

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky



Diplomová práce

**Morfologická variabilita okruhu
Dactylorhiza traunsteineri agg. ve vztahu k *D. majalis*
v České republice a přilehlých oblastech**

Morphological variability of *Dactylorhiza traunsteineri* agg. in relation to
D. majalis in Czech Republic and surrounding regions

František Lamla

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika

Forma studia: prezenční

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Bohumil Trávníček, Ph.D.**

Konzultanti: **RNDr. Michal Hroneš, Ph.D.**

Mgr. Vojtěch Taraška, Ph.D.

Olomouc 2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: František Lamla

Název práce: Morfologická variabilita okruhu *Dactylorhiza traunsteineri* agg. ve vztahu k *D. majalis* v České republice a přilehlých oblastech

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: doc. RNDr. Bohumil Trávníček, Ph.D.

Rok obhajoby: 2019

Abstrakt: Práce byla zaměřená na analýzu především morfologické, ale také ekologické, fenologické a karyologické variability taxonomicky a evolučně komplikovaného okruhu alotetraploidních taxonů *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* v oblasti střední Evropy. Celkem bylo navštíveno 19 lokalit na území České republiky, Rakouska a Německa, s údajným výskytem celkem 4 taxonů alotetraploidního komplexu (*D. majalis*, *D. lapponica*, *D. traunsteineri*, *D. majalis* subsp. *turfosa*). Morfologie taxonu *D. curvifolia* byla analyzována pouze na základě herbářových položek, jelikož tento druh je v současnosti ve studovaném území považován za vyhynulý. Celkem bylo morfometricky, karyologicky a fenologicky analyzováno 333 jedinců, zapsáno 16 fytoecologických snímků a odebráno 15 vzorků půdy pro měření pH. Vyjma morfologických kvantitativních znaků na vegetativních orgánech jsou jedinci *D. majalis* a domnělé *D. lapponica* téměř shodní, a to i ve své fenologii a karyologii. Lze proto vyvodit, že se *D. lapponica* na lokalitách, z nichž je uváděna, s nejvyšší pravděpodobností nevyskytuje a jde v tomto případě pouze o záměnu s jedinci *D. majalis*, kteří svou poněkud odlišnou morfologií reagují na extrémní stanovištní podmínky pěnovecových pramenišť. Jedinci ze zaniklé lokality Soos považovaní za *D. curvifolia* jsou velmi morfologicky podobní s rostlinami *D. traunsteineri* z jihozápadních Čech a jižního Bavorska a zároveň svými znaky neodpovídají údajům uváděným pro taxon *D. curvifolia* v literatuře. Je tedy dosti pravděpodobné, že revize jejich taxonomické příslušnosti na konci 70. let 20. století dospěla k nesprávným závěrům a jde pouze o poněkud atypickou populaci druhu *D. traunsteineri*. Ve studovaném území byl potvrzen výskyt dvou ekologicky, karyologicky a částečně i morfologicky odlišných typů *D. traunsteineri*. Jelikož mezi těmito dvěma skupinami populací zřejmě nedochází ke genovému toku, je vhodné tyto dva ekotypy považovat za svébytné biologické entity a snad jim i přiřadit některý z ranků hierarchické klasifikace. Zjištěna byla také značná nespolehlivost pro taxon *D. traunsteineri* často uváděného determinačního znaku – neskvřnitosti listů. V rozporu s literaturou, která neskvřnitost uvádí jako typickou pro většinou jedinců tohoto taxonu, měla v rámci této studie listy beze skvrn méně než polovina zkoumaných rostlin. Pro jižní Čechy endemická *D. majalis* subsp. *turfosa* se podle provedených analýz od ostatních taxonů komplexu liší kromě morfologie také průměrně vyššími hodnotami velikosti genomu. To ukazuje na pravděpodobnou reprodukční bariéru mezi tímto taxonem a zbytkem alotetraploidního komplexu *D. majalis/traunsteineri* a naznačuje, že je původ tohoto taxonu starší a nejde o produkt nedávné hybridizace například mezi *D. majalis* a *D. traunsteineri*. I proto by si *D. *turfosa* zasluhovala v závislosti na taxonomickém pojetí rank alespoň poddruhu, a to nejspíš pod jí nejpodobnější *D. traunsteineri*.

Klíčová slova: *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* agg., morfometrika, karyologie, taxonomie, fenologie, fytoocenologie, střední Evropa

Počet stran: 73

Počet příloh: 1

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: František Lamla

Thesis title: Morphological variability of *Dactylorhiza traunsteineri* agg. in relation to *D. majalis* in Czech Republic and surrounding regions

Thesis type: Diploma

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

Supervisor: doc. RNDr. Bohumil Trávníček, Ph.D.

Year of presentation: 2019

Abstract: The work focused on the analysis primarily of morphological, but also ecological, phenological, and karyological variability of the taxonomically and evolutionarily complex group of allotetraploid taxa *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* in Central Europe. A total of 19 sites were visited in the Czech Republic, Austria, and Germany, with the reported occurrence of 4 allotetraploid complex taxa (*D. majalis*, *D. lapponica*, *D. traunsteineri*, *D. majalis* subsp. *turfosa*). The morphological analysis of the taxon *D. curvifolia* was based solely on herbarium specimens, as this species is currently considered extinct in the studied area. In total, 333 individuals were analyzed morphometrically, karyologically, and phenologically, 16 phytosociological records were taken, and 15 soil samples were collected for pH measurement. Apart from the quantitative morphological traits on vegetative organs, individuals of *D. majalis* and the presumed *D. lapponica* are almost identical, including in their phenology and karyology. Therefore, it can be inferred that *D. lapponica* is most likely not present at the sites from which it has been reported, and this is merely a case of misidentification with individuals of *D. majalis*, which respond to the extreme habitat conditions of calcareous spring fens by somewhat altered morphology. Individuals from the extinct population „Soos“ considered to be *D. curvifolia* are very morphologically similar to *D. traunsteineri* plants from southwest Bohemia and southern Bavaria, and their characteristics differ from the data reported for *D. curvifolia* in the literature. It is thus quite probable that the revision of their taxonomic affiliation at the end of the 1970s was incorrect, and this was merely an atypical population of *D. traunsteineri*. In the studied area, the occurrence of two ecologically, karyologically, and partially morphologically distinct types of *D. traunsteineri* was recorded. Since gene flow between these two groups of populations likely does not occur, it is appropriate to consider these two ecotypes as distinct biological entities and possibly assign them some rank of the hierarchical classification. Significant unreliability of a commonly reported diagnostic feature for the taxon *D. traunsteineri* – the absence of leaf spots – was also found. Contrary to the literature, which describes this trait as typical for most individuals of this taxon, less than half of the examined plants exhibited unspotted leaves. The *D. majalis* subsp. *turfosa*, which is endemic to southwestern Bohemia, differs from other taxa of the complex not only in morphology but also in generally higher genome size values, indicating a probable reproductive barrier between this taxon and the rest of the allotetraploid complex *D. majalis/traunsteineri*. This suggests that the origin of this taxon is older and is not the product of recent hybridization, for example between *D. majalis* and *D. traunsteineri*. Therefore, *D. turfosa* should be, depending on the taxonomic concept, assigned at least the rank of a subspecies, most likely under the most similar *D. traunsteineri*.

Keywords: *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* agg., morphometrics, karyology, taxonomy, phenology, phytocoenology, central Europe

Number of pages: 73

Number of appendices: 1

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Na vzniku této práce má značný podíl hned několik lidí, jimž bych chtěl touto cestou poděkovat. Na prvním místě si velký dík zaslouží můj školitel Bob Trávníček a oba konzultanti Vojta Taraška a Michal Hroneš, bez jejichž vytrvalé a nezištné pomoci v terénu, v laboratoři i při samotném psaní by tato práce jistě nevznikla. Nemalý podíl na ní má také řada přátel i kolegů, kteří mi pomáhali jak při terénních výpravách, tak třeba při určování mechtů z fytoocenologických snímků. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, že mi nejen po dobu psaní této práce zajišťovali příjemné prostředí a dostatečnou míru motivace.



OBSAH

1. ÚVOD	10
1.1. Rod <i>Dactylorhiza</i> (prstnatec)	10
1.1.1. <i>Dactylorhiza majalis/traunsteineri</i> agg.	10
1. 1. 1. 1. <i>Dactylorhiza curvifolia</i> (F. Nyl) Czerep.....	11
1. 1. 1. 2. <i>Dactylorhiza lapponica</i> (Laest. ex Hartm.) Soó.....	12
1. 1. 1. 3. <i>Dactylorhiza majalis</i> (Rchb.) P.F.Hunt et Summerh. subsp. <i>majalis</i>	12
1. 1. 1. 4. <i>Dactylorhiza majalis</i> subsp. <i>turfosa</i> F. Proch.....	13
1. 1. 1. 5. <i>Dactylorhiza traunsteineri</i> (Saut. ex. Rchb.) Soó	13
1. 1. 1. 6. Ostatní taxony alotetraploidního komplexu s výskytem ve střední Evropě	14
1. 1. 1. 6. 1. <i>Dactylorhiza bohémica</i> Businský	14
1. 1. 1. 6. 2. <i>Dactylorhiza carpatica</i> (Batoušek et Kreutz) P. Delforge	14
2. CÍLE PRÁCE	16
3. MATERIÁL A METODY	17
3. 1. Sběr dat a rostlinného materiálu	17
3. 2. Analýza ploidie.....	17
3. 3. Fytocenologické snímky.....	18
3. 4. Měření pH substrátu	19
3. 5. Morfometrická analýza.....	19
3. 6. Analýza fenologie.....	20
4. VÝSLEDKY	22
4. 1. Analýza ploidie a relativní velikosti genomu	22
4. 2. Ekologie.....	23
4. 3. Fenologie	24
4. 4. Morfometrická analýza.....	26
4. 4. 1. Deskriptivní statistika.....	26
4. 4. 2. Analýza hlavních koordinát.....	30
4. 4. 3. Porovnání <i>Dactylorhiza *majalis</i> a <i>D. lapponica</i>	32
4. 4. 3. 1. Deskriptivní statistika a Mann-Whitney U-test	32
4. 4. 3. 2. Analýza hlavních koordinát (PCoA)	33
4. 4. 3. 3. Kanonická diskriminační analýza (CDA).....	33
4. 4. 4. Vzájemné porovnání ostatních taxonů <i>Dactylorhiza traunsteineri</i> agg. (<i>D. traunsteineri</i> , <i>D. *turfosa</i> , <i>D. curvifolia</i>).....	35
4. 4. 4. 1. Analýza hlavních koordinát (PCoA)	35
4. 4. 4. 2. Kanonická diskriminační analýza (CDA).....	36
4. 4. 5. Vzájemné porovnání ekologicky odlišných populací <i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	38
4. 4. 5. 1. Deskriptivní statistika a Mann-Whitney U-test	38

4. 4. 5. 2. Porovnání znaků měřených na ordinální škále	39
4. 4. 5. 3. Analýza hlavních koordinát (PCoA)	41
4. 4. 5. 4. Kanonická diskriminační analýza (CDA).....	41
4. 4. 6. Vzájemné porovnání taxonů aloploidního okruhu <i>D. majalis/traunsteineri</i> se sympatrickým výskytem v Čechách (<i>D. *majalis</i> , <i>D. traunsteineri</i> , <i>D. *turfosa</i>)	43
4. 4. 6. 1. Deskriptivní statistika kvantitativních znaků a Kruskal-Wallisův test.....	43
4. 4. 6. 2. Deskriptivní statistika kvalitativních znaků a χ^2 -test.....	44
4. 4. 6. 3. Analýza hlavních koordinát (PCoA)	46
4. 4. 6. 4. Kanonická diskriminační analýza (CDA).....	46
4. 4. 7. Vzájemné porovnání obou ekotypů <i>D. traunsteineri</i> a <i>D. *turfosa</i>	48
4. 4. 7. 1. Deskriptivní statistika kvantitativních znaků a Kruskal-Wallisův test.....	48
4. 4. 7. 2. Deskriptivní statistika kvalitativních znaků a χ^2 -test.....	49
4. 4. 7. 3. Analýza hlavních koordinát (PCoA)	51
4. 4. 7. 4. Kanonická diskriminační analýza (CDA).....	51
5. DISKUZE	53
5. 1. Variabilita velikosti genomu a její význam pro klasifikaci prstneců z okruhu <i>D. majalis/traunsteineri</i>	53
5. 2. Stanovištní preference taxonů alotetraploidního komplexu <i>D. majalis/traunsteineri</i> a její taxonomické důsledky	54
5. 3. Variabilita v načasování kvetení u taxonů alotetraploidního komplexu <i>D. majalis/traunsteineri</i> a její možný vliv na speciaci	55
5. 3. 1. Porovnání s <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>fuchsii</i>	55
5. 3. 2. Porovnání s <i>Dactylorhiza majalis</i> subsp. <i>majalis</i>	56
5. 4. Morfologická variabilita taxonů alotetraploidního komplexu <i>D. majalis/traunsteineri</i> ve střední Evropě	57
5. 4. 1. <i>Dactylorhiza curvifolia</i>	57
5. 4. 2. <i>Dactylorhiza lapponica</i>	57
5. 4. 3. <i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	58
5. 4. 4. <i>Dactylorhiza majalis</i> subsp. <i>turfosa</i>	58
5. 5. Taxonomické závěry	59
6. ZÁVĚR.....	62
7. CITACE	63
8. PŘÍLOHY	69

1. ÚVOD

1.1. Rod *Dactylorhiza* (prstnatec)

Rod *Dactylorhiza* Necker ex Nevski zahrnuje vytrvalé geofytní rostliny s prstovitě dělenými hlízami. Lodyhy jsou přímé, olistěné po celé délce úzce kopinatými až vejčitými, případně obvejčitými, často tmavonachově skvrnitými listy. V horní části lodyh vyrůstají květenství typu klasu s květy nejčastěji v různých odstínech růžové až fialové, někdy však mohou být i bílé, červené, žluté, či žlutozelené. Podepřeny jsou drobnými, bylinnými listeny (Kubát 2010). Květy jsou cca 6-20 mm velké, zygomorfí, často s výraznou kresbou, největší okvětní lístek, tzv. pysk, je opatřené ostruhou, která neprodukuje nektar (s výjimkou *D. viridis* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase) a která slouží ke zmatení potenciálních opylovačů. Těmi jsou nejčastěji různí zástupci blanokřídlého hmyzu (Claessens et Kleyen 2011).

Podle nejčastěji přijímaného pojetí (Eccarius 2016) zahrnuje rod *Dactylorhiza* dva podrody – subg. *Viridae* Eccarius s jediným druhem *Dactylorhiza viridis* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase a s cirkumboreálním rozšířením a subg. *Dactylorhiza* s počtem druhů kolísajícím v závislosti na pojetí mezi 6 a 75 (Pedersen 1998), a rozšířením palearktickým. V rámci čeledi Orchidaceae jde o jeden z taxonomicky nejkomplicovanějších a nejintenzivněji zkoumaných rodů (např. Hedrén 2001, Ståhlberg & Hedrén 2008, Bateman 2018, Taraška et al. 2021, Wolfe et al. 2023). Příčin těchto taxonomických nesází je celá řada. Rod *Dactylorhiza* je evolučně poměrně mladou skupinou, a tak se v něm stále do značné míry uplatňují všechny mikroevoluční procesy, jako je hybridizace, polyploidizace a svou roli zřejmě hrají i epigenetické procesy (Eccarius 2016, Neuwirthová 2018). Zvláště pak díky přítomnosti slabých reprodukčních bariér dochází na společných lokalitách více druhů často ke vzniku tzv. hybridních rojů, v nichž jedinci nesou znaky od obou původních rodičů v různém poměru (např. Aagard et al. 2005, De Hert et al. 2011, Jacquemyn et al. 2016). Zástupci rodu také často vykazují značnou fenotypovou plasticitu, a to jak ve vegetativních, tak zčásti patrně i generativních znacích, což může dále ztěžovat jejich klasifikaci i následnou determinaci. Vzhledem k rozsáhlému areálu výskytu zástupců podrodu *Dactylorhiza* se v něm vyštěpilo mnoho linií, které často i díky antropickým vlivům zůstaly izolovány a mohlo tak u nich docházet ke vzniku nových vlastností.

Tato práce se zabývá skupinou alotetraploidních taxonů *D.majalis/traunsteineri* agg. (Nordström et Hedrén 2009), která má jádro výskytu ve střední Evropě a je jednou z nejkomplicovanějších vývojových větví rodu.

1.1.1. *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* agg.

Skupina alotetraploidních taxonů sloučených pod jménem *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* agg. má původ v hybridizaci dvou evropských taxonů – *D. maculata* s. lat. a *D. incarnata* s. lat. (Hedrén 1996, Pillon et al. 2007, Brandrud et al. 2020). Z dat o chloroplastové a jaderné DNA vyplývá, že mateřským taxonem, po kterém zdědili potomci plastidovou i část jaderné DNA, je *D. maculata*, zatímco donorem pylu je *D. incarnata*, po které hybridní potomci zdědili pouze jadernou DNA. Opakovaná hybridizace mezi oběma rodičovskými taxony zřejmě vedla v průběhu evoluce k nezávislému vzniku několika alotetraploidních linií, které si mohou, ale také nemusí být značně podobné jak v morfologických, tak genetických znacích (Wolfe et al. 2023). Polyfyletický původ celé skupiny vede následně v kombinaci s nepřítomností, či přítomností pouze slabých reprodukčních bariér k retikulární evoluci v rámci celé skupiny a značnému překryvu vlastností mezi jednotlivými taxony (Pedersen 1998, Nordström et Hedrén 2008).

Taxony tohoto komplexu lze rozdělit na starší a mladší. U druhu *D. majalis* je předpokládán již předholocénní původ z výše zmíněných rodičovských taxonů, s čímž je v souladu sada odvozených morfologických a genetických znaků (ITS), jimiž se od zbytku okruhu odlišuje. Naproti tomu je u zbytku taxonů komplexu pravděpodobné, že vznikly až v současném interglaciálu a neprojevil se u nich proto výrazně bottle-neck efekt, který by zúžil jejich morfologickou a genotypovou variabilitu (Paun et al. 2011). Tato dichotomie má poté významný vliv na další evoluci taxonů této skupiny, jelikož může docházet k hybridizaci značně stabilizované *D. majalis* s ostatními taxony alotetraploidního komplexu a tím ke vzniku nových, potenciálně klasifikovatelných linií.

Taxony náležející do této skupiny se mimo společný původ a s ním spojený shodný chromosomový počet $2n = 4x = 80$ vyznačují také preferencí pro vlhká až podmáčená stanoviště. S tím souvisí často vysoká míra ohrožení v zemích střední Evropy a přítomnost taxonů z okruhu *D. majalis/traunsteineri* na červených seznamech těchto zemí (např. Grulich 2012, Metzing et al. 2018).

Odlišení zástupců této skupiny od vzdáleněji příbuzných taxonů rodu *Dactylorhiza* obvykle nečiní větší potíže, problematičtější však bývá jejich správné rozpoznání v případě společného výskytu s některým z rodičovských taxonů tohoto alotetraploidního komplexu na jedné lokalitě. Od *D. incarnata* taxony komplexu odlišuje kombinace menšího množství větších květů a od báze se zužující, alespoň u části jedinců v populaci skvrnitě listy, které od lodyhy odstupují ve větším úhlu (u *D. incarnata* téměř všechny lodyžní listy odstupují od lodyhy ve velmi ostrém úhlu) (Ponert 2019). S tímto taxonem mohou zástupci alotetraploidního komplexu vytvářet hybridy a zvláště v případě *D. majalis* tak činí na společných lokalitách téměř s pravidelností. Tyto pak mohou činit obtíže při determinaci, díky rozdílnému ploidnímu stupni obou rodičů (*D. incarnata* – $2n = 40$; *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* agg. – $2n = 80$; De Hert et al. 2012) je však lze spolehlivě určit pomocí analýzy průtokovým citometrem, neboť tyto hybridy mají zpravidla intermediární velikost genomu (Kantor 2019). Poněkud náročnější může být odlišení hybridních jedinců vzniklých křížením s druhým z rodičů alotetraploidního komplexu, tedy s taxony *D. maculata* agg. (ty mohou být jak diploidní, tak tetraploidní; např. Ståhlberg et Hedrén 2010). I zde však může pomoci velikost genomu rostlin, jelikož ta je i při stejné ploidii u rodičovských taxonů dostatečně rozdílná (např. Šmarda et al. 2019). Taxony samotného okruhu *D. maculata* se pak morfologicky odlišují výrazně širšími listy a vyšší celkovou výškou, zvláště v poměru k délce květenství (Kubát 2010, Ponert 2019). Klíčovým znakem pro správné odlišení taxonů v rámci alotetraploidního komplexu je také fenologie, která je poměrně charakteristická pro jednotlivé taxony a její znalost tak může výrazně usnadnit určování (Ponert 2019).

Z alotetraploidního agregátu *D. majalis/traunsteineri* je ve střední Evropě v současné době obvykle rozeznáváno 7 poddruhů řazených k 6 druhům, kterým jsou věnovány další kapitoly úvodu.

1. 1. 1. 1. *Dactylorhiza curvifolia* (F. Nyl) Czerep.

Prstnatec Russowův (*Dactylorhiza curvifolia*) je dnes v oblasti suboceanické střední Evropy zřejmě vyhynulým druhem s jedinou historickou lokalitou v NPR Soos u Františkových Lázní, na které však patrně vyhynul již v polovině 20. století a ze které byl rozpoznán až zpětně na základě herbářového materiálu (Procházka 1979). Zbytek světového areálu druhu se rozkládá v jižní části Pobaltí a dál směrem na východ do Běloruska a Ruska. Morfologicky jde o druh poměrně drobný, s lodyhou však poněkud tlustší, částečně smáčkutelnou. Listy v počtu 4-5 jsou nahloucheny ve spodní části lodyhy, nejdelší list je nejširší v 1/3 až 1/2 své délky. Listy bývají výrazně pigmentované velkými tmavými skvrnami a jejich apikální část je často dolů ohnutá. Právě tento znak dal taxonu jeho vědecké jméno. Lodyha bývá také silně fialově naběhlá, květy jsou poměrně velké, uspořádané v krátkém květenství na konci lodyhy. Pysk květů je jen mělce trojlaločný, střední lalok často výrazně převyšuje oba postranní a je tupě zakončený (Delforge 2006, Kubát 2010). Typickými stanovišti tohoto druhu jsou trvale zamokřená bazická slatiniště a prameniště, téměř vždy v rovinatých příbřežních oblastech (Eccarius 2016). Ke kvetení dochází v závislosti na klimatu stanoviště od června do července.

Od značně podobné *D. traunsteineri*, za kterou byl tento taxon i na našem území až do vydání článku Fr. Procházky (1979) zaměňován, se *D. curvifolia* liší tlustší lodyhou a méně trojlaločným pyskem. Ve svých monografiích však Delforge i Eccarius přiznávají, že je *D. curvifolia* často velmi variabilním taxonem, který se navíc vyskytuje v sympatrii s jinými druhy *D. majalis/traunsteineri* agg., zejména *D. traunsteineri*, od které bývá značně obtížné tento taxon odlišit (Delforge 2006, Eccarius 2016).

Genetická studie z oblasti Skandinávie založená na chloroplastové DNA neprokázala žádnou diferenciaci mezi tímto taxonem a taxony *D. majalis* subsp. *lapponica* (Laest. ex Hartm.) H. Sund. a *D. majalis* subsp. *traunsteineri* (Saut. ex Rchb.) H. Sund. (autoři uznávají širší pojetí taxonu *D. majalis*, kdy tento sdružuje všechny zástupce alopolyloidního komplexu) pročež její autoři navrhuji synonymizaci těchto jmen s *D. majalis* subsp. *lapponica* (Nordström et Hedrén 2008). V průběhu historie byl tento taxon někdy řazen také jako poddruh široce pojaté *D. majalis*, případně *D. traunsteineri* (Eccarius 2016), dnes však převládá tendence vylišovat tento taxon díky jeho odlišné morfologii jako samostatný druh (Aida 2016).

Do této práce byl tento taxon zahrnut, jelikož jeho jediná středoevropská populace nebyla nikdy porovnána se zbytkem středoevropských populací *D. traunsteineri* a mohla by k nim mít poměrně blízký vztah.

1. 1. 1. 2. *Dactylorhiza lapponica* (Laest. ex Hartm.) Soó

Prstnatec laponský (*Dactylorhiza lapponica*) je z oblasti střední Evropy udáván někdy jen v poddruhu subsp. *rhaetica* H. Baumann et R. Lorenz, který se má údajně vyskytovat ve vápencových oblastech vyšších pohoří, jako jsou Alpy (zejména jejich východní a jihovýchodní část, kde má taxon i své *locus classicus*) a západní Karpaty, díky kterým má sahat svým výskytem až na území ČR. Nominátní poddruh byl popsán již v první polovině 19. století ze severního Švédska. Jedinci označovaní ve střední Evropě jako *D. lapponica* jsou poměrně drobné, avšak robustní rostliny s částečně smáčkutelnou lodyhou. Krátké, relativně široké a tupě zakončené listy jsou v počtu 3-5 rozmístěny rovnoměrně na krátké lodyze a jsou obvykle pokryty malým počtem poměrně velkých a silně kontrastních tmavých skvrn. Lodyha bývá v horní části obvykle silně tmavofialově naběhlá a nese malý počet drobných, taktéž výrazně pigmentovaných květů (Delforge 2006, Ponert 2019). Ve střední Evropě je *D. lapponica* uváděna ze silně bazických pramenišť a slatin, zatímco ve Skandinávii má druh ekologickou valenci výrazně širší a může růst i na kyselých rašelinných substrátech (Eccarius 2016). V závislosti na nadmořské výšce konkrétní lokality kvete tento taxon ve střední Evropě obvykle od poloviny května do první poloviny července.

V oblasti střední Evropy může činit obtíže odlišení tohoto taxonu od *D. majalis*, se kterou se vyskytuje téměř vždy na společných lokalitách (vlastní pozorování). Od tohoto druhu by se *D. lapponica* měla lišit drobnějším vzrůstem a výraznou tmavofialovou pigmentací vegetativních i generativních orgánů. V oblasti Alp, kde tento taxon místy roste i sympatricky s *D. traunsteineri*, jej od tohoto taxonu můžeme odlišit podle krátkých skvrnitých listů a drobného vzrůstu. K určování je ale podobně jako u všech prstnateců potřeba přistupovat obezřetně, studovat celkovou variabilitu populací na lokalitě a vyvarovat se určování atypických jedinců (Gathoye et Tyteca 1987).

Studie, které by se zabývaly genetikou a původem poddruhu subsp. *rhaetica* dodnes neexistují, je však možné, že v jediné studii, která zkoumala genetiku rostlin z okruhu *D. majalis/traunsteineri* v prostoru Alp (Balao et al. 2016), byly rostliny *D. lapponica* před zahájením analýz chybně přiřazeny k *D. traunsteineri*, což by mohlo poukazovat na nesprávnou obecně přijímanou klasifikaci těchto populací. V oblasti Skandinávie se genetikou *D. majalis/traunsteineri* agg. zabývali Nordström et Hedrén (2009), kteří navrhují na základě molekulárních dat synonymizaci *D. lapponica*, *D. curvifolia* a *D. traunsteineri* pod jménem *D. majalis* subsp. *lapponica* minimálně v oblasti Fennoskandie.

Tento taxon byl do této práce zahrnut, jelikož je z území střední Evropy uváděn z několika lokalit v Západních Karpatech a také z území České republiky a jeho postavení v rámci alopolyploidního komplexu *D. majalis/traunsteineri* agg. a z něj vyplývající taxonomické pojetí je alespoň v rámci střední Evropy stále nejasné.

1. 1. 1. 3. *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) P.F.Hunt et Summerh. subsp. *majalis*

Prstnatec májový pravý (*Dactylorhiza majalis* subsp. *majalis*; dále označován také jako *D. *majalis*) je jedním z nejběžnějších zástupců rodu *Dactylorhiza* ve střední Evropě. Popsán byl již v první polovině 19. století na základě materiálu z okolí Norimberku v Německu. Dnes známý výskyt sahá od severního Španělska a Dolomit na jihu až po jižní Skandinávii na severu. Směrem na východ je prstnatec májový pravý rozšířen až do západního Běloruska a Ukrajiny (Delforge 2006). *D. majalis* subsp. *majalis* tvoří oproti ostatním taxonům alotetraploidního komplexu poměrně statné rostliny, nezřídka dorůstající 40 cm. Lodyha je poměrně tlustá, s centrální dutinou, v horní části pod květenstvím někdy fialově naběhlá. Listy jsou v poměru k délce relativně široké, většinou špičatě zakončené a jen výjimečně beze skvrn. Květenství je husté a sestává obvykle z více, než 15 květů. Ty mají poměrně výraznou tmavofialovou kresbu na fialovém podkladě, pysk bývá mělce až hluboce trojlaločný (Delforge 2006, Kubát 2010, Ponert 2019). Jde o jeden z nejvariabilnějších taxonů alotetraploidního komplexu (Mróz et Kosiba 2011), pročež u něj bylo popsáno hned několik dalších infrataxonů, které však svým výskytem (s výjimkou *D. majalis* subsp. *turfosa* a alpské *D. majalis* subsp. *alpestris* (Pugsley) Senghas) nezasahují do střední Evropy (Eccarius 2016). Od ostatních vzácnějších taxonů alotetraploidního komplexu ve

střední Evropě se *D. majalis* subsp. *majalis* odlišuje ekologickou preferencí, jelikož jde o poměrně málo vybíravý taxon rostoucí na celé škále vlhkých osluněných stanovišť, jako jsou prameniště, vlhké pcháčovité louky, slatiniště, mezofilní louky atd. V závislosti na nadmořské výšce a klimatických podmínkách kvete tento poddruh obvykle od počátku května do začátku července (Kubát 2010).

Díky své široké ekologické amplitudě se tento taxon často vyskytuje společně na lokalitách s ostatními vzácnějšími taxony alotetraploidního komplexu. Geneticky čisté populace nebývá problém odlišit zejména na základě jejich časné fenologie, dlouhých a velmi širokých listů a hustého bohatého květenství. Navzdory reprodukční bariéře v podobě rozdílné doby kvetení však na společných lokalitách poměrně často dochází ke vzniku hybridních jedinců, jejichž správné určení může činit obtíže i zkušeným odborníkům.

Značná fenotypová i genetická variabilita tohoto taxonu napovídá, že jde o jeden z nejstarších v rámci celého alotetraploidního komplexu, jehož původ sahá zřejmě až do pleistocénu (Pillon et al. 2007, Balao et al. 2016). Je tedy možné a asi i pravděpodobné, že v průběhu pleistocénní historie opakovaně kolonizoval oblasti po ústupu pevninského ledovce, kde zakládal nové populace (Hedrén et al. 2018; Hedrén et al. 2018).

1. 1. 1. 4. *Dactylorhiza majalis* subsp. *turfosa* F. Proch.

Prstnatec májový rašelinný (*Dactylorhiza majalis* subsp. *turfosa*; dále označován také jako *D. *turfosa*) byl popsán teprve v roce 1982 Františkem Procházkou z několika lokalit na české straně Šumavy (Procházka 1982). Jde o velmi vzácný taxon, dodnes známý jen ze Šumavy (krušnohorské populace zřejmě náleží k *D. majalis* subsp. *majalis*; Kaplan et al. 2017). Rostliny tohoto taxonu jsou většinou drobné, s relativně tlustou dutou lodyhou, která je v horní části výrazně fialově naběhlá. Listy jsou úzké a dlouhé, často úplně beze skvrn, vzácněji se vyskytují i jedinci s množstvím kontrastních fialových skvrn. Květenství je poměrně chudokvěté, tvořené 5-20 relativně velkými tmavofialovými květy. Pysk je v obrysu typicky okrouhlý, často však s výrazným středním lalokem (Eccarius 2016). Stanovištěm tohoto taxonu jsou přechodová rašeliniště a silně zrašelinělé louky v horském stupni (Kubát 2010, Ponert 2019). Ke kvetení dochází v druhé polovině června a na začátku července.

D. majalis subsp. *turfosa* roste často na společných lokalitách s *D. maculata* subsp. *fuchsii* (Procházka 1982) od níž však odlišení obvykle nečiní potíže. Údajně může vzácně docházet i k hybridizaci mezi oběma taxony, pak by k odlišení takto vzniklých jedinců mohla za předpokladu podobné velikosti genomu jako u blízké příbuzné *D. majalis* nejlépe posloužit průtoková cytometrie. Komplikovanější může být správné zařazení některých šumavských populací *D. majalis*, které vykazují přechodné znaky mezi oběma poddruhy, tedy subsp. *turfosa* a subsp. *majalis*. Nominátní poddruh se obvykle liší vyšším vzrůstem, výrazně skvrnitými listy a bohatým květenstvím, na některých lokalitách však lze nalézt velké množství intermediárních rostlin. Potíže může činit také odlišení od *D. traunsteineri*, ke které bývá tento taxon někdy řazen na úrovni poddruhu (např. Delforge 2006, Eccarius 2016). *Dactylorhiza traunsteineri* subsp. *traunsteineri* se od subsp. *turfosa* liší tenkou, nesmáčkutelnou lodyhou a užšími listy.

Původ tohoto taxonu dnes není znám, genetikou jeho populací ve vztahu k ostatním zástupcům alotetraploidního komplexu *D. majalis/traunsteineri* se stále nikdo nezabýval. Vzhledem ke geografické poloze jeho populací i poměrně nápadnému intermediárnímu vzhledu mezi *D. majalis* subsp. *majalis* a *D. traunsteineri* lze hypotetizovat, že jde o dávného hybridizací vzniklého potomka obou těchto taxonů, který se stabilizoval ve specifických podmínkách oligotrofní horských rašelinišť.

Do této práce byl tento taxon jakožto endemit střední Evropy s nevyřešeným postavením v rámci alotetraploidního komplexu zahrnut, a právě jeho původ a příbuznost s ostatními taxony komplexu je jednou z hlavních otázek této práce.

1. 1. 1. 5. *Dactylorhiza traunsteineri* (Saut. ex. Rchb.) Soó

Prstnatec Traunsteinerův (*Dactylorhiza traunsteineri*) byl popsán v roce 1830 z lokality Schwarzsee bei Kitzbühel v Rakousku. Výskyt tohoto taxonu je polydisjunktní, s arely v západní a jižní Francii, Alpách, Pobaltí a jihovýchodní Skandinávii (Eccarius 2016). Typickými charakteristikami tohoto druhu jsou štíhlý habitus s tenkou, nesmáčkutelnou lodyhou. Listy jsou úzké, nejširší obvykle v dolní třetině délky listové čepele a výrazně zašpičatělé. Skvrny na listech obvykle nejsou přítomny, a pokud ano, bývají jen bledé. Květenství je poměrně řídké, chudokvěté a sestává z relativně velkých, tmavofialových

květů s širokým pyskem. Ten je jen nevýrazně trojlaločný (Kubát 2010, Delforge 2006). Stanovišti tohoto druhu jsou ve střední Evropě rašelinné a slatinné louky s vysokou hladinou podzemních vod, obvykle v podhůří výraznějších horských celků. V závislosti na nadmořské výšce druh obvykle kvete od poloviny června do prvního červencového týdne.

Obzvláště na slatinných lokalitách v severním podhůří Alp tento druh často roste ve společnosti dalších taxonů rodu *Dactylorhiza*, jejichž odlišení může být značně náročné. Zde může vyjma štíhlého vzrůstu a úzkých listů výrazně pomoci také fenologie, která je oproti někdy morfologicky podobným exemplářům *D. majalis* opožděná až o tři týdny. Na společných lokalitách však často dochází i k hybridizaci, přičemž správná determinace hybridních rostlin, může být takřka nemožná. Pouze v případě křížení s rodičovskými druhy alotetraploidního komplexu (*D. maculata* subsp. *fuchsii* a *D. incarnata*) může díky rozdílné velikosti genomu (Šmarda et al. 2019) všech tří taxonů posloužit jako dobré vodítko pro určení potenciálních hybridů průtoková cytometrie.

Zdali tento taxon vznikl v evoluci jen jednou hybridizační událostí, a následně se významně rozšířil, nebo k jeho vzniku došlo několikrát nezávisle, to dodnes není jasné. Genetická data však naznačují pravdivost spíše první hypotézy, jelikož v Alpách, která je obecně považovaná za refugium mnoha rostlinných druhů v období střídání glaciálů a interglaciálů (např. Schönswetter et al. 2005), má tento taxon nejvyšší variabilitu, zatímco ve vzdálenějších areálech je haplotypová variabilita výrazně nižší (Nordström et Hedrén 2009). Tento taxon tak sice mohl v alpské oblasti vzniknout několikrát nezávisle, zdá se však, že do vzdálenějších regionů se v průběhu holocénu rozšířily jen některé genotypy. To by vysvětlovalo jen relativně malou genetickou podobnost postavenou na EBG genotypech mezi populacemi ze západní Evropy, Skandinávie a střední Evropy (Brandrud et al. 2020).

Jakožto jádrový taxon alotetraploidního komplexu byl tento do práce zahrnut. Ve zkoumaném území je zajímavá především značná dichotomie v jeho stanovištní preferenci a její důsledky jsou jednou z hlavních otázek této práce.

1. 1. 1. 6. Ostatní taxony alotetraploidního komplexu s výskytem ve střední Evropě

Následující dva taxony jsou považovány za svěbytné a na svých ojedinělých lokalitách poměrně izolované, a nebyly proto zahrnuty do měření provedených v rámci této práce.

1. 1. 1. 6. 1. *Dactylorhiza bohemica* Businský

Prstnatec český (*Dactylorhiza bohemica*) byl popsán v roce 1989 z Jestřebských slatin v severních Čechách, kde se dodnes nachází jeho jediná světová lokalita (Businský 1989, Kubát 2010, Eccarius 2016). Tento taxon se vyznačuje štíhlým habitem a poměrně krátkým, kompaktním květenstvím. Listy jsou dlouhé, nejširší v jedné polovině délky, nebo často i nad ní a často jen poměrně bledě skvrnitě středně velkými skvrnami. Květy jsou uspořádány v poměrně chudokvětém květenství. Mají bledě fialovou až fialovou barvu, na pysku se obvykle nachází jen poměrně jemná kresba. Lodyha je v úseku pod květenstvím často jemně fialově naběhlá (Businský 1989, vlastní pozorování). Stanovištěm druhu jsou vlhké slatinné louky na bazických substrátech svazu *Caricion davallianae*, ke kvetení za obvyklých meteorologických podmínek dochází ve dvou posledních červnových a prvním červencovém týdnu (Kubát 2010, vlastní pozorování).

Od nejpodobnější *D. traunsteineri* se tento taxon liší tvarem listů, které jsou nejširší nad polovinou délky, častou přítomností bledých skvrn na listech a poměrně kompaktním květenstvím (Ponert 2019).

Ačkoliv nejsou k dispozici žádné genetické studie, které by se zabývaly příbuzností tohoto druhu k ostatním taxonům *D. majalis/traunsteineri* agg., lze na základě morfologie předpokládat, že jde o taxon odvozený od druhu *D. traunsteineri* (k němuž bývá také někdy na úrovni poddruhu řazen; Eccarius 2016), případně mohl v *area classica* vzniknout nezávisle na ostatních taxonech alotetraploidního komplexu, jelikož se tam až dodnes vyskytují oba rodičovské taxony celé skupiny.

1. 1. 1. 6. 2. *Dactylorhiza carpatica* (Batoušek et Kreutz) P. Delforge

Prstnatec karpatský (*Dactylorhiza carpatica*) je druhým a posledním z českých stenoendemických zástupců čeledi Orchidaceae. Podobně jako *D. bohemica* byl i tento taxon popsán až poměrně nedávno, a to v roce 1999 pod jménem *Dactylorhiza traunsteineri* subsp. *carpatica* Batoušek et Kreutz ze své doposud jediné lokality na české straně Bílých Karpat (Batoušek et Kreutz 1999). Jde o druh štíhlého,

vysokého vzrůstu s dlouhými úzkými listy zužujícími se od báze ke špičce. Na listech se obvykle nachází mnoho drobných kontrastních skvrn. Celá rostlina bývá poměrně světle zbarvená, bez výrazné pigmentace lodyhy. Květy jsou drobné a uspořádané v poměrně hustém terminálním květenství. Barva květů je bledě růžová, často s kontrastní tmavofialovou kresbou. Jedinou lokalitou druhu je silně bazické luční pěnovecové prameniště, na němž se vyskytuje spolu s několika dalšími druhy rodu *Dactylorhiza* a s nimiž se zde poměrně ochotně kříží. *D. carpatica* kvete v průběhu června (Kubát 2010, Eccarius 2016).

Od podobné *D. traunsteineri* se tento druh liší téměř vždy skvrnitými listy a hustým květenstvím s drobnými, bledě růžovými květy. Od *D. maculata* subsp. *fuchsii*, která má na lokalitě takéž životaschopnou populaci se *D. carpatica* odlišuje výrazně drobnějšími květy s kontrastní kresbou a postranními úkrojky pysku nahoru odstálými a mnohem užšími, výrazně zašpičatělými listy (Ponert 2019).

Ani pro tento taxon nejsou k dispozici genetické studie, které by umožnily objasnit jeho vztah k *D. majalis/traunsteineri* agg. a k rodičovským druhům této skupiny. Vzhledem k výrazné geografické izolaci jediné lokality tohoto druhu od zbytku areálu *D. traunsteineri* lze předpokládat, že tento druh vznikl nezávisle na tomto taxonu přímo na své jediné lokalitě, případně v jejím nedalekém okolí. Jelikož se *D. carpatica* na lokalitě vyskytuje společně s několika dalšími druhy rodu *Dactylorhiza*, s nimiž se zde ochotně kříží je existence tohoto druhu dnes výrazně ohrožena introgresí. Tento taxon bývá někdy řazen jako poddruh *D. traunsteineri* (Eccarius 2016), nebo dokonce *D. fuchsii* (Kreutz 2004).

2. CÍLE PRÁCE

Tato práce je zaměřena na charakteristiku a porovnání především morfologie, ale také ekologie, cytologie a fenologie střeoevropských populací okruhu *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* (cf. Nordström et Hedrén 2009). V souvislosti s poznatky z těchto oblastí si klade několik otázek.

1. Jaké je postavení populací označovaných ve střední Evropě jako *D. lapponica*? Patří spíše k *D. majalis* s. str. nebo k *D. traunsteineri*?
2. Jaké je postavení *D. majalis* subsp. *turfosa*? Patří spíše k *D. majalis* nebo k *D. traunsteineri* nebo je to samostatný (intermediální?) druh?
3. Ukazuje se, že v S (-SV) Předalpí tvoří populace označované jako *D. traunsteineri* 2 výrazné ekotypy – jaký je jejich vzájemný vztah?
4. Jaký je vztah obou ekotypů *D. traunsteineri* k ostatním taxonům vyskytujícím se v zájmovém území: je některý z ekotypů bližší některému z ostatních taxonů a pokud ano, tak ve kterých aspektech?

3. MATERIÁL A METODY

3. 1. Sběr dat a rostlinného materiálu

V rozmezí let 2022-2024 bylo navštíveno celkem 19 lokalit na území České republiky, Rakouska a Německa. Lokality byly vybrány tak, aby pokryly variabilitu zkoumaného allotetraploidního komplexu *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* (cf. Nordström et Hedrén 2009) v zájmovém území. Celkem jsem analyzoval 10 populací *D. traunsteineri*, 4 populace označované v literatuře jako *D. lapponica*, 3 populace *D. majalis* subsp. *turfosa*, 2 populace *D. majalis* subsp. *majalis* a 1 populaci *D. curvifolia*, viz Tab. 1. S výjimkou populace *D. curvifolia*, která je v zájmovém území vyhynulým druhem a byla tedy hodnocena pouze na základě herbarizovaného materiálu, a populace *D. majalis* z lokality Vidnavské mokřiny jsem všechny lokality osobně navštívil a provedl na nich následující měření. Morfometrická data *D. majalis* z lokality Vidnavské mokřiny získal a laskavě poskytl konzultant práce V. Taraška. Z každé z populací bylo vybráno ideálně 20, nikdy však méně než 9 jedinců morfologicky odpovídajících danému taxonu u kterých bylo provedeno měření morfologických znaků. Jedinci byli vybíráni víceméně náhodným výběrem, zároveň však tak, aby pokryli morfologickou variabilitu taxonu na lokalitě. S výjimkou znaků charakterizujících tvar pysku byly tyto měřeny přímo na živých rostlinách v terénu. Za účelem analýzy průtokovým cytometrem bylo z každé rostliny spolu s květy odebráno také několik nezralých semeníků. Fytoocenologické snímky byly pořízeny na 16 lokalitách. Fotografie celkového habitu, květenství a detail skenu pysků typických jedinců všech taxonů zkoumaných na základě živého rostlinného materiálu jsou součástí přílohy 1. Přístup na lokality v 1. zóně NP Šumava byl zajištěn výjimkou získanou v rámci projektu Květena Šumavy / Flora des Böhmerwaldes.

3. 2. Analýza ploidie

Všech 333 jedinců vybraných pro morfometrickou analýzu bylo podrobena analýze pomocí metody průtokové cytometrie. Účelem bylo odhadnout ploidní stupeň rostlin a v některých případech také ověřit, zda se nejedná o rostliny vzniklé hybridizací s jiným druhem rodu *Dactylorhiza*.

Z rostlin bylo na lokalitě odebráno několik semeníků, které byly následně až do doby analýzy uloženy v chladničce v plastových zkumavkách s navlhčeným ubrouskem. Pletiva semeníků jsou pro cytometrickou analýzu vstavačovitých vhodnější než jiné části rostliny, jelikož v nich ve výrazně menší míře dochází k postupné částečné endoreplikaci, tedy fenoménu, který se u vstavačovitých hojně vyskytuje (Trávníček et al. 2015; Hřibová et al. 2016) a který zvyšuje obsah DNA v konkrétních buňkách. Pro přípravu vzorků byl použit protokol pro průtokovou cytometrii s vnitřním standardem (Doležel et al. 2007). Semeníky byly po vyjmutí ze zkumavek vloženy do 1 ml pufru LB01 s přidaným PVP (Doležel et al. 2007) a nasekány žiletkou spolu s listy standardu *Pisum sativum* "Ctirad" (2C = 9.09 pg; Doležel et al. 1998). Po dostatečné homogenizaci vzorku byla suspenze přefiltrována přes 40- μ m nylonový filtr do plastové kyvety obsahující cca 300 μ l stejného pufru. Následně bylo do kyvety přidáno 50 μ l barviva DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol). Pro měření byl použit cytometr Partec ML (Partec GmbH., Německo) s UV-led diodou (Partec GmbH., Německo) jako excitačním zdrojem.

Výsledkem měření byl poměr „píků“ vzorku a standardu, který lze při znalosti poměru při daném ploidním stupni využít k odhadu ploidního stupně analyzovaných vzorků. Mimo to byla zaznamenána také hodnota variačního koeficientu „píků“, která pakliže přesahovala 5 %, bylo měření opakováno. Pro urychlení měření bylo u lokalit KIT, ETT, MGH, MUR, PFR, MRB, SPS, KLO, ANT a KAP analyzováno vždy několik rostlin najednou v jednom vzorku, což však nemělo žádný pozorovaný negativní vliv na kvalitu měření.

Zjištěné hodnoty byly následně vyneseny podle taxonomické příslušnosti do podoby boxplotu. Vzhledem k patrným rozdílům mezi jednotlivými taxony byl nejprve proveden Shapiro-Wilkův test normality a poté analýza variance (ANOVA) spolu s Tukeyho-Kramerovým testem mnohonásobného porovnání. Uvedené statistické testy byly provedeny v programu NCSS 9 (Hintze 2013).

Tab. 1: Seznam lokalit a na nich provedených analýz. FCM – průtoková cytometrie

lokality	zkratka lokality	přibližné souřadnice	n	taxony	morfometrika	FCM	fyt. snímek	vzorek půdy	datum sběru
Soos (herbář PRC)	SOO	50°08'58.3"N, 12°23'55.8"E	9	<i>D. curvifolia</i>	ano	ne	ne	ne	20.05.2024
Kalábová	KAL	48°56'22.2"N, 17°44'39.3"E	11	<i>D. lapponica</i>	ano	ano	ano	ano	22.05.2023
Spitzingsee	SPI	47°39'24.1"N, 11°53'21.1"E	20	<i>D. lapponica</i>	ano	ano	ano	ano	18.06.2023
Štramberk	STR	49°35'19.3"N, 18°07'30.3"E	19	<i>D. lapponica</i>	ano	ano	ano	ano	20.05.2023
Troják	TRO	49°21'20.1"N, 17°48'39.8"E	20; 20	<i>D. lapponica</i> , <i>D. *majalis</i>	ano	ano	ne	ne	18.05.2024
Vidnavské mokřiny	VID	50°22'55.2"N, 17°12'00.5"E	10	<i>D. *majalis</i>	ano	ne	ne	ne	14.05.2022
Ettaler Mühle	ETM	47°34'16.2"N, 11°04'21.7"E	20	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ano	ano	16.06.2023
Kaproun	KAP	49°04'52.6"N, 15°11'23.5"E	10	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ano	ano	19.06.2023
Kitzbühel	KIT	47°27'36.3"N, 12°22'15.9"E	20	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ano	ano	15.06.2023
Klosterfilz	KLO	48°54'33.6"N, 13°25'28.7"E	20	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ano	ano	18.06.2023
Magnetsrieder Hardt	MGH	47°51'06.2"N, 11°12'57.9"E	20	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ano	ano	16.06.2023
Marnbach	MRB	47°50'15.3"N, 11°11'46.3"E	16	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ano	ano	17.06.2023
Murnauer Moos	MRM	47°38'41.0"N, 11°07'56.2"E	16	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ano	ano	17.06.2023
Na Volešku	VOL	49°11'25.0"N, 13°39'37.8"E	21	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ano	ano	20.06.2022
Pfählmoos	PFR	47°33'25.1"N, 11°09'04.0"E	15	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ne	ne	17.06.2023
Záhvozdí	ZAH	48°49'57.8"N, 13°56'44.2"E	13	<i>D. traunsteineri</i>	ano	ano	ano	ano	24.06.2022
Hrabčecí Hut'	HRH	49°00'42.2"N, 13°33'58.9"E	20	<i>D. *turfosa</i>	ano	ano	ano	ano	23.06.2022
Pod Horním Antýglem	ANT	49°03'10.3"N, 13°32'59.1"E	21	<i>D. *turfosa</i>	ano	ano	ano	ano	21.06.2022
Olšinka	OLS	49°01'59.8"N, 13°36'13.0"E	21	<i>D. *turfosa</i>	ano	ano	ano	ano	22.06.2022

3. 3. Fytcenologické snímky

S výjimkou lokalit Pfrühlmoos (PFR, *Dactylorhiza traunsteineri*), Troják (TRO, *D. majalis* subsp. *majalis*) a Vidnavské mokřiny (VID, *D. majalis* subsp. *majalis*) byl na všech nalezištích prstnaticů pořízen fytcenologický snímek. Snímkování bylo provedeno standardní metodou curyšsko-montpeliérské školy (Moravec 2000), velikost snímkované plochy byla v závislosti na charakteru stanoviště buď 4 m² (3 snímky), nebo 16 m² (13 snímků). Pokryvnost jednotlivých druhů rostlin byla charakterizována pomocí sedmičlenné Braun-Blanquetovy stupnice kombinující abundanci a dominanci (Westhoof et Van der Maarel 1978). Zapisovány byly také druhy mechového patra. Kromě soupisu druhů s příslušnou charakteristikou pokryvnosti byla u snímků vždy zaznamenávána také jejich poloha pomocí GPS souřadnic, nadmořská výška, sklon svahu ve stupních, orientace svahu vůči světovým stranám, maximální výška bylinného patra, maximální hloubka vody, celková pokryvnost vegetace na ploše snímků a pokryvnost dílčích pater vegetace.

Před klasifikací bylo všech 16 fytcenologických snímků zapsáno do databázového programu Turboveg (Henekens et Schaminée 2001), ze kterého byl proveden export databázového souboru do programu JUICE 7.0 (Tichý 2002). V tomto programu byly jednotlivé snímky klasifikovány pomocí expertního systému pro klasifikaci vegetačních snímků z České republiky (Chytrý et al. 2020). Ačkoliv část fytcenologických snímků pocházela z lokalit mimo území ČR, zvládl je expertní systém s dostatečnou jistotou přiřadit k některému z vegetačních svazů a nebylo tedy zapotřebí použít jiné klasifikační metody.

3. 4. Měření pH substrátu

Na převážné většině lokalit byl při jejich návštěvě proveden také odběr vzorků půdy, případně rašeliny. Odebráno bylo vždy přibližně 100 g vlhkého substrátu, a to v místě větší koncentrace jedinců taxonu rodu *Dactylorhiza* vyskytujícího se na dané lokalitě. Substrát byl následně během několika dní vysušen a rozdrolen skrz sérii sít o postupně menším průměru ok. Takto zpracovaného substrátu bylo odváženo 5 g, a rozmícháno v 50 ml destilované vody. Před měřením byla suspenze po dobu několika minut protřepávána, tak aby došlo k její dostatečné homogenizaci. Hodnoty pH byly zjištěny pomocí přístroje FiveEasy Benchtop F20 pH/mV Meter (Mettler-Toledo AG) jehož elektroda byla ponořena do připravené suspenze.

3. 5. Morfometrická analýza

Morfologie zkoumaných rostlin byla charakterizována pomocí sady kvalitativních a kvantitativních znaků, z nichž bylo vypočítáno několik bezrozměrných indexů. Na základě předchozí zkušenosti s morfometrickým studiem prstnaticů i prací zabývajících se touto problematikou v prostoru střední Evropy (Taraška 2014, Taraška et al. 2021) bylo vybráno celkem 11 kvalitativních znaků charakterizovaných na ordinálních škálách, 26 kvantitativních znaků a 9, z kvantitativních znaků vypočtených bezrozměrných indexů, které by měly dohromady dostatečně důkladně charakterizovat jedince zkoumaných taxonů (viz Tab. 2).

Hodnoty kvalitativních znaků byly kvalifikovaně odhadovány přímo na lokalitě a každé zkoumané rostlině byla v každém znaku přidělena jedna z předem určených kategorií znaků. Většina kvantitativních znaků byla taktéž měřena přímo v terénu, a to pomocí pravítka, digitálního posuvného měřítka či úhloměru. Pouze znaky měřené na pysku květu byly měřeny z obrazového materiálu získaného skenováním pysků sebraných z živých rostlin. Sebrané květy i se semeníky (viz Kap. 3. 1.) byly uskladněny v chladničce v plastových zkumavkách s navlhčeným ubrouskem, skenování probíhalo vždy hned v den odběru květů, tak aby bylo zamezeno poškození květů zasycháním, či vadnutím. Před skenováním byl z květů opatrně odříznut pysk i s ostruhou, který byl poté položen lícem dolů přímo na sklo skeneru a zatížen podložním mikroskopickým sklem tak, aby došlo k jeho zploštění a narovnání záhybů. Pysky byly skenovány spolu s milimetrovým měřítkem v režimu vysokého rozlišení (1200 dpi). Pro zjištění rozměrů takto zachyceného rostlinného materiálu byl použit program ImageJ 1.42q (Rasband 2009). Znaky měřené ze skenů pysku jsou znázorněny na obrázku 1. Z kvantitativních znaků bylo pomocí tabulkového editoru Microsoft Excel vypočítáno 9 bezrozměrných indexů, které dále charakterizují především tvary vegetativních i generativních orgánů zkoumaných rostlin.

Pro celý dataset byla nejprve vyhodnocena normalita distribuce hodnot jednotlivých znaků, zhotovena byla také korelační matice při použití Spearmanova korelačního koeficientu za účelem vyřazení vysoce korelovaných znaků z datasetu (převyšujících hodnotu 0.95 korelačního koeficientu). Variabilita a podobnost jedinců všech porovnávaných taxonů byla nejprve vizualizována pomocí analýzy hlavních koordinát (PCoA), dále pak bylo přistoupeno ke srovnání menších relevantních skupin taxonů. Při těchto dílčích srovnáních byly nejprve zjištěny základní statistické hodnoty kvantitativních i kategoriálních znaků pro porovnávané taxony, tyto znaky pak byly podrobeny porovnání formou Mann-Whitneyho U-testu (Kruskal-Wallisova testu v případě porovnání více taxonů najednou), respektive χ^2 testu při porovnání četnosti výskytu hodnot u kvalitativních znaků. Tato část statistických analýz byla s výjimkou korelační matice a prvotní PCoA provedena v programu NCSS 9 (Hintze 2013). Následně bylo přistoupeno k porovnání pomocí mnoharozměrných analýz. Z důvodu nenormality distribuce hodnot velké části znaků byla pro zobrazení variability a distribuce jedinců v mnoharozměrném prostoru zvolena metoda analýzy hlavních koordinát (PCoA), která neklade příliš velké nároky na normalitu dat a zároveň umožňuje při použití Gowerova koeficientu podobnosti srovnání kvantitativních i ordinálních znaků v rámci jednoho datasetu. Po zhodnocení variability datasetu bylo u všech dílčích srovnání přistoupeno k odlišení dílčích taxonů, nebo skupin populací metodou kanonické diskriminační analýzy (CDA). Úvodní korelační matice a všechny mnoharozměrné analýzy byly provedeny v sadě definic MorphoTools2 1.01 (Šlenker et al. 2022) v prostředí R.

3. 6. Analýza fenologie

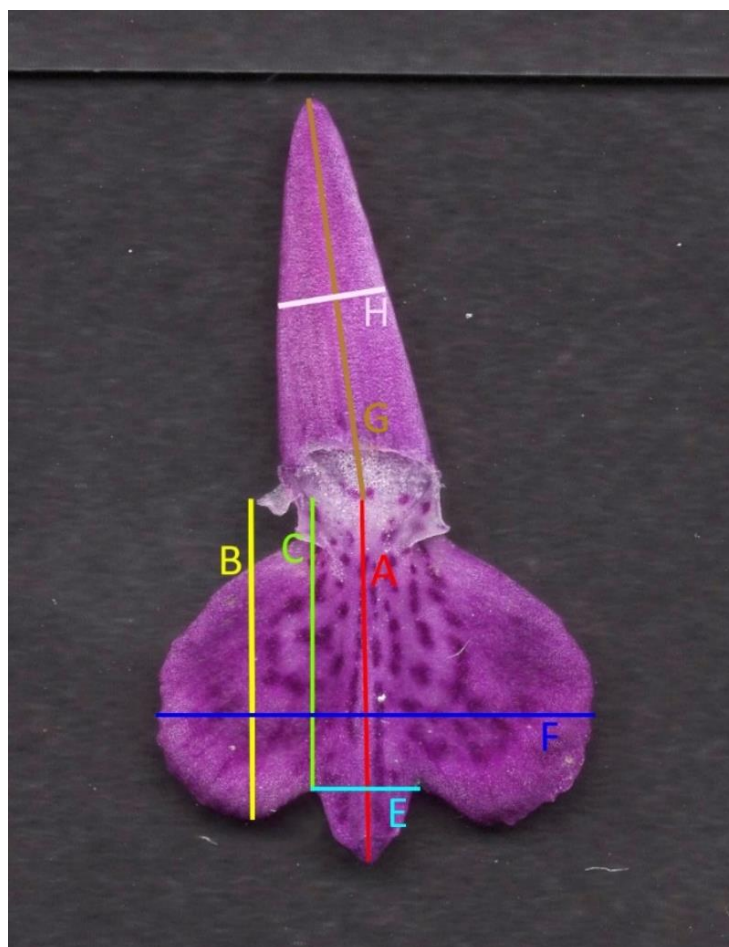
U všech jedinců byla na základě počtu ještě neotevřených, rozkvetlých a zasychajících květů charakterizována jejich fenofáze v době návštěvy lokalit. Pokud se zároveň na lokalitě vyskytoval některý jiný prstnatec z okruhu *D. maculata* nebo *D. majalis* (obvykle *D. maculata* subsp. *fuchsii*, nebo *D. majalis* subsp. *majalis*, „srovnávací taxon“), byla fenologie alespoň 15 jedinců tohoto druhu charakterizována obdobným způsobem. Z počtu poupat, otevřených květů a již zasychajících květů na jednotlivých rostlinách byl pro ně vypočítán fenologický index jako vážený průměr hodnot -1 (poupata), 0 (otevřené květy) a 1 (zasychající květy). Pro populace srovnávacího taxonu byla z dílčích fenologických indexů jedinců vypočítána průměrná hodnota, která následně sloužila k porovnání s populací zájmového druhu ze stejné lokality. Rozdíly mezi indexem vypočítaným pro zájmový taxon a srovnávací taxon byly následně vyhodnoceny pomocí Kruskal-Wallisova testu a Tukey-Kramerova testu. Do porovnání byly zahrnuty všechny zkoumané taxony vyjma *D. curvifolia*, jehož jediná lokalita v zájmovém území zanikla před mnoha desítkami let a rostliny tohoto druhu byly tudíž studovány pouze na základě herbarizovaného materiálu.

Tab. 2: Znaky použité pro charakteristiku morfologie zkoumaných rostlin, jejich zkratky použité pro účely statistických analýz, jednotky, v nichž byly měřeny a typ proměnné znaku. Pro jednotlivé rozměry měřené na pysku byla použita velká písmena shodná s písmeny na Obr. 1. U kategoriálních znaků jsou v závorce za názvem znaku uvedeny kategorie, kterých mohl tento znak nabývat. U indexů je za názvem znaku uveden vzorec pro výpočet hodnoty daného indexu. Barva lodyhy byla zjišťována v její dolní části. Za 1. list byl považován nejdolejší list na lodyze, který měl vyvinutou listovou čepel. Pro měření znaků na pysku květu byly vybrány dobře vyvinuté květy, nikoliv však první (nejdolejší) květ v květenství.

zkratka	název znaku (u indexů také výpočet)	jednotka	typ
b_lod	barva lodyhy (zelená, fialovo-zelená, fialová)	-	kateg.
b_vret	barva osy květenství (zelená, fialovo-zelená, fialová)	-	kateg.
b_sem	barva semeníků (zelená, fialovo-zelená, fialová)	-	kateg.
b_listenu	barva listenů (zelená, fialovo-zelená, fialová)	-	kateg.
skvrn	zbarvení skvrn na listech (chybí, světlé, tmavé)	-	kateg.
zlab_L1	žlábkovitost 1. listu od báze lodyhy (plochý, mírně žl., výrazně žl.)	-	kateg.
vrch_L1	špičatost 1. listu od báze lodyhy (tupý, mírně šp., výrazně špičatý)	-	kateg.
zlab_L2	žlábkovitost 2. listu od báze lodyhy (plochý, mírně žl., výrazně žl.)	-	kateg.
vrch_L2	špičatost 2. listu od báze lodyhy (tupý, mírně šp., výrazně špičatý)	-	kateg.
K_inten	intenzita zbarvení kresby pysku (bez kr., nevýrazná kr., kontrastní kr.)	-	kateg.
d_ostr	délka ostruhy vůči semeníku (kratší, zděli, delší)	-	kateg.
Vys	výška rostliny od povrchu půdy	cm	kvant.
Int_1	délka prvního internodia lodyhy (vzdálenost inzerce 1. a 2. listu)	mm	kvant.
Int_2	délka druhého internodia lodyhy (vzdálenost inzerce 2. a 3. listu)	mm	kvant.
Osa	délka osy květenství	mm	kvant.
Osa_rozkv.	délka osy rozkvetlé části květenství	mm	kvant.
poc_List	celkový počet listů	-	kvant.
poc_List_ns	počet horních, bezpochevných („šupinovitých“) listů	-	kvant.
d_L1	délka čepele 1. listu	mm	kvant.
s_L1	šířka 1. listu	mm	kvant.
BN_L1	vzdálenost od inzerce 1. listu po jeho nejširší část	mm	kvant.
uhel_L1	úhel čepele 1. listu vůči lodyze	stupně	kvant.
d_L2	délka čepele 2. listu	mm	kvant.
s_L2	šířka 2. listu	mm	kvant.
BN_L2	vzdálenost od inzerce 2. listu po jeho nejširší část	mm	kvant.
uhel_L2	úhel čepele 2. listu vůči lodyze	stupně	kvant.
listen_2	délka listenů 2. rozkvetlého květu v květenství	mm	kvant.
sem_2	délka semeníku 2. rozkvetlého květu v květenství	mm	kvant.
s_lod	tloušťka lodyhy pod květenstvím	mm	kvant.

Tab. 2: Pokračování.

Poc_pou	počet poupat	-	kvant.
Poc_rozkv	počet rozkvetlých květů	-	kvant.
Poc_odkv	počet odkvetlých květů	-	kvant.
Poc_kv	celkový počet květů	-	kvant.
A	délka pysku	mm	kvant.
B	délka postranního laloku pysku	mm	kvant.
C	délka pysku k zářezu mezi prostředním a postranním lalokem	mm	kvant.
E	šířka pysku	mm	kvant.
F	šířka prostředního laloku pysku	mm	kvant.
G	délka ostruhy	mm	kvant.
H	tloušťka ostruhy	mm	kvant.
H-H_ind	Heslop-Harrisonův index ----- $2A/(B+C)$	-	index
ind_ostr	index tvaru ostruhy ----- G/H	-	index
ind_str_l	index tvaru středního laloku ----- $(A-C)/E$	-	index
ind_d_str	index délky střední laloku ----- $(A-C)/A$	-	index
ind_tv1L	index délky 1. listu ----- d_{L1}/s_{L1}	-	index
ind_tv2L	index délky 2. listu ----- d_{L2}/s_{L2}	-	index
L2_ind.	index tvaru 2. listu ----- $BN_{L2}/(d_{L2}-BN_{L2})$	-	index
grac_ind.	index gracility ----- $Vys/(s_{lod} \times poc_{List})$	-	index
hust_kv	index hustoty květenství ----- $(poc_{rozkv} + poc_{odkv})/Osa_{rozkv}$	-	index



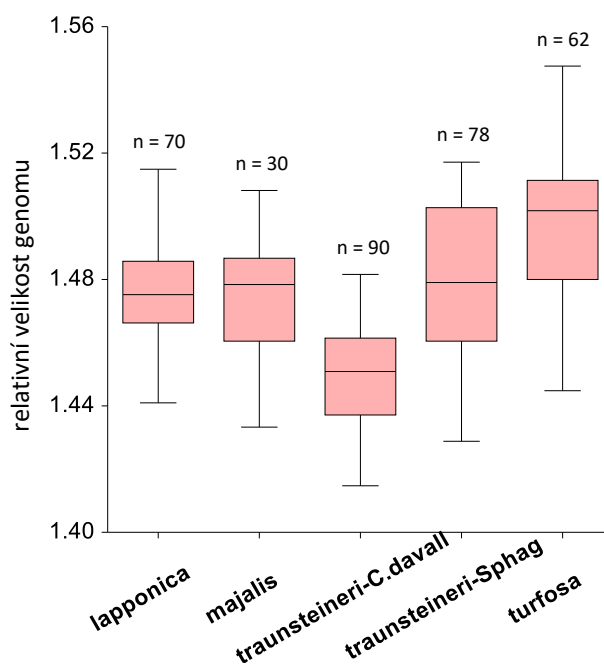
Obr. 1: Znaky měřené ze skenů pysku a pro ně použité značky (viz Tab. 2)

4. VÝSLEDKY

4. 1. Analýza ploidie a relativní velikosti genomu

Metodou průtokové cytometrie byl odhad ploidního stupně stanoven u celkem 333 jedinců náležejících ke čtyřem taxonům (*Dactylorhiza *majalis*, *D. *turfosa*, *D. lapponica*, *D. traunsteineri*). Na základě srovnání zjištěných hodnot relativní fluorescence s údaji z literatury (Taraška et al. 2021) byl u 330 jedinců potvrzen DNA-tetraploidní stav ($2n = 4x$) charakteristický pro alopolyploidní komplex *D. majalis/traunsteineri* (Nordström et Hedrén 2009). U dvou jedinců, po jednom z populací Ettaler Mühle (ETT13) a Marnbach (MRB12), byl zjištěn poměr píků standardu, který odpovídá DNA-triploidnímu stavu. Jelikož nejpravděpodobnější příčinou vzniku triploidního jedince je hybridizace tetraploida s diploidním rodičem jiného druhu (*D. incarnata* nebo *D. maculata* subsp. *fuchsii*), byli tito jedinci z morfometrických analýz vyřazeni pro svou nejasnou taxonomickou příslušnost. Vyřazena byla taktéž jedna rostlina z populace Záhvozdí (ZAH7), u níž poměr píků standardu a vzorku v histogramu odpovídal DNA-hexaploidnímu jedinci (i když v tomto případě lze předpokládat spíše autopolyploidii v důsledku vzniku neredukované gamety).

Ačkoliv z výsledků průtokové cytometrie při použití barviva DAPI nelze usuzovat na přesnou velikost genomu analyzovaných rostlin, jedinci se v rámci různých zkoumaných populací v hodnotě relativní velikosti genomu lišili natolik, že se porovnání mezi taxony ukázalo být užitečným (Obr. 2). Z provedené analýzy variance (ANOVA) vyplývá, že se některé z taxonů v hodnotě relativní fluorescence při FCM liší ($F = 135.49$; $p < 0.001$), následný Tukeyho-Kramerův test mnohonásobného porovnání (dále Tukeyho test) ukázal, že zejména *D. *turfosa* se významně odlišuje od všech ostatních zkoumaných taxonů (viz Tab. 3). Signifikantní rozdíl byl zjištěn i mezi oběma ekotypy *D. traunsteineri*.



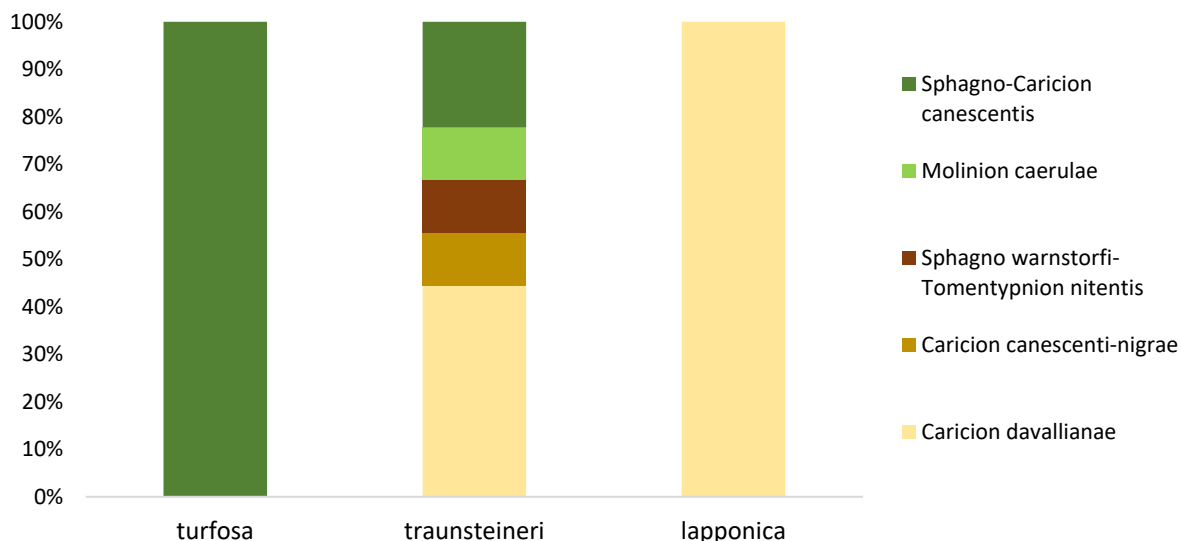
Obr. 2: Hodnoty poměru píků vzorků a vnitřního standardu (*Pisum sativum* 'Ctirad'; $2C = 9.09$ pg; Doležel et al. 1998) pro zkoumané taxony. Tělo diagramu vymezuje 25. a 75. percentil datového souboru, horizontální čára uvnitř boxu představuje medián, vousy sahají do vzdálenosti 1,5násobku mezikvartilového rozpětí. n = počet analyzovaných jedinců.

Tab. 3: Výsledky Tukeyho testu pro hodnoty relativní fluorescence DNA jednotlivých taxonů. NS – rozdíl není statisticky signifikantní, S – rozdíl je statisticky signifikantní

	majalis	lapponica	traunsteineri-C.davall	traunsteineri-Sphag	turfosa
majalis					
lapponica	NS				
traunsteineri-C.davall	S	S			
traunsteineri-Sphag	NS	NS	S		
turfosa	S	S	S	S	

4. 2. Ekologie

Na základě fytoecologických snímků byla pomocí expertního systému v rámci programu JUICE zjištěna jejich příslušnost k syntaxonomickým jednotkám na úrovni svazů. Zatímco vegetace na lokalitách *Dactylorhiza *turfosa* odpovídala na všech snímkaných lokalitách svazu přechodových rašelinišť *Sphagno-Caricion canescentis* Passarge (1964) 1978 a podobně i vegetace doprovázející taxon *D. lapponica* byla přiřazena pouze k jedinému svazu vápničných slatinišť *Caricion davallianae* Klika 1934, u lokalit *D. traunsteineri* byla ve k ní přidružené vegetaci zaznamenána značná dichotomie. Na 4 z 9 lokalit *D. traunsteineri* rostla tato ve vegetaci svazu *Caricion davallianae*, na ostatních 5 lokalitách byl její výskyt zaznamenán v rámci výrazně acidofilnější vegetace (svazy *Sphagno-Caricion canescentis*; *Molinion caeruleae* Koch 1926; *Sphagno warnstorfi-Tomentypnion nitentis* Dahl 1956 a *Caricion canescenti-nigrae*, viz Obr. 3). Tato skutečnost byla potvrzena také pomocí zjištěného pH substrátu na obou typech lokalit *D. traunsteineri* (Tab. 4), které bylo signifikantně vyšší u lokalit se společenstvy svazu *Caricion davallianae* (Mann-Whitney U test; $Z = 2.327$; $p = 0,02$). Jelikož se rostliny *D. traunsteineri* mezi těmito dvěma typy stanovišť lišily také fyziologií a některými morfologickými znaky, bylo s nimi dále v rámci morfologických analýz nakládáno jako se dvěma odlišnými taxony. Rostliny z lokalit s vegetací svazu *Caricion davallianae* jsou dále označeny jako *D. traunsteineri-C.davall*, rostliny z lokalit s výskytem rašeliniček (svazy *Sphagno-Caricion canescentis*; *Molinion caeruleae* Koch 1926; *Sphagno warnstorfi-Tomentypnion nitentis* Dahl 1956 a *Caricion canescenti-nigrae*) jsou dále označeny jako *D. traunsteineri-Sphag*.



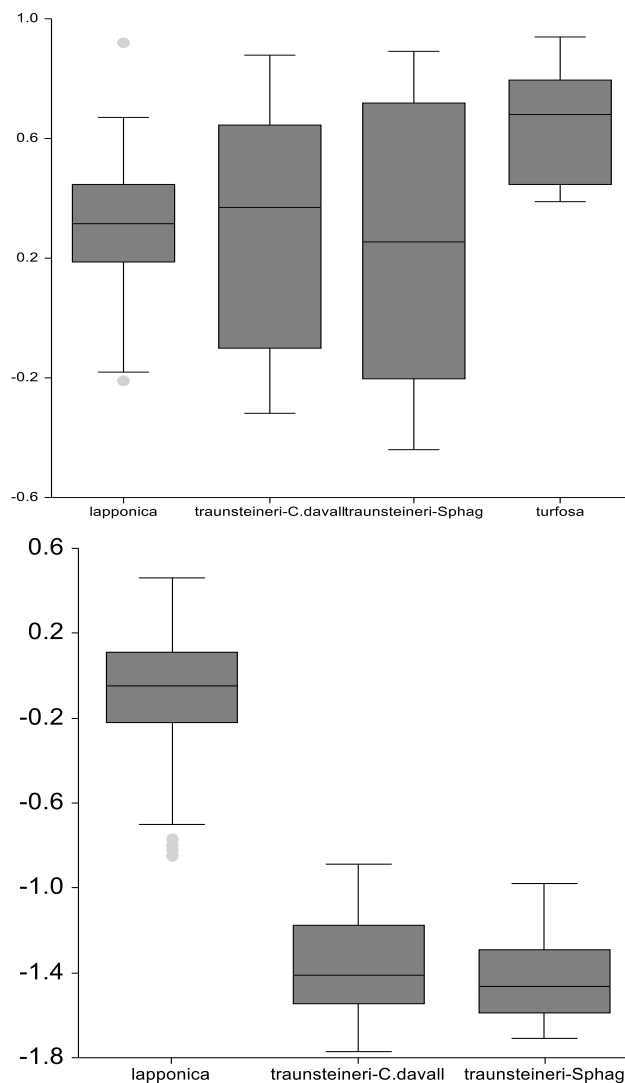
Obr. 3: Příslušnost fytoecologických snímků zapsaných na lokalitách zkoumaných taxonů rodu *Dactylorhiza* k vegetačním jednotkám na úrovni svazu.

Tab. 4: Souhrn lokalit, na nichž byly zhotoveny fytoecologické snímky a bylo změřeno pH substrátu. Zjišťována byla i přítomnost rašeliníku

lokality	výskyt druhu	pH	rašeliník	vegetace (svaz)
Kalábová	<i>D. lapponica</i>	7.74	ne	<i>Caricion davallianae</i>
Lom Rasová	<i>D. lapponica</i>	-	ne	<i>Caricion davallianae</i>
Štramberk	<i>D. lapponica</i>	8.08	ne	<i>Caricion davallianae</i>
Spitzingsee	<i>D. lapponica</i>	7.19	ne	<i>Caricion davallianae</i>
Ettaler Mühle	<i>D. traunsteineri</i>	7.35	ne	<i>Caricion davallianae</i>
Kaproun	<i>D. traunsteineri</i>	5.16	ano	<i>Caricion canescenti-nigrae</i>
Kitzbühel	<i>D. traunsteineri</i>	5.39	ano	<i>Sphagno-Caricion canescentis</i>
Klosterfilz	<i>D. traunsteineri</i>	4.84	ano	<i>Sphagno-Caricion canescentis</i>
Magnets. Hardt	<i>D. traunsteineri</i>	7.84	ne	<i>Caricion davallianae</i>
Marnbach	<i>D. traunsteineri</i>	8.11	ne	<i>Caricion davallianae</i>
Murnau	<i>D. traunsteineri</i>	5.62	ano	<i>Sphagno warnstorfi-Tomentypnion nitentis</i>
Na Volešku	<i>D. traunsteineri</i>	7.13	ne	<i>Caricion davallianae</i>
Záhvozdí	<i>D. traunsteineri</i>	6.45	ano	<i>Molinion caeruleae</i>
Horní Antýgl	<i>D. *turfosa</i>	6.27	ano	<i>Sphagno-Caricion canescentis</i>
Hrabčcí hut'	<i>D. *turfosa</i>	6.31	ano	<i>Sphagno-Caricion canescentis</i>
Olšinka	<i>D. *turfosa</i>	6.82	ano	<i>Sphagno-Caricion canescentis</i>

4. 3. Fenologie

Kruskal-Wallisův test odhalil signifikantní rozdíly mezi jednotlivými taxony jak při porovnání s *Dactylorhiza maculata* (s. lat.) ($\chi^2 = 19.27$, $p > 0.001$), tak při porovnání s *D. *majalis* ($\chi^2 = 74.14$, $p > 0.001$). Průměrné hodnoty rozdílu fenologických indexů oproti *D. maculata* byly u všech porovnávaných taxonů kladné (tzn. že taxony mají ranější fenologii než *D. maculata*), nejvyšší průměrný rozdíl byl zaznamenán u *D. *turfosa*, nejnižší u *D. traunsteineri* z rašelinných lokalit (*D. traunsteineri*-Sphag). Při porovnání s *D. *majalis* byl rozdíl mezi průměrnými hodnotami blízký nule u *D. lapponica*, a naopak výrazně záporný pro taxony *D. traunsteineri*-*C. davall* a *D. traunsteineri*-Sphag, což znamená, že tyto taxony mají oproti *D. *majalis* výrazně pozdnější fenologii (Obr. 4). Výsledky Tukeyho testů viz Tab. 5 a 6. Taxony *D. *majalis* a *D. *turfosa* nebylo možné srovnat, jelikož se nevyskytují na společných lokalitách a srovnání populací z různých lokalit a různých časů sběru dat vzhledem k meteorologickým a klimatickým jevům které na takto rozdílné populace mohou působit.



Obr. 4: Grafické znázornění rozdílu ve fenologii mezi zájmovými taxony a *D. maculata* (vlevo) a mezi zájmovými taxony a *D. majalis* subsp. *majalis* (vpravo). Tělo diagramu vymezuje 25. a 75. percentil datového souboru, horizontální čára uvnitř boxu představuje medián, vousy sahají do vzdálenosti 1,5násobku mezikvartilového rozpětí.

Tab. 5: Výsledky Tukeyho testu porovnání fenologie zájmových taxonů s *D. maculata*. NS – rozdíl není statisticky signifikantní, S – rozdíl je statisticky signifikantní

	lapponica	traunsteineri-Sphag	traunsteineri-C.davall	turfosa
lapponica				
traunsteineri-Sphag	NS			
traunsteineri-C.davall	NS	NS		
turfosa	S	S	S	

Tab. 6: Výsledky Tukeyho testu porovnání fenologie zájmových taxonů s *D. majalis*. NS – rozdíl není statisticky signifikantní, S – rozdíl je statisticky signifikantní

	lapponica	traunsteineri-Sphag	traunsteineri-C.davall
lapponica			
traunsteineri-Sphag	S		
traunsteineri-C.davall	S	NS	

4. 4. Morfometrická analýza

4. 4. 1. Deskriptivní statistika

Hodnoty základní deskriptivní statistiky pro všechny porovnávané a jsou uvedeny v tabulce 7. Pro kvantitativní morfometrická data byla nejprve provedena neparametrická obdoba analýzy variance (Kruskal-Wallisův test), která prokázala, že se ve všech kvantitativních znacích alespoň jeden taxon od zbytku odlišuje (Tab. 8). Následně byly hodnoty znaků pro všechny zkoumané taxony a s odlišením dvou ekotypů *D. traunsteineri* (viz kapitola 4. 2.) vizualizovány formou boxplotů. Na grafickém znázornění je patrné, že se od sebe taxony (a ekologické skupiny populací) značně liší, přičemž u primárních znaků nabývají nejnižších hodnot často taxony *D. *lapponica* a *D. curvifolia* (Obr. 5).

Tab. 7: Základní deskriptivní statistické údaje pro všechny porovnávané skupiny populací.

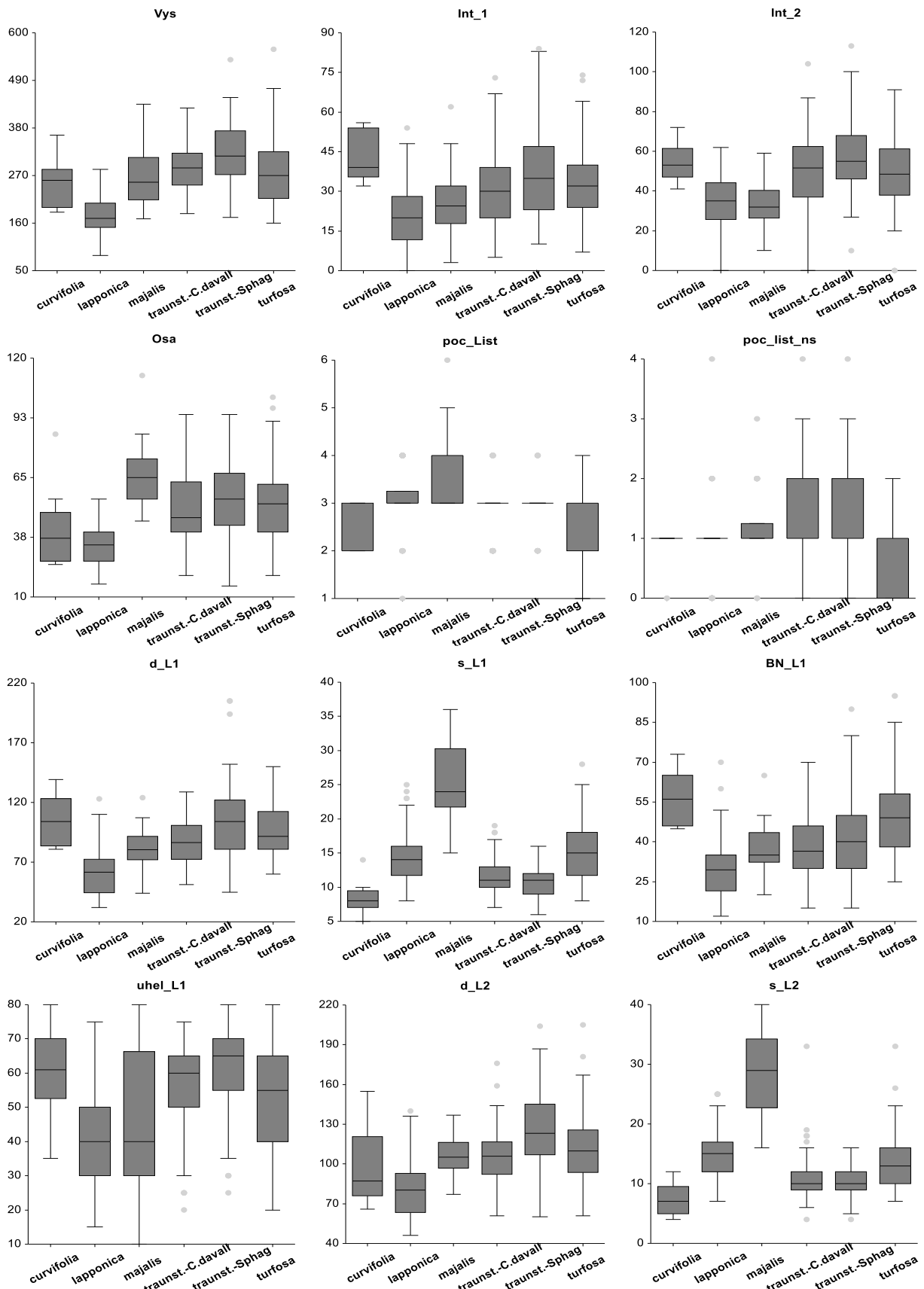
znak (jednotka)	<i>D. lapponica</i> (n = 70)		<i>D. *majalis</i> (n = 30)		<i>D. curvifolia</i> (n = 9)		<i>D. traunsteineri-C.</i> davall (n = 92)		<i>D. traunsteineri-</i> Sphag (n = 79)		<i>D. *turfosa</i> (n = 62)	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
Vys (mm)	178,2	40,87	266,97	65,97	261,31	62,84	290,68	54,72	320,46	71,87	280,76	80,77
Int_1 (mm)	20,51	11,77	25,63	12,83	42,12	13,57	30,34	14,73	37,75	17,1	32,81	14,49
Int_2 (mm)	35,13	13,77	33,27	10,82	43,61	10,93	50,54	18,57	55,9	18,55	48,81	18,58
Osa (mm)	34,2	9,5	66,1	14,04	35,64	11,1	51,76	16,35	55,57	17,06	53,1	17,56
poc_List (počet)	3,09	0,65	3,87	0,73	2,75	0,59	2,84	0,54	2,85	0,48	2,77	0,58
poc_List_ns (počet)	0,89	0,63	1,2	0,61	0,92	0,6	1,32	0,66	1,14	0,81	0,82	0,56
d_L1 (mm)	61,14	19,91	81,73	16,98	104,4	38,15	86,7	18,83	105,37	31,01	96,06	21,68
s_L1 (mm)	14,23	3,85	25,37	5,12	8,81	2,35	11,54	2,52	10,67	2,42	15,08	4,42
BN_L1 (mm)	29,44	10,82	37,67	8,88	56,71	14,83	37,72	11,86	41,99	14,21	50,26	15,68
uhel_L1 (stupně)	41,5	14,46	43,67	19,78	61,47	13,9	55,35	12,8	60,76	13,21	52,58	14,51
d_L2 (mm)	80,86	21,71	117,77	65,08	90,34	34,12	105,52	20,45	125,42	28,15	111,55	27,06
s_L2 (mm)	15,74	6,96	28,23	6,76	7,65	2,46	10,87	3,7	10,38	2,28	14,16	4,9
BN_L2 (mm)	32,86	12,77	43,9	6,86	38,67	21,93	36,86	14,91	41,8	14,45	46,95	21,08
uhel_L2 (stupně)	54,07	13,41	42	12,91	67,31	10,08	66,09	9,25	69,73	13,56	66,05	10,13
listen_2 (mm)	18,34	3,23	26,8	5,47	18,24	4,6	20,38	4,07	23,04	5,17	24,28	5,84
semenik_2 (mm)	12,22	1,63	15,26	3,93	12,06	1,28	12,7	1,55	14,3	1,83	14,53	2,17
s_lod (mm)	2,72	0,55	4,56	1,27	1,63	0,52	2,67	0,48	3,02	0,64	3,4	0,84
poc_kv_c (počet)	10,57	4,58	24,63	5,83	12,6	3,33	12,23	4,01	12,03	5,34	10,56	3,81
A (mm)	8,25	0,9	8,81	1,16	7,31	0,72	9,15	0,73	10,08	0,84	9,55	0,95
B (mm)	6,87	0,86	7,16	1,32	6,15	0,48	7,78	0,7	8,47	0,91	8,12	0,9
C (mm)	5,75	0,88	5,93	1,12	5,27	0,13	7,09	0,65	7,54	0,95	7,52	0,89
E (mm)	2,79	0,48	3,21	0,43	2,46	0,08	3,3	0,61	2,94	0,6	3,22	0,66
F (mm)	10,29	1,33	11,48	1,71	8,1	1,6	10,74	1,12	11,19	1,23	10,57	1,33
G (mm)	8,62	1,25	9,98	1,16	8,06	1,2	9,5	1,1	10,12	1,44	9,34	1,29
H (mm)	2,95	0,48	3,13	0,46	1,88	0,31	3,23	0,55	2,98	0,4	2,84	0,36
H-H_ind.	1,31	0,11	1,36	0,13	1,31	0,12	1,23	0,08	1,27	0,12	1,23	0,1
G/H	3	0,62	3,29	0,74	4,32	0,39	3,01	0,54	3,47	0,73	3,33	0,5
A-C/E	0,92	0,26	0,92	0,24	0,87	0,22	0,63	0,15	0,88	0,3	0,64	0,2
A-C/A	0,3	0,07	0,33	0,07	0,83	0,03	0,22	0,06	0,25	0,08	0,21	0,07
d_L1/s_L1	4,39	1,34	3,3	0,72	12,82	3,16	7,67	1,63	10,26	3,4	6,74	1,91

Tab. 7: Pokračování.

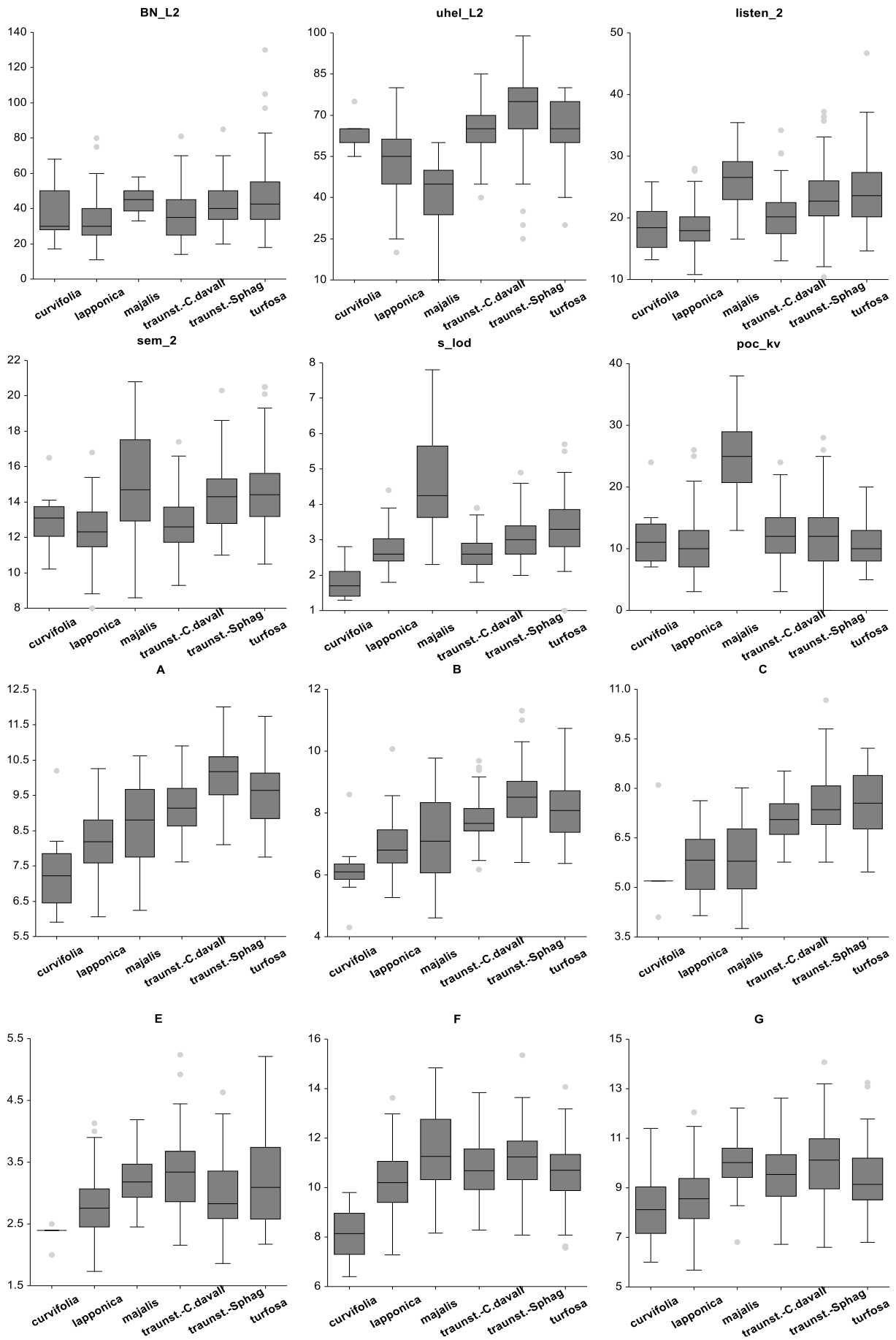
d_L2/s_L2	5,44	1,41	4,38	2,45	13,37	3,06	10,31	2,59	12,68	4,04	8,35	2,21
L2_ind.	0,76	0,42	0,7	0,2	0,73	0,25	0,58	0,29	0,53	0,23	0,8	0,46
grac_ind.	1,58	0,39	1,12	0,37	0,62	0,14	0,93	0,17	0,97	0,22	1,28	0,36
ind_hust	0,25	0,1	0,77	0,61	0,27	0,05	0,2	0,04	0,2	0,05	0,2	0,05

Tab. 8: Výsledky Kruskal-Wallisova testu pro porovnání hodnot kvantitativních znaků všech analyzovaných taxonů. χ^2 = hodnota testového kritéria, P = pravděpodobnost shodnosti výběrů

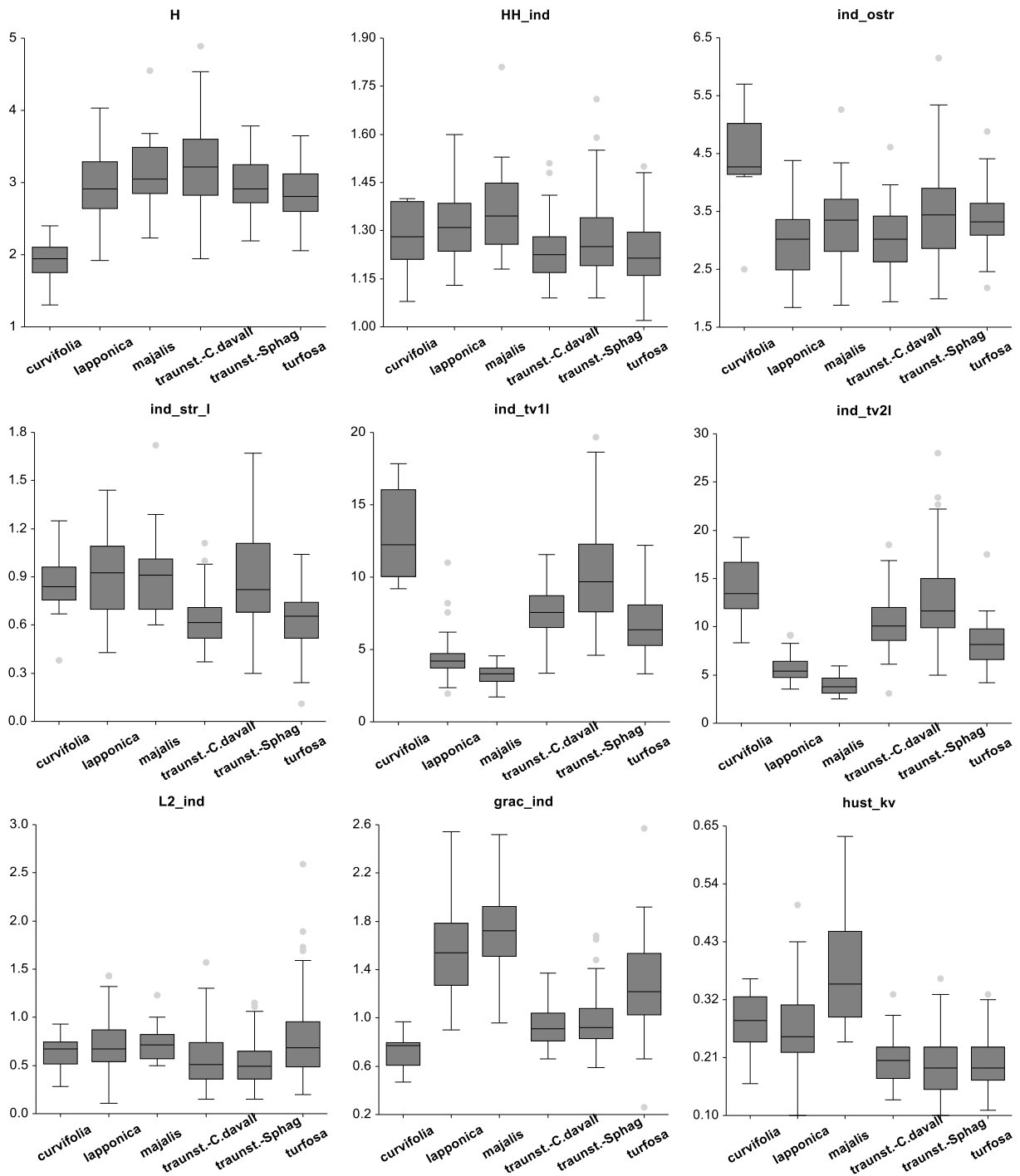
znak (jednotka)	Kruskal-Wallisův test	
	χ^2	P
Vys (mm)	141.52	< 0.001
Int_1 (mm)	55.91	< 0.001
Int_2 (mm)	74.78	< 0.001
Osa (mm)	106.20	< 0.001
poc_List (počet)	67.49	< 0.001
poc_List_ns (počet)	30.80	< 0.001
d_L1 (mm)	109.33	< 0.001
s_L1 (mm)	139.01	< 0.001
BN_L1 (mm)	86.33	< 0.001
uhel_L1 (stupně)	65.79	< 0.001
d_L2 (mm)	98.44	< 0.001
s_L2 (mm)	151.53	< 0.001
BN_L2 (mm)	36.74	< 0.001
uhel_L2 (stupně)	110.53	< 0.001
listen_2 (mm)	88.60	< 0.001
semenik_2 (mm)	77.34	< 0.001
s_lod (mm)	107.62	< 0.001
poc_kv_c (počet)	77.89	< 0.001
A (mm)	126.56	< 0.001
B (mm)	115.28	< 0.001
C (mm)	143.56	< 0.001
E (mm)	51.90	< 0.001
F (mm)	44.77	< 0.001
G (mm)	55.88	< 0.001
H (mm)	49.89	< 0.001
H-H_ind.	47.24	< 0.001
G/H	43.77	< 0.001
A-C/E	89.03	< 0.001
A-C/A	83.25	< 0.001
d_L1/s_L1	218.21	< 0.001
d_L2/s_L2	223.21	< 0.001
L2_ind.	35.14	< 0.001
grac_ind.	185.82	< 0.001
ind_hust	114.71	< 0.001



Obr. 5: Grafické znázornění hodnot kvantitativních znaků pro všechny zkoumané taxony a dva ekotypy *D. traunsteineri*. Tělo diagramu vymezuje 25. a 75. percentil datového souboru, horizontální čára uvnitř boxu představuje medián, vousy sahají do vzdálenosti 1,5násobku mezikvartilového rozpětí. Vysvětlivky zkratk znaků a jednotky (osa y) v nichž byly znaky měřeny viz Tab. 2.



Obr. 5: Pokračování.



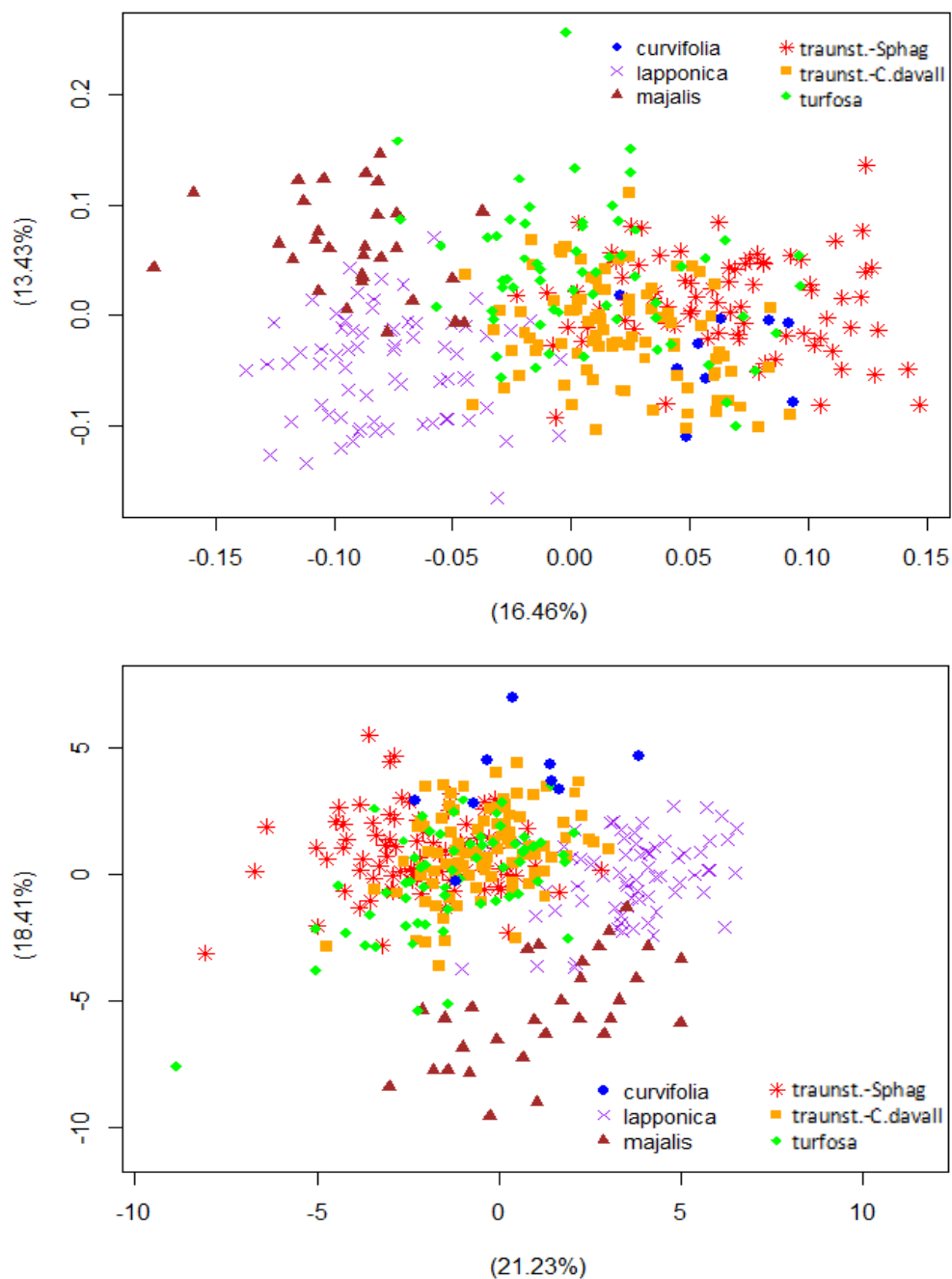
Obr. 5: Pokračování.

4. 4. 2. Analýza hlavních koordinát

Před započítím statistických analýz byla testována normalita dat pro jednotlivé znaky a taxony. Jelikož velká část datového souboru vykazovala nenormální rozložení, byla jako vhodná metoda pro zhodnocení celkové variability a struktury datového souboru vybrána analýza hlavních koordinát (PCoA). Ta byla nejprve provedena pro všechny zkoumané taxony na základě celého souboru zaznamenávaných znaků, tedy kvantitativních znaků, ordinálních znaků i indexů. Korelační analýza provedená před samotnou PCoA nezjistila korelační koeficient vyšší než 0,95 u žádné z dvojic znaků, pouze u dvou dvojic znaků (H.-H. index a index délky středního laloku; index délky 1. listu a index délky 2. listu) přesahoval korelační koeficient hranici 0,90. Všechny tyto znaky však byly v datovém souboru pro PCoA ponechány pro svou možnou vypovídací hodnotu. Analýza hlavních koordinát tedy byla provedena na základě celého morfometrického datového souboru.

První a druhá osa mnohazměrného prostoru vysvětlují 16,5 % a 13,4 % variability souboru, respektive 21,2 % a 18,4 % variability souboru při použití pouze kvantitativních znaků. Samotná PCoA

rozdělila datový soubor podle první osy na víceméně dvě vnitřně si podobnější skupiny. První skupina zahrnuje taxony *D. *majalis* a *D. lapponica*, druhá skupina potom zbytek analyzovaných taxonů, tedy *D. traunsteineri*-Sphag, *D. traunsteineri*-C.davall, *D. *turfosa* a *D. curvifolia*. PCoA byla provedena také na základě datového souboru ochuzeného o znaky charakterizované na ordinální škále. Výsledek této analýzy byl obdobný, zřetelné bylo opět zejména oddělení dvou výše zmíněných skupin, ty se však tentokrát oddělovaly podle obou hlavních os PCoA grafu (Obr. 6). Celkový podíl variability vysvětlené prvními dvěma osami mnohorozměrného prostoru bylo u PCoA bez ordinálních znaků vyšší, možná interpretace tohoto výsledku je tak poněkud robustnější.



Obr. 6: Analýza hlavních koordinát (PCoA) pro všechny morfometricky analyzované jedince na základě celého souboru měřených znaků (výše) a na základě souboru znaků ochuzeného o znaky měřené na ordinální škále (níže). Názvy os grafů udávají procento variability vysvětlené danou osou. Horizontální osy odpovídají první ose mnohorozměrného prostoru, vertikální osy druhé ose mnohorozměrného prostoru.

4. 4. 3. Porovnání *Dactylorhiza *majalis* a *D. lapponica*

4. 4. 3. 1. Deskriptivní statistika a Mann-Whitney U-test

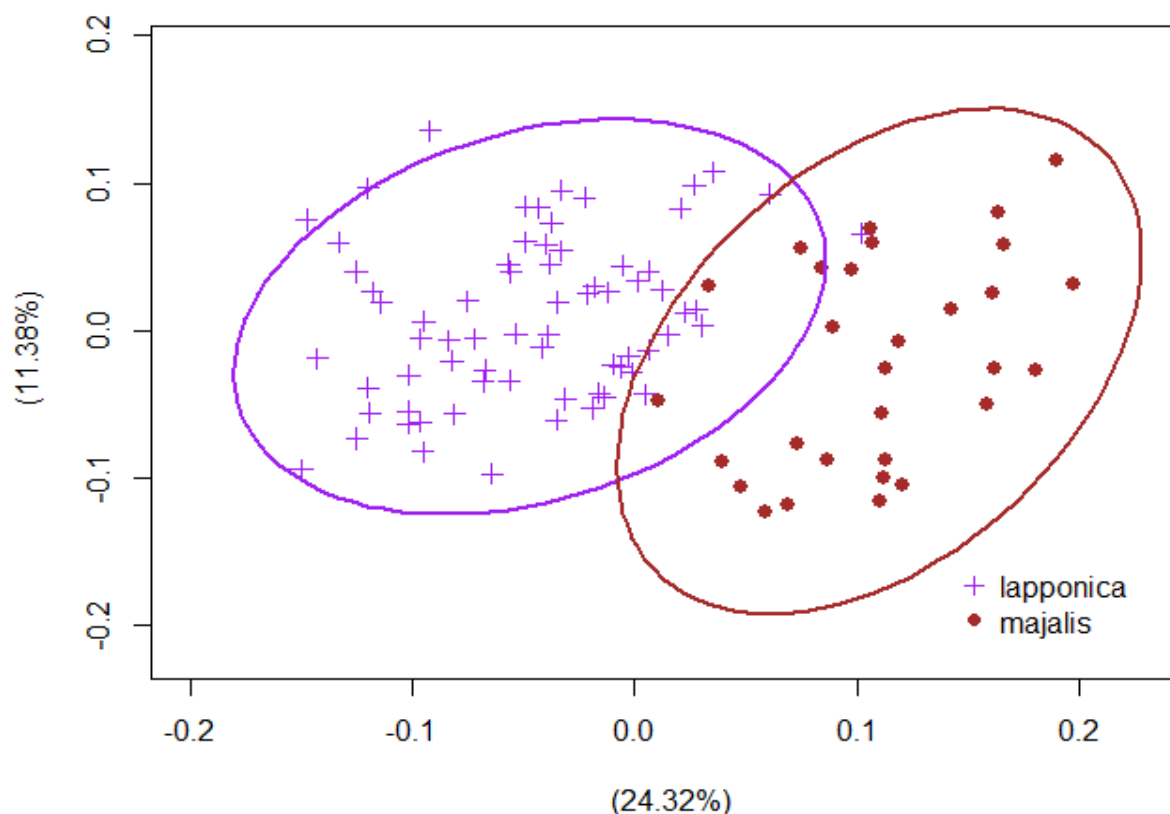
Spolu s deskriptivní statistikou bylo nejprve provedeno srovnání obou taxonů pomocí neparametrického Mann-Whitneyho U-testu. Ze srovnání vyplývá, že se oba taxony signifikantně liší ve většině posuzovaných kvantitativních znaků, nesignifikantní rozdíly byly zjištěny převážně u znaků měřených na pysku květu a u z těchto znaků vypočítaných indexech (Tab. 9). Z tabulky je také zřejmé, že všechny měřené kvantitativní znaky (nikoliv indexy), ve kterých se oba taxony signifikantně odlišují nabývají vyšších průměrných hodnot pro populace *D. *majalis*.

Tab. 9: Základní statistické údaje pro primární kvantitativní znaky a indexy a výsledky neparametrického Mann-Whitneyho U-testu porovnání taxonů *D. lapponica* a *D. *majalis*. Signifikantní výsledky statistického testu ($P < 0,05$) jsou zvýrazněny. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 2. SD = směrodatná odchylka, n = velikost vzorku jedinců, Z = hodnota testového kritéria, P = pravděpodobnost shodnosti výběrů

znak (jednotka)	<i>D. lapponica</i> (n = 70)		<i>D. *majalis</i> (n = 30)		Mann-Whitney U-test	
	průměr	SD	průměr	SD	Z	P
Vys (mm)	178.2	40.87	266.97	65.97	6.16	< 0.001
Int_1 (mm)	20.51	11.77	25.63	12.83	1.81	0.071
Int_2 (mm)	35.13	13.77	33.27	10.82	-0.81	0.416
Osa (mm)	34.2	9.5	66.1	14.04	7.74	< 0.001
poc_List (počet)	3.09	0.65	3.87	0.73	4.64	< 0.001
poc_List_ns (počet)	0.89	0.63	1.2	0.61	2.6	< 0.010
d_L1 (mm)	61.14	19.91	81.73	16.98	4.59	< 0.001
s_L1 (mm)	14.23	3.85	25.37	5.12	7.24	< 0.001
BN_L1 (mm)	29.44	10.82	37.67	8.88	4.06	< 0.001
uhel_L1 (stupně)	41.5	14.46	43.67	19.78	0.24	0.809
d_L2 (mm)	80.86	21.71	117.77	65.08	5.53	< 0.001
s_L2 (mm)	15.74	6.96	28.23	6.76	6.9	< 0.001
BN_L2 (mm)	32.86	12.77	43.9	6.86	5.11	< 0.001
uhel_L2 (stupně)	54.07	13.41	42	12.91	-3.9	< 0.001
listen_2 (mm)	18.34	3.23	26.8	5.47	6.66	< 0.001
semenik_2 (mm)	12.22	1.63	15.26	3.93	4.44	< 0.001
s_lod (mm)	2.72	0.55	4.56	1.27	6.71	< 0.001
poc_kv_c (počet)	10.57	4.58	24.63	5.83	7.41	< 0.001
A (mm)	8.25	0.9	8.81	1.16	2.28	< 0.050
B (mm)	6.87	0.86	7.16	1.32	1.08	0.279
C (mm)	5.75	0.88	5.93	1.12	0.83	0.406
E (mm)	2.79	0.48	3.21	0.43	3.99	< 0.001
F (mm)	10.29	1.33	11.48	1.71	3.31	< 0.001
G (mm)	8.62	1.25	9.98	1.16	4.73	< 0.001
H (mm)	2.95	0.48	3.13	0.46	1.7	0.089
H-H_ind.	1.31	0.11	1.36	0.13	1.74	0.082
G/H	3	0.62	3.29	0.74	1.92	0.055
A-C/E	0.92	0.26	0.92	0.24	-0.12	0.907
A-C/A	0.3	0.07	0.33	0.07	1.52	0.129
d_L1/s_L1	4.39	1.34	3.3	0.72	-4.52	< 0.001
d_L2/s_L2	5.44	1.41	4.38	2.45	-4.51	< 0.001
L2_ind.	0.76	0.42	0.7	0.2	0.05	0.958
grac_ind.	1.58	0.39	1.12	0.37	-4.83	< 0.001
ind_hust	0.25	0.1	0.77	0.61	5.78	< 0.001

4. 4. 3. 2. Analýza hlavních koordinát (PCoA)

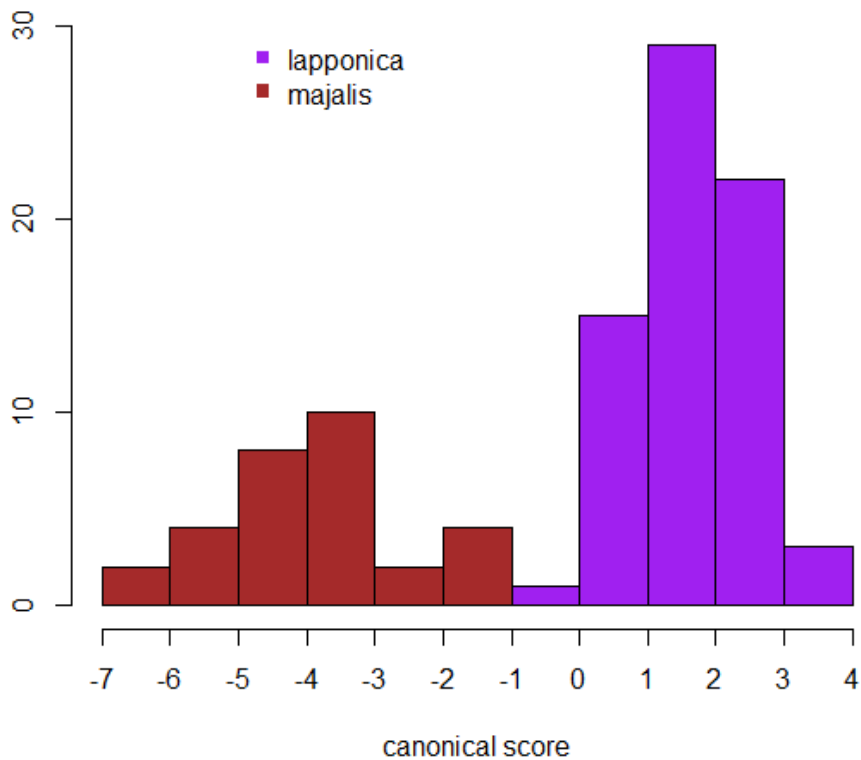
Za účelem zjištění podobnosti obou taxonů na základě celé sady znaků byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA). První osa mnohorozměrného prostoru vysvětluje 24.32 %, druhá pak 11.38 % variability souboru. Další osy již vysvětlovaly pouze zanedbatelnou část variability souboru a nebyly proto zpracovány do grafické podoby. Jedinci obou taxonů se odlišují podle první osy a tvoří dvě poměrně dobře oddělené skupiny (Obr. 7). Výsledek této analýzy ukazuje, že je vhodné provést kanonickou diskriminační analýzu a pokusit se najít znaky, které obě skupiny odlišují.



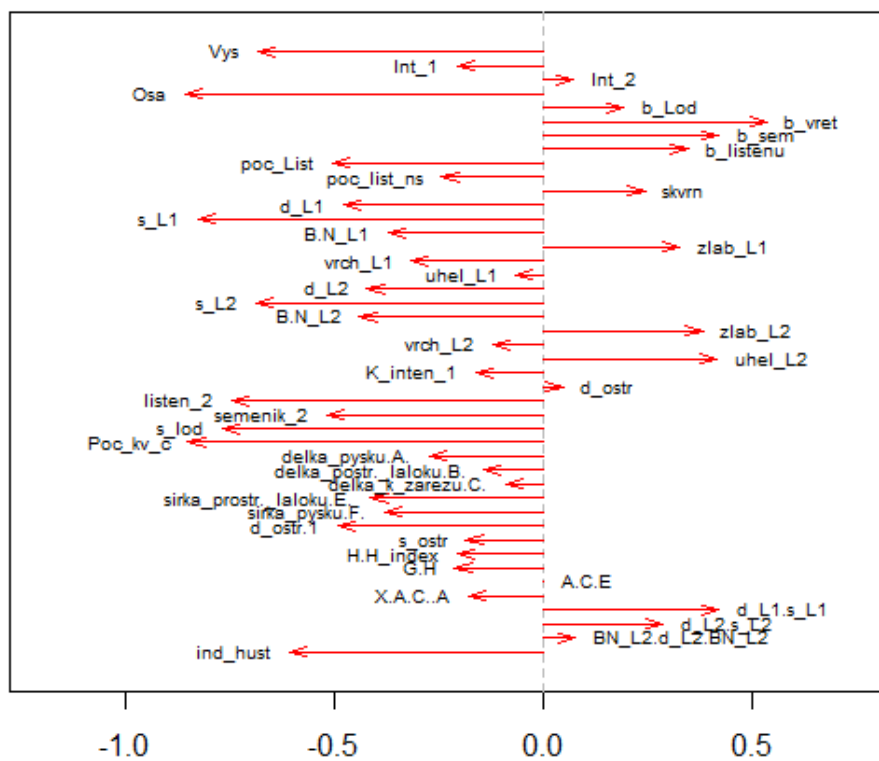
Obr. 7: Grafický výstup PCoA znázorňující rozložení jedinců příslušejících k taxonům *D. *majalis* a *D. lapponica* v mnohorozměrném prostoru promítnutém do dvou rozměrů vykazujících největší variabilitu. Názvy os grafů udávají procento variability vysvětlené danou osou. Horizontální osa odpovídá první ose mnohorozměrného prostoru, vertikální osa druhé ose mnohorozměrného prostoru.

4. 4. 3. 3. Kanonická diskriminační analýza (CDA)

Podle kanonické diskriminační analýzy je možné oba taxony pomocí sady zjišťovaných znaků poměrně dobře odlišit (Obr. 8). Existují však i morfologicky přechodní jedinci, které nelze jednoznačně přiřadit k jedné ze skupin. Mezi nejvýznamnější znaky odlišující oba soubory jedinců patří znaky související s celkovou velikostí jedinců (*Vys*, *Osa*, *s_L1*, *s_L2*, *listen_2*, *s_lod*, *Poc_kv_c*), naopak poměrně malý vliv mají znaky měřené na generativních orgánech, které nejsou tolik ovlivněny celkovou velikostí rostlin (Obr. 9). Nezanedbatelný podíl na kanonickém skóre mají také některé kategoriální znaky, jako barva vřetene květenství, nebo barva semeníků.



Obr. 8: Výsledek kanonické diskriminační analýzy pro taxony *D. *majalis* a *D. lapponica*. Výška sloupců označuje počet jedinců s daným kanonickým skóre (osa x).

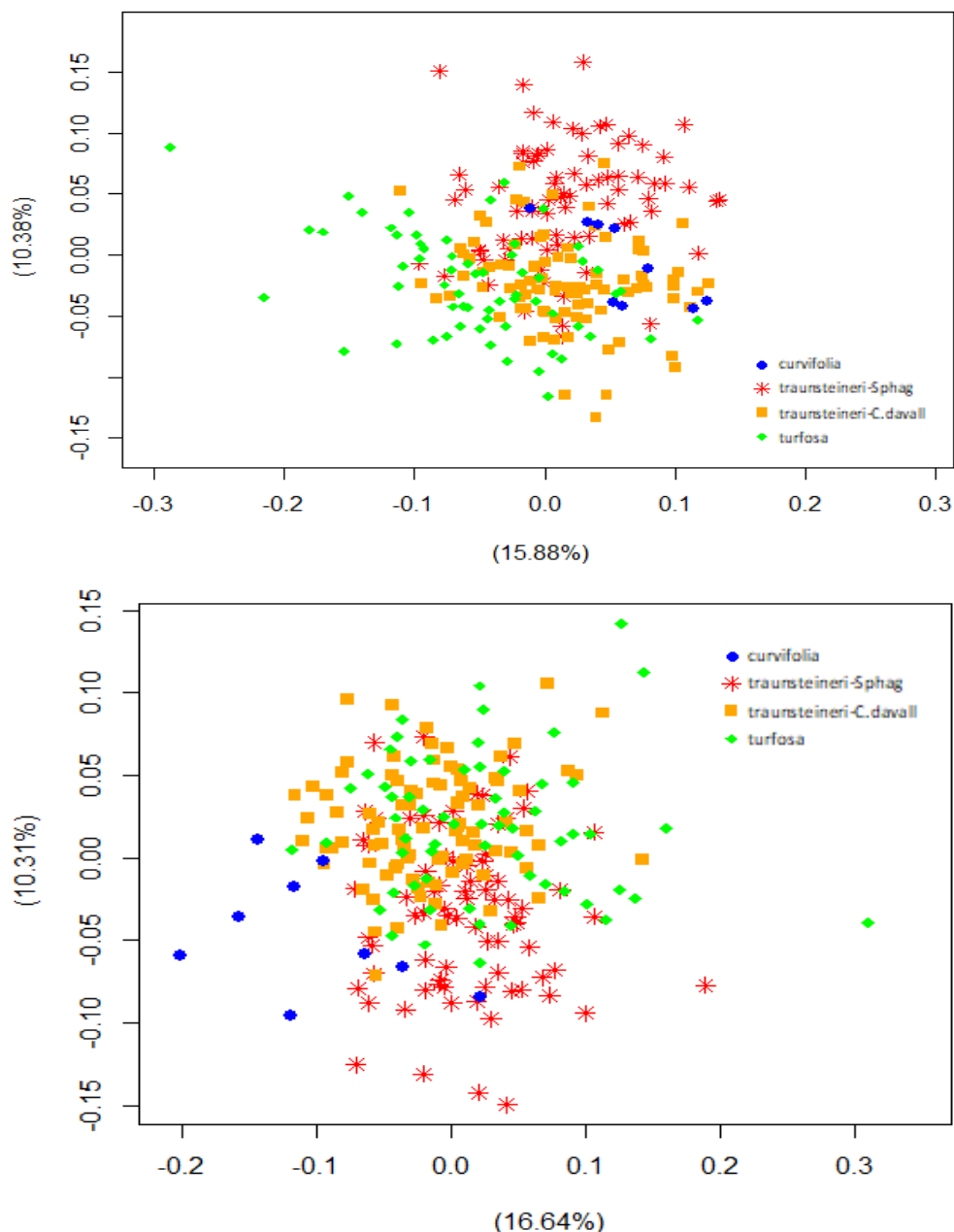


Obr. 9: Příspěvek jednotlivých znaků k rozložení jedinců taxonů *D. *majalis* a *D. lapponica* v rámci CDA. Čím je šipka u daného znaku delší, tím má větší vliv na odlišení těchto dvou taxonů v rámci CDA. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 2.

4. 4. 4. Vzájemné porovnání ostatních taxonů *Dactylorhiza traunsteineri* agg. (*D. traunsteineri*, *D. *turfosa*, *D. curvifolia*)

4. 4. 4. 1. Analýza hlavních koordinát (PCoA)

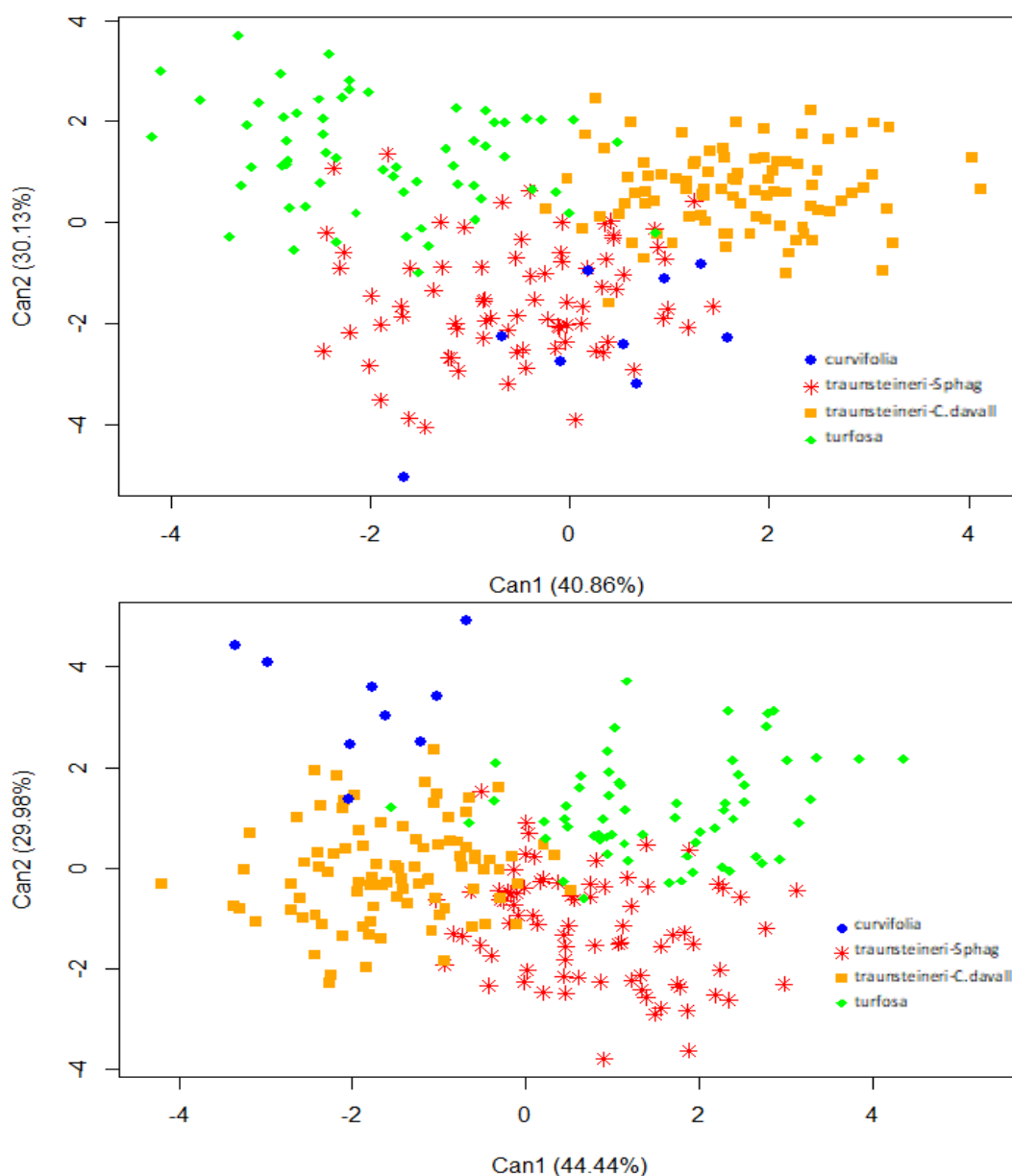
Podobně jako při porovnání *D. *majalis* a *D. lapponica* byla i k posouzení variability a podobnosti ostatních zkoumaných taxonů nejprve využita analýza hlavních koordinát (PCoA). Jedinci náležející k jednotlivým taxonům v ní utváří poměrně koherentní skupiny, které se však značně překrývají. První a druhá osa mnohazměrného prostoru vysvětlují 15,9 % a 10,4 % variability souboru, respektive 16,6 % a 10,3 % variability souboru při použití pouze kvantitativních znaků. Podíl variability vysvětlené prvními dvěma osami mnohazměrného prostoru a vyjádřené v procentech také není zvláště velký, další osy však poskytují ještě nižší rozlišovací schopnost. S obdobným výsledkem byla analýza hlavních koordinát provedena i na datovém souboru ochuzeném o znaky charakterizované na ordinální škále (Obr. 10).



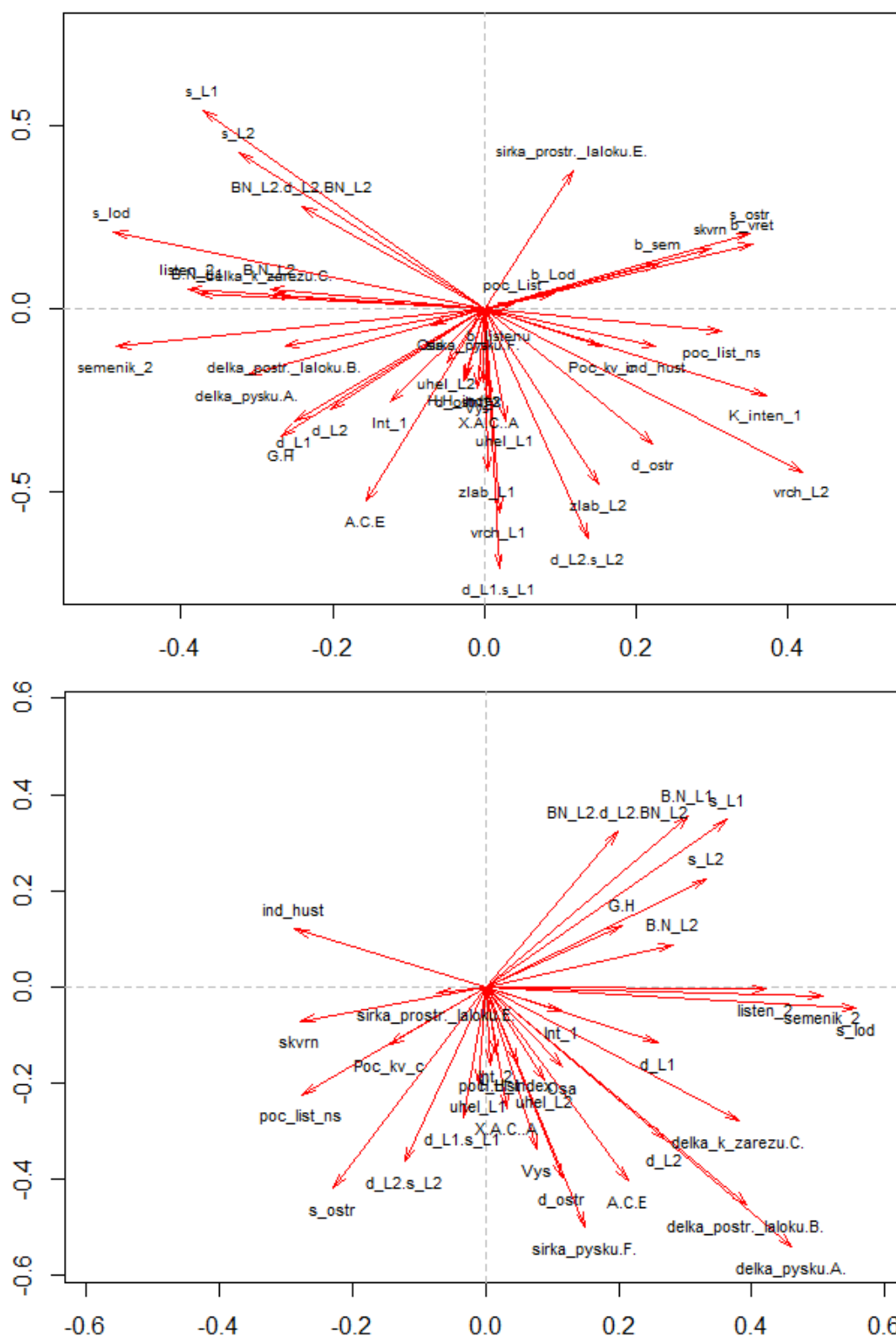
Obr. 10: Výsledky PCoA při použití všech zjišťovaných morfometrických znaků (výše) a pouze kvantitativních morfometrických znaků (níže). Názvy os udávají procento variability vysvětlené danou osou. Horizontální osa odpovídá první ose mnohazměrného prostoru, vertikální osa druhé ose mnohazměrného prostoru.

4. 4. 4. 2. Kanonická diskriminační analýza (CDA)

Kanonická diskriminační analýza, která hledá největší rozdíly mezi stanovenými skupinami, dokázala čtveřici zkoumaných taxonů oddělit poněkud lépe. Tento typ analýzy bylo možné provést, jelikož se srovnávané taxony liší jak ekologií, tak velikostí genomu (viz příslušné kapitoly). Podobně jako PCoA, byla i tato analýza provedena se dvěma různými datasety a to s kompletním a o znaky měřené na ordinální škále ochuzeným datasetem. Obě analýzy dokázaly předdefinované taxony poměrně dobře odlišit, ačkoliv u obou se část jedinců jevila jako intermediární mezi dvěma či více skupinami (Obr. 11). Obzvláště pak při užití datasetu se zahrnutými kvalitativními znaky byli jedinci taxonu *Dactylorhiza curvifolia* vtroušení mezi jedince obou ekologických typů *D. traunsteineri* a jeví se tím pádem jako těžko od nich odlišitelní. Graficky byl zpracován příspěvek jednotlivých znaků k rozložení jedinců v rámci CDA. Při použití obou datasetů se jako významné pro odlišení taxonů jeví znaky související s tvarem a velikostí listů (s_L1, s_L2, B.N_L1), tloušťka lodyhy (s_lod) a část znaků charakterizujících tvar a velikost pysků (A, B, C, F, H). Význam alespoň některých kategoriálních znaků se také zdá být nezanedbatelný, značný vliv na odlišení taxonů v rámci analýzy měly například znaky vrch_L2, vrch_L1, b_vret, nebo b_sem (Obr. 12).



Obr. 11: Výsledky CDA při použití všech zjišťovaných morfometrických znaků (výše) a pouze kvantitativních morfometrických znaků (níže). Názvy os udávají procento variability vysvětlené danou osou. Horizontální osa odpovídá první ose mnoharozměrného prostoru, vertikální osa druhé ose mnoharozměrného prostoru.



Obr. 12: Vliv jednotlivých měřených znaků na rozložení jedinců taxonů *D. curvifolia*, *D. *turfosa* a obou ekotypů *D. traunsteineri* v rámci CDA. Graf při použití celého datasetu výše, níže graf při použití datasetu ochuzeného o znaky měřené na ordinální škále. Čím je šipka u daného znaku delší, tím má tento znak větší vliv na odlišení taxonů v rámci CDA. Vysvětlivky zkratků znaků viz Tab. 2.

4. 4. 5. Vzájemné porovnání ekologicky odlišných populací *Dactylorhiza traunsteineri*

Z analýzy fytoocenologických snímků ze stanovišť výskytu *D. traunsteineri* vyplynulo, že se tento druh v zájmovém území vyskytuje na dvou poměrně odlišných typech stanovišť (viz kapitola 4. 2.). Populace z lokalit s bohatým výskytem rašeliníků a ze slatinných lokalit byly proto odděleny a vzájemně porovnány. Populace z rašelinných lokalit jsou označeny „*D. traunsteineri*-Sphag“ (soubor zahrnuje populaci z *locus classicus*), populace ze slatin jsou označeny jako „*D. traunsteineri*-C.davall“.

4. 4. 5. 1. Deskriptivní statistika a Mann-Whitney U-test

Spolu se základní deskriptivní statistikou byl nejprve proveden Mann-Whitney U-test pro porovnání obou skupin populací ve všech kvantitativních znacích (Tab. 10). Obě skupiny populací se významně lišily ve většině zjišťovaných znaků, vysoce významné rozdíly byly zjištěny zejména u délky prvního listu, některých znaků měřených na skenech pysků (A, B, E) a u indexů charakterizujících tvar pysku (G/H, A-C/E) a tvar listů (d_L1/s_L1, d_L2/s_L2). Navzdory významným rozdílům v hodnotách znaků u jedinců obou taxonů je ale zapotřebí si povšimnout značných překryvů v těchto hodnotách, a tedy jejich obtížnému využití pro případnou determinaci.

Tab. 10: Základní statistické údaje pro primární kvantitativní znaky a indexy a výsledky neparametrického Mann-Whitneyho U-testu porovnání skupin populací označených *D. traunsteineri*-Sphag a *D. traunsteineri*-C.davall. Signifikantní výsledky statistického testu ($P < 0,05$) jsou zvýrazněny. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 2. SD = směrodatná odchylka, n = velikost vzorku jedinců, Z = hodnota testového kritéria, P = pravděpodobnost shodnosti výběrů

znak (jednotka)	<i>D. traunsteineri</i> -Sphag (n = 79)		<i>D. traunsteineri</i> -C.davall (n = 92)		Mann-Whitney U-test	
	průměr	SD	průměr	SD	Z	P
Vys (mm)	320.46	71.87	290.68	54.72	2.78	< 0.01
Int_1 (mm)	37.74	17.1	30.34	14.73	2.71	< 0.01
Int_2 (mm)	55.90	18.55	50.54	18.57	1.68	0.092
Osa (mm)	55.82	17.77	51.76	16.35	1.78	0.075
poc_List (počet)	2.85	0.48	2.84	0.54	0.20	0.839
poc_List_ns (počet)	1.14	0.81	1.32	0.66	-1.79	0.074
d_L1 (mm)	105.37	31.01	86.70	18.83	4.26	< 0.001
s_L1 (mm)	10.67	2.42	11.54	2.52	-1.96	< 0.05
BN_L1 (mm)	41.99	14.21	37.72	11.86	1.81	0.069
uhel_L1 (stupně)	60.76	13.21	55.35	12.80	3.03	< 0.01
d_L2 (mm)	125.42	28.15	105.52	20.45	4.86	< 0.001
s_L2 (mm)	10.38	2.28	10.87	3.70	-0.03	0.973
BN_L2 (mm)	41.80	14.45	36.86	14.91	2.32	< 0.05
uhel_L2 (stupně)	69.73	13.56	66.09	9.25	3.21	< 0.01
listen_2 (mm)	23.04	5.17	20.38	4.07	3.90	< 0.001
semenik_2 (mm)	14.30	1.83	12.70	1.55	5.55	< 0.001
s_lod (mm)	3.02	0.64	2.67	0.49	3.76	< 0.001
poc_kv_c (počet)	12.03	5.34	12.23	4.01	-0.70	0.483
A (mm)	10.08	0.84	9.15	0.73	6.76	< 0.001
B (mm)	8.47	0.91	7.78	0.70	5.24	< 0.001
C (mm)	7.55	0.95	7.09	0.65	3.16	< 0.01
E (mm)	2.94	0.60	3.30	0.61	-3.59	< 0.001
F (mm)	11.19	1.23	10.74	1.12	2.56	< 0.05
G (mm)	10.12	1.44	9.50	1.10	3.03	< 0.01
H (mm)	2.98	0.40	3.23	0.55	-3.13	< 0.01
H-H_ind.	1.27	0.12	1.23	0.08	1.62	0.105
G/H	3.47	0.73	3.01	0.54	4.24	< 0.001
A-C/E	0.88	0.30	0.63	0.15	6.22	< 0.001
A-C/A	0.25	0.08	0.22	0.06	2.62	< 0.01

Tab. 10: Pokračování.

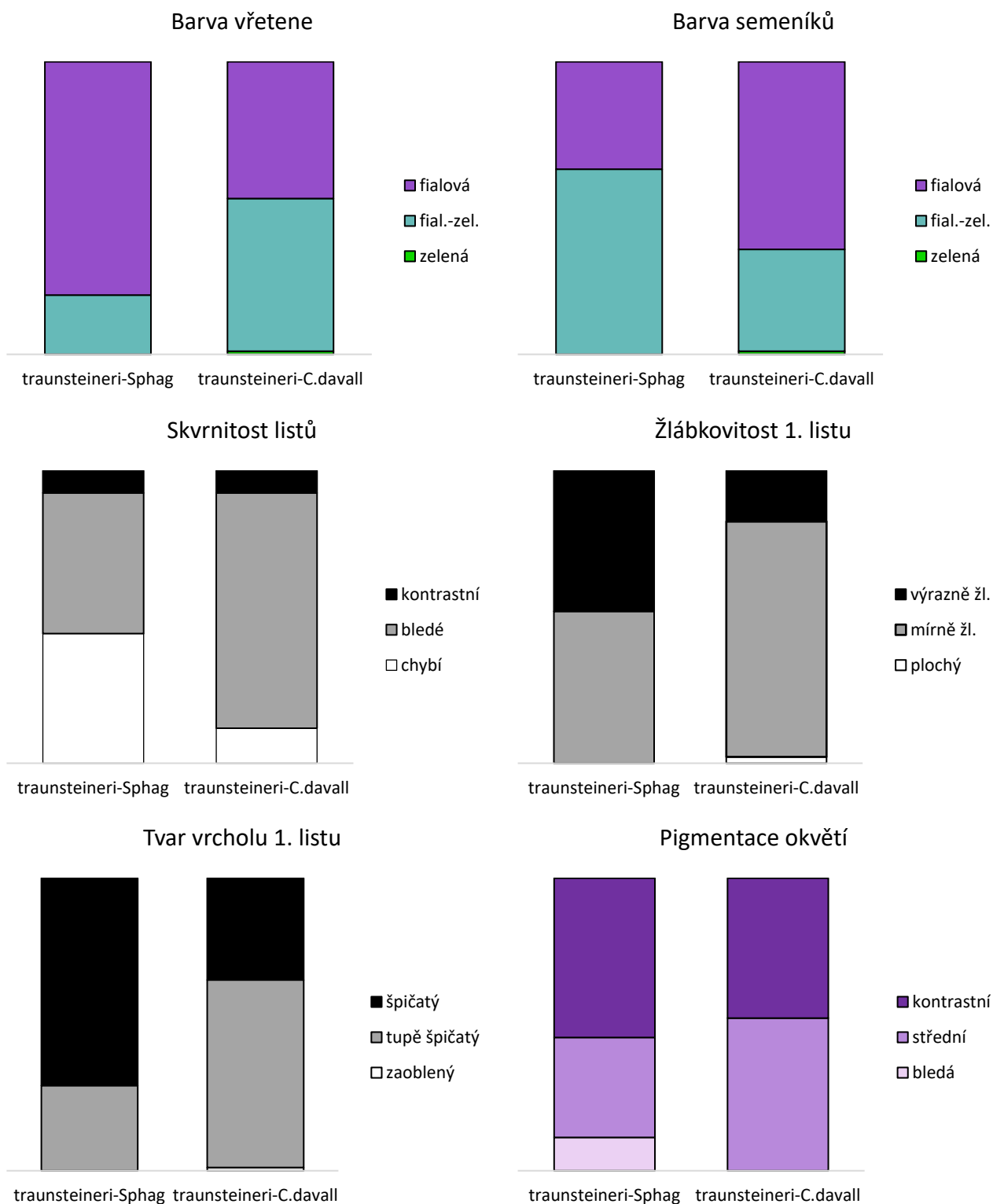
d_L1/s_L1	10.26	3.40	7.67	1.63	5.36	< 0.001
d_L2/s_L2	12.68	4.04	10.31	2.59	4.20	< 0.001
L2_ind.	0.53	0.23	0.58	0.29	-0.57	0.569
ind_hust	0.19	0.05	0.21	0.06	-1.77	0.077

4. 4. 5. 2. Porovnání znaků měřených na ordinální škále

Pro porovnání rozdílů v četnosti výskytu hodnot kategoriálních proměnných u obou skupin populací byl použit Pearsonův χ^2 test (Tab. 11). Vysoce signifikantní rozdíly byly zjištěny hned u několika znaků, jako jsou barva včetně květenství, barva semeníků, intenzita skvrnitosti listů, žlábkovitost a tvar vrcholu prvního listu a intenzita pigmentace pysků. Zdá se, že *D. traunsteineri* ze slatinných stanovišť je obecně více pigmentovaná, což se projevuje jak na vegetativních, tak na generativních částech rostlin. Poměr výskytu hodnot těchto znaků u obou taxonů byl pro vysoce signifikantní rozdíly vizualizován prostřednictvím složených sloupcových grafů (Obr. 13).

Tab. 11: Počty jedinců v dané kategorii znaku pro obě zkoumané skupiny populací *Dactylorhiza traunsteineri* a výsledky Pearsonova χ^2 testu. Za signifikantní byly považovány výsledky s $P < 0,05$. Takovéto jsou v tabulce tučně zvýrazněny. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 2. n = velikost vzorku jedinců daného taxonu, χ^2 = hodnota testového kritéria, n = velikost vzorku jedinců daného taxonu, DF = stupně volnosti, P = pravděpodobnost shodnosti výběrů

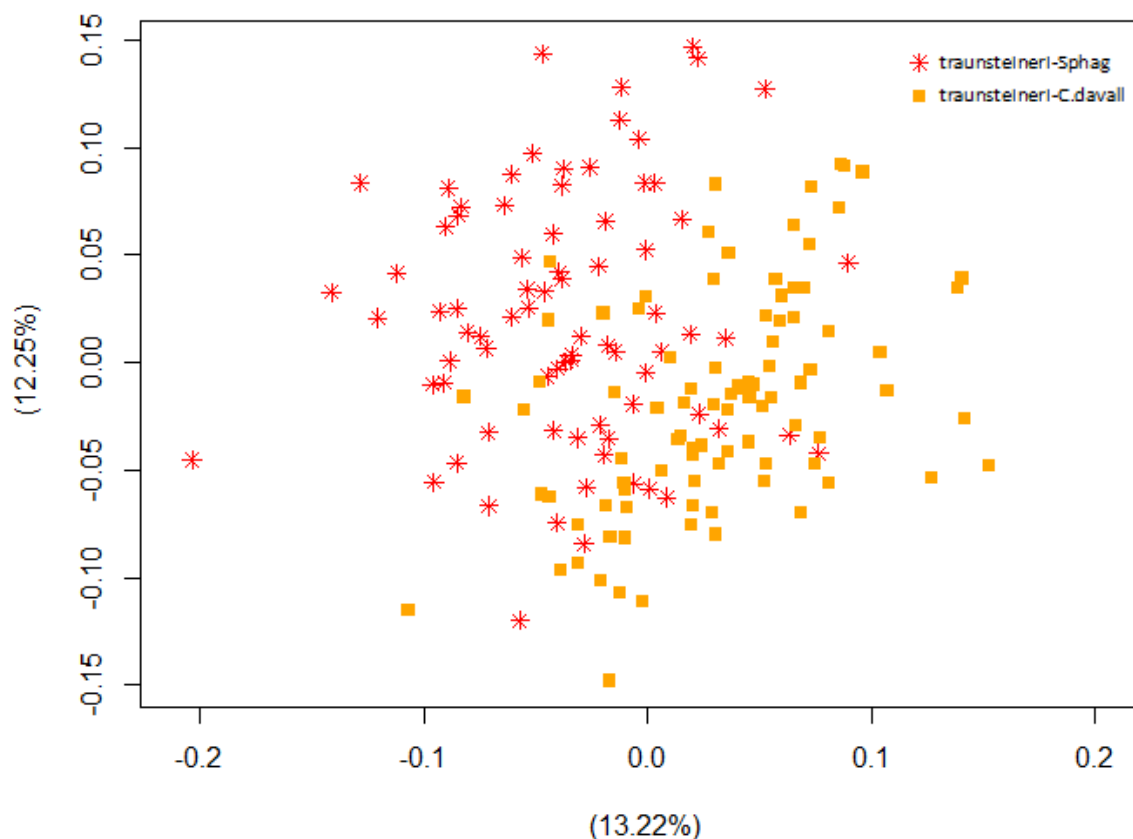
znak	<i>D. traunsteineri</i> -Sphag (n = 79)			<i>D. traunsteineri</i> -C.davall (n = 92)			χ^2 test		
	počet jedinců v kategorii						χ^2	DF	P
	kategorie			kategorie					
	zelená	fial.-zel.	fialová	zelená	fial.-zel.	fialová			
b_lod	79	0	0	91	1	0	0.86	1	0.353
b_vret	0	63	16	1	43	48	19.9	2	< 0.001
b_sem	0	50	29	1	32	59	14.27	2	< 0.001
b_listenu	0	54	25	1	63	28	0.88	2	0.644
	kategorie			kategorie					
	chybí	světlé	tmavé	chybí	světlé	tmavé			
skvrn	35	38	6	11	74	7	23.32	2	< 0.001
	kategorie			kategorie					
	plochý	mírně žl.	výrazně žl.	plochý	mírně žl.	výrazně žl.			
zlab_L1	0	41	38	2	74	16	19.56	2	< 0.001
zlab_L2	0	22	57	1	46	45	9.95	2	< 0.01
	kategorie			kategorie					
	zaoblený	tupě špič.	špičatý	zaoblený	tupě špič.	špičatý			
vrch_L1	0	23	56	1	59	32	22.49	2	< 0.001
vrch_L2	0	1	78	0	5	87	2.18	2	0.140
	kategorie			kategorie					
	bledá	střední	kontrastní	bledá	střední	kontrastní			
K_inten	9	27	43	0	48	44	13.98	2	< 0.001
	kategorie			kategorie					
	delší s.	zděli s.	kratší s.	delší s.	zděli s.	kratší s.			
d_ost	11	51	17	1	65	26	10.98	2	< 0.01



Obr. 13: Vizualizace vybraných kategoriálních znaků s vysoce signifikantními rozdíly mezi skupinami populací *Dactylorhiza traunsteineri* z rašelinných a slatinných lokalit. Výšky barevných sloupců odpovídají poměrnému výskytu dané hodnoty znaku u dané skupiny populací.

4. 4. 5. 3. Analýza hlavních koordinát (PCoA)

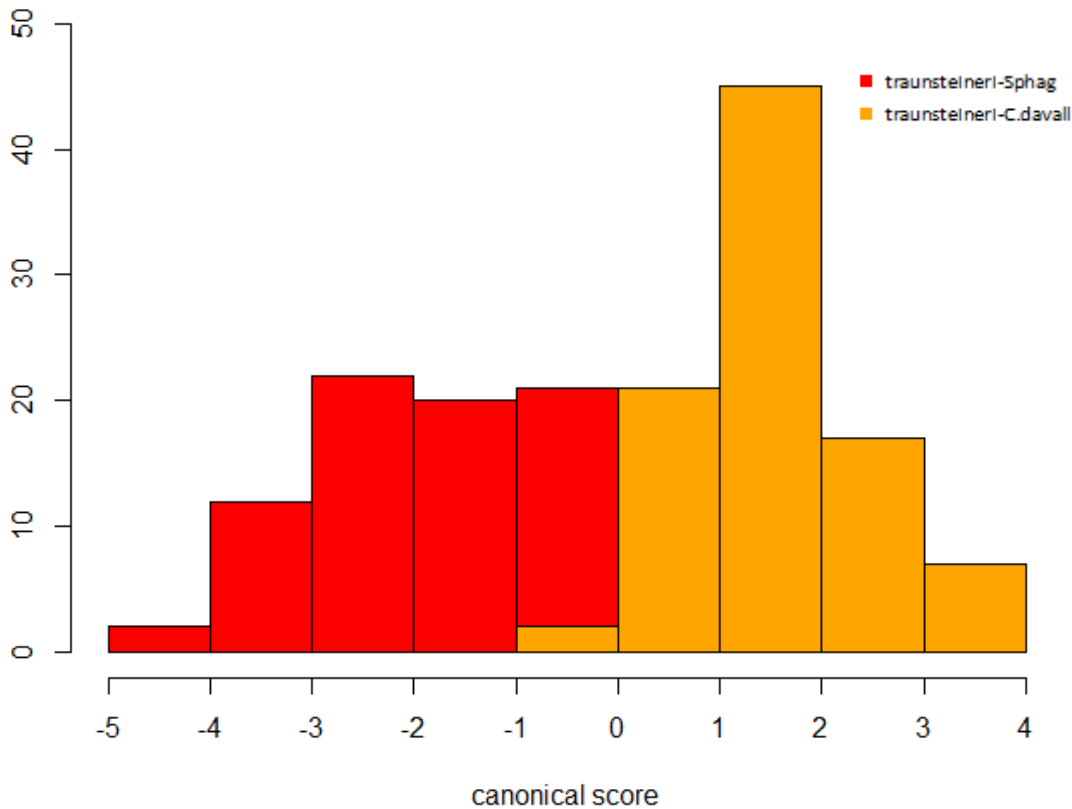
Na základě celého datového souboru byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA). Obě ekologické skupiny populací *Dactylorhiza traunsteineri* se v grafu poměrně značně překrývají, první i druhá osa vysvětlují jen relativně malý podíl celkové variability souboru dat (Obr. 14). Tato analýza byla s obdobným výsledkem provedena i na základě datového souboru ochuzeného o znaky charakterizované na ordinální škále. Navzdory obtížné interpretaci grafu však jedinci obou ekotypů tvoří dva relativně ucelené shluky, a tak bylo dále přistoupeno ke kanonické diskriminační analýze (CDA) za účelem nalezení znaků vhodných k jejich odlišení.



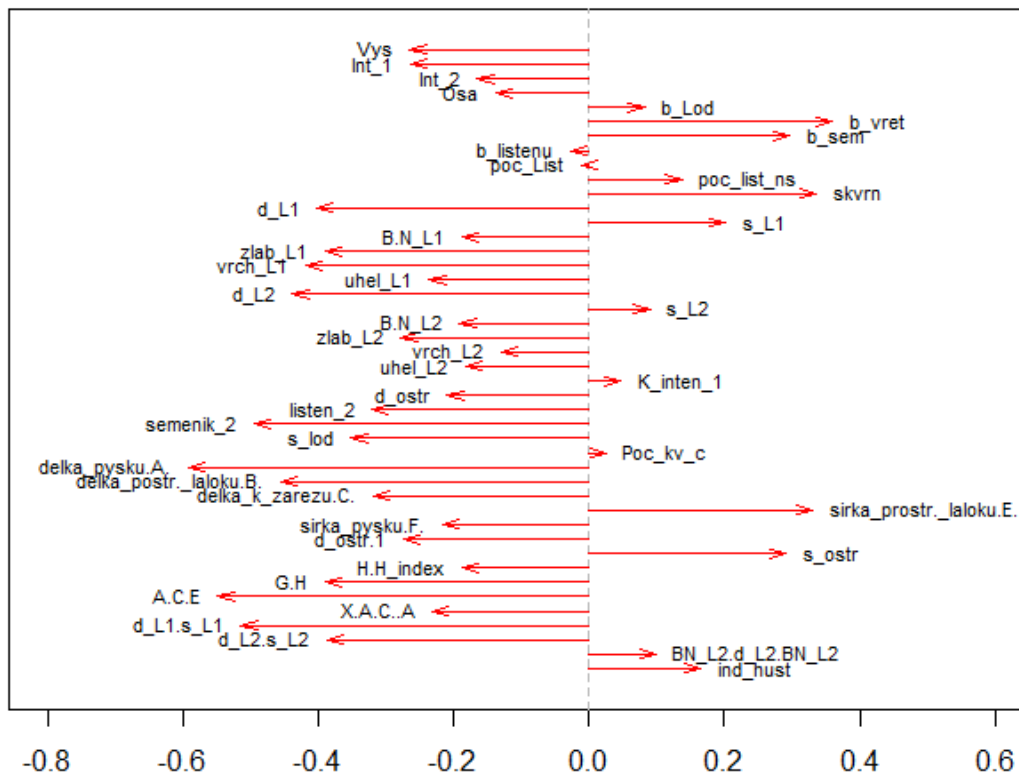
Obr. 14: Grafický výstup z analýzy hlavních koordinát (PCoA) pro ekotypy *Dactylorhiza traunsteineri*. Názvy os udávají procento variability vysvětlené danou osou. Horizontální osa odpovídá první ose mnohazměrného prostoru, vertikální osa druhé ose mnohazměrného prostoru.

4. 4. 5. 4. Kanonická diskriminační analýza (CDA)

Kanonická diskriminační analýza bylo možné provést, jelikož se oba srovnávané taxony liší jak svou stanovištní preferencí, tak relativní velikostí genomu (viz příslušné kapitoly). Tato analýza nedokázala obou soubory populací *Dactylorhiza traunsteineri* přesvědčivě odlišit, značná část jedinců je i při takto optimalizovaném rozložení variability intermediárního charakteru (Obr. 15). Analýza byla kromě celého souboru znaků provedena i na souboru ochuzeném o znaky měřené na ordinální škále, výsledek této analýzy byl však velmi podobný. Analyzován byl i příspěvek jednotlivých znaků k celkovému rozložení. Nejvýznamnějšími znaky odlišujícími obě zkoumané skupiny populací jsou ve shodě s výsledky Mann-Whitney U-testu délka prvního a druhého listu, délka 2. semeníku, délka pysku (A), délka postranního laloku (B), index tvaru ostruhy, index tvaru středního laloku pysku, index délky 1. listu a index délky 2. listu (Obr. 16).



Obr. 15: Výsledek kanonické diskriminační analýzy pro dva ekotypy *Dactylorhiza traunsteineri*. Výška sloupců označuje počet jedinců s daným kanonickým skóre (osa x).



Obr. 16: Příspěvek jednotlivých znaků k rozložení jedinců pro dva ekotypy *Dactylorhiza traunsteineri* v rámci CDA. Čím je šipka u daného znaku delší, tím má větší vliv na odlišení těchto dvou domnělých taxonů v rámci CDA. Vysvětlivky zkratků znaků viz Tab. 2.

4. 4. 6. Vzájemné porovnání taxonů alopolyploidního okruhu *D. majalis/traunsteineri* se sympatrickým výskytem v Čechách (*D. *majalis*, *D. traunsteineri*, *D. *turfosa*)

Vzhledem k výsledkům předcházejícího porovnání populací *D. traunsteineri* z různých typů stanovišť bylo s tímto taxonem v následujících analýzách nakládáno jako s jedním souborem jedinců.

4. 4. 6. 1. Deskriptivní statistika kvantitativních znaků a Kruskal-Wallisův test

Na úvod statistických analýz byla zhotovena základní deskriptivní statistika pro trojici porovnávaných taxonů. Zároveň byl proveden také neparametrický Kruskal-Wallisův test, který odhalil, že ve většině znaků se alespoň jeden taxon odlišuje od zbylých dvou, a to často poměrně významně (Tab. 12). V řadě znaků je výrazně odlišným od obou zbývajících taxonů *D. *majalis* (znaky Int_2, Osa, s_L2, uhel_L2, Poc_kv_c, A, B, ind_hust), v části znaků pak jedinci taxonů *D. *majalis* a *D. traunsteineri* reprezentují krajní hodnoty variability celého datového souboru, zatímco jedinci taxonu *D. *turfosa* jsou hodnotami svých znaků intermediární (s_L1, s_L2, listen_2, s_lod, d_L1_s_L1, d_L2_s_L2).

Tab. 12: Základní deskriptivní statistika pro primární kvantitativní znaky a indexy taxonů *D. *majalis*, *D. traunsteineri* a *D. *turfosa* a výsledek Kruskal-Wallisova testu porovnání mezi nimi. Signifikantní výsledky statistického testu ($P < 0,05$) jsou zvýrazněny. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 2. SD = směrodatná odchylka, n = velikost vzorku jedinců, χ^2 = hodnota testového kritéria, P = pravděpodobnost shodnosti výběrů

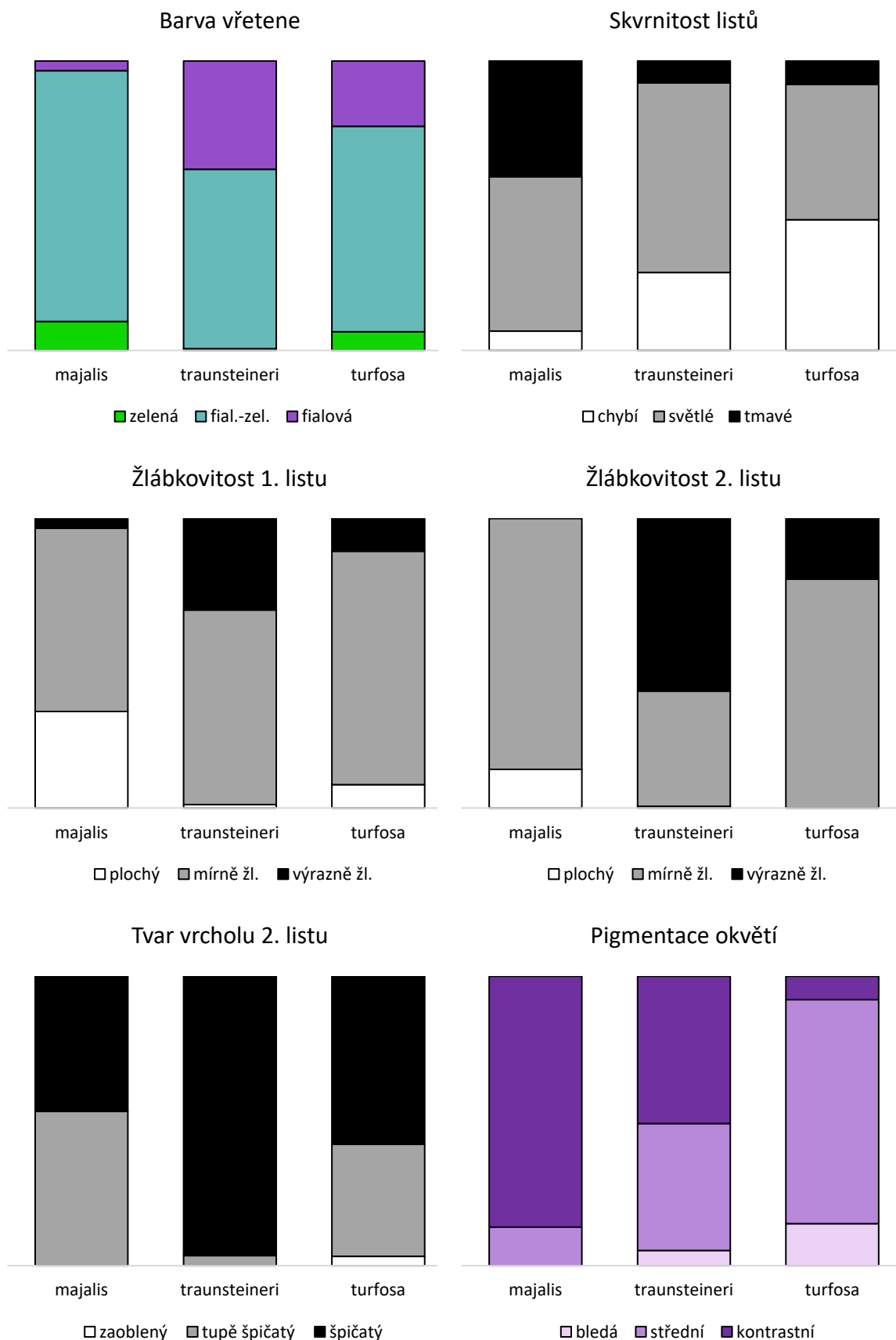
znak (jednotka)	<i>D. *majalis</i> (n=30)		<i>D. traunsteineri</i> (n = 171)		<i>D. *turfosa</i> (n = 62)		Kruskal-Wallisův test	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD	χ^2	P
Vys (mm)	266.97	65.97	304.44	64.77	280.76	80.77	13.11	< 0.01
Int_1 (mm)	25.63	12.83	33.76	16.25	32.81	14.49	7.51	< 0.05
Int_2 (mm)	33.27	10.82	53.02	18.70	48.81	18.58	33.08	< 0.001
Osa (mm)	66.10	14.04	53.64	17.09	53.10	17.56	17.38	< 0.001
poc_List (počet)	3.87	0.73	2.84	0.51	2.77	0.58	57.65	< 0.001
poc_List_ns (počet)	1.20	0.61	1.23	0.74	0.82	0.56	12.27	< 0.01
d_L1 (mm)	81.73	16.98	95.32	26.80	96.06	21.68	8.81	< 0.05
s_L1 (mm)	25.37	5.12	11.14	2.50	15.08	4.42	107.34	< 0.001
BN_L1 (mm)	37.67	8.88	39.69	13.13	50.26	15.68	25.75	< 0.001
uhel_L1 (stupně)	43.67	19.78	57.85	13.23	52.58	14.51	16.58	< 0.001
d_L2 (mm)	117.77	65.08	117.77	65.08	111.55	27.06	2.05	0.359
s_L2 (mm)	28.23	6.76	10.64	3.12	14.16	4.90	99.56	< 0.001
BN_L2 (mm)	43.90	6.86	39.14	14.87	46.95	21.08	9.30	< 0.01
uhel_L2 (stupně)	42.00	12.91	67.77	11.55	66.05	10.13	63.92	< 0.001
listen_2 (mm)	26.80	5.47	21.61	4.78	24.58	6.36	28.41	< 0.001
semenik_2 (mm)	15.26	3.93	13.44	1.86	14.53	2.17	18.03	< 0.001
s_lod (mm)	4.56	1.27	2.83	0.59	3.40	0.84	68.41	< 0.001
poc_kv_c (počet)	24.63	5.83	12.13	4.66	10.56	3.81	72.27	< 0.001
A (mm)	8.81	1.16	9.58	0.91	9.55	0.95	11.08	< 0.01
B (mm)	7.16	1.32	8.10	0.87	8.12	0.90	14.22	< 0.001
C (mm)	5.93	1.12	7.30	0.83	7.52	0.89	39.90	< 0.001
E (mm)	3.21	0.43	3.14	0.63	3.22	0.66	0.97	0.616
F (mm)	11.48	1.71	10.95	1.19	10.57	1.33	6.92	< 0.05
G (mm)	9.98	1.16	9.79	1.30	9.34	1.29	8.62	< 0.05
H (mm)	3.13	0.46	3.11	0.50	2.84	0.36	16.19	< 0.001
H-H_ind.	1.36	0.13	1.25	0.10	1.23	0.10	25.86	< 0.000
G/H	3.29	0.74	3.22	0.67	3.33	0.50	1.96	0.376
A-C/E	0.92	0.24	0.74	0.27	0.64	0.20	23.48	< 0.001
A-C/A	0.33	0.07	0.24	0.07	0.21	0.07	42.98	< 0.001
d_L1/s_L1	3.30	0.72	8.87	2.90	6.74	1.91	101.55	< 0.001
d_L2/s_L2	4.38	2.45	11.40	3.54	8.35	2.21	103.06	< 0.001
L2_ind.	0.70	0.20	0.56	0.27	0.80	0.46	22.77	< 0.001
ind_hust	0.77	0.61	0.20	0.06	0.18	0.06	75.99	< 0.001

4. 4. 6. 2. Deskriptivní statistika kvalitativních znaků a χ^2 -test

Podobně jako pro kvantitativní znaky, byla i pro kvalitativní znaky zhotovena základní deskriptivní statistika. Proveden byl také χ^2 -test, který odhalil vysoce významné rozdíly mezi taxony u většiny zjišťovaných znaků. Taxony se velmi výrazně lišily obzvláště ve znacích souvisejících s tvarem listů a jejich pigmentací (Tab. 13). Vybrané vysoce signifikantní rozdíly mezi taxony v kvalitativních znacích byly vizualizovány pomocí skládaných sloupcových grafů (Obr. 17).

Tab. 13: Počty jedinců v dané kategorii znaku pro sympatricky se vyskytující taxony *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* agg. a výsledky Pearsonova χ^2 testu. Za signifikantní byly považovány výsledky s $P < 0,05$. Takovéto jsou v tabulce tučně zvýrazněny. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 2. n = velikost vzorku jedinců daného taxonu, χ^2 = hodnota testového kritéria, n = velikost vzorku jedinců daného taxonu, DF = stupně volnosti, P = pravděpodobnost shodnosti výběrů

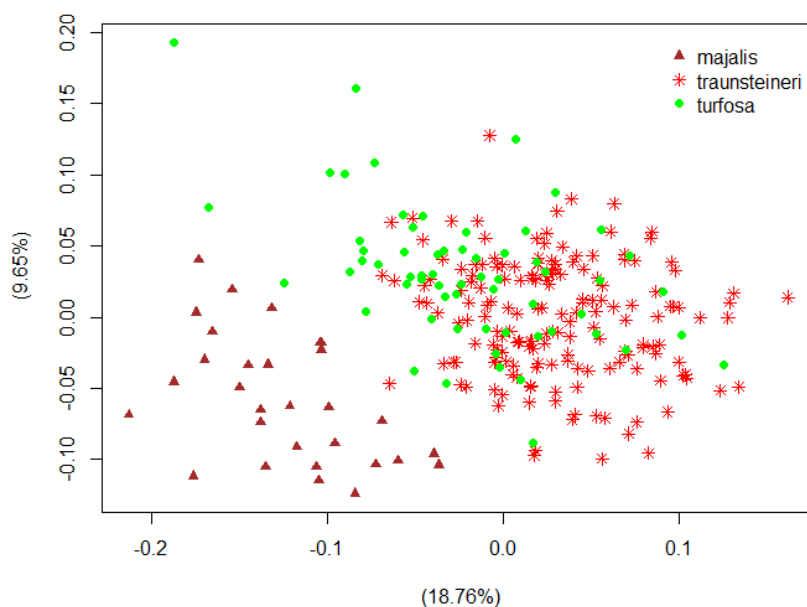
znak	<i>D. *majalis</i> (n = 30)			<i>D. traunsteineri</i> (n = 171)			<i>D. *turfosa</i> (n = 62)			χ^2 test		
	počet jedinců v kategorii			počet jedinců v kategorii			počet jedinců v kategorii			χ^2	DF	P
	kategorie			kategorie			kategorie					
	zelená	fial.-zel.	fialová	zelená	f.-zelená	fialová	zelená	fial.-zel.	fialová			
b_lod	30	0	0	170	1	0	62	0	0	0.54	2	0.76
b_vret	3	26	1	1	106	64	4	44	14	24.44	4	<0.001
b_sem	0	26	4	1	82	88	0	35	27	15.89	4	<0.01
b_listenu	1	28	1	1	117	53	0	46	16	12.72	4	<0.05
	kategorie			kategorie			kategorie					
	chybí	světlé	tmavé	chybí	světlé	tmavé	chybí	světlé	tmavé			
skvrn	2	16	12	46	112	13	28	29	5	38.22	4	<0.001
	kategorie			kategorie			kategorie					
	plochý	mírně žl.	výrazně žl.	plochý	mírně žl.	výrazně žl.	plochý	mírně žl.	výrazně žl.			
zlab_L1	10	19	1	2	115	54	5	50	7	56.38	4	<0.001
zlab_L2	4	26	0	1	68	102	0	49	13	73.14	4	<0.001
	kategorie			kategorie			kategorie					
	špičatý	tupě šp.	zaoblený	špičatý	tupě šp.	zaoblený	špičatý	tupě šp.	zaoblený			
vrch_L1	10	18	2	88	82	1	16	42	4	19.4	4	<0.001
vrch_L2	14	16	0	165	6	0	36	24	2	76.91	4	<0.001
	kategorie			kategorie			kategorie					
	bledá	střední	kontrastní	bledá	střední	kontrastní	bledá	střední	kontrastní			
K_inten	0	4	26	9	75	87	9	48	5	58.97	4	<0.001
	kategorie			kategorie			kategorie					
	delší s.	zděli s.	kratší s.	delší s.	zděli s.	kratší s.	delší s.	zděli s.	kratší s.			
d_ost	0	17	13	12	116	43	1	19	42	37.75	4	<0.001



Obr. 17: Vizualizace vybraných kategoriálních znaků s vysoce signifikantními sympatricky se vyskytující taxony *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* agg.. Výšky barevných sloupců odpovídají poměrnému výskytu dané hodnoty znaku u dané skupiny populací.

4. 4. 6. 3. Analýza hlavních koordinát (PCoA)

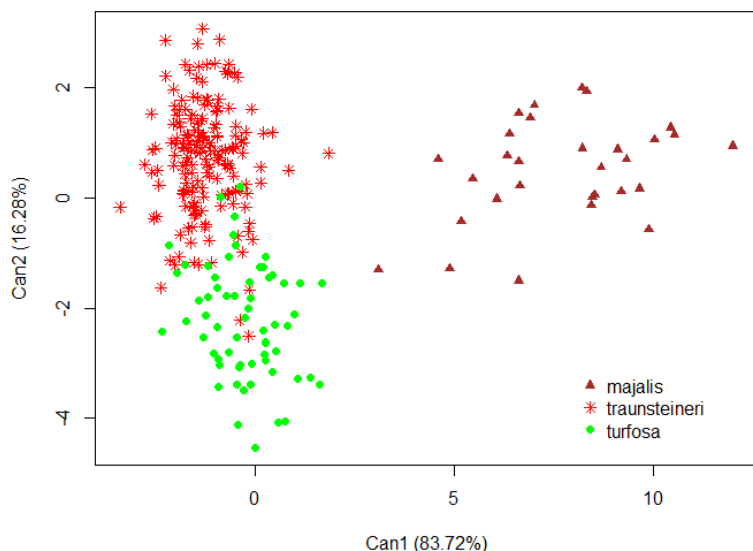
Pro prvotní posouzení vlivu všech znaků na rozložení variability mezi trojicí porovnávaných taxonů byla použita analýza hlavních koordinát (PCoA). První osa mnohorozměrného prostoru vysvětluje 18.76 %, druhá pak 9.65 % variability souboru. Další osy již vysvětlovaly pouze zanedbatelnou část variability souboru a nebyly proto zpracovány do grafické podoby. Ve směru první osy mnohorozměrného prostoru se poměrně výrazně vylíší jedinci taxonu *D. *majalis*, naopak jedinci *D. traunsteineri* a *D. *turfosa* tvoří poměrně nepřehledný propletený shluk v pravé části grafu (Obr. 18). První dvě osy zároveň vysvětlují jen poměrně malý podíl variability celého datového souboru. Obdobného výsledku bylo dosaženo i při použití datasetu ochuzeného o znaky charakterizované na ordinální škále.



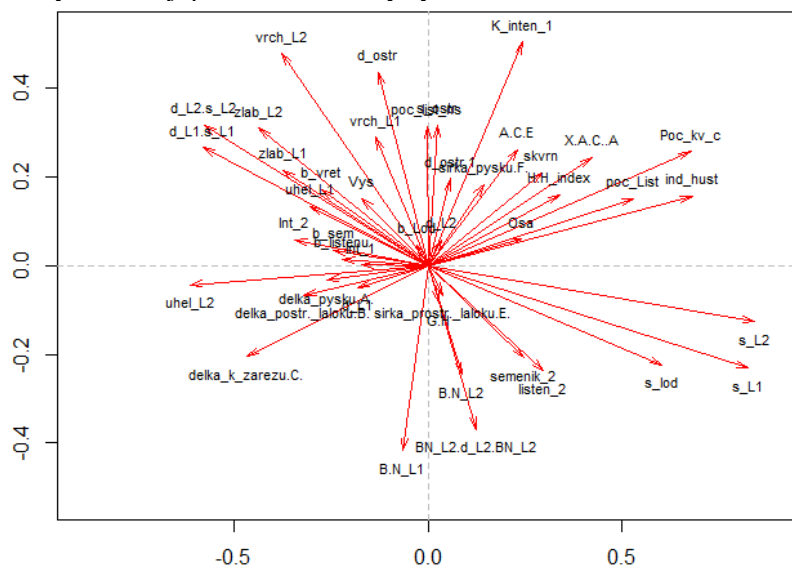
Obr. 18: Grafický výstup z analýzy hlavních koordinát (PCoA) pro taxony *D. *majalis*, *D. traunsteineri* a *D. *turfosa*. Názvy os udávají procento variability vysvětlené danou osou.

4. 4. 6. 4. Kanonická diskriminační analýza (CDA)

Za účelem nalezení znaků, které by dokázaly odlišit trojici porovnávaných taxonů byla provedena kanonická diskriminační analýza (CDA). Podle první osy se v ní velmi výrazně odlišují populace *D. *majalis*, které se nacházejí v levé části pole grafu, podle druhé osy se pak poněkud méně zřetelně odlišují populace *D. traunsteineri* a *D. *turfosa* nacházející se v levé části pole grafu (Obr. 19). Ačkoliv je část jedinců obou těchto taxonů zřetelně přechodná mezi oběma skupinami, tak převážná většina jedinců leží blízko středu variability příslušného taxonu. Zjištěn byl také příspěvek jednotlivých znaků k rozložení jedinců v grafu kanonické diskriminační analýzy (Obr. 20). Ve směru první a částečně i druhé osy pole grafu mají značný vliv znaky *s_L1*, *s_L2*, *Poc_kv_c*, *ind_hust*, *d_L1/s_L1*, *d_L2/s_L2*, které tak odlišují především taxon *D. *majalis* od zbylých dvou taxonů. Ve směru druhé osy utvářejí rozložení jedinců v poli grafu zejména znaky *K_inten_1*, *BN_L1*, *d_ostr* a *vrch_L2*, které jsou tak důležité pro odlišení *D. traunsteineri* a *D. *turfosa*. CDA byla provedena i se stejným souborem jedinců a souborem znaků ochuzeným o znaky charakterizované na ordinální škále. Výsledek této analýzy byl téměř shodný.



Obr. 19: Výsledek kanonické diskriminační analýzy (CDA) pro taxony *D. *majalis*, *D. traunsteineri* a *D. *turfosa*. Názvy os udávají procento variability vysvětlené danou osou.



Obr. 20: Vliv jednotlivých měřených znaků na rozložení jedinců taxonů *Dactylorhiza *majalis*, *D. traunsteineri* a *D. *turfosa* v rámci CDA. Čím je šipka u daného znaku delší, tím má tento znak větší vliv na odlišení taxonů v rámci CDA. Vysvětlivky zkratek znaků viz Tab. 2.

4. 4. 7. Vzájemné porovnání obou ekotypů *D. traunsteineri* a *D. *turfosa*

4. 4. 7. 1. Deskriptivní statistika kvantitativních znaků a Kruskal-Wallisův test

Na úvod statistických analýz byla zhotovena základní deskriptivní statistika pro trojici porovnávaných taxonů. Zároveň byl proveden také neparametrický Kruskal-Wallisův test, který odhalil, že ve většině znaků se alespoň jeden taxon odlišuje od zbylých dvou, a to často poměrně významně (Tab. 14). Oba ekotypy *D. traunsteineri* jsou si v hodnotách většiny znaků dosti podobné a výrazněji se častěji odlišuje *D. *turfosa*. Jsou však i takové znaky (např. Vys, uhel_L2, listen_2, semenik_2, C, H), v nichž je jeden z ekotypů bližší *D. *turfosa*, než druhému ekotypu. Tato podobnost je častější mezi rašelinným ekotypem a *D. *turfosa*, nežli slatinným ekotypem a *D. *turfosa*.

Tab. 14: Základní deskriptivní statistika pro primární kvantitativní znaky a indexy obou ekotypů *D. traunsteineri* a *D. *turfosa* a výsledek Kruskal-Wallisova testu porovnání mezi nimi. Signifikantní výsledky statistického testu ($P < 0,05$) jsou zvýrazněny. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 2. SD = směrodatná odchylka, n = velikost vzorku jedinců, χ^2 = hodnota testového kritéria, P = pravděpodobnost shodnosti výběrů

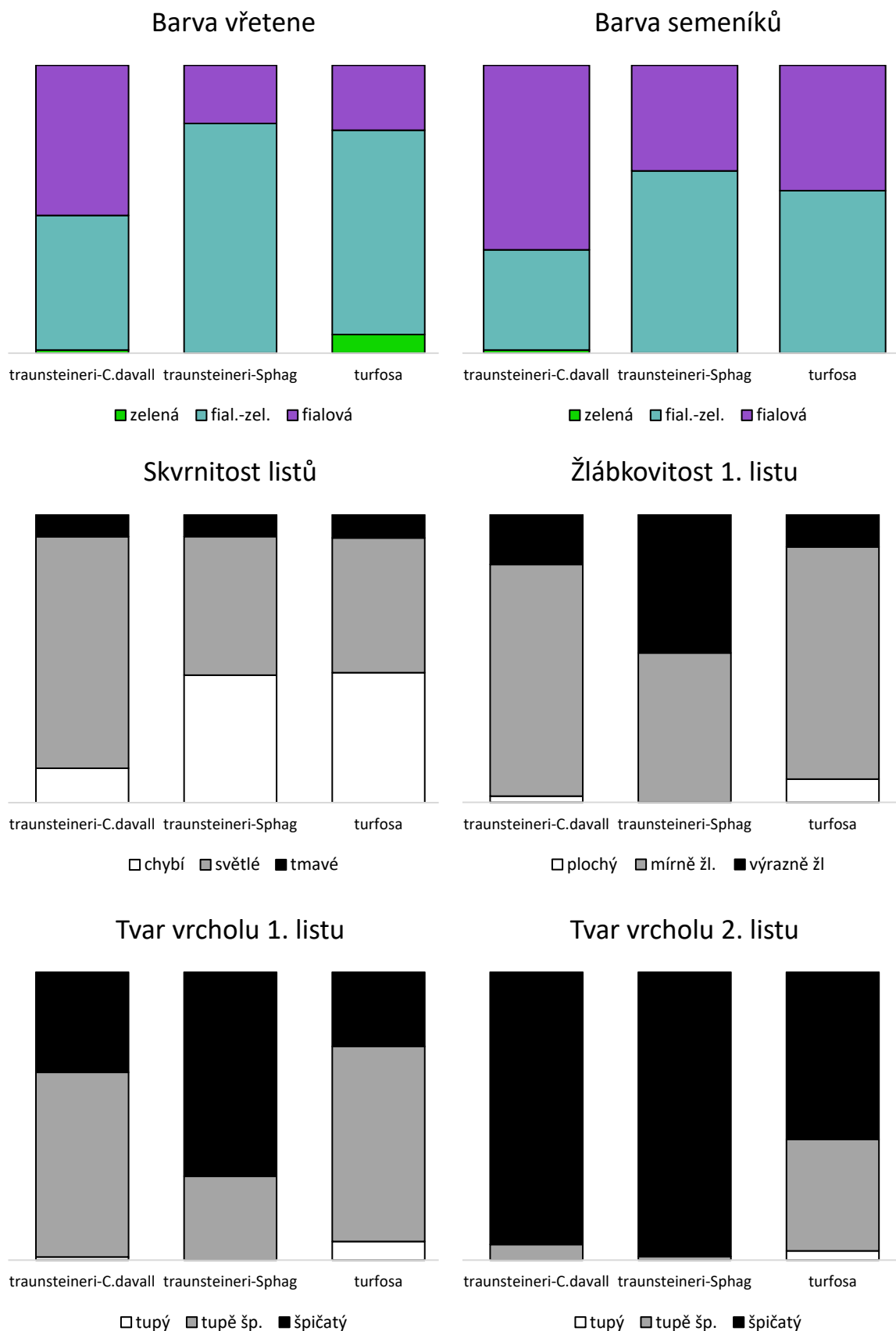
znak (jednotka)	<i>D. traunsteineri</i> - <i>C.davall</i> (n=92)		<i>D. traunsteineri</i> - <i>Sphag</i> (n = 79)		<i>D. *turfosa</i> (n = 62)		Kruskal-Wallisův test	
	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD	χ^2	P
Vys (mm)	290.68	54.72	320.46	71.87	280.76	80.77	13.76	< 0.01
Int_1 (mm)	30.34	14.73	37.75	17.10	32.81	14.49	7.75	< 0.05
Int_2 (mm)	50.54	18.57	55.90	18.55	48.81	18.58	4.77	0.092
Osa (mm)	51.76	16.35	55.57	17.06	53.10	17.56	3.20	0.201
poc_List (počet)	2.84	0.54	2.85	0.48	2.77	0.58	0.61	0.736
poc_List_ns (počet)	1.32	0.66	1.14	0.81	0.82	0.56	19.03	< 0.001
d_L1 (mm)	86.70	18.83	105.37	31.01	96.06	21.68	19.00	< 0.001
s_L1 (mm)	11.54	2.52	10.67	2.42	15.08	4.42	44.05	< 0.001
BN_L1 (mm)	37.72	11.86	41.99	14.21	50.26	15.68	25.74	< 0.001
uhel_L1 (stupně)	55.35	12.80	60.76	13.21	52.58	14.51	15.07	< 0.001
d_L2 (mm)	105.52	20.45	125.42	28.15	111.55	27.06	23.97	< 0.001
s_L2 (mm)	10.87	3.70	10.38	2.28	14.16	4.90	30.54	< 0.001
BN_L2 (mm)	36.86	14.91	41.80	14.45	46.95	21.08	11.04	< 0.01
uhel_L2 (stupně)	66.09	9.25	69.73	13.56	66.05	10.13	11.92	< 0.01
listen_2 (mm)	20.38	4.07	23.04	5.17	24.28	5.84	23.38	< 0.001
semenik_2 (mm)	12.70	1.55	14.30	1.83	14.53	2.17	43.18	< 0.001
s_lod (mm)	2.67	0.48	3.02	0.64	3.40	0.84	40.03	< 0.001
poc_kv_c (počet)	12.23	4.01	12.03	5.34	10.56	3.81	5.96	0.051
A (mm)	9.15	0.73	10.08	0.84	9.55	0.95	45.90	< 0.001
B (mm)	7.78	0.70	8.47	0.91	8.12	0.90	27.35	< 0.001
C (mm)	7.09	0.65	7.54	0.95	7.52	0.89	14.04	< 0.001
E (mm)	3.30	0.61	2.94	0.60	3.22	0.66	13.25	< 0.01
F (mm)	10.74	1.12	11.19	1.23	10.57	1.33	9.48	< 0.01
G (mm)	9.50	1.10	10.12	1.44	9.34	1.29	14.42	< 0.001
H (mm)	3.23	0.55	2.98	0.40	2.84	0.36	23.66	< 0.001
H-H_ind.	1.23	0.08	1.27	0.12	1.23	0.10	4.17	0.124
G/H	3.01	0.54	3.47	0.73	3.33	0.50	22.04	< 0.001
A-C/E	0.63	0.15	0.88	0.30	0.64	0.20	43.96	< 0.001
A-C/A	0.22	0.06	0.25	0.08	0.21	0.07	10.88	< 0.01
d_L1/s_L1	7.67	1.63	10.26	3.40	6.74	1.91	54.08	< 0.001
d_L2/s_L2	10.31	2.59	12.68	4.04	8.35	2.21	59.95	< 0.001
L2_ind.	0.58	0.29	0.53	0.23	0.80	0.46	15.86	< 0.001
grac_ind.	0.93	0.17	0.97	0.22	1.28	0.36	50.16	< 0.001
ind_hust	0.20	0.04	0.20	0.05	0.20	0.05	0.94	0.626

4. 4. 7. 2. Deskriptivní statistika kvalitativních znaků a χ^2 -test

Podobně jako pro kvantitativní znaky, byla i pro kvalitativní znaky zhotovena základní deskriptivní statistika, kterou shrnuje tabulka 15. Proveden byl také χ^2 -test, který odhalil vysoce významné rozdíly mezi taxony a ekotypy u téměř všech zjišťovaných znaků. Zvláště u znaků souvisejících se zbarvením se zde výrazně projevila podobnost rašelinného ekotypu a *D. *turfosa*, ve znacích týkajících se tvaru listů si byly pro změnu podobnější slatinný typ *D. traunsteineri* s *D. *turfosa*, viz Obr. 21.

Tab. 15: Počty jedinců v dané kategorii znaku pro sympatricky se vyskytující taxony *Dactylorhiza majalis/traunsteineri* agg. a výsledky Pearsonova χ^2 testu. Za signifikantní byly považovány výsledky s $P < 0,05$. Takovéto jsou v tabulce tučně zvýrazněny. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 2. n = velikost vzorku jedinců daného taxonu, χ^2 = hodnota testového kritéria, n = velikost vzorku jedinců daného taxonu, DF = stupně volnosti, P = pravděpodobnost shodnosti výběrů

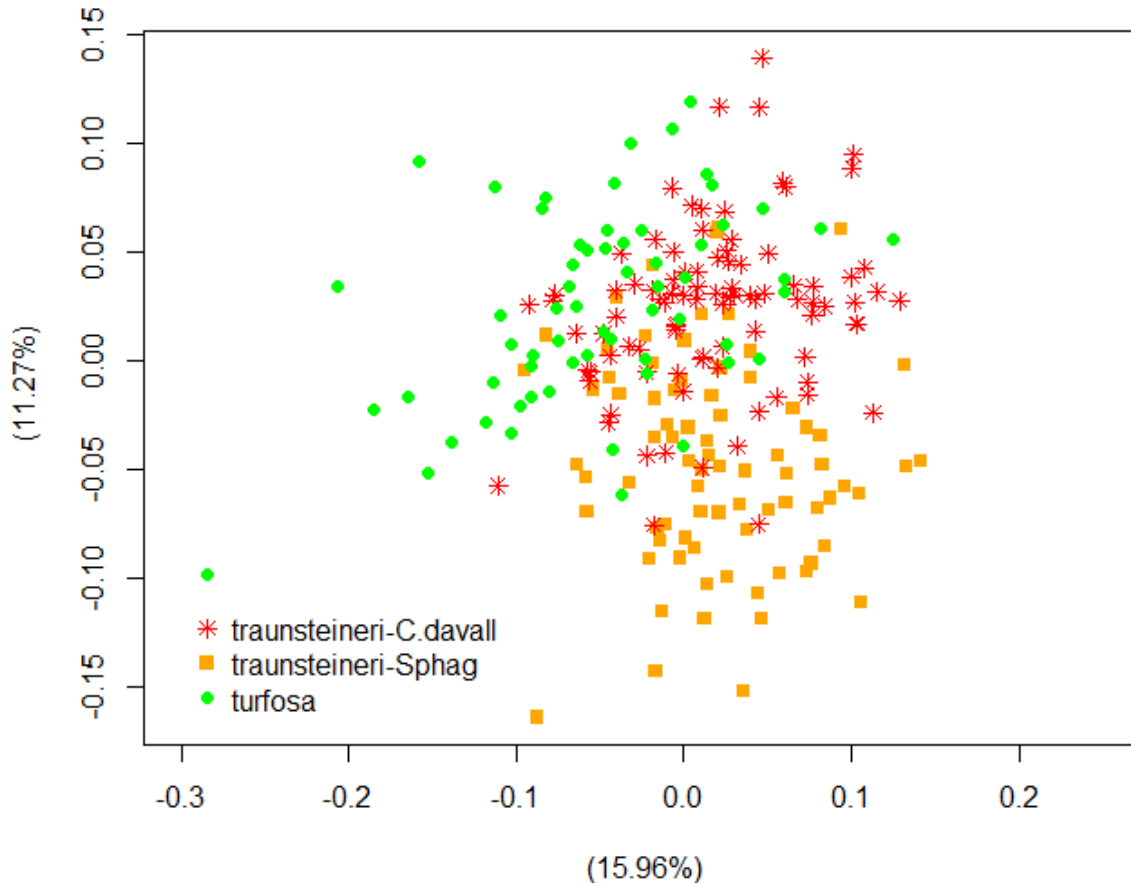
znak	<i>D. traunsteineri-C.davall</i> (n = 92)			<i>D. traunsteineri-Sphag</i> (n = 79)			<i>D. *turfosa</i> (n = 62)			χ^2 test		
	počet jedinců v kategorii									χ^2	DF	P
	kategorie			kategorie			kategorie					
	zelená	fial.-zel.	fialová	zelená	f.-zelená	fialová	zelená	fial.-zel.	fialová			
b_lod	91	1	0	91	1	0	62	0	0	1.54	2	0.463
b_vret	1	43	48	1	43	48	4	44	14	31.23	4	<0.001
b_sem	1	32	59	1	32	59	0	35	27	16.12	4	<0.01
b_listenu	1	63	28	1	63	28	0	46	16	2.18	4	0.702
	kategorie			kategorie			kategorie					
	chybí	světlé	tmavé	chybí	světlé	tmavé	chybí	světlé	tmavé			
skvrn	11	74	7	11	74	7	28	29	5	28.77	4	<0.001
	kategorie			kategorie			kategorie					
	ploché	mírně žl.	výrazně žl.	ploché	mírně žl.	výrazně žl.	ploché	mírně žl.	výrazně žl.			
zlab_L1	2	74	16	2	74	16	5	50	7	36.37	4	<0.001
zlab_L2	1	46	45	1	46	45	0	49	13	38.10	4	<0.001
	kategorie			kategorie			kategorie					
	zaoblený	tupě šp.	špičatý	zaoblený	tupě šp.	špičatý	špičatý	tupě šp.	zaoblený			
vrch_L1	1	59	32	1	59	32	16	42	4	39.79	4	<0.001
vrch_L2	0	5	87	0	5	87	36	24	2	57.75	4	<0.001
	kategorie			kategorie			kategorie					
	bledá	střední	kontrastní	bledá	střední	kontrastní	bledá	střední	kontrastní			
K_inten	0	48	44	0	48	44	9	48	5	46.09	4	<0.001
	kategorie			kategorie			kategorie					
	delší s.	zděli s.	kratší s.	delší s.	zděli s.	kratší s.	delší s.	zděli s.	kratší s.			
d_ost	1	65	26	1	32	59	1	19	42	49.23	4	<0.001



Obr. 21: Vizualizace vybraných kategoriálních znaků s vysoce signifikantními rozdíly mezi dvěma ekotypy *D. traunsteineri* a *D. *turfosa*. Výšky barevných sloupců odpovídají poměrnému výskytu dané hodnoty znaku u dané skupiny populací.

4. 4. 7. 3. Analýza hlavních koordinát (PCoA)

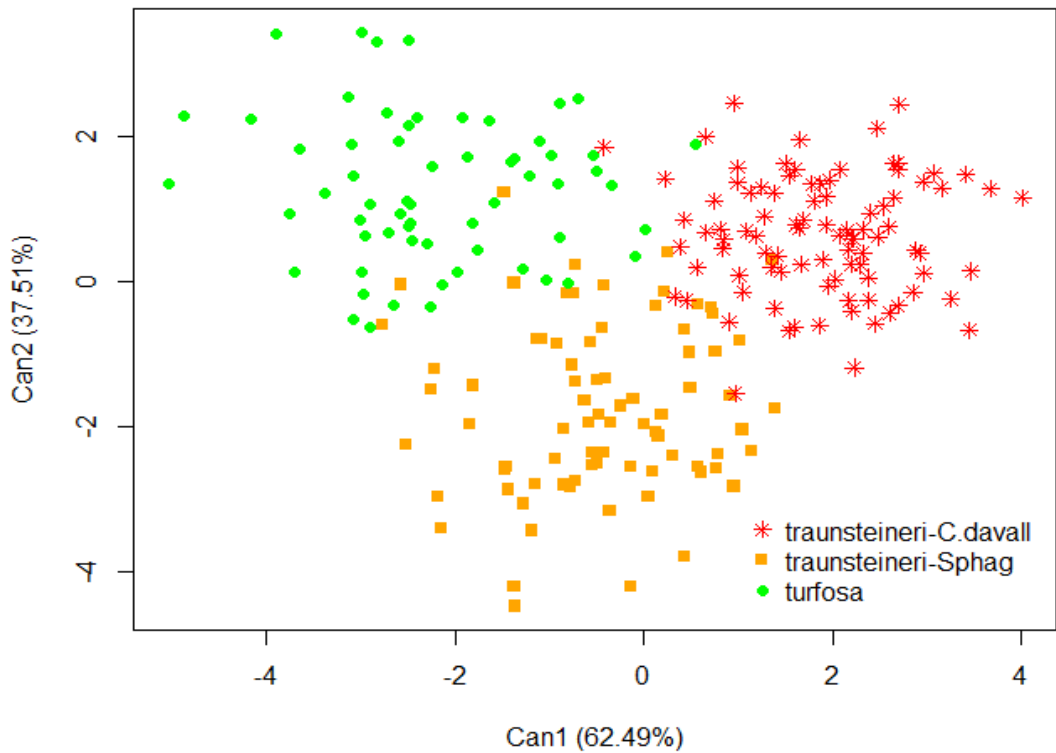
Po zjištění základních statistických charakteristik byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA). Podle té se od sebe oba ekotypy *D. traunsteineri* a *D. *turfosa* liší jen poměrně málo (Obr. 22). Podle první dvou os mnohazměrného prostoru je však viditelná jen poměrně malá část variability datasetu (viz popisky os). Podle nich se nejvíce vylišuje slatinný ekotyp *D. traunsteineri*, zatímco rašelinný ekotyp *D. traunsteineri* a taxon *D. *turfosa* se ve variabilitě jedinců výrazně překrývají. Poměrně výrazný překryv je ale i mezi jedinci slatinného ekotypu *D. traunsteineri* a zbytkem datasetu.



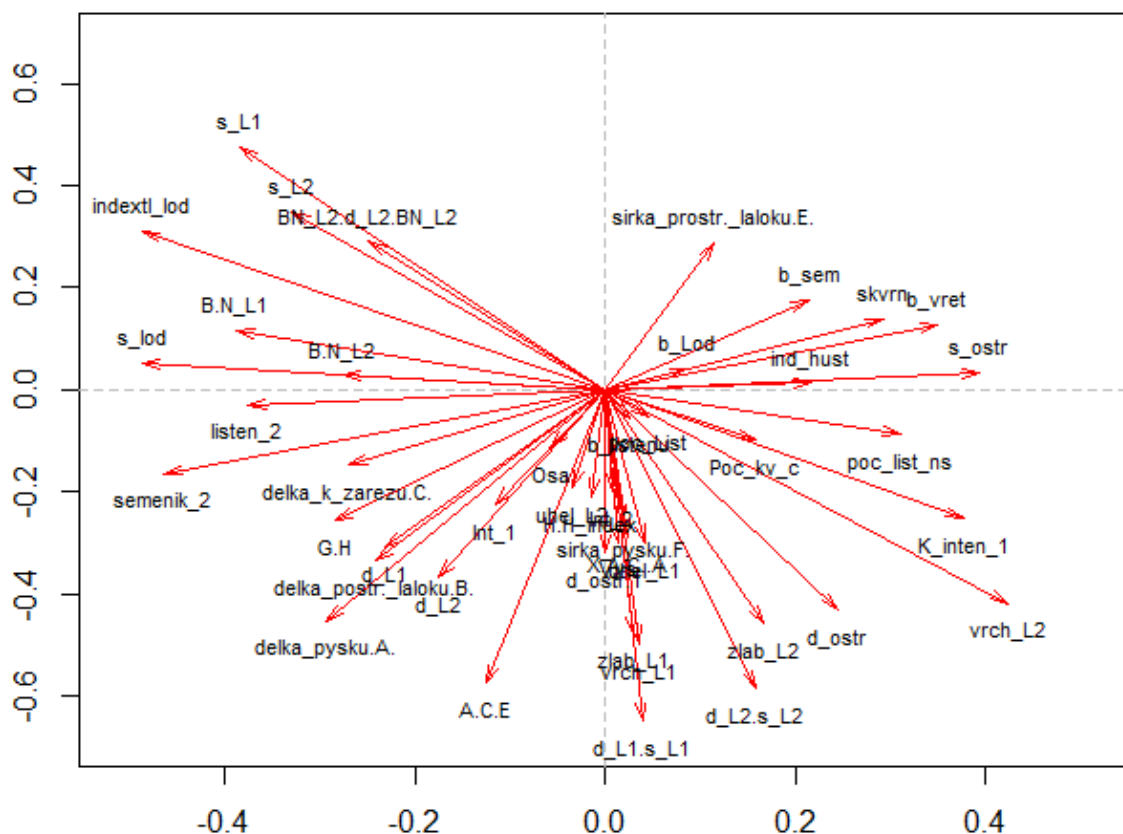
Obr. 22: Grafický výstup z analýzy hlavních koordinát (PCoA) pro taxony *D. *majalis*, *D. traunsteineri* a *D. *turfosa*. Názvy os udávají procento variability vysvětlené danou osou.

4. 4. 7. 4. Kanonická diskriminační analýza (CDA)

S cílem přesvědčivějšího odlišení porovnávaných skupin byla dále provedena i kanonická diskriminační analýza (CDA), která také umožňuje zjistit vliv jednotlivých znaků na uspořádání jedinců v mnohazměrném prostoru. Podle této analýzy se jednotlivé skupiny oddělují zřetelněji (Obr. 23). Trojice skupin tvoří ve dvojrozměrném prostoru cca rovnostranný trojúhelník, což znamená, že jsou si jednotlivé skupiny navzájem zhruba stejně podobné. Snad jen *D. *turfosa* je od obou zbývajících skupin trochu vzdálenější. Zdá se, že *D. *turfosa* leží přibližně na rozhraní variability obou ekotypů *D. traunsteineri*, přitom se však od obou některými svými znaky výrazněji odlišuje. Těmito znaky jsou zejména šířka 1. a 2. listu, index gracility, tvar vrcholu 2. listu a délka 2. semeníku (viz Obr. 24).



Obr. 23: Výsledek kanonické diskriminační analýzy (CDA) pro oba ekotypy *D. traunsteineri* a *D. *turfosa*. Názvy os udávají procento variability vysvětlené danou osou.



Obr. 24: Vliv jednotlivých měřených znaků na rozložení jedinců obou ekotypů *D. traunsteineri* a *D. *turfosa* v rámci CDA. Čím je šipka u daného znaku delší, tím má tento znak větší vliv na odlišení taxonů v rámci CDA. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 2.

5. DISKUZE

5. 1. Variabilita ve velikosti genomu a její význam pro klasifikaci prstnaticů z okruhu *D. majalis/traunsteineri*

Relativní velikost genomu téměř u všech analyzovaných rostlin odpovídala tetraploidnímu stavu v literatuře uváděnému pro taxony z okruhu *D. majalis/traunsteineri* (Eriksson et al. 2022). Pouze dvojice jedinců původně (na základě morfologie) přiřazených k druhu *D. traunsteineri* z lokalit Ettaler Mühle a Marnbach vykazovala poměr píků odpovídající předpokládanému DNA-triploidnímu stavu. Takovýto stav zřejmě vznikl v důsledku hybridizace jedince druhu *D. traunsteineri* s jedním z diploidních druhů (*D. incarnata*, *D. maculata* subsp. *fuchsii*), které se na obou zmíněných lokalitách vyskytovaly. Hybridizace je u rodu *Dactylorhiza* častým fenoménem, který na společných lokalitách většího počtu druhů tohoto rodu vede k obtížné determinaci mnoha jedinců (Lord et Richards 1977, Aagard et al. 2005, Ståhlberg 2009). I při našich návštěvách lokalit zkoumaných taxonů byly pravidelně nalézány zřejmě hybridní rostliny intermediárního vzhledu. Jedna rostlina druhu *D. traunsteineri* z lokality Záhvozdí byla s největší pravděpodobností DNA-hexaploidní. Pravděpodobnou příčinou vzniku tohoto stavu je však patrně autopolyploidie, která u taxonů rodu *Dactylorhiza* není příliš vzácným jevem (Taraška et al. 2021; 2024) a v evoluční historii rodu hrála zásadní roli (Bertolini et al. 2000, Pillon et al. 2007, Ståhlberg et Hedrén 2010).

Nejvyšší relativní velikost genomu byla zjištěna u *D. *turfosa*, která je zpravidla považována za hybridogenní taxon s pravděpodobnými rodiči *D. *majalis* a *D. traunsteineri* (Eccarius 2016). U hybridů, potažmo hybridogenních taxonů lze obvykle očekávat intermediární hodnoty velikosti genomu oproti jejich rodičům/rodičovským taxonům, jelikož ti poskytují potomkům právě polovinu své genetické informace (např. Bureš et al. 2004; Marques et al. 2012). Stejný fenomén byl navíc pozorován i přímo u rodu *Dactylorhiza*, kde může sloužit k poměrně snadné determinaci hybridních jedinců, jejichž rodičovské taxony mají různou velikost genomu (Lamla 2022). Vyšší hodnoty velikosti genomu u *D. *turfosa* oproti *D. *majalis* a *D. traunsteineri* jsou tak v nesouladu s hypotézou, že tento taxon (*D. *turfosa*) vznikl jejich hybridizací. Je však možné, že u něj vlivem genetické izolace a specifických stanovištních podmínek došlo k takovým změnám v genomu, díky kterým je možné ho od obou předpokládaných rodičovských taxonů na základě velikosti genomu odlišit. Nelze také vyloučit možnost, že se u populací tohoto taxonu ve značné míře projevují jako u jiných zástupců alotetraploidního komplexu *D. traunsteineri/majalis* epigenetické změny (Paun et al. 2010; Eriksson et al. 2022), které mohou výrazněji ovlivnit i zjištěné hodnoty velikosti genomu. Výsledek této analýzy tak naznačuje, že v případě *D. *turfosa* se nejedná o primárního hybridu, resp. nedávno vzniklý hybridní roj předpokládaných rodičovských druhů, nýbrž o relativně ustálený taxon.

Dalším zajímavým poznatkem je oproti všem ostatním zkoumaným taxonům signifikantně nižší hodnota relativní fluorescence u slatinných populací *D. traunsteineri* (zde označovaných *D. traunsteineri*-C.davall). Tento významný rozdíl zřejmě poukazuje na nezávislý vývoj obou ekotypů tohoto taxonu a pravděpodobně také na omezený genový tok mezi slatinnými a rašelinnými populacemi *D. traunsteineri*. Za zmínku stojí zejména přiřazení rostlin z populace „Na Volešku“ (VOL) k slatinným populacím *D. traunsteineri* nejen na základě fytoecologie ale právě také relativní fluorescence zjištěné průtokovým cytometrem. To by mohlo naznačovat, že výskyt taxonu na této lokalitě má původ právě v předalpských populacích, a nikoliv v mnohem bližších populacích šumavských. Tato populace tak mohla snad vzniknout v důsledku disperze na velkou vzdálenost, které jsou zástupci čeledi Orchidaceae schopni pomocí svých drobných semen (Givnish et al. 2016) a která byla prokázána na základě genetických dat i u evropských zástupců rodu *Dactylorhiza* (Hedrén et al. 2018). Nelze však také vyloučit možnost, že lokalita „Na Volešku“ byla v minulosti propojena se zbytkem areálu slatinné *D. traunsteineri* v předalpi řadou dalších, dnes již zaniklých lokalit. Ostatně biotop slatin byl minimálně na území jižních a západních Čech v minulosti zřejmě mnohem rozšířenější, což dosvědčují i četné historické sběry druhů (nikoliv však *D. traunsteineri*) vázaných na slatiny z této oblasti (např. Čelakovský 1876; Vaněček 1969; Procházka 1998).

Menší velikost genomu u slatinných populací *D. traunsteineri* může mít mimo taxonomických důsledků i adaptivní význam. Je známo, že u rostlin vyskytujících se na živinami chudých stanovištích (typicky například masožravých rostlin; Veleba et al. 2020) může jednou z adaptací být právě snížená velikost genomu, který je jinak bohatý na dusíkaté sloučeniny (Kang et al. 2015). Takovouto adaptací by ale šlo očekávat spíše u rašelinných populací *D. traunsteineri*, jelikož právě tato stanoviště jsou známa svým nízkým obsahem dusíkatých látek. Možný adaptivní význam různé přibližné velikosti

genomu u zkoumaných taxonů tak zůstává neobjasněn a jeho budoucí studium by mohlo přinést zajímavé poznatky související s ekologií nejen druhu *D. traunsteineri*.

5. 2. Stanovištní preference taxonů alotetraploidního komplexu

D. majalis/traunsteineri a její taxonomické důsledky

Ekologie všech taxonů, u nichž byla charakterizována metodou fytoocenologického snímkování a na základě pH odebraných vzorků půdy se shodovala s údaji uváděnými v literatuře (Kubát 2010, Eccarius 2016).

Pro populace označované jako *Dactylorhiza lapponica* byla zjištěna silná afinita k vápnitým slatišti svazu *Caricion davallianae*, což odpovídá preferencím tohoto taxonu ve střední Evropě známým z literatury (Delforge 2006). Vegetaci snímkových ploch odpovídalo také relativně vyšší pH zjištěné u odebraného substrátu. Rostliny přiřazené k tomuto taxonu se vždy vyskytovaly na společných lokalitách s *D. majalis* subsp. *majalis*, jejíž jedinci s typickým habitem rostli ve vyšší vegetaci, na místech méně ovlivněných vývěry minerálně bohatých vod. Naopak právě na stanovištích vápnitou vodou silně ovlivněných, s vegetací jen málo zapojenou se nacházely typicky drobné, silně pigmentované rostliny, jež bylo nutné v souladu s určovací literaturou (Ponert 2019) označovat spíše jako *D. lapponica*. Mezi oběma typy však na lokalitách existovaly plynulé přechody v podobě jedinců sdílejících znaky obou těchto domnělých taxonů. Tato situace byla zaznamenána na všech pěti navštívených lokalitách údajně *D. lapponica* a jistě vede k zamyšlení, je-li tento taxon v oblasti střední Evropy skutečně zastoupen, nebo zda se jedná pouze o fenotypem atypické jedince *D. majalis* subsp. *majalis* rostoucí na (pro tento druh) extrémních, minerálně bohatých prameništích vždy spolu s rostlinami *D. majalis* subsp. *majalis* typického vzezření. Zejména na lokalitě „Troják“ (TRO), ale i na ostatních navštívených lokalitách, kde se má *D. lapponica* (subsp. *rhaetica*) vyskytovat, byli jedinci tohoto druhu vybíráni v podstatě z populací *D. majalis* subsp. *majalis* jen na základě arbitrárně stanovených znaků (dle Ponert 2019), čemuž následně odpovídají i výsledky morfometrické studie (viz níže). Údaje o výskytu *D. lapponica* na Moravě tak zřejmě vznikají jako důsledek morfologické konvergence *D. majalis* subsp. *majalis* ke skutečné *D. lapponica*, za níž jsou pak některé populace (resp. některé rostliny v těchto populacích) mylně považovány. Stanovištní podmínky mohou silně ovlivnit vzhled i geneticky shodných rostlinných jedinců (Gratani 2014), a to obzvláště, pokud jde o tak fenotypově plastickou skupinu, jakou je alotetraploidní komplex *D. majalis/traunsteineri*. Zdá se tedy pravděpodobnější, že malý vzrůst rostlin považovaných v ČR za *D. lapponica* je vysvětlitelný jako reakce na nízkou konkurenci na minerálně extrémních stanovištích s nedostatkem živin. Podobnou diferenciaci ve velikosti jedinců v závislosti na charakteru stanoviště lze ostatně často zaznamenat také u jiných druhů r. *Dactylorhiza*, např. *D. maculata* nebo *D. incarnata* (vlastní pozorování). Silná tmavofialová pigmentace listů, lodyh i květů u jedinců označovaných jako *D. lapponica* je také spíše projevem variability fenotypu způsobené indukovanou ochranou před UV zářením (viz např. Mahdavian et al. 2008). I bez genetických dat nebo přesazovacích experimentů, které je v případě vstavačovitých obzvláště komplikované úspěšně provést (mykorrhiza, status zákonem chráněných rostlin) a které by tyto hypotézy mohly podpořit či vyvrátit, se zdá být pravděpodobné, že *D. lapponica* není ve zkoumaném území svébytným taxonem ale pouze ekotypem *D. majalis* subsp. *majalis* vyskytujícím se na poměrně extrémních biotopech minerálně bohatých výslunných pramenišť svazu *Caricion davallianae*.

Taxon *D. majalis* subsp. *turfosa* byl ve své stanovištní preferenci také uniformní. Na všech navštívených lokalitách se vyskytoval ve vegetaci přechodových rašelinišť svazu *Sphagno-Caricion canescentis*, což odpovídá typu vegetace uváděnému v Delforgeho monografii (2006), nikoliv však vegetaci zmíněné v původním popisu taxonu. Procházka uvádí *D. *turfosa* z lokalit s vegetací svazu *Sphagnion medii* Kästner & Flössner 1933 (dnes známou pod jménem *Sphagnion magellanicum* Kästner & Flössner 1933) odpovídající kontinentálním a subkontinentálním vrchovištím. Tento rozdíl lze vysvětlit možnými změnami ve složení vegetačního krytu na lokalitách *D. *turfosa* ale také odlišným přístupem ke klasifikaci vegetace (přístup založený na osobní expertíze v případě Procházky a částečně formalizovaná klasifikace pomocí expertního systému v této studii). Na rozdíl od výše zmíněné *D. lapponica* se však na těchto lokalitách nevyskytoval nikdy společně s jiným taxonem alotetraploidního komplexu, z dalších druhů rodu *Dactylorhiza* byl tento taxon jen občas doprovázen *D. maculata* subsp. *fuchsii*, se kterou zde *D. *turfosa* vzácně hybridizuje (vlastní pozorování). Ačkoliv se na některých lokalitách vyskytovaly v menším množství i rostliny, které by bylo možné přiřadit k nominálnímu poddruhu *D. majalis*, jde v tomto případě nejspíš o pro rod *Dactylorhiza* typickou

fenotypovou plasticitu (např. Taraška et al. 2024), kdy je na populace potřeba nahlížet jako na celek a vyhnout se klasifikaci jednotlivých atypických exemplářů.

Poněkud zajímavější situace byla zaznamenána u *D. traunsteineri*. Ta se má v oblasti střední Evropy vyskytovat podle Delforgeho (Delforge 2006) i Eccaria (Eccarius 2016) na bazických slatinách, což je však v rozporu se situací na jeho *locus classicus*, protože místní vegetace odpovídá svazu *Sphagno-Caricion canescentis*. Kubát (2010) však v Květeně ČR uvádí jako typické stanoviště nevápnité rašelinné louky až přechodová rašeliniště. Rostliny odpovídající morfologickému popisu *D. traunsteineri* byly nalezeny na obou těchto typech stanovišť, která se někdy nacházela jen ve vzdálenosti jednotek kilometrů od sebe. Lokality s odlišným typem vegetace se lišily také zjištěným pH substrátu, které bylo vyšší u slatin svazu *Caricion davallianae* s méně zapojeným mechovým patrem tvořeným vícero druhy mechorostů (*Aulacomnium palustre* (Hedw.) Schwägr., *Palustriella comutata* (Hedw.) Ochyra, *Scorpidium cossonii* (Schimp.) Hedenäs, atd.) a naopak nižší na lokalitách s výskytem mechorostů rodu *Sphagnum* L., které často tvořily dominantu vegetačního pokryvu. Jelikož výskyt na takto odlišných stanovištích může mít v delším časovém měřítku významný vliv na evoluci nových taxonů z ekotypů (Schafer et Wolf 2013).

5. 3. Variabilita v načasování kvetení u taxonů alotetraploidního komplexu *D. majalis/traunsteineri* a její možný vliv na speciaci

Pro charakteristiku fenologie zkoumaných taxonů bylo použito porovnání s referenčními taxony rodu *Dactylorhiza* (*D. majalis* subsp. *majalis* a *D. maculata* subsp. *fuchsii*), které se s analyzovanými taxony často vyskytují na společných lokalitách a porovnání s nimi tak dokáže eliminovat vliv mikroklimatických a sezónních vlivů, které působí na téže lokalitě na oba porovnávané taxony stejně. Přesnější a hodnotnější by jistě byla charakteristika fenologie pomocí sledování počátku a délky jednotlivých fenofází, což by však vyžadovalo mnoho opakovaných návštěv lokalit a bylo proto vzhledem k jejich velké vzájemné vzdálenosti technicky obtížně proveditelné. Námi zvolená metoda výpočtu indexu z podílu počtu odkvetlých květů, kvetoucích květů a pupat a následný výpočet rozdílu tohoto indexu od obdobně získaných hodnot pro referenční taxon se ukázala jako užitečná, zvláště pokud je mezi kvetením porovnávaných taxonů alespoň určitý překryv. Pokud je fenologie jednoho z taxonů natolik posunutá, že začne rozkvétat až poté, co je již druhý taxon úplně odkvetlý, ztrácí rozdíl indexů získaných touto metodou částečně svou vypovídací hodnotu. Podobně problematická může být interpretace tohoto rozdílu v případě, kdy je návštěva lokalita provedena v době, kdy jeden z porovnávaných taxonů teprve rozkvétá a druhý je ještě daleko před rozkvětem.

5. 3. 1. Porovnání s *Dactylorhiza maculata* subsp. *fuchsii*

Při porovnání studovaných populací s *D. maculata* subsp. *fuchsii* nabýval rozdíl indexů u všech taxonů kladných hodnot, což znamená, že tyto kvetou dříve než referenční taxon. Pouze u některých jedinců druhu *D. traunsteineri* (bez ohledu na konkrétní populaci, viz výše) byly hodnoty rozdílu u některých jedinců blízké nule, či dokonce mírně záporné, což dokazuje, že má tento druh poměrně pozdní fenologii, která se blíží referenčnímu taxonu.

Ačkoliv se údajná *D. lapponica* podle získaných výsledků ve fenologii signifikantně neliší od *D. traunsteineri*, jde v tomto případě s největší pravděpodobností o artefakt použité metody, vzniklý v důsledku relativně brzké návštěvy lokalit, kdy jedinci považovaní za *D. lapponica* nebyli ještě v plném květu. Kdyby byly lokality navštíveny například s dvoutýdenním zpožděním, hodnoty tohoto rozdílu by byly výrazně vyšší, jelikož zatím co *D. lapponica* by již tou dobou odkvétala, *D. maculata* subsp. *fuchsii* by teprve začínala rozkvétat. Z tohoto důvodu nejsou fenologická data získaná z moravských lokalit údajné *D. lapponica* směrodatná a z grafu porovnávacího fenologii taxonů okruhu *D. majalis/traunsteineri* (Obr. 4) nelze vyvodit, že jedinci populací označovaných jako *D. lapponica* mají shodnou fenologii s oběma ekotypy *D. traunsteineri*. Zajímavá jsou však data získaná z lokality Spitzingsee v německých Alpách. Ta se nachází v poměrně vysoké nadmořské výšce (cca 1100 m n. m.) a navíc ve hlubokém údolí nedaleko ledovcového jezera, kde lze v průběhu celé vegetační sezóny očekávat nižší teploty, než u moravských lokalit údajné *D. lapponica*. Tomu odpovídá i zjištěná fenologie místní tzv. *D. lapponica*, která se v souladu se zkrácenou vegetační periodou podle očekávání posouvá do nejteplejší části roku. Je známo, že ve vyšších nadmořských výškách je kvetení rostlin koncentrováno do teplejších částí vegetační sezóny (Inouye et Wielgolaski 2013, Schieber 2014) a druhy, které tak v nižších polohách kvetou v rozdílnou dobu tak mohou kvést synchronně.

Kvetení *D. traunsteineri* bylo nezávisle na ekotypu nejbližší taxonu *D. maculata* subsp. *fuchsii*. Zde je zajímavá velká variabilita hodnot fenologického indexu ($x = 0.28$, $SD = 0.41$), která je zřejmě důsledkem rozdílného vlivu podmínek prostředí na různé taxony. Mohla by být způsobena také podobným jevem, jako u výše zmíněné *D. *lapponica*, kdy populace z vyšších poloh spíše kvetou ve stejnou dobu jako referenční taxon, než populace z nižších poloh. Navštívené lokality *D. traunsteineri* se však nacházely v jen malém rozpětí nadmořských výšek (620-850 m n. m.) a tak se zdá být toto vysvětlení nepravděpodobné. Ve fenologii obou ekotypů *D. traunsteineri* nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl.

V porovnání s *D. maculata* subsp. *fuchsii* měla nejvíce dopředu posunutou fenologii *D. *turfosa*. Ta, ač se vyskytuje v poměrně vysokých nadmořských výškách a nehostinném prostředí, byla často ještě i před rozkvetem *D. maculata* subsp. *fuchsii* již téměř úplně odkvetlá. Vysvětlením tohoto výrazného posunu však může mimo ekologických a genetických faktorů být i atypická vegetační sezóna 2022, kdy byly lokality tohoto taxonu navštíveny a byla zjišťována jejich fenologie. Meteorologické jevy v průběhu vegetační sezóny mohou mít na fenologie nejen prstnaticů poměrně značný vliv (B. Trávníček, ústní sdělení). V roce 2022 bylo jaro poměrně teplé, a jedinci *D. *turfosa* tak vykvetly cca o 10 dní dříve, než bývá obvyklé. Po jejich rozkvetu ovšem následovalo asi týdenní velmi chladné období, doprovázené i přízemními mrazíky, které rostliny a především jejich generativní orgány částečně poškodilo a urychlilo jejich odkvétání. Referenční *D. maculata* subsp. *fuchsii* přestála toto celé období ve stádiu poupatek a došlo tak u ní pouze k určitému posunu ve fenologii. Efekt této atypické sezóny se mohl projevit i u výše zmiňované *D. traunsteineri* a mohl být jednou z příčin zjištěné velké variability ve fenologii (ačkoliv zde byla většina dat získána během sezóny 2023).

5. 3. 2. Porovnání s *Dactylorhiza majalis* subsp. *majalis*

Porovnání s *D. majalis* subsp. *majalis* bylo provedeno pro *D. lapponica* a oba ekotypy *D. traunsteineri*. Taxon *D. *turfosa* nebylo možné s nominálním poddruhem srovnat, jelikož se nevyskytují na společných lokalitách.

Hodnoty průměrného rozdílu indexu pro *D. lapponica* byly blízké nule, což naznačuje jeho shodnou fenologii s *D. majalis* subsp. *majalis*. Shodná doba kvetení v kombinaci se společným výskytem na lokalitách naznačuje vysokou pravděpodobnost křížení v rámci jedné panmiktické populace, navzdory tomu že dosud chybí potvrzení tohoto jevu pomocí genetických dat. Jde tak o další argument, jež zpochybňuje výskyt *D. lapponica* minimálně v oblasti východní Moravy a Bavorských Alp.

Naopak druh *D. traunsteineri*, ačkoliv se často vyskytoval na lokalitách společně s *D. majalis* subsp. *majalis*, se od něj výrazně odlišoval svou fenologií. Na rozdíl od srovnání s *D. maculata* subsp. *fuchsii*, při tomto srovnání oba ekotypy nevykazovaly nijak velkou variabilitu, přičemž příčina tohoto rozdílu ve variabilitě by mohla být menší variabilita v nadmořských výškách lokalit, z nichž byla data o fenologii *D. traunsteineri* ve srovnání s *D. *majalis* získána oproti lokalitám s *D. traunsteineri* a *D. maculata* subsp. *fuchsii*, které ležely ve větším rozpětí nadmořských výšek a mohl se tak u nich silněji projevit efekt zkrácení sezóny (viz výše). Hodnoty rozdílu indexů obou taxonů jsou výrazně záporné a v průměru dosahují až hodnot nižších než -1, což znamená, že většina jedinců v populacích obou ekotypů *D. traunsteineri* rozkvétá až poté, co jsou již všechny rostliny *D. majalis* subsp. *majalis* na lokalitě odkvetlé. To je poměrně zásadní zjištění, které by mohlo poukazovat na klíčovou vlastnost (odlišnost ve fenologii), jež je zodpovědná za reprodukční izolaci obou taxonů, které mají podobný allotetraploidní původ (z rodičovských taxonů *D. incarnata* a *D. maculata* s. lat.) a tedy i podobnou genovou výbavu (Hedrén 1996). Reprodukční bariéra v podobě rozdílné fenologie je mechanismem, který může vést k diferenciaci a speciaci i v případě sympatrie (Taylor et Friesen 2017, Osmolovsky et al. 2022). Tato diferenciaci může oběma taxonům dokonce poskytovat adaptivní výhodu, například v souvislosti s jejich opylovací strategií. Zástupci rodu prstnatec mají tzv. šálivé květy, které jsou pro hmyz nápadné a díky přítomnosti ostruhy vypadají, jako by měly obsahovat nektar (Claessens et Kleynen 2011). Ten však přítomen není a rostliny jsou tak odkázány pouze na nezkušenost opylovačů, kteří květy opakovaně navštěvují. Tato nezkušenost však logicky klesá s populační hustotou jedinců rostlin využívajících tuto strategii a pro druhy se šálivými květy proto může být výhodné, aby své kvetení rozprostřely do co nejdelšího období. Ačkoliv se oba taxony v oblast Alp liší i geneticky (Balao et al. 2016), tato rozdílnost sama o sobě zřejmě není dostatečně silná ke vzniku reprodukční bariéry. Asi i proto lze navzdory výraznému rozdílu ve fenologii na společných lokalitách nalézt rostliny intermediárního vzhledu, které jsou pravděpodobně hybridního původu. Alespoň na námi navštívených lokalitách byly ale takové rostliny vždy v menšině a zdá se tedy, že je to právě fenologie, která slouží jako hlavní bariéra proti splynutí obou taxonů. S touto hypotézou je v souladu i fakt, že zatímco ve

vyšších polohách Šumavy jsou si *D. majalis* subsp. *majalis* a *D. traunsteineri* svou fenologií poměrně blízké a mohou tak příležitostně dát vzniknout hybridním jedincům, kteří se mohou dál nezávisle vyvíjet a speciovat (*D. *turfosa*), v bavorském Předalpi mají oba taxony fenologii výrazně odlišnou a ke vzniku hybridů zde tak dochází jen velmi vzácně.

Ekotypy *D. traunsteineri* se od sebe ve fenologii nijak neliší a k jejich izolaci, na kterou poukazují výsledky karyologické analýzy, tak historicky zřejmě přispěla hlavně jejich odlišná ekologie.

5. 4. Morfologická variabilita taxonů alotetraploidního komplexu *D. majalis/traunsteineri* ve střední Evropě

5. 4. 1. *Dactylorhiza curvifolia*

Morfologie tohoto v oblasti suboceanické střední Evropy dnes již vyhynulého taxonu byla zkoumána pouze na základě herbarizovaného materiálu uloženého v herbáři Univerzity Karlovy (PRC). Morfometrická analýza na základě herbářového materiálu přináší hned několik úskalí. Jedním z nich je omezený počet vzorků jedinců, který nemusí dostatečně reprezentovat celkovou variabilitu jedinců v původní populaci. Dalším je vliv sušení na hodnoty kvantitativních, a především kategoriálních znaků zjišťovaných z herbarizovaného materiálu. Je například vysoce pravděpodobné, že vlivem sušení došlo k určitým změnám v rozměrech květů a tloušťce lodyhy. Stejně tak intenzitu pigmentace všech orgánů rostlin je ze suchého materiálu možné pouze odhadovat. Tyto fakty je třeba mít na paměti při interpretaci porovnání morfologie 9 jedinců z lokality Soos u Františkových lázní se zbytkem studovaných (živých) rostlin alotetraploidního komplexu *D. majalis/traunsteineri*.

Rostliny *D. curvifolia* se od ostatních taxonů odlišovaly na první pohled velmi úzkou lodyhou a listy, což je v rozporu s literaturou, podle které by tento taxon měl naopak relativně široké listy a tlustou lodyhu (Delforge 2006, Eccarius 2016). Dalšími znaky, kterými se tyto rostliny lišily od zbytku studovaných taxonů byly kvantitativní charakteristiky pysku, které taktéž vykazovaly výrazně menší hodnoty. Ve zbytku znaků se již rostliny z lokality Soos podobaly drobnějším exemplářům druhu *D. traunsteineri*. To se projevilo v mnohazměrných analýzách, které při zahrnutí všech zjišťovaných znaků (tedy i kategoriálních) nedokázaly rostliny ze Soosu od zbytku komplexu odlišit a řadily je někde na pomezí rašelinných a slatinných populací *D. traunsteineri*. Poněkud odlišná byla situace při použití datasetu ochuzeného o kategoriální znaky. V těchto analýzách se již jedinci z lokality Soos od ostatních taxonů zřetelně lišili, jak však vyplývá z grafického znázornění vlivu jednotlivých znaků na rozložení jedinců v mnohazměrném prostoru, bylo to způsobeno především znaky měřenými na pysku květu, které mohly být značně ovlivněny procesem herbarizace a které navíc nejsou klíčové pro odlišení *D. curvifolia* od nejbližší *D. traunsteineri* (Delforge 2006, Eccarius 2016).

5. 4. 2. *Dactylorhiza lapponica*

Z mnohazměrných analýz provedených na základě celého datového souboru je zřejmé, že se rostliny označované v literatuře jako *D. lapponica* oddělují spolu s jedinci *D. majalis* subsp. *majalis* od zbytku souboru taxonů. Hlavními znaky, které k tomuto odlišení přispívají, jsou odlišné hodnoty indexů charakterizujících tvar 1. a 2. listu, gracilitu rostlin a hustota květenství.

V rámci CDA měly na odlišení největší vliv znaky související s absolutní velikostí vegetativních orgánů rostlin, naopak znaky související s velikostí generativních orgánů a tvarem vegetativních i generativních orgánů přispívaly k odlišení jen slabě. Velikost vegetativních orgánů je však tradičně špatným znakem pro odlišení taxonů a rozdíly mezi jedinci v tomto typu znaků jsou způsobeny spíše selekcí provedenou na základě předem známých kritérií ještě před měřením, než reálným, taxonomicky významným rozdílem. Jak již bylo uvedeno v kapitole o ekologii rostlin, mohou být tyto rozdíly umocněny i stanovištními podmínkami, kdy se drobné a chudokvěté rostliny nejčastěji vyskytují na nejextrémnějších místech bazických pramenišť. Jelikož k tomuto taxonu z oblasti Alp a střední Evropy prakticky neexistuje literatura, která by uváděla lokality tohoto taxonu, nelze vyloučit, že část populací označovaných jménem *D. lapponica* ve skutečnosti spadá do variability *D. *majalis*. Databáze AHO-Bayern uvádí výskyt *D. lapponica* v jižním Bavorsku jako poměrně hojný a je tedy možné, že jsou v tomto prostoru za *D. lapponica* naopak považovány i některé formy *D. traunsteineri*. Tato problematika však jistě vyžaduje další studium.

5. 4. 3. *Dactylorhiza traunsteineri*

Navzdory svému rozsáhlému areálu je *D. traunsteineri* ve střední Evropě značně vzácným taxonem vázaným svým výskytem na reliktní biotopy, rašelinné a slatinné louky a mokřady s nenarušeným vodním režimem (Eccarius 2016). Oba zde odlišené ekotypy (viz kap. 4. 2.) se částečně liší svou morfologií, i když v rámci celkové variability analyzovaných populací jsou si relativně blízké. Oba ekotypy se poměrně výrazně liší od *D. *majalis* (a domnělé *D. lapponica*), poněkud podobnější tomuto druhu jsou populace ze slatinných lokalit *D. traunsteineri*. Větší podobnost byla zaznamenána oproti *D. *turfosa*, pro kterou je *D. traunsteineri* jedním z předpokládaných rodičů (Eccarius 2016). Zásadními znaky, které oba ekotypy *D. traunsteineri* od jim podobné *D. *turfosa* odlišují jsou index délky 2. listu, šířka 1. listu a celá řada znaků charakterizujících velikost a proporce pysku. Z morfometrických analýz tak vyplývá, že při posouzení celkové variability populace je *D. traunsteineri* poměrně dobře odlišitelným taxonem od zbytku alotetraploidního komplexu ve střední Evropě.

Oba ekotypy *D. traunsteineri* se nápadně liší v mnoha kvantitativních znacích, mimo jiné například v délce listů a listenů a v šířce lodyhy, ale také ve znacích na generativních orgánech, jako jsou velikost a tvar květů. Právě znaky související s tvarem listů by kromě fixace v rámci náhodných mikroevolučních procesů (genetický drift, bottle-neck efekt) mohly mít i určitý adaptivní význam. Analogická situace byla popsána u příbuzného druhu *D. maculata*, jehož poddruh *Dactylorhiza maculata* subsp. *averyanovii* Jagiełło, který osídluje ze všech středoevropských poddruhů *D. maculata* nejvíce kyselá a oligotrofní stanoviště (rašelinné lesy a přechodová rašelinště) současně v rámci infrataxonů druhu *D. maculata* představuje typ s relativně (v poměru k jejich délce) nejužšími listy (Taraška et al. 2024). Obzvláště dlouhé dolní listy u rašelinného ekotypu *D. traunsteineri* jako u *D. maculata* subsp. *averyanovii* by mohly být odpovědí na během vegetační sezóny rychle rostoucí rašeliník a s tím se zhoršující dostupnost světla. Výrazné rozdíly byly zaznamenány také v proporcí výskytu některých kategoriálních znaků u obou ekotypů. Z nich mezi nejvýraznější patří vyšší míra pigmentace lodyhy pod květenstvím a výrazně častější výskyt silně žlábkovitých a špičatých nejdolejších listů u rašelinného ekotypu. Údajům uváděným v literatuře (Procházka 1979; Kubát 2010; Ponert 2019) poněkud odporuje zjištěný vysoký podíl rostlin s bledě a částečně i výrazně skvrnitými listy u obou ekotypů. Neskvrnitost listů, zdá se, není u *D. traunsteineri* pravidlem a neměla by tedy být uváděna jakožto jeden z klíčových determinacních znaků tohoto taxonu.

Navzdory řadě dílčích morfologických znaků, v nichž se oba ekotypy liší, je kanonická diskriminační analýza spolehlivě oddělit nedokázala. Rašelinný ekotyp podle ní nabývá pro většinu kvantitativních znaků vyšších hodnot, což lze u vegetativních znaků vysvětlit snazší dostupností vody na rašelinných lokalitách v době kvetení prstnatic, a tedy i bujnější vegetací, se kterou musí rostliny svou výškou soupeřit. Odlišnou velikost a tvar květů je však tímto způsobem obtížné vysvětlit, a tyto rozdíly tak pravděpodobně mají genetickou podstatu. I zde lze hypotetizovat o adaptivním významu těchto rozdílů, jelikož velikost a tvar květů může mít prostřednictvím lákání opylovačů silný vliv na úspěšnost reprodukce a bývá na ni proto vyvíjen silný selekční tlak (Delph et Herlihy 2012; Souto-Vilarós et al. 2018).

5. 4. 4. *Dactylorhiza majalis* subsp. *turfosa*

Dactylorhiza majalis subsp. *turfosa* je nejvíce podobná druhu *D. traunsteineri* v jeho širším pojetí (zahrnujícím slatinné i rašelinné populace). Hlavními znaky přispívajícími k odlišení *D. *turfosa* od *D. traunsteineri* jsou větší šířka listů a tloušťka lodyhy u *D. *turfosa*, což souhlasí s údaji uváděnými v určovacích klíčích (Kubát 2010, Ponert 2019). Z kategoriálních znaků přispívá k rozdělení významněji pouze tvar vrcholu 2. listu, který je u *D. *turfosa* oproti *D. traunsteineri* méně často výrazně špičatý. Porovnání trojice taxonů vyskytujících se sympatricky a v minulosti dost možná i na společných lokalitách v oblasti jižních Čech u řady kvantitativních a kategoriálních znaků potvrdilo intermediární postavení taxonu *D. *turfosa* mezi *D. majalis* a *D. traunsteineri*. Podle některých analýz se však *D. *turfosa* zdá být výrazně morfologicky bližší k *D. traunsteineri* než k *D. majalis*. Podobně jako u *D. traunsteineri*, také u *D. *turfosa* je možné na základě zde prezentovaných dat zpochybnit v literatuře (Procházka 1982, Kubát 2010, Ponert 2019) často uváděný charakteristický znak tohoto taxonu – neskvrnité listy. Ačkoliv byl u tohoto taxonu podíl neskvrnitých jedinců v populacích nejvyšší mezi všemi analyzovanými taxony, nedosahoval ani 50 % a informace uváděné v určovacích klíčích by tak bylo na místě popravit.

Ostatní znaky uváděné Procházkou (Procházka 1982) v protologu potvrzeny byly, je však na místě se ještě pozastavit nad odlišením *D. *turfosa* od značně podobné *D. traunsteineri*, respektive obou ekotypů tohoto taxonu. Procházka uvádí jako klíčové znaky *D. *turfosa* oproti *D. traunsteineri* menší

výšku rostlin, kratší délku nejdelšího (obvykle 2.) listu, místo největší šířky listů (v polovině délky vs. u báze), úhel přisedání listů na lodyhu, barvu listů a délku a hustotu květenství. Data získaná v rámci této práce však jednoznačnost morfologického odlišení obou taxonů nepotvrzují. Výška rostlin byla sice průměrně větší u *D. traunsteineri*, než u *D. *turfosa*, podobně jako u délky 2. listu byl však tento rozdíl jen poměrně drobný. S Procházkovým popisem se shoduje také poloha nejširšího místa listu, opět je však rozdíl jen poměrně malý (v 1/3 u *D. traunsteineri*, v 1/2 u *D. *turfosa*). Dobrým znakem naopak nejsou úhel odklonu listů od lodyhy ani délka a hustota květenství. Ve všech těchto znacích se oba taxony prakticky neliší, a navíc vykazují velkou variabilitu. Za výrazně lepší znaky pro odlišení lze považovat některé kategoriální znaky, jako tvar vrcholu 2. listu, který je u *D. traunsteineri* výrazně častěji špičatý, nebo pigmentaci okvětí, která je u *D. traunsteineri* velmi často silně kontrastní.

Z porovnání s oběma ekotypy *D. traunsteineri* vyplývá, že rostliny *D. *turfosa* stojí morfologicky někde na pomezí variability obou ekotypů, řadou znaků se od nich však odlišují. Není tedy snadné odhadnout, je-li *D. *turfosa* jednomu z ekotypů vývojově bližší. Pomoc ve vyřešení této otázky by snad mohly nabídnout molekulárně genetické metody, které však při porovnání různých alotetraploidů vzniklých ze stejných rodičovských taxonů mohou poskytovat rozporuplné výsledky (např. Balao et al. 2016).

5. 5. Taxonomické závěry

Tato studie přinesla některé nové poznatky o karyologii, ekologii, fenologii a morfologii taxonů alotetraploidního komplexu *D. majalis/traunsteineri* v oblasti střední Evropy. Jelikož se některá tato zjištění neshodují s dosud přijímaným vymezením některých taxonů tohoto komplexu, pojednává tato kapitola o návrzích na změny, které by tyto nové poznatky lépe reflektovaly. Základní morfologickou, karyologickou, ekologickou a fenologickou charakteristiku jednotlivých zkoumaných taxonů shrnuje tabulka 16.

Dactylorhiza curvifolia nebyla na území dnešní České republiky dlouho rozlišována. Teprve koncem 70. let 20. stol. k tomuto taxonu Procházka (1979) přiřadil populaci z lokality Soos, která byla dříve označována jako *D. traunsteineri* (např. Domin 1925). Tou dobou však již byla tato populace zaniklá a Procházka ji tak studoval pouze na základě herbářového materiálu. K výše uvedenému taxonomickému závěru jej dovedl především fakt, že rostliny z této populace měly skvrnité listy, zatímco druh *D. traunsteineri* by podle tohoto autora měl mít výhradně neskvřité listy. Jak je však dnes zřejmé (např. Eccarius 2016), existuje mnoho populací *D. traunsteineri*, zvláště na slatinných biotopech (viz dále), v nichž se často vyskytují rostliny s alespoň bledě skvrnitými listy. Dalším Procházkovým argumentem pro oprávněnost klasifikace *Dactylorhiza curvifolia* jako svébytného druhu je fakt, že by pro druh *D. curvifolia* měl být charakteristický DNA-hexaploidní chromozomový počet ($2n = 120$) uvedený ve Vermeulenově monografii z roku 1947 (Vermeulen 1947). Toto tvrzení je však chybné, a i rostliny dnes považované za *D. curvifolia* mají pro komplex typický tetraploidní, a nikoliv hexaploidní chromozomový počet a samotná existence druhu *D. curvifolia* je tak stále předmětem studia (Andersson 1994; Nordström et Hedrén 2008). Procházka se dále zmiňuje o tvaru podzemních hlíz a počtu prstovitých laloků na něž jsou hlízy děleny. Pro *D. curvifolia* by podle něj měly být typické rostliny se dvěma laloky hlízy, které byly taktéž zaznamenány na lokalitě Soos, naproti tomu pro *D. traunsteineri* mají být typické rostliny s troj- až čtyřlaločnými hlízami. V tomto případě však jde o vegetativní znak, který jistě více souvisí s vitalitou konkrétních jedinců a stanovištními podmínkami než s jejich taxonomickou příslušností. Vzhledem k extrémním pedologickým poměrům panujícím na lokalitě Soos zde je možné očekávat výskyt rostlin s mírně atypickým fenotypem.

Ačkoliv nebylo ze zřejmých důvodů možné zkoumat karyologii a fenologii taxonu *D. curvifolia* na jeho jediné historické české lokalitě, dovoluji si v návaznosti na výše uvedené skutečnosti tvrdit, že druh *D. curvifolia* se na území České republiky nikdy nevyskytoval a v případě rostlin z lokality Soos je lepší se přiklonit k původnímu Dominovu (1925) určení jakožto *D. traunsteineri*. Vztah této zaniklé populace k oběma ekotypům *D. traunsteineri* by však měl být předmětem budoucího studia.

Dactylorhiza lapponica je z území střední Evropy uváděna teprve poměrně krátce (Vlčko et al. 2003), někdy v poddruhu *D. lapponica* subsp. *rhaetica* (Ponert 2019), který byl popsán teprve v roce 2005 na základě materiálu z jižního Tyrolska.

Zjištěná neexistence rozdílů v jinak tradičně taxonomicky významných znacích, jako jsou tvary vegetativních orgánů a velikost a tvar generativních orgánů v kombinaci s argumentací založenou na karyologii, ekologii a fenologii nutně vede k závěru, že rostliny udávané minimálně z území ČR (ale velmi pravděpodobně i dalších oblastí střední Evropy) pod jménem *Dactylorhiza lapponica* nejsou ničím jiným než ekotypem druhu *D. majalis* subsp. *majalis* vyskytujícím se na silně bazických, často

pěnovcových prameništích. Je však možné, že se rostliny, které by měly být správně klasifikovány jako *D. lapponica* ve střední Evropě vyskytují, protože by bylo namístě provést srovnávací studii, jejíž součástí bude morfometrické srovnání střeoevropských populací s populacemi z *area classica* taxonu *D. lapponica* subsp. *lapponica* ve Skandinávii, stejně jako s populacemi *D. lapponica* subsp. *rhaetica* ze severní Itálie.

Dactylorhiza traunsteineri je taxonem s rozsáhlým areálem rozprostírajícím se od západní Francie až do polárních oblastí Skandinávie a evropského Ruska (Eccarius 2016; Kirillova et Kirilov 2023).

V oblasti střední Evropy existují dva morfologicky poněkud odlišné ekotypy druhu *Dactylorhiza traunsteineri*. Pokud se u nich uplatňuje genetická izolace, způsobená prostorovou izolací populací vázaných na odlišné biotopy, je nanejvýš pravděpodobné, že budou oba, zatím jen obtížně morfologicky odlišitelné typy dále divergovat. Na základě poznatků o jejich karyologii, ekologii a částečně i morfologii se však zdá, že jde o dnes již poměrně odlišné biologické entity, jimž by snad mohl náležet některý z ranků hierarchické klasifikace (např. var., nebo subsp.). Vztah zejména slatinných populací *D. traunsteineri* k ostatním taxonům alotetraploidního komplexu by však měl být předmětem dalšího studia.

Z výsledků zde provedené morfometrické analýzy i ze znalostí o rozšíření taxonů *D. *turfosa*, *D. traunsteineri* a *D. majalis* se zdá být pravděpodobné, že taxon *D. *turfosa* vznikl historicky křížením obou výše zmíněných druhů a následně se specializoval na podmínky vysokých poloh Šumavy. Vzhledem ke zjištěnému rozdílu v částečné relativní míře fluorescence mezi *D. *turfosa* a zbytkem taxonů dnes již možná mezi nimi ke genovému toku nedochází a *D. *turfosa* je tak zřejmě svébytným taxonem. V případě použití konceptu úzkých druhů v rámci alotetraploidního komplexu *D. majalis/traunsteineri* (sensu Delforge 2006) by bylo vhodné taxon *D. *turfosa* klasifikovat na druhové úrovni jako *Dactylorhiza turfosa* comb. nov., případně jej vzhledem k morfologické afinitě k *D. traunsteineri* uvádět navzdory originální diagnóze jako poddruh *D. traunsteineri* pod jménem *Dactylorhiza traunsteineri* subsp. *turfosa* (F. Proch.) Kreutz.

Tab. 16: Souhrn zkoumaných taxonů a jejich charakteristik. Údaje převzaté z literatury (Procházka 1982, Chytrý et al. 2007, Chytrý et al. 2011) jsou označeny hvězdičkou. „Částečná relativní fluorescence“ odkazuje na průměr hodnot poměrů vůči standardu *Pisum sativum* 'Ctirad' (2C = 9.09 pg; Doležel et al. 1998) zjištěný při použití barviva DAPI. V buňkách je za hodnotou průměru uvedena hodnota směrodatné odchylky.

taxon	<i>Dactylorhiza curvifolia</i>	<i>Dactylorhiza lapponica</i> sensu auct. bohem. (Ponert 2019, etc.)	<i>Dactylorhiza majalis</i> subsp. <i>majalis</i>	<i>Dactylorhiza traunsteineri</i> (rašelinný typ)	<i>Dactylorhiza traunsteineri</i> (slatinný typ)	<i>Dactylorhiza majalis</i> subsp. <i>turfosa</i>
relativní fluorescence	nezjištěna	1.4738 ± 0.0176	1.4738 ± 0.0194	1.4481 ± 0.0188	1.4802 ± 0.0228	1.4974 ± 0.0028
ekologie	*přechodová rašeliniště	slatiny a slatinná bazická prameniště sv. <i>Caricion davallianae</i>	*vlhké louky, mokřady a prameniště sv. <i>Caricion davallianae</i> , <i>Sphagno warnstorffii-Tomentypnion nitentis</i> , <i>Molinion caeruleae</i> a <i>Calthion palustris</i>	přechodová rašeliniště sv. <i>Sphagno-Caricion canescentis</i> , vzácněji i jiné typy vlhkomilné rašelinné vegetace	slatinné louky sv. <i>Caricion davallianae</i>	přechodová rašeliniště sv. <i>Sphagno-Caricion canescentis</i>
fenologie	*v květu od půli června do začátku července	v květu od počátku května do počátku července, zároveň s <i>D. majalis</i> subsp. <i>majalis</i>	v závislosti na nadmořské výšce a průběhu vegetační sezóny v květu od počátku května do počátku července, cca měsíc před <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>fuchsii</i>	v závislosti na nadmořské výšce a průběhu vegetační sezóny v květu od půli června do počátku července, cca tři týdny po <i>D. majalis</i> subsp. <i>majalis</i> a týden před <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>fuchsii</i>	v závislosti na nadmořské výšce a průběhu vegetační sezóny v květu od půli června do počátku července, cca tři týdny po <i>D. majalis</i> subsp. <i>majalis</i> a týden před <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>fuchsii</i>	v závislosti na nadmořské výšce a průběhu vegetační sezóny v květu od půli června do počátku července, cca dva týdny po <i>D. majalis</i> subsp. <i>majalis</i> a dva týdny před <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>fuchsii</i>
morfologické znaky pro odlišení od ostatních taxonů komplexu	viz odlišení <i>D. traunsteineri</i> subsp. <i>traunsteineri</i> od ostatních taxonů komplexu	viz odlišení <i>D. majalis</i> subsp. <i>majalis</i> od ostatních taxonů komplexu a vnitrodruhová variabilita tohoto taxonu	Od obou poddruhů <i>D. traunsteineri</i> se liší pomocí širokých listů, které jsou téměř vždy skvrnité, mnohokvětého hustého květenství a tlusté, duté (smáčkutelné) lodyhy	od <i>D. *turfosa</i> se liší tenčími lodyhami, od <i>D. *majalis</i> (zahrnující <i>D. lapponica</i>) výrazně užšími listy, drobným vzrůstem, malým počtem větších květů, od slatinného typu podle větších květů, delších a užších listů, které jsou častěji žlábkovité a méně často skvrnité	od <i>D. *turfosa</i> se liší tenčími lodyhami, od <i>D. *majalis</i> (zahrnující <i>D. lapponica</i>) výrazně užšími listy, drobným vzrůstem, malým počtem větších květů, od rašelinného typu podle menších květů, kratších a poněkud širších, tupěji zakončených listů, které jsou méně často žlábkovité a často bledě skvrnité	od <i>D. traunsteineri</i> se liší tlustšími lodyhami, od <i>D. *majalis</i> (zahrnující <i>D. lapponica</i> sensu auct. bohem.) výrazně užšími listy, drobným vzrůstem, malým počtem větších květů
vnitrodruhová variabilita	nezaznamenána	viz variabilita <i>D. majalis</i> subsp. <i>majalis</i>	velká variabilita ve výšce, délce listů, počtu květů a celkové pigmentaci rostlin v závislosti na výskytu na různých typech stanovišť	poměrně malá morfologická variabilita v kvantitativních znacích na vegetativních orgánech a ve intenzitě zbarvení okvěti	poměrně malá morfologická variabilita v kvantitativních znacích na vegetativních orgánech	především v rozměrech vegetativních orgánů, značná variabilita také ve skvrnitosti listů
výskyt v oblasti střední Evropy	V oblasti se tento taxon zřejmě nikdy nevyskytoval.	V oblasti se tento taxon zřejmě nikdy nevyskytoval.	a vhodných biotopech místy stále roztroušený až hojný taxon	vzácně v severním podhůří Alp a velice vzácně v Pošumaví	vzácně v severním podhůří Alp a velice vzácně v Pošumaví	velmi vzácně ve vysokých polohách centrální Šumavy

6. ZÁVĚR

V oblasti střední Evropy (severní předhůří Alp, Šumava a Pošumaví, východní Morava) bylo morfologicky, fenologicky a cytologicky charakterizováno celkem 330 jedinců taxonů alotetraploidního komplexu *Dactylorhiza majalis/traunsteineri*.

Nejvýznamnějšími poznatky vyplývajícími z této práce jsou:

1. *D. curvifolia* se pravděpodobně na území ČR nikdy nevyskytovala a její jediná domnělá populace z historické lokality SOOS by měla být přiřazena k *Dactylorhiza traunsteineri*. Vztah k ekologicky diferencovaným typům tohoto taxonu by však měl být předmětem dalšího studia.
2. Taxon *D. lapponica* se v oblasti východní Moravy nevyskytuje a zřejmě ani nikdy nevyskytoval a populace z pěnokových pramenišť, které jsou dnes pod tímto jménem uváděny, spadají do variability *Dactylorhiza majalis* subsp. *majalis*, která je právě díky výskytu na těchto relativně extrémních biotopech značná. Taxonomická příslušnost a vztah některých předalpských populací k tomuto severskému taxonu by však měl být obsahem dalších vědeckých prací.
3. Provedena byla revize znaků, jimiž je možné odlišit poddruh *Dactylorhiza *turfosa* od jeho pravděpodobných evolučních předků, tedy *Dactylorhiza traunsteineri* a *Dactylorhiza majalis* subsp. *majalis*. Z té vyplývá, že ačkoliv je *D. *turfosa* morfologicky výrazně bližší k *D. traunsteineri*, je i vzhledem k odlišné relativní velikosti genomu možné uvažovat nad klasifikací tohoto taxonu jako samostatné mikrospecie alotetraploidního komplexu *D. majalis/traunsteineri*. I tato otázka by si však zaslouhovala další studium, zvláště pak s ohledem na neznámé fylogenetické vztahy celé skupiny v kontextu výskytu dvou ekotypů *D. traunsteineri* v nedalekých Alpách a bavorském Předalpí.
4. Potvrzena byla existence dvou ekologicky, karyologicky a částečně i morfologicky odlišných typů *Dactylorhiza traunsteineri* v předalpské oblasti a na Šumavě. Tyto ekotypy se mohou při pokračující reprodukční izolaci dále diferencovat, v současnosti by jim však vzhledem k jen malé morfologické diferenciaci bylo vhodné přiřadit některý z nižších ranků hierarchické klasifikace, např. varietu.

7. CITACE

- Aagaard S. M. D., Sástad S. M., Greilhuber J. & Moen, A. (2005) A secondary hybrid zone between diploid *Dactylorhiza incarnata* ssp. *cruenta* and allotetraploid *D. lapponica* (*Orchidaceae*). – *Heredity* 94: 488–496.
- Aida J. (2016) Russowi sörmkäpa (*Dactylorhiza russowii*) geneetilise varieeruvuse ning liigi identiteeti [Genetic variation and species identity of *Dactylorhiza russowii*]. – Dipl. thesis, University of Tartu, Tartu, available from: <https://core.ac.uk/reader/79114370> (cit. 25.7.2024).
- Andersson E. (1994) On the identity of orchid populations: a morphometric study of the *Dactylorhiza traunsteineri* complex in eastern Sweden. – *Nordic Journal of Botany* 14: 269–275.
- Balao F., Tannhäuser M., Lorenzo M. T., Hedrén M. & Paun O. (2016) Genetic differentiation and admixture between sibling allopolyploids in the *Dactylorhiza majalis* complex. – *Heredity* 116: 351–361.
- Batoušek P. & Kreutz C. A. J. (1999) *Dactylorhiza traunsteineri* (Sauter) Soó subsp. *carpatica*—eine neue *Dactylorhiza*-Unterart aus den Weißen Karpaten (Bílé Karpaty) in der Tschechischen Republik. – *Journal Europäischer Orchideen* 31: 678–702.
- Bertolini V., Del Prete C. & Garbari F. (2000) Karyological and biometrical studies on some species of the genus *Dactylorhiza* Necker ex Nevski, sect. *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*) of Central-Northern Italy. – *Portugaliae Acta Biologica*, 19: 249–266.
- Brandrud M. K., Baar J., Lorenzo M. T., Athanasiadis A., Bateman R. M., Chase M. W., Hedrén M. & Paun O. (2020) Phylogenomic relationships of diploids and the origins of allotetraploids in *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*). – *Systematic Biology* 69: 91–109.
- Bureš P., Wang Y. F., Horová L. & Suda J. (2004). Genome size variation in Central European species of *Cirsium* (*Compositae*) and their natural hybrids. – *Annals of Botany*, 94: 353–363.
- Businský R. (1989) *Dactylorhiza bohémica*—nový druh objevený v severních Čechách [*Dactylorhiza bohémica*—a new species discovered in northern Bohemia]. – *Preslia* 61: 289–314.
- Claessens J. & Kleynen J. (2011) The Flower of the European Orchid. Form and Function. – J. Claessens & J. Kleynen.
- Čelakovský L. (1883) Prodrómus květeny české Vol. 4. [Prodrómus of the Czech flora Vol. 4.] – Archiv přírodovědného výzkumu Čech, Praha, 677–944.
- De Hert K., Jacquemyn H., Van Glabeke S., Roldán-Ruiz I., Vandepitte K., Leus L. & Honnay O. (2011) Patterns of hybridization between diploid and derived allotetraploid species of *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*) co-occurring in Belgium. – *American Journal of Botany* 98: 946–955.
- De Hert K., Jacquemyn H., Van Glabeke S., Roldán-Ruiz I., Vandepitte K., Leus L. & Honnay O. (2012) Reproductive isolation and hybridization in sympatric populations of three *Dactylorhiza* species (*Orchidaceae*) with different ploidy levels. – *Annals of Botany* 109: 709–720.
- Delph L. F. & Herlihy C. R. (2012) Sexual, fecundity, and viability selection on flower size and number in a sexually dimorphic plant. – *Evolution* 66: 1154–1166.

- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M. A., Nardi L. & Obermayer R. (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. – *Annals of Botany* 82: (Suppl. A): 17–26.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (eds) (2007): *Flow cytometry with plant cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Domin K. (1925) O variabilitě vstavače úzkolistého (*Orchis traunsteineri* Saut.) na novém českém nalezišti [About the variability of *Orchis traunsteineri* Saut. at a new Czech site]. – *Věstník královské české společnosti nauk* 9: 1–9.
- Eccarius W. (2016) *Die Orchideengattung Dactylorhiza. Phylogenie, Taxonomie, Morphologie, Biologie, Verbreitung, Ökologie und Hybridisation* [The orchid genus *Dactylorhiza*. Phylogeny, Taxonomy, Morphology, Biology, Distribution, Ecology and Hybridisation]. – W. Eccarius, Eisenach.
- Eriksson M. C., Mandáková T., McCann J., Temsch E. M., Chase M. W., Hedrén, M., Weiss-Schneeweiss H. & Paun O. (2022). Repeat dynamics across timescales: A perspective from sibling allotetraploid marsh orchids (*Dactylorhiza majalis* sl). – *Molecular biology and evolution* 39.
- Gathoye J. L. & Tyteca D. (1987) Étude biostatistique des *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*) de Belgique et des territoires voisins [Biostatistical study of *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*) in Belgium and neighbouring regions]. – *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique/Bulletin van de Nationale Plantentuin van België*: 389–424.
- Givnish T. J., Spalink D., Ames M., Lyon S. P., Hunter S. J., Zuluaga A., Doucette A., Caro G. G., McDaniel J., Clements M. A., Arroyo M. T. K., Endara L., Kriebel R., Williams N. H. & Cameron K. M. (2016) Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. – *Journal of Biogeography* 43: 1905–1916.
- Gratani L. (2014) Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. – *Advances in botany* 2014: 208747.
- Grulich V. (2012) Red List of vascular plants of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 631–645.
- Hedrén M. (1996) Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*): evidence from allozyme markers. – *Plant Systematics and Evolution* 201: 31–55.
- Hedrén M., Nordström S. & Ståhlberg D. (2012) Geographical variation and systematics of the tetraploid marsh orchid *Dactylorhiza majalis* subsp. *sphagnicola* (*Orchidaceae*) and closely related taxa. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 168: 174–193.
- Hedrén M. & Olofsson S. N. (2018) High levels of genetic diversity in marginal populations of the marsh orchid *Dactylorhiza majalis* subsp. *majalis*. – *Nordic Journal of Botany* 36: njb-01747.
- Hedrén M., Olofsson S. N. & Paun, O. (2018) Orchid colonization: multiple parallel dispersal events and mosaic genetic structure in *Dactylorhiza majalis* ssp. *lapponica* on the Baltic island of Gotland. – *Annals of botany* 122: 1019–1032.
- Hennekens S. M. & Schaminée J. H. (2001) TURBOVEG, a comprehensive data base management system for vegetation data. – *Journal of vegetation science* 12: 589–591.
- Hřibová E., Holušová K., Trávníček P., Petrovská B., Ponert J., Šimková H., Kubátová B., Jersáková J., Čurn V., Suda J., Doležel J. & Vrána J. (2016) The enigma of progressively partial endoreplication: new

insights provided by flow cytometry and next-generation sequencing. – *Genome Biology and Evolution* 8: 1996–2005.

Chytrý M. (ed.) (2007) *Vegetace České republiky 1. Travninná a keříčková vegetace* [Vegetation of the Czech Republic 1. Grassland and heathland vegetation]. – Academia, Praha.

Chytrý M. (ed.) (2011) *Vegetace České republiky 3. Vodní a mokřadní vegetace* [Vegetation of the Czech Republic 3. Aquatic and wetland vegetation]. – Academia, Praha.

Chytrý M., Tichý L., Boublík K., Černý T., Douda J., Hájek M., Hájková P., Hédli R., Kočí M., Krahulec F., Kučera T., Landucci F., Láníková D., Lososová Z., Navrátilová J., Petřík P., Preislerová Z., Řezníčková M., Roleček J., Sádlo J., Šumberová K., Vítková & M. Zelený, D. (2020) *CzechVeg-ESy: Expert system for automatic classification of vegetation plots from the Czech Republic*. – Zenodo, URL: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3605562>

Inda L. A., Pimentel M. & Chase M. W. (2010) Chalcone synthase variation and phylogenetic relationships in *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*). – *Botanical Journal of the Linnean Society* 163: 155–165.

Inouye D. W. & Wielgolaski F. E. (2013) Phenology at high altitudes. – In: Schwartz M. D. (ed.), *Phenology: An integrative environmental science*. 249–272, Springer Netherlands, Dordrecht.

Jacquemyn H., van der Meer S. & Brys R. (2016) The impact of hybridization on long-term persistence of polyploid *Dactylorhiza* species. – *American Journal of Botany* 103: 1829–1837.

Kang M., Wang J. & Huang H. (2015) Nitrogen limitation as a driver of genome size evolution in a group of karst plants. – *Scientific Reports* 5: 11636.

Kantor A. (2019) *Okruh Dactylorhiza incarnata a jeho medzidruhové hybridy v strednej Európe: morfológická a cytotypová variabilita* [The *Dactylorhiza incarnata* complex and its interspecies hybrids in central Europe: Morphological and cytotype variability]. Dipl. thesis. Palacký University in Olomouc, Faculty of Science, Olomouc. available from: <https://theses.cz/id/8kblai/>

Kaplan Z., Danihelka J., Šumberová K., Chrtek J. J., Rotreklová O., Ekrt L., Štěpánková J., Taraška V., Trávníček B., Prančl J., Ducháček M., Hroneš M., Koblrová L., Horák D. & Wild J. (2017) Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 5. – *Preslia* 89: 333–439.

Kirillova I. A. & Kirillov D. V. (2023) Living at the Edge: A Comparative Study of the Central and Marginal Populations of *Dactylorhiza traunsteineri* (*Orchidaceae*) in the European Northeast of Russia. – *Moscow University Biological Sciences Bulletin* 78: 82–88.

Kreutz C. A. J. (2004) *Kompendium der Europäischen Orchideen/Catalogue of European Orchids*. – Landgraaf, Netherlands.

Kubát K. (2010) *Dactylorhiza* Nevski – prstnatec. – In: Štěpánková J., Chrtek J. & Kaplan Z. (eds.), *Květena České republiky* 8: 502–523, Academia, Praha.

Lamla F. (2022) *Morfometrická a karyologická analýza vybraných populací Dactylorhiza maculata agg. v Západních Karpatech* [Morphological and karyological analysis of chosen populations of *Dactylorhiza maculata* agg. in Western Carpathians]. Bach. thesis. Palacký University in Olomouc, Faculty of Science, Olomouc. available from: <https://theses.cz/id/wk8d8m/>.

Larsen T. A., Goodsell D. S., Cascio D., Grzeskowiak K. & Dickerson R. E. (1989) The structure of DAPI bound to DNA. – *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 7: 477–491.

- Lord R. M. & Richards A. J. (1977) A hybrid swarm between the diploid *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó and the tetraploid *D. purpurella* (T. & TA Steph.) Soó in Durham. – *Watsonia* 11: 205–210.
- Mahdavian K., Kalantari K. M., Ghorbanli M. & Torkzade M. (2008) The effects of salicylic acid on pigment contents in ultraviolet radiation stressed pepper plants. – *Biologia Plantarum* 52: 170–172.
- Marques I., Nieto Feliner G., Martins-Loução M. A. & Fuertes Aguilar J. (2012) Genome size and base composition variation in natural and experimental *Narcissus* (*Amaryllidaceae*) hybrids. – *Annals of Botany* 109: 257–264.
- Metzing D., Garve E., Matzke-Hajek G., Adler J., Bleeker W., Breunig T., Caspari S., Dunkel F. G., Fritsch R., Gottschlich G., Gregor T., Hand R., Hauck M., Korsch H., Meierott L., Meyer N., Renker C., Romahn K., Schulz D., Täuber T., Uhlemann I., Welk E., Weyer K. van de, Wörz A., Zahlheimer W., Zehm A. & Zimmermann F. (2018) Rote Liste und Gesamtartenliste der Farn- und Blütenpflanzen (Tracheophyta) Deutschlands [Red list and checklist of spore plants and Tracheophytes of Germany]. – In: Metzing D., Hofbauer N., Ludwig G. & Matzke-Hajek G. (eds): Rote Liste gefährdeter Tiere, Pflanzen und Pilze Deutschlands. Band 7: Pflanzen. – Münster (Landwirtschaftsverlag). – *Naturschutz und Biologische Vielfalt* 70: 13–358.
- Moravec J. (ed.) (2000): *Fytocenologie (Nauka o vegetaci)* [Phytocenology (Vegetational science)]. Academia, Praha.
- Mróz L. & Kosiba P. (2011) Variation in size-dependent fitness components in a terrestrial orchid, *Dactylorhiza majalis* (Rehb.) Hunt et Summerh., in relation to environmental factors. – *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 80.
- Neuwirthová E. (2018) *Mikroevoluční procesy v rodu Dactylorhiza* [Microevolutionary processes in the genus *Dactylorhiza*] Bach. thesis, Charles University, Faculty of Science, Department of Botany, Prague.
- Nordström S., & Hedrén M. (2007) Development of polymorphic nuclear microsatellite markers for polyploid and diploid members of the orchid genus *Dactylorhiza*. – *Molecular Ecology Notes* 7: 644–647.
- Nordström S. & Hedrén M. (2008) Genetic differentiation and postglacial migration of the *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri/lapponica* complex into Fennoscandia. – *Plant Systematics and Evolution* 276: 73–87.
- Nordström S. & Hedrén M. (2009) Genetic diversity and differentiation of allopolyploid *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*) with particular focus on the *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri/lapponica* complex. – *Biological Journal of the Linnean Society* 97: 52–67.
- Osmolovsky I., Shifrin M., Gamliel I., Belmaker J. & Sapir Y. (2022) Eco-geography and phenology are the major drivers of reproductive isolation in the royal irises, a species complex in the course of speciation. – *Plants* 11: 3306.
- Paun O., Luna J. A., Fay M. F., Bateman R. M. & Chase M. W. (2010) Genomic responses drive adaptation in allotetraploid species of *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*; *Orchidinae*). – *Diversity, Phylogeny, and Evolution in the Monocotyledons*: 169–192.
- Paun O., Bateman R. M., Fay M. F., Luna J. A., Moat J., Hedrén M. & Chase M. W. (2011) Altered gene expression and ecological divergence in sibling allopolyploids of *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*). – *BMC evolutionary biology* 11: 1–14.

- Pedersen, Æ. H. (1998) Species Concept and Guidelines for Intraspecific Taxonomic Ranking in *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*). – *Nordic Journal of Botany* 18.
- Pillon Y., Fay M. F., Hedrén M., Bateman R. M., Devey D. S., Shipunov A. B., van der Bank M. & Chase M. W. (2007) Evolution and temporal diversification of western European polyploid species complexes in *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*). – *Taxon* 56: 1185–1208.
- Procházka F. (1979) Prstnatec Russowův (*Dactylorhiza russowii*) - nově rozeznáný a vyhynulý druh československé květeny [*Dactylorhiza russowii* - a newly recognized and extinct species of the Czechoslovak flora]. – *Preslia* 51: 247–254.
- Procházka F. (1982). *Dactylorhiza majalis* subsp. *turfosa*, nové plemeno prstnatce májovéhoho. [*Dactylorhiza majalis* subsp. *turfosa*, a new race of the broad-leaved marsh orchid]. – *Preslia* 54: 289–295.
- Procházka F. (1998) Vyhynulé a nezvěstné druhy šumavské flóry [Extinct and missing species of the flora of Šumava]. – *Silva Gabreta* 2: 67–84.
- Shafer A. B. & Wolf J. B. (2013) Widespread evidence for incipient ecological speciation: a meta-analysis of isolation-by-ecology. – *Ecology letters* 16: 940–950.
- Schieber B. (2014) Effect of altitude on phenology of selected forest plant species in Slovakia (Western Carpathians). – *Folia oecologica* 41: 75.
- Schönswetter P., Stehlik I., Holderegger R. & Tribsch A. (2005) Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps. – *Molecular Ecology* 14: 3547–3555.
- Ståhlberg D. (2009) Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s. l. (*Orchidaceae*). – *Evolutionary Ecology* 23: 295–328.
- Ståhlberg D. & Hedrén M. (2010) Evolutionary history of the *Dactylorhiza maculata* polyploid complex (*Orchidaceae*). – *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 503–525.
- Šlenker M., Koutecký P. & Marhold K. (2022) MorphoTools2: an R package for multivariate morphometric analysis. – *Bioinformatics* 38: 2954–2955.
- Taraška V. (2014) Karyologická a morfologická variabilita okruhu *Dactylorhiza maculata* v České republice a na západním Slovensku [Karyological and morphological variability of the *Dactylorhiza maculata* complex in Czech Republic and western Slovakia]. – Dipl. thesis Palacký University, Olomouc, available from: <https://theses.cz/id/5863iq/> [cit. 12.7.2024]
- Taraška V., Batoušek P., Duchoslav M., Temsch E. M., Weiss-Schneeweiss H. & Trávníček B. (2021) Morphological variability, cytotype diversity, and cytogeography of populations traditionally called *Dactylorhiza fuchsii* in Central Europe. – *Plant Systematics and Evolution* 307: 51.
- Taraška V., Duchoslav M., Hroneš M., Batoušek P., Lamla F., Temsch E. M., Weiss-Schneeweiss H. & Trávníček B. (2023) *Dactylorhiza maculata* agg. (*Orchidaceae*) in Central Europe: Intricate Patterns in Morphological Variability, Cytotype Diversity and Ecology Support the Single-Species Concept. – *Folia Geobotanica* 58: 151–188.
- Taylor R. S. & Friesen V. L. (2017) The role of allochrony in speciation. – *Molecular Ecology* 26: 3330–3342.

- Tichý L. (2002) JUICE, software for vegetation classification. – *Journal of vegetation science* 13: 451–453.
- Trávníček P., Ponert J., Urfus T., Jersáková J., Vrána J., Hřibová E., Doležel J. & Suda J. (2015) Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in Orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication. – *Cytometry Part A* 87: 958–966.
- Vaněček J. (1969) Květena Horažďovicka: materiál k floristickému výzkumu Horažďovicka [Flora of the Horažďovicko region: a basis for floristic research]. – Krajské středisko státní památkové péče a ochrany přírody, Plzeň.
- Vermeulen P. (1947) *Studies on Dactylorchids*. Utrecht.
- Vermeulen P. J. (2015) On selection for flowering time plasticity in response to density. – *New Phytologist* 205: 429–439.
- Vlčko J., Dítě, D. & Kolník M. (2003): *Vstavačovité Slovenska [Orchids of Slovakia]* – Zvolen.
- Westhoof V. & van der Maarel E. (1978) The Braun-Blanquet approach. In: Whittaker R. H. (ed), *Classification of plant communities*. W. Junk, The Hague, pp. 289–399.
- Wolfe T. M., Balao F., Trucchi E., Bachmann G., Gu W., Baar J., Hedrén M., Weckwerth W., Leitch A. R. & Paun O. (2023) Recurrent allopolyploidizations diversify ecophysiological traits in marsh orchids (*Dactylorhiza majalis* sl). – *Molecular Ecology* 32: 4777–4790.

8. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Fotografie typických exemplářů studovaných taxonů a jejich stanovišť

Strana 1: koláž biotopu, celkového habitu, květenství a skenu pysku pro druh *D. lapponica*



Strana 2: koláž biotopu, celkového habitu, květenství a skenu pysku pro druh *D. majalis*





Strana 4: koláž biotopu, celkového habitu, květenství a skenu pysku pro rašelinný ekotyp *D. traunsteineri*



Strana 5: koláž biotopu, celkového habitu, květenství a skenu pysku pro *D. majalis* subsp. *turfosa*

