

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**katedra biologie**

Přirozená hybridizace ostřic (*Carex*, *Cyperaceae*): přehled dosavadních  
poznatků a pilotní případová studie

Bakalářská práce

Autor: Natálie Horáková  
Studijní program: B1501 / Biologie  
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie  
Vedoucí práce: RNDr. Jan Košnar, Ph.D.

Hradec Králové  
2018

Leden



## Zadání bakalářské práce

**Autor:** Natálie Horáková

**Studium:** S14BI003BP

**Studijní program:** B1501 Biologie

**Studijní obor:** Systematická biologie a ekologie

**Název bakalářské práce:** **Přirozená hybridizace ostřic (Carex, Cyperaceae): přehled dosavadních poznatků a pilotní případová studie**

**Název bakalářské práce AJ:** Natural hybridization in Carex (Cyperaceae): a review of current knowledge and an initial case study

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

Teoretická část práce bude literární rešerší dosud publikovaných znalostí o případech přirozeného mezidruhového křížení v rodu *Carex* (ostřice) a o biosystematických metodách, které jsou používány pro detekci hybridizace mezi ostřicemi. Cílem je zhodnotit, ve kterých skupinách druhů ostřic a ve kterých geografických oblastech je přirozená hybridizace zatím nejlépe zdokumentována, a ve kterých skupinách a oblastech je naopak frekvence doložených kříženců nízká. Diskutovány budou možné příčiny případných zjištěných nerovnoměrností ve znalostech o přirozeném křížení mezi ostřicemi. Praktická část práce bude spočívat v pilotním morfometrickém studiu populací blízce příbuzných druhů *Carex nigra* a *C. acuta* v oblasti Liberecka. Křížení těchto druhů se předpokládá, ale jeho rozsah nebyl ve střední Evropě nikdy detailně zkoumán. Bude zjišťováno, jak dobře lze pomocí morfologických znaků oba druhy (reprezentované lokálními populacemi) od sebe odlišit, resp. do jaké míry se jejich znaky překrývají, a zda případné překryvy znaků lze vysvětlovat povahou populací nebo stanovišť (např. zda mají vliv syntopické výskyt obou druhů nebo produktivita vegetace).

Arnold M. L., 1999. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York. Ball P. W., Reznicek A. A., 2002. *Carex* L. In: Flora of North America Editorial Committee (eds.), Flora of North America, vol. 23 (Magnoliophyta: Commelinidae (in part): Cyperaceae), 254-453. Oxford University Press, New York. Cayouette J., Catling P. M. (1992): Hybridization in the genus *Carex* with special reference to North America. ? Botanical Review 58: 351-438. Egorova T. V., 1999. The sedges (*Carex* L.) of Russia and adjacent states (within the limits of the former USSR). St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, St. Petersburg; Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. Faulkner J. S., 1973. Experimental hybridization of north-west European species in *Carex* section *Acutae* (Cyperaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 67, 233-253. Stace C. A., Preston C. D., Pearman D. A., 2015: Hybrid flora of the British Isles. Botanical Society of Britain and Ireland, Bristol. Jermy A. C., Simpson D. A., Foley M. J. Y., Porter M. S., 2007: Sedges of the British Isles. Botanical Society of Britain and Ireland, London. Whitney K. D., Ahern J. R., Campbell J. G., Albert L. P., King M. S., 2010. Patterns of hybridization in plants. ? Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 12, 175-182. Řepka R., Grulich V., 2014: Ostřice České republiky: terénní obrazový průvodce. ? Lesnická práce, Kostelec nad Černými lesy.

**Garantující pracoviště:** Katedra biologie,  
Přírodovědecká fakulta

**Vedoucí práce:** RNDr. Jan Košnar, Ph.D.

**Oponent:** Mgr. Ondřej Horných

**Datum zadání závěrečné práce:** 23.10.2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Natálie Horáková

Poděkování:

Děkuji tímto vedoucímu své bakalářské práce, panu RNDr. Janu Košnarovi, Ph.D., za vedení práce, cenné rady, připomínky, pomoc se zpracováním dat a za všechny čas, který mi věnoval.

## **Anotace**

HORÁKOVÁ, N. *Přirozená hybridizace ostřic (Carex, Cyperaceae): přehled dosavadních poznatků a pilotní případová studie*. Hradec Králové, 2018. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Jan Košnar. 52 s.

Teoretická část práce je zaměřena na rešerši literárních zdrojů pojednávajících o fenoménu mezidruhového křížení, zvláště pak o přirozené hybridizaci v rodu *Carex* (*Cyperaceae*) a metodách její detekce. Praktická část se zabývá morfometrickou studií populací *Carex acuta*, *C. nigra* a jejich potenciálních hybridů v oblasti Liberecka. Vstupní data získaná měřením 14 morfologických znaků 45 herbářových položek sbíraných na 7 lokalitách byla statisticky zpracována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Vliv pokryvnosti vegetace (zástupné proměnné charakterizující úživnost stanoviště) na morfologické znaky rostlin byl testován redundanční analýzou (RDA). Získané výsledky byly porovnány s výsledky podobných zahraničních studií. Pomocí makroskopických morfologických znaků bylo možné rostliny ze studované oblasti Liberecka rozdělit do dvou jasně oddělených skupin odpovídajících druhům *C. nigra* a *C. acuta*. Hustoty průduchů a epidermálních papil na listech byly užitečnými doplňkovými znaky pro identifikaci druhů, nicméně použití výhradně těchto znaků často nebylo pro určení druhu dostatečné. Dále bylo zjištěno, že často zmiňovaný poměr délky listene dolního klásku a délky klásku není vhodným determinačním znakem. Vliv pokryvnosti vegetace na variabilitu morfologických znaků nebyl prokázán.

## **Klíčová slova**

*Carex*, *Cyperaceae*, přirozená hybridizace, ostřice, literární rešerše, Liberecko, makroskopické a mikroskopické morfologické znaky, morfometrická analýza, molekulární markery

## **Annotation**

HORÁKOVÁ, N. *Natural hybridization in Carex (Cyperaceae): a review of current knowledge and an initial case study*. Hradec Králové, 2018. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Jan Košnar. 52 p.

Theoretical part of the thesis is a review of literature about phenomenon of natural hybridization, particularly in the genus *Carex* (*Cyperaceae*), and about the methods useful for detection of hybrids. Practical part deals with a morphometric study of populations of *Carex acuta*, *C. nigra* and their putative hybrids in the Liberec region. Input data, obtained by measurement of 14 morphological characters on 45 herbarium specimens, which were collected at 7 localities, were statistically evaluated using principal components analysis (PCA). Influence of vegetation cover (considered as a proxy of site productivity) was tested in a redundancy analysis (RDA). Obtained results were compared with the results of similar previous studies. Macroscopic morphological characters enabled to divide the examined plants from the studied region into two clearly separated groups that corresponded to the species *C. nigra* and *C. acuta*. Densities of stomata and of leaf epidermal papillae were found to be useful complementary characters for species identification. However, mere usage of these micromorphological characters was often insufficient for species determination. Furthermore, it was found that the frequently mentioned ratio of the length of the lowest bract and the length of the inflorescence is not a suitable distinctive character. No significant effect of vegetation cover on plant morphology was found.

## **Keywords**

*Carex*, *Cyperaceae*, natural hybridization, review, Liberec region, macroscopic and microscopic morphological characters, morphometric analysis, molecular markers

## Obsah:

1. Úvod.....	8
2. Hybridizace.....	10
3. Metody detekce.....	15
4. Ostřice.....	20
4.1. Morfologická charakteristika rodu .....	20
4.2. Genom ostřic .....	21
4.3. Hybridizace ostřic .....	21
4.4. Evropa.....	23
4.5. Asie.....	25
4.6. Severní Amerika .....	26
4.7. Kvantitativní rozdíly v pozorování hybridizace v rodu <i>Carex</i> mezi kontinenty....	27
5. Materiál a metodika .....	28
5.1. Výběr lokalit .....	28
5.2. Sběr vzorků.....	28
5.3. Popis lokalit .....	29
5.4. Měřené znaky.....	30
5.5. Způsob měření.....	31
5.6. Statistické vyhodnocení dat.....	32
6. Výsledky.....	33
7. Diskuse .....	38
8. Závěr.....	42
9. Literatura .....	43

# 1. Úvod

Hybridizace neboli křížení mezi různými taxonomickými skupinami (nejčastěji druhy) je zajímavým evolučním procesem, jehož obvyklost je ale doposud sporná. Zatímco některé zdroje její existenci dokládají četnými příklady, jiné jsou spíše zdrženlivé. Zájem o přirozenou hybridizaci v rodu *Carex* začíná už v 30. letech 19. století. Od té doby byl v poznání tohoto fenoménu učiněn velký krok vpřed. Původní metody morfologické determinace hybridů jsou postupně doplňovány metodami molekulárními, které jsou sice nákladnější a složitější, ale poskytují více informací a umožňují hlubší vhled do problematiky (Arnold 1997, Cayeoutte et Catling 1992, Řepka et al. 2014).

*Carex nigra* a *Carex acuta* (sekce *Phacocystis*) jsou ostřice hojně zastoupené na území ČR. Ve Velké Británii, Německu, Polsku a dalších zemích Evropy (např. Jermy et al. 2007, Schröder et al. 2005, Kobierski et Ryś 2017) i České republice (Kubát et al. 2002, Danihelka et al. 2012) byl jejich společný hybridní potomek pozorován a evidován často jako *Carex* × *elytroides*.

Teoretická část této práce se zabývá rešerší případů přirozené hybridizace v rodu *Carex*, a dále pak biosystematickými metodami, které jsou používány k detekci vzniklých kříženců. Praktická část je pak pilotním studiem morfologické variability druhů *C. acuta* a *C. nigra* v oblasti Liberecka. Smyslem tohoto studia bylo seznámit se s metodami morfometrické analýzy a odpovědět pomocí nich na následující dva okruhy otázek.

(1) Lze podle běžných morfologických znaků odlišit *C. acuta* od *C. nigra*? Podle některých literárních údajů (např. Řepka et Grulich 2014) se zdá, že rozdíly mezi těmito druhy jsou neostré, znaky mají kvantitativní povahu a v jejich hodnotách existují mezi oběma druhy překryvy, tedy že mezi uvedenými druhy může existovat morfologické kontinuum znemožňující spolehlivou determinaci. Toto kontinuum by mohlo znamenat (a) rozsáhlý genový tok mezi oběma druhy (přirozenou hybridizaci), který stírá rozdíly mezi oběma druhy poté, co se jejich populace ocitnou v kontaktu, nebo (b) nevhodné taxonomické rozdělení jediného (morfologicky značně variabilního) druhu do druhů dvou, na základě nadhodnocení výskytu morfologicky extrémních forem a podhodnocení frekvence výskytu forem méně vyhraněných.

(2) Literární údaje založené na studiu britských rostlin (Jermy et al. 2007, Dean et Ashton 2008, Stace et al. 2016) uvádějí, že *C. nigra* se od *C. acuta* velmi výrazně liší umístěním průduchů v listové epidermis. *C. nigra* má být epistomatická, tj. s průduchy téměř výhradně na svrchní (adaxiální) straně listu (průduchy na abaxiální straně se u ní mají vyskytovat nanejvýš řídce a výjimečně). Naproti tomu *C. acuta* má být hypostomatická, tj. s průduchy soustředěnými na abaxiální listové pokožce; adaxiální pokožka má u tohoto druhu být zcela bez průduchů nebo jen s ojedinělými průduchy. Velká četnost průduchů na obou



stranách listu pak má být známkou hybridizace mezi uvedenými druhy. Platí tyto rozdíly i u rostlin z ČR?

## 2. Hybridizace

Jediná obecně platná definice druhu nejspíše neexistuje. Nové definice, snažící se řešit nedostatky těch předchozích, si s sebou přinášejí často nové problémy. Druh můžeme sice definovat např. jako skupiny populací, které se mezi sebou mohou volně pohlavně rozmnožovat a zároveň jsou reprodukčně izolovány od ostatních takových skupin (Barton et Hewitt 1985), ale tento popis se obecně více hodí pro živočichy, zatímco u rostlin je jeho použití problematické (kvůli větší variabilitě způsobů rozmnožování u rostlin). Nejlepší se tedy zdá být vymezení druhů jako skupin organismů určením vhodných a odůvodněných kritérií, která budou brát v úvahu dosud shromážděné znalosti (Ruse 1969). Povaha takových kritérií může být dosti různá. U některých druhů se prozatím musíme spokojit pouze s morfologicky pozorovatelnými znaky, u jiných lze využívat i poznání jejich ekologie nebo areálu rozšíření, stále rostoucí význam má dnes poznání různé části genetické informace kódované v DNA.

Za přirozenou hybridizaci (přirozené křížení) se považuje v přírodě spontánně probíhající vznik potomků při pohlavním rozmnožování mezi zástupci dvou populací nebo skupin populací, které jsou rozlišitelné na základě jednoho nebo více dědičných znaků (Arnold 1997). Těmito skupinami populací se v případě vyšších rostlin obvykle rozumí taxony na úrovni druhů, méně často poddruhů či variet, výjimečně také rodů. Předpokládá se, že uvnitř takto rozlišitelných populací (nebo skupin populací) jsou si jedinci navzájem příbuznější a geneticky podobnější než mezi těmito populacemi (skupinami populací). Při hybridizaci tedy náhle vznikají jedinci se zcela neobvyklými kombinacemi genů. Prvním, a nezájímavě i posledním, produktem křížení je vznik první generace potomků – kříženců první filální generace (*F1 hybrids*). Jejich životaschopnost a plodnost (fertilita, tj. schopnost tvořit pohlavním procesem další potomky) je různá, zpravidla nízká (odtud někdy pramení pohled na hybridy jako na méněcenné „omyly přírody“); z evolučního hlediska však má zásadní význam skutečnost, že někdy se někteří primární kříženci dokážou dále rozmnožovat (Arnold 1997). V případě vyšších rostlin tak mohou činit (1) nepohlavně (apomikticky) nebo vegetativně, (2) křížením mezi sebou navzájem (za vzniku následných filálních generací – F2, F3 atd.) nebo (3) zpětným křížením (*back-crossing*) s jedinci některého z rodičovských druhů. Takové zpětné křížení může probíhat opakovaně v mnoha následných generacích (B1, B2, B3 atd.) a jeho důsledkem je introgrese – vnášení genů jednoho druhu do dědičné informace jiného druhu.

Hybridní zóny se dají podle svého vzniku rozdělit na dva typy. V primárních hybridních zónách nebyly areály výskytu rodičovských druhů nikdy zcela odděleny, mezi rodičovskými druhy nedošlo k dokonalé reprodukční izolaci a přetrval mezi nimi tok genů (u rostlin nejčastěji přenosem spor, pylu nebo semen mezi populacemi odlišných druhů; Barton et Hewitt 1985, Coyne et Orr 2004). Sekundárně se hybridní zóny mohou vytvářet stykem populací, které byly

geograficky odděleny a tok genů byl mezi nimi nějakou (někdy i velmi dlouhou) dobu zastaven (Jiggins et Mallet 2000). Oddělení populací a přerušení genového toku může mít i jiné příčiny než geografické – např. těsnou vazbu druhů na ekologicky odlišná stanoviště v rámci lokality. Při změně stanovištních podmínek (např. lidskou činností) pak může vzniknout nový „hybridní“ biotop (s podmínkami umožňujícími přítomnost obou druhů) a nastat sekundární kontakt dříve izolovaných populací (Grootjans et al. 1987).

Hybridní zóny je možné dělit také na základě fenotypu jedinců a míry zastoupení (vyjadřující úspěšnost) hlavních kategorií fenotypů v populaci. V bimodálních hybridních zónách převažují jedinci odpovídající fenotypu jednoho nebo druhého rodičovského druhu. Jedinci s intermediárními znaky jsou zastoupeni v minimálním množství. V unimodálních hybridních zónách se nacházejí převážně jedinci s intermediárními znaky, tedy hybridi jsou v těchto zónách úspěšnější než rodiče. Pojmenování vychází z křivek grafického znázornění četnosti (frekvence) jedinců hybridů a rodičovských druhů v populaci. Tyto dva typy se také liší silou působení prezygotických a postzygotických izolačních mechanismů. V unimodálních zónách nejsou tyto mechanismy dost účinné na to, aby zabránily vzniku intermediálních jedinců. V případě bimodálních zón jsou izolační mechanismy silnější. V „ploché“ hybridní zóně (která je přechodným typem mezi zónou unimodální a bimodální) se uplatňují v podobné míře rodičovské druhy i hybridi (Jiggins et Mallet 2000); jde o situaci, kdy znaky používané pro identifikaci druhů nemají význam pro *fitness* (zdatnost, úspěšnosti) jedinců, a proto nedochází k výrazné negativní selekci žádného z rozlišovaných fenotypů (ani rodičovských, ani hybridních). Klina je model spojitě změny hodnot jednoho znaku. Její průběh se mění podle toho, jaký znak přechází přes hybridní zónu. Neutrální (neselektovaný) znak přechází poměrně snadno, ale znak selektovaný nikoliv (Macholán et Munclinger 2007). Přejít selektovaného znaku vytváří bimodální hybridní zónu, ve které jsou upřednostňovány kombinace rodičovských alel před hybridními kombinacemi. Znak neselektovaný není podroben přirozenému výběru, resp. na něm nezávisí *fitness* jedince a tím pádem není potlačována kombinace rodičovských ani hybridních alel. Ishida et al. (2003) popisují jako bimodální hybridní zónu japonských dubů (*Quercus crispula* a *Q. dentata*). Jako unimodální se jeví hybridní zóna myší (*Mus musculus musculus* a *M. m. domesticus*) na území Dánska (Smadja et al 2003). „Plochou“ zónu je možné pozorovat v některých případech (v jiných už přechází do bimodální) hybridních zón motýlů z rodu *Anartia* v Panamě (Dasmahapatra et al. 2002).

Ačkoliv při studiu hybridizace lze křížení provádět v laboratořích, jedná se o velmi nákladnou a technicky náročnou metodu. Hybridní zóny v některých případech mohou nabídnout vhodnou alternativu. Nejenže křížení probíhá samovolně, ale navíc vzniklí hybridi jsou podrobeni působení přírodního výběru, který lze v laboratorních podmínkách jen velmi těžko simulovat. Tyto areály lze proto nazývat „přírodními laboratořemi“ (Macholán et Munclinger 2007).

Modelů snažících se vysvětlit fungování hybridních zón je hned několik. Campbell et Waser (2007) rozdělují tyto modely podle toho, zda přihlíží při hodnocení úspěšnosti hybridů i na vliv prostředí. Do kategorie “environmentálně nezávislé” patří často zmiňovaný model tenzních zón, který za klíčový faktor považuje „napětí“ mezi dvěma protichůdnými jevy – endogenní selekcí (přirozeným výběrem na základě vlastností na genomické úrovni bez ohledu na vnější prostředí) a disperzí (rozptylem). V modelu tenzních zón se počítá s tím, že hybridy mají nižší *fitness* než rodičovské druhy (Campbell et Waser 2007, Bariotakis et al. 2016).

Proti tenzním zónám, které počítají jen s endogenními faktory (vrozenými vlastnostmi organismu nezávislými na prostředí) stojí model evoluční novinky, který zohledňuje jak endogenní, tak i exogenní faktory, tedy vliv prostředí (Arnold 1997). S hypotézami hybridních zón souvisí i relativní *fitness* hybridů. Často panuje představa, že přírodní výběr razantně znevýhodňuje vzniklé křížence (Macholán et Munclinger 2007), tato situace se označuje jako *hybrid inferiority*. Arnold (1997) ale zmiňuje hned několik studií, které prokázaly, že *fitness* hybridů nemusí být nutně menší než *fitness* jedinců rodičovských taxonů. V závislosti na momentálně panujících podmínkách prostředí tedy může docházet i k opačnému jevu – *hybrid superiority* (též heterozní efekt) – kdy kříženci jsou životaschopnější a úspěšnější než jejich rodičovské druhy (Moore 1977). Významným důsledkem tohoto jevu může být vznik taxonů, které díky novým vlastnostem, odlišným od původních druhů, mohou obsazovat novou niku a tím působit změny až na ekosystémové úrovni. Jsou známé případy, kdy hybridizací invazních druhů vznikají obzvláště agresivní (neboli velmi zdatné) taxony, které dokáží rychle měnit charakter lokalit (Hegarty et Hiscock 2005). Příkladem může být křížení trav rodu *Spartina* v kalifornských slaných bažinách. Původní *S. foliosa* je ohrožována spontánní hybridizací s invazivní *S. alterniflora*. Hybridní potomstvo vytlačuje původní rodičovský druh a navíc se více podobá invazivní *S. alterniflora*, což zřejmě povede k markantním změnám biotopu, které budou mít dopad na pobřežní ptactvo i na přilehlý mořský život (Wolf et al. 2001, Anttila et al. 1998). Riziko spojené se zánikem nebo oslabením původních populací existuje i na našem území. Tento jev byl zaznamenán u v ČR nejspíš vyhynulé *Gentianella germanica* subsp. *germanica*, jejíž poslední pozorované rostliny se křížily s *Gentianella praecox* subsp. *bohemica* (Kirschner et Kirschnerová 2000). Dalším příkladem je oslabování populací borovice blatky (*Pinus uncinata* subsp. *uliginosa*) křížením s borovicí lesní (Businský 2009).

Hybridizace může mít vliv na míru přirozené rezistence k určitým druhům patogenů a parazitů. Výsledky studie provedené v Kanadě na *Carex limosa*, *C. rariflora* a jejich téměř sterilnímu hybridovi ukazují, že existuje korelace mezi výskytem hybridů a patogenů (sněti *Anthracoidea limosa*). Sněti se mnohem lépe dařilo na hybridech než na mateřských druzích a zároveň mnohem více napadala *C. limosa* v případě, že v populaci bylo vysoké zastoupení hybridů. Důvody proč tomu tak je, jsou dva. Prvním možným důvodem jsou odlišnosti v genetické

resistenci a druhým je jiná fenologie. Ačkoliv jsou hybridy víceméně neplodní, mají podobný povrch blizny a dobu kvetení jako rodičovské druhy. Jelikož nedochází k fertilizaci, zůstávají blizny déle otevřené a tím vzniká cesta pro sněť, která má mnohem více času na napadení jedince. *Carex rariflora* má dobu kvetení dříve než *C. limosa* i hybrid a proto se se snětí prakticky nemůže setkat (McIntire et Waterway 2002).

Mezidruhovú hybridizace a introgrese jsou (spolu s rekombinacemi a horizontálním přenosem genů) důležitými mechanismy zodpovědnými za nikoli čistě divergentní, nýbrž retikulární povahu evoluce (Arnold 1997, Peris et al. 2014). Udává se, že hybridizace stála za vznikem 30–80 % rostlinných druhů (Floate et al. 1993, Wendel et al. 1991). Mallet (2007) rozlišuje speciace podle toho, jestli dochází nebo nedochází ke změně ploidie (tj. počtu homologních sad chromozomů). Homoploidní speciace zahrnují hybridizaci mezi dvěma taxony, při níž nedochází ke změně počtu chromozomálních sad. Tento druh hybridní speciace je běžný u živočichů, neboť změna ploidie je pro ně mnohem častěji fatální než u rostlin. Polyploidní speciace produkují potomky s jiným počtem chromozomálních sad, než vykazovaly rodičovské taxony. Tato změna počtu chromozomů mnohdy působí jako reprodukční bariéra, která brání vzniku fertilních gamet při zpětném křížení s rodičovskými druhy (Mallet 2007). Jako stabilizační mechanismus speciace hybridogenních taxonů většinou slouží apomixie, vegetativní rozmnožování nebo stálá lichá polyploidie, které sice brání zpětnému křížení s rodičovskými druhy, ale umožňují rozmnožování kříženců (Ellstrand et al 1996).

Křížence lze považovat za samostatný hybridogenní taxon až ve chvíli, kdy si jsou schopni z generace na generaci předávat své charakteristické unikátní vlastnosti a vybudují si izolaci, ať už genetickou nebo ekologickou, která ukončí výměnu jejich genů s rodičovskými taxony. Allopolyploidní hybridy jsou často „chráněni“ proti zpětnému křížení odlišnou ploidií. Homoploidní hybridy si musí vytvořit postzygotické bariéry, které jim nedovolí zpětné křížení s rodičovskými taxony (Hegarty et Hiscock 2005).

Bariérami se míní reprodukčně izolační mechanismy (RIM), které vylučují nebo alespoň znesnadňují mezidruhovú křížení. Aby docházelo ke křížení druhů, musí docházet k toku genů mezi nimi. RIM můžeme z jejich základní podstaty rozdělit podle toho, kdy působí a kde. Rozlišujeme prezygotické a postzygotické bariéry.

Prezygotické působí před vznikem zygoty; do této skupiny lze zařadit mechanismy ekologické, morfologické nebo například časové. Časové rozrůznění může být sezónní nebo i denní (např. odlišná doba kvetení různých druhů v rámci roku nebo dne). Další významnou bariérou je květní rozrůznění, které se může projevit mechanickou neslučitelností pylu a pestíku, ale i ekologickými odlišnostmi, jako je jiný systém opylení. Je například známo, že délka čnělky mateřského druhu se odráží v rychlosti růstu a celkové délce pylové láčky. U taxonů s výrazně odlišnou délkou čnělky, tedy může lehce dojít k abortaci pylové láčky a zamezení výměny genů (Arnold 1997). Pod pojmem ekologická bariéra by

se dal představit stav, kdy druhy sdílí areál, ale preferují odlišné ekotopy. U zoogamních rostlin je podstatnou bariérou specializace opylovačů na omezené spektrum druhů. Tato forma etologické izolace je obzvláště zásadní pro blízce příbuzné taxony, u kterých může být hlavní bariérou toku genů (Arnold 1997). Na druhou stranu je známo, že opylovači si mohou „splést“ i druhy značně odlišné (Janovský 2012).

Postzygotické bariéry působí až po vytvoření zygoty a projevit se mohou, mortalitou zygot, oslabením až neživotaschopností kříženců nebo sterilitou vzniklých hybridů (Levin 1978).

### 3. Metody detekce

Metod pro detekci hybridů v rostlinné říši existuje celá řada. Obecně se dá říci, že rozhodovat o hybridním původu jedince můžeme na bázi fenotypu nebo genotypu. Dají se pro přehlednost roztrdit do tří kategorií, a to na metody morfologického charakteru, chemického charakteru a charakteru molekulárního (Rieseberg et Ellstrand 1993).

Rozlišování hybridů na základě morfologického charakteru má své nesporné výhody. První z nich je zajisté fakt, že se dá alespoň částečně aplikovat již v terénu bez nutnosti zvláštního vybavení. Nejedná se ovšem o zcela spolehlivou metodu. Rostliny v rámci jednoho druhu se mohou od sebe znatelně lišit, což komplikuje determinaci. Těžko se posuzuje, jestli za změnou fenotypu stojí hybridizace (tj. změna genotypu) nebo se jedná o fenotypovou plasticitu, tedy změnu, která byla vyvolaná snahou vyrovnat se s lokálními podmínkami v rámci jednoho genotypu, který dokáže generovat více odlišných fenotypů (Joshi et al. 2001). Předpoklad, že znaky hybridů budou na pomezí mezi rodičovskými znaky, je také nejistý, protože se ukazuje, že někteří kříženci se projevují mozaikou fenotypu svých rodičů. Při introgresi se mohou fenotypové rozdíly mezi potomstvem a původní rodičovským druhem minimalizovat do takové míry, že nebudou od sebe rozeznatelní (Allendorf et al. 2001). Při vyhodnocování morfologických dat lze využít více metod. Smith a Waterway (2008) v případové studii hybridizace v rámci komplexu *Carex complanata* pracují s mnohorozměrnými statistickými metodami, konkrétně využívají Gowerův koeficient podobnosti a analýzu hlavních koordinát (PCoA). U mnohorozměrných statistických metod zůstávají při výzkumu hybridních populací okruhu *Carex flava* i Blackstock a Ashton (2010), kteří zvolili pro vyhodnocení analýzu hlavních komponent (PCA). Mnohorozměrné statistické metody jsou vhodným prostředkem pro analýzu složitých dat (Haruštiaková et al. 2012). Alternativně lze při vyhodnocení morfologických dat využít různých indexů intermediarity, které jsou výpočetně méně náročné, ale zároveň více redukuje vstupní informace. Příkladem využití takových indexů je studie hybridizace v rodu *Betula* na Islandu (Thórsson et al. 2007).

Chemická metoda detekce je založena na porovnávání složení některých chemických sloučenin mezi jednotlivými druhy. Tato metoda není často využívána, protože pokud už je vzorek nutno zkoumat v laboratoři za pomoci speciálního vybavení, je výhodnější investovat do molekulárních metod, které jsou více informativní (Rieseberg et Ellstrand 1993).

Nejspolehlivější možností je využití molekulárních metod. Molekulární markery signalizují hybridizaci buď na základě variability v tvorbě produktů buněčného metabolismu, nebo na základě variability v samotné DNA. Další alternativou může být například průtoková cytometrie, která dokáže identifikovat hybrida na základě rozdílné (intermediární) velikosti genomu. Musí být ale splněna podmínka, že rodičovské druhy mají dostatečně odlišnou velikost genomu. Za zmínku také stojí metoda GISH (genomová *in situ* hybridizace), která přímo určí chromozomy od

jednotlivých rodičů (Barre et al. 1998). Kopecký et al. (2006) zmiňují, že metoda GISH bývala poměrně náročnou a finančně nákladnou metodou, ale během posledních let se podařilo vyvinout nové postupy, které práci s touto metodou zjednodušují a její komerční využití je teď dostupnější. Komplikací této metody se může stát složité určení optimální koncentrace blokovací DNA, která se využívá pro zvýšení specifičnosti sondy (například při repetitivní sekvenci DNA, která „kontaminuje“ sondu, se po dodání blokovací DNA potlačí hybridizace na těchto místech a tím se zabrání nespecifickému signálu; Melo 2005).

Jako molekulární markery jsou využívány makromolekuly (proteiny, DNA, RNA). V druhé polovině minulého století využití těchto markerů při detekci hybridizace umožnila nově vyvinutá proteinová elektroforéza, která dokáže rozdělit molekuly podle jejich pohyblivosti v elektrickém poli. Z proteinů se využívají hlavně isozymy, což jsou varianty enzymů, které katalyzují stejnou reakci, ale mají navzájem mírně odlišné složení (Allendorf et al. 2001, Pospíšková et Vacková 1997). Předpokládá se, že běžně studované isozymy jsou selektivně neutrální znaky (tj. že neexistují selekční tlaky preferující určitou variantu enzymu), a proto neodrážejí vlivy prostředí, pouze genetickou konstituci organismu. Příkladem použití isozymů jako molekulárních markerů je studie hybridů *Festuca arundinacea* × *Lolium multiflorum*, kterou provedli Eizenga et Buckner (1986). Ti porovnávali zymogramy rodičovských druhů a hybridů. Z pěti různých enzymů, které testovali, se osvědčily fosfoglukózaizomeráza, 6-fosfogukonátdehydrogenáza a malátdehydrogenáza. Tyto enzymy reflektovaly různou ploidii rodičů (diploidní *Lolium* a hexaploidní *Festuca*) a tetraploidních hybridů na isozymových „proužcích“. Rozdíl mezi zymogramy *Lolium* a hybridů byly dostatečně průkazné. Odlišení hybridů od *Festuca* na základě těchto tří enzymů nebylo možné.

Během posledních zhruba 30 let v rostlinné systematice výrazně přibývá studií, které pomocí molekulárně biologických technik porovnávají podobnost organismů přímo na úrovni DNA. Výhodou práce se základní genetickou informací je skutečnost, že změna genotypu se nemusí projevit na dalších úrovních. Dalším přínosem je, že tyto markery nejsou ovlivněny prostředím. Analýza DNA je tak nejspolehlivější metodou detekce hybridizace (Jankovský et Šmerda 2003). Hybridní F1 generace by měli v analýzách jaderných DNA markerů vykazovat kombinaci znaků obou rodičů (tzv. aditivní *pattern*; Lo 2010). Po zpětném křížení by se znaky měly přiblížit více na stranu příslušného rodičovského druhu. Hybridogenní taxony (tj. příslušníci evoluční linie vzniklé dávnou hybridizační událostí) si mohou po čase vytvořit vlastní znaky, které nejsou přítomny u žádného z původních rodičovských druhů, což může komplikovat rozpoznávání hybridního původu (Abbott et al. 2013).

Analýza haplotypů chloroplastové DNA (cpDNA) je založena na variabilitě v sekvenci (pořadí) nukleotidů kódujících daný úsek DNA. Tato variabilita se objeví buď po změně báze v nukleotidu nebo inzercí (vložením) či delecí (vymizením) několika nukleotidů; molekulární příčinou těchto změn jsou nepřesnosti v činnosti



DNA polymerázy během replikace DNA. Chloroplastová DNA je vhodná díky svojí relativně vysoké stabilitě a dědičnosti výhradně v linii jednoho z rodičů. Většina rostlin dědí chloroplasty po „matce“ (tj. po rostlině, která byla při pohlavním procesu donorem vaječné buňky). I v případě biparentální dědičnosti (kdy cpDNA předávají obě rodičovské rostliny) převládá maternální informace (Whatley 1982). Významnou výjimkou z převážně maternální dědičnosti cpDNA je paternální dědičnost objevující se napříč celým oddělením nahosemenných rostlin (Neale et al. 1989). Toho, že informace, které získáme, ukazují jen na jednoho z rodičů, lze využít k určení směru toku genů (v podobě směru pohybu spor nebo pylových zrn) při hybridizaci (Kim et Donoghue 2008).

Sekvence nukleotidů v ITS (*internal transcribed spacer*) v jaderné ribozomální DNA (nrDNA) jsou užitečným markerem díky možnosti použití univerzálních primerů při amplifikaci, což zaručuje relativní finanční dostupnost. Jedná se o nekódující oblast mezi dvěma kódujícími oblastmi ribozomální DNA. Zásadní výhodou ITS pro studium hybridizace je biparentální přenos těchto markerů. Hybridní jedinec může být identifikován podle tzv. aditivního *pattern* rodičovských alel – přítomnosti obou rodičovských variant ITS ve svém jaderném genomu. Na druhou stranu, ITS sekvence se někdy mezi blízkými příbuznými druhy prakticky neliší (např. Košnar et al. 2010) a jako marker pro studium hybridizace jsou v takovém případě nepoužitelné (Álvarez et Wendel 2003). Jinou nevýhodou je pak také skutečnost, že v mnoha případech přítomnost dvou rozdílných variant ITS v jednom jádře znemožňuje klasické (Sangerovo) sekvenování DNA (vzniká nečitelný signál). Je pak nutné rodičovské varianty před sekvenací nejprve separovat pomocí molekulárního klonování nebo používat sekvenování nové generace (*next generation sequencing*, NGS), např. metody Illumina nebo *single molecule real time sequencing* (SMRT). Tyto postupy umožňují paralelní sekvenování jednotlivých molekul DNA (Konečná 2010).

Dalším užitečným molekulárním markerem jsou SSRs (*simple sequence repeats*), neboli mikrosatelity. Jedná se o sekvence repetitivní DNA, složené z opakujících se jednotek o velikosti, která většinou nepřesahuje šest nukleotidů. Jsou to relativně krátké úseky DNA s kodominantní povahou. Lze je snadno amplifikovat pomocí PCR. Vyznačují se vysokou mírou polymorfismu (tzn., že je v rámci jedné populace najdeme ve více variantách), který je způsoben jejich značnou mutační rychlostí (Chistiakov et al. 2006). Výhodou při použití je nutnost jen malého množství DNA (Mitrová et Ovesná 2015).

AFLP (polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů) je restriční metoda, která umožňuje analýzu variability v celkové genomové DNA a současně nevyžaduje znalosti o struktuře genomu. Během této metody je nejdříve nutné rozštěpit DNA pomocí dvou restričních endonukleáz. Druhým krokem je ligace, během které dochází činností ligáz k navázání adaptorů na konce fragmentů vzniklých činností restričních enzymů. Následuje preselektivní PCR amplifikace, při které dochází k namnožení úseků rozeznávaných díky navázaným adaptorům preselektivními primery. Vzniklé fragmenty pak slouží jako templát pro selektivní

PCR reakci, kdy dochází k pomnožení pouze části genomických fragmentů. Toho je dosaženo použitím primerů, které jsou arbitrárně prodlouženy o několik nukleotidů, jež zasahují do sekvence genomického fragmentu a tím eliminují fragmenty s nekomplementární sekvencí. Po dokončení se výsledek vyhodnotí pomocí automatického sekvenátoru. Jedná se o užitečnou metodu, která má ale i své nevýhody. Hlavní známou komplikací je náročnost této metody na kvalitu vstupní DNA – problémem může být např. použití DNA izolované ze starších herbářových položek (Lajkepová 2013).

RAPD (random amplified polymorphic DNAs) je metoda jednoduchá na provedení, vyžadující pouze malé množství genomické DNA a použitelná i bez předchozí znalosti genomu studovaného organismu. Zásadní nevýhodou je její citlivost, která komplikuje její opakované provedení například v jiné laboratoři. Je také méně informativní kvůli nižší úrovni polymorfismu oproti AFLP nebo mikrosatelitům (Hadrys et al. 1992, Liu et Cordes 2004). Přesto se metoda pro detekci hybridů používá (Saeedi et al. 2012).

Další vhodnou metodou je ISSR (*inter-simple sequence repeats polymorphism*), která poskytuje mnoho variabilních markerů, vystačí si s malým množstvím genomové DNA a je v porovnání s jinými markery finančně dostupnější (Ng et Tan 2015). Tato metoda byla mnohokrát úspěšně použita při detekci hybridizace (García-Maroto et al. 2003, Goldman 2008, Wolfe et al. 1998). Jako užitečná se podle Korpelainen et al. (2010) ukázala být při řešení taxonomických otázek v kombinaci s analýzou ITS. ISSR nebyly samostatně dostatečně informativní při detekci hybridizace a introgrese v rodu *Carex*, ale při použití společně s daty ze sekvenování ITS se ukázaly jako velmi užitečné.

V minulosti se využívaly analýzy RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) oblasti IGS (*intergenic spacer*, nekódující sekvence mezi jadernými geny pro ribozomální RNA) pro určení původních rodičovských druhů existujících hybridních taxonů (Hegarty et Hiscock 2005). Zdá se, že v posledních letech zájem o tuto metodu upadá. Nahrazují ji jiné molekulární markery, které jsou jednodušejší a použitelné, více informativní a nevyžadují použití radioaktivních materiálů (Garcia et al. 2004). Jednodušší modifikací výše uvedené metody je PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) chloroplastové DNA. Při ní je nejprve pomocí univerzálních primerů (konzervativní části genů v plastidové DNA) amplifikován určitý úsek cpDNA a ten je následně podroben štěpení jednou nebo více restriktivními endonukleázami. Využívá se skutečnosti, že každá restriktivní endonukleáza štěpí molekulu DNA v určitém místě, definovaném krátkou specifickou sekvencí nukleotidů. Na přítomnosti a pozici těchto sekvencí v amplifikované DNA pak závisí délka výsledných fragmentů, které lze od sebe elektroforeticky oddělit a vyhodnotit jejich zastoupení ve zkoumaném vzorku. PCR-RFLP cpDNA lze v řadě případů použít pro zjištění, který rodičovský druh byl donorem vaječné buňky. Například Kochert et al. (1996) díky této metodě dokázali určit směr toku genů při hybridizaci *Arachis duranensis* a *A. ipaensis*.

V současnosti dochází i při studiu mezidruhové hybridizace k rozvoji použití metod zahrnujících NGS. Kromě výše uvedené analýzy vzorků obsahujících více variant ITS se využívá např. sekvenování RAD (*restriction site associated DNA*). Princip této metody připomíná AFLP, ale výsledné genomické fragmenty jsou sekvenovány pomocí NGS. Maguilla et al. (2017) pomocí RAD sekvenování (v kombinaci se sekvenováním chloroplastové DNA) rekonstruovali přibližný průběh diferenciaci dvou druhů stejnoklasých ostřic (*C. furva* a *C. lucennoiberica*) na Pyrenejském poloostrově během čtvrtohor, včetně podílu alopatrické speciaci a hybridizace při druhotném kontaktu populací.

## 4. Ostřice

### 4.1. Morfologická charakteristika rodu

Rod *Carex* je jedním z nejrozšířenějších a ekologicky nejdůležitějších v rostlinné říši. Zároveň je druhově nejbohatším rodem čeledi šáchorovitých (*Cyperaceae*), na celém světě je známo okolo 2000 druhů ostřic (Dragon et al 2008). V České republice je zastoupen více než 80 druhů (Danihelka et al. 2012). Ostřice rostoucí na našem území obsazují většinou biotopy mokřadního charakteru, jako vlhké louky, bažiny, litorální zóny vodních ploch nebo rašeliniště (Řepka et Grulich 2014). Tyto rostliny patří do skupiny graminoidů, což je skupina, která svým vzhledem připomíná lipnicovité (tedy pravé trávy).

Jedná se o polykarpní trvalky, které využívají pro opylení anemogamie. Vždy mají jednopohlavné květy bez květních obalů, které vyrůstají z paždí listenu, který se nazývá pleva. Květy vyrůstají v kláscích a podle jejich uspořádání se dají ostřice rozdělit do tří morfologických typů. Prvním z nich jsou ostřice homostachyátní (stejnoklasé), u nichž se v klásku nachází samčí i samičí květy zároveň a všechny klásky na rostlině vypadají přibližně stejně. Druhý typ, který se označuje jako heterostachyátní (různoklasé) s čistě samčími (vzácněji oboupohlavnými) klásky umístěnými nad čistě samičími klásky. Třetím typem jsou ostřice unispikátní (jednoklasé), s jediným klasem, tvořeným u některých druhů samčími i samičími květy (jednodomé jednoklasé ostřice), zatímco u jiných druhů pouze květy jednoho pohlaví (dvoudomé jednoklasé ostřice). V samčím květu jsou dvě nebo tři tyčinky. Samičí květ se skládá z jediného pestíku, který je uzavřen ve zvláštním listenu se srostlými okraji – tzv. mošničce (perigynium, utriculus; Jegorova 1999). Mošničky bývají trojhranné nebo bikonvexní. Morfologické vlastnosti mošničky často patří k důležitým determinačním znakům (Řepka et Grulich 2014). Plodem je nažka uzavřená v mošničce. Primárním mechanismem šíření semen je barochorie, ale setkat se můžeme i s anemochorií (*Carex arenaria*, *Carex physodes* a další), hydrochorií (*Carex rostrata*, *Carex riparia* a další), endoornithochorií, epizoochorií (například *Carex bohemica*) a některé lesní druhy jako *Carex digitata* využívají myrmekochorii (Jegorova 1999).

Při určování se dále využívá typ odnožování – je tak možné rozdělit ostřice na trsnaté a výběžkaté s plazivým oddenkem. Oddenek bývá sympodiální, vzácněji monopodiální. Podstatnými znaky jsou též barva a struktura pochvy listu a tvar jazýčku. Při klíčení se formuje primární kořen, který je po dvou až třech měsících nahrazen adventivními kořeny. Tloušťka kořenů, jejich barva a barva kořenových vlásků může být vhodným znakem pro učení některých druhů. Stonek bývá dlouhý 3–120 cm a široký v průměru 0,3–7 mm, více či méně trojhranný, plný nebo dutý, s konkávními nebo rovnými stranami, obvykle pokrytý papilami, listnatý, s nody většinou nahlučenými u báze. Lodyhy s rozmnožovací funkcí jsou zakončeny klásky, zatímco vegetativní výhony se skládají především z listů, jejichž pochvy se přes sebe překládají a někdy mohou vytvářet útvary připomínající stoněk

(nepravé stonky, *pseudoculms*). Listy bývají trojřadé. Podle zakončení nezelené bazální listové pochvy můžeme dělit ostřice na phyllopodní a aphylopodní, při čemž u první skupiny na pochvu navazuje část odumřelé čepele, zatímco u druhé skupiny čepel úplně chybí a vytváří se tzv. katafyly, které připomínají šupiny. Barva bazálních listových pochev se pohybuje od hnědé, fialové, načervenalé přes slámově žlutou až k odstínům černé nebo bílé. U některých ostřic může být barva permanentní, ale u většiny se více či méně mění podle charakteru prostředí. Okraje listů bývají drsné nebo dokonce ostré, díky zoubkům, které mohou při doteku poranit kůži, což dalo nejspíš ostřicím jejich české jméno. Epidermální buňky listů jsou často opatřené trichomy ve formě papil, vzácněji chloupků. Mezi jednotlivými druhy se mění jejich tvar a četnost. Stomata jsou paracytická a mohou být umístěná na horní, dolní nebo obou stranách listu (Jegerova 1999).

Druhy ostřic se na základě morfologické podobnosti a předpokládané příbuznosti seskupují do tzv. sekcí. Jegerova (1999) rozlišuje v oblasti kontinentální severní Eurasie asi 130 sekcí.

## 4.2. Genom ostřic

Rod *Carex* se vyznačuje několika karyologickými zvláštnostmi. Chromozomy ostřic jsou holocentrické, tedy postrádají centromeru a kinetochor je tedy rozprostřen po celé délce chromatid (Rotreklová et al. 2011). Dalším jevem je velmi častý výskyt fúzí a rozpadů chromozomů při meióze. Holocentrický charakter chromozomů způsobuje, že i malé fragmenty chromozomů mohou být při buněčném dělení přeneseny do nově vzniklých jader. Často se zdůrazňuje, že takto u holocentrických organismů (mj. ostřic) dochází ke zvyšování počtu chromozomů a přestavbám karyotypu, aniž by se měnil celkový obsah DNA v jádře – jev bývá označován jako agmatoploidie (Lipnerová et al. 2013). Dále se někdy předpokládá, že frekvence polyploidních událostí je u ostřic velmi nízká, ačkoliv u některých jiných rodů čeledi *Cyperaceae* se jedná o častý jev (Rotreklová et al. 2011). Existují však také názory, které zpochybňují výjimečnost chromozomální evoluce u holocentrických organismů a upozorňují, že řada případů tzv. agmatoploidie může ve skutečnosti odpovídat polyploidii nebo dysploidii, tedy genomovým změnám stejným jako u organismů s monocentrickými chromozomy s lokalizovanou centromerou (Guerro 2016). V každém případě v rodu *Carex* existuje velká variabilita chromozomových počtů, které se pohybují od  $n = 6$  do  $n = 66$ , což může mít význam jak pro vnitrodruhovou variabilitu, tak pro speciaci v rámci rodu *Carex* (Hipp et al. 2009). Na druhou stranu jsou známy druhy ostřic, které jsou morfologicky velmi proměnlivé, ale přitom karyologicky (z hlediska počtu chromozomů) variabilní velmi málo – např. *Carex nigra* (Faulkner 1972).

## 4.3. Hybridizace ostřic

Ostřice patří do čeledi šáchorovité (*Cyperaceae*), která patří mezi čeledi s relativně největším počtem hybridů vůči počtu druhů v ČR – na 110 našich druhů této čeledi

připadá 39 předpokládaných mezidruhových hybridů (Lajkepová 2013). Počet hybridů vůči počtu druhů v čeledi je velmi rozdílný napříč rostlinnou říší. Některé čeledi v ČR se zdají být zcela bez hybridizace, například lilkovité (*Solanaceae*) nebo česnekovité (*Alliaceae*). Jiné produkují jen velmi málo hybridů (*Apiaceae*, *Fabaceae*) a další jsou naopak mezidruhovému křížení silně nakloněny, vedle již zmíněných šachorovitých lze zmínit i krtičníkovité (*Scrophulariaceae*) nebo pupalkovité (*Onagraceae*; Lajkepová 2013).

Problémem jsou odlišnosti v nomenklatuře mezi Severní Amerikou a Eurasií. Ačkoliv se na obou územích vyskytují totošní hybridy a měli být pojmenováni stejně, mohou se objevit výjimky (Cayouette et Cattling 1992).

Zdá se, že v některých sekcích *Carex* je hybridizace mnohem častější než v jiných, jmenovitě se jedná o *Vesicariae*, *Ceratocystis*, *Temnemis*, *Phacocystis*, *Canescentes* a *Physoglochin*. Většinou se rostliny kříží v rámci jedné sekce. Zajímavé je, že známí hybridy z rodu *Carex* jsou vždy vlhkomilné druhy a nebyl ještě objeven hybrid suchých ekotopů (Jegorova 1999).

Důležité informace přináší experimentální studie ze sekce *Acutae* (podle dnešní nomenklatury sekce *Phacocystis* – skupina různoklasých ostřic se dvěma bliznami, v ČR zastoupené druhy *Carex acuta*, *C. bigelowii*, *C. buekii*, *C. cespitosa*, *C. elata* a *C. nigra*) založené na studiu karyotypu, fertility a klíčivosti semen hybridních rostlin (Faulkner 1972 a 1973). Autor citovaných prací např. zjistil, že pylová zrna hybridů jsou mnohem více velikostně variabilní než pylová zrna jejich rodičů. Největší a nejmenší pylová zrna by pak mohla mít problém s oplodněním vaječné buňky a tvorbou zygoty, což by vysvětlovalo sníženou fertilitu hybridů. U pokusů s klíčivostí nezaznamenal sníženou klíčivost hybridních semen. Semena dobře získatelných hybridů klíčila dobře (u hůře získatelných nebylo možné nic konstatovat, kvůli nedostatku semen pro stanovení procenta klíčivosti). Snížená klíčivost byla zaznamenána u zpětného křížení *C. elata* × *C. nigra* s rodičovskými druhy, ale u ostatních zpětných křížení detailní zkoumání neproběhlo, takže nelze říci, do jaké míry je toto obvyklé. Jedinci vzniklí zpětným křížením občas vykazovali různé poruchy (například nanismy), které pro rostliny nebyly v umělých podmínkách fatální (v přirozeném prostředí by byl jejich dopad nejspíše větší). Z cytologického zkoumání popisuje, že F1 hybridé mají narušené párování chromozomů při meióze (výjimku v podobě zcela pravidelného párování zjistil u křížence *C. juncella* × *C. nigra*, ale tu připisuje spíše spornému taxonomickému pojetí – hranice mezi druhy *C. nigra* a *C. juncella* jsou totiž nejasné a je možné, že jde ve skutečnosti o jediný druh).

Na studium chromozomů při hybridizaci navazuje Luceño (1994), který zmiňuje ve své cytotaxonomické studii dva hybridy vyskytující se ve Španělsku, a to *C. muricata* × *C. divulsa* a *C. remota* × *C. paniculata*. Zjišťoval případné rozdíly v polohách a počtech chromozomů při meióze během metafáze. Zvláštní pozornost je věnována druhému zmiňovanému hybridovi, který vykazuje velké množství univalentů (nеспárovaných chromozomů) špatně rozpoznatelných díky své velikosti od bivalentů a rozdílné počty chromozomů dokonce i v rámci jedince.

Jedná se o hybrida vzniklého křížením rodičů z různých sekcí. Vzniklé odchylky ukazují, že k diferenciaci rodičovských druhů došlo znatelněji dříve než u *Carex muricata* × *C. divulsa*.

#### 4.4. Evropa

Za jedno z prvních konstatování hybridizace v rodu *Carex* je považována práce z roku 1830 německého botanika Wilhelma Gottfrieda Lasche, který zasvětil 12 let pozorování dvěma společně rostoucím druhům ostřic, které, jak se domníval, vytvářely hybridní potomstvo. O 12 let později se přidává Ludwig Reichenbach s dalším popisem hybridního původu v rámci rodu *Carex*. Právě v polovině 19. století se začínají studie zabývající se hybridizací ostřic Evropě objevovat v enormním měřítku. Hybridní původ je usuzován na základě intermediárních morfologických znaků. Například v roce 1920 Otto Nordstedt už eviduje 47 hybridních druhů jen v oblasti Švédska. Severní Evropa a Velká Británie jsou ve výzkumu hybridizace velmi aktivní, ale ani zbytek Evropy nezůstává pozadu (Cayeoutte et Catling 1992).

Toivonen (1980) porovnává morfologické a anatomické znaky *Carex canescens* a *C. mackenziei*. Pomocí těchto znaků a chromatografie potvrzuje jejich F1 hybrida.

Blackstock a Ashton (2010) prověřovali tři hybridy *Carex flava* × *C. lepidocarpa* pocházející z Britských ostrovů. K názoru, že se jedná opravdu o křížence těchto druhů, došli díky vyhodnocení morfologických dat a alozymové analýzy. Molekulární markery nejenže potvrdily výsledky morfologické analýzy ohledně hybridního původu, ale navíc odhalily introgresi v *Carex flava* agg.

Więclaw et Koopman (2013) studovali morfologické odlišnosti u hybridů *Carex hostiana* a rostlin z *Carex flava* agg. (jmenovitě *C. demissa*, *C. lepidocarpa* a *C. flava*). Za pomoci jedno- a vícerozměrných statistických metod se jim podařilo určit hned několik morfologických markerů pro detekci těchto hybridů. Jedná se například o délku mošničky, šířku samičího klásku, šířku plevy, délku zobánku na vrcholu mošničky a poměr délky zobánku k celkové délce mošničky.

Pedersen et al. (2016) se zabývali možným hybridním původem *C. rostrata* var. *borealis* a *C. stenolepis*. Jako genetické markery pro tuto studii zvolili mikrosatelity a data zpracovali pomocí vícerozměrných statistických metod. Z jejich výsledků vyplývá, že *C. rostrata* var. *borealis* vznikla mezidruhovým křížením *C. rostrata* a *C. rotundata*. Druhá zkoumaná, *C. stenolepis*, vzešla z hybridizace mezi *C. vesicaria* a *C. saxatilis*.

Schmidt et al. (2017) zkoumají rozdílné znaky mezi *Carex flava*, *Carex viridula* a jejich společnými hybridy. Pro analýzu zvolili 14 morfologických znaků, které vyhodnotili za pomoci jednorozměrných (analýza variance – ANOVA) a vícerozměrných (analýza hlavních komponent – PCA) statistických metod. Zajímavostí je, že hybridy se vzhledově lišili v závislosti na tom, kde sběr proběhl. Švýcarští hybridy se v morfologických znacích více podobali *C. flava* než *C. viridula*, zatímco v Estonsku objevení hybridy měli znaky spíše intermediární.

Maguilla et al. (2017) se ve své studii zabývali historickým genovým tokem mezi *Carex furva* a *C. lucennoiberica*, který byl ovlivňován glaciály, během kterých se tyto druhy přesouvaly do nížin, kde měly širší společný výskyt a docházelo mezi nimi k toku genů, a teplejšími interglaciály, při kterých se rostliny přesouvaly do horských refugií a genový tok tak byl pozastaven. Hnacím motorem diferenciace těchto druhů byla tedy nejspíše alopatrie. Na místech styku areálů těchto ostřic se vytvářelo hybridní potomstvo.

Danihelka et al. (2012) považují hybridizaci v rámci rodu *Carex* na území České republiky za běžný jev. Podle jejich seznamu existuje v ČR asi 40 mezidruhových kříženců ostřic. Na druhou stranu k těmto závěrům bylo využito jen morfologických znaků. Řepka et al. (2014) ověřovali hybridní původ *C. ×danielis* nejen pomocí morfologických markerů. Podle morfologických znaků se předpokládalo, že se jedná o hybrida *Carex flacca* a *C. tomentosa*. Při použití molekulárních markerů (AFLP, sekvence ITS a trnL-F oblasti chloroplastové DNA) bylo výsledné stanovisko zcela odlišné. Hybridní původ nebyl prokázán a *C. ×danielis* se ukázala jako totožná s *Carex flacca*. Zdá se tedy, že hybridizace v rodu *Carex* nemusí být natolik běžnou, jak se předpokládá a za morfologickými odlišnostmi může přinejmenším v některých případech stát spíše variabilita v rámci druhu.

Tato práce se podrobněji zabývá možnou hybridizací mezi druhy *C. acuta* a *C. nigra*. Jde o hojně a morfologicky dosti podobné druhy výběžkatých (někdy ale i trsnatých) dvoubližných různoklasých ostřic (sekce *Phacocystis*). Bazální listové pochvy obou druhů jsou hnědé (vzácněji červenohnědé), matné a síťovitě se netřepí. Jejich samičí klásky nesou tmavohnědé plevy nevybíhající v osinatý hrot a zelené mošničky bez protaženého zobánku. Zpravidla se od sebe oba druhy mají lišit pomocí těchto znaků (Řepka et Grulich 2014): výška (*C. acuta* je uváděna jako robustnější a *C. nigra* jako subtilnější), šířka listů (*C. acuta* 3,3–7,5 mm a výjimečně až 9 mm; *C. nigra* většinou 1,8–3,8 mm), počet samčích klásků (*C. acuta* nejčastěji 2–3; *C. nigra* většinou 1), počet samičích klásků (*C. acuta* 2–6; *C. nigra* 1–5), poměr délky plevy a mošničky (*C. acuta* má plevy obvykle delší nebo stejně dlouhé jako mošničky; *C. nigra* má plevy zpravidla kratší než mošničky), zakončení plevy (*C. acuta* má plevy s tupým až ostrým vrcholem; *C. nigra* má plevy zaokrouhlené nebo s tupým vrcholem) a poměr délky listenu dolního klásku a květenství (u *C. acuta* listen delší než květenství; *C. nigra* má listen kratší než květenství).

Dean et Ashton (2008) se zaměřují na použití mikroskopických struktur listu (průduchy a papily) při oddělování ostřic v sekci *Phacocystis* (včetně *C. nigra* a *C. acuta*). Použití těchto markerů se ukázalo jako užitečné. Zatímco *C. nigra* byla epistomatická (průduchy měla téměř výhradně na svrchní straně listu), *C. acuta* se jevila v této práci jako hypostomatická (s průduchy téměř výhradně na spodní straně listu). Spolehlivost těchto závěrů však může být omezena malým množstvím zkoumaných rostlin.

Kříženec *C. acuta* a *C. nigra* (binomicky pojmenovaný *C. ×elytroides*) by měl vykazovat znaky intermediární mezi oběma rodičovskými druhy. Jedná se



konkrétně o výšku stonku, šířku listů, velikost a počet klásků, délku a tvar plevy a výskyt průduchů na obou stranách listů (Jermy et al. 2007).

S přítomností kříženců *C. acuta* a *C. nigra* se počítá na Britských ostrovech (Jermy et al. 2007), v Dánsku (Schröder et al. 2005), Nizozemsku (Koopman 2010), Německu (Kiffe 2004), Polsku (Kobierski et Ryś 2017) i České republice (Kubát et al. 2002, Danihelka et al. 2012). Ve všech případech byly rostliny určeny jako *C. × elytroides* jen na základě morfologických znaků.

#### 4.5. Asie

Pět prvních možných hybridů zaznamenal Hulten v roce 1927 na poloostrově Kamčatka. Později v roce 1935 studium hybridizace rozvinul Krečetovič, který zmínil 131 hybridů na celém území bývalého SSSR; není jisté, jestli se někteří nenacházeli mimo území SSSR. Kuzeneva v 1954 také zmiňuje hybridní ostřice, a to na poloostrově Kola. V Japonsku první případy hybridizace ostřic dokumentují až Akiyama v roce 1935 and Ohwi o rok později. O skoro třicet let později Koyama rozšiřuje seznam hybridních ostřic na 28. Vždy bylo využito pouze morfologických markerů (Cayeoutte et Catling 1992).

Hoshino et Waterway (1994) popisují rostliny nalezené na území Japonska, které podle intermediálních morfologických znaků vznikly hybridizací mezi *Carex conica* a *C. morrowii* (sekce *Mitratae*, do které náleží u nás se vyskytující *Carex davalliana*). Jako markery posloužily rozměry klásků, mošniček, zobánků a plev. Kromě morfologických znaků se také zaměřili na počty chromozomů, které porovnávali mezi jednotlivými druhy. U tohoto hybridu odpovídalo  $2n=37$ , což je mezi čísly rodičovských druhů (*C. conica* má  $2n=36$  a *C. morrowii* vykazuje  $2n=38$ ).

Fujiwara (1998) popsal nového hybridu *Carex phacota* × *C. sadoensis* (sekce *Phacocystis*) objeveného na území Japonska. Zaměřil se na morfologickou studii rozdílů mezi hybridem a rodičovskými druhy. Oddenek, poloha klásků a barva plev odpovídaly *C. sadoensis*. Struktura papil na mošničce byla stejná jako u *Carex phacota*. Tvar mošniček byl intermediární. Dále Fujiwara (1999) informoval o další hybridizaci v rodu *Carex* v Japonsku. Tentokrát se jednalo o křížence *Carex fernaldiana* × *C. stenostachys* (sekce *Mitratae*). Hybrid vykazoval intermediární znaky u výšky stonku, délky a šířky listu a barvy bazálních pochev a plev.

Nagamasu et Kinoshita (2010) zkoumali hybridu *C. × musashiensis*, kterého původně Ohwi (1936) popsal jako křížence *C. curvicollis* a *C. thunbergii*. Struktura bazálních pochev a zakončení mošničky ale neodpovídala ani jednomu z domnělých rodičů. Morfologické znaky spíše ukazovaly, že rodičovskými druhy by měly být *Carex curvicollis* a *C. forficula*.

Koopman et al. (2017) našli v Arménii možné křížence *Carex diluta* × *C. distans* (sekce *Spirostachyae*). Hybridní původ usuzovali podle morfologických znaků. Přesto, že v Arménii je evidováno 70 druhů ostřic, *Carex diluta* × *C. distans* zůstává jediným popsaným hybridem na tomto území. Na první lokalitě byl pozorován

v roce 2015 na východě Arménie v provincii Gegharkunik a podruhé o rok později v jihovýchodní provincii Vayots Dzor. Na druhé uvedené arménské lokalitě tohoto možného křížence nebyly přítomny žádné rostliny jednoho z rodičovských druhů (*C. distans*).

#### 4.6. Severní Amerika

S výzkumem hybridizace ostřic na území Severní Ameriky začíná Francis Boott, který ve své publikace vydané roku 1842 zmiňuje možnost hybridního původu *C. sullivantii*. Až o 40 let později jeho stanovisko potvrdil Elliot C. Howe. Teprve na konci 19. století se začínají studie pojednávající o hybridizaci v rodu *Carex* objevovat častěji (Cayouutte et Catling 1992).

Cayouutte et Morisset (1985) studovali 9 různých hybridních ostřic. Jedná se o *C. aquatilis* × *C. subspathacea*, *C. nigra* × *C. subspathacea*, *C. nigra* × *C. salina*, *C. paleacea* × *C. salina*, *C. aquatilis* × *C. recta*, *C. nigra* × *C. recta*, *C. paleacea* × *C. recta*, *C. aquatilis* × *C. paleacea* a *C. nigra* × *C. paleacea*. Hybridi vykazovali kombinaci morfologických znaků obou rodičovských druhů a jejich chromozomová čísla byla většinou mezi čísla jejich rodičů.

Studie Catling et al. (1989) detekující hybrida *Carex lacustris* × *C. trichocarpa* vychází stále pouze z morfologických dat. Autoři zkoumali délku stonku, výšku nejnižšího nodu a pochvy, délku jazýčku, délku zobánku a trichomů. Až na celkovou výšku byly znaky hybrida intermediární.

Hybridizaci mezi *Carex gynodynamis* a *C. mendocinensis* na území Kalifornie potvrdila Waterway (1990). Studovala herbářové položky, které porovnávala na základě morfologie. Intermediárními znaky u hybridů byly délka samčího klásku, délka stopky (*pedunculus*) a šířka nejširšího listu. Dále prováděla analýzu allozymů. Obě tyto metody potvrdily přítomnost sterilních hybridů *C. gynodynamis* × *C. mendocinensis*.

Standley (1990) se ve své práci zaměřila na hledání rodičovských druhů *Carex salina* a *Carex recta* pomocí allozymů. Byly vytipovány čtyři potenciální rodičovské druhy, které byly testovány a výsledky naznačují, že *C. salina* nejspíše vznikla křížením *C. paleacea* a *C. subspathacea*. V případě *C. recta* by se mělo jednat o hybridizaci a zpětné křížení *C. aquatilis* a *C. paleacea*.

Smith a Waterway (2008) se zaměřili na detekci hybridů v komplexu *Carex complanata*. Vytipování možných hybridů proběhlo na základě morfologie a pro potvrzení bylo využito AFLP. Mezidruhová hybridizace byla potvrzena u *C. complanata* × *C. oxylepis*, *C. swanii* × *C. complanata*, kde se podařilo zjistit, že donorem vaječné buňky byla nejspíše *C. swanii*, *C. bushii* × *C. swanii*, u které by nejspíše donorem vaječné buňky měla být *C. bushii*, *C. caroliniana* × *C. complanata*, *C. caroliniana* × *C. hirsutella* a *C. bushii* × *C. hirsutella*.

Bergeron et Pellerin (2014) zkoumali v Kanadě sterilní rostliny, u kterých byl předpokládán vznik hybridizací mezi neznámými druhy ostřic ze sekce *Lupulinae* a *Vesicariae*. Na základě morfologických markerů a vícerozměrných statistických

metod došli k závěru, že rodičovskými druhy tohoto hybrida jsou *C. comosa* (sekce *Vesicariae*) a *C. lupulina* (sekce *Lupulinae*). Hnědé pochvy a zakončení plev odpovídaly *C. comosa*, zakončení mošniček se podobalo *C. lupulina*. Intermediární byly například znaky spojené s délkou a šířkou mošničky.

#### **4.7. Kvantitativní rozdíly v pozorování hybridizace v rodu *Carex* mezi kontinenty**

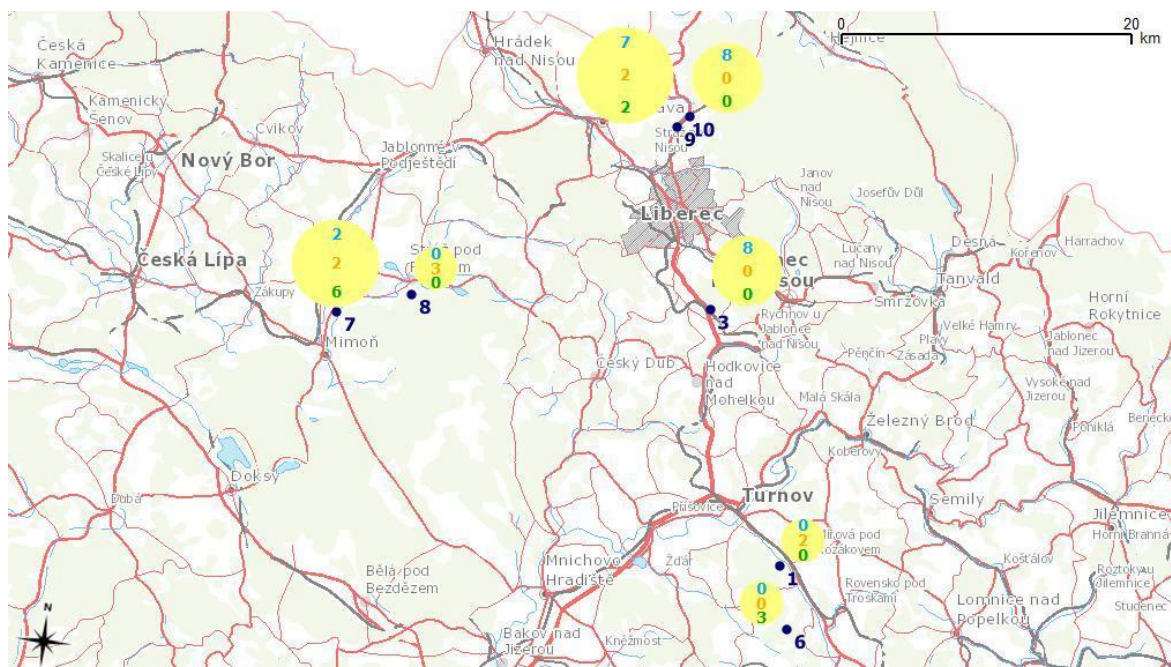
Počátky výzkumu hybridizace ostřic jsou časově mezi kontinenty dost iodišné. Obzvláště citelný rozdíl je mezi Asií a dalšími dvěma kontinenty. Tento jev se dá vysvětlit nejspíše izolovaností většiny asijských států a politickou situací. Je evidentní, že vůdčí roli v oblasti studia hybridizace rostlin měli do konce 19. století Evropané. Skoro půlstoletí amerického zpoždění Cayeoutte et Catling (1992) přisuzují počáteční nedůvěřivosti amerických botaniků k fenoménu hybridizace. Výzkum na území Severní Ameriky začátkem 20. století dohání výzkumy evropské. Botanici začali pojednávat o hybridizaci v rodu *Carex* na území Asie až o další 30 let později. Tento kontinent zůstává v tomto ohledu až doposud nejméně probádaným. Výjimku představuje Japonsko.

## 5. Materiál a metodika

Následující část práce se zabývá pilotním morfometrickým studiem populací blízké příbuzných druhů *Carex nigra* a *C. acuta* v oblasti Liberecka.

### 5.1. Výběr lokalit

Na lokalitách mělo ideálně docházet ke styku výskytu *Carex nigra* a *Carex acuta*. Tento předpoklad by měl být teoreticky splněn především na mokřadních stanovištích. Pro předběžné vytipování lokalit bylo využito údajů z Nálezové databáze AOPK ČR, které dokumentovaly společný výskyt obou druhů. Tato data nebyla vždy aktuální a přesná. Některé lokality byly zcela bez výskytu požadovaných druhů, za což většinou mohla patrně změna managementu a charakteru lokality (brzké sečení, výstavba komunikací, odvodnění atd.).



**Obr. 1.** Mapa lokalit s vyznačeným počtem jedinců *C. nigra* (modře), *C. acuta* (oranžově) a přechodných rostlin (zeleně) určených podle zběžného posouzení morfologie rostlin v terénu (před zahájením morfometrické analýzy). Mapový podklad: Česká informační agentura životního prostředí (CENIA).

### 5.2. Sběr vzorků

Na lokalitách bylo třeba dodržovat vzdálenosti mezi jednotlivými vzorky, aby se minimalizovalo riziko sběru stejného genotypu (klonu). Řepka et Grulich (2014) uvádí pro oba druhy podobnou délku výběžků a to cca 5–35 cm. Toto nebylo vždy lehké, protože na některých lokalitách se populace nacházely nahloučeny na velmi malém prostoru. Dodržování rozestupu nebylo nutné u rozdílných druhů, ale rostliny s takto výrazně (na první pohled) odlišným morfotypem se nacházely jen lokalitě č. 9.

Samotný sběr proběhl v červnu a červenci (tj. v době kvetení) 2016 na několika lokalitách v Libereckém kraji. Ačkoliv lokalit, na kterých se sběr uskutečnil, bylo více (celkem 10, na každé lokalitě sebráno 10 vzorků), počet pro studii použitelných populací se zúžil na 7 (3 v okrese Liberec, 2 v okrese Česká Lípa a 2 v okrese Semily) a celkový počet nasbíraných položek byl 45. Hlavní podíl na tomto úbytku měla chybná determinace druhů v terénu (především záměny *C. acuta* za *C. acutiformis*). Rostliny byly do několika hodin od sběru herbářovány.

V místě sbírané rostliny byla na ploše 10 cm × 10 cm odhadnuta procentická pokryvnost vegetace. Její hodnota byla považována za hrubou míru produktivity porostu a tedy i množství dostupných živin v okolí rostliny.

### 5.3. Popis lokalit

Lokalita č. 1 (50°33'29.909"N, 15°11'32.273"E; všechny zeměpisné souřadnice uvedené v této práci jsou v souřadnicovém systému WGS 84) se nachází na břehu rybníka Bažantník vzdáleného asi 0,5 km od obce Sedmihorky (okres Semily), v nadmořské výšce 253 m. Rostliny (předběžně v terénu určené jako *C. acuta*) byly sbírány 23. 7. 2016 na úzkém pruhu břehu vodní plochy. Stanoviště bylo z větší části zastíněno stromy. Do určité míry bylo v některých částech mechanicky narušováno aktivitami spojenými s rekreačním využitím rybníku.

Lokalita č. 3 (50°42'35.506"N, 15°5'38.254"E) se nachází na okraji obce Dlouhý Most (okres Liberec) v nadmořské výšce 474 m. Má v porovnání s ostatními lokalitami odlišný charakter. Jedná se o zcela zalesněnou plochu, která se rozprostírá podél potoka. Sbírané rostliny (předběžně určené jako *C. nigra*) se nevyskytovaly v bezprostřední blízkosti toku na podmáčené půdě (kde byla vysoká míra konkurence jiných vlhkomilných druhů), ale až dále (asi 15–20 m) od něj na zpevněném povrchu, kde představovaly skoro jediné zástupce bylinného patra. Sběr proběhl 31. 7. 2016.

Lokalita č. 6 (50°31'12.572"N, 15°12'25.861"E) leží na břehu rybníka Krčák u obce Hrubá Skála (okres Semily), ve výšce 268 m n. m. Zdálo se, že stanoviště bývalo podmáčené, ale v důsledku suchého a teplého léta změnilo charakter a jevílo se poměrně suché. Místo bylo z části kryté stromy. Sběr rostlin (předběžně považovaných za morfologicky přechodné mezi *C. acuta* a *C. nigra*) proběhl 8. 7. 2016.

Lokalita č. 7 (50°40'43.642"N, 14°44'2.230"E) je na břehu mělké eutrofní vodní plochy u obce Pertoltice pod Ralskem (okres Česká Lípa), v nadmořské výšce 283 m. Rostliny (z nichž některé byly předběžně určeny jako *C. nigra*, jiné jako *C. acuta* a další jako přechodné mezi oběma druhy) byly sbírány na místě z větší části porostlém stromy. Některé sbírané ostřice rostly v těsné blízkosti vody, jiné vzdálené od ní několik metrů. Celá lokalita měla poměrně vlhký charakter. Sběr proběhl 25. 6. 2016.

Lokalita č. 8 (50°41'43.990"N, 14°48'15.219"E) se nachází u obce Stráž pod Ralskem (okres Česká Lípa), v nadmořské výšce 301 m. Lokalita leží poměrně

daleko od potoka (cca 30 m) na zcela nezalesněné ploše. V době sběru vypadalo stanoviště jako poměrně suché, ale přesto byla vegetace velmi vysoká a hustá. Sběr rostlin (předběžně určených jako *C. nigra*) proběhl 17. 7. 2016.

Lokalita č. 9 (50°49'09.7"N 15°02'20.8"E) je u obce Krásná Studánka (okres Liberec), ve výšce 387 m n. m. Místem protéká potok, ale sběr proběhl v bezlesé ploše dále od něj. Na lokalitě byly dvě fenotypově výrazně odlišné populace (jedna se skládala z robustních ostřic odpovídajících *C. acuta*, druhá ze subtilních ostřic odpovídajících *C. nigra*), které se stýkaly na snadno pozorovatelné linii. Kromě dobře určitelných jedinců bylo sbíráno i několik ostřic předběžně považovaných za přechodné mezi *C. acuta* a *C. nigra*. Místo výskytu bylo zcela beze stromů. Položky byly sbírány 24. 6. 2016.

Lokalita č. 10 (50°49'35.001"N, 15°3'1.939"E) se nachází u obce Mníšek (okres Liberec; místo je vzdálené jen cca 1 km od lokality č. 9) v nadmořské výšce 382 m n. m. Sběr proběhl 24. 6. 2016 na břehu potoka a v jeho okolí. Přítomné ostřice (předběžně určené jako *C. nigra*) využívaly mechanicky narušená místa (stopy po pneumatikách zemědělské techniky), kde nebyla tak vysoká vegetace jako na místech nenarušených a zároveň tyto nerovnosti terénu zadržovaly vodu.

#### 5.4. Měřené znaky

Na herbářových položkách bylo sledováno 14 kvantitativních i kvalitativních znaků (Tab. 1), které jsou na základě literatury považovány za důležité pro determinaci *Carex acuta*, *C. nigra* a detekci jejich případných hybridů.

**Tabulka 1.** Přehled studovaných znaků

Zkratka	Popis znaku
SL	Šířka listu (mm)
SLN	Šířka nejnižšího listenu (mm)
DL	Délka nejnižšího listenu (cm)
DK	Délka květenství (cm)
DL/K	Poměr délky nejnižšího listenu k délce květenství
PTK	Počet samčích (tyčinkových) klasů
PPK	Počet samičích (pestíkových) klasů
PSK	Počet smíšených klasů (s pestíkovými květy na bázi a tyčinkovými na vrcholu)
SD	Počet průduchů na 0,05 mm <sup>2</sup> abaxiální (dolní) epidermis listu
SH	Počet průduchů na 0,05 mm <sup>2</sup> adaxiální (horní) epidermis listu
PD	Počet papil na 0,05 mm <sup>2</sup> abaxiální (dolní) epidermis listu
PH	Počet papil na 0,05 mm <sup>2</sup> adaxiální (horní) epidermis listu
PDM	Přesah plevy přes mošničku (0 – ne, 1 – ano)
SVP	Špičatý vrchol plevy (0 – ne, 1 – ano)

## 5.5. Způsob měření

Měření šířek listů a listenů bylo prováděno ve spodní třetině v přibližně nejširší části listu/listene, ale zároveň několik centimetrů od báze. Měření bylo prováděno pětkrát a výsledná šířka je průměrem těchto hodnot. Podle Řepka et Grulich (2014) by měla *C. acuta* mít listy širší než *C. nigra*.

Jedním z často uváděných rozdílů mezi *C. acuta* a *C. nigra* je přesah listenu dolního klásku přes květenství (Řepka et Grulich 2014). Listen přesahující květenství, tj. poměr délky listenu k délce květenství vyšší než 1, by měl být typický pro *C. acuta*, zatímco *C. nigra* by měla mít listen ukončený pod vrcholem květenství, tj. poměr délky listenu k délce květenství nižší než 1. Měření proto byly délky nejnižšího listenu (listenu nejnižze vyrůstajícího klasu květenství) a délky květenství a pro morfometrickou analýzu byl použit i poměr těchto délek.

Na každé rostlině byl zjištěn počet samčích a samičích klásků. Samčí klásky by *C. acuta* měly být nejčastěji 2–3, ale u *C. nigra* by se mělo jednat většinou jen o jeden až dva klásky (Řepka et Grulich 2014).

Pozorování znaků týkajících se průduchů a papil bylo nutno provádět na namočených částech rostlin, které se ponořily do horké vody a nechaly volně rozvinout. Na herbářových položkách měření bránilo pokroucení listů. Po narovnání byly listy osušeny položením na savý papír a natřeny bezbarvým lakem na nehty. Ten vytvořil na listech slabou vrstvu, ke které byla po zatvrdnutí přitisknuta izolepa a vrstva laku s otiskem epidermis se dala opatrně sloupnout. Otisky byly přilepeny na podložní sklíčko a umístěny pod světelný mikroskop, kde se daly při 400-násobném zvětšení dobře pozorovat požadované struktury. Počítání proběhlo vždy na stejně velké ploše vzorku (ve čtvrtině zorného pole ohraničené mikrometrickým měřítkem na okuláru, při uvedeném zvětšení odpovídala ploše 0,05 mm<sup>2</sup>). Pro každý vzorek proběhla čtyři měření, která byla následně zprůměrována, aby se minimalizovala chybovost při počítání. Hustota průduchů byla dále porovnávána s údaji z britské studie Dean et Ashton (2008), která tyto hodnoty pro *C. acuta* i *C. nigra* uvádí.

Přesah plevy přes mošničku byl hodnocen kvalitativně 1/0, podle toho, zda byla pleva delší než mošnička v jejím úžlabí, nebo nikoliv. Hodnota 1 byla volena pro přesah plevy a hodnota 0 byla volena v případě, že přesah plevy nebyl pozorován. I toto pozorování proběhlo u každé rostliny pětkrát a hodnoty byly zprůměrovány. Řepka et Grulich (2014) uvádí přesah plevy přes mošničku jako determinální znak *C. acuta*, zatímco kratší plevy je přisuzována *C. nigra*.

Zakončení plevy se vyhodnocovalo také kvalitativně. Hodnota 0 odpovídala tupě zakončené plevě, zatímco hodnota 1 ukazovala na plevu ostře (tj. špičatě) zakončenou. Pozorování proběhlo pětkrát a výsledná hodnota vznikla jako průměr všech měření. Komplikací u tohoto znaku byla tendence okrajů plevy se při sušení kroutit, takže tupé plevy se pak někdy jevily jako ostře zakončené. Pro tyto případy bylo nutné použít preparační jehlu a ujistit se o tvaru. Řepka a Grulich (2014) popisují u *C. nigra* tupé/zaokrouhlené zakončení plevy a u *C. acuta* by mělo být možné zakončení ostré i tupé.

## 5.6. Statistické vyhodnocení dat

Podobnost jednotlivých vzorků rostlin ve studovaných znacích byla vyhodnocena analýzou hlavních komponent (*principal components analysis*, PCA). Tato metoda konstruuje tzv. ordinační osy ve směru hlavních gradientů, podél nichž se mění hodnoty sledovaných proměnných (v našem případě studovaných znaků). Každá ordinační osa zachytí určitý podíl celkové variability sledovaných proměnných, přičemž největší podíl zachycuje vždy první ordinační osa a u každé další osy v pořadí podíl zachycené variability klesá. Čím těsněji je konkrétní proměnná (znak) s některou ordinační osou korelována (čím menší úhel svírá na ordinačním diagramu ordinační osa s šipkou znázorňující směr růstu hodnot znaku), tím lépe je variabilita této proměnné (znaku) ordinační osou zachycena. Vzorky rostlin jsou pak na základě hodnot svých znaků seřazeny podle ordinačních os tak, že vzdálenost mezi vzorky je mírou jejich odlišnosti (tedy morfologicky podobné rostliny jsou od sebe v prostoru vymezeném ordinačními osami vzdáleny málo, zatímco rostliny nepodobné jsou navzájem vzdáleny hodně). Hodnoty jednotlivých znaků byly zjišťovány na různých stupnicích a lišily se v důsledku toho mírou své variability, což nebylo pro účely morfometrické studie žádoucí, neboť konstrukce ordinačních os by probíhala především podle znaků s velkou variací a málo by zohledňovala znaky s menší variací (byť potenciálně důležité pro vymezení druhů). Proto byla PCA provedena na centrovaných a standardizovaných hodnotách znaků (hodnoty znaků byly transformovány tak, aby měly nulový průměr a jednotkovou varianci – Šmilauer et Lepš 2014).

Pro zjištění závislosti zkoumaných znaků rostlin na pokryvnosti vegetace v okolí rostliny byla použita redundanční analýza (*redundancy analysis*, RDA) standardizovaných hodnot znaků. Jedinou vysvětlující proměnnou této RDA byla logaritmičsky transformovaná [ $x' = \ln(x+0,001)$ ] procentická pokryvnost vegetace. Významnost této proměnné pro vysvětlení variability v hodnotách znaků byla testována Monte Carlo permutačním testem.

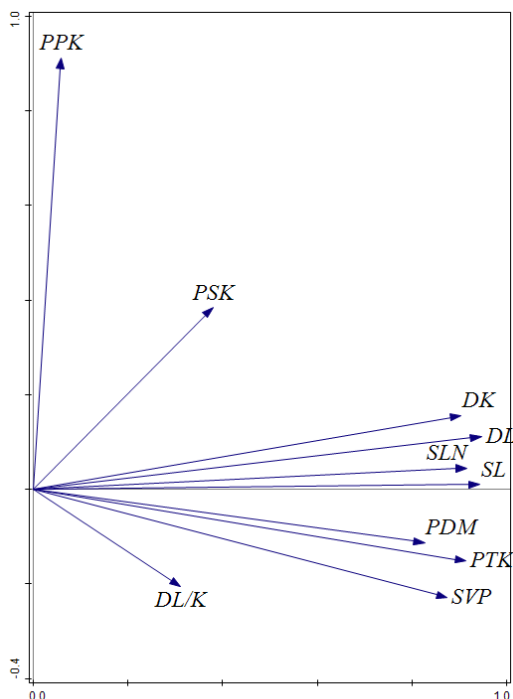
Výpočty a konstrukce ordinačních diagramů byly provedeny v programu Canoco 5 (ter Braak et Šmilauer 2012).



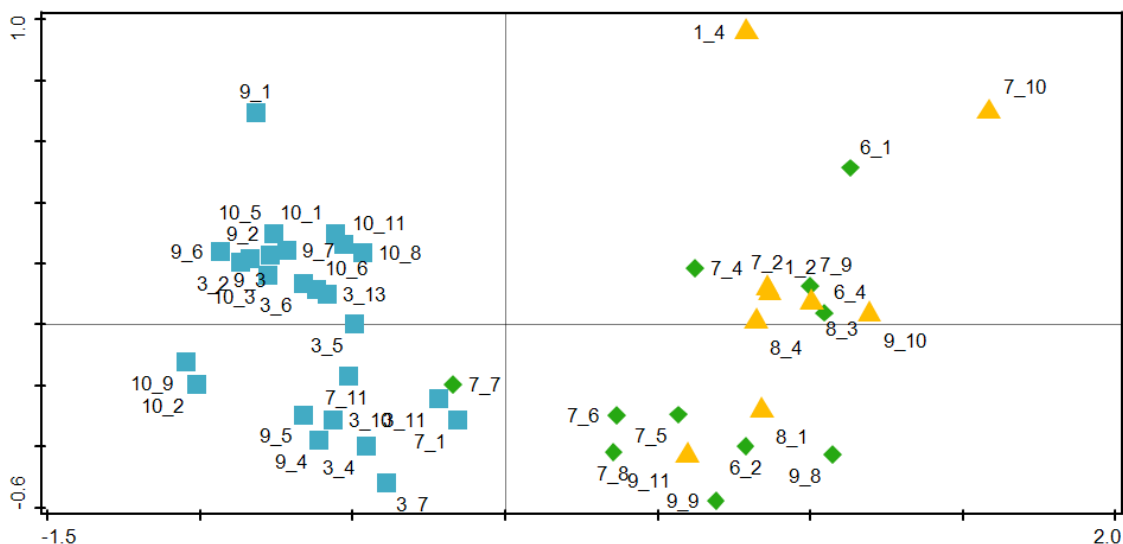
## 6. Výsledky

Většina studovaných makroskopických znaků byla spolu navzájem pozitivně korelována a výrazně korelovala s první ordinační osou. Výjimku tvořil zejména počet samičích a smíšených klásků a poměr délky spodního listenu a květentví (obr. 2). Stavby znaků uváděné jako charakteristické pro *C. nigra* korelovaly s první ordinační osou negativně, stavby uváděné jako typické pro *C. acuta* s první osou korelovaly pozitivně. Na základě studovaných makroskopických znaků bylo možno podél první ordinační osy rozlišit dvě zřetelně oddělené (nepřekrývající se) skupiny vzorků: rostliny odpovídající svými znaky (užšími listy i listeny, kratšími květenstvími, plevami kratšími než mošničky, atd.) *C. nigra* měly na této ose záporné souřadnice, rostliny odpovídající *C. acuta* (s širšími listy, plevami delšími než mošničky, větším počtem samčích klásků, atd.) měly kladné souřadnice (obr. 3, obr. 4). I rostliny při předběžném určení v terénu považované za možné křížence s intermediárními znaky bylo na základě PCA makroskopických znaků možné jednoznačně zařadit buď ke *C. nigra*, nebo *C. acuta* (obr. 3). Klasifikace rostlin výhradně pomocí hustoty průduchů na svrchní a spodní listové epidermis poměrně dobře odpovídala v případě *C. acuta*, zatímco hůře v případě *C. nigra*. Řadu rostlin makroskopicky zařaditelných ke *C. nigra* nebylo možné při využití pouhé hustoty průduchů (a papil) jednoznačně určit (obr. 4). Výskyt průduchů a papil spolu pozitivně koreloval jak na spodní, tak na svrchní listové epidermis (obr. 5). Samostatné použití znaků na listové epidermis neumožnilo rozlišit žádné nepřekrývající se skupiny (obr. 6, obr. 7). Rostliny morfologicky odpovídající *C. nigra* se v charakteru listové epidermisjevily jako více variabilní než *C. acuta* (obr. 7). Zatímco u *C. acuta* byly průduchy a papily téměř u všech vzorků přítomny (ve velké hustotě) jen na spodní listové pokožce, u *C. nigra* byly tyto útvary většinou přítomny na obou stranách listu (na svrchní straně byla jejich hustota většinou mírně větší než na spodní straně). Většina rostlin v terénu předběžně považovaných za možné křížence se charakterem listové epidermis podobala *C. acuta* (obr. 6).

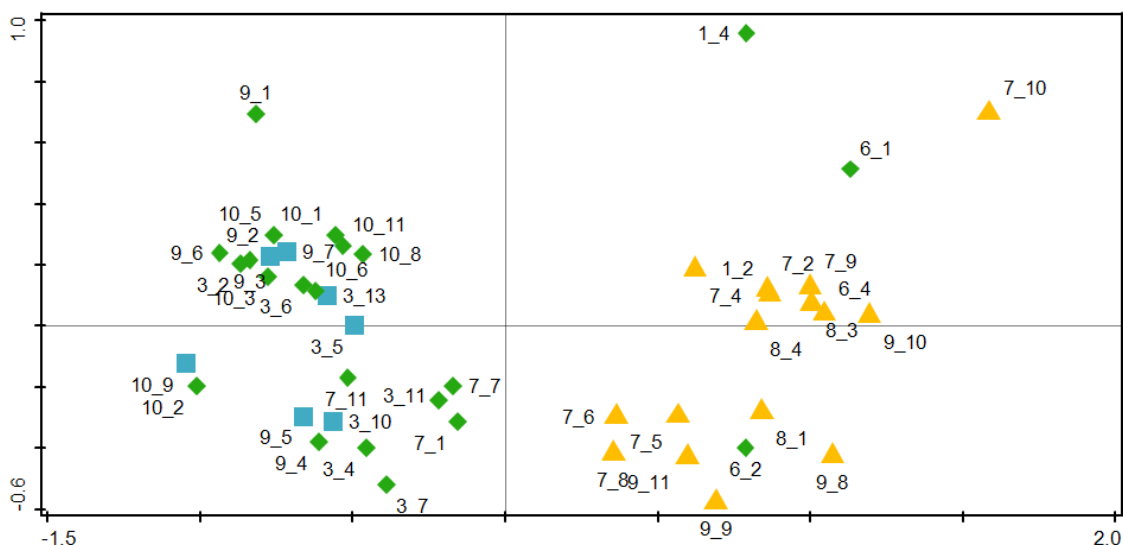
Z údajů o pokryvnosti vegetace vyplynulo, že rostliny morfologicky odpovídající *C. nigra* byly sbírány v plochách s pokryvností vegetace 20–90%, zatímco rostliny odpovídající *C. acuta* v plochách s pokryvností 50–90%. Při RDA nebyl prokázán vliv pokryvnosti vegetace na hodnoty studovaných znaků rostlin (Monte Carlo test, 499 permutací, pseudo-F=2.0, P<0.114).



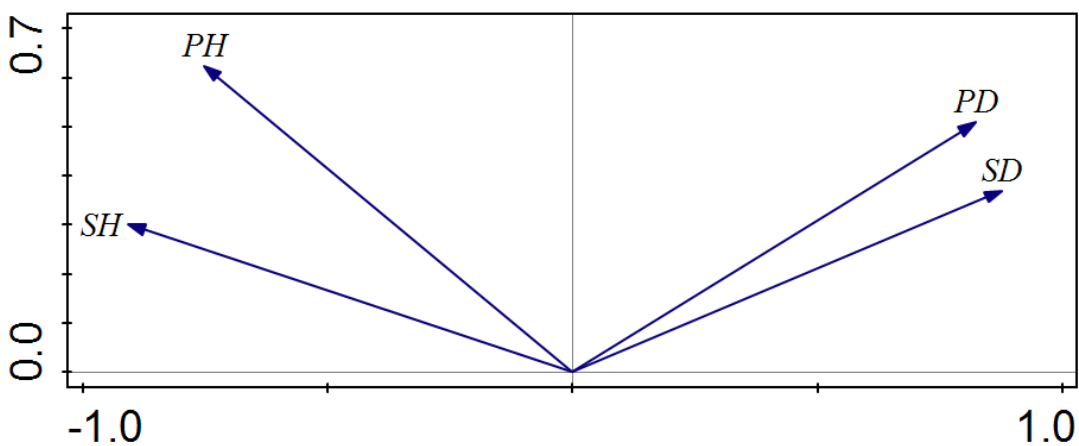
**Obr. 2.** PCA makroskopicky pozorovatelných morfologických znaků *C. nigra*, *C. acuta* a rostlin považovaných za přechodné mezi oběma druhy. Zobrazena je korelace studovaných znaků s ordinačními osami. Hodnota znaku vzrůstá ve směru šipky (a klesá proti směru šipky). První (vodorovná) ordinační osa zachycuje 59.7% variability v hodnotách znaků, druhá (svislá) ordinační osa 11.5% variability.



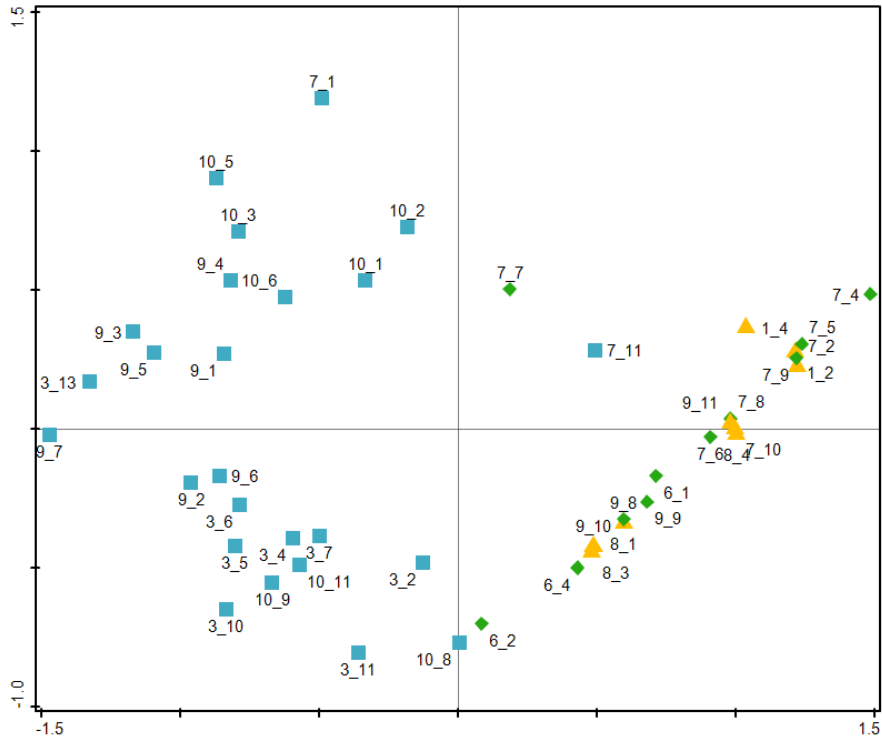
**Obr. 3.** PCA makroskopicky pozorovatelných morfologických znaků *C. nigra* (modré body), *C. acuta* (žluté body) a rostlin považovaných za přechodné mezi oběma druhy (zelené body). Zobrazena je vzájemná podobnost studovaných vzorků rostlin. Rostliny byly předběžně určeny při sběru v terénu (tj. před provedením morfometrické analýzy) pomocí makroskopicky pozorovatelných morfologických znaků uváděných v určovací literatuře. První (vodorovná) ordinační osa zachycuje 59.7% variability v hodnotách znaků, druhá (svislá) ordinační osa 11.5% variability.



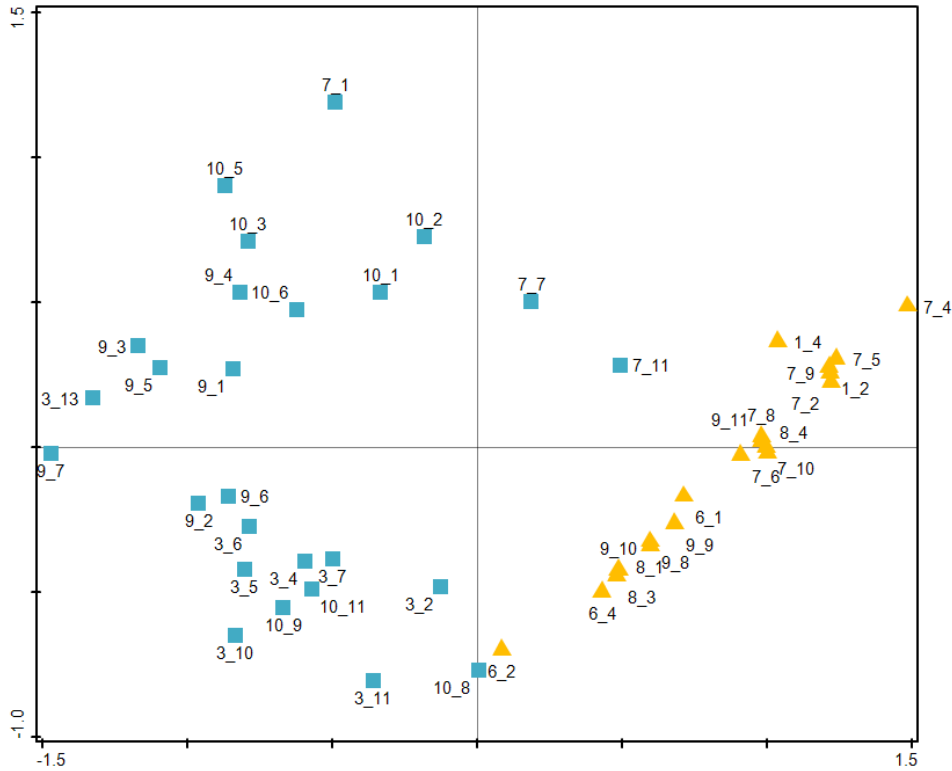
**Obr. 4.** PCA makroskopicky pozorovatelných morfologických znaků *C. nigra* (modré body), *C. acuta* (žluté body) a rostlin považovaných za přechodné mezi oběma druhy (zelené body). Zobrazena je vzájemná podobnost studovaných vzorků rostlin. Rostliny byly klasifikovány podle poměru počtu průduchů na svrchní a spodní straně listu na základě hodnot uvedených v práci Dean et Ashton (2008): poměr vyšší než 3 odpovídal *C. nigra*, poměr nižší než 0.01 *C. acuta*, poměr v rozmezí 0.01–3 rostlinám přechodným. První (vodorovná) ordinační osa zachycuje 59.7% variability v hodnotách znaků, druhá (svislá) ordinační osa 11.5% variability.



**Obr. 5.** PCA počtu průduchů a papil na svrchních a spodních stranách listů *C. nigra*, *C. acuta* a rostlin považovaných za přechodné mezi oběma druhy. Zobrazena je korelace studovaných znaků s ordinačními osami. Hodnota znaku vzrůstá ve směru šipky (a klesá proti směru šipky). První (vodorovná) ordinační osa zachycuje 70% variability v hodnotách znaků, druhá (svislá) ordinační osa 22% variability.



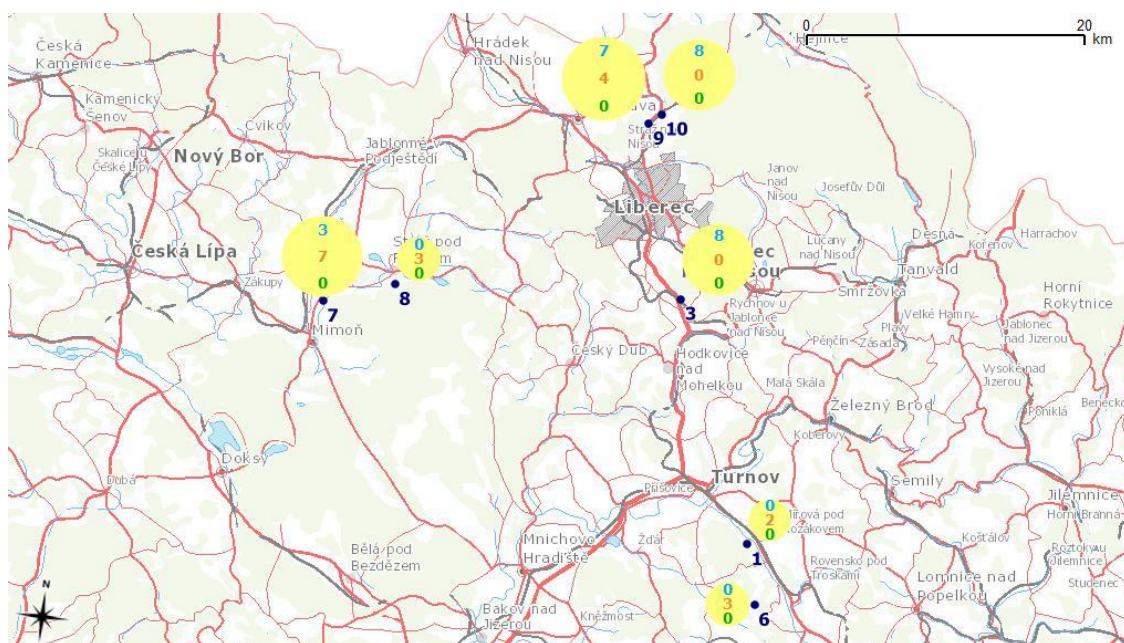
**Obr. 6.** PCA počtu průduchů a papil na svrchních a spodních stranách listů *C. nigra* (modré body), *C. acuta* (žluté body) a rostlin považovaných za přechodné mezi oběma druhy (zelené body). Zobrazena je vzájemná podobnost studovaných vzorků rostlin. Rostliny byly předběžně určeny při sběru v terénu (tj. před provedením morfometrické analýzy) pomocí makroskopicky pozorovatelných morfologických znaků uváděných v určovací literatuře. První (vodorovná) ordinační osa zachycuje 70% variability v hodnotách znaků, druhá (svislá) ordinační osa 22% variability.



**Obr. 7.** PCA počtu průduchů a papil na svrchních a spodních stranách listů *C. nigra* (modré body) a *C. acuta* (žluté body). Zobrazena je vzájemná podobnost studovaných vzorků rostlin. Rostliny byly určeny na základě posouzení celkové variability makroskopicky pozorovatelných znaků po provedení morfometrické analýzy (tato analýza odhalila existenci dvou nepřekrývajících se skupin odpovídajících uvedeným druhům). První (vodorovná) ordinační osa zachycuje 70% variability v hodnotách znaků, druhá (svislá) ordinační osa 22% variability

## 7. Diskuse

Existence morfologického kontinua mezi *C. acuta* a *C. nigra* nebyla při analýze makroskopických morfologických znaků rostlin z Liberecka zjištěna. Naopak, mezi studovanými rostlinami bylo možné rozlišit dvě poměrně jasně ohraničené skupiny, z nichž každá svými morfologickými znaky odpovídala jednomu z druhů. Možných příčin je více. (1) Vzhledem k tomu, že výsledky byly získány z měření provedených na pouhých 45 položkách, je platnost zjištěných závěrů značně diskutabilní. Výsledek bude nutné dále verifikovat na mnohem větším počtu vzorků, protože je možné, že morfologicky přechodné formy zatím jen nebyly zachyceny, přestože v přírodě existují. Počet rostlin prostudovaných během této pilotní studie je pro tvorbu obecnějších závěrů příliš malý, problematický je také nedostatek zatím prozkoumaných lokalit se společným výskytem *C. nigra* a *C. acuta*. (2) Morfologická nevyhraněnost některých rostlin se může týkat jen některých jejich znaků, které nejsou stabilní v rámci žádného z druhů. Pro odhalení takových znaků je nutné porovnávat větší množství rostlin z více lokalit zároveň. Morfometrická analýza naznačuje, že některé znaky uváděné jako determinační nemusejí být spolehlivé. Bylo tak např. zjištěno, že často zdůrazňovaný (např. Řepka et Grulich 2014, Jermy et al. 2007) rozdíl v délce listenu vůči délce květenství (listen delší než květenství u *C. acuta*, listen kratší nebo stejně dlouhý jako květenství u *C. nigra*) není vždy platný. Ukázalo se, že u obou druhů má tento znak podobnou variabilitu a může nabývat stejných stavů nezávisle na druhu.



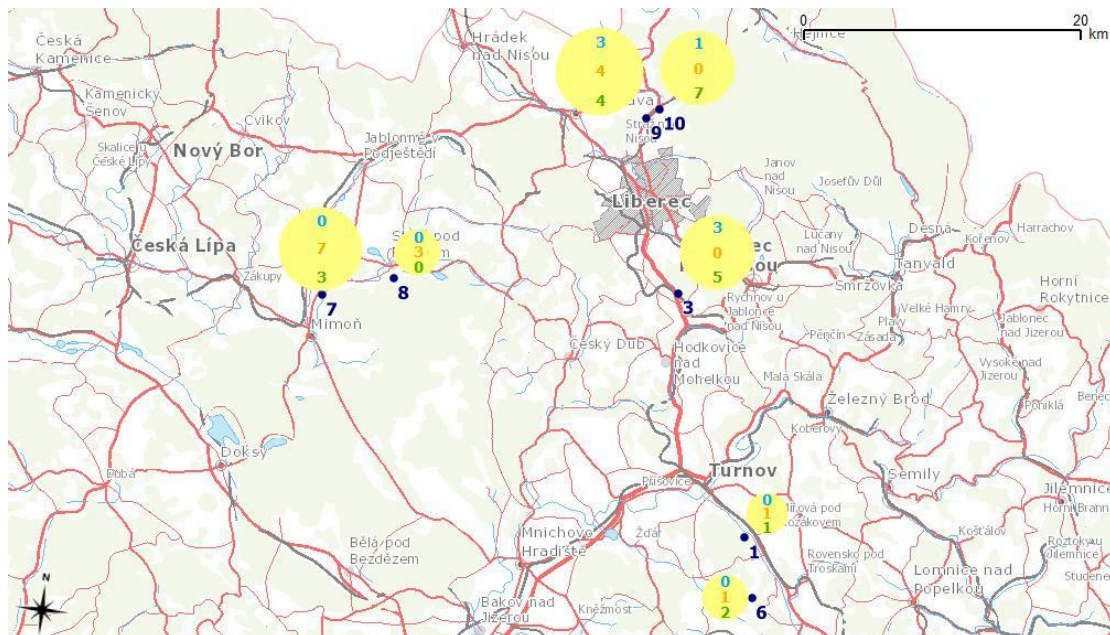
**Obr. 8.** Mapa lokalit s vyznačeným počtem jedinců *C. nigra* (modře), *C. acuta* (oranžově) a přechodných rostlin (zeleně) určených na základě makroskopických znaků po provedení morfometrické analýzy. Mapový podklad: Česká informační agentura životního prostředí (CENIA).

Zkoumané severočeské rostliny *C. acuta* byly hypostomatické, což se shoduje s pozorováním Dean et Ashton 2008 na materiálu z Britských ostrovů). Na druhou stranu, *C. nigra* byla na Liberecku zjištěna jako převážně amfistomatická (s průduchy na obou stranách listu), přestože Dean et Ashton (2008) pozorovali v naprosté většině epistomatické rostliny tohoto druhu. Zdá se tedy, že dosud nebyla reálně zhodnocena zejména variabilita v počtu průduchů u *C. nigra* (v důsledku toho se pak výsledky různých regionálních studií navzájem výrazně liší). Narozdíl od britského materiálu měl počet průduchů na listech severočeských rostlin mezi oběma druhy kontinuální charakter a tento znak sám o sobě v řadě případů nebyl použitelný pro jednoznačnou identifikaci druhu (výjimkou jsou především striktně hypostomatické exempláře *C. acuta*, které jsou zřejmě dosti běžné, neboť byly zachyceny i poměrně malým souborem vzorků z několika severočeských populací). Stoeva et al. (2005) v Bulharsku zjistili, že *C. acuta* je ve velké části případů hypostomatická, ale zároveň diskutují populaci, která byla amfistomatická, a tedy podobná více *C. nigra*. Rozdíl byl v hustotě průduchů na spodní straně listů, která byla u *C. acuta* větší. Bulharští jedinci *C. nigra* byli v této studii, buď epistomatičtí nebo amfistomatičtí. V diskusi je zmíněno, že podobné výsledky naznačují i předchozí nálezy ze Severní Ameriky a Polska. Jako amfistomatické se jevily polské rostliny *C. nigra* a epistomatické populace téhož druhu byly zjištěny na území Severní Ameriky (Stoeva et al. 2005). Stejně závěry je možné učinit i pro počty epidermálních papil na obou stranách listů, protože tento znak je s počty průduchů silně pozitivně korelován, což odpovídá zjištěním Dean et Ashton (2008) i Stoeva et al. (2005).

Amfistomatické exempláře *C. nigra* bývají někdy interpretovány jako kříženci s *C. acuta* (Stace et al. 2015). Pokud by tomu tak vždy bylo, naznačovaly by dosavadní výsledky ze severočeských populací, že frekvence kříženců v ČR může být velmi vysoká a naopak frekvence „čistých“ rostlin *C. nigra* velmi nízká, přičemž morfologicky by kříženci nebyli intermediární, ale velmi podobní *C. nigra*, a vyskytovali by se i na lokalitách bez *C. acuta*. Tyto závěry se nezdají být příliš pravděpodobné, ale vzhledem k malému rozsahu dosud prozkoumaných jedinců i populací je nelze ani zcela vyloučit. Výskyt pravděpodobného hybridu jiných druhů ostřic na lokalitách bez jednoho rodičovského druhu udávají např. Koopman et al. (2017). Pro řešení otázky míry hybridizace mezi *C. nigra* a *C. acuta* je třeba mj. zjistit, v jakém množství a za jakých podmínek se v ČR vyskytují epistomatické a amfistomatické rostliny s makroskopickými morfologickými znaky *C. nigra*.

Stoeva et al. (2005) uvádí, že morfologická rozdílnost populací *C. nigra* a *C. acuta* byla větší na lokalitách, kde se nevyskytovaly společně. Na místech syntopického (společného) výskytu se od sebe lišily méně. To by mohlo naznačovat, že rostliny se zde mezi sebou kříží a znaky nabývají spíše kontinuální charakter. V případě dvou studovaných severočeských lokalit se společným výskytem obou druhů však morfometrická analýza neodhalila žádné rostliny vykazující intermediární charakter. Je možné, že pro případnou existenci hybridizace je třeba souhry více faktorů než jen syntopického výskytu obou druhů.

Ze studie Řepka et al. (2014) vyplývá, že zkoumání morfologických znaků není vždy spolehlivou metodou pro rozpoznání druhů a kříženců ostřic. Při ověření molekulárními markery se ukazuje, že morfologické znaky vlivem své široké variability mohou někdy poskytovat i falešný signál o hybridním původu určitého fenotypu.



**Obr. 9.** Mapa lokalit s vyznačeným počtem jedinců *C. nigra* (modře), *C. acuta* (oranžově) a přechodných rostlin (zeleně) určených na základě rozmístění průduchů na listové epidermis podle údajů publikovaných v práci Dean et Ashton (2008). Mapový podklad: Česká informační agentura životního prostředí (CENIA).

Při pilotní studii na Liberecku byly nalezeny jen dvě lokality se společným výskytem *C. acuta* a *C. nigra* (lokality č. 7 a 9). Tato stanoviště byla rozdílného charakteru. Populace lokality č. 7 se rozprostíraly na břehu rybníka a jeho blízkého okolí (*C. acuta* měla tendenci růst blíže u vody, *C. nigra* zase snášela zástin způsobené stromy v okolí vodní plochy). Populace se ale prostorově prolínaly. Na lokalitě č. 9 byla evidentní linie rozdělující populace *C. acuta* a *C. nigra*, ale při zběžném zkoumání se nepodařilo zjistit čím je způsobená (v letních měsících nebyla na místě žádná známka po vodním toku/ploše). Linie by mohla ukazovat, kam dosahovala dočasná vodní hladina (například po tání sněhu nebo intenzivních dešťových srážkách). Lze předpokládat, že vyšší rostliny (*C. acuta*) budou oproti nižším (*C. nigra*) zvýhodněny v zaplavovaných sníženinách.

Samotná *C. nigra* se vždy nacházela na lokalitách s nižší vegetací (louka s nízkými travami – lokalita č. 10; na okraji lesa, kde tvořila jediného zástupce bylinného patra – lokalita č. 3). *C. acuta* rostla samostatně na loukách s vyššími travními společenstvy (lokality č. 8) nebo přímo na březích rybníků (lokality č. 1 a č. 6). Vzhledem k heterogenitě a malému počtu stanovišť nelze určit, jak by měla vypadat lokalita, na které by byla vyšší pravděpodobnost společného výskytu obou



druhů. Při případném dalším sběru by bylo dobré vyřadit lokality jen s vysokými bylinnými společenstvy, protože ty nejspíše nesvědčí jedincům *C. nigra*.

Pro další práci by bylo dobré zvážit i další mikroskopické morfologické znaky listové epidermis. Jako slibné se podle Dean et Ashton (2008) jeví rozměry (délka a šířka) epidermálních buněk. Zařazení většího množství mikromorfologických znaků by mělo umožnit jednoznačné odlišení *C. acuta* od *C. nigra*, nebo přinést robustnější podporu pro existenci morfologického kontinua mezi oběma druhy.

Absence vztahu mezi pokryvností vegetace a variabilitou morfologických znaků zkoumaných ostřic pravděpodobně indikuje nepříliš vhodnou volbu vysvětlující proměnné. Pro reálnější odhad produktivity stanoviště je třeba kromě vegetačního zápoje znát přinejmenším i výšku vegetace. Vhodné by jistě bylo i přímé stanovení obsahu hlavních živin v půdě nebo ještě lépe v biomase vegetace v bezprostředním okolí sbírané rostliny.

## 8. Závěr

Rešerše literárních zdrojů ukázala, že hybridizace v rodu *Carex* je běžně pozorovaný jev, a to hlavně na území Evropy a Severní Ameriky. Metody detekce kříženců ostřic jsou založeny zejména na morfologických znacích, méně často i na molekulárních markerech. Morfologické znaky nemusí být vždy správně interpretovány a jejich variabilita nemusí být způsobena hybridizací, ale různorodostí ve fenotypové podobě druhu. Vzhledem k tomu, že většinou byl domnělý hybridní původ usouzen jen na základě morfologického pozorování, je možné, že skutečná četnost hybridizace v rodu *Carex* je výrazně nadhodnocena. Molekulární markery jsou spolehlivější metodou ověření původu, ale jejich komplikací je například finanční a časová náročnost, nutnost laboratorního zázemí a znalosti vyhodnocení těchto metod.

V pilotním souboru vzorků z populací *C. acuta*, *C. nigra* a jejich možných kříženců sbíraných na Liberecku byly pomocí makroskopických morfologických znaků jasně odlišeny dvě skupiny (odpovídající oběma druhům) a nebyla zjištěna přítomnost intermediárních rostlin. Ukázalo se ale, že ne všechny znaky uváděné v literatuře pro odlišení *C. nigra* a *C. acuta* jsou dostatečně informativní. Například často zmiňovaný poměr délky nejspodnějšího listenu a délky listenu podle údajů získaných v této práci selhává a oba druhy jsou schopné dosahovat stejných hodnot.

Rozmístění průduchů a papil na listech se ukázalo jako dobrý doplňkový determinační znak, jehož samostatné použití ale k jednoznačnému určení zatím často nestačí. Lepší poznání rozsahu variability v hustotě průduchů a papil však může přispět k přesnějším determinacím *C. nigra* i *C. acuta* a v důsledku toho i spolehlivěji odlišovat hybridní rostliny od případů jinak generované morfologické variability. V rámci provedené studie byl potvrzen hypostomatický charakter listů *C. acuta*, naproti tomu listy *C. nigra* obvykle nebyly epistomatické, jak je někdy uváděno, nýbrž amfistomatické.

## 9. Literatura

ABBOTT, R., ALBACH, D., ANSELL, S., ARNTZEN, J. W., BAIRD, S. J., BIERNE, N., BUTLIN, R. K. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 2013, 26(2), 229–246.

ALLENDORF, F. W., LEARY, R. F., SPRUELL, P., WENBURG J. K. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 2001, 16, 613–622.

ÁLVAREZ, I., WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2003, 29(3), 417–434.

ANTTILA, C. K., DAEHLER, C. C., RANK, N. E., STRONG, D. R. Greater male fitness of a rare invader (*Spartina alternifolia*, *Poaceae*) threatens a common native (*Spartina foliosa*) with hybridization. *American Journal of Botany*, 1998, 85, 1597–1601.

ARNOLD, M. L. *Natural hybridization and evolution*. New York: Oxford University Press, 1997. ISBN 0195099753.

BARIOTAKIS, M., KOUTROUMPA, K., KAROUSOU, R., PIRINTSOS, S. A. Environmental (in)dependence of a hybrid zone: Insights from molecular markers and ecological niche modeling in a hybrid zone of *Origanum* (*Lamiaceae*) on the island of Crete. *Ecology and Evolution*, 2016, 6(24), 8727–8739.

BARTON, N. H., HEWITT, G. M. Analysis of hybrid zones. *Annual review of Ecology and Systematics*, 1985, 16(1), 113–148.

BERGERON, A., PELLERIN, S. *Carex ×cayouettei* (*Cyperaceae*), a new intersectional sedge hybrid from southern Québec, Canada. *Phytoneuron*, 2014, 52, 1–11.

BLACKSTOCK, N., ASHTON, P.A. Genetic markers and morphometric analysis reveal past hybridization and introgression in putative *Carex flava* L. s. str. (*Cyperaceae*) hybrid populations. *Plant Systematics and Evolution*, 2010, 287, 37–47.

BUSINSKÝ, R. Borovice blatka v novém pojetí. *Zprávy České Botanické Společnosti*, 2009, 44, 35–43.

CAMBELL, D. R., WASER, N. M. Evolutionary dynamics of an *Ipomopsis* hybrid zone: Confronting models with lifetime fitness data. *American Midland Naturalist*, 2007, 169, 298–310.

- CATLING, P. M., REZNICEK, A. A., Denford, K. *Carex lacustris* × *C. trichocarpa* (*Cyperaceae*), a new natural hybrid. *Canadian Journal of Botany*, 1989, 67, 790–795.
- CAYOUILLE, J., CATLING, P. M. Hybridization in the genus *Carex* with special reference to North America. *The Botanical Review*, 1992, 58(4), 351–438.
- CAYOUILLE, J., MORISSET, P. Chromosome studies on natural hybrids between maritime species of *Carex* (sections *Phacocystis* and *Cryptocarpae*) in northeastern North America, and their taxonomic implications. *Canadian Journal of Botany*, 1985, 63, 1957–1982.
- COYNE, J. A., ORR, H. A. 2004. *Speciation*. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. ISBN 9780878930890
- DANIHELKA, J., CHRTEK, J., KAPLAN, Z. Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia, Česká botanická společnost*, 2012, 84(3), 647–811.
- DASMAHAPATRA, K. K., BLUM, M. J., AIELLO, A., HACKWELL, S., DAVIES, N., BERMINGHAM, E. P., MALLETT, J. Inferences from a rapidly moving hybrid zone. *Evolution*, 2002, 56(4), 741–753.
- DEAN, M., ASHTON, P. A. Leaf surfaces as a taxonomic tool: the case of *Carex* section *Phacocystis* (*Cyperaceae*) in the British Isles. *Plant systematics and evolution*, 2008, 273(1–2), 97–105.
- DRAGON, J. A., BARRINGTON, D. S. East vs. West: Monophyletic clades within the paraphyletic *Carex acuta* complex, section *Phacocystis* (*Cyperaceae*). *Sedges: Uses, Diversity, and Systematics of the Cyperaceae. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard*, 2008, 108: 215–226.
- EIZENGA, G. C., BUCKNER, R. C. Cytological and isozyme Evaluation of Tall Fescue × Italian Ryegrass Hybrids. *Plant Breeding*, 1986, 97, 340–344.
- ELLSTRAND, N. C., WHITKUS, R., RIESEBERG, L. H. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(10), 5090–5093.
- FAULKNER, J. S. Experimental hybridization of north-west European species in *Carex* section *Acutae* (*Cyperaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1973, 67(3), 233–253.

- FAULKNER, J. S. Chromosome studies on *Carex* section *Acutae* in north-west Europe. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1972, 65(3), 271–301.
- FLOATE, K. D., KEARSLEY, M. J. C., WHITHAM, T. G. Elevated herbivory in plant hybrid zones: *Chrysomela confluens*, *Populus* and phenological sinks. *Ecology*, 1993, 74(7), 2056–2065.
- FUJIWARA, R. A new hybrid of *Carex* from the Azumino plain, Nagano prefecture. *Bulletin of Nagano Nature Conservation Research Institute*, 1999, 2, 23–26.
- FUJIWARA, R. A new hybrid of *Carex* from Togakushi-Kohgen, Nagano prefecture. *Bulletin of Nagano Nature Conservation Research Institute*, 1998, 1, 7–10.
- GARCIA, A. A. F., BENCHIMOL, L. L., BARBOSA, A. M. M., GERALDI, I. O., SOUZA, C. L., SOUZA, A. P. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*, 2004, 27(4), 579–588.
- GARCÍA-MAROTO, F., GARRIDO-CÁRDENAS, J. A., GÓMEZ-MERCADO, F., GUILGUERRERO, J. L., LÓPEZ ALONZO, D. Natural hybridisation and phylogenetic position of *Saxifraga trabutiana* (*Saxifragaceae*) inferred from ISSR markers and ITS sequences. *Annales Botanici Fennici*, 2003, 40, 5–13.
- GOLDMAN, J. J. The use of ISSR markers to identify Texas bluegrass interspecific hybrids. *Plant Breed*, 2008, 127, 644–646.
- GROOTJANS, A. P., ALLERSMA, G. J. R., KIK C. Hybridization of the habitat in disturbed hay meadows. In: van Andel J., Bakker J. P., Snaydon R. W. [eds], *Disturbance in grasslands: causes, effects and processes*. Dordrecht: Dr W. Junk Publishers, 1987, 67–77. ISBN 978-94-009-4055-0.
- Guerra, M. Agmatoploidy and symploidy: a critical review. *Genetics and Molecular Biology*, 2016, 39, 492–496.
- HADRYS, H., BALICK, M., SCHIERWATER, B. Applications on random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1992, 1, 55–63.
- HARUŠTIAKOVÁ, D., JARKOVSKÝ, J., LITTNEROVÁ, S., DUŠEK, L. *Vícerozměrné statistické metody v biologii*. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012. ISBN 978-80-7204-791-8.
- HEGARTY, M. J., HISCOCK, S. J. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist*, 2005, 165(2), 411–423.

- HIPP, A. L., ROTHROCK, P. E., ROALSON, E. H. The evolution of chromosome arrangements in *Carex* (Cyperaceae). *The Botanical Review*, 2009, 75, 96–109.
- HOSHINO, T., WATERWAY, M. J. Cytogeography and meiotic chromosome configurations of six intraspecific aneuploids of *Carex conica* Boott (Cyperaceae) in Japan. *Journal of Plant Research*, 1994, 107, 131–138.
- CHISTIYAKOV, D. A., HELLEMANS, B., VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 2006, 255, 1–29.
- ISHIDA, T. A., HATTORI, K., SATO, H., KIMURA, M. T. Differentiation and hybridization between *Quercus crispula* and *Q. dentata* (Fagaceae): insights from morphological traits, amplified fragment length polymorphism markers, and leafminer composition. *American Journal of Botany*, 2003, 90(5), 769–776.
- JANKOVSKÝ, L., ŠMERDA, J., Aplikace molekulární biologie v lesnictví – molekulární markery. *Lesnická práce*, 2003, 82(1).
- JANOVSKÝ, Z. Vztahy rostlin a opylovačů na louce aneb nejen botanici určují rostliny. *Živa*, 2012, 4, 210–212.
- JEGOROVA, T. V. The sedges (*Carex* L.) of Russia and adjacent states (within the limits of the former USSR). *St. Petersburg: St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy*, 1999.
- JERMY, A. C., SIMPSON, D. A., FOLEY, M. J. Y., PRORTER, M. S. *Sedges of the British Isles*. London: Botanical Society of the British Isles, 2007. ISBN 9780901158352.
- JIGGINS C. D., MALLETT J. Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 2000, 15, 250–255.
- JOSHI, J., SCHMID, B., CALDEIRA, M., DIMITRAKOPULUS, P., GOOD, J., HARRIS, R., et al. Local adaptation enhances performance of common plant species. *Ecology Letters*, 2001, 4, 536–544.
- KIFFE, K. *Carex* hybrids in Hesse. *Botanik und Naturschutz in Hessen*, 2004, 17, 77–86.
- KIM, S. T., DONOGHUE, M. J. Incongruence between cpDNA and nrITS trees indicates extensive hybridization within *Eupersicaria* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*, 2008, 95, 1122–1135.

KIRSCHNER, J., KIRSCHNEROVÁ, L. (2000) 131. *Gentianaceae Juss.* / hořcovité. In: Slavík B. [ed.], *Květena České republiky 6*. Praha: Academia, 2000, 82–98. ISBN 80-200-0306-1.

KOBIERSKI, P., RYŚ, R. Rozmieszczenie wybranych taksonów roślin naczyniowych na obszarze powiatu żarskiego (zachodnia Polska). *Przeгляд Przyrodniczy*, 2017, 28(1), 3-42.

KOCHERT, G., STALKER, H. T., GIMENES, M., GALGARO, L., LOPES, C. R., MOORE, K. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (*Leguminosae*). *American Journal of Botany*, 1996, 1282–1291.

KONEČNÁ, E. *Studium genetické příbuznosti rostlin pomocí molekulárních markerů*. Brno, 2010. Diplomová práce. MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ. Vedoucí práce Ing. Pavel Hanáček Ph.D.

KOOPMAN, J. *Carex*-hybriden in Nederland. *Gorteria*, 2010, 34(6), 159–169.

KOOPMAN, J., WIĘCŁAW, H., KARL, R., FAYVUSH, G., OGANESIAN, M., VITEK, E. New records of *Carex* (*Cyperaceae*) for the flora of Armenia II. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 2017, 119, 167–172.

KOPECKY, D., LOUREIRO, J., ZWIRZYKOWSKI, Z., GHESQUIERE, M., DOLEŽEL, J. Genome constitution and evolution in *Lolium* x *Festuca* hybrid cultivars (*Festulolium*). *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113, 731–742.

KORPELAINEN, H., KOSTAMO, K., VIRTANEN, V., VÄRE, H. Hybridization and introgression in *Carex aquatilis* and *C. paleacea*. *Plant Systematics and Evolution*, 2010, 287, 141–151.

KOŠNAR J., KOŠNAR J., HERBSTOVÁ M., MACEK P., REJMÁNKOVÁ E., ŠTECH M. Natural hybridization in tropical spikerushes of *Eleocharis* subgenus *Limnochloa* (*Cyperaceae*): evidence from morphology and DNA markers. *American Journal of Botany*, 2010, 97, 1229–1240.

KUBÁT, K. *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0836-5.

LAJKEPOVÁ, E. *Detekce mezidruhového genového toku v rodu Cirsium*. 2013. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.

LEVIN, D. A. The origin of isolating mechanisms in flowering plants. *Evolutionary Biology*, 1978, 11, 185–317.

LIPNEROVÁ, I., BUREŠ, P., HOROVÁ, L., ŠMARDA, P. Evolution of genome size in *Carex* (*Cyperaceae*) in relation to chromosome number and genomic base composition. *Annals of Botany*, 2013, 111, 79–94.

LIU, Z. J., CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 2004, 238, 1–37.

LO, E. Y. Y. Testing hybridization hypotheses and evaluating the evolutionary potential of hybrids in mangrove plant species. *Journal of Evolutionary Biology*, 2010, 23(10), 2249–2261.

LUCEÑO, M. Cytotaxonomic studies in Iberian, Balearic, North African, and Macaronesian species of *Carex* (*Cyperaceae*): II. *Canadian Journal of Botany*, 1994, 72, 587–596.

MAGUILLA, E., ESCUDERO, M., HIPPEL, A. L., LUCEÑO, M. Allopatric speciation despite historical gene flow: divergence and hybridization in *Carex furva* and *C. lucennoiberica* (*Cyperaceae*) inferred from plastid and nuclear RAD-seq data. *Molecular ecology*, 2017.

MACHOLÁN, M., MUNCLINGER, P. Hybridní zóny a „záhada záhad“. Studium hybridních zón a otázka vzniku druhů. *Živa. Academia*, 2007, (3), 134–137.

MCINTIRE, E. J. B., WATERWAY, M. J. Clonal structure and hybrid susceptibility to a smut pathogen in microscale hybrid zones of northern wetland *Carex* (*Cyperaceae*). *American journal of botany*, 2002, 89(4), 642–654.

MELO, C. A. F., SILVA, G. S., SOUZA, M. M. Establishment of the genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14 (1), 2176–2188.

MITROVÁ, K., OVESNÁ, J. Použití metody analýzy mikrosatelitů pro charakterizaci odrůd cibule. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2015. ISBN 978-80-7427-196-0.

MOORE, W. S. An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review of Biology*, 1977, 52, 263–77.

NAGAMASU, H., KINOSHITA, S. A natural hybrid between *Carex curvicollis* and *C. forficula* (*Cyperaceae*), and the lectotypification of *C. ×musashiensis*. *Journal of Japanese Botany*, 2010, 85, 297–302.



NEALE, D. B., SEDEROFF, R. R. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 77, 212–216.

NG, W. L., TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? *ASM Science Journal*, 2015, 9(1), 30–39.

PEDERSEN, A. T. M., NOWAK, M. D., BRYSTING, A. K., ELVEN, R., BJORA, C. S. Correction: Hybrid origins of *Carex rostrata* var. *borealis* and *C. stenolepis*, two problematic taxa in *Carex* section *Vesicariae* (*Cyperaceae*). *PLoS ONE*, 2016, 11(10), 1–18.

PERIS, D., SYLVESTER, K., LIBKIND, D., GONÇALVES, P., SAMPAIO, J.P., ALEXANDER, W.G., HITTINGER, C.T. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Molecular Ecology*, 2014, 23, 2031–2045.

POSPÍŠKOVÁ, M., VACKOVÁ, K. Elektroforetická analýza isoenzymů. Biochemické přístupy ke studiu rostlinné buňky [online]. 1997, 53–54 [cit. 2017-12-16]. Dostupné z: [http://www.ueb.asuch.cas.cz/methods/files/Methods\\_1997/biochemie\\_1997.pdf](http://www.ueb.asuch.cas.cz/methods/files/Methods_1997/biochemie_1997.pdf)

RIESEBERG, L. H., ELLSTRAND, N. C. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridisation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1993, 12(3), 213–241.

ROTREKLOVÁ, O., BUREŠ, P., ŘEPKA, R., GRULICH, V., ŠMARDÁ, P., HRALOVÁ, I., ZEDEK, F., KOUTECKÝ, T. Chromosome numbers of *Carex*. *Preslia*, 2011, 83, 25–58.  
RUSE, M. Definitions of Species in Biology. *The British Journal for the Philosophy of Science*, 1969, 20, 97–119.

ŘEPKA, R., GRULICH, V. *Ostřice České republiky: terénní obrazový průvodce*. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce, 2014. ISBN 978-80-7458-066-6.

ŘEPKA, R., VESELÁ, P., MRÁČEK, J. Are there hybrids between *Carex flacca* and *C. tomentosa* in the Czech Republic and Slovakia? *Preslia*, 2014, 86(4), 367–379.

SAEEDI, Y., NOBREGA, P., GOUVEIA, L. Identification of spontaneous Portuguese digitalis hybrids using RAPD markers. *Planta Medica*, 2012, 78(11), 1112–1112.

- SCHMIDT, L., FISCHER, M., SCHMID, B., OJA, T. Despite admixing two closely related *Carex* species differ in their regional morphological differentiation. *Plant systematics and evolution*, 2017, 303(7), 901–914.
- SCHRÖDER, H. K., ANDERSEN, H. E., KIEHL, K. Rejecting the mean: Estimating the response of fen plant species to environmental factors by non-linear quantile regression. *Journal of Vegetation Science*, 2005, 16(4), 373–382.
- SMADJA, C., CATALAN, J., GANEM, G. Strong premating divergence in a unimodal hybrid zone between two subspecies of the house mouse. *Journal of evolutionary biology*, 2004, 17(1), 165–176.
- SMITH, T. W., WATERWAY, M. J. Evaluating species limits and hybridization in the *Carex complanata* complex using morphology, amplified fragment length polymorphisms, and restriction fragment analysis. *Botany*, 2008, 86, 809–826.
- STACE, C. A., PRESTON, C. D., PEARMAN, D. A. *Hybrid flora of the British Isles*. Bristol: Botanical Society of Britain and Ireland, 2015. ISBN 978-0-901158-48-2.
- STANDLEY, L. Allozyme Evidence for the Hybrid Origin of the Maritime Species *Carex salina* and *Carex recta* (*Cyperaceae*) in Eastern North America. *Systematic Botany*, 1990, 15(2), 182–191.
- STOEVA, M., UZUNOVA, K., POPOVA, E., STOYANOVA, K. Patterns and levels of variation within section *Phacocystis* of genus *Carex* (*Cyperaceae*) in Bulgaria. *Phytologia Balcanica*, 2005, 11(1), 45–62.
- ŠMILAUER, P., LEPŠ, J. *Multivariate analysis of ecological data using Canoco 5*. Cambridge University Press, 2014. ISBN 9781107694408.
- TANAKA, N. Chromosome studies in the genus *Carex* with special reference to aneuploidy and polyploidy. *Cytologia*, 1949, 15, 15–29.
- THÓRSSON, Æ. Th., PÁLSSON, S., SIGURGEIRSSON, A., ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. Morphological Variation among *Betula nana* (diploid), *B. pubescens* (tetraploid) and their Triploid Hybrids in Iceland, *Annals of Botany*, 2007, 99(6), 1183–1193.
- TOIVONEN, H. *Carex canescens* × *mackenziei*. A comparative study of two *Carex* species and their spontaneous hybrid. *Annales Botanici Fennici*, 1980, 17(1), 91–123.

WATERWAY, Marcia J. Genetic differentiation and hybridization between *Carex gynodynamis* and *C. mendocinensis* (Cyperaceae) in California. *American Journal of Botany*, 1990, 826–838.

WENDEL, J. F., STEWART, J. McD., RETTING, J. H. Molecular evidence for homoploid reticulate evolution among Australian species of *Gossypium*. *Evolution*, 1991, 45, 694–711.

WHATLEY, J. M. Ultrastructure of plastid inheritance: Green algae to angiosperms. *Biological Reviews*, 1982, 57(4), 527–569.

WIĘCŁAW, H., KOOPMAN, J. Numerical analysis of morphology of natural hybrids between *Carex hostiana* and the members of *Carex flava* agg. (Cyperaceae). *Nordic Journal of Botany*, 2013, 3, 464–472.

WOLF, D. E., TAKEBAYSHI, N., RIESEBERG, L. H. Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology*, 2001, 15(4), 1039–1053

WOLFE, A. D., XIANG, Q. Y., KEPHART, S. R. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95, 5112–5115.