálenost (max. cca 1 km) nebo šlo o víceméně souvislý výskyt rostliny na větším území.

Na revidovaných lokalitách byly zaznamenány následující charakteristiky: přesná lokalizace se souřadnicemi (souřadný systém WGS 84), nadmořská výška a charakteristika populace s poznámkami o lokalitě a potenciálním ohrožení populace. Dle přesné lokalizace byl zjištěn geologický podklad lokality na mapovém serveru České geologické služby (<http://nts2.cgu.cz/>), průměrný úhrn srážek ve vegetačním období a průměrná teplota ve vegetačním období (SYROVÝ 1958). Kvůli popisu společenstev, ve kterých se *M. bohemicum* vyskytuje byl na většině nalezených lokalit sepsán fytoocenologický snímek. Plocha snímků byla 5 x 5 m. Pokryvnosti jednotlivých druhů byly zaznamenávány v procentech. U mechového patra byla zaznamenávána pouze celková pokryvnost a pokryvnost dominanty.

Data z fytoocenologických snímků byla převedena na Braun-Blanquetovu stupnici a zapsána do programu Turboveg (HENNEKENS et SCHAMINÉE 2001) a dále zpracovávána v programu Canoco for Windows 4.5 (TER BRAAK et ŠMILAUER 2002). Pokryvnosti v procentech byly logaritmovány. Pro znázornění podobnosti jednotlivých snímků byla použita nepřímá gradientová analýza. Vzhledem k relativní různorodosti dat byla vybrána unimodální metoda DCA (detrended correspondence analysis). Pro podložení výsledků z DCA byla data analyzována metodou divizivní klasifikace Twinspan ve stejnojmenném programu (HILL et ŠMILAUER 2005). Kvůli snížení chyby byly po uvážení z analýzy vyloučeny některé rostliny, které se podařilo určit pouze do rodu.

2.3 Průtoková cytometrie

Pro analýzu byly sebrány vzorky populací *Melampyrum bohemicum* z lokalit Majdalena, Příběnice, Týniště nad Orlicí, Sopřeč, Kněževés, Žehrov a ze slovenské lokality Šaštín-Stráže. Vzorky *Melampyrum angustissimum* byly získány z rakouských lokalit Semmering, Puchberg, Merkenstein, Peutenberg a Hofstätten. Vzorky populací *Melampyrum subalpinum* s. str. byly sebrány v rakouském Gumpoldskirchen a Einöde. Vzorky populace *Melampyrum nemorosum* byly získány v Příběnicích a v oblasti Wienerwald u obcí Haidlhof, Gießhübel a Rotes Kreuz. Přesná lokalizace studovaných populací je v příloze 1. Na každé lokalitě bylo sebráno několik listů z 10 rostlin.

Pro stanovení absolutní velikosti jaderného genomu u zkoumaných rostlin byly vzorky obarveny propidium iodidem. Měření bylo provedeno na přístroji Partec PA II v Botanickém ústavu AV ČR v Průhonicích s pomocí a radou Pavla Trávníčka.

Pro určení absolutního obsahu DNA byly vybrány populace *Melampyrum bohemicum* z Příběnic, Týniště n. O. a Šaštín-Stráže (SK), populace *Melampyrum angustissimum* z rakouské lokality Semmering, populace *Melampyrum subalpinum* s. str. z lokality Gumpoldskirchen a populace *Melampyrum nemorosum* z lokality Haidlhof.

Dle standardního postupu (GREILHUBER et OBERMAYER 1997, LYSÁK et al. 1999, DOLEŽEL et BARTOŠ 2005) byly z každé populace vybrány 3 rostliny, které byly analyzovány 3 dny po sobě.

Příprava vzorků pro vlastní měření byla provedena podle upravené metodiky prací DOLEŽEL et GÖHDE (1995), DOLEŽEL et al. (1998) a OTTO (1990). Jako referenční standard byl použit hrách (*Pisum sativum*) (DOLEŽEL et al. 1998).

Metodika:

1. Rozsekání cca 20 mg listu vzorku spolu se stejným množstvím listu hrachu žiletkou v 1ml hypotonického roztoku Otto I¹
2. Přefiltrování suspence přes 42 µm nylonový filtr
3. Centrifugace filtrátu (150 g/5 min)
4. Odsátí supernatantu tak, aby ve zkumavce zbylo ještě asi 100 µl
5. Rozmíchání usazeniny na dně zkumavky, přidání 100 µl roztoku Otto I
6. Inkubace asi 15 minut s občasným jemným protřepáním vzorku
7. Přidání 1 ml roztoku Otto II²
8. Přidání fluorochromu PI (propidium iodide) a RNAsy, oboje na finální koncentraci 50 µg/ml

¹ Chemické složení roztoku Otto I: monohydrát kyseliny citronové (4,2g) a 0,5% Tween 20 (1 ml), celkový objem roztoku je 200 ml.

² Chemické složení roztoku Otto II: Na₂HPO₄·12H₂O (0,4 M; 28,65 g), celkový objem roztoku 200 ml.

9. Analýza průtokovým cytometrem

Rostliny ze všech populací byly porovnány s odpovídajícími standardy z analýzy absolutního obsahu DNA metodou relativního stanovení obsahu DNA. Celkově bylo vždy analyzováno 10 rostlin z populace. Vzhledem k tomu, že byla zjištěna minimální vnitropopulační variabilita, v každém dílčím měření byly analyzovány 3 rostliny společně s jednou standardní.

Metodika stanovení relativního obsahu DNA odpovídá výše uvedené metodice pro absolutní velikost DNA, pouze v kroku 8 bylo jako fluorochrom použito DAPI v koncentraci 4 µg/ml a na doporučení P. Trávníčka byly vypuštěny kroky 3 – 6 bez snížení kvality provedené analýzy.

Při každém měření cytometrem bylo analyzováno minimálně 3000 jader. Pokud se CV³ měření pohyboval nad 3% bylo měření zopakováno.

2.4 Isozymová analýza

Analýza s drobnými úpravami probíhala dle metodik laboratoře izozymové analýzy Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích (KIRSCHNER et al. 2000).

2.4.1 Sběr vzorků

Pro izozymovou analýzu bylo z každé studované populace sebráno deset rostlin se snahou o náhodný výběr. Vzorek z jedné rostliny představovalo asi osm listů či listenů, které byly zabaleny do vlhkého toaletního papíru a vloženy do popsaného igelitového sáčku. Sáčky byly během přepravy v termosce naplněné ledem.

Výběr vzorků byl proveden tak, aby pokryl základní morfologickou variabilitu skupiny (s výjimkou sezónní) a všechny izolované arely výskytu. Vzorky byly získány z těchto populací:

Populace *M. subalpinum* agg. z oblasti Vídeňského lesa:

- Gumpoldskirchen (Rakousko 29. 8. 2006)
- Einöde (Rakousko 30. 8. 2005)
- Hofstätten (Rakousko 30. 8. 2005)
- Merkenstein (Rakousko 29. 8. 2006)

Populace *M. subalpinum* agg. ze severovýchodního okraje Alp:

- Puchberg (Rakousko 30. 8. 2005)
- Semmering (Rakousko 29. 8. 2006)

³ CV – koeficient variance (coefficient of variation) odráží odchylky a nepřesnosti v jaderné izolaci, barvení a měření průtokovým cytometrem. Čím menší je hodnota CV, tím je analýza obsahu DNA přesnější. Optimální hodnoty CV jsou mezi 1 – 3 % (DOLEŽEL et BARTOŠ 2005).

- Peutenberg (Rakousko 29. 8. 2006)

Populace z hlavních arel výskytu v Čechách, na Moravě a na Slovensku:

- Majdalena (Česká republika 30. 8. 2005)
- Týniště nad Orlicí (Česká republika 4.9.2006)
- Příběnice (Česká republika 4.9.2006)
- Kněževes (Česká republika 4.9.2006)
- Sopřech (Česká republika 4.9.2006)
- Žehrov (Česká republika 4.9.2006)
- Šaštín – Stráže (Slovensko 29. 8. 2006)

Populace *M. nemorosum*:

- Hofstätten (Rakousko 30. 8. 2005)
- Gießhübel (Rakousko 30.8.2005)
- Rotes Kreuz (Rakousko 29. 8. 2006)
- Příběnice (Česká republika 4.9.2006)

Všechny vzorky byly okamžitě po sebrání (do 24 hodin) odvezeny k extrakci.

2.4.2 Extrakce vzorků

Asi 80 mg čerstvých listů bez střední žilky bylo homogenizováno ve vychlazené třecí misce s 0,5 ml extrakčního pufru a s přídavkem mořského písku. Byl použit extrakční pufr „Gentiana“ s přídavkem DOWEXu 1x8 – 100 (CI). Homogenát byl centrifugován při 15 000 ot./min ve vychlazené centrifuze. Čistý supernatant byl před provedením elektroforézy několik týdnů uchováván zmražený při teplotě -75 °C.

Extrakční pufr „Gentiana“ (dle receptury izozymové laboratoře BÚ AV ČR):

Množství jednotlivých složek odpovídá 100ml pufru.

Tris HCl 0,1 M pH 8,3	1,2 g
Glutathion 1 %	1,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O 10 mM	0,2 g
Sacharóza 5 %	5,0 g
β – mercaptoethanol	100 μl

2.4.3 Elektroforéza

Elektroforéza vzorků byla provedena na polyakrylamidovém gelu s použitím aparatury pro vertikální elektroforézu HOEFER SE 600. Veškeré postupy a receptury odpovídají skriptům

laboratoře isozymové analýzy Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích (KIRSCHNER et al. 2000).

PAGE byla provedena s použitím 8,16 % separačního gelu a 4 % koncentračního gelu.

Separací gel

Množství jsou uváděna na 4 gely, tedy pro jednu elektroforézu v použité vertikální aparatuře.

Separací gel. pufr pH 8,9	22,5ml
Zásobní roztok (AA + Bis)	2 ml
d H ₂ O	38,25 ml
10 % persíran amonný	360 µl
10% TEMED	360 µl

Koncentrační gel

Koncentrační gel. pufr pH 6,9	18 ml
Zásobní roztok (AA + Bis)	2 ml
10 % persíran amonný	120 µl
10% TEMED	120 µl

Elektrodový pufr

Množství odpovídá pro jednu elektroforézu v použité vertikální aparatuře.

Zásobní roztok elektrodového pufru (Tris – glycin)	2400 ml
d H ₂ O	1800 ml

Vzorky byly do jamek v koncentračním gelu nanášeny v množství 30 µl. Elektroforéza probíhala v chlazené aparatuře ve dvou fázích. V první fázi při 80 mA po dobu asi 1 hodiny (dokud čelo vzorku neprojde diskontinuálním rozhraním koncentračního a separačního gelu) a v druhé fázi při 100 mA po dobu 3 hodin a 15 minut.

2.4.4 Barvení gelů

V prvním kroku bylo testováno 6 enzymových systémů, z nichž byly vybrány 4 s nejlepší reprodukovatelností zymogramů pro další interpretaci. Studované enzymové systémy byly šikimát dehydrogenáza (SKDH EC 1.1.1.25), aspartát aminotransferáza (AAT EC 1.1.1.44), alkohol dehydrogenáza (ADH EC 1.1.1.1) a superoxid dismutáza (SOD EC 1.15.1.1). Značení enzymů v závorkách je použito dle MANCHENKO (1994).

Detekční roztok pro SKDH sestával z 30 ml Tris-HCl pH 8,4 (Bush-pufr), 30 mg Shikimic acid, 5 mg NADP, 6 mg MTT a 1 mg PMS. Gel s detekčním roztokem byl inkubován ve tmě při 32°C po dobu 30 až 60 minut.

Detekční roztok pro AAT sestával ze 40 ml Tris-HCl pH 8,4(Bush-pufri), roztoku A (240 mg Aspartic acid, 40 mg α -ketoglutaric acid) a roztoku B (25 mg Pyridoxal-5-P, 50 mg Fast Blue BB Salt a 50 mg Fast Violet B). Roztok A byl připraven asi 15 min před aplikací s polovinou Bush-pufri. Gel byl po elektroforéze propláchnut ve vodě a poté v pufri Tris-HCl pH 7. Roztok B byl připraven těsně před aplikací s druhou polovinou Bush-pufri. Roztoky A a B byly ve tmě smíchány a okamžitě aplikovány na gel. Inkubace probíhala ve tmě při teplotě 32°C po dobu 2 – 4 hod (do objevení proužků). Poté byl gel opláchnut a přelit fixačním roztokem (100 ml Glycerine, 100 ml Acetic acid, 400 ml Methanol, 400 ml d H₂O).

Detekční roztok pro ADH sestával ze 40 ml 0,1M Tris-HCl pH 7,5, 15 mg NAD, 10 mg MTT, 1 mg PMS a 8 ml ethanolu. Ethanol je nutno aplikovat chlazený těsně před inkubací asi 2 minuty po ostatních složkách. Gel byl inkubován ve tmě při teplotě 32°C po dobu asi 1 hodiny v závislosti na aktivitě enzymu.

Detekční roztok pro SOD sestával z 50 ml 0,05M Tris HCl pH 8,2, 4,5 mg EDTA, 1,5 mg riboflavinu a 5 mg NBT. Gel byl inkubován ve tmě při 37°C po dobu 20 minut a potom pod lampou až do objevení světlých proužků na tmavém pozadí.

Po obarvení byly gely zafixovány v celofánové folii a ponechány k vysušení.

2.4.5 Zpracování dat

Gely byly vyhodnoceny alelicky. Získaná data byla zpracována v programu Popgene (YEH et al. 1997), ve kterém byly zjišťovány tyto genetické charakteristiky populací: **A** – průměrný počet alel na lokus, **%P** – procentické zastoupení polymorfních lokusů (lokus je považován za polymorfní, pokud je detekována více než 1 alela), **H_o** – pozorovaná heterozygotnost, **H_e** – očekávaná heterozygotnost, **F_{is}** – koeficient inbreedingu (míra snížení heterozygotnosti) a Neiovy genetické vzdálenosti populací. Z matice Neiových genetických vzdáleností byl clusterovou analýzou metodou UPGMA vytvořen dendrogram.

Kvůli obtížím s interpretací byl systém AAT z analýz nakonec vyřazen.

2.5 Nomenklatura

Latinské názvy rostlin s výjimkou skupiny *M. subalpinum* agg. jsou sjednoceny podle Klíče ke květeně České republiky (KUBÁT et al. 2002). Názvy mechorostů jsou sjednoceny dle Seznamu a Červeného seznamu mechorostů České republiky (KUČERA et VÁŇA 2005).

3. Výsledky

3.1 Hybridizační experiment

Počet zásahů v jednotlivých kategoriích není vyvážen, protože u některých květů nebylo možné posoudit jejich reprodukční úspěšnost vlivem uhynutí rostliny, poškození při zásazích, či poškození hmyzími herbivory. V obou studovaných sezónách také v několika případech někdo odstranil ochranné sáčky ze studovaných rostlin a ty proto nemohly být dále pozorovány.

3.1.1 Reprodukční úspěšnost květů ošetřených různými zásahy

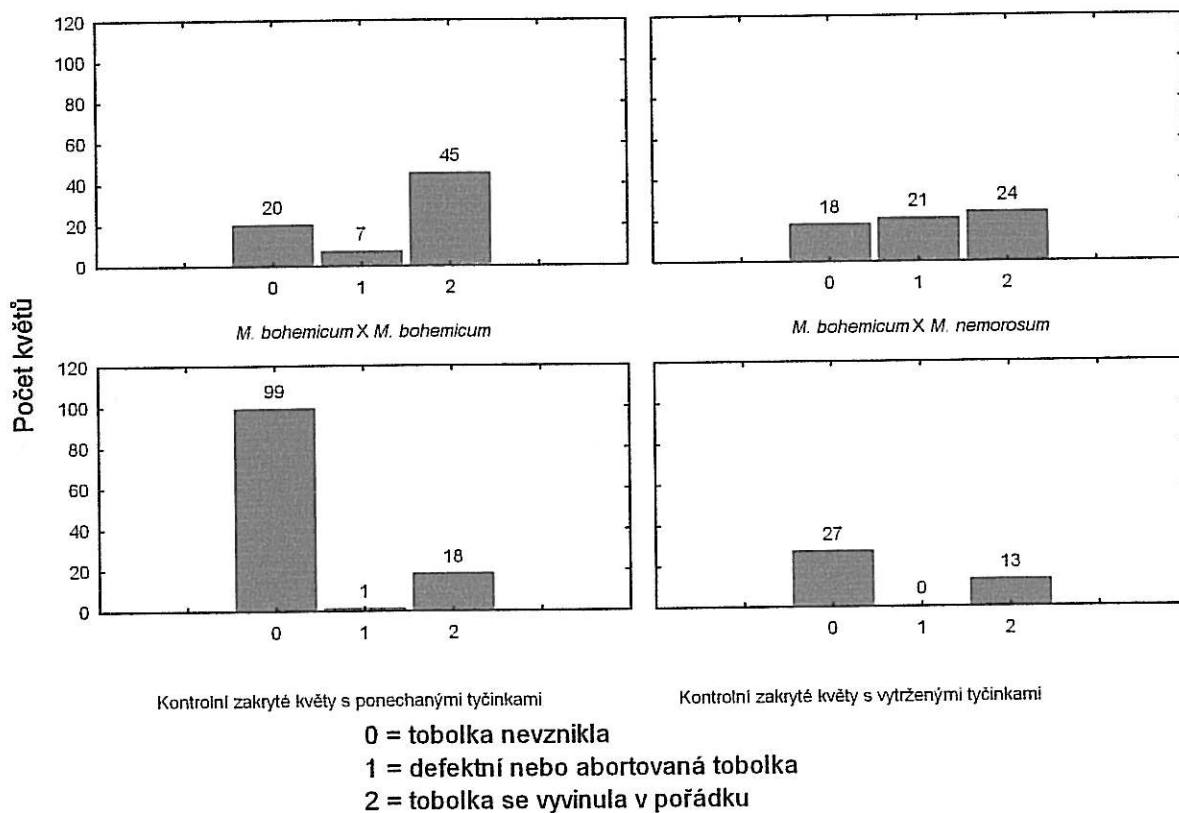
Melampyrum bohemicum (sezóna r. 2004)

Z celkového počtu 63 květů, u kterých bylo provedeno umělé opylení pylem *M. nemorosum* se vyvinulo 45 tobolek (71%), z nichž 21 (47%) neslo jasné stopy defektního vývoje, nebo abortace. Ze 72 květů uměle opylených cizím pylem stejného druhu se vyvinulo 52 (72%) tobolek, z nichž 7 (13%) neslo známky defektního vývoje či abortace. Kontrolních květů s vytrženými tyčinkami bylo 40 a v tobolku se vyvinulo 13 (33%). Defektní tobolky se v tomto případě neobjevily. Kontrolních květů s ponechanými tyčinkami bylo 118 a v tobolku se vyvinulo 19 (16%) květů. Jedna tobolka byla defektní. (viz obr. 4)

Melampyrum nemorosum (sezóna r. 2004)

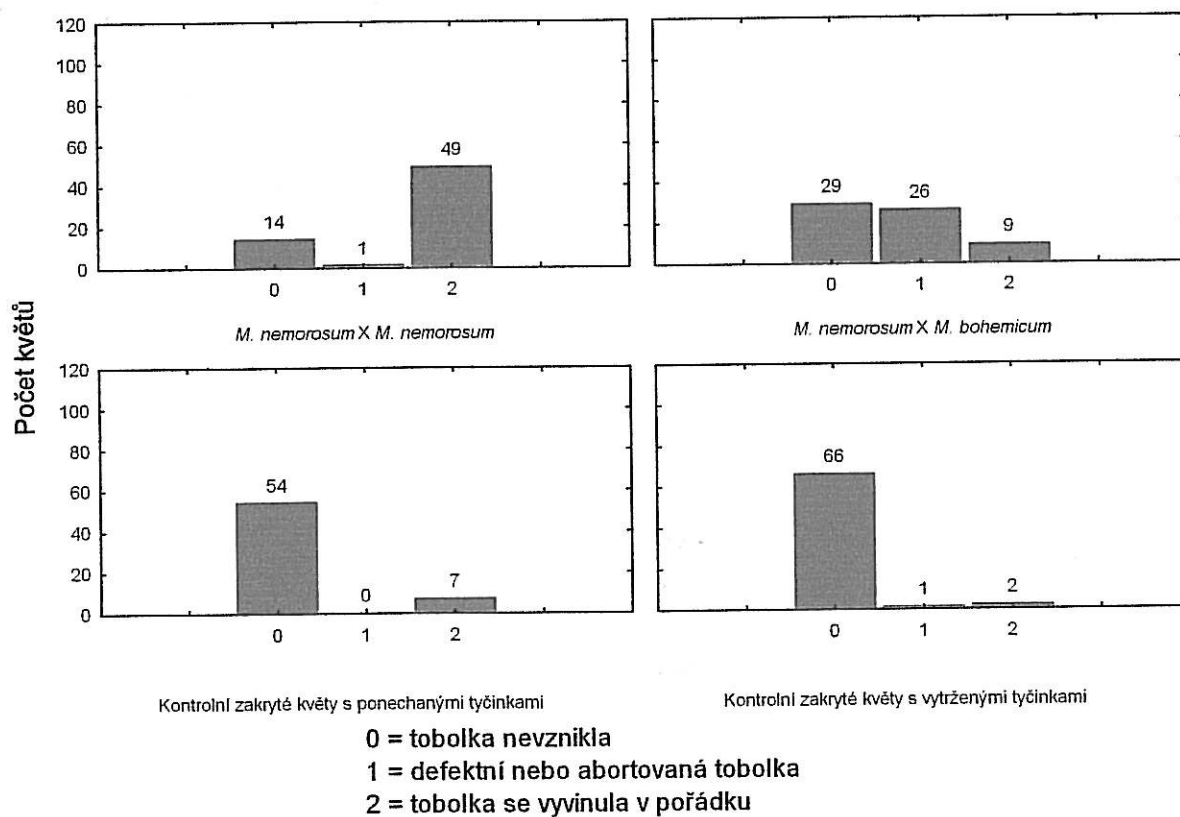
Z celkového počtu 64 květů, u kterých bylo provedeno umělé opylení pylem *M. bohemicum* se vyvinulo 35 tobolek (55%), z nichž 9 (26%) neslo jasné stopy defektního vývoje nebo abortace. Ze 64 květů uměle opylených cizím pylem stejného druhu se vyvinulo 50 (78%) tobolek, z nichž 1 tobolka nesla známky defektního vývoje. Kontrolních květů s vytrženými tyčinkami bylo 68 a v tobolku se vyvinuly 3 květy, z nichž jedna tobolka byla abortovaná. Kontrolních květů s ponechanými tyčinkami bylo 61 a v tobolku se vyvinulo 7 (11%) květů. Žádná tobolka nebyla defektní. (viz obr. 5)

**Úspěšnost tvorby tobolek u *Melampyrum bohemicum* v závislosti na různém zásahu
r. 2004**



Obr. 4: Porovnání úspěšnosti tvorby tobolek v závislosti na různém zásahu u *M. bohemicum*

**Úspěšnost tvorby tobolek u *Melampyrum nemorosum* v závislosti na různém zásahu
r. 2004**



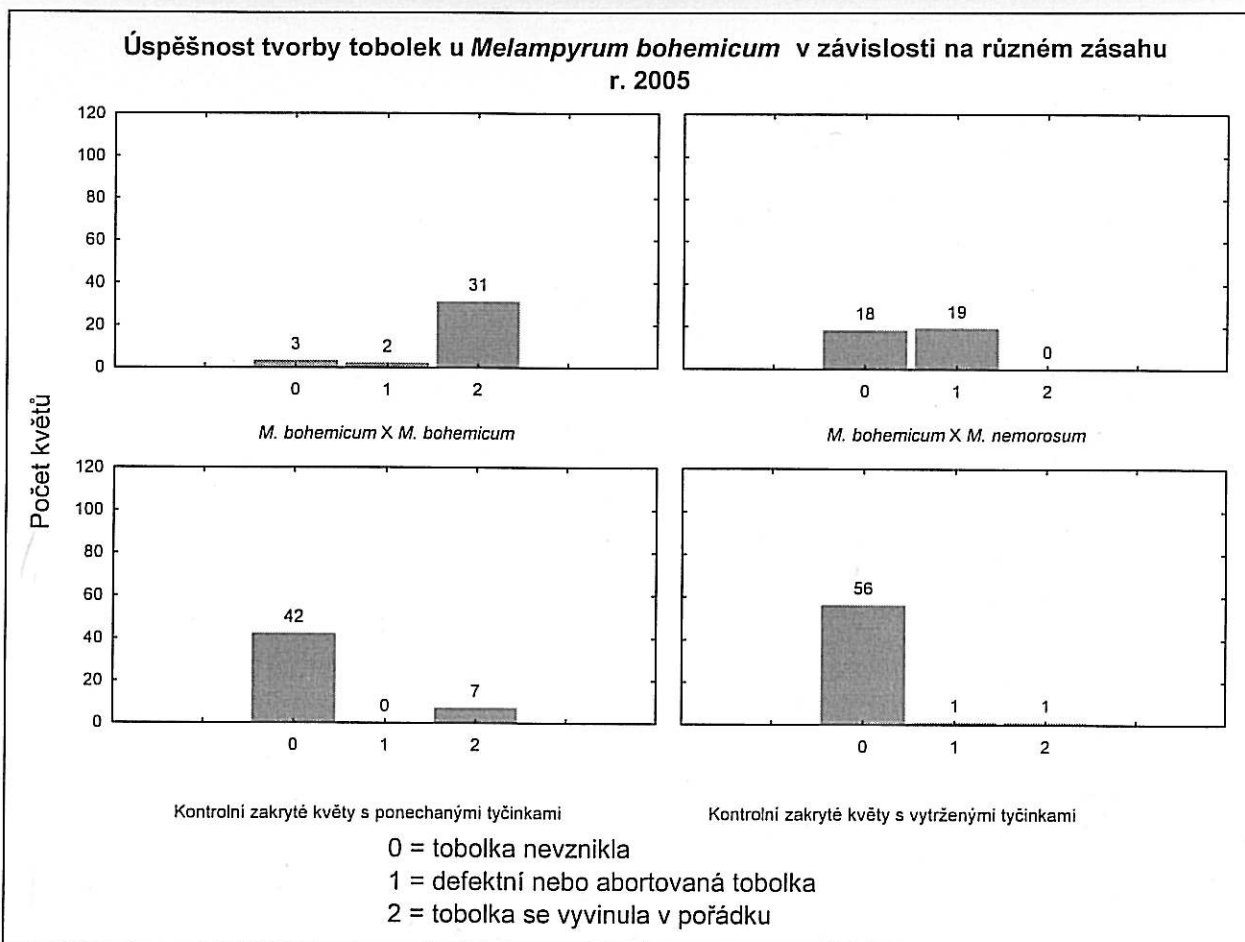
Obr. 5: Porovnání úspěšnosti tvorby tobolek v závislosti na různém zásahu u *M. nemorosum*

Melampyrum bohemicum (sezóna r. 2005)

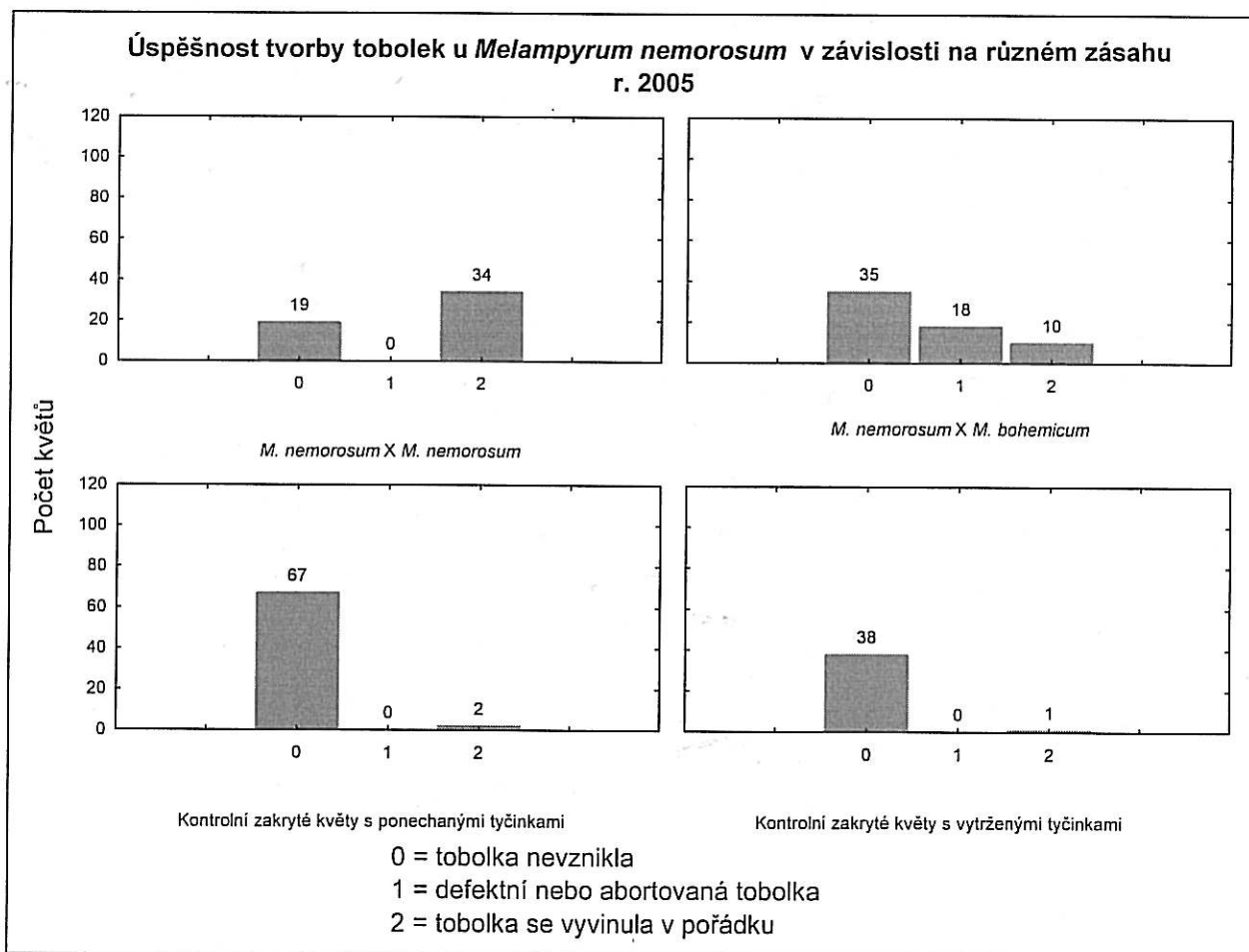
Z celkového počtu 37 květů, u kterých bylo provedeno umělé opylení pylem *M. nemorosum* se vyvinulo 19 tobolek (51%). Všechny tobolky vykazovaly stopy defektního vývoje či abortace. Ze 36 květů uměle opylených cizím pylem stejného druhu se vyvinulo 33 (92%) tobolek, z nichž 2 nesly známky defektního vývoje či abortace. Kontrolních květů s vytrženými tyčinkami bylo 58 a v tobolku se vyvinuly 2 květy. Jedna tobolka byla defektní. Kontrolních květů s ponechanými tyčinkami bylo 49 a v tobolku se vyvinulo 7 (14%) květů. Žádná tobolka nebyla defektní. (viz obr. 6)

Melampyrum nemorosum (sezóna r. 2005)

Z celkového počtu 63 květů, u kterých bylo provedeno umělé opylení pylem *M. bohemicum* se vyvinulo 28 tobolek (44%), z nichž 18 (64%) neslo jasné stopy defektního vývoje nebo abortace. Z 53 květů uměle opylených cizím pylem stejného druhu se vyvinulo 34 (64%) tobolek. Žádná tobolka nebyla defektní. Kontrolních květů s vytrženými tyčinkami bylo 39 a v tobolku se vyvinul 1 květ. Tobolka nebyla defektní. Kontrolních květů s ponechanými tyčinkami bylo 69 a v tobolku se vyvinuly 2 květy. Žádná z tobolek nebyla defektní. (viz obr. 7)



Obr. 6: Porovnání úspěšnosti tvorby tobolek v závislosti na různém zásahu u *M. bohemicum*



Obr. 7: Porovnání úspěšnosti tvorby tobolek v závislosti na různém zásahu u *M. nemorosum*

3.1.2 Výsevové pokusy

Semena získaná z opylovacích pokusů byla na konci sezóny vyseta do přirozeného lesního biotopu. Z vyšetých potenciálně hybridních semen nevzešlo žádné.

3.2 Revize lokalit

Celkem bylo nalezeno 52 lokalit. V příloze 2 je výpis všech ověřených lokalit s popisem lokality, charakteristikami geologického podkladu, průměrnou teplotou ve vegetačním období a průměrným úhrnem srážek ve vegetačním období. Subpopulace, náležející pod jednu lokalitu jsou v příloze 2 od ostatních odděleny podélnými čarami. V tab. 2 jsou pak lokality, na kterých byl zaznamenán fytoecologický snímek.

Tab. 2: Lokality zaznamenaných fytoecologických snímků.

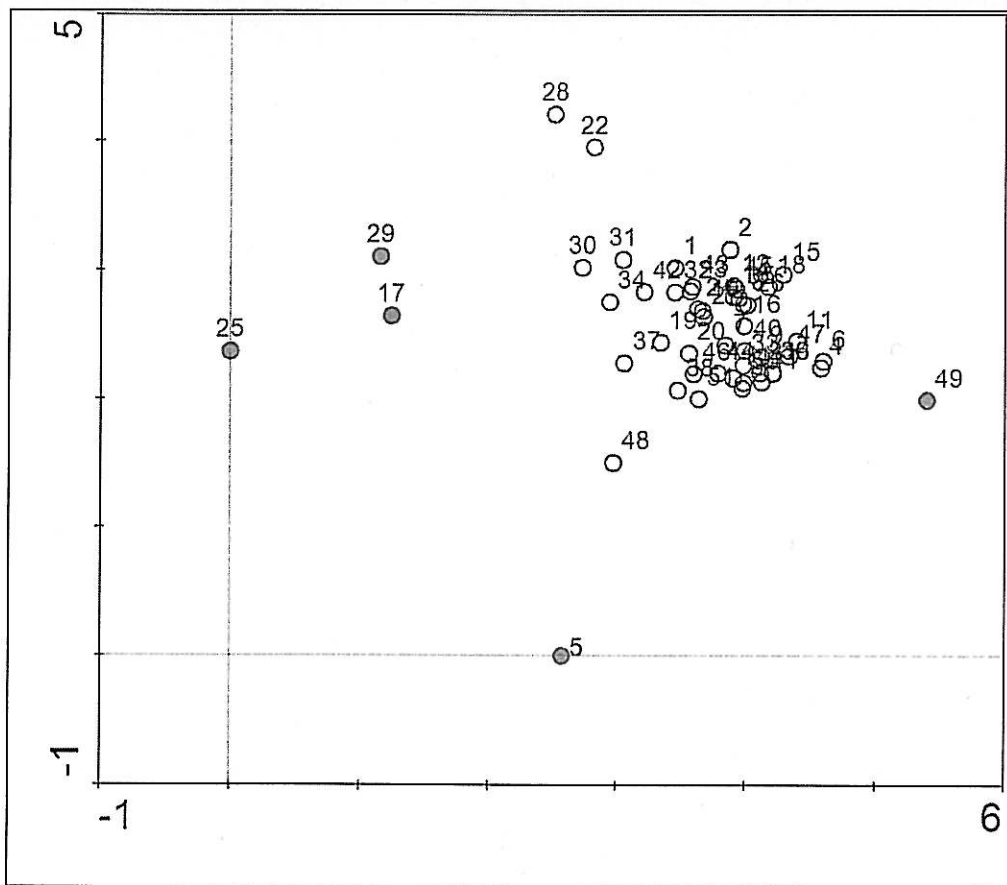
číslo fytoec. Snímku	č. v databázi Turboveg	Datum poslední revize	Lokalita	nadm.v. (m n.m.)	Souřadnice (WGS 84)
1	551350	16.7.2006	Majdalena: lesní cesta k soutoku Lužnice a Nové řeky (zelená značka) cca 200m od hlavní silnice; asi 2,5km SSZ od nádraží v obci	440	N48,98466° E1484436°
2	551351	16.7.2006	Klikov: okraj lesní cesty vedoucí z Jk soutoku Lužnice a Dračice asi 150m od silnice mezi Klikovem a Suchdolem nad Lužnicí; 800m Z od mostu přes Dračici	464	N48,90650° E14,89470°
3	551352	20.7.2006	Halámky: 2,8km J od křižovatky v obci, pravý břeh Lužnice asi 1km V od Lesních Chalup; poslední terasa nad nivou Lužnice - ústí úvozové cesty do nivy	460	N48,83049° E14,93284°
4	551353	20.7.2006	Halámky: 800m JV od hájenky v obci po obou stranách hlavní silnice (Halámky-Neunagelberg) v místě křižování s lesní cestou	467	N48,84177° E14,93738°
5	551354	20.7.2006	Františkov: terasa nad levým břehem Dračice cca 300m JV od mostu silnice na Rapšach	465	N48,89154° E14,94009°
6	551355	1.8.2006	Doubí u Tábora: asi 150m Z od nádraží v borovém lese u staré silnice	425	N49,32243° E14,71519°
7	551356	1.8.2006	(Tábor)Slapy: les u silnice cca 1,5km JZ od obce, pěšina na Z okraji lesa	520	N49,37760° E14,60035°
8	551357	1.8.2006	(Planá nad Lužnicí) Ústrašice: 750m JZ od křižovatky v obci po obou stranách silnice z Ústrašic do Želeče cca 200m před okrajem lesa v okolí křižující lesní cesty	440	N49,33371° E14,67733°
9	51358	5.8.2006	Doubí u Tábora: v borovém lese asi 460m JJV od vlakové zastávky v obci	420	N49,31799° E14,71956°
10	551359	5.8.2006	Doubí u Tábora: smrkový les nad zářezem trati asi 1 km JJV od vlakové zastávky v obci	425	N49,31334° E14,72134°
11	551360	5.8.2006	Doubí u Tábora: asi 950m SSZ od vlakové zastávky v obci v porostu mezi železnicí a silnicí E55	420	N49,33000° E14,71456°
12	551361	5.8.2006	(Bečice u Tábora) Příběnice: J až JZ svah nad silnicí kolem zříceniny Příběnice, cca 150m JJZ od zbytků věže	420	N49,39162° E14,56269°
13	551362	5.8.2006	(Mašice u Tábora) Příběnice: asi 1,5km V od zříceniny na mohylovém pohřebišti ve smrkovém lese	480	N49,39191° E14,58351°
14	551363	5.8.2006	Planá nad Lužnicí: les ca 50m J od rybníka Hejtman	410	N49,33250° E14,72173°
15	551364	7.8.2006	(Olešnice u Kunštátu) Kněževs: asi 1km SSZ od kaple v obci; na SZ svahu Kavinského potoka při cestě se žlutou turistickou značkou	530	N49,59475° E16,41799°
16	551365	7.8.2006	(Olešnice u Kunštátu) Trpín: JZ okraj lesa na vrchu Fouska 900m JJZ od kostela v obci	640	N49,58455° E16,39945°
17	551366	10.8.2006	Kostelec n. Orlicí: při lesní cestě cca 620m JJZ od hájovny u Kostelce n. O. v blízkosti býv. pískovny	315	N50,10688° E16,18907°
18	551367	10.8.2006	(Kostelec nad Orlicí) Zdelov: asi 1,8 km SV od hájovny ve Zdelově u silnice ze Zdelova do Kostelce nad Orlicí; 1,2km V od rybníka v Častolovických Horkách	280	N50,11335° E16,16443°

19	551368	11.8.2006	(Týniště nad Orlicí) vrch Malý Chlum u Čestic: u lesní cesty asi 1 km ZSZ od vlakové zastávky v Česticích	280	N50,13400° E16,13324°
20	551369	11.8.2006	(Týniště nad Orlicí) Rašovice: u silnice z Rašovic do Krivic asi 970m SS(Z) od křižovatky v Rašovících; pod kopcem Hlava (Hlaváč?), podle staršího obyvatele	300	N50,16135° E16,12835°
21	551370	11.8.2006	Křivice (Týniště nad Orlicí): asi 1,25km SZ od kostela v obci na okraji lesa poblíž jedné z lesních cest vedoucích k voj. prostoru	280	N50,18350° E16,09675°
22	551371	11.8.2006	(Týniště nad Orlicí) Sutě břehy: rozcestí Sutě břehy u zlomu terasy nad nivou Orlice	250	N50,15732° E16,02848°
23	551372	11.8.2006	(Týniště nad Orlicí) Nová Ves: při silnici 680m V od hájovny V Jezovinách	300	N50,13796° E16,03532°
24	551373	12.8.2006	(Holice) Dolní Jelení: asi 500m V(J)V od osady Rousínov na okrajích silnice	285	N50,04659° E16,12945°
25	551374	12.8.2006	(Vysoké Mýto) Dobříkov: okraj nesekané stráně pod lesem 0,5km SSZ od kostela v obci; zhruba SZ roh stráně	310	N50,00751° E16,13196°
26	551375	12.8.2006	(Hradec Králové) Hoděšovice: asi 40m V přes cestu od hájovny Bažantnice	280	N50,15725° E15,92501°
27	551376	12.8.2006	(Hradec Králové) Hoděšovice: v lese Z od obce u silnice cca 120m od V okraje lesa	300	N50,14710° E15,90948°
28	551377	12.8.2006	Vysoká nad Labem: při lesní cestě 520m JV od hájovny v obci	260	N50,15118° E15,84681°
29	551378	12.8.2006	Vysoká nad Labem: v lipovém háji u silnice asi 150m JJV od hájovny v obci	260	N50,15285° E15,84125°
30	551379	13.8.2006	Nový Hradec Králové: asi 500m JV od rybníka Biřička u hlavní silnice z Nového Hradce K. do Býšče	280	N50,16741° E15,86620°
31	551380	13.8.2006	(Třebechovice pod Orebem) Bělečko: v mladém smrkovém porostu při silnici z Bělečka do Třebechovic, cca 1,6 km SSV od křižovatky v obci Bělečko	270	N50,16388° E15,96336°
32	551381	13.8.2006	Běleč nad Orlicí: 1,3km ZSZ od křižovatky v obci při silnici mezi Bělčí a Svinary na hraně terasy nad nivou Orlice; přes silnici proti hájovně Škvárovka v chatářské osadě	245	N50,20584° E15,92646°
33	551382	16.8.2006	Kardašova Řečice: na okraji borového lesa u turistické značky ca 2,5km JJZ od nádraží v obci	445	N49,16297° E14,84647°
34	551383	18.8.2006	Kolence: les při silnici do Novosedel nad Nežárkou ca 900 m JV od obce	445	N49,08643° E14,79793°
35	551384	19.8.2006	(Chlum u Třeboně) Kosky: asi 720m JJZ od mostu přes Kostěnický potok v obci nad pravým břehem Lužnice v lese za chatami	450	N48,94421° E14,88637°
36	551385	19.8.2006	Suchdol nad Lužnicí: smrkový les při soutoku Lužnice s Dračicí (na terase na pravém břehu Lužnice) ca 540m SSV od mostu přes Lužnici v obci Suchdol n. L.	450	N48,90893° E14,89216°
37	551386	21.8.2006	(Olešnice u Kunštátu) Nyklovice: u lesní cesty ca 1,8km VJV od křižovatky v obci; svah nad L břehem Hodonínky (Nyklovického potoka)	620	N49,60185° E16,37135°
38	551387	21.8.2006	(Olešnice u Kunštátu) Velké Tresné: v údolí Tresného potoka na terase nad potokem na kraji lesní cesty asi 800m J(J)V od křižovatky v obci	540	N49,56416° E16,38700°
39	551388	21.8.2006	Olešnice u Kunštátu: smrkový les při silnici Olešnice - Nyklovice asi 1,7km J od kostela v obci Trpín nad L břehem Hodonínky při lesní cestě nad bývalým lomem(?)	600	N49,57538° E16,40224°
40	551389	22.8.2006	(Pardubice) Černá za Bory: JZ část lesa S od silnice mezi obcemi Zminný a Černá za Bory ca 650m V od vlakové zastávky v obci	240	N50,02766° E15,84306°
41	551390	22.8.2006	(Pardubice) Bělobranská dubina, Veska: okraj lesa za rodinnými domy 680m ZSZ od kostela v obci	230	N50,04098° E15,85254°
42	551391	22.8.2006	(Pardubice) Bělobranská dubina, Sezemice: okraj silnice mezi Černou za Bory a Sezemicemi 2,7km JJZ od kostela v obci	230	N50,04154° E15,84028°
43	551392	22.8.2006	(Pardubice) Bělobranská dubina, Spojil: na okraji lesa u lesní pěšiny ca 590m S(S)V od křižovatky v obci	230	N50,04638° E15,82786°

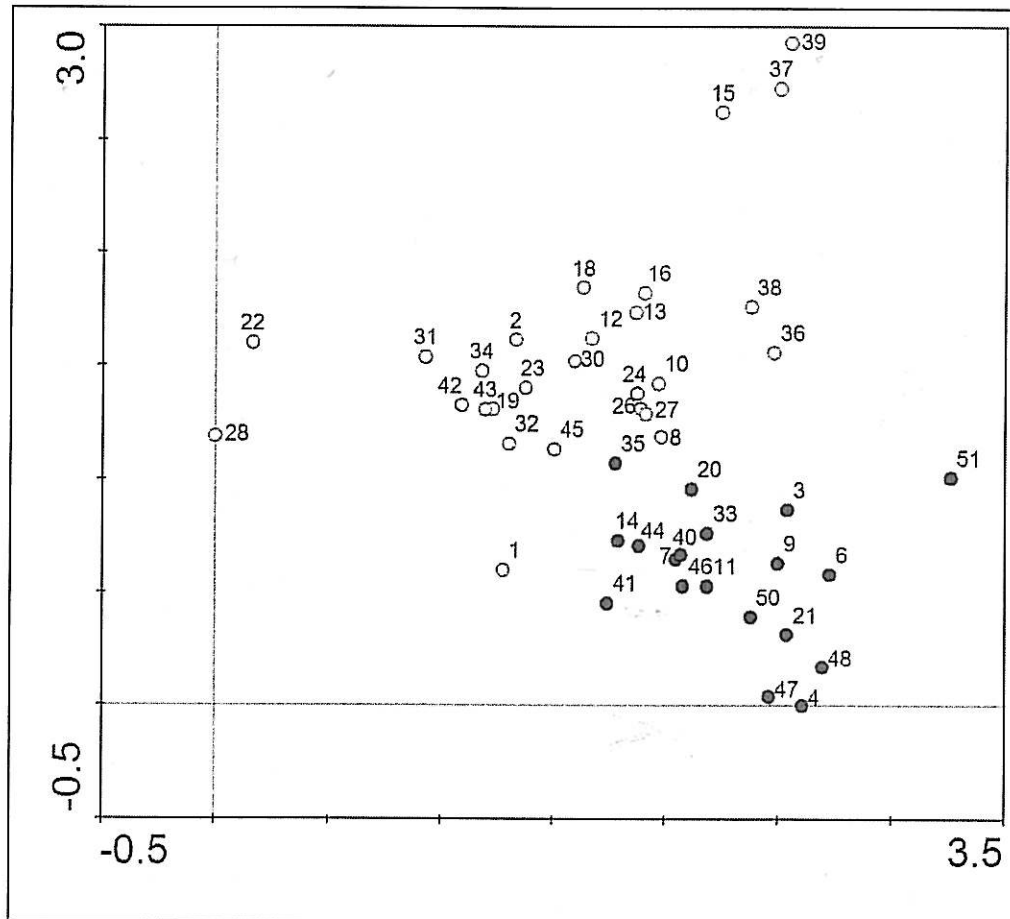
44	551393	22.8.2006	(Přelouč) Přelovice: doubrava u silnice na Vlčí Habřinu 1,5km ZJZ od kostela v obci	230	N50,07073° E15,59530°
45	551394	22.8.2006	Břehy: lesní světlina SV rybníka Černý Nadýmač ca 2km Z(S)Z od kostela v Přelovicích	240	N50,07627° E15,58875°
46	551395	23.8.2006	(Přelouč) Sopřeč: bor u silnice J od obce ca 980m J od křižovatky Sopřeč - Strašov - Břehy	220	N50,06899° E15,54539°
47	551396	23.8.2006	(Mnichovo Hradiště) Žehrov: bývalý lom u silnice kolem obory zámečku Bellevue ca 980m J(J)Z od křižovatky v obci	280	N50,52346° E15,10729°
48	551397	25.8.2006	(SK)Šaštín - Stráže: doubrava u silnice v blízkosti hájovny ca 2km JJZ od žel. zastávky v obci	200	N48,61874° E17,13850°
49	551398	25.8.2006	(SK)Borský Mikuláš: bor J od silnice do Šaštína ca 3km Z od obce	180	N48,63115° E17,17033°
50	551399	25.8.2006	(SK) Borský Mikuláš, Šajdkové Humence: světlý bor na V okraji obce (ca 180m V od kostela)	200	N48,65257° E17,27207°
51	551400	26.8.2006	(SK) Malacky: lesní cesta 170m SV od býv. hájovny Červený Kríž (momentálně vojenský objekt)	ca 200?	N48,47697° E17,05714°

Na obr. 8 je diagram analýzy DCA pro snímky. Celkově analýza vysvětlila velmi malou část variability. První kanonická osa vysvětlila pouze 7,1% variability a druhá 5,1%. Na diagramu lze rozeznat několik odlehlých snímků a víceméně homogenní shluk zbylých snímků. Odlehlé snímky lze charakterizovat jako snímky okrajových biotopů, pro které není výskyt *M. bohemicum* typický. Snímek 25 se nalézal na okraji nesekané stráně a k lesním druhům tak přibylo i mnoho druhů lučních. Snímky 29 a 17 se nacházely v listnatém lese s humóznější půdou. Stromové patro snímku 17 bylo tvořeno *Quercus rubra*, *Tilia cordata* a *Acer pseudoplatanus*. U snímku 29 byl ve stromovém patře zastoupen jen druh *Tilia cordata*. Další odlehlý snímek 5 byl sepsán v řídkém borovém lese s relativně zapojeným bylinným patrem a s příměsí lučních a nitrofilních druhů jako *Lotus corniculatus* nebo *Holcus mollis*. Další samostatně stojící snímek 49 byl sepsán na Slovensku v oblasti Záhorí ve světlém písčitém boru. Tento snímek se od ostatních lišil zastoupením druhů, které jsou typické pro oblast Záhorí (např. *Dianthus serotinus*, *Koeleria glauca*, *Festuca vaginata*).

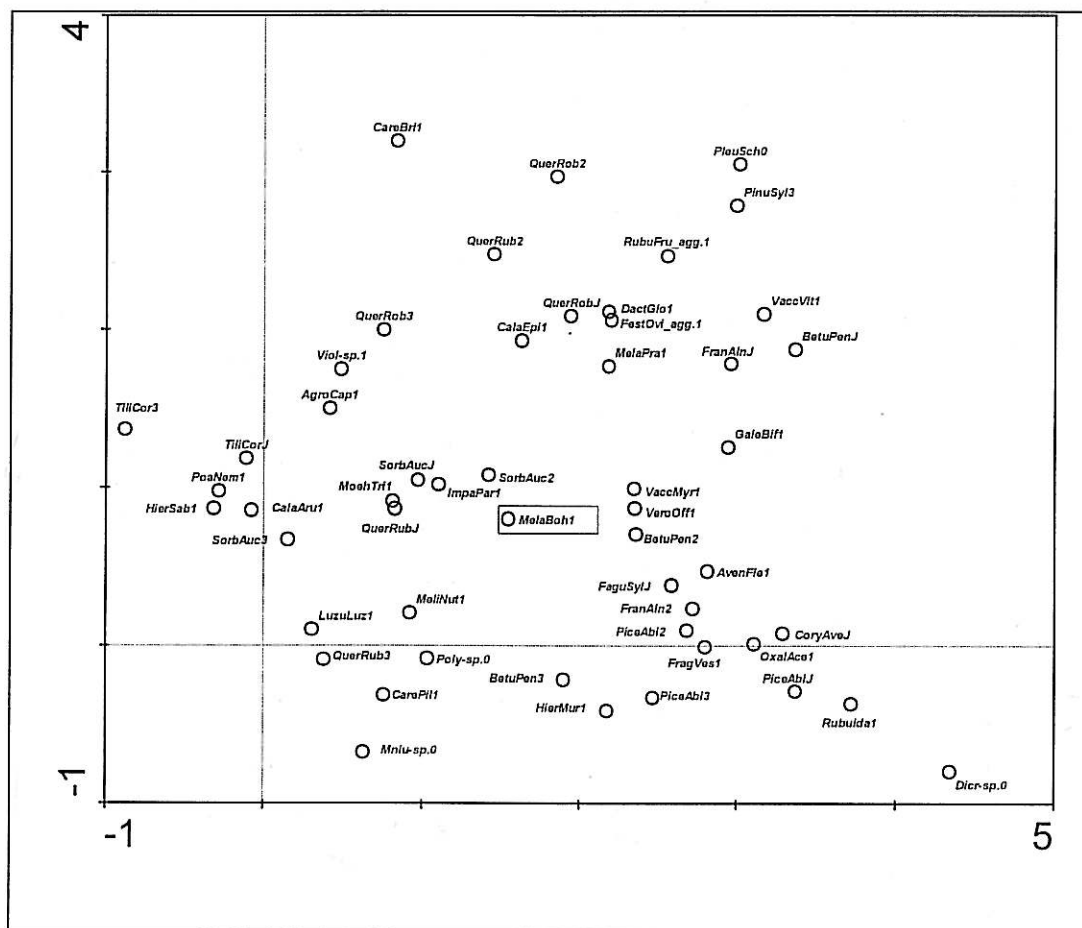
Se záměrem rozlišit další potenciální podskupiny ve shluku zbylých snímků byla analýza DCA provedena ještě jednou bez zmíněných odlehlých snímků. Kanonické osy v tomto případě opět vysvětlily velmi malou část variability. Pro první osu to bylo 5,4% a pro druhou 4,3% vysvětlené variability. Výsledky analýzy DCA byly porovnány s výsledky z analýzy Twinspan. Po rozřazení snímků analýzou Twinspan byly stejně jako v případě DCA odlišeny jako nejodlehlejší výše zmíněné snímky 17, 25, 29, 49 a 5. Zbylé snímky byly rozděleny na dvě hlavní skupiny jejichž indikátorové druhy pro dělení byly: *Picea abies* (E3), *Hieracium murorum*, a *Carex pilulifera* pro jednu skupinu (v obr. 9 vyznačena bílými symboly) a *Pinus sylvestris* (E3), *Frangula alnus* (juv.), *Pleurozium schreberii* a *Quercus robur* (juv.) pro druhou skupinu (v obr. 9 vyznačena černými symboly). Po promítnutí těchto skupin do diagramu DCA se shluk rozdělil na dvě dobře ohraničené skupiny (viz obr. 9). Na obr. 10 je diagram stejné analýzy pro DCA druhů. Bohužel lze vzhledem k nízké vysvětlené variabilitě diagram pro DCA druhů velmi obtížně interpretovat.



Obr. 8: DCA snímků. Zvýrazněny jsou nejdálejší snímků, které byly kvůli rozlišení shluku snímků vyřazeny z další analýzy. Čísla fyto. snímků odpovídají tab. 2.



Obr. 9: DCA snímků s odstraněnými odlehlými snímků. Barevně jsou označeny dvě skupiny rozlišené metodou Twinspan. Čísla fyto. snímků odpovídají tab. 2.



Obr. 10: DCA druhů⁴⁵ s největší vahou (od 5%). *Melampyrum bohemicum* je zvýrazněno.

⁴ Vysvětlivky zkratk druhů v diagramu DCA: **AgroCap** – *Agrostis capillaris*; **AvenFle** – *Avenella flexuosa*; **BetuPen** – *Betula pendula*; **CalaAru** – *Calamagrostis arundinacea*; **CalaEpi** – *Calamagrostis epigejos*; **CareBri** – *Carex brizoides*; **CarePil** – *Carex pilulifera*; **CoryAve** – *Corylus avellana*; **DactGlo** – *Dactylis glomerata*; **Dicr-sp.** – *Dicranum* sp.; **FaguSyl** – *Fagus sylvatica*; **FestOvi_agg.** – *Festuca ovina* agg.; **FragVes** – *Fragaria vesca*; **FranAln** – *Frangula alnus*; **GaleBif** – *Galeopsis bifida*; **HierMur** – *Hieracium murorum*; **HierSab** – *Hieracium sabaudum*; **ImpaPar** – *Impatiens parviflora*; **LuzuLuz** – *Luzula luzuloides*; **MelaBoh** – *Melampyrum bohemicum*; **MelaPrat** – *Melampyrum pratense*; **MeliNut** – *Melica nutans*; **Mniu_sp.** – *Mnium* sp.; **MoehTri** – *Moehringia trinervia*; **OxalAce** – *Oxalis acetosella*; **PiceAbi** – *Picea abies*; **PinuSyl** – *Pinus sylvestris*; **PleuSch** – *Pleurozium schreberii*; **PoaNem** – *Poa nemoralis*; **Poly_sp.** – *Polytrichum* sp.; **QueRob** – *Quercus robur*; **QueRub** – *Quercus rubra*; **RubuFru_agg.** – *Rubus fruticosus* agg.; **RubuIda** – *Rubus idaeus*; **SorbAuc** – *Sorbus aucuparia*; **TiliCor** – *Tilia cordata*; **VaccMyr** – *Vaccinium myrtillus*; **VaccVit** – *Vaccinium vitis-idaea*; **VeroOff** – *Veronica officinalis*; **Viol-sp.** – *Viola* sp.

⁵ Značení za zkratkou duhů: **0** – mechové patro; **1** – bylinné patro; **2** – keřové patro; **3** – stromové patro; **J** – juvenilní dřevina nepřevyšující bylinné patro

3.3 Průtoková cytometrie

V tab. 3 jsou uvedeny výsledky stanovení absolutního obsahu DNA pro šest studovaných populací. Hodnoty poměru fluorescence k hrachu pro jednotlivé lokality (viz tab. 3) byly vyneseny do grafu (viz obr. 11). Analýzou variance (ANOVA) bylo zjištěno, že velikost genomu vyjádřená poměrem fluorescence k hrachu se mezi studovanými populacemi průkazně liší ($F = 537,04$; $p < 0,0001$). Pro zjištění rozdílů ve velikosti genomu mezi jednotlivými populacemi bylo provedeno mnohonásobné porovnání výsledků Tukeyho testem (viz tab. 4).

Tab. 3: Výsledky analýzy absolutního obsahu DNA.

Taxon	Lokalita	Počet rostlin	Poměr fluorescence k <i>Pisum</i> ($x \pm s.e.$)	2C obsah jaderné DNA (pg) ($x \pm s.e.$)
<i>M. subalpinum</i> s. str.	Gumpoldskirchen	3	$1,286 \pm 0,003$	$11,675 \pm 0,028$
<i>M. nemorosum</i>	Haidlhof	3	$1,134 \pm 0,0004$	$10,3 \pm 0,003$
	Šaštín-Stráže	3	$1,254 \pm 0,001$	$11,384 \pm 0,01$
<i>M. bohemicum</i>	Příběnice	3	$1,305 \pm 0,003$	$11,853 \pm 0,03$
	Týniště n. O.	3	$1,315 \pm 0,007$	$11,915 \pm 0,07$
<i>M. angustissimum</i>	Semmering	3	$1,309 \pm 0,002$	$11,882 \pm 0,02$

Tab. 4: Výsledky Tukeyho testu pro rozdíly mezi hodnotami obsahu jaderné DNA ($F = 537,04$). Šedě jsou vyznačeny případy, kdy se populace neliší průkazně.

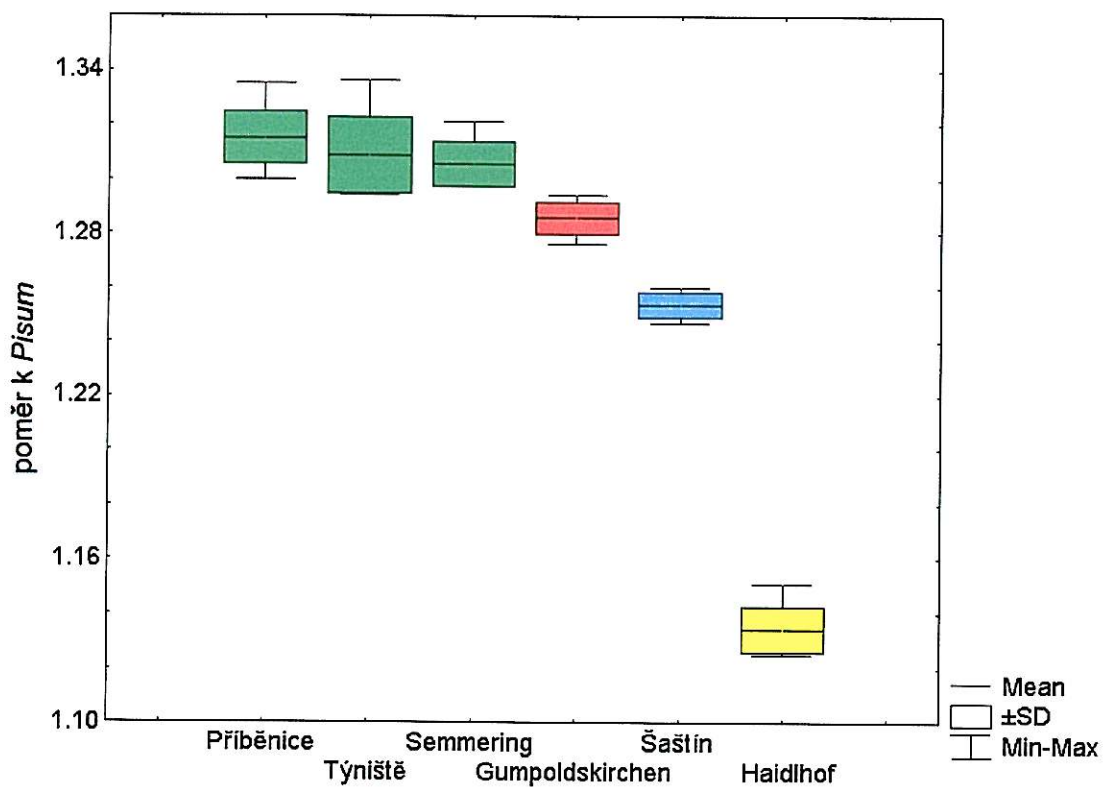
	Haidlhof (<i>M. nemorosum</i>)	Gumpoldskirchen (<i>M. subalpinum</i> s. str.)	Týniště n. O. (<i>M. bohemicum</i>)	Příběnice (<i>M. bohemicum</i>)	Semmering (<i>M. angustissimum</i>)	Šaštín-Stráže (<i>M. bohemicum</i>)
Haidlhof (<i>M. nemorosum</i>)	x	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Gumpoldskirchen (<i>M. subalpinum</i> s. str.)	< 0,0001	x	< 0,0001	< 0,0001	0,0003	< 0,0001
Týniště n. O. (<i>M. bohemicum</i>)	< 0,0001	< 0,0001	x	0,6268	0,9756	< 0,0001
Příběnice (<i>M. bohemicum</i>)	< 0,0001	< 0,0001	0,6268	x	0,2128	< 0,0001
Semmering (<i>M. angustissimum</i>)	< 0,0001	0,0003	0,9756	0,2128	x	< 0,0001
Šaštín-Stráže (<i>M. bohemicum</i>)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	x

Rostliny z dalších studovaných populací byly srovnány metodou stanovení relativního obsahu DNA se standardy získanými z populací, u kterých byl zjištěn absolutní obsah jaderné DNA. Mapa na obr. 12 zobrazuje všechny analyzované populace. Barva populací odpovídá barvám jednotlivých hodnot poměru fluorescence k *Pisum* v obr. 11.

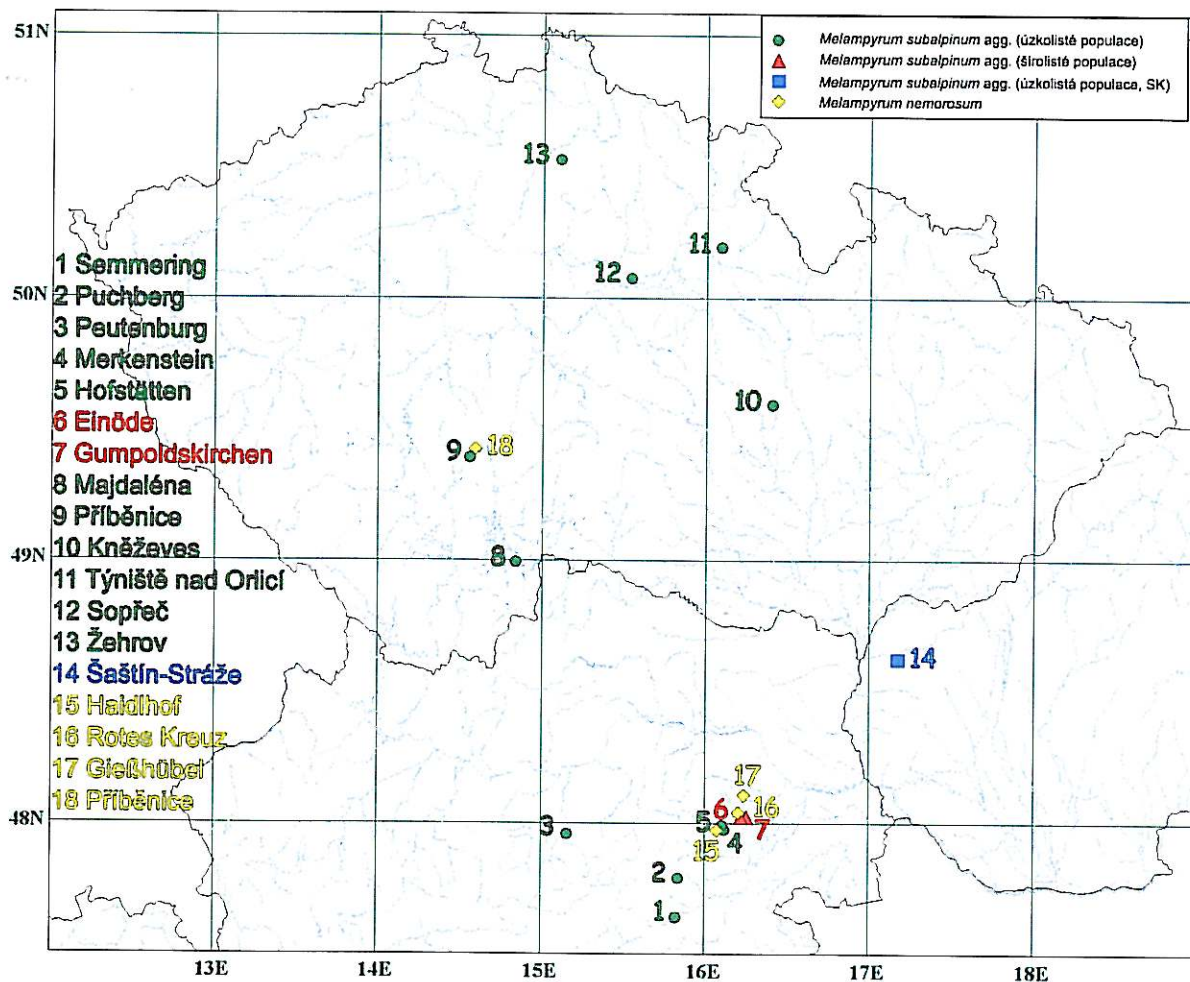
Nebyla zjištěna variabilita ve velikosti genomu uvnitř populací.

Mezi populacemi *M. angustissimum* a *M. bohemicum* není průkazný rozdíl. Mezi rakouskými populacemi *M. subalpinum* s. str. s výrazně širokými listy a úzkolistými populacemi *M.*

angustissimum a *M. bohemicum* byl zjištěn malý, ale statisticky průkazný rozdíl v obsahu DNA. Populace *M. subalpinum* s. str. mají obsah DNA o 1,5% až 2,3% menší. Překvapivý rozdíl byl zjištěn u slovenské populace *M. bohemicum*, která se od zbylých populací průkazně liší (má o 4,1% – 4,8% menší obsah DNA). Populace *M. nemorosum* se průkazně lišily od všech ostatních populací. Proti úzkolistým populacím měly populace *M. nemorosum* o 15,1% až 15,9% menší obsah DNA.



Obr. 11: Srovnání absolutního obsahu DNA (poměr fluorescence k *Pisum*).



Obr. 12: Mapa lokalit analyzovaných průtokovou cytometrií.

3.4 Isozymová analýza

Bylo hodnoceno isozymové spektrum u 14 populací *M. subalpinum* agg. a 4 populací *M. nemorosum*. Nakonec byly vyhodnoceny 3 enzymové systémy s celkem 4 interpretovatelnými lokusy. U ADH a SHDH byl interpretován vždy jeden lokus a u SOD lokusy dva.

V systému SHDH se u populací *M. subalpinum* s. str. z lokalit Einöde a Hofstätten vyskytla společná unikátní alela, kterou další populace neobsahovaly. V lokusu SOD 1 se vyskytla společná unikátní alela pro populace *M. nemorosum* z lokalit Gieshübel a Rotes Kreuz. V systému ADH se vyskytlo několik unikátních alel pro jednotlivé populace a jedna unikátní alela sdílená populací *M. bohemicum* z lokality Šaštín-Stráže a populací *M. nemorosum* z Příběnic, která měla ještě další dvě unikátní alely.

Genetické parametry populací jsou shrnuty v tab. 5. Nejvyšší průměrný počet alel na lokus (A) a procento polymorfních lokusů (%P) měla populace *M. nemorosum* z lokality Rotes Kreuz. Naopak nejnižší hodnoty vykazovaly

české populace *M. bohemicum*. Obecně vykazovaly nejvyšší průměrný počet alel na lokus a procento polymorfních lokusů populace *M. nemorosum* a širolisté populace *M. subalpinum* s. str. z oblasti Wienerwaldu. Rakouské populace *M. angustissimum* vykazovaly variabilitu výrazně nižší, a české a slovenská populace *M. bohemicum* byly nejméně variabilní.

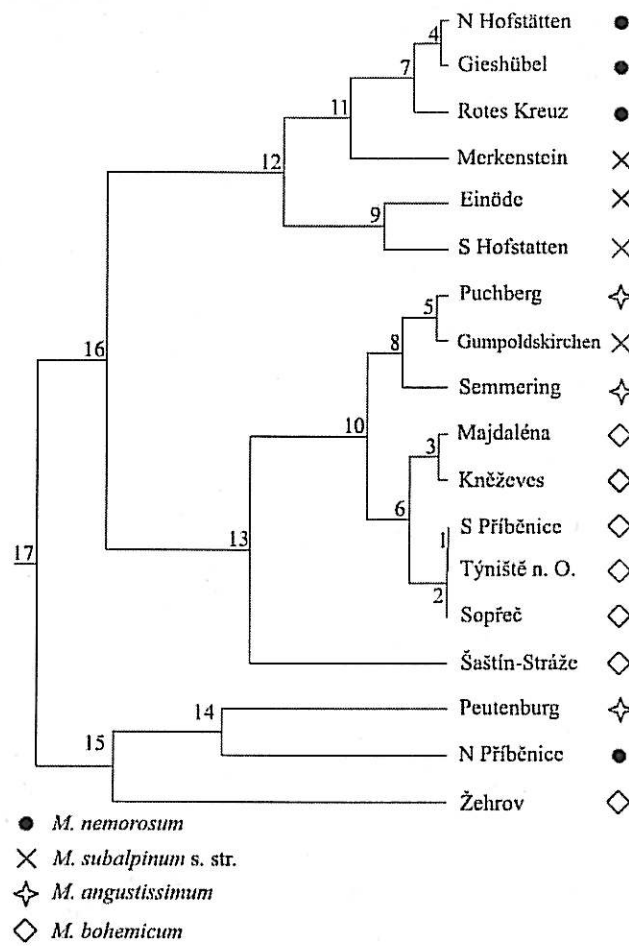
Tab. 6 zobrazuje matici Neiových genetických vzdáleností a podobností. Na obr. 13 je dendrogram vytvořený metodou UPGMA pro Neiovy genetické vzdálenosti. Na obr. 14 je diagram PCoA (Principal Coordinates Analysis) založené na matici Neiových genetických vzdáleností. Zobrazena je první a druhá kanonická osa. Obě osy dohromady vysvětlily 50,7% variability (28,1% a 22,6%). Třetí a čtvrtá kanonická osa vysvětlily 13,3% a 12,1% variability.

Tab. 5: Genetické charakteristiky populací *M. subalpinum* agg. a *M. nemorosum*. A – průměrný počet alel na lokus, %P – procentické zastoupení polymorfních lokusů (lokus je považován za polymorfní, pokud je detekována více než 1 alela), H_o – pozorovaná heterozygotnost, H_e – očekávaná heterozygotnost, F_{is} – koeficient inbreedingu (míra snížení heterozygotnosti)

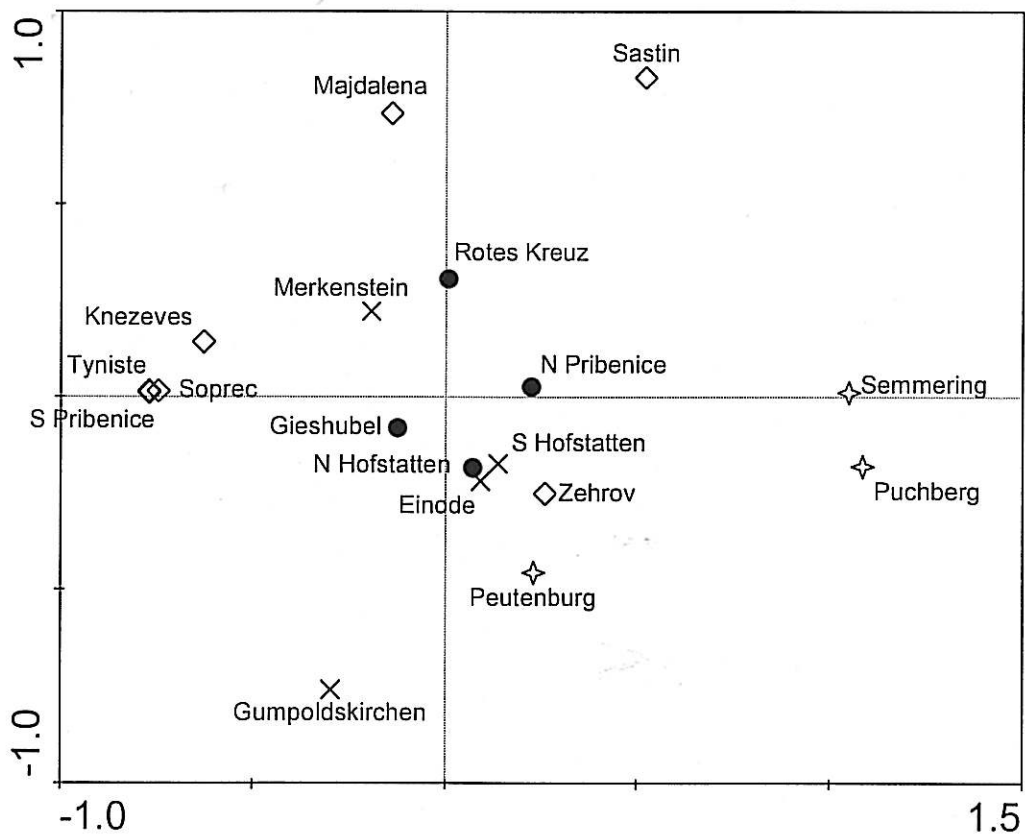
Populace	A	%P	H_o	H_e	F_{is}
<i>M. nemorosum</i> (AU)					
Hofstätten N	2	75	0,350	0,338	-0,035
Gieshübel	2,25	75	0,300	0,313	0,042
Rotes Kreuz	2,75	100	0,275	0,332	0,171
Průměr	2,33	83,3	0,308	0,328	0,059
<i>M. nemorosum</i> (CZ)					
N Příběnice	2,25	50	0,300	0,311	0,034
<i>M. subalpinum</i> s. str. (AU Wienerwald)					
Einöde	3	75	0,375	0,407	0,078
Hofstätten	2,5	75	0,500	0,480	-0,041
Merkenstein	2,25	75	0,400	0,432	0,073
Gumpoldskirchen	2,25	75	0,400	0,341	-0,174
Průměr	2,5	75	0,419	0,415	-0,016
<i>M. angustissimum</i> (úzkolisté) (AU)					
Puchberg	2	75	0,125	0,233	0,463
Peutenburg	1,75	75	0,325	0,262	-0,241
Semmering	2	50	0,200	0,230	0,132
Průměr	1,92	66,7	0,217	0,242	0,118
<i>M. bohemicum</i> (CZ)					
Majdaléna	1,25	25	0,150	0,132	-0,140
B Příběnice	1,5	50	0,050	0,092	0,457
Sopřeč	1,5	50	0,150	0,158	0,050
Žehrov	1,25	25	0,050	0,084	0,406
Týniště n. O.	1,25	25	0,100	0,084	-0,188
Kněževes	1,25	25	0,125	0,099	-0,266
Průměr	1,33	33,3	0,104	0,108	0,053
<i>M. bohemicum</i> (SK)					
Šaštín-Stráže	1,5	50	0,100	0,158	0,367

Tab 6: Neiovy genetické podobnosti (pod diagonálou) a genetické vzdálenosti (nad diagonálou) mezi populacemi.

	S														Šaštin													
	N	Hofstättlen	Gieshübel	Rotes Kreuz	N	Příběnice	Einöde	S	Hofstättlen	Merkenstein	Gumpolds- kirchen	Majdaléna	S	Příběnice	Sopřeč	Žehrov	Týniště	Kněževes	Šaštin	Stráže	Puchberg	Peutenburg	Semmering					
N Hofstättlen	x	0,9775	0,9468	0,5078	0,8231	0,7623	0,9086	0,6679	0,665	0,5734	0,6287	0,5125	0,5821	0,7092	0,4657	0,6018	0,7343	0,612										
Gieshübel	0,0227	x	0,9388	0,4032	0,8053	0,7301	0,8776	0,6039	0,6856	0,5613	0,6293	0,398	0,5753	0,752	0,4271	0,529	0,6779	0,5652										
Rotes Kreuz	0,0546	0,0631	x	0,393	0,1795	0,3444	0,8022	0,5859	0,4372	0,5312	0,593	0,3937	0,5448	0,706	0,8011	0,6178	0,6343	0,5058										
N Příběnice	0,6777	0,9083	0,9339	x	0,7383	0,451	0,5273	0,4007	0,7393	0,5766	0,549	0,6581	0,5588	0,391	0,3859	0,3809	0,3159	0,3168										
Einöde	0,1947	0,2166	0,8357	0,4779	x	0,898	0,7759	0,6364	0,6141	0,5081	0,5642	0,4458	0,519	0,6704	0,5209	0,5334	0,7051	0,4991										
S Hofstättlen	0,2714	0,3145	0,7087	0,637	0,1076	x	0,8552	0,7916	0,743	0,7169	0,7502	0,6857	0,714	0,739	0,6141	0,7232	0,751	0,7384										
Merkenstein	0,0958	0,1306	0,2204	0,5902	0,2538	0,1564	x	0,1993	0,2902	0,701	0,7466	0,7635	0,699	0,7607	0,5465	0,3131	0,2677	0,296										
Gumpoldskirchen	0,4036	0,5043	0,5347	0,6698	0,4519	0,2337	0,8193	x	0,1307	0,9038	0,9002	0,7385	0,9033	0,8223	0,2174	0,0272	0,6875	0,9149										
Majdaléna	0,4079	0,3775	0,6458	0,4775	0,4877	0,2971	0,7481	0,8775	x	0,9652	0,9856	0,4737	0,9752	0,9826	0,7537	0,1298	0,5704	0,8769										
S Příběnice	0,5562	0,5776	0,6325	0,5505	0,681	0,3328	0,3552	0,1011	0,0354	x	0,9935	0,573	0,9986	0,9003	0,2697	0,061	0,6223	0,0477										
Sopřeč	0,4642	0,4632	0,5225	0,5996	0,5724	0,2875	0,2922	0,1051	0,0145	0,0065	x	0,5654	0,9951	0,94	0,276	0,0831	0,5715	0,0697										
Žehrov	0,6684	0,9212	0,9323	0,4184	0,8079	0,3773	0,2699	0,3031	0,7472	0,5569	0,5702	x	0,5435	0,397	0,721	0,3525	0,4985	0,397										
Týniště	0,5411	0,5529	0,6073	0,582	0,6558	0,3369	0,3581	0,1017	0,0251	0,0014	0,0049	0,6098	x	0,9172	0,2627	0,0658	0,6194	0,058										
Kněževes	0,3436	0,2851	0,3481	0,9392	0,3998	0,3025	0,2735	0,1956	0,0175	0,105	0,0619	0,9238	0,0864	x	0,3395	0,2281	0,5522	0,2391										
Šaštin - Stráže	0,7642	0,8508	0,4489	0,6798	0,6522	0,4876	0,579	0,8046	0,2828	0,7636	0,7588	0,4863	0,769	0,7121	x	0,2303	0,4818	0,7302										
Puchberg	0,5079	0,6368	0,5391	0,6832	0,6285	0,324	0,7312	0,9732	0,8783	0,9409	0,9203	0,7029	0,9363	0,7961	0,7943	x	0,6202	0,9487										
Peutenburg	0,3088	0,3887	0,4553	0,7291	0,3495	0,2863	0,7651	0,3747	0,5613	0,5367	0,5647	0,6074	0,5383	0,5757	0,7302	0,4777	x	0,6102										
Semmering	0,4911	0,5705	0,6817	0,7285	0,6949	0,3033	0,7438	0,0889	0,1314	0,9534	0,9326	0,6723	0,9436	0,7873	0,3145	0,0526	0,4939	x										



Obr. 13: Dendrogram analýzy UPGMA pro Neiovy genetické vzdálenosti



Obr. 14: PCoA Neiových vzdáleností. (Symboly odpovídají legendě v obr. 13)

4. Diskuze

4.1 Zhodnocení hybridizačních experimentů

Hlavním cílem opylovacích pokusů bylo ověřit možnost vzniku hybridních rostlin mezi *M. nemorosum* a *M. bohemicum*. Tato možnost se však ukázala být nepravděpodobnou. Po opylení mateřské rostliny pylem opačného druhu se tobolky ve většině případů vyvíjely defektně a často vývoj nedokončily. (Obr. 4, 5, 6, 7) Vzniklá semena byla začernalá nebo špatně vyvinutá a nebyla schopna vyklíčit. V porovnání s rostlinami uměle opylenými pylem stejného druhu se pro oba druhy vyvinula větší část opylených květů a defektních či abortovaných tobolek bylo minimum. Tyto výsledky naznačují nezanedbatelnou genetickou inkompatibilitu mezi oběma druhy.

Na obr. 4 v případě grafu popisujícího umělé opylení pylem opačného druhu (*M. bohemicum* x *M. nemorosum*) je vidět, že po opylení se v roce 2004 vyvinulo neobvykle velké množství normálních tobolek (38%), zatímco v případě grafu z následující sezóny 2005 popisujícího výsledky stejného zásahu (obr. 5) se v dobrou tobolku nevyvinul květ žádný. Tento rozdíl je způsoben nechtěným vniknutím opylovače do některých sáčků s pokusnými rostlinami a část květů tak byla opylena pylem stejného druhu. Tomuto tvrzení odpovídá i množství tobolek, které ve stejném pokusu vzniklo u kontrolních květů s vytrženými tyčinkami (48%). V další sezóně (r. 2005) kontrolní květy *M. bohemicum* s vytrženými tyčinkami vytvořily z 58 květů pouze dvě tobolky.

Neschopnost recentní hybridizace mezi oběma druhy ještě zcela nevyklučuje možnost hybridního původu *M. subalpinum* s. str. Bylo by potřeba ověřit pokusně možnosti hybridizace mezi rakouskými populacemi, u kterých by mohla být genetická inkompatibilita nižší. Také je pravděpodobné, že k hybridizaci došlo před dlouhou dobou, kdy mezi rodičovskými druhy ještě nemusela být genetická bariéra tak výrazná a hybrid se za tu dobu stačil vyvinout ve stabilní jednotku.

Pokud pomineme výsledek pro *M. bohemicum* z roku 2004 ovlivněný vniknutím opylovače do izolačního sáčku s rostlinami, vykazovaly kontrolní rostliny obou druhů velmi nízkou míru autogamie. U rostlin bez zásahu, zakrytých sáčkem se v případě *M. nemorosum* vyvinulo v roce 2004 v dobrou tobolku 11% květů a v roce 2005 pouze asi 3% květů. U *M. bohemicum* se v roce 2005 vyvinulo v tobolku 14% květů. Tyto hodnoty je možné ještě porovnat s hodnotami pro kontrolní zakryté rostliny bez zásahu z předešlého pokusu v roce 2003 (CHLUMSKÝ 2004). V tomto roce se u *M. bohemicum* v tobolku vyvinulo 15% květů a u *M. nemorosum* pouze 1% květů. Přesto, že jsou oba druhy schopny samoopylení, nemají zřejmě efektivní systém samosprášení. KWAK (1988) pro *M. arvense* uvádí, že postavení blizny tohoto

taxonu znemožňuje vznik tobolek u zakrytých rostlin. Pro druh *M. pratense*, který má postavení blizny a tyčinek obdobné jako *M. bohemicum*, KWAK (1991) uvádí, že je schopný samoopylení, ale počet vzniklých tobolek (u zakrytých rostlin) je mnohem nižší než v případě přirozeného opylení.

Přesto, že pro jednoznačné závěry je zatím k dispozici nedostatečné množství dat, zdá se, že u *M. bohemicum* je míra autogamie o něco vyšší než u *M. nemorosum*.

4.2 Revize lokalit

Hadač (1966b) ve své době shromáždil z herbářových sbírek veškeré dostupné údaje o výskytu *M. bohemicum*. Na území bývalého Československa uváděl 57 lokalit tohoto druhu. Dvě jím uváděné populace však náleží k jiným druhům, jak bylo zjištěno revizí citovaných herbářových dokladů (ŠTECH 2000). Jedná se o lokalitu u Dobřan v Orlických horách, kde došlo k záměně s *M. sylvaticum* agg. a o lokalitu na Hodonínsku, kde došlo k záměně s *M. pratense*.

Novější doplňující údaje k rozšíření byly získány z publikovaných floristických příspěvků (HOLUB 1996, TICHÝ 1996, KAPLAN 2005, ŠTECH 2005) a z rukopisných materiálů R. Kurky a M. Štecha. Údaje poskytnuté AOPK a údaje z národní fytoocenologické databáze (CHYTRÝ et RAFAJOVÁ 2003) se vesměs kryly s údaji HADAČE (1966b) a Milana Štecha.

Výsledek revize uvedených zdrojů je patrný z přílohy 2, kde je výpis všech nalezených lokalit. Nepodařilo se nalézt 20 Hadačem uváděných údajů (viz příloha 3). Vzhledem k tomu, že některé lokality jsou naposledy udávány na konci 19. století, je velmi pravděpodobné, že mnoho z nich již neexistuje. Významnou roli však také hraje fakt, že mnohé starší lokality jsou velmi široce udávány. Je proto pravděpodobné, že některé lokality se ještě v budoucnu podaří ověřit.

Během revize bylo nalezeno několik nových populací, které se nacházely v blízkosti již známých lokalit a jedna nová lokalita v blízkosti Ústrašic na Táborsku (viz příloha 2).

4.2.1 Vegetační charakteristika lokalit

HADAČ (1966b) ve své práci uvádí, že *M. bohemicum* roste v borech nebo světlých doubravách v asociacích *Pino-Quercetum* nebo *Luzulo-Quercetum*. Při revizi lokalit v roce 2006 se všechny lokality *M. bohemicum* nalézaly v sekundárních kulturních lesích, které lze zařadit do syntaxonomického systému jen velmi obtížně. Uvažovat by se dalo jen o lokalitách ze Záhorí, které HADAČ (1996b) řadí do asociací *Pino-Quercetum zahoricum* a *Dicrano-*

Pinetum zahoricum. Tyto světlé bory na pískách mají specifickou flóru, která je zcela odlišná od podrostu českých borů.

O jednotnosti většiny porostů vypovídá výsledek DCA fytoocenologických snímků (obr. 8). Kromě několika odlehlých snímků, rostoucích v čistě listnatých lesích, v odlišných borech na Záhorí, nebo na lokalitách s příměsí lučních druhů se snímky nahromadily v jednu skupinu zahrnující sekundární, většinou jehličnaté lesy s přimíšeným dubem. Analýza Twinspan ukázala, že ve shluku lze rozlišit dvě podskupiny (viz obr. 9). Dle druhového složení stromového patra a dle indikátorových druhů pro dělení skupin lze jednu část charakterizovat jako bory a jednu jako porosty se smrkem.

HADAČ (1966b) uvádí, že převážná část lokalit má písčité podklad. Při současné revizi však bylo zjištěno, že populace často rostly i na šterkopískovém podkladu či na hlinito-písčitých půdách. Stejně tak matečný substrát nemusí být pouze písky. Z geologických map bylo zjištěno, že podklad lokalit mnohdy tvoří přeměněné horniny nebo vyvěřeliny, které jsou většinou kyselé, ale často i zásadité.

HADAČ (1966b) se o vápencovém podkladu na lokalitách *M. bohemicum* nezmiňuje. Naopak pro rakouské populace *M. subalpinum* agg. uvádí jako jeden z rozlišovacích znaků, že se proti *M. bohemicum* vyskytují na vápenci. Teprve TICHÝ (1996) uvádí populace *M. bohemicum* rostoucí na vápencovém podloží z lokalit v blízkosti Olešnice u Kunštátu. Při aktuální revizi bylo zjištěno, že *M. bohemicum* se na vápnitých podkladech (vápnitých jílovcích, slínovcích a prachovcích) vyskytuje i ve východním Polabí (viz příloha 2). *M. bohemicum* tedy roste na vápencovém podkladu častěji než se předpokládalo a přibližuje se tak stanovištními nároky *M. agustissimum*.

Ze všech lokalit bylo patrné, že *M. bohemicum* velice často roste v okolí silnic, cest a pěšin. Tato vlastnost se patrně dá vysvětlit tím, že *M. bohemicum* vyhledává světlejší lesy, případně světlá místa s narušeným stromovým zápojem. S tím také souvisí nejpočetnější populace ve světlých borech na pískách v oblasti Záhorí. Velmi často *M. bohemicum* roste na terasách řek nebo v jejich blízkosti (např. nad nivou řeky) a v okolí terénních zlomů. Tato vlastnost patrně také souvisí s příznivějšími světelnými podmínkami.

HADAČ (1966b) uvádí, že smíšené háje s duby, lípou a javory jsou pro *M. bohemicum* příliš stinné a vlhké. Přesto jsem našel několik lokalit, na kterých rostl tento taxon v podobných společenstvech. Například u Vysoké nad Labem rostla velká prosperující populace v lipovém háji s příměsí trnovníku akátu.

Hlavními faktory recentně ohrožujícími tento druh v České republice jsou zejména: ruderalizace lokalit (zarůstání *Calamagrostis epigejos*, *Calamagrostis arundinacea*, *Impatiens*

parviflora, *Carex brizoides*, *Pteridium aquilinum*), nešetrné lesnické zásahy (mýcení, hustá výsadba smrků na lesní světliny), vysoká fragmentace populací a malá velikost populací. Dle ústního sdělení Milana Štecha se zdá, že v posledních letech dochází na některých lokalitách ke zmenšování populací. Také je ale možné, že pozorovaný úbytek rostlin byl způsoben přirozenými fluktuacemi početnosti, které jsou u jednoletých rostlin běžné. Takovéto změny početnosti jsem např. sledoval od roku 2003 na lokalitách v Doubí u Tábora.

4.3 Velikost jaderného genomu

Porovnání velikosti obsahu DNA studovaných populací *M. subalpinum* agg. ukázalo některé zajímavé skutečnosti (viz obr. 11). Populace *M. bohemicum* z České republiky a populace *M. angustissimum* z Rakouska se v obsahu DNA průkazně nelišily, což neodporuje hypotéze o totožnosti těchto dvou taxonů, která byla původně založena pouze na morfologické podobnosti (ŠTECH 2000, ŠTECH 2006). Velmi zajímavý je však případ slovenské populace *M. bohemicum* z blízkosti obce Šaštín-Stráže. Přesto, že je tato populace morfologicky shodná s českými populacemi, velikost její jaderné DNA je o 4,5% menší. U dalších slovenských populací bude nutné v budoucnu prověřit, zda ve velikosti genomu vykazují obdobný rozdíl a zajímavé by bylo také otestovat, zda jsou tyto populace schopné křížení s populacemi českými.

Velikost jaderné DNA rakouských široolistých populací *M. subalpinum* agg. se od úzkolistých populací lišila sice jen nepatrně, ale stále průkazně (1,9 %). Rozdíl od druhého potenciálně rodičovského taxonu *M. nemorosum* byl výrazně větší. (13,4 %). Přesto, že v případě hypotézy o hybridním původu široolistých populací *M. subalpinum* agg. by se dala očekávat intermediární velikost obsahu DNA, jak tomu často bývá u jiných homoploidních hybridů (BUITENDIJK et al. 1997, THIBAUT 1998, ŠIŠKO et al. 2003), aktuální výsledek nemusí nutně popírat hybridní původ. Rozdíly proti očekávanému obsahu jaderné DNA u hybridů uvádí např. BUREŠ et al. (2004) v rodě *Cirsium*. V tomto případě měly hybridní taxony v průměru menší obsah jaderné DNA, než by se dalo očekávat vzhledem k velikosti DNA rodičovských taxonů. Naproti tomu např. BAACK et al. (2005) pro rod *Helianthus* uvádí, že hybridy sebrané z přirozených stanovišť měli o 50 % vyšší obsah jaderné DNA než rodičovské druhy. Naopak hybridy vzniklé umělým křížením se od rodičovských druhů nelišily ani v rozsahu šesti generací.

Nárůst velikosti jaderné DNA proti předpokládané intermediární velikosti vzhledem k rodičovským taxonům by se dal vysvětlit např. evolučními tlaky. Při hybridní speciaci může hrát významnou roli úzký bottleneck. Pokud se v období bottlenecku vyskytla rostlina s větším genomem, mohl se tento genom udržet i v případě, že byl selektivně neutrální nebo dokonce nevýhodný (BAACK et al. 2005).

4.4 Isozymová analýza

Isozymová analýza podpořila zřetelně některé hypotézy. ŠTECH (2006) předpokládá, že *M. subalpinum* agg. má centrum diverzity v Rakousku v oblasti Wienerwaldu a české a slovenské populace této skupiny jsou výsekem variability rakouských populací. Hodnoty v tab. 5 potvrzují, že největší genetická variabilita je v rámci populací *M. subalpinum* s. str. v oblasti Wienerwaldu. Populace *M. angustissimum* vykazují o něco nižší genetickou variabilitu a okrajové populace *M. bohemicum* v České republice a na Slovensku jsou geneticky variabilní nejméně. Zmíněné genetické rozdíly dobře korelují s morfologickou variabilitou populací (ŠTECH 2006). Genetické vzdálenosti mezi všemi studovanými populacemi jsou patrné z tabulky 6 a z obr. 13.

Ve výsledku shlukové analýzy se zřetelně dá rozlišit shluk většiny českých populací *M. bohemicum*, který je spojen se shlukem rakouských populací mimo Wienerwald. Tento výsledek spolu s analýzou velikosti genomu podporuje teorii o totožnosti *M. bohemicum* a *M. angustissimum* (ŠTECH 2000, ŠTECH 2006). Mimo tuto skupinu stojí slovenská populace *M. bohemicum* z lokality Šaštín-Stráže, která se od ostatních populací lišila i v obsahu jaderné DNA. Ač je populace morfologicky totožná s českými populacemi, na základě analýzy isoenzymů a celkového obsahu DNA lze předpokládat, že by se v případě Záhorí mohlo jednat o arelu izolovanou již velmi dlouhou dobu.

Geneticky nejvíce odlišnou se ukázala být populace *M. bohemicum* z oblasti Českého ráje. Jedná se o populaci čítající několik set rostlin omezenou na malou plochu. V dendrogramu na obr. 13 se lišila velmi výrazně od všech studovaných populací. Nejnižší heterozygotnost populace potvrzená vysokou hodnotou fixačního indexu ($F_{is} = 0,406$) ukazuje na silný inbreeding. Tento stav mohl nastat dvěma možnými způsoby. Buď došlo vlivem náhlé změny prostředí k prudkému poklesu početnosti původně větší populace na několik jedinců a tím se výrazně snížila genetická diverzita populace, nebo populace vznikla zavlečením. Oba případy vedou ke snížení heterozygotnosti, silné inbrední depresi a genetickému driftu (BRIGGS et WALTERS 1997). Lokalita *M. angustissimum* z nejzápadnější odlehlé oblasti výskytu v Rakousku se v dendrogramu také odělila od většiny ostatních populací, ale genetická variabilita této lokality byla výrazně vyšší než u Žehrova. Také záporná hodnota fixačního indexu naznačuje, že v populaci dochází k častému opylení mezi nepříbuznými jedinci.

Další dobře vymezenou skupinou v dendrogramu shlukové analýzy pro Neiovy vzdálenosti jsou rakouské populace *M. nemorosum*. Pouze česká populace *M. nemorosum* z Příběnic stojí v dendrogramu zcela mimo tuto skupinu, což naznačuje, že by mezi rakouskými a českými populacemi tohoto taxonu mohl být významnější rozdíl. Pozoruhodná je také nejednotnost populací *M. subalpinum* s. str. Populace z lokalit Hofstätten, Einöde a Merkenstein jsou ve

shluku s *M. nemorosum*, kdežto populace z Gumpoldskirchenu je ve shluku s *M. angustissimum*. Toto může indikovat příbuznost *M. subalpinum* s. str. s oběma potenciálními rodičovskými druhy, ale pravděpodobné je i náhodné přiřazení některých populací způsobené nedostatkem dat a limitací použité metody.

Na obr. 14 je diagram PCoA Neiových vzdáleností mezi populacemi. Opět je patrné, že potenciálně hybridní populace *M. subalpinum* s. str. se na základě isozymové analýzy řadí do blízkosti *M. nemorosum*. Ovšem české a rakouské úzkolisté populace se v tomto případě rozdělily do opačných částí gradientu první osy, pouze lokalita Žehrov se zařadila do blízkosti lokality *M. angustissimum* Peutenberg a lokality *M. subalpinum* s. str. Hofstätten. Po zobrazení první a třetí kanonické osy se však žehrovská populace odsunula zcela mimo ostatní. Populace z lokality Gumpoldskirchen, která se v dendrogramu shlukové analýzy zařadila do shluku s populacemi *M. angustissimum* se odsunula zcela mimo tyto populace. Stejně tomu bylo i v případě zobrazení třetí osy.

HADAČ (1966b) předpokládal, že taxon *M. bohemicum* vzniknul v oblasti Záhorí v době posledního zalednění a odtud se pak dále přes Hodonínsko a okolí Olešnice rozšířil na zbylé české arely. Dnes je však téměř jisté, že centrum genetické diverzity *M. subalpinum* agg. je v oblasti Wienerwaldu. Odtud by se dalo očekávat separátní šíření dvěma migračními cestami do Čech a na Slovensko. Do Čech se mohlo *M. bohemicum* také šířit dvěma cestami. Přes území Waldviertel na Třeboňsko a podél Lužnice až k Táboru a přes jižní Moravu k Olešnici a do východních Čech. Hadačova teorie o šíření druhu je nepravděpodobná i proto, že zmiňovaná Hodonínská arela je omyl.

I přes relativně dobrou interpretovatelnost výsledků isozymové analýzy je k nim potřeba přistupovat obezřetně. Výrazné omezení interpretace přináší skutečnost, že byly studovány pouze čtyři lokusy ze tří enzymových systémů.

4.5 Návrh dalšího postupu studia skupiny

Vzhledem k odlišnému obsahu DNA u populace ze slovenské oblasti Záhorí by bylo vhodné se na tuto arelu detailněji zaměřit. Kromě analýz velikosti genomu zbylých slovenských populací by bylo velmi zajímavé ověřit možnost hybridizace mezi českými a slovenskými populacemi.

České populace *M. bohemicum* a *M. nemorosum* se nepodařilo zkřížit. Přesto není vyloučeno, že rakouské populace z oblasti Wienerwaldu jsou křížení schopny. Proto by bylo vhodné pokusně ověřit hybridizaci i u populací z této oblasti.

Pro zřetelnější interpretaci výsledků isozymové analýzy by bylo vhodné provést analýzu většího množství enzymatických systémů a lokusů.

Další studie by bylo vhodné rozšířit o morfologicky podobné rostliny z centra diverzity celé skupiny na Balkánském poloostrově.

5. Závěr

U českých populací *M. nemorosum* a *M. bohemicum* nebyla prokázána možnost hybridizace. Tobolky většinou nedokončí vývoj nebo jsou v nich defektní semena neschopná vyklíčení. Otázkou zůstává, zda lze toto zobecnit i pro rakouské populace.

Byla provedena kompletní revize veškerých lokalit *M. bohemicum* v ČR a SR. V současné době byl druh ověřen na 52 lokalitách v tomto území. Část lokalit uváděných HADAČEM (1966b) nebyla nalezena (viz příloha 3). Zčásti z důvodu široké lokalizace originálních pramenů a z části též z důvodu zániku některých lokalit. Novější údaje o rozšíření z publikovaných floristických příspěvků (HOLUB 1996, TICHÝ 1996, KAPLAN 2005, ŠTECH 2005) a rukopisných materiálů R. Kurky a M. Štecha, které doplňují Hadačovy lokality byly revidovány úspěšně. Při aktuální revizi byly objeveny některé nové subpopulace v blízkosti dříve uváděných populací a jedna nová lokalita.

Během revize bylo zjištěno, že se *M. bohemicum* v současné době roste zejména v druhotných kulturních borech a smrkových porostech s příměsí dubu. Přesto se může výjimečně vyskytovat i v čistě listnatých hájích. Taxon preferuje písky nebo písčité půdy, ale může růst i na humóznějším podkladu. Mateční^{FS} horninou nemusí být pouze písky. V podkladu lokalit se často objevovaly i přeměněné horniny a vyvřeliny. Podklad lokalit měl převážně kyselou, ale nezřídka i zásaditou reakci. *M. bohemicum* roste na vápencovém podkladu častěji než se předpokládalo a přibližuje se tak stanovištními nároky *M. angustissimum*.

Rostlina vyhledává zejména lesní světliny v okolí cest a často se vyskytuje na terasách a terénních zlomech.

Recentně je taxon ohrožen ruderalizací a zarůstáním lokalit, nešetrnými lesnickými zásahy (mýcení, hustá výsadba smrků na lesní světliny), vysokou fragmentací populací a často malou velikostí populací.

České populace *M. bohemicum* a rakouské populace *M. angustissimum* v Alpách se ve velikosti jaderného genomu neliší. Byla však zjištěna odlišná velikost genomu (o 4,5% menší) u slovenské populace *M. bohemicum* z lokality Šaštín-Stráže.

U dvou rakouských populací *M. subalpinum* s. str. byl zjištěn o 2% menší obsah jaderné DNA než u populací *M. angustissimum* a *M. bohemicum*, zatímco *M. nemorosum* mělo velikost genomu menší o 15,5%.

Analýzou isozymů byla zjištěna největší genetická variabilita v rámci populací v oblasti Wienerwaldu. Populace *M. angustissimum* vykazují o něco nižší genetickou variabilitu a populace *M. bohemicum* v Čechách a na Slovensku jsou geneticky variabilní nejméně.

Analýza UPGMA Neiových genetických vzdáleností pro populace naznačuje blízkost *M. bohemicum* s populacemi *M. angustissimum*. Geneticky nejvíce odlišnou se ukázala být populace *M. bohemicum* z oblasti Českého ráje. Tato populace vykazuje velmi nízkou úroveň heterozygosity a naopak vysokou míru inbreedingu.

Slovenská populace *M. bohemicum* z lokality Šaštín-Stráže, která se od ostatních populací lišila i v obsahu jaderné DNA, se zařadila zcela mimo ostatní české populace. Ač je arela v Záhorí morfologicky totožná s českými populacemi, zřejmě je izolovaná již dlouhou dobu a její genový pool se vyvíjel zcela nezávisle na ostatních.

Rakouské populace *M. nemorosum* se v analýzách zařadily do jedné skupiny, pouze česká populace z Příběnic se zařadila zcela mimo tuto skupinu. Tento rozdíl je pravděpodobně korelován s geografickou vzdáleností populací, ale zčásti může jít i o náhodné oddělení české populace způsobené nedostatkem dat.

Výsledky isozymové analýzy by i přes povzbudivé závěry měly být interpretovány s opatrností. Kvůli vypuštění systému AAT se snížil počet analyzovaných lokusů, což snižuje interpretovatelnost výsledků.

6. Citovaná literatura

- ACQUAHH G. (1992): Practical protein electrophoresis for genetic research. – Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- ARZATE-FERNANDÉZ A. M., MEJÍA-GONZÁLEZ C. O., NAKAZAKI T., OKUMOTO Y., TANISAKA T. (2005): Isozyme electrophoretic characterization of 29 related cultivars of lily (*Lilium* spp.). – Plant Breeding 124: 71 – 78.
- BAACK E. J., WHITNEY K. D., RIESEBERG L. H. (2005): Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. – New Phytologist 167(2): 623 – 630.
- BEAUVERD G. (1916): Monographie du genre *Melampyrum* L. – Mém. Soc. Phys. Hist. Natur. Genève 38: 261–657.
- BECK G. (1882): Neue Pflanzen Österreichs. – Verh. Zool.-Bot. Ges. Wien 32: 179 – 194.
- BENNETT M. D. et LEITCH I. J. (2005a): Plant Genome Size Research: A Field In Focus. – Annals of Botany 95: 1 – 6.
- BENNETT M. D. et LEITCH I. J. (2005b): Angiosperm DNA C-values Database (verze 6.0, říjen 2005). – [cit. 26. 11. 2006] Dostupný z WWW: (<http://www.kew.org/cval/homepage.html>)
- BRIGGS D. et WALTERS S.M. (1997): Plant Variation and Evolution. – Cambridge University Press, Cambridge.
- BROWN A. H. D., BURDON J. J., JAROSZ A. M. (1989): Isozyme Analysis of Plant Mating Systems. – In: SOLTIS D. E. et SOLTIS P. S.[eds.]: Isozymes in plant biology. – Dioscoroides Press, Portland, Oregon: 73 – 87.
- BUITENDIJK J. H., BOON E. J., RAMANNA M. S. (1997): Nuclear DNA Content in Twelve Species of *Alstroemeria* L. and Some of their Hybrids. – Annals of Botany 79: 343 – 353.
- BUREŠ P., WANG Y.-F., HOROVÁ L., SUDA J. (2004): Genome Size Variation in Central European Species of *Cirsium* (Compositae) and their Natural Hybrids. – Annals of Botany 94: 353 – 363.
- BUSO G. S. C., RANGEL P. H., FERREIRA M. E. (1998): Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. – Molecular Ecology 7: 107 – 117.
- CRAWFORD D. J. (1989): Enzyme Electrophoresis and Plant Systematics. – In: SOLTIS D. E. et SOLTIS P. S.[eds.]: Isozymes in plant biology. – Dioscoroides Press, Portland, Oregon: 146 – 165.

- TER BRAAK et ŠMILAUER P. (2002): CANOCO Release 4.5. Reference Manual and user's guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination. – Microcomputer Power, Ithaca, New York.
- THIBAUT J. (1998): Nuclear DNA amount in pure species and hybrid willows (*Salix*): a flow cytometric investigation. – *Can. J. Bot.* 76(1): 157 – 165.
- TICHÝ L. (1996): Některé zajímavé floristické nálezy na vápencích v okolí Olešnice. – *Zprávy Čes. Bot. Společ.* 31: 172 – 174.
- DOLEŽEL J. et BARTOŠ J. (2005): Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. – *Annals of Botany* 95: 99 – 110.
- DOLEŽEL J. et GÖHDE W. (1995): Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. – *Cytometry* 19: 103 – 106.
- DOLEŽEL J., GREILHUBER J., LUCRETTI S., MEISTER A., LYSÁK M. A., NARDI L., OBERMAYER R. (1998): Plant genome size estimation by flow cytometry inter-laboratory comparison. – *Annals of Botany* 82 (Suppl. A): 17 – 26.
- DOLEŽEL J., KUBALÁKOVÁ M., BARTOŠ J., MACAS J. (2004): Flow cytogenetics and plant genome mapping. – *Chrom. Res.* 12: 77-91.
- 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.
- FISCHER M. A., ADLER W., OSWALD K. [eds.]: *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol*, 2., verbesserte und erweiterte Auflage der Exkursionsflora von Österreich. – *Wachtelweizen / Melampyrum*: 754 – 757. – Land Oberösterreich, Biologiezentrum der OÖ Landesmuseen, Linz.
- FRANCESCHINELLI E. V. et BAWA K. S. (2000): The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). – *Heredity* 84(1): 116 – 123.
- GREILHUBER J. (1998): Intraspecific Variation in Genome Size: A Critical Reassessment. – *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 27 – 35.
- GREILHUBER J. et OBERMAYER R. (1997): Genome size and maturity group in *Glycine max* (soybean). – *Heredity* 78: 547 – 551.
- HADAČ E. (1966a): Černýš český - *Melampyrum bohemicum* Kern. - *Zpr. Čes. Bot. Společ.* 1: 35 – 37.
- HADAČ E. (1966b): Rozšíření černýše českého (*Melampyrum bohemicum* Kerner) v Československu. - *Preslia* 38: 403 – 412.

- HARTL D. (1974): *Melampyrum* L. – In: Hartl D. et Wagenitz G. [eds]: Hegi., Illustrierte Flora von Mitteleuropa 6/1: 403–451. ed. 2, Carl Hanser, München.
- HENNEKENS S. M. et SCHAMINÉE J. H. J. (2001): TURBOVEG, a comprehensive data base management system for vegetation data. – *J. Veg. Sci.* 12: 699 – 704.
- HIEI K. et SUZUKI K. (2001): Visitation frequency of *Melampyrum roseum* var. *japonicum* (Scrophulariaceae) by three bumblebee species and its relation to pollination efficiency. – *Can. J. Bot./Rev. Can. Bot.* 79(10): 1167 – 1174.
- HILL M. O. et ŠMILAUER P. (2005): TWINSpan for Windows version 2.3. – Centre for Ecology and Hydrology & Jihočeská univerzita, Huntingdon & České Budějovice.
- HOLUB J. (1996): Nejseverozápadnější lokalita černýše českého (*Melampyrum bohemicum*) a poznámky k tomuto druhu. – *Zpr. Čes. Bot. Společ.* 31: 175 – 186.
- CHLUMSKÝ J. (2004): Možnosti hybridizace mezi *Melampyrum bohemicum* a *Melampyrum nemorosum* a počáteční studie jejich reprodukční a opylovací strategie. – Bakalářská práce BF JU, České Budějovice.
- CHRTEK J. et PLAČKOVÁ I. (2005): Genetic variation in *Hieracium alpinum* (Asteraceae) in the Krkonoše Mts (West Sudeten Mts, Czech Republic). – *Biologia, Bratislava* 60(4): 387 – 391.
- CHYTRÝ M. et RAFAJOVÁ M. (2003): Czech National Phytosociological Database: basic statistics of the available vegetation-plot data. – *Preslia* 75: 1 – 15.
- IBÁÑEZ O., Calero C., MAYOL M., ROSSELLÓ J. A. (1999): Isozyme uniformity in a wild extinct insular plant, *Lysimachia minoricensis* J.J. Rodr. (Primulaceae). – *Molecular Ecology* 8: 813 – 817.
- JORUN N., HAMRE E., NORDAL I. (2003): Facultative apomixis and hybridization in arctic *Potentilla* section *Nivae* (Rosaceae) from Svalbard. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 42(1): 373 – 381.
- JURATZKA J. (1857): Ueber einige Arten der Gattung *Melampyrum*. – *Verh. Zool.-Bot. Ges. Wien* 7: 507 – 511.
- KAPLAN Z. [ed.] (2005): Výsledky floristického kurzu České botanické společnosti v Kostelci nad Orlicí (4. – 10. července 2004). – *Zprávy Čes. Bot. Společ., Příl.* 2005/1: 1 – 76.
- KAPLAN Z., PLAČKOVÁ I., ŠTĚPÁNEK J. (2001): *Potamogeton* × *fluitans* (*P. natans* × *P. lucens*) in the Czech Republic. II. Isozyme analysis. – *Preslia* 74: 187 – 195.
- KERNER A. (1881): Schedae ad Floram exsiccata Austro-Hungaricam 1. – Wien.
- KIRSCHNER J., KIRSCHNEROVÁ L., KOTTOVÁ K., PLAČKOVÁ I., ŠTĚPÁNEK J., TICHÝ M. (2000): Analýza isoenzymů v populační biologii rostlin. – Přírodovědecká fakulta UK, Průhonice.

- KRAHULEC F., KRAHULCOVÁ A., FEHRER J., BRÄUTIGAM S., PLAČKOVÁ I., CHRTEK jun. J. (2004): The Sudetic group of *Hieracium* subgen. *Pilosella* from the Krkonoše Mts: a synthetic view. – *Preslia* 76: 223 – 243.
- KUBÁT K., HROUDA L., CHRTEK J. jun., KAPLAN Z., KIRSCHNER J., ŠTĚPÁNEK J. [eds] (2002): Klíč ke květeně České republiky. – Academia, Praha.
- KUČERA J. et VÁŇA J. (2005): Seznam a červený seznam mechorostů české republiky (2005). – *Příroda* 23: 1 – 104.
- KURKA R. Rukopisný materiál ke Květeně Třeboňské pánve. – Ms., depon. Milan Štech, Biologická fakulta JU.
- KWAK M. M. (1988): Pollination ecology and seed-set in the rare annual species *Melampyrum arvense* L. (Scrophulariaceae). – *Acta Bot. Neerl.* 37 (2): 153 – 163.
- KWAK M. M. (1991): Bumblebee visitation and seedset in *Melampyrum pratense* and *Viscaria vulgaris*: heterospecific pollen and pollen limitation. – *Oecologia* 86: 99–104.
- LYSÁK M. A., DOLEŽELOVÁ M., HORRY J. P., SWENNEN R., DOLEŽEL J. (1999): Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. – *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1344 – 1350.
- MANDÁK B., BÍMOVÁ K., PLAČKOVÁ I., MAHELKA V., CHRTEK J. (2005): Loss of Genetic Variation in Geographically Marginal Populations of *Atriplex tatarica* (Chenopodiaceae). – *Annals of Botany* 96: 901 – 912.
- MANCHENKO GENADY P. (1994): Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. – CRC Press LLC, Boca Raton.
- MAPOVÝ SERVER ČGS (2004): Dostupný z WWW: (<http://nts2.cgu.cz/>) [cit. 2006-12-14].
- MURRAY B. G. (2005): When does Intraspecific C-value Variation become Taxonomically Significant? – *Annals of Botany* 95: 119 – 125.
- NYLÉHN J., HAMRE E., NORDAL I. (2003): Facultative apomixis and hybridization in arctic *Potentilla* section *Niveae* (Rosaceae) from Svalbard. – *Bot. Jour. Linn. Soc.* 42(1): 373 – 381.
- OHRI D. (1998): Genome Size Variation and Plant Systematics. – *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 75 – 83.
- OJA T. (2005): Isozyme evidence on the genetic diversity, mating system and evolution of *Bromus intermedius* (Poaceae). – *Plant Syst. Evol.* 284: 199 – 208.
- OLMSTEAD R. G., DEPAMPHILIS C. W., WOLFE A. D., YOUNG N. D., ELISONS W.J. ET REEVES P. A. (2001): Disintegration of the *Scrophulariaceae*. – *Amer. J. Bot.* 88(2): 348 – 361.

- OTTO F. J. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: DARZYNKIEWICKZ Z. et CRISMAN H. A. [eds.]
- PECKERT T., CHRTEK jun. J., PLAČKOVÁ I. (2005): Genetic variation in agamosperous populations of *Hieracium echiodides* in southern Slovakia and northern Hungary (Danube Basin). – *Preslia* 77: 307 – 315.
- PHILIPP M. et SIEGISMUND H. R. (2003): What can morphology and isozymes tell us about the history of the *Dryas integrifolia-octopetala* complex? – *Molecular Ecology* 12: 2231 – 2242.
- PROCHÁZKA F. [ed.] (2001): Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). - Příroda, Praha.
- REINER F. J. (1994): Taxonomie und Ökogeographie von *Melampyrum subalpinum*, einem Endemiten des Alpenostrandes. – Diplomová práce, Universität Wien, Wien.
- ROSENBAUMOVÁ R., PLAČKOVÁ I., SUDA J. (2004): Variation in *Lamium* subg. *Galeobdolon* (Lamiaceae) – insights from ploidy levels, morphology and isozymes. – *Plant Syst. Evol.* 244: 219 – 244.
- SHAPIRO H. M. (2003): Practical flow cytometry, 4th ed. – Wiley Liss, Hoboken, New Jersey.
- SOLTIS D. E. et SOLTIS P. S. (1989): Isozymes in Plant Biology. - Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- SOÓ R. (1927): Systematische Monographie der Gattung *Melampyrum*. III. – Feddes Repert. 24: 127 – 193.
- SOÓ R. v. et WEBB D. A. (1972): *Melampyrum* L. – In TUTIN T. G. et al. [ed.]: Flora Europaea 3: 253 – 257. Cambridge.
- SOUZA M. M., PALOMINO G., PEREIRA T. N. S., PEREIRA M. G., VIANA A. P. (2004): Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. – *Hereditas* 141: 31 – 38.
- ŠYROVÝ S. [ed.] (1958): Atlas podnebí Československé republiky. – Ústřední správa geodézie a kartografie, Praha.
- ŠÍPOŠOVÁ H. (1997): *Melampyrum* L. – Čermel' - In: GOLIAŠOVÁ K. [ed.]: Flóra Slovenska V/2: 301 – 328. Veda, Bratislava.
- ŠÍPOŠOVÁ H. et ŠTECH M. (1997): *Melampyrum nemorosum* L. a *Melampyrum subalpinum*. – In: GOLIAŠOVÁ K. [ed.]: Flóra Slovenska V/2: 318–324. Veda, Bratislava.
- ŠÍŠKO M., IVANČIČ A., BOHANEK B. (2003): Genome size analysis in the genus *Cucurbita* and iuse for determination of interspecific hybrids obtained using the embryo-rescue technique. – *Plant Science* 165: 663 – 669.

- 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. (2005) [ed.]: Výsledky floristického kurzu ČSBS v Táboře 1988 (2. – 9. 7. 1988). – Zprávy Čes. Bot. Společ., Příl. 2005/2: 3 – 70.
- ŠTECH M. (2006): Was sind *Melampyrum subalpinum*, *M. angustissimum* und *M. bohemicum*? – *Neireichia* 4: 221 – 234.
- YEH FRANCIS C., YANG R.-C., BOYLE, TIMOTHY B. J., YE Z.-H., et MAO J. X. (1997): POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. – Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Příloha

Příloha 1

Studované lokality

Označení lokality v analýzách / rostlina	Lokalita	Nadm. v. (m n.m.)	Souřadnice (WGS 84)
Majdalena / <i>M. bohemicum</i>	Majdalena: lesní cesta k soutoku Lužnice a Nové řeky (zelená značka) cca 200m od hlavní silnice; asi 2,5km SSZ od nádraží v obci	440	N48,98466° E14,84436°
Příběnice / <i>M. bohemicum</i>	(Bečice u Tábora) Příběnice: J až JZ svah nad silnicí kolem zříceniny Příběnice, cca 150m JJZ od zbytků věže	420	N49,39162° E14,56269°
Týniště / <i>M. bohemicum</i>	(Týniště nad Orlicí) Rašovice: u silnice z Rašovic do Křivic asi 970m SS(Z) od křižovatky v Rašovicích; pod kopcem Hlava (Hlaváč?), podle staršího obyvatele	280	N50,18350° E16,09675°
Sopřeč / <i>M. bohemicum</i>	(Přelouč) Sopřeč: u křižovatky Sopřeč - Strašov - Břehy cca 2km JJZ od obce	240	N50,07890° E15,54553°
Kněževes / <i>M. bohemicum</i>	(Olešnice u Kunštátu) Kněževes: asi 760m SZ od kaple v obci; při lesní cestě na mýtině s výsadbou mladých modřínů a na okrajích lesní cesty	530	N49,59178° E16,41661°
Žehrov / <i>M. bohemicum</i>	(Mnichovo Hradiště) Žehrov: bývalý lom u silnice kolem obory zámečku Bellevue cca 980m J(J)V od křižovatky v obci	280	N50,52301° E15,10653°
Šaštín-Stráže / <i>M. bohemicum</i>	(SK)Borský Mikuláš: bor J od silnice do Šaštína cca 3km Z od obce	180	N48,63115° E17,17033°
Semmering / <i>M. angustissimum</i>	Semmering: lesnaté (<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Corylus</i>) a křovinaté svahy (VJV orientace) nad silnicí cca 220 m SV od kostela v obci	1010	N47,64069° E15,82730°
Puchberg / <i>M. angustissimum</i>	Puchberg am Schneeberg, Losenheim: kulturní smrčina cca 230 m SS(Z) od zříceniny hradu	746	N47,79048° E15,84452°
Peutenburg / <i>M. angustissimum</i>	Scheibbs, Kienberg: lesnaté (<i>Fagus</i> , <i>Pinus nigra</i>) JV svahy cca 275 m SZ od železniční zastávky Peutenburg	430	N47,95620° E15,15440°
Merkenstein / <i>M. angustissimum</i>	Bad Vöslau, Großau, Haidlhof: lesnaté a křovinaté (<i>Pinus nigra</i> , <i>Sorbus aria</i> agg., <i>Corylus</i>) svahy nad zříceninou hradu Merkenstein	450	N47,98230° E16,13314°
Hofstätten / <i>M. angustissimum</i>	Bad Vöslau, Rohrbach, Hofstätten: křoviny při cestě cca 100 m JV od osady	406	N47,99271° E16,10519°
Einöde / <i>M. subalpinums. str.</i>	Baden, Pfaffstätten, Einöde: lem silnice ca 260 m Z od západního okraje osady Einöde.	300	N48,02366° E16,22976°
Gumpoldskirchen / <i>M. subalpinums. str.</i>	Gumpoldskirchen, Heberlberg: lemy a křoviny cca 2,3 km ZJZ od nádraží v Gumpoldskirchenu	297	N48,03286° E16,25664°
Haidlhof / <i>M. nemorosum</i>	Bad Vöslau, Großau, Haidlhof: podél silnice v údolí cca 1,9 km SZ od osady Haidlhof	385	N47,97996° E16,12221°
Gießhübel / <i>M. nemorosum</i>	Perchtoldsdorf, Gießhübel: dubohabřina u lomu na západním okraji osady Tirolerhofsiedlung.	412	N48,10364° E16,23370°
Rotes Kreuz / <i>M. nemorosum</i>	Gaaden, Rotes Kreuz: lemy a křoviny cca 2,3 JJ(V) od obce Gaaden, Z od rozcestí Rotes Kreuz	390	N48,03581° E16,21005°
Příběnice / <i>M. nemorosum</i>	(Bečice u Tábora) Příběnice: 70m S od zbytků věže na svahu nad Lužnicí	420	N49,39334° E14,56207°

Příloha 2

Seznam lokalit

Lokality jsou řazeny podle příslušnosti k jednotlivým areálům v Českém ráji, ve východním Polabí, v širším okolí Olešnice u Kunštátu, podél údolí Lužnice u Tábora, na Třeboňsku a na Slovensku v oblasti Záhorí.

Subpopulace spadající pod jednu lokalitu jsou vymezeny podélnými čarami.

U některých popisů lokalit byla kvůli usnadnění orientace do závorky před název obce uvedena nejbližší větší obec či město.

Pokud je v poznámce uveden podklad, jedná se o údaj o charakteru podkladu zjištěný při revizi.

U zdrojů, které nebyly publikovány, je letopočet v závorce.

Datum poslední revize	Lokalita	nadm.v. (m n.m.)	Souřadnice (WGS 84)	Pozn.	číslo fytoc. snímků	č. v databázi Turboveg	Zdroj	Geologický podklad lokality dle Mapového serveru ČGS	Průměrná teplota veget. Obd. (°C)	Průměrný úhrn srážek veget. Obd. (mm)
23.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Mnichovo Hradiště) Žehrov: bývalý lom u silnice cca 980m J(JV) od křižovatky v obci	280	N50,52346° E15,10729°	V bývalém lomu a kolem lesní cesty v blízkosti lomu; roztroušeně stovky rostlin podklad: jemný písek	47	551396	Holub 1996	vápnitě jílovce, slínovce a prachovce, podřadně vločky jílovitého vápence	13	400
23.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Mnichovo Hradiště) Žehrov: při silnici u býv. lomu cca 970m J(JV) od křižovatky v obci	280	N50,52301° E15,10653°	Stovky rostlin v příkopu u silnice v úseku cca 200m mezi body N50,52301° E15,10653° a N50,52458° E15,10528°			Holub 1996	vápnitě jílovce, slínovce a prachovce, podřadně vločky jílovitého vápence	13	400
23.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Přelouč) Sopotč: u křižovatky Sopotč - Strašov - Břehy cca 2km J(JZ) od obce	240	N50,07890° E15,54553°	Stovky až tisíce rostlin v borovém lese s duby; populace se nachází mezi body N50,07890° E15,54553° a N50,07654° E15,54606°; podklad: jemný písek			Hadač 1966b	hlína, písek, štěrk; nívní sediment; fluvialní neclněné sedimenty + sedimenty vodních nádrží	14	400
23.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Přelouč) Sopotč: bor u silnice J od obce cca 980m J od křižovatky Sopotč - Strašov - Břehy	220	N50,06899° E15,54539°	Stovky rostlin v borovém lese po straně silnice v úseku cca 100m	46	551395	Hadač 1966b	navátý písek; převážně křemenný + příměsi	14	400
22.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Přelouč) Přelovice: doubrava u silnice na Vlčí Habřinu 1,5km Z(JZ) od kostela v obci	230	N50,07073° E15,59530°	Stovky až tisíce rostlin v doubravě s borovicí na okraji silnice v úseku cca 30m	44	551393	Chlumský (2006) nová lokalita	písek, štěrk; pestré minerální složení; fluvialní	14	400
22.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Břehy: lesní světlina SV rybníka Černý Nadymač cca 2km Z(S)Z od kostela v Přelovicích	240	N50,07627° E15,58875°	Desítky až stovky rostlin roztroušeně na světlině v lese; podklad: jemný písek	45	551394	Hadač 1966b	navátý písek, převážně křemenný + příměsi	14	400

12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Vysoká nad Labem: při lesní cestě 520m JV od hájovny v obci	260	N50,15118° E15,84681°	28	551377	Hadač 1966b	vápnnité jílovice, slinovec, vápnnité prachovce	14	400
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Vysoká nad Labem: v lipovém háji u silnice asi 150m JJV od hájovny v obci	260	N50,15285° E15,84125°	29	551378	Hadač 1966b	pisek, šterk, fluviální, pestré minerální složení	14	400
13.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Nový Hradeček Králové: asi 500m JV od rybníka Břířčka u hlavní silnice z Nového Hradeček K. do Býštet	280	N50,16741° E15,86620°	30	551379	Hadač 1966b	vápnnité jílovice, slinovec, vápnnité prachovce	14	400
13.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Nový Hradeček Králové: asi 700m JV od rybníka Břířčka u hlavní silnice z Nového Hradeček K. do Býštet	280	N50,16612° E15,86817°			Hadač 1966b	vápnnité jílovice, slinovec, vápnnité prachovce	14	400
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Hradeček Králové) Hoděšovice: asi 40m V od hájovny Bažantnice	280	N50,15725° E15,92501°	26	551375	Hadač 1966b	vápnnité jílovice, slinovec, vápnnité prachovce	13	400
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Hradeček Králové) Hoděšovice: smrčina u křížovatky lesních cest 130m SV od hájovny Bažantnice	280	N50,15798° E15,92571°			Hadač 1966b	vápnnité jílovice, slinovec, vápnnité prachovce	13	400
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Hradeček Králové) Hoděšovice: asi 100m SZ od dřevěnký v bývalé osadě Mazurovy chalupy	280	N50,16154° E15,92296°			Hadač 1966b	vápnnité jílovice, slinovec, vápnnité prachovce	13	400
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Hradeček Králové) Hoděšovice: v lese ca 480m Z od obce u silnice cca 120m od V okraje lesa	300	N50,14710° E15,90948°	27	551376	Hadač 1966b	pisek, šterk, fluviální, pestré minerální složení	13	400
13.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Bělec nad Orlicí: 1,3km SZ od křížovatky v obci při silnici mezi Bělčí a Svinary na hraně terasy nad nivou Orlice; přes silnici proti hájovně Skvárovka v chatářské osadě	245	N50,20584° E15,92646°	32	551381	Hadač 1966b	pisek, šterk; fluviální, pestré minerální složení	14	400

13.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Třebechovice pod Orebem) Bělečko: v mladém smrkovém porostu při silnici z Bělečka do Třebechovic, cca 1,6 km SSV od křižovatky v obci Bělečko	270	N50,16388° E15,96336°	31	551380	Hadač 1966b	vápnnité jílovce, slínovce, vápnité prachovce	14	400
11.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Týniště nad Orlicí) Vysoké Chvojno: Buky u Vysokého Chvojna; 1,8km Z od hájovny V Jezovinách na kraji hlavní silnice u plotu lesnických školek	300	N50,13634° E16,00045°			Hadač 1966b	písek, štěrk, fluviální; pestré minerální složení	13	450
11.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Týniště nad Orlicí) Sutě břehy: rozcestí Sutě břehy u zlomu terasy nad nivou Orlice	250	N50,15732° E16,02848°	22	551371	Hadač 1966b	písek, štěrk; fluviální; pestré minerální složení	14	400
11.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Týniště nad Orlicí) Nová Ves: při silnici 680m V od hájovny V Jezovinách	300	N50,13796° E16,03532°	23	551372	Hadač 1966b	písek, štěrk, fluviální, pestré minerální složení	13	450
11.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Týniště nad Orlicí) Čestice: u lesní cesty asi 1 km ZSZ od vlakové zastávky v obci	280	N50,13400° E16,13324°	19	551368	Hadač 1966b	kamenitý až hlinito kamenitý sediment s pestrým minerálním složením	13	450
11.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Týniště nad Orlicí) Čestice: asi 270m SZ od nádraží v obci, na malé stránce pod lesem na úpatí vrchu Malý Chlum za rodinným domkem	300	N50,13202° E16,14481°			Hadač 1966b	písčité slínovce až jílovce spongilitické, místy silicifikované (opuky)	13	450
11.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Týniště nad Orlicí) Rašovice: u silnice z Rašovic do Křivice asi 970m SS(Z) od křižovatky v Rašovicích; pod kopcem Hlava (Hlaváč?), podle staršího obyvatel	300	N50,16135° E16,12835°	20	551369	Hadač 1966b	kamenitý až hlinito kamenitý sediment s pestrým minerálním složením	13	450
11.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Křivice (Týniště nad Orlicí): asi 1,25km SZ od kostela v obci na okraji lesa poblíž jedné z lesních cest vedoucích k voj. prostoru	280	N50,18350° E16,09675°	21	551370	Hadač 1966b	písek, štěrk, pestré minerální složení	14	450

10.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Kostelec n. Orlicí: při lesní cestě cca 620m JIZ od hájovny u Kostece n. O. v blízkosti býv. pískovny	315	N50,10688° E16,18907°	Desítky rostlin rozptýlených na okraji mladé smrkové výsadby a v listnatém lese tvořeném převážně <i>Tilia cordata</i> , <i>Quercus rubra</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i>	17	551366	Hadač 1966b	písek se štěrkem fluvialního původu; pestré minerální složení	13	450
10.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Kostelec n. Orlicí: po obou stranách silnice mezi Kostelem n. O. a Čermnou n. O.; cca 760m JIZ od hájovny u Kostece n. O. v blízkosti býv. pískovny	320	N50,10536° E16,18889°	Stovky rostlin kolem cesty ve smrkovém lese s přimíšenými duby	18	551367	Hadač 1966b	písek se štěrkem fluvialního původu; pestré minerální složení	13	450
10.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Kostelec nad Orlicí) Zdešov: asi 1,8 km SV od hájovny ve Zdešově u silnice ze Zdešova do Kostece nad Orlicí; 1,2km V od rybníka v Častolovických Horkách	280	N50,11335° E16,16443°	Několik desítek rostlin v úseku cca 100m	18	551367	Hadač 1966b	písek se štěrkem fluvialního původu; pestré minerální složení	13	450
10.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Kostelec nad Orlicí) Zdešov: asi 1 km VSV od hájovny ve Zdešově u silnice ze Zdešova do Kostece nad Orlicí; 760m JV od rybníka v Častolovických Horkách	280	N50,10999° E16,15475°	Několik desítek až stovek rostlin u cesty ve smrkovém lese v úseku cca 50m			Hadač 1966b	písek se štěrkem fluvialního původu; pestré minerální složení	13	450
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Holice) Dolní Jelení: asi 500m V(JJV) od osady Rousínov na okrajích silnice	285	N50,04659° E16,12945°	Po stranách cesty roztroušeně, ostrůvkovitě větší porosty, tisíce rostlin; ohrožení: místy zarůstá <i>Pteridium aquilinum</i> ; podklad: jemný písek se štěrkem	24	551373	Faltsy in Kaplan 2005	pískito-hlinitý až hlinito-pískitý sediment, minerální složení pestré	14	400
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Holice) Dolní Jelení: lesní cesta na Plichůvky asi 3,8km V(JJV) od kostela v Horní Jelení; cca 1,4km SZ od nádraží v Plichůvkách	300	N50,04517° E16,14651°	Malá populace roztroušená v borůvci; několik desítek rostlin			Gruitch in Kaplan 2005	písek se štěrkem fluvialního původu; pestré minerální složení	14	400
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Holice) Dolní Jelení: u silnice z Dolního Jelení do osady Prochody; 2,4km V(JJV) od křižovatky v Dolním Jelení	300	N50,04507° E16,14081°	Asi 20 rostlin rozptýlených v borůvci			Štech in Kaplan 2005	písek se štěrkem fluvialního původu; pestré minerální složení	14	400
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Holice) Dolní Jelení: asi 1km V(JJV) od osady Rousínov na okrajích silnice	290	N50,04603° E16,13269°	Populace u hlavní cesty, stovky rostlin			Štech in Kaplan 2005	vápnnité jílovce, slínovce a prachovce, podřadně vložky jílovitého vápence	14	400
12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Vysoké Mýto) Dobříkov: okraj lesní cesty cca 900m SS(V) od kostela v obci	320	N50,00888° E16,14135°	Stovky rostlin po obou stranách lesní cesty ve smrkovém lese			Štech 1996	písek se štěrkem fluvialního původu; pestré minerální složení	14	400

12.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Vysoké Mýto) Dobřítkov: okrajnesekané stráně pod lesem 0,5km SSZ od kostela v obci; zhruba SZ-roh stráně	310	N50,00751° E16,13196°	Velmi malá populace cca 10 rostlin na okrajnesekané stráně pod lesem a mladého lesa s <i>Acer campestre</i> ; ohrožení: velmi malá populace	25	551374	Černý in Kaplan 2005	silicifikované vápnité jílovce a slinovice	14	400
22.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Pardubice) Černá za Bory: JZ část lesa S od silnice mezi obcemi Zmíniny a Černá za Bory cca 650m V od vlakové zastávky v obci	240	N50,02766° E15,84306°	Stovky až tisíce rostlin roztroušeně v celé JZ části borového lesa a po jeho okrajích; podklad: jemný písek; ohrožení: místy zarůstá <i>Catalpastris epigejos</i> ; všude extrémně hodně mravenčí	40	551389	Hadač 1966b	navátý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
Subpopulace										
			N50,02871° E15,84050°	Desítky rostlin roztr. na okrajích lesa u lesní cesty				navátý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
			N50,02726° E15,84130°	Desítky rostlin roztr. na okrajích lesa a podél lesní cesty				navátý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
			N50,02708° E15,84278°	Desítky až stovky rostlin na okrajích mladého borového lesa; ohrožení: zarůstá <i>Catalpastris epigejos</i>				navátý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
			N50,02766° E15,84419°	Desítky rostlin roztroušeně na okrajích borového lesa				navátý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
			N50,02883° E15,84377°	Desítky rostlin roztroušeně na okrajích lesa a kolem lesní cesty				navátý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
			N50,02893° E15,84620°	Stovky rostlin roztroušeně v mladém lese s <i>Betula pendula</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Pinus strobus</i> , <i>Populus tremula</i>				navátý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
			N50,02771° E15,84760°	Stovky rostlin na okrajích lesní cesty				navátý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400

	N50,02665° E15,84622°	Stovky rostlin roztroušeně podél hlavní silnice	navatý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
	N50,02699° E15,84443°	Desítky rostlin roztroušeně v mladém borovém lese	navatý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
22.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	N50,04098° E15,85254°	Stovky rostlin na ploše cca 1500m ² v lese s borovicí, dubem a březou; podklad: jemný písek; ohrožení: populace zarůstá <i>Melica nutans</i>	navatý písek; převážně křemenný + příměsí	41	551390
22.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	N50,04154° E15,84028°	Pár desítek rostlin u silnice v příkopu a v jeho těsné blízkosti; les s dubem a smrkem, místy husté porosty semenáčů <i>Quercus rubra</i> ; podklad: jemný písek; ohrožení: malá populace, <i>Quercus rubra</i>	navatý písek; převážně křemenný + příměsí; vápnité jílovce, slínovce, vápnité prachovce	42	551391
22.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	N50,04111° E15,83910°	Desítky rostlin v lese poblíž silnice; ohrožení: malá populace	navatý písek; převážně křemenný + příměsí	14	400
22.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	N50,04638° E15,82786°	Desítky rostlin v doubravě u lesní pěšiny na velmi malé ploše (cca 30m ²); podklad: jemný písek; ohrožení: malá populace	hlína, písek; smíšený sediment; deluviofluvialní	43	551392
7.8.2006 (Štěch, Košnar, Svobodová, Peterka)	N49,59475° E16,41799°	(Olešnice u Kunštátu) Kněžves: asi 1km SZ od kaple v obci; na SZ svahu Kavinského potoka při cestě se žlutou turistickou značkou	dvojslídá paranula s granátem, drobnozrná	15	551364
7.8.2006 (Štěch, Košnar, Svobodová, Peterka)	N49,59178° E16,41661°	(Olešnice u Kunštátu) Kněžves: asi 760m SZ od kaple v obci; při lesní cestě na mýtině s výsadbou mladých modřínů a na okrajích lesní cesty	dvojslídá paranula s granátem, drobnozrná	12	400
7.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	N49,58455° E16,39945°	(Olešnice u Kunštátu) Trpin: JZ okraj lesa na vrchu Fouska 900m JJZ od kostela v obci	muskovitický kvarcit až kvarcitická rula	16	551365

21.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Olešnice u Kunšátu) Nyklovice: u lesní cesty cca 1,8km JV od křižovatky v obci; svah nad L břehem Hodonínský (Nyklovického potoka)	620	N49,60185° E16,37135°	37	551386	Hadač 1966b	amfibolit	12	450
21.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	(Olešnice u Kunšátu) Velké Tresné: v údolí Tresného potoka na terase nad potokem na kraji lesní cesty asi 800m J(J)V od křižovatky v obci	540	N49,56416° E16,38700°	38	551387	Hadač 1966b	dolomitický vápenc; krystalický (mramor)	12	450
21.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Olešnice u Kunšátu: smrkový les při silnici Olešnice - Nyklovice asi 1,7km J od kostela v obci Trpín nad L břehem Hodonínský při lesní cestě nad bývalým lomem(?)	600	N49,57538° E16,40224°	39	551388	Hadač 1966b	muskovitický kvarcit až kvarcitická rula + dvojsídlá pararula s granátem + dolomitický vápenc; krystalický	12	450
21.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Olešnice u Kunšátu: smrkový les při silnici Olešnice - Nyklovice asi 1,8km J od kostela v obci Trpín nad L břehem Hodonínský při okraji lesa	590	N49,57446° E16,40283°			Hadač 1966b	muskovitický kvarcit až kvarcitická rula + dvojsídlá pararula s granátem + dolomitický vápenc; krystalický	12	450
5.8.2006 (Chlumský)	(Bečice u Tábora) Přiběnice: J až JZ svah nad silnicí kolem zříceniny Přiběnice, cca 150m JIZ od zbytků věže	420	N49,39162° E14,56269°	12	551361	Kurka kartioleka (1972)	pararula, až mignaitit	14	400
5.8.2006 (Chlumský)	(Bečice u Tábora) Přiběnice: po okrajích obezděného otevřeného prostoru v centru zříceniny 30m S od věže	425	N49,39142° E14,56421°			Kurka kartioleka (1972)	pararula, až mignaitit	14	400
5.8.2006 (Chlumský)	(Bečice u Tábora) Přiběnice: v lískovém křoví 100m SZ od věže v areálu zříceniny	425	N49,39245° E14,56244°			Kurka kartioleka (1972)	pararula, až mignaitit	14	400
5.8.2006 (Chlumský)	(Bečice u Tábora) Přiběnice: asi 580m JV od zříceniny na svahu nad Lužnicí při okraji lesní cesty	460	N49,38838° E14,56655°			Sádko in Štech 2005	pararula, až mignaitit	14	400

5.8.2006 (Chlumský)	Mašice u Tábora: asi 1,5km V od zříceniny hradu Příběnice na mohylovém pohřebišti ve smrkovém lese	480	N49,39191° E14,58351°	13	551362	Štech (1996)	syenit	14	400
5.8.2006 (Chlumský)	Mašice u Tábora: asi 1,5km V(J)V od zříceniny hradu Příběnice, 300m JJZ od mohylového pohřebiště na svahu u cesty	460	N49,38966° E14,58216°			Štech (1996)	syenit	14	400
1.8.2006 (Chlumský)	(Tábor)Slapy: les u silnice cca 1,5km JZ od obce, pěšina na Z okraji lesa	520	N49,37760° E14,60035°	7	551356	Kaiser in Kurka, kartoteka (1982)	granit, kvaresyenit (křemenný syenit)	14	400
1.8.2006 (Chlumský)	(Planá nad Lužnicí) Ústrašice: 750m JZ od křižovatky v obci po obou stranách silnice z Ústrašic do Žeteče cca 200m před okrajem lesa v okolí křižující lesní cesty	440	N49,33371° E14,67733°	8	551357	Chlumský (2006) nová lokalita	Jily, jílovité písky, diatomit. jily, diatomity	14	400
5.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Planá nad Lužnicí: les cca 50m J od rybníka	410	N49,33250° E14,72173°	14	551363	Trávníček in Štech 2005	Jily, jílovité písky, diatomit. jily, diatomity	14	400
5.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Planá nad Lužnicí: borový les u lesní cesty cca 200m JJV od rybníka Hejtmán	410	N49,33131° E14,72463°			Trávníček in Štech 2005	Jily, jílovité písky, diatomit. jily, diatomity	14	400
1.8.2006 (Chlumský)	Douбі u Tábora: asi 150m Z od hádraží v borovém lese u staré silnice	425	N49,32243° E14,71519°	6	551355	Rybenský in Kurka, kartoteka (1983)	Jily, jílovité písky, diatomit. jily, diatomity	14	400
5.8.2006 (Chlumský)	Douбі u Tábora: v borovém lese asi 460m JJV od vlakové zastávky v obci	420	N49,31799° E14,71956°	9	51358	Štech (1993)	paranula	13	400
5.8.2006 (Chlumský)	Douбі u Tábora: smrkový les nad zářezem tratí asi 1 km JJV od vlakové zastávky v obci	425	N49,31334° E14,72134°	10	551359	Kaiser in Kurka (1984)	paranula	14	400

5.8.2006 (Chlumský)	Doubí u Tábora: asi 950m SSZ od vlakové zastávky v obci v porostu mezi železnicí a silnicí E55	420	N49,33000° E14,71456°	Populace mezi body N49,33000° E14,71456° a N49,33042° E14,71455°, stovky rostlin rozptýleně v podrostu	11	551360	Chlumský (2004)	pararula	14	400
5.8.2006 (Chlumský)	Doubí u Tábora: asi 450m SSZ od vlakové zastávky v obci v porostu mezi železnicí a silnicí E55	420	N49,32562° E14,71579°	Populace mezi body N49,32562° E14,71579° a N49,32621° E14,71568° stovky rostlin, proti minulému roku se populace zmenšila (disturbance lokality kácením?)			Štech (1996)	Jílly, jílovité pisky, diatomit, jíly, diatomity	14	400
16.8.2006 (Chlumský, Svobodová)	Kardašova Řečice: na okraji borového lesa u turistické značky ca 2,5km JJZ od nádraží v obci	445	N49,16297° E14,84647°	Desítky rostlin na čerstvě mýtině (populace zarůstá) a dále v borovém porostu kolem cesty; celá populace je v úseku ca 240m mezi body N49,16297° E14,84647° a N49,16092° E14,84564°	33	551382	Štech (2003)	pararula, až migmatit	14	400
18.8.2006 (Štech, Chlumský)	Kolence: les při silnici do Novosedel nad Nežárkou ca 900 m JV od obce	445	N49,08643° E14,79793°	Velká populace, mnoho tisíc rostlin podél obou stran silnice, převážně slušnější les (dub, bor), lokálně ale postupuje ruderalizace; rostliny se vyskytují mezi body N49,086202° E014,796570°, N49,085853° E014,796660°, N49,085627° E014,801250°, ale i dále	34	551383	Hadač 1966b	hlubinný magmatit; granit	13	400
16.7.2006 (Chlumský, Chlumská)	Majdalena: lesní cesta k soutoku Lužnice a Nové řeky (zelená značka) ca 200m od hlavní silnice; asi 2,5km SSZ od nádraží v obci	440	N48,98466° E1484436°	Stovky rostlin v úseku asi 150m kolem cesty; okraj druhotného borového lesa s přimíšenými duby na JV orientované hraně terasy nad nivou Lužnice	1	551350	Štech (1993)	navátý, jemnozrný písek, převážně křemenný + příměsi	13	400
19.8.2006 (Chlumský, Chlumská)	(Chlum u Třeboně) Kosky: asi 720m JJZ od mostu přes Kostěněcký potok v obci nad pravým břehem Lužnice v lese za chatami	450	N48,94421° E14,88637°	Smrkový les s dubem; malá populace několika desítek rostlin na malé ploše; podklad: hrubozrný šterkopísek; dtrožení: vzhledem k velikosti populace značné, potenciální hrozbou je i <i>Carex brizoides</i> a <i>Pteridium aquilinum</i>	35	551384	Hadač 1966b	písek, šterk, fluvialní, pestré minerální složení	13	400
19.8.2006 (Chlumský, Chlumská)	Suchdol nad Lužnicí: smrkový les při soutoku Lužnice s Dračicí (na terase na pravém břehu Lužnice) ca 540m SSV od mostu přes Lužnici v obci Suchdol n. L.	450	N48,90893° E14,89216°	Stovky rostlin na světlínách kolem lesní cesty směřující k Lužnici a ve smrkovém lese u řeky; populace je v úseku mezi body N48,90893° E14,89216° a N48,90760° E14,89425°	36	551385	Hadač 1966b	písek, šterk; fluvialní; pestré minerální složení	13	400

16.7.2006 (Chlumský, Chlumská)	Klikov: okraj lesní cesty vedoucí z J k soutoku Lužnice a Dračice asi 150m od silnice mezi Klikovem a Suchdolem nad Lužnicí; 800m Z od mostu přes Dračici	464	N48,90650° E14,89470°	Velmi malá populace na ploše cca 2x3m, desítky rostlin; malá světlina ve smrkovém lese; ohrožení: v případě zhoustnutí stromového patra by mohla mít populace nedostatek světla	2	551351	Hadač 1966b	písek, štěrk; fluviální; pestré minerální složení	13	400
20.7.2006 (Štech, Chlumský)	Františkov: terasa nad levým břehem Dračice cca 300m JV od mostu silnice na Rapšach	465	N48,89154° E14,94009°	Populace podél hrany vyznívá na Z, stovky rostlin; ohrožení: místy je okraj populace ohrožen nuderalizací (<i>Impatiens parviflora</i>), potenciální hrozbou jsou i juvenilní rostliny <i>Symphoricarpos albus</i>	5	551354	Hadač 1966b	biotitická ortorula	13	400
20.7.2006 (Štech, Chlumský)	Halámky: 2,8km J od křižovatky v obci, pravý břeh Lužnice asi 1km V od Lesních Chalup; poslední terasa nad nivou Lužnice - ústí úvozové cesty do nivy	460	N48,83049° E14,93284°	Velmi malá populace na ploše cca 2x4m, 15 rostlin; mladý les s borovicí, těsně navazuje na starší zbytky porostu v ústí úvozu; ohrožení: vzhledem k počtu rostlin vysoké	3	551352	Hadač 1966b	fluviální šěrkové pisky nejvyšší terasy	13	400
20.7.2006 (Štech, Chlumský)	Halámky: 800m JV od hájenky v obci po obou stranách hlavní silnice (Halámky-Neunagelberg) v místě křížení s lesní cestou	467	N48,84177° E14,93738°	V od silnice velká populace cca 200m ² , tisíce rostlin; světlý borový les, Z od silnice po obou stranách lesní cesty tisíce rostlin na ploše 500m ²	4	551353	Hadač 1966b	písek, štěrk; fluviální; pestré minerální složení	13	400
25.8.2006 (Chlumský)	(SK)Šaštin - Stráž: doubrava u silnice v blízkosti hájovny cca 2km JJZ od žel. zastávky v obci	200	N48,61874° E17,13850°	Několik desítek rostlin v mladém doubravě s borovicí při cestě kolem hájovny; podklad: jemný písek	48	551397	Hadač 1966b	naváté pisky	15	400
25.8.2006 (Chlumský)	(SK)Borský Mikuláš: bor J od silnice do Šaština cca 3km Z od obce	180	N48,63115° E17,17033°	Desetitisíce rostlin v řídkém boru na jemném písku na ploše cca 40000m ²	49	551398	Hadač 1966b	naváté pisky	15	400
25.8.2006 (Chlumský)	(SK) Borský Mikuláš, Šajdíkové Humence: světlý bor na V okraji obce (cca 180m V od kostela)	200	N48,65257° E17,27207°	Desetitisíce až statisíce rostlin ve světlém boru s duby mezi obcí a pískovnou; populace se vyskytuje ve větších porostech k J od bodu N48,65257° E17,27207° až k N48,64306° E17,27338° v úseku cca 1 km a k SV v úseku cca 450m mezi body N48,65257° E17,27207° a N48,65419° E17,27773°; podklad: jemný písek	50	551399	Hadač 1966b	naváté pisky	15	400
25.8.2006 (Chlumský)	(SK) Borský Mikuláš, Šajdíkové Humence: okraj boru cca 180m V od kostela v obci	200	N48,65257° E17,27207°	Tisíce rostlin na okraji vesnice ve světlém boru s duby			Hadač 1966b	naváté pisky	15	400

25.8.2006 (Chlumský)	(SK) Borský Mikuláš, Šajdítkové Humence: okraj boru při panelové lesní cestě cca 400m SV od kostela v obci	200	N48,65409° E17,27477°	Tisíce až desetitisíce rostlin J podél panelové lesní cesty ve světlém boru mezi body N48,65409° E17,27477° a N48,65419° E17,27773°; ohrožení: místy zarůstá <i>Calamagrostis epigejos</i> a <i>Robinia pseudacacia</i>	Hadač 1966b naváté písky	15	400
25.8.2006 (Chlumský)	(SK) Borský Mikuláš, Šajdítkové Humence: bor 420m JV mezi obcí a pískovnou	200	N48,65060° E17,27430°	Stovky až tisíce rostlin u lesní cesty ve světlém boru s přimíšenými duby na ploše cca 20x20m; podklad: jemný písek	Hadač 1966b naváté písky	15	400
25.8.2006 (Chlumský)	(SK) Borský Mikuláš, Šajdítkové Humence: bor 450m J(JV) mezi obcí a pískovnou	200	N48,64954° E17,27324°	Tisíce až desetitisíce rostlin od tohoto bodu dále k J až po N48,64306° E17,27338°	Hadač 1966b naváté písky	15	400
26.8.2006 (Chlumský)	(SK) Malacky: lesní cesta 170m SV od býv. hájovny Červený Kríž (momentálně vojenský objekt)	200	N48,47697° E17,05714°	Desítky rostlin roztroušeně kolem lesní cesty v borovém lese v úseku cca 250m mezi body N48,47663° E17,05770° a N48,47727° E17,05450°; podklad: jemný písek; ohrožení: populaci značně zarůstá <i>Calamagrostis epigejos</i>	Hadač 1966b naváté písky	51	350

Příloha 3

Nenalezené lokality

Lokality HADAČE (1966b), které nebyly při revizi nalezeny (popis lokalit je přejat doslova) :

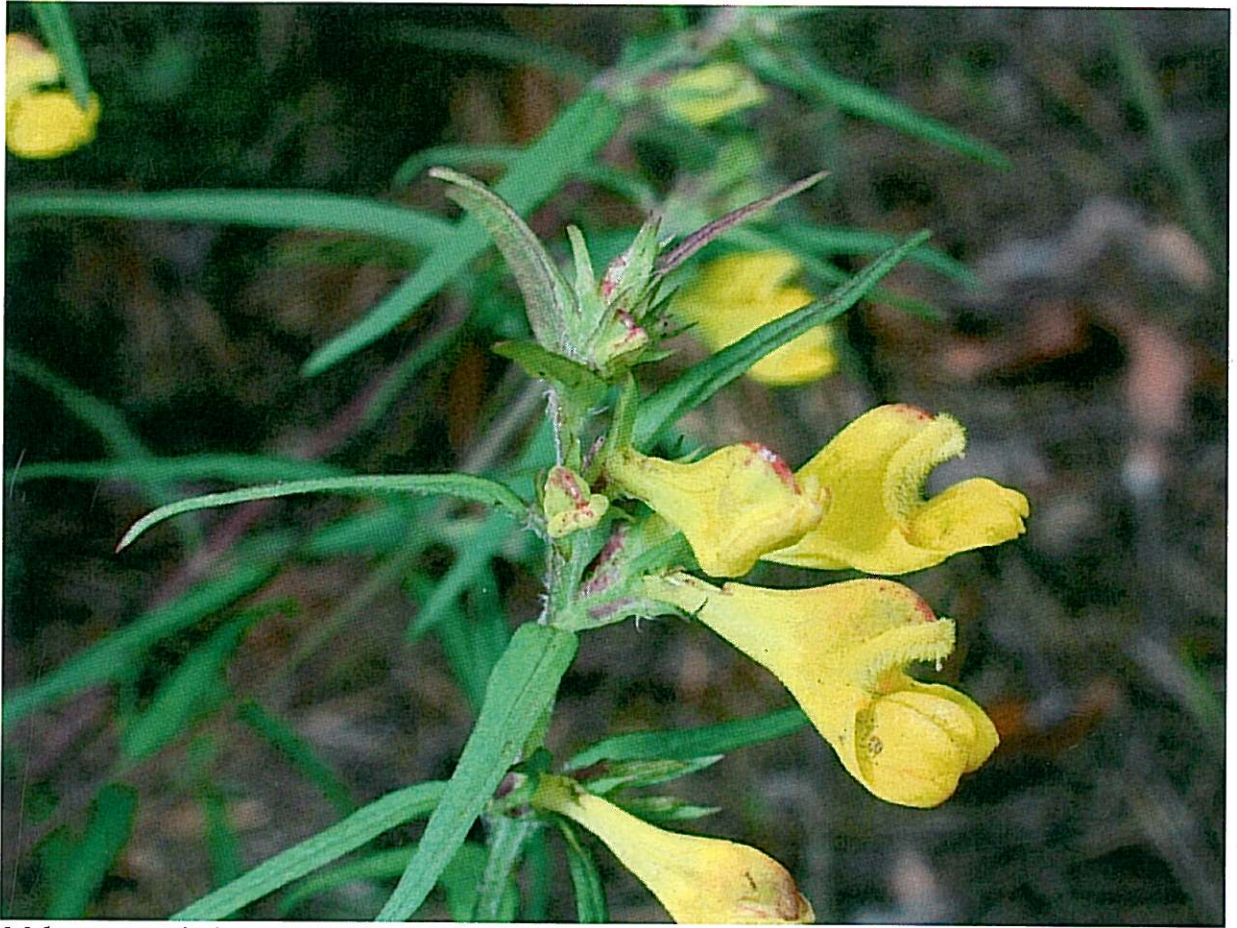
- Kóta 284 m mezi háj. Dva Šraňky a Bělečkem (MIKYŠKA, úst. sděl.).
- Mezi Kladruby a Týncem n. L. v borobřezovém lese na písčité půdě ca 250 m n. m. (ČELAKOVSKÝ 1873).
- V lese ohrada u Vchynic, ca 213 m (KOŠTÁL in ČELAKOVSKÝ 1890, PARD.)
- Bor u Živanic (E. HADAČ, PARD.).
- Lesy u Bohdanče (JAHN, BRNU); les Horka u Bohdanče, ca 230 m (J. et E. HADAČ 1948, E. HADAČ 1966).
- U hájovny jv. od Strášova 18. 6. 66 (E. HADAČ).
- Bělobranská dubina (při silnici Pardubice – Sezemice), 220m, s *Melampyrum vulgatum*. (J. et E. HADAČ 1948, PARD.).
- Les u os. Borek (J. HADAČ PARD.).
- Ad marginem silvae Horka supra Přepychy, ca 320 m (ROHLENA 28. 8. 1927 PR, BRNU).
- Albrechtice, ca 260 m (Rohlena 1928, J. HADAČ PARD.), les Lípava u A. (MIKYŠKA, úst. sděl.).
- Štěpánovsko, ca 255 m (ROHLENA 1928).
- Čestice, ca 270 m (ROHLENA 1928), Horecká stráň jihovýchodně od Čestic (MIKYŠKA, úst. sděl.).
- Les nad Starými Holicemi, 320 m (KOŠTÁL in ROSŮLEK 1903); pravděp. totožné s lokalitou: „Holice, v obecním lese“, 29. 7. 1899 TOCL, PR, BRNU, resp. „Holice, při lesní cestě k Borohrádku“ (30. 8. 1897 TOCL PR).
- U Potštýna, ca 300m, 8. 1896 (ČELAKOVSKÝ fil. PR).
- V borech u Rovečného („Rovečín“), ca 600 m, 8. 1878 (FLEISCHER PR).
- Olešnice: u lomu při silnici k Crhovu, 550 m, druhotná smrčina (E. HADAČ).
- Studienka („Hasprunka“), v písčitém boru 17. 8. 1946 (HOLZKNECHT, BRNU).
- Pod Bozajvrškem jihových. Mikulášova, 225 m, 16. 8. 1965 (HADAČ).
- Šajdíkovce Humence: polesí Hrušov odd. 71d (RŮŽIČKA 1964) 185 – 206 m n. m.
- Plavecký Štvrtok (HOLUBY sec. SOÓ 1927), ca 170 m n. m.

Příloha 4

Tabulka fytoocenologických snímků

Příloha 5

Fotografie



Melampyrum bohemicum
(foto M. Štech)



Melampyrum angustissimum (Losenheim)
(foto M. Štech)



Melampyrum nemorosum (Mackov)
(foto M. Štech)



Melampyrum subalpinum s. str. (Einöde)
(foto M. Štech)



Porost *Melampyrum bohemicum* v okolí a na pomníku z druhé světové války – příklad praktického využití černýše českého pro pietní a dekorativní účely.
(foto J. Svobodová)

leč do 2022