



Vojtěch Petrák

**Význam hybridizace pro speciaci krytosemenných rostlin
se zvláštním důrazem na rod *Dactylorhiza***

*A significance of hybridization to the speciation of angiosperms with a particular reference
to the genus *Dactylorhiza**

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jan Ponert, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 04. 2024

Podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval svému vedoucímu práce Mgr. Tomáši Urfusovi, Ph.D. za obrovskou trpělivost při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině, která mě podporovala a stála při mně i v časech horších.

Abstrakt

Procesy hybridizace a introgrese představují jeden z nejdůležitějších nástrojů evoluce rostlin. Mohou přinášet riziko zániku pro druhy s malými populacemi nebo nově ustálené hybridy, ale současně umožňují některým druhům získat větší variabilitu, než která by jim byla za normálních okolností dostupná, a vedou mnohdy k evolučním novinkám a adaptaci na nové podmínky života. Tato práce je zaměřena na rod *Dactylorhiza*, který je charakteristický retikulátní alopolyploidní evolucí s vysokou schopností mezidruhové hybridizace a s hybridní speciací. Rod je rozšířen od tropických oblastí až po severní arktické oblasti. Vedle široce rozšířených druhů se zde vyskytují vzácné lokálními taxony. Práce uvádí, vedle některých nevýhod mezidruhové hybridizace, pozitivní evoluční vliv tohoto procesu se vznikem nových druhů. Proto byla hlavní pozornost věnována nejčastějším a nejvíce rozšířeným hybridogenním taxonům *Dactylorhiza majalis* a *Dactylorhiza traunsteineri*, které svou ustáleností a stářím představují plně oddělené, samostatné a evolučně úspěšné nové druhy. Charakter funkčního přizpůsobení rostlin vnějším podmínkám a rychlost takového přizpůsobení má význam nejen pro rod *Dactylorhiza*, ale může mít význam také obecný.

Klíčová slova: *Dactylorhiza*, mezidruhová hybridizace, introgrese, hybridní speciace.

Abstract

The processes of hybridization and introgression represent one of the most important tools of plant evolution. While these processes carry the risk of extinction for species with small populations or newly established hybrids, they also allow some species to acquire more variation than would normally be available to them, often leading to evolutionary novelty and adaptation to new living conditions. This work focuses on the allotetraploid genus *Dactylorhiza*, with a high capacity for interspecific hybridization and hybrid speciation. The genus is distributed from tropical regions to northern arctic regions. In addition to the widely distributed species, there are rare local taxa. The paper argues, besides some disadvantages of interspecific hybridization, the positive evolutionary impact of this process with the emergence of new resistant species. Therefore, the main attention was paid to the most common and widespread hybrid taxa *Dactylorhiza majalis* and *Dactylorhiza traunsteineri*, which by their stability and age represent fully separated, independent and evolutionarily successful new species. The nature of the functional adaptation of plants to external conditions and the rate of such adaptation is not only of relevance to the genus *Dactylorhiza*, but may also be of general relevance.

Keywords: Genus *Dactylorhiza*. Interspecific hybridization. Introgression. Hybrid speciation.

1 Obsah

Úvod.....	1
2 Hybridizace.....	2
3 Introgrese	2
4 Negativní a pozitivní vliv hybridizace a introgrese	3
4.1 Negativní vliv hybridizace a introgrese.....	3
4.2 Pozitivní efekt hybridizace a hybridní speciace	4
5 Metody zkoumání hybridizace	5
5.1 Průtoková cytometrie	6
6 Hybridizace u čeledi <i>Orchidaceae</i>	6
6.1 Evoluční historie čeledi <i>Orchidaceae</i>	6
6.2 Hybridizace v čeledi <i>Orchidaceae</i>	7
7 Rod <i>Dactylorhiza</i>	8
8 Hybridizace u rodu <i>Dactylorhiza</i>	11
9 Allopolyploidní evoluce u rodu <i>Dactylorhiza</i>	12
10 Komplex <i>Dactylorhiza majalis</i>	14
10.1 <i>Dactylorhiza majalis</i> sensu stricto	14
10.2 Mezirodová hybridizace s účastí <i>Dactylorhiza majalis</i>	16
10.2.1 <i>Dactylorhiza</i> × <i>aschersoniana</i>	16
10.2.2 <i>Dactylorhiza</i> × <i>braunii</i>	16
10.2.3 <i>Dactylorhiza</i> × <i>dinglensis</i>	16
10.2.4 <i>Dactylorhiza</i> × <i>duffiana</i>	17
10.2.5 <i>Dactylorhiza</i> × <i>rupertii</i>	17
11 Komplex <i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	17
11.1 <i>Dactylorhiza traunsteineri</i> sensu stricto	17
11.2 Mezirodová hybridizace s účastí <i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	20
11.2.1 <i>Dactylorhiza</i> × <i>silvae – gabretae</i>	20
11.2.2 <i>Dactylorhiza</i> × <i>thellungiana</i>	20
11.2.3 <i>Dactylorhiza</i> × <i>jenensis</i>	20
12 <i>Dactylorhiza praetermissa</i>	20
13 <i>Dactylorhiza baltica</i>	21
14 <i>Dactylorhiza sphagnicola</i>	22
15 <i>Dactylorhiza bohémica</i>	23
16 Diskuse	23
17 Závěr	25
Literatura	28

Úvod

Hybridizace je jedním z nejdůležitějších evolučních procesů, které umožňují druhům získat větší variabilitu, než která by jim byla za normálních okolností dostupná (Hedrén, 1996; Pillon et al. 2007; Paun et al. 2011). V minulosti se předpokládalo, že k hybridizačním událostem mezi druhy dochází vzácně a že výslední potomci vzešlí z hybridizace budou převážně neplodní (Knobloch, 1972). Pozdější výzkumy ale tuto představu významně změnily a hybridizace byla přijata jako důležitý nástroj evoluce, který umožňuje rychlejší diverzifikaci druhů cestou mezidruhového křížení (Anderson a Stebbins, 1954). Hybridizace je důležitým fenoménem, který vede k evolučním novinkám nejen u rostlin, ale také u hub a zvířat (Gross a Rieseberg, 2005; Paun et al. 2009; Soltis a Soltis, 2009)

Právě čeleď *Orchidaceae* se vyznačuje vysokou schopností hybridizace, při které dochází nejen k mezidruhové, ale také mnohdy k mezirodové hybridizaci (Hedrén, 1996a; Pillon et al. 2007). Součástí čeledě *Orchidaceae* je rod *Dactylorhiza*. U rodu *Dactylorhiza*, který je cílovým subjektem této práce, došlo v průběhu posledních milionů let k dramatické diverzifikaci druhů (Hawranek, 2021). Tato diverzifikace byla způsobena mnoha faktory, a právě na rozbor těchto faktorů bych se rád zaměřil v této práci. Vznik hybridních zón měl za následek plejádu hybridogenních druhů, které znesnadňují taxonomické uspořádání uvnitř rodu. Je tedy často složité určit, jestli se jedná o variantu mateřského druhu, či plně oddělený samostatný nový druh. Tyto hybridogenní druhy se liší původem, ale také celkovým stářím a ustáleností (Brandrud et al. 2020).

Předkládaná práce se zaměří převážně na nejčastější a nejvíce rozšířené hybridní taxony *Dactylorhiza majalis* a *Dactylorhiza traunsteineri*, ale současně také představí další taxony, které jsou v rámci svého rozšíření více lokální. Práce dále odpoví na stanovené otázky:

1. Jaký vliv může mít mezidruhová hybridizace na speciaci rodu *Dactylorhiza*?
2. Do jaké míry jsou alotetraploidní taxony v rodě *Dactylorhiza* nezávislé na rodičovských taxonech?
3. Může hybridizace představovat ohrožení některých taxonů v rámci rodu?

2 Hybridizace

Hybridizace je mechanismus, při kterém dochází ke křížení mezi dvěma odlišnými druhy a jedinci vzniklí z této interakce se pak nazývají hybridy (Rieseberg a Carney, 1998). Původně se předpokládalo, že jedinci, vzniklí křížením jsou sterilní. Druh byl považován za skupinu populací, které se plodně kříží mezi sebou, ale jsou reprodukčně odděleny od jiných (třebaže příbuzných) druhů (Harrison, 1993). Od druhé poloviny dvacátého století se naopak na hybridizaci nahlíží jako na proces, který stojí za evolučními inovacemi a vznikem nových druhů (Anderson a Stebbins, 1954; Arnold, 1997).

Odhaduje se, že mezi druhy se účastní hybridizace minimálně 25% rostlinných a 10% živočišných taxonů (Mallet, 2005). Knobloch (1972) uvádí, že celkově 23 675 druhů rostlin má potenciálně hybridní původ. Ellstrand et al. (1996), který se zabýval ve svém výzkumu pěti floristickými oblastmi v Severní Americe a v Evropě zaznamenal významnou nevyrovnanost mezi jednotlivými rody, kdy jen 6-16 % rodů ve zkoumaných oblastech podstupovalo hybridizaci. Naopak Whitney et al. (2010) odhadli celkové zastoupení hybridizace na 40 % u všech rostlinných čeledí a na 16 % u rostlinných rodů.

Pohled mnoha vědců na hybridizaci je rozdílný. Mnozí autoři se domnívají, že takto časté hybridizace mají jednoznačně pozitivní vliv na rostlinnou evoluci (Rieseberg a Wendel, 1993), například zvýšená genetická výbava u hybridizujících druhů, vznik nových adaptivních vlastností v krátkém čase nebo přenesení adaptivních vlastností z jednoho druhu na druhý (Arnold; 1997; Soltis a Soltis, 2009). Hybridizace mnohdy také vede k izolaci hybridizujícího druhu, tento jev nazýváme hybridní speciací (Mallet, 2007). Další autoři vnímají hybridizaci i jako negativní faktor, který představuje existenciální hrozbu pro vzácné druhy (Allendorf et al. 2001; Levin et al. 1996; Rhymer a Simberloff, 1996; Rieseberg, 1991; Todesco et al. 2016).

S rozvojem molekulárních metod a jejich snadnější dostupností si postupně uvědomujeme, že hybridizace se vyskytuje častěji, než jsme dříve předpokládali a mnoho druhů v průběhu své evoluce hybridizaci prodělalo (Naczka a Ziętara, 2019). V rostlinném světě hraje hybridizace významnou úlohu v evoluci a při vzniku druhů díky vysoké frekvenci svého výskytu (Soltis a Soltis, 2009). Hybridizace byla studována u řady komerčních plodin jako například rýže (Langevin et al. 1990) nebo u kukuřice (Troyer, 2006).

3 Introgrese

Hybridizace je definována jako genový tok mezi dobře diferenciovanými druhy, ovšem může docházet i ke zpětné hybridizaci, kdy genový tok probíhá mezi již existujícím hybridem a jeho mateřským druhem. Tuto situaci nazýváme jako introgresi. Introgresi rozlišit na jednosměrnou (dochází mezi

hybridem a jedním rodičem) a obousměrnou (dochází mezi hybridem a oběma rodiči) (Rhymer and Simberloff, 1996). Opakovaným zpětným křížením s rodičovským druhem se potomci stávají stále více podobní rodičům a mají homogennější vlastnosti v rámci generace. Po několika zpětných kříženích může být obtížné rozlišit hybridy od původní populace rodičů (Anderson, 1949).

Pokud dochází k opakovanému zpětnému křížení a hybridy se kříží i mezi sebou, může vzniknout hybridní roj (Rhymer a Simberloff 1996), což je typické pro hybridní zóny (Harrison 1993).

Hybridizace nemusí vždy vést k introgresi, zejména pokud jsou hybridní jedinci sterilní (Rhymer a Simberloff 1996). Přesto je introgrese nejčastějším důsledkem hybridizační události (Ottensmith, 2021). Introgrese nemusí probíhat pouze mezi různými druhy, ale také mezi různými cytotypy jednoho druhu. Nejčastěji byl přenos genů mezi různými ploidiemi pozorován v systémech obsahujících diploidy a tetraploidy (Neuffer et al. 1999).

4 Negativní a pozitivní vliv hybridizace a introgrese

Hybridizace je zcela běžný jev v rostlinné říši, který nejen že stojí za vznikem nových adaptivních vlastností, ale také pravděpodobně i za vznikem nových druhů (Anderson a Stebbins, 1954; Soltis a Soltis 2009). Organismy se brání hybridizaci reprodukčními bariérami, které lze rozdělit do dvou základních skupin – postzygotické (po vzniku zygoty) a prezygotické (před vznikem zygoty). Po úspěšném opylení a oplození hrají roli postzygotické izolace. Mezi ně se řadí zygotická i embryonální mortalita, neživotaschopnost či sterilita hybrida (Rieseberg a Carney, 1998).

Prezygotické izolační mechanismy jsou různorodé, zahrnují prostorové, časové (např. posun fenologie), etologické (např. interakce s opylovači) a genetické bariéry. Zde je vidět, že mnoho ekologických faktorů má vliv na tvorbu či na porušení izolačních mechanismů (Rieseberg a Carney, 1998). Bohužel prezygotická izolace jsou dnes velmi často narušovány činností člověka třeba stavbou cest a ty pak následně slouží jako migrační koridory pro organismy (Grabenstein a Taylor, 2018).

4.1 Negativní vliv hybridizace a introgrese

Hybridizace nemusí být jen pozitivním mechanismem. Vzácné druhy mohou čelit mezidruhové hybridizaci, která může oslabit populaci a po určité době vést druh k úplnému vymření (Levin et al. 1996; Wolf et al. 2001, Todesco et al. 2016).

Hybridizace přispívá k úbytku vzácnějších druhů dvěma způsoby (Levin et al. 1996; Ellstrand et al. 1999; Wolf et al. 2001). Za prvé: pokud hybridy mají sníženou fitness ku svým rodičům (Outbreední deprese), může růst populace klesnout pod únosnou úroveň a populace se zhroutí – tento jev nazýváme „demografickým zaplavením“ (demographic swamping). Za druhé: pokud hybridy jsou plodnější a nejeví známky sníženého fitness, mohou hybridy vytlačit jednoho či oba rodičovské druhy, které se účastní hybridizace – tento jev nazýváme „genetickým zaplavením“ (genetic swamping). Mnohdy však oba

faktory operují současně a je obtížné určit, který z nich je dominantní (Wolf et al. 2001; Todesco et al. 2016).

Demografické zaplavování ve výsledku vede k úplné asimilaci vzácnějšího druhu (Todesco et al. 2016). V České republice tomuto problému čelí náš endemický hadcový druh *Cerastium alsinifolium*. Jeho populace je ovlivňována hybridizací s hojnou *C. arvense* při které dochází ke vzniku sterilních hybridů (Vít et al., 2014). Z ciziny je nám znám případ z Austrálie, kde australský původní druh starčeku *Senecio pinnatifolius* A.Rich. je ohrožen demografickým zaplavováním prostřednictvím křížení s invazním druhem *S. madagascariensis* Poir (Prentis et al. 2007).

Genetické zaplavování zahrnuje hybridní populace, kde hybridy mají aspoň částečně zachovanou plodnost. Tyto hybridy mohou být životaschopnější a konkurence schopnější než jejich rodiče a také mohou degradovat genom jednoho či obou rodičů introgresí. Výsledkem může být substituce rodičovských druhů hybridními jedinci (Todesco et al. 2016; Wolf et al. 2001). Toto si můžeme ilustrovat na *Argyranthemum coronopifolium*, který se vyskytoval v sedmi čistých lokalitách na ostrově Tenerife. Populace druhu nebyly ovlivněny hybridizací s ostatními příbuznými druhy, protože byly od sebe odděleny lávovým polem, které znemožňovalo kontakt mezi těmito druhy. Situace se však změnila s výstavbou silnice, která umožnila příbuzným tohoto vzácného druhu překročit lávové pole. Výsledkem je, že 3 ze 7 původních populací vzácného druhu jsou dnes tvořeny hybridy nebo invadujícími druhy (Levin et al. 1996).

Hybridní jedinci mohou ohrožovat vzácné druhy i díky interakcím se škůdci a patogeny. Při hybridizaci může docházet ke ztrátě rezistentních genů mateřských rostlin (Levin et al. 1996). Interakce mezi hybridy a patogenem jsou různé, ale zdá se, že hybridy jsou spíše náchylnější, než aby byly odolnější vůči nim (Levin et al. 1996; Rieseberg a Carney, 1998).

Nebezpečím pro vzácné druhy představuje i introgrese, která může ohrozit genetickou integritu vzácného druhu. Příkladem nám může být *Viola lutea subsp. sudetica*, která je endemitem Krkonoš. Tento endemit tvoří hybridní roje s *Viola tricolor*, který se dříve vyskytoval v nížinách a upřednostňuje zásaditý substrát. Populace přišly do kontakt díky lidské činnosti, a to výstavbou stezek, kde byl při výstavbě použit zásaditý vápencový štěrk (Krahulcová et al. 1996).

4.2 Pozitivní efekt hybridizace a hybridní speciace

Vznik nových adaptabilních vlastností, zvýšení genetické diverzity či genetická záchrana je jen část pozitivních vlastností hybridizace (Arnold, 1997; Whiteley et al. 2015). Hybridizace také nabízí únik před parazity. Whitham (1989) uvádí příklad dvou druhů topolů, a to *Populus fremontii* a *Populus augustifolia*, kteří na řece Weber v Utahu vytváří hybridní zónu. Hybrid těchto dvou stromů má nižší vitalitu v porovnání s rodiči, a to se například projevuje i nižší rezistencí proti patogenům. Hybrid tedy slouží jako „sink“ pro parazity, kteří ho preferují více než rodičovské druhy, které jsou proto méně

zatíženy. Během hybridizace dochází k přeorganizování genomu v hybridních populacích, což vede nejen k lepším adaptabilním vlastnostem na prostředí, ale také k izolaci hybridů od rodičovských druhů (Wong et al. 2022). To znamená, že hybridizace má dvojí dopad na druh, a to v podobě adaptivní introgrese a hybridní speciace (Wong et al. 2022).

Adaptivní introgrese se vyskytuje, když jsou rodičovské populace málo reprodukčně izolované, což umožňuje rychlou ekologickou adaptaci (Anderson a Stebbins, 1954). Genetická rozmanitost je zvláště důležitá pro adaptaci na rychle se měnící podmínky prostředí, jako je globální změna klimatu. Nové genetické varianty mohou být do populace přeneseny introgresí, což může způsobit změny v ekologických vlastnostech (Burgarella et al. 2019). Adaptivní introgrese tak může přispět k lepší adaptaci na nové podmínky a urychlit evoluci a diverzifikaci druhů (Soltis a Rieseberg, 1986; Burgarella et al. 2019).

Introgrese například probíhá v hybridní zóně mezi *Fraxinus angustifolia* a *Fraxinus excelsior*, kde genetické varianty jsou přenášeny do *Fraxinus angustifolia*. To umožňuje druhu se lépe adaptovat na zimní podmínky a expandovat na sever (Gerard et al. 2006).

Hybridní speciace je proces, ve kterém hraje hybridizace klíčovou roli při vytváření reprodukčních bariér mezi hybridními liniemi a rodičovskými liniemi (Mallet, 2007). Existují dva hlavní mechanismy, které vedou k hybridní speciaci. Prvním z nich je speciace bez změny počtu chromozomů, známá jako homoploidní hybridní speciace. Druhým mechanismem je zdvojnásobení počtu chromozomů v hybridu oproti jeho rodičům, označované jako allopolyploidní hybridní speciace (Soltis a Soltis, 2009). Kombinace genetických informací z původních druhů v allopolyploidních hybridních jedincích pravděpodobně podporuje jejich adaptaci k novým prostředím a evoluční diverzifikaci (Soltis a Soltis, 2009). Významnou úlohu při vzniku druhů hraje allopolyploidní hybridní speciace u rodu *Dactylorhiza*, kde se můžeme setkat s velkou diverzitou allotetraploidních druhů (Brandrud et al., 2020)

5 Metody zkoumání hybridizace

Zájem o hybridizaci provází člověka už od dob, kdy započal se šlechtěním dobytka a hospodářských plodin (Zirkle, 1934). Vážnější zájem o hybridizaci přichází v 18. století, kdy Thomas Fairchild, který jako první experimentálním křížením mezi dvěma druhy hvozdíků získal hybrida (Zirke, 1934). Zásadním autorem na poli hybridizace byl Gregor Mendel, který ustanovil pravidla křížení mezi druhy a položil základy experimentálnímu křížení. Tato metoda je dodnes využívána ke studiu hybridizace. (např. Liebst and Schneller, 2005; Mötler et al., 2021). Experimentální křížení je metoda, kdy křížíme vybrané jedince mezi sebou a sledujeme vlastnosti jejich potomků. Příkladem experimentálního křížení nám může být studie od Matfield et al. (1970), který zkoumal hybridizaci u mochen (*Potentilla*).

Nejběžnější metodou určování hybridů je sledování jejich morfologie. Nicméně většina hybridů vykazuje spíše směsici znaků obou rodičů (Rieseberg, 1995; Hedrén 1996), což činí spolehlivé rozlišení mezi hybridy a rodičovskými druhy náročným. Proto je výhodnější využít molekulární metody.

Pro detekci hybridních procesů se stále častěji využívají vysoce citlivé molekulární markery. Například jaderné mikrosatelitní markery nám umožňují určit příbuznost mezi jedinci až po odvozování demografických parametrů (např. Balao et al. 2016). Molekulární metody nám umožnily odhalit jevy, které byly dříve přehlíženy, jako jsou třeba starobylé hybridizace (Grimm a Denk, 2008; Fehrer et al. 2009) nebo kryptické druhy (Bickford et al. 2007; Fišer et al. 2018).

5.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie, známá také jako FCM, je technika umožňující badatelům zkoumat optické vlastnosti jednotlivých buněk ve vzorku a umožňuje nám poměrně snadno určit velikost genomu u rostlin (Suda and Trávníček, 2006b). Mezi hlavní výhody této metody patří rychlost a přesnost měření, což umožňuje efektivní analýzu velkého množství vzorků za krátký čas (Doležel et al. 2007; Loureiro et al. 2010). Jedná se o kvantitativní metodu, která umožňuje určit množství DNA v jednotlivých jádrech rostlinné buňky, a to za pomoci fluorescenčního barviva (nejčastěji DAPI a PI), které je ozařováno laserem. Intenzita záblesků nám následně umožní vypočítat množství DNA v jádrech (Doležel et al. 2007). Podle množství DNA v jednotlivém jádře se pak dá za pomoci srovnání se standardem určit ploidie daného pletiva (dané rostliny) (Suda and Trávníček, 2006b). Pro měření genetické informace se používají specifické fluorescenční barvy, jako jsou DAPI a PI. Výhodou barviva propidium jodid je, že neselektivně vstupuje do dvoušroubovicové DNA a také se vkládá mezi ně (je interkalární). Na druhou stranu barvivo DAPI se váže na oblasti DNA, které obsahují větší množství A-T bází, což vede k tomu, že relativní velikost genomu je z principu menší než absolutní velikost genomu (Suda and Trávníček, 2006a).

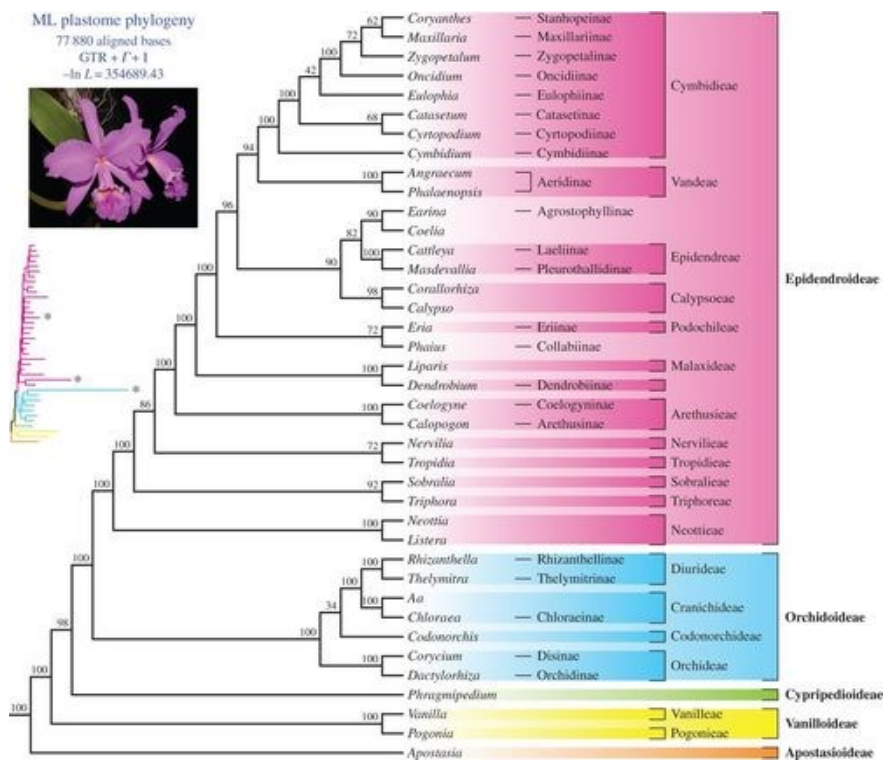
6 Hybridizace u čeledi *Orchidaceae*

Čeď *orchidaceae* je mimořádně bohatou skupinou rostlin, která reprezentuje až 8 % celkové diverzity krytosemenných rostlin (Chase et al. 2003, 2015; Givnish et al. 2015). Díky své variabilitě se orchideje dokáží přizpůsobit různým podmínkám, a to nejen morfologicky, ale také ekologií jednotlivých druhů, čímž jsou schopné obývat oblasti s nejrůznějším klimatem – od arktických oblastí až po tropické lesy (Benzing, 1986).

6.1 Evoluční historie čeledi *Orchidaceae*

Přesné datování divergence *Orchidaceae* od *Asparagaceae* zůstává dodnes neobjasněno. Načasování diverzifikace výrazně komplikuje podobnost listů orchidejí k jiným zástupcům řádu *asparagales*, které

se nedají využít k identifikaci a absence pylových zrn ve fosilním záznamu. Nepřítomnost *Orchidaceae* ve fosilních záznamech, vedlo řadu starších prací k závěru, že k divergenci *Orchidaceae* muselo dojít poměrně nedávno (např. Wolter and Schill, 1985). Globální rozšíření a fylogenetické studie naopak nahrávají mnohem staršímu druhohornímu původu této čeledi (např. Jansen a Bremer, 2004). Podle (Givnish, 2015), který ve své studii zkoumal příbuznost na základě plastidové DNA se zdá, že k oddělení společného předka *Orchidaceae* od ostatních členů řádu *Asparagales* došlo přibližně před 112 miliony let a dnešní recentní linie se oddělily zhruba před 90 miliony let. Givnish také popsal členění hlavních větví čeledi: *Vanilloideae* identifikoval jako nejbazálnější (od ostatních se oddělila už před 84 miliony let) a následovalo oddělení *Cypripedioideae* (77 milionů let) a *Orchidoideae* a *Epidendroideae* před 64 miliony let v období raného paleogenu (Givnish, 2015). Větvení korunní skupiny u rodu *Dactylorhiza*, pravděpodobně začalo již v období pozdního miocénu v období Messinské krize, nicméně se zdá, že rozdělení dvou hlavních skupin *D. fuchsii-macluta* a *D. incarnata-euxina* nastalo až na rozhraní miocénu a pliocénu. K největšímu dělení v těchto skupinách došlo zhruba na začátku spodního pleistocénu a pokračuje dál do současnosti (Brandrud, 2020).



Obrázek 1. Fylogenetický strom založený na ML analýze v 75 genech z plastidového genomu 39 druhů orchidejí znázorňující hlavní větve čeledi *Orchidaceae*, převzato: (Givnish, 2015).

6.2 Hybridizace v čeledi *Orchidaceae*

Podle studie Whitney et al. (2010), se v čeledi *Orchidaceae* nachází 6 % druhů s rizikem hybridizace na úrovni rodu, což z této čeledi činí pátou z hlediska hybridizace. Důvodem snadné hybridizace je nedostatek endospermu v semenech a také časté odvětvení nových druhů u kterých se ještě nevyvinula dostatečná genetická inkompatibilita (Scopece et al. 2008).

Orchideje jsou známy svými často slabými genetickými bariérami proti hybridizaci, zato mají často specifické opylovací systémy a vyskytují se na vysoce specifických stanovištích, které mohou fungovat, jako reprodukční izolační bariéry omezující hybridizaci mezi druhy (Dressler, 1981).

Příkladem nám mohou být klamavé orchideje s častým sdílením opylovačů s jinými druhy, což je dobrá příležitost pro mezidruhovou hybridizaci (Cozzolino a Widmer, 2005).

Většina orchidejí jsou vzácné druhy jejichž výskyt je často omezen na malé areály s prostorově izolovanými populacemi. Z pohledu diverzity orchidejí se jedná o pozitivní jev, protože izolované populace pravděpodobně podporují vznik nových druhů a vliv genetického toku z jiných populací je minimální (Tremblay et al. 2005) a do popředí významu se dostává selekce a genetický drift.

Příkladem nám může být rod *Vanilla*, kde sympatrická populace *V. claviculata* a *V. barbellata* hybridizovala a dala vzniknout hybridnímu potomkovi, který má intermediální morfologické znaky s rodiči (Nielsen a Siegismund, 1999).

Hybridizace může však znamenat pro rodičovské druhy i hrozbu, a to nejen rozkladem genetické celistvosti rodičovských druhů, ale také vynaložení reprodukční energie do těchto hybridů, což rodičovské druhy oslabuje (Arnold, 1997). Pokud hybridy nemají nižší zdatnost než rodičovské druhy, tak existuje riziko vytlačení jednoho či obou mateřských druhů. Výrazněji ovlivněny mohou být tímto procesem vzácné druhy, které mají díky malé populaci vyšší frekvenci mezidruhového opylení a rekombinace s hybridy (Levin et al. 1996; Rhymer a Simberloff, 1996).

Velmi zajímavým rodem s bohatým zastoupením mikroevolučních procesů je rod *Dactylorhiza* (Hedrén, 1996 a), kterým se budeme v této práci dále zabývat.

7 Rod *Dactylorhiza*

Rod *Dactylorhiza* Nevski patří k taxonomicky nejsložitějším skupinám čeledi *Orchidaceae* v Evropě spolu s rody *Ophrys* a *Epipactias* s velmi častým výskytem allotetraploidních druhů (Averyanov, 1990; Pedersen, 1998; Pillon et al., 2006). Jedná se o evolučně mladší skupinu, která se právě nachází na vrcholu svého rozvoje, což dokazují časté mikroevoluční mechanismy jako například časté polyploidizace, hybridizace a genové introgrese. Tyto mikroevoluční mechanismy vedly k retikulární evoluci a mnohonásobnému původu některých jejích druhů (Procházka 1983 a Velíšek; Hedrén 1996; Hedrén et al. 2001; Pillon et al. 2007; Nordström a Hedrén 2009; De hert 2012; Balao et al. 2016; Brandrud et al. 2020). Rod *Dactylorhiza* je definován buď jako diploidní ($2n = 40$) nebo tetraploidní ($2n = 80$). Vysoká morfologická variabilita, fenotypová plasticita a epigenetické změny v rodu komplikovaly fylogenetickou rekonstrukci a taxonomii v rámci této skupiny (Paun et al. 2010).

Všechny druhy rodu *Dactylorhiza* mají vzhled vytrvalých bylin s nevětveným vzpřímeným stonkem, spirálovitým uspořádáním listů a termínovaným klasnatým květenstvím (Averyanov, 1990). Podobají

se hlízotvorným geofytům. Evoluční morfologie a vývoj hlízy souvisí se sezonalitou prostředí, kdy rostlina k zajištění přežití potřebuje dostatek energie pro růst a vývoj v následujícím roce (Dressler, 1981). Centrální část stonku je u mladých rostlin vyplněna parenchymem, který během dalšího vývoje rostliny vymizí a je nahrazen dutinou. Vzhled a velikost této dutiny během ontogeneze je pro rod důležitým systematickým znakem (Borsos, 1980). Předci rodu *Dactylorhiza* měli velké množství velkých široce oválných listů a tento nálezný znak nadále trvá také u vývojově starších zástupců tohoto rodu. Mladší druhy přešly k úzce kopinatým a lineárním listům (Averyanov, 1990). Z paždí listenů vyrůstají dosti velké květy, které se skládají do různě hustých klasů. Boční okvětní lístky vnějšího kruhu odstávají a prostřední je spolu s párovými vnitřními skloněn v neúplnou přílbu. Ostruhatý pysk bývá nejčastěji trojlaločný, plochý nebo podélně uložený. Dozadu vybíhá v rovnou nebo poněkud dolů skloněnou, nejčastěji kuželovitou ostruhu, jež je kratší než pysk a také kratší než přisedlý, resupinací zkroucený semeník. Terčíky stopkatých brylek jsou uloženy v jedné, avšak dvoudílné burzikule (Procházka a Velíšek, 1983).

Rod *Dactylorhiza* je primárně boreální a temperátní rod, který je převážně rozšířen v Euroasii, ale své zástupce má také v Severní Americe a v horách severní Afriky (Averyanov 1990; Delforge 1995; Delforge a Harrap, 2006; Pillon et al. 2007). Druhy rodu *Dactylorhiza* obývají různá stanoviště s odlišnými půdními podmínkami, včetně kyselých rašelinišť, vlhkých zásaditých trávníků, suchých luk a lesů ((Delforge a Harrap, 2006; Pillon et al., 2007). Během období glacialu se zástupci tohoto rodu stahovali do refugii z kterých následně znovu kolonizovali území, z kterého původně ustoupili (Hedrén, 2009; Naczka a Kolanowska, 2015; Nordström a Hedrén, 2009; Stahlberg a Hedrén, 2010).

Rod *Dactylorhiza* je znám klamavými strategiemi, při nichž je ošálen čmelák a dochází k opylení. Tento jev podporuje mezidruhové křížové opylení a velkou diverzitu hybridů, což je posíleno také skrz velmi slabé prezygotické bariéry rodu *Dactylorhiza* (Aagaard et al. 2005; Cozzolino a Widmer, 2005; Hedrén et al. 2018; Nordström a Hedrén, 2009). Allotetraploidní druhy, které prošli rekombinací genomu jsou schopné koexistovat na jedné lokalitě i přes rozdílné ekologické nároky (Paun et al. 2011).

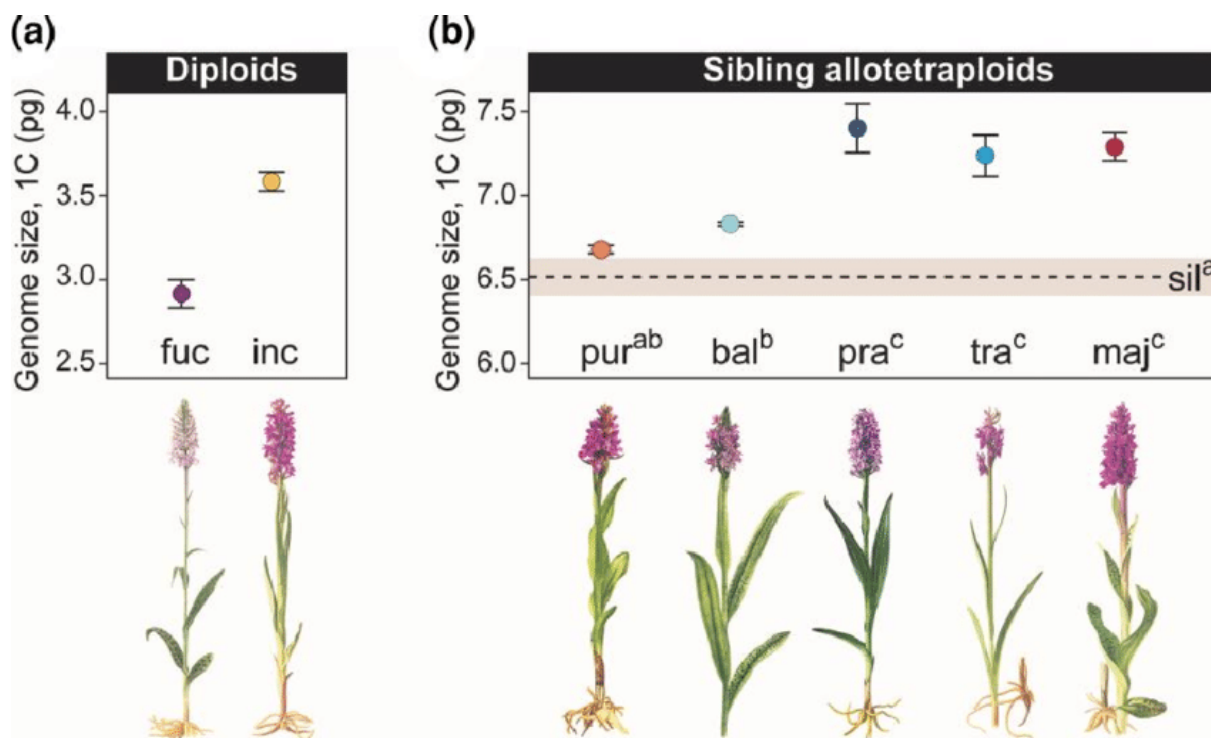
Hybridizace mezi druhy s různými úrovněmi ploidie je častým úkazem v rodě *Dactylorhiza* (Aagaard et al. 2005; Heslop-Harrison, 1957, 1953; Lord a Richards, 1977; Pillon et al. 2007; Shipunov et al. 2004; Stahlberg a Hedrén, 2009). Hybridizace a introgrese mezi diploidními druhy a allopolyploidy pravděpodobně vedla ke genetické variabilitě, kterou můžeme pozorovat u tetraploidních druhů (Hedrén, 2003).

Genomická práce zabývající se analýzou RAD-seg, provedená napříč orchideovým rodem *Dactylorhiza* ukázala opakovanou, jednosměrnou a nezávislou allopolyploidizaci zahrnující dva rodičovské druhy (Brandrud et al. 2020). Výsledné křížení rodičovských druhů vedlo ke vzniku

allotetraploidů, kteří se značně liší od svých rodičů ekologickými nároky a k morfologickými změnami (Hedrén 1996; Pillon et al. 2007; Hedrén et al. 2011; Paun et al., 2011; Wolfe et al. 2023).

Pro tuto práci je důležité pochopení vztahů mezi jednotlivými skupinami. Podle přelomové studie Brandrud et al. (2020), jež použila metodu heatmap, byla příbuznost 14 allotetraploidních druhů rozdělena do 6 skupin:

- (i) První skupina je reprezentována *Dactylorhiza fuchsii* a *D. incarnata* (nebo jejími předky), které spolu vytvářeli allotetraploidní druhy, které mají střed svého areálu ve střední a severozápadní Evropě. *Dactylorhiza fuchsii* představuje pro tyto druhy rodiče z mateřské strany. Skupina zahrnuje *D. baltica* (včetně *D. ruthei*), *D. elatior*, *D. majalis*, *D. praetermissa*, *D. purpurella* a *D. traunsteineri*.
- (ii) Druhá skupina pochází z hybridizačních událostí mezi *Dactylorhiza maculata* a *D. incarnata* (nebo její rodičovské druhy). Při tvorbě allotetraploidních druhů představuje *Dactylorhiza maculata* vždy mateřský druh. Jejich hybridizací byl dán vznik dvěma severozápadoevropským allotetraploidním druhům – *D. sphagnicola* (včetně druhu *D. calcifugiens*) a *D. kerryensis* a nejspíš také středoevropskému a severozápadoevropskému taxonu *D. elata*.
- (iii) Třetí skupina je reprezentována druhy *Dactylorhiza saccifera* a *D. incarnata* (nebo jejími předky), přičemž *D. saccifera* představuje v tomto vztahu rodiče z matčiny strany. Tyto dva rodičovské druhy daly vzniknout jihovýchodoevropským druhům *D. cordigera* a *D. kalopissii* (včetně *D. macedonica*).
- (iv) Čtvrtá skupina je reprezentována druhy *Dactylorhiza saccifera*, kteří se účastnila hybridizační události s *D. umbrosa* a dala vzniku *D. pythagorae*, který má endemický výskyt na ostrově Samos.
- (v) Čtvrtá skupina zahrnuje druh *Dactylorhiza armeniaca*, což je horský druh, který je endemický ve v malé oblasti východního Turecka. Rodiči druhu jsou *Dactylorhiza euxina* a *D. umbrosa* (nebo její předci), přičemž *D. umbrosa* představuje pro *D. armeniaca* mateřský druh.
- (vi) Konečně *D. urvilleana*, s rozšířením od severního Turecka po severní Írán, je výsledkem hybridizace *D. euxina* a *D. saccifera*, přičemž *D. saccifera* je mateřským rodičem.



Obrázek 2. Velikost genomů zaznamenaná jak u diploidních druhů (*D. fuchsii* a *D. incarnata*) tak alotetraploidů (*D. majalis*, *D. praetermissa*, *D. baltica* a *D. traunsteineri*). Práce ukázala výrazné rozdíly ve velikosti genomů mezi jednotlivými alotetraploidy. Osa X znázorňuje odhad relativního věku hybridů podle práce Brandrud et al. (2020), přičemž věk *D. purpurella* se odhaduje na přibližně 530 generací a *D. majalis* přibližně na 104 000 generací – maximální odhady pocházejí z práce (Hawranek 2021). Autor využil ilustrace rostlin od Nelsona (1976). Převzato: (Eriksson et al. 2022).

8 Hybridizace u rodu *Dactylorhiza*

Podle míry příbuznosti křížících se jedinců rozeznáváme několik stupňů hybridizace. Prvním stupněm je takzvaná vnitrodruhová (intraspecifická) hybridizace, kdy dochází v rámci jednoho druhu ke křížení jedinců s různými morfologickými znaky (Hedén, 1996; De Hert et al. 2011). Příkladem může být křížení mezi žlutě a červeně kvetoucími rostlinami prstnatce bezového (*Dactylorhiza sambucina*). Druhým stupněm je takzvaná mezidruhová (intragenetická) hybridizace, kdy dochází ke křížení dvou jedinců různých druhů, avšak ze stejného rodu (Hedén, 2001; De Hert et al. 2012). Příkladem nám může být *Dactylorhiza x archersoniana* (hausskn.) Borsos a Soó (Margenburg, 2016) Třetím a nejvzácnějším stupněm křížení je mezirodová (intergenerická) hybridizace, kdy dochází ke křížení jedinců patřící do jednoho rodu.

Problematika hybridizace je ale ještě složitější. Jsou známé i případy, kdy dochází k vícenásobné hybridizaci, to znamená, že na křížení se podílejí více než dva rodičovské taxony, dále jsou to případy,

kdy dochází ke zpětnému křížení s jedním z rodičovských taxonů (Hedrén, 1996a). V některých případech pak může docházet až k vzniku hybridního roje, kde se lze setkat s tím, že znaky obou jednotlivých rostlin, jsou rozprostřeny v plynulé škále od těch, které se více podobají jednomu rodičovskému taxonu, přes rostliny jasně intermediární, až po ty, jenž se více podobají druhému z rodičů. Typ hybridizace, při kterém vznikají rozsáhlé hybridogenní populace, se nazývá introgrese (Průša a Šedivý, 2022).

Kříženci mají většinou intermediální charakter, a to jak po stránce morfologické, tak fenologické. Neplatí to ale obecně a ve všech případech. Některé znaky mohou mít někdy dominantní charakter a mohou zcela převládnout. Důležitou vlastností kříženců je jejich schopnost dalšího rozmnožování. Někteří z nich jsou sterilní a dalšího rozmnožování nejsou schopní. Někteří však tuto schopnost mají mezi sebou navzájem, anebo se zpětně křížít s některým z rodičů (Průša a Šedivý, 2022).

S kříženci v rodě *Dactylorhiza* se tedy lze setkat všude tam, kde na jednom místě nebo alespoň v těsné blízkosti roste více druhů. Někteří jsou dokonce velmi hojní (např. *Dactylorhiza x aschersoniana* (hausskn.) Borsos a Soó (*D. incarnata* x *D. majalis*), jiní jsou vzácnější (např. *Dactylorhiza x ruppertii* (Schulze) Borsos a Soó (*D. majalis* x *D. sambucina*) a někteří z nich jsou zcela raritní a výjimečně nalezeni jednou za mnoho desítek let (Průša a Šedivý, 2022). Proč jsou někteří kříženci vzácnější a jiní častější, je dáno mírou příbuznosti rodičovských druhů, tím, zda jsou rodičovské taxony hojné, nebo vzácné, blízkostí jejich výskytu na lokalitě, stejnou nebo různou dobu kvetení nebo vazbou na stejného, nebo různého hmyzího opylovače (Průša a Šedivý, 2022).

Za vhodných okolností může někdy dojít k tomu, že dva nebo více taxonů, které se spolu navzájem ochotně kříží, vytvoří bohaté, plodné a životaschopné populace kříženců, které se v průběhu času mohou dále ustálit nebo u nich může dojít k dalším genetickým změnám a vznikne tak nový druh nebo poddruh (Průša a Šedivý, 2022).

9 Allopolyploidní evoluce u rodu *Dactylorhiza*

Polyploidizace je běžným jevem v rodě *Dactylorhiza* (Balao et al. 2016; Brandrud et al. 2020; Devos et al. 2006; Hedrén, 2001, 1996; Jacquemyn et al. 2016; Paun et al. 2010; Pillon et al. 2007; Stahlberg a Hedrén, 2010; Wolfe et al. 2023) a je často důsledkem hybridizační události, která vede k zdvojení genomu a vytvoření nového druhu (Pillon et al. 2007). K allopolyploidizačním událostem došlo v průběhu času nesčetněkrát, a to nejen mezi diploidními rodiči a allotetraploidními potomky, ale také mezi allotetraploidy navzájem (Brandrud et al. 2020; Eriksson et al. 2022; Hawranek, 2021.; Hedrén, 2003; Hedrén et al. 2008; Wolfe et al. 2023). Podle Hedréna (2001), je hlavní hybnou evoluční silou v tomto rodu allotetraploidizace a dominuje dokonce nad introgresí.

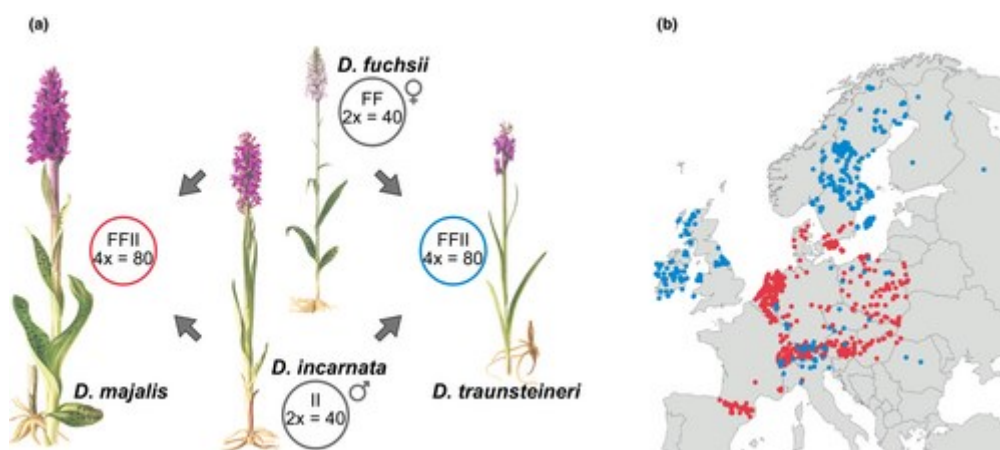
Většina studií zaměřené na proces alopyploidizace se zaměřovala na mladé polyploidní komplexy (např. Soltis et al. 2014) či na allopolyploidní komplexy, které prodělaly vývoj i v řádu milionů let

(např. Chase et al. 2003). *Dactylorhiza* je naopak středně starý allopolyploidní komplex, a proto je studie Brandrud et al. (2020) zajímavá. Díky tomu, že víme že oddělení hlavních diploidních skupin došlo přibližně před 5,5 miliony let, tak s určitostí můžeme říct, že žádný alotetraploidní druh rodu *Dactylorhiza* nemůže být starší (Brandrud et al. 2020).

Vysoká genetická diverzita a přítomnost alel, které se nevyskytují u rodičovských druhů dokazuje, že mezi nezávisle odvozenými allopolyploidy docházelo opakovaně k hybridizačním událostem (Brandrud et al. 2020). Příkladem může být *D. majalis*, který má plastidové genomy *D. maculata* i *D. fuchsii*, ale také jiné geny, které nebyly dosud nalezeny u žádného jedince z rodičovských druhů (Nordström a Hedrén 2009). *Dactylorhiza majalis* a *traunsteineri* sdílejí podobné markery, pravděpodobně související s genetickým tokem mezi těmito druhy (Balao et al. 2016).

Genový tok mezi jednotlivými druhy může také představovat problém. De Hert et al. (2012) například zaznamenal, že na lokalitě, na níž se nacházely zprvu tři druhy *Dactylorhiza* včetně jejich hybridů, došlo po určité době k vymizení jednoho z nich - *D. praetermissa*. Přestože nebyl specifikován důvod vymizení tohoto druhu, výsledky naznačují, že hybridizace představuje ohrožení pro rodičovské druhy, zvláště pro ty, které jsou vzácné.

V rodě *Dactylorhiza* se také setkáváme s hybridními zónami. Například na Britských ostrovech se nachází hybridní zóna mezi *D. praetermissa*, která se vyskytuje primárně na jihu a *D. purpurella*, která je soustředěna na severní část souostroví. V oblasti Walsu ve střední Británii se areály těchto druhů prolínají a na místech styku vzniká vzácný hybrid *Dactylorhiza* × *salteri* (Lewis, 2021). Díky postupu *D. praetermissa* na sever můžeme v budoucnu předpokládat častější výskyt těchto hybridních rostlin (Bateman et al. 2023).



Obrázek 3. Allotetraploidní druhy *Dactylorhiza majalis* a *Dactylorhiza traunsteineri* a jejich rozšíření v Evropě – červené tečky reprezentují lokality *D. majalis* a modré tečky zas lokality *D. traunsteineri*. Bubliny nám ukazují chromozomovou sadu každého druhu uvedeného na obrázku. Převzato (Wolfe et al. 2023).

10 Komplex *Dactylorhiza majalis*

10.1 *Dactylorhiza majalis* sensu stricto

Druh se vyskytuje na většině území Evropy. Jižní hranice probíhá severním Španělskem, Severní Itálií, Dalmácií a Rumunskem. Severní hranice areálu je vymezena jižním Norskem a Švédskem (Baumann et al. 2009). Východní hranice druhu se nachází ve střední Evropě a absentuje v severovýchodní a východní Evropě, kde je nahrazen *Dactylorhizou baltica* (Procházka a Velísek, 1983).

Druh *Dactylorhiza majalis* je nejčastěji se vyskytujícím se zástupcem rodu *Dactylorhiza* na našem území. Důvodem, proč je tento druh tak úspěšný, souvisí s jeho adaptabilitou na různé typy prostředí. Jedná se o velmi flexibilní druh (Wotavová et al. 2004). Vyskytuje se jak na obhospodařovaných vlhčích loukách, tak i na slatinách, mokřích pastvinách, vřesovištích a na horských vrchovištích (Procházka a Velísek, 1983, Wotavová et al. 2004). Druh *Dactylorhiza majalis* na rozdíl od *Dactylorhiza traunsteineri* zvládá lépe kompetici, a proto ho najdeme i v bohatých lučních společenstvech (Paun et al. 2010). Populace druhu se nacházejí na půdách s různým minerálním zastoupením a snáší vyšší zastoupení dusíku v půdě než jiné druhy, což by mohlo vysvětlovat široké rozšíření tohoto druhu v Evropě (Wolfe et al. 2023). Další výhodou, kterou má *D. majalis* nad svými příbuznými je vyšší tolerance k sušším stanovištím, a tak se dokáže vyskytovat ve více biotopech než ostatní druhy (Wolfe et al. 2023).

Jedná se o robustní, 20–40 centimetrů vysokou rostlinu s dutým stonkem a prstovitě tvarovanými hlízami. Rostliny mají obvykle 4-10 tmavozelených listů, které jsou posety hnědopurpurovými skvrnami. Listy v dolní části lodyhy jsou podlouhlé, vejčité až kopinaté na koncích listů zašpičatělé. Výš na lodyze jsou jen malé a listenovité. Květenství je husté na hoře tupé a může obsahovat až 50 květů. Skládá se z větších květů, které mají růžovou až nachovou barvu a vyrůstají z paždí bylinných, vejčité kopinatých, zelených nebo fialově naběhlých listenů. Obvykle skvrnitě vejčité kopinaté okvětní lístky skládají neúplnou přílbu. Pysk má temně nachovou kresbu, je na bázi světlejší, trojlaločný a často dolu složený s tupým prostředním lalokem. Ostruha je válcovitého až kuželovitého tvaru a je skoro stejně dlouhá jako semeník (Procházka a Velísek, 1983; Delforge a Harrap, 2006).

V České republice je vývoj výskytu tohoto druhu nepříznivý a ustupuje z mnoha lokalit z důvodů meliorace a změny peče o krajinu, zarůstání krajiny, přehnojování krajiny a opouštění pastvy v podhorské krajině (Janečková et al. 2006).

Dactylorhiza majalis má velmi komplikovaný evoluční vývoj, během něhož se druh vyvinul mnohačetnými a nezávislými hybridizačními událostmi mezi dvěma široce definovanými mateřskými liniemi: *D. incarnata*, která je považována za otcovskou linii a *Dactylorhiza maculata*, která je považována za linii mateřskou (Hedrén, 1996 a, Pillon et al. 2007). Složitý vývoj tohoto druhu je pravděpodobně zapříčiněn glaciálními a interglaciálními událostmi, kdy byl druh nucen migrovat a

v průběhu vývoje došlo k řadě polyploidizačních událostí, které druh dále modelovaly (Hedrén, 1996, Hedrén, 2003; Pillon et al. 2007; Nordström a Hedrén, 2008). Tento fakt je podpořen i prací Balao et al. (2016), kde nejvyšší vnitrodruhová diverzita *D. majalis* byla zaznamenána v oblastech Pyrenejí a Alp, což nasvědčuje, že evropská pohoří hrála důležitou úlohu ve vývoji druhu (Nordström a Hedrén, 2008). Naopak nejnižší diverzita byla zaznamenána u skandinávských populací, což je následek recentní rekolonizace této oblasti (Hewitt, 1999; Nordström a Hedrén, 2008). Na základě alel, typických pro jednotlivé allopolyploidní druhy, odvodil Bradrud et al. (2020) jejich relativní stáří. O rok později Hawranek (2021) tyto odhady potvrdil na základě koalescentních metod. Věk určený pro *D. majalis* Hawranek (2021) stanovila na cca. 104 000 generací, což odpovídá názoru, že *D. majalis* je



Obrázek 4 *Dactylorhiza majalis*, převzato: Jozef Dohnal



Obrázek 5 *Dactylorhiza majalis*, převzato: Barbora Werchan

10.2 Mezirodová hybridizace s účastí *Dactylorhiza majalis*

10.2.1 *Dactylorhiza* × *aschersoniana*

Jedná se hybridní druh vzniklý hybridizací mezi *Dactylorhiza majalis* a *Dactylorhiza incarnata*. Jedinci, kteří jsou geneticky blíže *D. majalis* se vyznačují větší skvrnitostí svých listů, pyskem slabě vykrojeným a květy jsou intenzivněji barevnější s výraznější kresbou než u jedinců, kteří jsou geneticky blíže *D. incarnata*. Naproti tomu rostliny, které jsou geneticky blíže *D. incarnata* se vyznačují užšími, delšími a vzprámenějšími listy, které jsou zakončeny zahnutou „čepicovitou“ špičkou. Květy jsou menší s méně výraznou kresbou (Vlčko et al. 2000).

Druh se vyskytuje v hybridních rojích. Příkladem takového hybridního roje je lokalita v okrese Unna v Bádensku-Württembersku, kde je lokalita sledována od roku 1996 (Margenburger, 2016). V této populaci se nacházejí jedinci s intermediálními znaky obou rodičů, ale mateřské rostliny již zde nebyly zaznamenány. Důvodem je silná vitalita hybridů, kteří se vyznačují vysokou násadou plodů (sledována zvýšená násada plodů mezi roky 2004 a 2006 ze 76% na 94%) a vysokou plodností, což ukazuje, že hybridi dokáží rychle kolonizovat nové stanoviště (Margenburger, 2016).

V posledních letech byly v této populaci zaznamenány rostliny se skvrnitými listy, což nasvědčuje introgresi *D. majalis* do populace, a to i přes to, že v okolí lokality žádní jedinci druhu *D. majalis* nebyli zaznamenáni (Margenburger, 2016).

10.2.2 *Dactylorhiza* × *braunii*

Jedná se o hybridní druh mezi *Dactylorhiza fuchsii* a *Dactylorhiza majalis*, který je velmi často variabilní ve své morfologii (Procházka, 1980). Patří mezi běžné hybridogenní druhy. Vyskytuje se na lokalitách, kde se nacházejí oba jeho rodiče. Kvete v období, kdy *D. majalis* dokvétá a *D. fuchsii* začíná kvést (Bernacki, 2016, Procházka, 1980).

Vzhledově se jedná se o rostlinu mohutnější stavby. Výška hybridních rostlin je vyšší než *D. majalis* a lodyha a listeny jsou širší než u *D. fuchsii*. Hybrid má husté a bohaté květenství s purpurovými či růžovými květy. Pysk je velký a málo členitý. Ostruha je dlouhá, široká až pytlovitá (Bernacki, 2016).

10.2.3 *Dactylorhiza* × *dinglensis*

Jedná se o hybrida mezi *Dactylorhiza maculata* a *Dactylorhiza majalis*. Podle Horsmana (1991) se v Anglii vyskytují dva poddruhy tohoto druhu. Jedná se o *D* × *dinglensis* nothosubsp. *dinglensis* jehož rodiče jsou *D. majalis* subsp. *occidentalis* a *D. maculata* subsp. *ericetorum*. Druhým poddruhem je *D* × *dinglensis* nothosubsp. *robertsii* jehož rodiče jsou *D. majalis* subsp. *cambrensis* a *D. maculata* subsp. *ericetorum*. Jednotlivé poddruhy se liší v délce a šířce listů a ostruha je u hybrida nápadně širší než u jeho rodičů.

Podle posledních poznatků se *D. majalis* na Britských ostrovech nevyskytuje a ve skutečnosti tedy dochází k hybridizaci *D. maculata* s *D. kerryensis*. Proto by měli být populace hybridů rodu *Dactylorhiza* na Britských ostrovech řazena pod druh *D × vermeuleniana* (Verloove, 2023).

10.2.4 *Dactylorhiza × duffiana*

Hybridní druh vzniklý hybridizací mezi allotetraploidními druhy *Dactylorhiza majalis* a *Dactylorhiza traunsteineri*. V místě výskytu obou mateřských taxonů velmi často dochází k introgresi, což ztěžuje taxonomické zařazení těchto populací. Rostliny, které se dají řadit k těmto hybridogennímu druhu se vyskytují v rezervaci *U Zvůle* na jihu Čech, ale o zařazení této populace k *D × duffiana* panují pochyby (Procházka, 1980, Průša a Šedivý, 2022).

10.2.5 *Dactylorhiza × ruppertii*

Jedná se o hybridní druh mezi *Dactylorhiza majalis* a *Dactylorhiza sambucina*. Skvrnitost listů je u tohoto hybrida silně potlačena. Tvar okvětních lístků a pysku jsou lalokovité. Příbuznost k *D. sambucina* naznačují některé morfologické znaky jako velká vakovitá ostruha s délkou rovnající se délce vaječníku, velké široké hypofýzy nafialovělé barvy, stejně jako květenství a horní část stonku. Avšak vaječník je jen o 20% kratší než u *D. sambucina* a přibližně o 40% delší než u *D. majalis* (Angelescu et al. 2023; Bernacki, 2016). I přes tyto znaky jsou znaky hybridogenního druhu podobné svým rodičům, což ztěžuje jeho správné určení (Procházka, 1980).

Z tohoto důvodu je podstatné, že období květu hybrida se nachází po odkvětu *D. sambucina* a *D. majalis* teprve v té době nakvétá (Bernacki, 2016).

11 Komplex *Dactylorhiza traunsteineri*

11.1 *Dactylorhiza traunsteineri* sensu stricto

Dactylorhiza traunsteineri je velmi vzácný druh orchideje. Rozšíření tohoto druhu je velmi fragmentované. Vyskytuje se v Alpách, odkud tento druh byl popsán a dále v několika dalších střeoevropských pohoří. Pak se již vyskytuje v širokém areálu v severní Evropě a středovýchodní Evropě, od Britských ostrovů přes Fenoskandinávský – Baltický region až po západní stranu pohoří Ural s izolovanými lokalitami na jižní Sibiři (Procházka, 1983; Delforge a Harrap, 2006; Nordström a Hedrén, 2009; Kirillova et al. 2023).

Z hlediska lokality výskytu se tento druh typicky vyskytuje na přechodových rašeliništích v pahorkatinách a nižších polohách horského stupně na severněji položených lokalitách se druh vyskytuje na slatiništích s nepřetržitým přítokem podzemní vody, což naznačuje, že se jedná o velmi vlhkomilný druh (Procházka a Velísek, 1983; Delforge a Harrap, 2006; ; Nordström a Hedrén, 2009). Na rozdíl od *D. majalis* je *D. traunsteineri* schopna růst v bazičtějších prostředí (Wolfe et al. 2023).

Dactylorhiza traunsteineri má silnou preferenci na stanoviště, která jsou ochuzená o makro-mikronutrienty, a to hlavně úrovní dostupnosti dusičnanů (NO₃), ale také fosforu (P) a draslíku (K). Jinými slovy, *D. traunsteineri* upřednostňuje extrémní prostředí, s nízkou úrovní konkurence, neb se jedná o nekonkurenceschopný druh, který prospívá v řídké vegetaci jako například rosnatky (Paun et al. 2010a; Wolfe et al. 2023).

Nízký obsah živin v půdě, hlavně dusičnanů, dále vysvětluje u *D. traunsteineri* i pozorované nízké hodnoty chlorofylu v listech, protože dusík je základní pro tvorbu chlorofylu (Wu et al. 2006). Wolf et al. (2023) uvedl, že *D. traunsteineri* kompenzuje nižší hladinu chlorofylu v listech vyšší expresí světlosběrných proteinů, což vede k vyššímu lineárnímu toku elektronů a nefotochemickému zhášení excitovaných elektronů. To znamená, že *D. traunsteineri* vyžaduje robustnější fotoprotektivní strategii k regulaci své fotosyntetické aktivity. Tuto strategii volí pravděpodobně kvůli omezenému množství chlorofylu, což samo o sobě svědčí o nedostatku dusičnanů a dalších živin na těchto místech výskytu (Demmig-Adams a Adams III, 2006).

Jedná se o 20-40 centimetrů vysokou rostlinu se štíhlou chabou lodyhou a s dvěma hluboce dělenými hlízami. Většinou jedinci mají 2, vzácněji 3, úzké listy se slabou pigmentací. Skvrny na listech se mohou vyskytovat na celých listech, přičemž skvrny spolu nesplývají. Květenství je řídké a je složeno z velkých nachových květů kvetoucích od července do srpna. Boční kalištní lístky jsou kopinaté, skvrnitě a stočené nahoru, kdežto horní kalištní lístky jsou stočené dolů a spolu s velkými okvětními lístky tvoří těsnou kapuci. Pysk je vejčitý se 3 laloky. Báze a střed pysku jsou světlé, přičemž pysk je pokryt výraznými červeno-fialovými až purpurovými pruhy a skvrnami (Procházka a Velisek, 1983; Delforge a Harrap, 2006; Baumann et al. 2009, Blinova a Uotila, 2012).

Druh *Dactylorhiza traunsteineri* vznikl nezávislou, ale jednosměrnou allopolyploidizací mezi *D. fuchsii* a *D. incarnata*, kdy *D. incarnata* reprezentuje „otce“ a *D. fuchsii* je mateřský druh, který poskytl semeno (Balao et al. 2016; Brandrud et al. 2020; Hedrén et al. 2008; Pillon et al. 2007; Wolfe et al. 2023). Hybridizace mezi dalšími allotetraploidními druhy s *D. traunsteineri* byla zaznamenána. Genetický tok byl zaznamenán například s *D. majalis* v Alpách (Balao et al. 2016; Brandrud et al. 2020). Hawranek (2021) určil stáří druhu na 74000 generací, což z *D. traunsteineri* což z něj činí mladší druh než *D. majalis*, ale genom druhu je heterogennější (Balao et al. 2016, Brandrud et al. 2020).



© K. Lauber - Flora Helvetica - Haupt Verlag

Obrázek 6 *Dactylorhiza traunsteineri*,
převzato: Konrad Lauber



© Jiří Plekanec

Obrázek 7 chudé květenství typické pro
Dactylorhiza traunsteineri, převzato: Jiří
Plekanec

11.2 Mezirodová hybridizace s účastí *Dactylorhiza traunsteineri*

11.2.1 *Dactylorhiza* × *silvae* – *gabretae*

Jedná se o hybridní druh mezi *Dactylorhiza traunsteineri* a *Dactylorhiza Fuchsii*, který je známý ze Šumavy, kde byl poprvé popsán. Následně byl nalezen i v Bavorském lese. Druh je reprezentován 2 známými lokalitami (Procházka a Čurn, 1999). Druh má intermediální znaky obou rodičů.

Druh čelí silnému introgresivnímu tlaku od *D. majalis* subs. *comosa*, kvůli čemuž jsou čistí hybridi vzácní (Procházka a Čurn, 1999).

11.2.2 *Dactylorhiza* × *thellungiana*

Jedná se o hybrid mezi *Dactylorhiza traunsteineri* a *Dactylorhiza incarnata*. Druh roste na podmáčených lokalitách, často v rašeliništích. Jedná se o drobnou rostlinu s výškou okolo 15-20 centimetrů. Stonek je masivní s 3 až 4 skvrnitými listy, které jsou silně kýlovité a mírně prohnuté ven. Květy jsou poměrně velké, výrazně purpurově červené s cylindrickými ostruhami, které je stejně dlouhé jako jejich semeníky (Claessens a Kleynen, 1990).

Druh sdílí některé charakteristiky svých rodičů, jako například čepcovité špičky listů, dutý stonek a malé květy, které jsou znaky *D. traunsteineri*. Naopak oslabená skvrnitost listů, kloubovitě stažení špiček listů a květy se světlejšími pysky ukazují na příbuznost k *D. incarnata* (Claessens a Kleynen, 1990).

11.2.3 *Dactylorhiza* × *jenensis*

Jedná se o hybridní druh mezi *Dactylorhiza traunsteineri* a *Dactylorhiza maculata*. Druh má intermediální znaky obou rodičů. Rostlina je velká a štíhlá s fialově zbarvenou lodyhou, což je znak typický pro *D. traunsteineri*. Dále se rostlina vyznačuje vzpřímenými listy, které jsou přimknuté ke stonku, květy jsou světleji zbarvené a rostliny se vyznačují hustším květenstvím, což je typický znak pro *D. maculata*. Hybrid se vyskytuje na stanovištích, která jsou na hranicích ekologických nároků obou rodičů (Claessens a Kleynen, 1990).

12 *Dactylorhiza praetermissa*

Tento druh se vyskytuje v širokém areálu západní Evropy. Byla zaznamenána ve Spojeném království, severozápadní Francii, Belgii, Nizozemí v severním Německu a Dánsku (Baumann et al. 2009).

V současnosti druh zažívá expanzi na Britských ostrovech a jeho rozšíření se posouvá směrem na severozápad, kde se populace uchytila v severní Anglii a lze předpokládat její další postup na sever do Skotska (Bateman et al. 2023).

Jedná se o statnou rostlinu, která měří 30-70 centimetrů na výšku s dutou lodyhou. Rostliny mají mezi pěti až devíti listy, které jsou široce kopinaté, neskvřnité, ztuha vzpřímené a kýlnaté. Květenství je husté, kónické až cylindrické, obsahující 20 až 60 květů, které jsou růžové nebo až karmínově růžové barvy. Kališní lístky jsou prodloužené a někdy skvrnité. Okvětní lístky tvoří přílbu. Pysk je slabě srdčitý a téměř neznatelně laločnatý. Báze a centrální část pysku je světlá a je pokryta výraznými růžovými skvrnami, které jsou orientované do podoby vějíře (Baumann et al. 2009; Delforge a Harrap, 2006).

Otcovským druhem pro *Dactylorhiza praetermissa* je *Dactylorhiza incarnata*. Přestože se oba druhy vyskytují ve stejné oblasti, obvykle se na společných lokalitách nevyskytují, a to z důvodů odlišné preference mikrobiotopů. *D. incarnata* preferuje co nejvlhčí místa, kdežto *D. praetermissa* se vyskytuje i na místech, která jsou i sušší (De Hert et al. 2011). Genetická variabilita je u *D. praetermissa* vyšší než u otcovské *D. incarnata*. Sama však *D. praetermissa* disponuje poměrně nízkou genetickou variabilitou, což může souviset s historickým efektem úzkého hrdla (De Hert et al. 2011).

Podle studií musela mít *D. praetermissa* nanejvýše 74 000 generací (Brandrud et al. 2020; Hawranek 2021), což z *D. praetermissa* činí středně starý allotetraploidní druh, jehož stáří je však mladší než *D. majalis*.

De Hert et al. (2012) ve své práci zkoumal sílu reprodukčních bariér mezi diploidními *D. incarnata*, *D. fuchsii* a allotetraploidním druhem *D. praetermissima*. Plodnost mezi rodičovskými druhy a hybridy nebyla rozdílná, ale životaschopnost semen byla u čistých druhů vyšší než u hybridů.

13 *Dactylorhiza baltica*

Rozšíření tohoto druhu je problematické. Jeho západní hranice je jasně vymezena východním Německem, severním a východním Polskem, Pobaltskými státy a jižním Finskem (Shipunov et al. 2005). Východní hranice areálu je nejasná, ale mnozí autoři přikládají druhu rozsáhlý areál, který se v evropské části Ruska táhne od arktického kruhu až k padesáté rovnoběžce, přičemž východní hranice je vymezena pohořím Ural (Soó, 1980; Averyanov, 1990).

Rostlina dosahuje výšky 25–40(–70) cm. Stonek je až 1 cm tlustý a přímý. Má 4 až 6 listů (někdy 9), které jsou obvykle podlouhle až kopinatě tvarované, vzpřímené a často hustě skvrnitě velkými kulatými skvrnami. Spodní dva listy mohou být dlouhé 9 až 20 centimetrů a široké 2 až 4 centimetrů, zatímco nejvyšší listy jsou často listovité. Květenství je husté, přímé, kuželovité až válcovité, složené

z 20 až 50 květů, a dosahuje délky 3 až 10 centimetrů a šířky do 3,5 centimetru. Květy jsou velké, světle růžové až světle fialově zbarvené s tmavší kresbou, otevřené, s pyskem širokým 6 až 9 milimetrů a dlouhým 8 až 13 milimetrů, trojlaločným, přičemž střední lalok pysku je delší než boční laloky (Baumann et al. 2009; Delforge a Harrap, 2006)

Druh se vyskytuje v bažinách, aluviální oblastech, na pobřežních pastvinách a v řídkých lesích (Delforge a Harrap, 2006).

Druh vzešlý z hybridizace mezi primárními, diploidními hybridy *Dactylorhiza incarnata* a *Dactylorhiza fuchsii* (Shipunov et al. 2005). Dnes se většina autorů přiklání k názoru, že *D. baltica* je samostatný druh, který je podle některých studií nejbližší příbuzný k *D. praetermissa* (Duce) Soó a *D. purpurea* (T. a T. A. Stephenson) Soó (např. Averyanov, 1990).

14 *Dactylorhiza sphagnicola*

Jedná se o druh s atlantickým rozšířením. Vyskytuje se od francouzských Ardén po Belgii a Nizozemí a na severu až po jižní Skandinávii (Delforge a Harrap, 2006). Biotopem výskytu jsou vrchoviště a mokřadní listnaté či jehličnaté lesy, které nejsou výš než 600 metrů nad mořem s dominancí rašeliníku (Delforge a Harrap, 2006). Většina allotetraploidních druhů *Dactylorhiza* se sice vyskytuje v mokřadech, ale jsou většinou vázány na vyšší PH, kdežto *Dactylorhiza sphagnicola* prospívá v chudých a velmi kyselých bažinatých komplexech (Hedrén, 2003). Na společných lokalitách se vyskytuje spolu s rodičovským druhem *Dactylorhiza maculata*, ale ve srovnání s *D. maculata* je *D. sphagnicola* mnohem vzácnější a silně ustupující (Jacquemyn et al. 2016). Ve vzácnějších případech lze najít sympatrické populace s otcovským *Dactylorhiza incarnata*, kde oba druhy rostou v těsné blízkosti (Hedrén et al. 2012).

Jedná se o statnou 20 až 60 centimetrů vysokou rostlinu s 4 až 8 lineárně kopinatými listy, které nemají na sobě skvrny a mohou dosahovat délky až 25 centimetrů. Květenství je husté, cylindrického tvaru s 20 až 25 květy, jejichž barva přechází od růžové do tmavě fialové. Kališní lístky jsou obdélníkovitého tvaru s přítomností skvrn a vzájemně se dotýkají. Pysk je téměř kruhovitý, lekce trojdílný a slabě vypuklý. Pysk je pokryt růžovými tečkami a čárkami (Baumann et al. 2009; Delforge a Harrap, 2006).

Dactylorhiza sphagnicola je allotetraploidní druh, který ve svém genomu má subgenom, který je podobný subgenomu, který se vyskytuje v mateřském *D. maculata* (Devos et al. 2003; Hedrén, 2003). V sympatrických populacích s *D. maculata* se vyskytoval značný počet rostlin hybridního původu. Naopak v alopatické populaci se hybridy nevyskytovaly (Jacquemyn et al. 2016). Vzory genetických variací u hybridních rostlin ukázaly, že hybridní rostliny jsou geneticky blíže k *D. sphagnicola*. Toto

potvrzuje, že mezidruhový tok, který probíhal mezi *D. sphagnicola* a *D. Maculata*, byl asymetrický a probíhal směrem od *D. maculata* k *D. sphagnicola* (Jacquemyn et al. 2016).

Sdílené haplotypy plastidové DNA typu C i E a intermediální znaky mezi *D. traunsteineri* a *D. sphagnicola* dokazují lokální hybridizaci a introgresi mezi těmito alotetraploidními druhy (Hedrén, 2003).

15 *Dactylorhiza bohemica*

Dactylorhiza bohemica je endemický druh české flóry (Businský, 1989). Druh se vyskytuje jedině na Jestřebském blatu, což je druhově bohaté slatiniště (Businský, 1989; Kaplan, 2017).

Popis rostlin podle Businského (1989) je následující: „Nejnápadnější znaky těchto rostlin byl štíhlý habitus, velmi úzké, nektrastně skvrnitě listy v malém počtu, a zvláště pak chudokvěté květenství s ojedinelou ametystovou barvou“.

V blízkosti populace *D. bohemica* se nacházejí tři druhy *Dactylorhiza*, které by podle výzkumníků mohly představovat rodičovské druhy pro *D. bohemica*. Businský (1989) obzvláště upozornil na výskyt *Dactylorhiza majalis* a *Dactylorhiza maculata*, které jsou známy, že na zóně styků svých populací vytvářejí bohaté hybridní roje s rozsáhlou variabilitou. Zároveň byly tyto hybridní rostliny poblíž lokality a byly u nich pozorovány produkty několikanásobného i oboustranného zpětného křížení. Podle Eccarius (2016) se jedná o taxon, který pravděpodobně vzešel z *Dactylorhiza traunsteineri*, a tak bychom jeho samostatnost měli brát s velkou rezervou.

Podle červeného seznamu ohrožených druhů (Bureš et al. 2001), je *Dactylorhiza bohemica* řazena mezi kriticky ohrožené druhy naší květeny.

16 Diskuse

Rod *Dactylorhiza* Necker ex Nevski je jedním z nejčastěji zkoumaných rodů v čeledi *Orchidaceae* (Averyanov, 1990; Eccarius, 2016; Pedersen, 1998). Těžiště výskytu rodu se nachází v Euroasii, ale jsou známy také druhy ze Severní Ameriky (Kanada, Aljaška) a ze severní Afriky (Bateman et al., 2024; Baumann et al., 2009; Delforge and Harrap, 2006; Eccarius, 2016). Rod se vyznačuje velmi složitými taxonomickými vztahy způsobenými častou mezidruhovou hybridizací a polyploidizací. Proto se v rodě nachází velké množství obskurních a obtížně klasifikovatelných forem (Efimov et al. 2016; Paun et al. 2010). Tyto aspekty výrazně komplikují identifikaci druhů v terénu a jejich správné taxonomické určení (Pritchard, 2007; Devos et al., 2005, 2006). To se projevuje i na množství uznaných druhů, jejichž počet se mezi jednotlivými autory významně liší. U starších prací se počet

uznaných druhů pohyboval od dvanácti (Klinge, 1898) až po sedmdesát pět (Averyanov, 1990). Podle Eccariuse (2016) je počet uznaných druhů okolo šestatřiceti se čtyřiceti šesti poddruhy.

Problematika je umocněna různými způsoby určování druhů orchidejí, protože dodnes není stanoven jednotný způsob určení druhů této čeledi. Na našem území se s tímto problémem setkáváme u našich endemických prstnaticů, jako jsou *Dactylorhiza bohemica* a *Dactylorhiza carpatica* (Průša a Šedivý, 2022), kdy Eccarius (2016) upozorňuje, že *Dactylorhiza bohemica* může být jen derivátem *Dactylorhiza traunsteineri*.

Taxonomický nesoulad byl také způsoben politickým vývojem v Evropě po druhé světové válce. Příkladem nám může být *Dactylorhiza baltica*. Populace v Nizozemí a v Dánsku byly přiřazovány k *D. praetermissa/pardalina*, i přes to, že se odlišovaly od populací v baltských státech jen jediným znakem, a to velikostí květů např. Buttler (1986). Tento taxonomický nesoulad byl způsoben díky politickému vývoji v Evropě a vzniku železné opony, kdy vědci z obou stran pojmenovali rostliny jinak, protože komunikace mezi oběma stranami byla minimální (Pedersen a Hedrén, 2010). Podle Delforge (2005) je rozhodujícím znakem k odlišení těchto druhů doba kvetení, kdy *D. baltica* kvete dříve než *D. praetermissa*. Problematiku taxonomie tohoto druhu vyřešil Pedersen a Hedrén, (2010), protože estonská populace *D. baltica* a britsko-holandská populace *D. pardalina* jsou odlišné podle analýzy alozymů, což potvrzují i morfometrická data. Proto bychom měli brát tyto dvě populace jako dva dobře definované druhy, a ne jako dvě morfy stejného druhu.

Problematickým taxonem je také známější *Dactylorhiza traunsteineri*, jehož určení nám stěžuje jeho ostrůvkovitý výskyt. Mnohé populace byly přiřazeny k druhu dle morfologickým podobnostem, ale dnes díky molekulárním metodám máme pohled jasnější (Hedrén, 1996). Například populace nacházející se v oblasti Skandinávie a severního Ruska se dříve označovaly za samostatný druh *D. lapponica*, avšak dnes se tato populace zařazuje do druhu *D. traunsteineri* (Sletvold et al. 2010). RAD-seg data od Bradrud et al. (2020) a Hawranek (2021) přesvědčivě neodlišila populace skandinávské *D. lapponica* od alpských jedinců *D. traunsteineri*. Samostatnost *D. lapponica* podle těchto studií není uznána.

S opačným problémem se setkáváme na Britských ostrovech, kde se dříve předpokládal výskyt *D. traunsteineri*. Tyto populace jsou však dnes považovány za sesterský druh k *D. traunsteineri*. Druh byl nazván *D. francis-drucei* (Bateman et al. 2023) a jeho existenci podporují epigenetické údaje Paun et al. (2010). Výsledky z jaderných mikrosatelitů podané v práci Balao et al. (2016) ukazují že *D. francis-drucei* je geneticky stejně vzdálená k *D. majalis*, jako ke kontinentální *D. traunsteineri*.

17 Závěr

Názory na význam hybridizace pro vývoj života na Zemi se v posledních padesáti letech zásadně změnil – od představy hybrida jako neplodného jedince, který byl považován za slepou vývojovou cestu (Knobloch, 1972) až po současný pohled na hybridizaci jako na jeden z nejdůležitějších evolučních procesů. To umožnilo druhům získat větší variabilitu, než která by jim byla za normálních okolností dostupná (Soltis a Soltis, 2009, Whitney et al. 2010). Hybridizace vede mnohdy k evolučním novinkám a k adaptaci na nové podmínky života (Soltis a Soltis, 2009; Brandrud et al. 2020).

Čeď *Orchideaceae* a do ní patřící rod *Dactylorhiza* se vyznačují vysokou schopností mezidruhově hybridizace. Tato práce je zaměřena na rod *Dactylorhiza*, protože u něj došlo v průběhu poměrně krátkého časového úseku k dramatické diverzifikaci druhů v závislosti na životních podmínkách, včetně změn klimatu v dobách ledových a mimo tato období (Nordström a Hedrén, 2008). Rod *Dactylorhiza* je široce rozšířen od tropických oblastí až po severní arktické oblasti. Některé druhy mají velké areály, ale současně je rod tvořen i vzácnými lokálními taxony, mezi nimiž zaujímají významnou pozici právě hybridogenní druhy (Delforge a Harrap, 2006). Pochopení faktorů, které vedou k této významné a současně úspěšné diverzifikaci druhů rodu *Dactylorhiza*, může být také obecně významné v kontextu s nastupujícími klimatickými změnami období, ve kterém právě žijeme (Sumbembayev et al. 2023).

Taxonomicky byla u rodu *Dactylorhiza* hlavní pozornost věnována nejčastějším a nejvíce rozšířeným evropským hybridním taxonům *Dactylorhiza majalis* a *Dactylorhiza traunsteineri*, které svou ustáleností a celkovým stářím představují plně oddělené samostatné nové druhy tohoto rodu, a samy jsou jako rodičovské druhy součástí dalších hybridizačních procesů (Brandrud et al. 2020). Nepředstavují tedy hybrid slabý s nízkou životaschopností, ale samostatně evolučně úspěšné hybridogenní druhy.

Charakter funkčního přizpůsobení rostlin vnějším podmínkám a vlivům a rychlost takového přizpůsobení (s podílem hybridizace) pak může mít lokální význam při hodnocení možností přežití vzácného druhu pod tlakem příbuzných druhů na jeho reprodukční bariéry, ale také může mít, v návaznosti na měnící se životní podmínky daného období, význam pro širší ekosystém (Todesco et al. 2016).

Cílem práce bylo zároveň odpovědět na otázky uvedené v jejím úvodu:

1. Jaký vliv může mít mezidruhově hybridizace na speciaci rodu *Dactylorhiza*?

Hybridizace má vliv na rostlinnou speciaci (Abbott et al., 2013; Abbott and Rieseberg, 2012; Goulet et al., 2017; Soltis and Soltis, 2009). Pokud je hybrid schopen se rozmnožovat, přináší druhu mnoho zajímavých příležitostí. Skrz hybridizaci vznikají nové adaptivní vlastnosti, které umožňují takto vzniklým druhům se rychle adaptovat na měnící se podmínky, a to rychleji než skrze náhodné mutace

(Barton, 2013; Schluter and Rieseberg, 2022). Nové hybridní druhy mnohdy obsazují podobné nebo naopak rozdílné ekologické niky než jejich rodiče, což ještě zvyšuje morfologickou a genetickou variabilitu (např. Anderson and Stebbins, 1954; Goulet et al., 2017). Dobrým příkladem, na kterém můžeme tento jev prezentovat, je rod *Dactylorhiza* (Paun et al. 2011). Přestože polyploidní komplexy *Dactylorhiza* nevykazují širší geografické rozšíření než diploidní druhy, mohou allopolyploidní linie mít širší ekologické rozmezí v některých ekologických parametrech. To naznačuje, že epigenetické faktory hrají důležitou roli v udržování jednotlivých taxonů (Paun et al., 2011, 2010). Například allotetraploidní druhy jsou schopny růst v prostředí s výraznějšími výkyvy vlhkosti v půdě než rodičovský *D. incarnata* (Paun et al. 2011). Rozdělení nik neprobíhá jen mezi diploidními a allotetraploidy, ale také mezi allotetraploidy samotnými. Důkazem nám může být *D. traunsteineri*, která preferuje více otevřená stanoviště s minimálními zastíněním a kdežto *D. majalis*, která sdílí stejné rodičovské druhy jako *D. traunsteineri* zvládá zastínění lépe a je více konkurenceschopná (Balao et al. 2016; Wolfe et al., 2023). Mezidruhová hybridní druhy také mohou přispívat k evolučnímu potenciálu rodu *Dactylorhiza* tím, že poskytují genetický materiál, který může být využit v průběhu evoluce k vytváření nových druhů či poddruhů (Brandrud et al. 2020; De Hert et al. 2011). U hybridů se zároveň často setkáváme s heterózním efektem, kdy hybridy jsou vitálnější než jejich rodiče. Heteróza se projevuje nejen v rychlejším růstu rostliny, ale také v odolnosti vůči chorobám a lepší reprodukční schopnosti (Paun et al. 2011; Janick, 2010).

Hybridizace ale může představovat i negativní faktor pro druhy rodu *Dactylorhiza*. Problematika ohrožení rostlin v rodě *Dactylorhiza* cestou hybridizace bude probrána v otázce číslo 3.

2. Do jaké míry jsou allotetraploidní taxony v rodě *Dactylorhiza* nezávislé na rodičovských taxonech?

Allotetraploidní taxony rodu *Dactylorhiza* mají kombinaci chromozomů od obou rodičů, což jim poskytuje širší genetický základ (Hedrén, 1996). Zároveň hybridy procházejí genetickou stabilizací, což znamená, že se jejich genom konsoliduje a stává se stabilním během několika generací po hybridizaci a zdvojení chromozomů (Paun et al. 2011). Tyto nové genetické kombinace mohou umožnit allotetraploidům adaptovat se na různé podmínky a stanoviště, čímž se stávají geneticky nezávislémi na svých rodičích. Stabilizace zahrnuje fixaci chromozomových párů, což umožňuje pravidelnou meiózu a produkci fertálních gamet (Pillon et al., 2007). Tento krok je klíčový pro dlouhodobou nezávislost allotetraploidních druhů. To umožňuje allotetraploidním druhům i ekologickou nezávislost, kdy allotetraploidní druhy mohou obsadit nové ekologické niky nebo se přizpůsobit širšímu spektru stanovišť než jejich rodičovské druhy (Paun et al. 2011).

Allotetraploidní druhy jsou rovněž reprodukčně izolovány díky vzniku reprodukčních bariér (Aagaard et al. 2005). Druhy si mohou časem vyvinout prezygotické bariéry, jako jsou odlišné doby kvetení, různé typy opylovačů nebo odlišné habitatové preference, které snižují pravděpodobnost křížení s druhy rodičovskými (Průša a Šedivý, 2022). Pokud i tak k hybridizaci dojde, tak postzygotické

bariéry, jako je sterilita hybridů nebo snížená fitness, mohou omezit tok genů mezi alotetraploidními a diploidními druhy (Aagaard et al. 2005).

3. Může hybridizace představovat ohrožení některých taxonů v rámci rodu *Dactylorhiza*?

Hybridizace představuje nejen příležitost pro vznik nových druhů, ale také svým působením ohrožuje druhy stávající (Elstrand et al. 1996; Levin et al., 1996). Z důvodu nedostatečných prezygotických bariér mezi jednotlivými zástupci rodu *Dactylorhiza* je introgrese mezi jednotlivými druhy častým fenoménem a jsou primárně ohroženy nově zformované hybridní taxony, které neprošli rekombinací genomu (Paun et al. 2011). Tímto také může být narušována genetická čistota rodičovského druhu a může dojít ke ztrátě unikátních genetických vlastností druhu původního. Příkladem nám může být vzácná a málo početná *D. sphagnicola*, která se dostává v Belgii do sekundárního kontaktu s *D. maculata* a tím je potenciálně ohrožena vyhynutím (Jacquemyn et al. 2016). Přestože většina vzniklých hybridů bývá sterilní, objevují se hybridi, kteří naopak svojí vitalitou převyšují své rodiče (De Hert et al. 2012). Hybridí se pak vyznačují velkou násadou semen, a jsou tak schopni konkurovat svým rodičům. Hybridí mnohdy bývají také lépe přizpůsobeni podmínkám lokalit, na kterých se vyskytují společně se svými rodičovskými druhy, což má za následek vytlačení jednoho či obou rodičovských druhů z lokalit (De Hert et al. 2012). Tento problém si můžeme uvést na lokalitě Unna v Porýní Vestfálsku, kde hybrid *Dactylorhiza* × *aschersoniana* vytlačil oba mateřské druhy pryč z lokality, pravděpodobně díky větší vitalitě, přizpůsobení se svému prostředí a větší násadě semen (Margenburt, 2016) Opačným extrémem je tvorba sterilních hybridů, na které mateřské druhy plýtvají svou energií. Tyto rostliny zároveň představují konkurenci v oblasti vody, světla a živin. Tento stav může vyústit až v redukcii či kolapsu celé populace jednoho či obou mateřských druhů (Aagaard et al. 2005; Paun et al. 2011; Pillon et al. 2007).

Literatura

- AAGAARD, S.M.D., SÅSTAD, S.M., GREILHUBER, J., MOEN, A., 2005. A secondary hybrid zone between diploid *Dactylorhiza incarnata* ssp. *cruenta* and allotetraploid *D. lapponica* (Orchidaceae). *Heredity* **94**, 488–496. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800643>
- ABBOTT, R., ALBACH, D., ANSELL, S., ARNTZEN, J.W., BAIRD, S.J.E., BIERNE, N., BOUGHMAN, J., BRELSFORD, A., BUERKLE, C.A., BUGGS, R., BUTLIN, R.K., DIECKMANN, U., EROUKHMANOFF, F., GRILL, A., CAHAN, S.H., HERMANSEN, J.S., HEWITT, G., HUDSON, A.G., JIGGINS, C., JONES, J., KELLER, B., MARCZEWSKI, T., MALLET, J., MARTINEZ-RODRIGUEZ, P., MÖST, M., MULLEN, S., NICHOLS, R., NOLTE, A.W., PARISOD, C., PFENNIG, K., RICE, A.M., RITCHIE, M.G., SEIFERT, B., SMADJA, C.M., STELKENS, R., SZYMURA, J.M., VÄINÖLÄ, R., WOLF, J.B.W., ZINNER, D., 2013. Hybridization and speciation. *J. Evol. Biol.* **26**, 229–246. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02599.x>
- ABBOTT, R., RIESEBERG, L., 2012. Hybrid Speciation. ELS *JohnWileySons* Ltd Chichester.
- ALLENDORF, F., LEARY, R., SPRUELL, P., WENBURG, J., 2001. The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 613–622. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02290-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02290-X)
- ANDERSON, Edgar. Introgressive hybridization. *Biological research series*, 1949.
- ANDERSON, E., STEBBINS, G.L., 1954. Hybridization as an Evolutionary Stimulus. *Evolution* **8**, 378–388. <https://doi.org/10.2307/2405784>
- ANGHELESCU, N., BALOGH, L.-M., BALOGH, M., KIGYOSSY, N., DULUGEAC, R., KERTÉSZ, H., MAALOUF, R., GEORGESCU, M., PETRA, S., TOMA, F., PETICILĂ, A., 2023. An overview of recently discovered intra and inter-generic orchid hybrids as new additions to romanian flora. *Series, B, Horticulture*.
- ARNOLD, M.L., 1997. Natural Hybridization and Evolution. *Oxford University Press*, USA.
- AVERYANOV, L.V., 1990. A review of the genus *Dactylorhiza*. *Orchid Biol. Rev. Perspect.* V 159–206.
- BALAO, F., TANNHÄUSER, M., LORENZO, M.T., HEDRÉN, M., PAUN, O., 2016. Genetic differentiation and admixture between sibling allopolyploids in the *Dactylorhiza majalis* complex. *Heredity* **116**, 351–361. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.98>
- BARTON, N.H., 2013. Does hybridization influence speciation? *J. Evol. Biol.* **26**, 267–269. <https://doi.org/10.1111/jeb.12015>

- BATEMAN, R.M., DENHOLM, I., MCLEOD, L., CRAIG, W., ENNOS, R.A., 2023. Systematic reappraisal of marsh-orchids native to Scotland. *Kew Bull.* **78**, 107–131.
<https://doi.org/10.1007/s12225-023-10080-5>
- BATEMAN, R.M., MEADES, S.J., DENHOLM, I., TYTECA, D., HEDRÉN, M., 2024. Marsh-orchids of Canada: long-standing mysteries partially solved. *Kew Bull.* **79**, 257–281.
<https://doi.org/10.1007/s12225-024-10176-6>
- BAUMANN, H., KÜNKELE, S., LORENZ, R., 2009. Orchideje Evropy.
- BENZING, D.H., 1986. The Vegetative Basis of Vascular Epiphytism. *Selbyana* **9**, 23–43.
- BERNACKI, L., 2016. Mieszkańce międzygatunkowe storczykowatych Pienińskiego Parku Narodowego. *Pieniny – Przyroda i Człowiek* **14**: 51–61
- BICKFORD, D., LOHMAN, D.J., SODHI, N.S., NG, P.K.L., MEIER, R., WINKER, K., INGRAM, K.K., DAS, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- BLINOVA, I.V., UOTILA, P., 2012. *Dactylorhiza traunsteineri* (Orchidaceae) in Murmansk Region (Russia). *Memoranda Soc. Fauna Flora Fennica* **88**, 2012 • B
- BORSOS, O. 1980. Anatomy of wild orchids in Hungary, I. tissue structure of leaf and floral axis. – *Acta Agron. Acad. Sci. Hung.* **29**: 369–389.
- BRANDRUD, M.K., BAAR, J., LORENZO, M.T., ATHANASIADIS, A., BATEMAN, R.M., CHASE, M.W., HEDRÉN, M., PAUN, O., 2020. Phylogenomic Relationships of Diploids and the Origins of Allotetraploids in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Syst. Biol.* **69**, 91–109.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syz035>
- BUREŠ, P., HOLUB, J., PROCHÁZKA, F. (Eds.), 2001. Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000): = Black and Red List of vascular plants of the Czech Republic - 2000, Příroda. *Agentura ochrany přírody a krajiny ČR*, Praha.
- BURGARELLA, C., BARNAUD, A., KANE, N.A., JANKOWSKI, F., SCARCELLI, N., BILLOT, C., VIGOUROUX, Y., BERTHOULY-SALAZAR, C., 2019. Adaptive Introgression: An Untapped Evolutionary Mechanism for Crop Adaptation. *Front. Plant Sci.* **10**.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00004>
- BUSINSKÝ, R., 1989. *Dactylorhiza bohemica* – nový druh objevený v severních Čechách. *Preslia* **61**: 289–314.
- BUTTLER, K. P. 1986. Orchideen. Die wildwachsenden Arten und Unterarten Europas, Vorderasiens und Nordafrikas. MosaikVerlag GmbH.
- CHASE, M., CAMERON, K., BARRETT, R., FREUDENSTEIN, J., 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification, in: *Orchid Conservation*. pp. 69–89.

- CHASE, M.W., CAMERON, K.M., FREUDENSTEIN, J.V., PRIDGEON, A.M., SALAZAR, G., VAN DEN BERG, C., SCHUITEMAN, A., 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* **177**, 151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>
- COZZOLINO, S., WIDMER, A., 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends Ecol. Evol.* **20**, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.004>
- DE HERT, K., JACQUEMYN, H., VAN GLABEKE, S., ROLDÁN-RUIZ, I., VANDEPITTE, K., LEUS, L., HONNAY, O., 2012. Reproductive isolation and hybridization in sympatric populations of three *Dactylorhiza* species (Orchidaceae) with different ploidy levels. *Ann. Bot.* **109**, 709–720. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr305>
- DE HERT, K., JACQUEMYN, H., VAN GLABEKE, S., ROLDÁN-RUIZ, I., VANDEPITTE, K., LEUS, L., HONNAY, O., 2011. Patterns of hybridization between diploid and derived allotetraploid species of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) co-occurring in Belgium. *Am. J. Bot.* **98**, 946–955. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000367>
- DELFORGE, P., HARRAP, S., 2006. Orchids of Europe, North Africa and the Middle East, 3rd ed. ed. *A & C Black*, London.
- DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS III, W.W., 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* **172**, 11–21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x>
- DEVOS, N., RASPÉ, O., OH, S.-H., TYTECA, D., JACQUEMART, A.-L., 2006. The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: insights from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data. *Mol. Phylogenet. Evol.* **38**, 767–778. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.11.013>
- DEVOS, N., TYTECA, D., RASPÉ, O., WESSELINGH, R.A., JACQUEMART, A.-L., 2003. Patterns of chloroplast diversity among western European *Dactylorhiza* species (Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.* **243**, 85–97. <https://doi.org/10.1007/s00606-003-0068-0>
- DRESSLER, R., 1981. *The Orchids Natural History and Classification*, Systematic Botany. <https://doi.org/10.2307/1219717>
- DOHNAL, Jozef. *www.botanickafotogalerie.cz* [online]. 16.5.1968 [cit. 28.7.2024]. Dostupný na WWW:
https://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Dactylorhiza%20majalis&czName=prstnatec%20m%C3%A1jov%C3%BD&title=Dactylorhiza%20majalis%20|%20prstnatec%20m%C3%A1jov%C3%BD&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=lat

- DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., SUDA, J., 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat. Protoc.* **2**, 2233–2244. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- DOLEZEL, J., GREILHUBER, J., SUDA, J., 2007. Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. *John Wiley & Sons*.
- ECCARIUS, W., 2016. Die Orchideengattung *Dactylorhiza*: Phylogenie, Taxonomie, Morphologie, Biologie, Verbreitung, Ökologie und Hybridisation, 1. Auflage. ed. Selbstverlag des Verfassers, Eisenach.
- EFIMOV, P., PHILIPPOV, E., KRIVENKO, D., 2016. Allopolyploid speciation in Siberian *Dactylorhiza* (Orchidaceae, Orchidoideae). *Phytotaxa* **258**, 101–120. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.258.2.1>
- ELLSTRAND, N.C., WHITKUS, R., RIESEBERG, L.H., 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5090–5093. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.5090>
- ERIKSSON, M.C., MANDÁKOVÁ, T., MCCANN, J., TEMSCH, E.M., CHASE, M.W., HEDRÉN, M., WEISS-SCHNEEWEISS, H., PAUN, O., 2022. Repeat Dynamics across Timescales: A Perspective from Sibling Allotetraploid Marsh Orchids (*Dactylorhiza majalis* s.l.). *Mol. Biol. Evol.* **39**, msac167. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac167>
- FEHRER, J., KRAK, K., CHRTEK, J., 2009. Intra-individual polymorphism in diploid and apomictic polyploid hawkweeds (*Hieracium*, Lactuceae, Asteraceae): disentangling phylogenetic signal, reticulation, and noise. *BMC Evol. Biol.* **9**, 239. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-239>
- FIŠER, C., ROBINSON, C.T., MALARD, F., 2018. Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Mol. Ecol.* **27**, 613–635. <https://doi.org/10.1111/mec.14486>
- GERARD, P.R., FERNANDEZ-MANJARRES, J.F., FRASCARIA-LACOSTE, N., 2006. Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Mol. Ecol.* **15**, 3655–3667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03032.x>
- GIVNISH, T.J., SPALINK, D., AMES, M., LYON, S.P., HUNTER, S.J., ZULUAGA, A., ILES, W.J.D., CLEMENTS, M.A., ARROYO, M.T.K., LEEBENS-MACK, J., ENDARA, L., KRIEBEL, R., NEUBIG, K.M., WHITTEN, W.M., WILLIAMS, N.H., CAMERON, K.M., 2015. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **282**, 20151553. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1553>
- GOULET, B.E., RODA, F., HOPKINS, R., 2017. Hybridization in Plants: Old Ideas, New Techniques. *Plant Physiol.* **173**, 65–78. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01340>
- GRABENSTEIN, K.C., TAYLOR, S.A., 2018. Breaking Barriers: Causes, Consequences, and Experimental Utility of Human-Mediated Hybridization. *Trends Ecol. Evol.* **33**, 198–212. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.12.008>

- GRIMM, G.W., DENK, T., 2008. ITS Evolution in *Platanus* (Platanaceae): Homoeologues, Pseudogenes and Ancient Hybridization. *Ann. Bot.* **101**, 403–419. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm305>
- GROSS, B.L., RIESEBERG, L.H., 2005. The Ecological Genetics of Homoploid Hybrid Speciation. *J. Hered.* **96**, 241–252. <https://doi.org/10.1093/jhered/esi026>
- HARRISON, R.G., 1993. Hybrid Zones and the Evolutionary Process. *Oxford University Press*.
- HAWRANEK, A.-S., 2021. The impact of recurrent origins and gene flow on the genetic structure of allopolyploid marsh orchids (*Dactylorhiza*, Orchidaceae).
- HEDRÉN, M., 2009. Plastid DNA haplotype variation in *Dactylorhiza incarnata* (Orchidaceae): evidence for multiple independent colonization events into Scandinavia. *Nord. J. Bot.* **27**, 69–80. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2009.00274.x>
- HEDRÉN, M., 2003. Plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* polyploid complex and the origin of allotetraploid *D. sphagnicola* (Orchidaceae). *Mol. Ecol.* **12**, 2669–2680. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01930.x>
- HEDRÉN, M., 2001. Systematics of the *Dactylorhiza euxina/incarnata/maculata* polyploid complex (Orchidaceae) in Turkey: evidence from allozyme data. *Plant Syst. Evol.* **229**, 23–44. <https://doi.org/10.1007/s006060170016>
- HEDRÉN, M., 1996. Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): Evidence from allozyme markers. *Plant Syst. Evol.* **201**, 31–55. <https://doi.org/10.1007/BF00989050>
- HEDRÉN, M., NORDSTRÖM, S., PEDERSEN, H.Æ., STÅHLBERG, D., 2012. Systematics and conservation genetics of *Dactylorhiza majalis* ssp. *elatior* (Orchidaceae) on Gotland. *Nord. J. Bot.* **30**, 257–272. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2012.01321.x>
- HEDRÉN, M., NORDSTRÖM, S., STÅHLBERG, D., 2008. Polyploid evolution and plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia. *Mol. Ecol.* **17**, 5075–5091. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03965.x>
- HEDRÉN, M., OLOFSSON, S.N., PAUN, O., 2018. Orchid colonization: multiple parallel dispersal events and mosaic genetic structure in *Dactylorhiza majalis* ssp. *lapponica* on the Baltic island of Gotland. *Ann. Bot.* **122**, 1019–1032. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy111>
- HESLOP-HARRISON, J., 1957. On the Hybridization of the Common Spotted Orchid, *Dactylorchis Fuchsii* (druce) Vermln., with the Marsh Orchids, *D. Praetermissa* (druce) Vermln. and *D. Purpurella* (t. and T. a. Steph.) Vermln. *Proc. Linn. Soc. Lond.* **167**, 176–185. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1957.tb00792.x>
- HESLOP-HARRISON, J., 1953. Microsporogenesis in some Triploid *Dactylorchid* Hybrids. *Ann. Bot.* **17**, 539–549.

- HEWITT, G.M., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc.* **68**, 87–112. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01160.x>
- HORSMAN, F., 1991. A new dactylorchid hybrid. *Watsonia*, **18**, 395-399
- JACQUEMYN, H., VAN DER MEER, S., BRYN, R., 2016. The impact of hybridization on long-term persistence of polyploid *Dactylorhiza* species. *Am. J. Bot.* **103**, 1829–1837. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600274>
- JANEČKOVÁ, P., WOTAVOVÁ, K., SCHÖDELBAUEROVÁ, I., JERSÁKOVÁ, J., KINDLMANN, P., 2006. Relative effects of management and environmental conditions on performance and survival of populations of a terrestrial orchid, *Dactylorhiza majalis*. *Biol. Conserv.* **129**, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.045>
- JANICK, J., 2010. Plant Breeding Reviews, *Volume 12*. John Wiley & Sons.
- JANSSEN, T., BREMER, K., 2004. The age of major monocot groups inferred from 800+rbcl sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* **146**, 385–398. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00345.x>
- KAPLAN, Z., 2017. Flora and Phytogeography of the Czech Republic, in: CHYTRÝ, M., DANIHELKA, J., KAPLAN, Z., PYŠEK, P. (Eds.), *Flora and Vegetation of the Czech Republic. Springer International Publishing*, Cham, pp. 89–163. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63181-3_3
- KIRILLOVA, I.A., DUBROVSKIY, Y.A., DEGTEVA, S.V., NOVAKOVSKIY, A.B., 2023. Ecological and habitat ranges of orchids in the northernmost regions of their distribution areas: A case study from Ural Mountains, Russia. *Plant Divers.* **45**, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2022.08.005>
- KLEYNEN, Jacques. DE ORCHIDEEËN VAN MITTENWALD (ZUID-DUITSLAND). Online. *EURORCHIS*. 1990, roč. 1990, article 2, s. 95-104. Dostupné z: [file:///C:/Users/petra/Downloads/De_Orchideeen_Van_Mittenwald_Zuid_Duitsl%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/petra/Downloads/De_Orchideeen_Van_Mittenwald_Zuid_Duitsl%20(2).pdf). [cit. 2024-04-30].
- KLINGE, J. 1898. Dactylorchidis, orchidis subgeneris, monographiae prodromus. I. Specierum subspecierumque synopsis etdiagnoses. *Trudy Imp. S.-Peterburgsk. Bot. Sada XVII*: 145 - 201.
- KNOBLOCH, I.W., 1972. Intergeneric Hybridization in Flowering Plants. *TAXON* **21**, 97–103. <https://doi.org/10.2307/1219229>
- KRAHULCOVÁ, A., KRAHULEC, F., KIRSCHNER, J., 1996. Introgressive Hybridization between a Native and an Introduced Species: *Viola lutea* subsp. *sudetica* versus *V. tricolor*. *Folia Geobot. Phytotaxon.* **31**, 219–II.

- LANGVIN, S.A., CLAY, K., GRACE, J.B., 1990. The Incidence and Effects of Hybridization Between Cultivated Rice and Its Related Weed Red Rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution* **44**, 1000–1008. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1990.tb03820.x>
- LAUBER, Konrad. *Flora Helvetica* [online]. 2022 [cit. 28.7.2024]. Dostupný na WWW: <https://www.infoflora.ch/de/flora/dactylorhiza-traunsteineri.html>
- LEVIN, D.A., FRANCISCO-ORTEGA, J., JANSEN, R.K., 1996. Hybridization and the Extinction of Rare Plant Species. *Conserv. Biol.* **10**, 10–16.
- LEWIS, L., 2021. *Dactylorhiza × salteri*: the correct name for *Dactylorhiza praetermissa* × *D. purpurella*. *J. Eur. Orch.* **52** (2-4): 461 – 470.
- LIEBST, B., SCHNELLER, J., 2005. How selfing and intra- and interspecific crossing influence seed set, morphology and ploidy level in *Euphrasia*: An experimental study of species occurring in the Alps of Switzerland. *Plant Syst. Evol.* **255**, 193–214. <https://doi.org/10.1007/s00606-005-0314-8>
- Lord, R.M., Richards, A.J., 1977. A hybrid swarm between the diploid *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo and the tetraploid *D. purpurella* (T. & T. A. Steph.) Soo in Durham. *Watsonia*, **11**, 205-210
- LOUREIRO J., TRÁVNÍČEK P., RAUCHOVÁ J., URFUS T., VÍT P., ŠTECH M., CASTRO S. & SUDA J. (2010): The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. – *Preslia* **82**: 3–21.
- MALLET, J., 2007. Hybrid speciation. *Nature* **446**, 279–283. <https://doi.org/10.1038/nature05706>
- MALLET, J., 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.*, Special issue: Invasions, guest edited by Michael E. HOCHBERG and Nicholas J. GOTELLI **20**, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.010>
- MARGENBURG, B., 2016. *Dactylorhiza incarnata* subsp. *incarnata* – Fleischfarbenes Knabenkraut (Orchidaceae), Orchidee des Jahres 2015. *Jahrb. Bochumer Bot. Ver.* **7** 212–219
- MATFIELD, B., JONES, J.K., ELLIS, J.R., 1970. Natural and Experimental Hybridization in *Potentilla*. *New Phytol.* **69**, 171–186. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1970.tb04061.x>
- MÖTLEP, M., ILVES, A., TALI, K., SILD, E., KULL, T., 2021. Artificial crossing and pollen tracking reveal new evidence of hybridization between sympatric *Platanthera* species. *Plant Syst. Evol.* **307**, 25. <https://doi.org/10.1007/s00606-020-01736-x>
- NACZK, A.M., KOLANOWSKA, M., 2015. Glacial Refugia and Future Habitat Coverage of Selected *Dactylorhiza* Representatives (Orchidaceae). *PloS One* **10**, e0143478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143478>

- NACZK, A.M., ZIĘTARA, M.S., 2019. Genetic diversity in *Dactylorhiza majalis* subsp. *majalis* populations (Orchidaceae) of northern Poland. *Nord. J. Bot.* **37**.
<https://doi.org/10.1111/njb.01989>
- NEUFFER, B., HIRSCHLE, S., JÄGER, S., 1999. The colonizing history of *Capsella* in Patagonia (South America)—Molecular and adaptive significance. *Folia Geobot.* **34**, 435–450.
<https://doi.org/10.1007/BF02914921>
- NIELSEN, L.R., SIEGISMUND, H.R., 1999. Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). *Heredity* **83**, 560–567. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885880>
- NORDSTRÖM, S., HEDRÉN, M., 2009. Genetic diversity and differentiation of allopolyploid *Dactylorhiza* (Orchidaceae) with particular focus on the *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri/laponica* complex. *Biol. J. Linn. Soc.* **97**, 52–67.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2008.01183.x>
- NORDSTRÖM, S., HEDRÉN, M., 2008. Genetic differentiation and postglacial migration of the *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri/laponica* complex into Fennoscandia. *Plant Syst. Evol.* **276**, 73–87. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0084-1>
- OTTENBURGH, J., 2021. The genic view of hybridization in the Anthropocene. *Evol. Appl.* **14**, 2342–2360. <https://doi.org/10.1111/eva.13223>
- PAUN, O., BATEMAN, R.M., FAY, M.F., HEDRÉN, M., CIVEYREL, L., CHASE, M.W., 2010. Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*: Orchidaceae). *Mol. Biol. Evol.* **27**, 2465–2473. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq150>
- PAUN, O., BATEMAN, R.M., FAY, M.F., LUNA, J.A., MOAT, J., HEDRÉN, M., CHASE, M.W., 2011. Altered gene expression and ecological divergence in sibling allopolyploids of *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *BMC Evol. Biol.* **11**, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-113>
- PAUN, O., FOREST, F., FAY, M.F., CHASE, M.W., 2009. Hybrid speciation in angiosperms: parental divergence drives ploidy. *New Phytol.* **182**, 507–518. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02767.x>
- PEDERSEN, H.Æ., 1998. Species concept and guidelines for infraspecific taxonomic ranking in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Nord. J. Bot.* **18**, 289–310. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1998.tb01881.x>
- PEDERSEN, H.Æ., HEDRÉN, M., 2010. On the distinction of *Dactylorhiza baltica* and *D. pardalina* (Orchidaceae) and the systematic affinities of geographically intermediate populations. *Nord. J. Bot.* **28**, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2009.00450.x>
- PIJL, L. VAN DER AND DODSON, C. H. 1966. Orchid flowers, their pollination and evolution. *University of Miami Press, Coral Gables, Florida*

- PILLON, Y., FAY, M.F., HEDRÉN, M., BATEMAN, R.M., DEVEY, D.S., SHIPUNOV, A.B., VAN DER BANK, M., CHASE, M.W., 2007. Evolution and temporal diversification of western European polyploid species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *TAXON* **56**, 1185–1208. <https://doi.org/10.2307/25065911>
- PILLON, Y., FAY, M.F., SHIPUNOV, A.B., CHASE, M.W., 2006. Species diversity versus phylogenetic diversity: A practical study in the taxonomically difficult genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Biol. Conserv.* **129**, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.06.036>
- PLEKANEC, Jiří. www.botanickafotogalerie.cz [online]. 2022 [cit. 28.7.2024]. Dostupný na WWW: https://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Dactylorhiza%20traunsteineri&czName=prstnatec%20Traunsteiner%20C5%AFv&title=Dactylorhiza%20traunsteineri%20prstnatec%20Traunsteiner%20C5%AFv&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=lat
- PRENTIS, P.J., WHITE, E.M., RADFORD, I.J., LOWE, A.J., CLARKE, A.R., 2007. Can hybridization cause local extinction: a case for demographic swamping of the Australian native *Senecio pinnatifolius* by the invasive *Senecio madagascariensis*? *New Phytol.* **176**, 902–912. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02217.x>
- PRITCHARD, H.W., 2007. 87. The latent life of seeds: from fundamental principles to risk management. *Cryobiology* **55**, 353. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.10.090>
- PROCHÁZKA, František; VELÍSEK, Václav. *Orchideje naší přírody*. Praha: Academia, 1983.
- PROCHÁZKA, František. *Naše orchideje*. Pardubice: Krajské muzeum východních Čech, 1980.
- PROCHÁZKA F. & ČURN V. (1999) A new orchid hybrid *Dactylorhiza ×silvae-gabretae* (*D. fuchsii* × *D. traunsteineri*) from the Czech Republic. – *Preslia* **71**: 235–240
- PRŮŠA, David; ŠEDIVÝ, Václav. *Orchideje jižních Čech*. České Budějovice: Jihočeský kraj, 2022.
- RHYMER, J.M., SIMBERLOFF, D., 1996. Extinction by Hybridization and Introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**, 83–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>
- RIESEBERG, L.H., 1991. Homoploid Reticulate Evolution in *Helianthus* (Asteraceae): Evidence from Ribosomal Genes. *Am. J. Bot.* **78**, 1218–1237. <https://doi.org/10.2307/2444926>
- RIESEBERG, L.H., 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins¹2. *Am. Bot.* **82**.
- RIESEBERG, L.H., CARNEY, S.E., 1998. Plant hybridization. *New Phytol.* **140**, 599–624. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00315.x>

- RIESENBERG L, WENDEL JF (1993) Introgression and its consequences in plants. In: Harrison RG (ed) Hybrid zones and the evolutionary process. *Oxford University Press*, New York, pp 70–109
- SCHLUTER, D., RIESEBERG, L.H., 2022. Three problems in the genetics of speciation by selection [WWW Document]. *pnas.org*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122153119>
- SCOPECE, G., WIDMER, A., COZZOLINO, S., 2008. Evolution of Postzygotic Reproductive Isolation in a Guild of Deceptive Orchids. *Am. Nat.* **171**, 315–326. <https://doi.org/10.1086/527501>
- SHIPUNOV, A.B., FAY, M.F., CHASE, M.W., 2005. Evolution of *Dactylorhiza baltica* (Orchidaceae) in European Russia: evidence from molecular markers and morphology. *Bot. J. Linn. Soc.* **147**, 257–274. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2005.00380.x>
- SHIPUNOV, A.B., FAY, M.F., PILLON, Y., BATEMAN, R.M., CHASE, M.W., 2004. *Dactylorhiza* (Orchidaceae) in European Russia: combined molecular and morphological analysis. *Am. J. Bot.* **91**, 1419–1426. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.9.1419>
- SLETVOLD, N., ØIEN, D.-I., MOEN, A., 2010. Long-term influence of mowing on population dynamics in the rare orchid *Dactylorhiza lapponica*: The importance of recruitment and seed production. *Biol. Conserv.* **143**, 747–755. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.12.017>
- SOLTIS, D.E., RIESEBERG, L.H., 1986. Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): Genetic Insights from Enzyme Electrophoresis. *Am. J. Bot.* **73**, 310–318. <https://doi.org/10.2307/2444186>
- SOLTIS, D.E., SEGOVIA-SALCEDO, M.C., JORDON-THADEN, I., MAJURE, L., MILES, N.M., MAVRODIEV, E.V., MEI, W., CORTEZ, M.B., SOLTIS, P.S., GITZENDANNER, M.A., 2014. Are polyploids really evolutionary dead-ends (again)? A critical reappraisal of MAYROSE et al. (2011). *New Phytol.* **202**, 1105–1117. <https://doi.org/10.1111/nph.12756>
- SOLTIS, P.S., SOLTIS, D.E., 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 561–588. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092039>
- STÅHLBERG, D., HEDRÉN, M., 2010. Evolutionary history of the *Dactylorhiza maculata* polyploid complex (Orchidaceae). *Biol. J. Linn. Soc.* **101**, 503–525. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01505.x>
- STÅHLBERG, D., HEDRÉN, M., 2009. Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae). *Evol. Ecol.* **23**, 489–489. <https://doi.org/10.1007/s10682-007-9241-1>

- SUDA, J., TRÁVNÍČEK, P., 2006A. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research. *Cytometry A* **69A**, 273–280. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20253>
- SUDA, J., TRÁVNÍČEK, P., 2006B. Estimation of Relative Nuclear DNA Content in Dehydrated Plant Tissues by Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* **38**, 7.30.1-7.30.14. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0730s38>
- SUMBEMBAYEV, A.A., NOWAK, S., BURZACKA-HINZ, A., KOSIRÓG-CEYNOWA, A., SZLACHETKO, D.L., 2023. New and Noteworthy Taxa of the Genus *Dactylorhiza* Necker ex Nevski (Orchidaceae Juss.) in Kazakhstan Flora and Its Response to Global Warming. *Diversity* **15**, 369. <https://doi.org/10.3390/d15030369>
- TAYLOR, S.A., LARSON, E.L., HARRISON, R.G., 2015. Hybrid zones: windows on climate change. *Trends Ecol. Evol.* **30**, 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.04.010>
- TODESCO, M., PASCUAL, M.A., OWENS, G.L., OSTEVIK, K.L., MOYERS, B.T., HÜBNER, S., HEREDIA, S.M., HAHN, M.A., CASEYS, C., BOCK, D.G., RIESEBERG, L.H., 2016. Hybridization and extinction. *Evol. Appl.* **9**, 892–908. <https://doi.org/10.1111/eva.12367>
- TREMBLAY, R.L., ACKERMAN, J.D., ZIMMERMAN, J.K., CALVO, R.N., 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biol. J. Linn. Soc.* **84**, 1–54. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00400.x>
- TROYER, A.F., 2006. Adaptedness and Heterosis in Corn and Mule Hybrids. *Crop Sci.* **46**, 528–543. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0065>
- VERLOOVE, F., 2023. The seventh edition of the Nouvelle Flore de la Belgique: nomenclatural and taxonomic remarks. *Nouvelle Flore*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.8195273>
- VÍT P., WOLFOVÁ K., URFUS T., TÁJEK P. & SUDA J. (2014): Interspecific hybridization between rare and common plant congeners inferred from genome size data: assessing the threat to the Czech serpentine endemic *Cerastium alsinifolium*. – *Preslia* **86**: 95–117.
- VLČKO, Jaroslav; HRIVNÁK, Richard a BALÁZS, Pavol. New taxa in genus *Dactylorhiza* Neck. Nevski and new localities in family Orchidaceae to Hungary. Online. *KITAIBELIA*. 2000, roč. 2000, s. 217-220. Dostupné z: https://kitaibelia.unideb.hu/articles/Kitaibelia_vol51_p217-220.pdf. [cit. 2024-04-30].
- WERCHAN, Barbora. www.botanickafotogalerie.cz [online]. 6.6.2011 [cit. 28.7.2024]. Dostupný na WWW:
<https://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Dactylorhiza%20majalis&czName=prstnatec%20m%C3%A1jov%C3%BD&title=Dactylorhiza%20majalis%20|%20prstna>

tec%20m%C3%A1jov%C3%BD&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=lat

- WHITELEY, A.R., FITZPATRICK, S.W., FUNK, W.C., TALLMON, D.A., 2015. Genetic rescue to the rescue. *Trends Ecol. Evol.* **30**, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.009>
- WHITHAM, T.G., 1989. Plant Hybrid Zones as Sinks for Pests. *Science* **244**, 1490–1493.
- WHITNEY, K.D., AHERN, J.R., CAMPBELL, L.G., ALBERT, L.P., KING, M.S., 2010. Patterns of hybridization in plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **12**, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2010.02.002>
- WOLF, D.E., TAKEBAYASHI, N., RIESEBERG, L.H., 2001. Predicting the Risk of Extinction through Hybridization. *Conserv. Biol.* **15**, 1039–1053. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.0150041039.x>
- WOLFE, T.M., BALAO, F., TRUCCHI, E., BACHMANN, G., GU, W., BAAR, J., HEDRÉN, M., WECKWERTH, W., LEITCH, A.R., PAUN, O., 2023. Recurrent allopolyploidizations diversify ecophysiological traits in marsh orchids (*Dactylorhiza majalis* s.l.). *Mol. Ecol.* **32**, 4777–4790. <https://doi.org/10.1111/mec.17070>
- WOLTER, M., SCHILL, R., 1985. On acetolysis resistant structures in the Orchidaceae— why fossil record of orchid pollen is so rare. *Grana* **24**, 139–143. <https://doi.org/10.1080/00173138509431001>
- WONG, E.L.Y., HISCOCK, S.J., FILATOV, D.A., 2022. The Role of Interspecific Hybridisation in Adaptation and Speciation: Insights From Studies in Senecio. *Front. Plant Sci.* **13**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.907363>
- WOTAVOVÁ, K., BALOUNOVÁ, Z., KINDLMANN, P., 2004. Factors affecting persistence of terrestrial orchids in wet meadows and implications for their conservation in a changing agricultural landscape. *Biol. Conserv.* **118**, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2003.09.005>
- WU, C., WANG, Z., SUN, H., GUO, S., 2006. Effects of different concentrations of nitrogen and phosphorus on chlorophyll biosynthesis, chlorophyll a fluorescence, and photosynthesis in *Larix olgensis* seedlings. *Front. For. China* **1**, 170–175. <https://doi.org/10.1007/s11461-006-0019-3>
- ZIRKLE, CONWAY. "More records of plant hybridization before Koelreuter." (1934): 3-18

