

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky



Bakalářská práce

**Morfologická a karyologická analýza vybraných populací
Dactylorhiza maculata agg.**

Morphological and karyological analysis of chosen populations of the *Dactylorhiza maculata* group

František Lamla

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Forma studia: prezenční

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

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

Mgr. Vojtěch Taraška

Olomouc 2022

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

V Olomouci dne 29. 7. 2022

.....

Poděkování

Na prvním místě bych chtěl poděkovat především svému školiteli Bobovi Trávníčkovi a to nejen za pomoc při měření v terénu a užitečné rady při sestavování práce, ale především za příležitost věnovat se ve své bakalářské práci skupině rostlin, která je mi tolik blízká. Nemalý dík patří také oběma konzultantům, Vojtu Taraškovi a Michalu Hronešovi za jejich nekonečnou trpělivost a čas který mi věnovali při práci jak v terénu, tak v laboratoři. Ani bez jednoho z nich by tato práce jistě nevznikla. Míše a Ríšovi děkuji za grafické úpravy a korektury. Dále děkuji panu Petru Batouškovi za výrazné usnadnění dopravy na lokality a jeho cenné rady. V neposlední řadě patří velký dík všem, kteří mě podporovali po celou dobu studia a vlastně už i dlouho před ním, tedy mé rodině a přátelům.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: František Lamla

Název práce: Morfologická a karyologická analýza vybraných populací *Dactylorhiza maculata* agg.

Typ práce: bakalářská

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

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

Rok obhajoby: 2022

Abstrakt: Ve slovenském a polském pohraničí byly na třech lokalitách morfologicky a cytologicky analyzovány populace rostlin v literatuře uváděných pod jménem *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes*. Tyto populace byly následně porovnány s populacemi *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* z *area classica* v západním Německu a východním Nizozemsku. Metodou průtokové cytometrie byl u všech populací zjištěn stejný, tetraploidní cytotyp, jedinou výjimkou byla DNA-hexaploidní rostlina, nalezená na lokalitě Mútnianska pila na severu Slovenska. Chromosomový tetraploidní počet ($2n = 80$) byl potvrzen i z roztlakových preparátů nezralých prašníků. U šesti jedinců ze slovensko-polských lokalit byl také změřen absolutní obsah DNA ($2C = 12,53$ pg). Morfometrická analýza odhalila značné rozdíly mezi populacemi z *area classica* a ze slovensko-polského pohraničí, a to jak u kvantitativních, tak u kvalitativních znaků. Z tohoto důvodu bylo navrženo popsat rostliny ze slovensko-polského pohraničí jako nový poddruh *D. maculata* pod jménem *D. maculata* subsp. *arcana*. Tento nový poddruh se od *D. maculata* subsp. *elodes* liší především kvantitativními znaky měřenými na pysku, ale také kvalitativně tvarem a typem zakončení listů. Pomocí průtokové cytometrie byla dále na lokalitách ve slovensko-polském pohraničí odhalena přítomnost rostlin s intermediárním obsahem DNA oproti *D. maculata* subsp. *arcana* a *D. majalis*, která se na lokalitách také vyskytovala. Tyto rostliny byly proto označeny za hybridy. I tyto rostliny byly morfometricky analyzovány, jejich fenotyp byl porovnán s domnělými rodičovskými taxony. Morfometrickou analýzou byl zjištěn překvapivě nízký výskyt intermediárních hodnot kvantitativních znaků u křížence, hybridní rostliny se často v daném znaku podobaly více jednomu z rodičů. U kvalitativních znaků byla intermediarita hybridů výraznější, projevovala se zejména ve zbarvení květů. Vzhledem k navrženému novému popisu jednoho z rodičů bude vhodné popsat i tohoto křížence jako novou nothosubspecii mezidruhového křížence *D. ×vermeuleniana*.

Klíčová slova: *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes*, Evropa, hybridizace, morfometrika, průtoková cytometrie, taxonomie

Počet stran: 67

Počet příloh: 3

Jazyk: český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: František Lamla

Title: Morphological and karyological analysis of chosen populations of the *Dactylorhiza maculata* group

Type of thesis: Bachelor

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

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

Year of presentation: 2022

Abstract: Three populations, thought to belong to the taxon *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* from the Slovakian-Polish border region were assessed in terms of their morphology and karyology. These populations were then compared to the populations of *D. maculata* subsp. *elodes* from its *area classica* in western Germany and eastern Netherlands. Ploidy level estimation using flow cytometry has revealed that all analysed individuals belong to the tetraploid cytotype ($2n = 4x$), with one exception of single DNA-hexaploid specimen from the Mútnianska pila site. The tetraploid chromosome count was confirmed by counting from chromosome squashes of unripe anthers. The average absolute DNA content of 6 individuals from the Slovakian-Polish border region was $2C = 12,53$ pg. Morphological analysis discovered significant differences between populations from *area classica* and from the Slovakian-Polish border region, both in quantitative and qualitative traits of the studied plants. It is therefore proposed to scientifically describe the plants from the Slovakian-Polish border region as a new subspecies of the species *D. maculata*, under the suggested name *D. maculata* subsp. *arcana*. This new subspecies differs from *D. maculata* subsp. *elodes* mainly in proportions of the labellum (bottom part of a flower), but also in the shape of its lower leaves and mainly their terminal part. Cytological analysis also detected the presence of several individuals with intermediate DNA content between *D. maculata* subsp. *arcana* and *D. majalis* (which co-occurred on the sites) at the sites in the Slovakian-Polish border region, which were therefore labelled as hybrids. Morphological analysis was performed on these plants as well and they were compared to both of the alleged parental species. Surprisingly few of the quantitative traits of the hybrid exhibited intermediate values when compared to the parental species, the supposed hybrids were, for a given trait, often closer in values to one of the parents. In terms of qualitative traits, the hybrid plants had more intermediate appearance, mainly in colour of their flowers. Considering the proposed description of one of the parental taxa as a new subspecies of *D. maculata*, it would be appropriate to also describe this hybrid as a new nothosubspecies of the interspecific hybrid *D. ×vermeuleniana*.

Key words: *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes*, Europe, flow cytometry, hybridisation, morphometrics, taxonomy

Number of pages: 67

Number of appendices: 3

Language: Czech

OBSAH

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
1.1. Rod <i>Dactylorhiza</i>	9
1.2. <i>Dactylorhiza maculata</i> agg.	9
1.3. <i>Dactylorhiza maculata</i> agg. na Slovensku	10
1.3.1. <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>fuchsii</i>	10
1.3.2. <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>maculata</i>	10
1.3.3. <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>transsilvanica</i>	11
1.3.4. <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>sooana</i>	11
1.3.5. <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>averyanovii</i>	12
1.3.6. <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>elodes</i>	12
2. CÍLE PRÁCE	14
3. MATERIÁL A METODY	15
3.1. Sběr dat a rostlinného materiálu	15
3.2. Analýza ploidie a počtu chromosomů	16
3.2.1. Stanovení chromosomového počtu	16
3.2.2. Stanovení odhadu ploidního stupně a přesného obsahu DNA	16
3.3. Morfometrická analýza	17
3.4. Statistické vyhodnocení dat	20
4. VÝSLEDKY	22
4.1. Karyologická analýza	22
4.1.1. Zjištění chromosomového počtu	22
4.1.2. Odhad ploidního stupně a stanovení přesného obsahu DNA	22
4.2. Morfometrická analýza	27
4.2.1. Porovnání taxonů <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>arcana</i> a <i>D. maculata</i> subsp. <i>elodes</i>	27
4.2.2. Porovnání taxonů <i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>arcana</i> , <i>D. majalis</i> a jejich předpokládaného křížence	40
5. DISKUZE	54
5.1. Ploidní stupeň, chromosomový počet a absolutní velikost genomu	54
5.2. Morfometrické studium	55
5.3. Taxonomické důsledky	58
6. ZÁVĚR	59

7. LITERATURA.....	61
PŘÍLOHY.....	65

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1. Rod *Dactylorhiza*

Rod *Dactylorhiza* Necker ex Nevski zahrnuje víceleté hlíznaté rostliny náležející do podčeledi *Orchidoideae*, jedné ze dvou terminálních vývojových větví čeledi *Orchidaceae* (Freudenstein et al. 2004). V rámci uvedené čeledi jde o jeden z taxonomicky nejkomplikovanějších a nejintenzivněji zkoumaných rodů (Hedrén 2001, Ståhlberg & Hedrén 2008, Bateman 2018, Taraška et al. 2021). To je způsobeno jak obecnou atraktivitou vstavačovitých, tak velkou fenotypovou variabilitou v rámci rodu, často uplatňovanými mechanismy hybridizace a polyploidie, a v neposlední řadě také výskytem rodu v botanicky intenzivně zkoumané oblasti Evropy.

Podle Averyanova (1983a, 1983b) je vhodné rod členit na 4 sekce: *Aristatae* Aver., *Iberanthus* Schlechter, *Sambucinae* (Parl.) Smoljan a *Dactylorhiza*. Sekce *Dactylorhiza* je terminální vývojovou větví s nejsložitější fylogenezí a největším počtem taxonů. Dále se dělí na 3 podsekce: *Dactylorhiza*, *Maculatae* (Parl.) Aver. a *Latifoliae* (Reichenb. fil.) Aver. Do podsekce *Dactylorhiza* jsou zahrnuty diploidní taxony z okruhu *Dactylorhiza incarnata*, podsekce *Maculatae* sdružuje diploidní a autopolyploidní taxony odpovídající *D. maculata* agg. Podsekce *Latifoliae* je fylogeneticky nejkomplexnější a zahrnuje ustálené alopolyploidní linie vzniklé křížením taxonů ze dvou předcházejících podsekcí. Rod je považován za fylogeneticky poměrně mladý, díky čemuž se v něm stále velmi významně uplatňují evoluční mechanismy jako hybridizace, auto- i alopolyploidie.

1.2. *Dactylorhiza maculata* agg.

Okruh *D. maculata* odpovídá podsekcí *Maculatae* a zahrnuje diploidní a tetraploidní taxony s výskytem v Evropě, severní Africe a západní Asii. Lodyha je obvykle plná (nesmáčknutelná), v dolní polovině většinou s poměrně úzkými dlouhými listy kopinatého, obkopinatého až eliptického nebo kopist'ovitého tvaru; horní listy listenovité, bezpochevné; květenství většinou mnohokvěté, často dlouhé, jehlancovité (zejména v počátku rozkvetu) až válcovité; květy s širokým pyskem, nejčastěji světle růžově zbarvené, často s výraznou tmavě fialovou kresbou (vyjma *D. foliosa*).

V rámci okruhu se na základě morfologie a ploidního stupně tradičně rozlišují 4 druhy: *D. foliosa* (Rchb. f.) Soó – diploidní taxon endemický pro ostrov Madeira, *D. saccifera* (Brongn.) Soó – diploidní taxon s rozšířením v jižní Evropě a Malé Asii (kde vikarizuje s *D. fuchsii*), *D. fuchsii* (Druce) Soó – diploidní nebo autotetraploidní taxon s rozšířením v celé Evropě a západní Asii a *D. maculata* (L.) Soó – autotetraploidní taxon vyskytující se především v severní polovině Evropského kontinentu. Předci současné *D. maculata* a *D. fuchsii* v minulosti prošli třemi polyploidizačními událostmi (Ståhlberg 2010). Tzv. jižně/západní a severně/východní tetraploidní linii dnes považujeme za *D. maculata*, u linie která pronikla do střední Evropy však došlo k polyploidizaci až později, po období holocénu a proto je morfologicky nerozeznatelná od *D. fuchsii*. V poslední době byly navrženy úpravy pojetí taxonomie okruhu *D. maculata* zahrnující *D. fuchsii* jako poddruh *D. maculata* (L.) Soó (Taraška et al. 2021). Toto taxonomické pojetí okruhu je aplikováno i ve zbytku této práce. V případě druhů *D. fuchsii* a *D. maculata* bylo v minulosti popsáno velké množství často regionálně vymezených nižších taxonů (nejčastěji poddruhů), jejichž taxonomická hodnota je předmětem diskuzí. Právě do této kategorie spadá i dvojice taxonů, na kterou se zaměřuje tato práce.

Jelikož má vlastní výzkumná část práce probíhala na slovenském území, zaměřuje se další část literární rešerše na úroveň poznání v této oblasti.

1.3. *Dactylorhiza maculata* agg. na Slovensku

Na slovenském území bývá rozlišováno 6 taxonů z okruhu *D. maculata* řazených většinou jako poddruhy dvou hlavních taxonů *D. maculata* a *D. fuchsii*. Z pohledu této taxonomické skupiny je Slovensko méně prozkoumané než Česká republika a v poslední době zde dochází a pravděpodobně i nadále bude docházet k reinterpretaci statutu některých taxonů (Taraška 2014, Taraška et al. 2021). Ve střední Evropě, a tedy i na Slovensku, se nachází dílčí (regionální) radiální centrum této taxonomické skupiny a proto zde lze očekávat zvýšený výskyt lokálních odchylek. Díky výskytu tetraploidních populací *D. maculata* subsp. *fuchsii* může snadno docházet ke genovému toku mezi tímto poddruhem a většinou ostatních poddruhů *D. maculata*, což dále komplikuje rozpoznání fylogenetických vztahů.

1.3.1. *Dactylorhiza maculata* subsp. *fuchsii*

Dactylorhiza maculata subsp. *fuchsii* (Druce) Hyl. je patrně nejběžnějším taxonem z okruhu prstnatce plamatého vyskytujícím se na Slovensku (Dítě 2002) i ve střední Evropě (Kubát 2011). Ve slovenské botanické komunitě pro něj bývá nejčastěji používáno jméno *D. fuchsii* (Druce) Soó subsp. *fuchsii* (např. Dítě 2002, Vlčko et al. 2003), podle současných poznatků je ale patrně vhodnější považovat tento taxon za poddruh širěji pojatého druhu *D. maculata* (L.) Soó (Ståhlberg & Hedrén 2008, Taraška et al. 2021), i když některé práce (Brandrud et al. 2020, Bateman 2021) naopak stojí spíše proti tomuto konceptu. Jedná se typicky o diploidní, ve střední Evropě však většinou autotetraploidní taxon, s rozšířením především v severní polovině evropského kontinentu. Typickými stanovišti tohoto taxonu jsou vlhčí mikrohabitaty v podhorských a horských oblastech, často na krajích lesů nebo v blízkosti lesních cest (Dítě 2002, Průša 2005, Ponert 2019). Na Slovensku se vyskytuje roztroušeně až hojně v severní, hornaté polovině území. Co se týče morfologie, je tento taxon velice variabilní, vzhled rostlin se často odvíjí od podmínek na mikrostanovišti i od počasí v dané vegetační sezóně. Typické exempláře jsou vysoké, štíhlé rostliny s 5–11 dlouhými, skvrnitými listy, z nichž spodní 2 jsou tupě zakončené. Lodyha je plná, tuhá, květenství mnohokvěté, husté, květy jsou růžově zbarvené, s výraznou fialovou kresbou na pysku, který je silně trojlaločného tvaru. Pro určování prstnatců z okruhu prstnatce plamatého se jako dobrý determinační znak osvědčil právě tvar pysku vyjádřený tzv. Heslop-Harrisonovým indexem (Heslop-Harrison 1951), který kvantifikuje poměr délky postranních laloků pysku vůči prostřednímu laloku. Květy *D. maculata* subsp. *fuchsii* mají většinou prostřední lalok pysku dlouhý, výrazně přesahující postranní laloky a hodnoty Heslop-Harrisonova indexu jsou tedy u tohoto taxonu relativně vysoké, typické jsou hodnoty v rozmezí 1,4–1,6 (Tyteca & Gathoye 2003, Taraška 2014). Na slovenském území se vyskytují jak diploidní, tak tetraploidní jedinci náležející k tomuto taxonu (Taraška et al. 2021).

1.3.2. *Dactylorhiza maculata* subsp. *maculata*

Dactylorhiza maculata (L.) Soó subsp. *maculata* je autotetraploidní taxon popsáný ze Švédska Linném původně jako *Orchis maculata* L. (Linné 1753). Do rodu *Dactylorhiza* byl i s později vyčleněným druhem *Orchis fuchsii* Druce (Druce 1915) přerazen roku 1962 (Soó 1962). Od *D.*

maculata subsp. *fuchsii* se nominální poddruh odlišuje tvarem pysku, který bývá širší, hodnota Heslop-Harrisonova indexu je u *D. maculata* subsp. *maculata* nižší, většinou v rozmezí hodnot 1,05–1,3 (Gathoye & Tyteca 1987, Taraška 2014). Dalším determinačním znakem je tvar spodních lodyžních listů, jejichž zakončení bývá špičaté, celkově jsou listy také užší, než u subsp. *fuchsii* (Procházka 2002, Stáhlberg 2009, Ponert 2019). Rozdílná je i stanovištní preference obou taxonů. Zatímco subsp. *fuchsii* roste spíše na zastíněných stanovištích, nominální poddruh vyhledává otevřená, osluněná stanoviště na minerálně bohatších podkladech. Kromě hor a podhůří se tak může vyskytovat i na slatinných loukách v nížinných oblastech. Ploidní stupeň je především v západní Evropě považován za důležitý determinační znak (Dufřêne et al. 1991, Bateman 2021), ve střední Evropě je však díky hojnému výskytu tetraploidní *Dactylorhiza maculata* subsp. *fuchsii* (Druce) Hyl. (Scharfenberg 1977, Vöth & Greilhuber 1980, Jagiełło & Lankosz. Mróz 1986-1987, Taraška 2014) nedostatečný pro spolehlivé určení. Na Slovensku se nominální poddruh prstnatce plamatého vyskytuje poměrně vzácně, Dostál (1989) a Dítě (2002) uvádějí jeho výskyt především z horských oblastí v severní a východní části země. Pro určení celkového rozšíření *D. maculata* subsp. *maculata* na tomto území bude nutné zanalyzovat morfologii mnoha populací.

1.3.3. *Dactylorhiza maculata* subsp. *transsilvanica*

Poddruh *D. maculata* subsp. *transsilvanica* (Schur) Soó byl popsán z území dnešního Rumunska v roce 1853 jako *Orchis transsilvanica* Schur. Podle původního popisu by mělo jít o rostliny lišící se od nominálního poddruhu především sněhově bílou barvou květů. Podle Dítěte (Dítě 2002) jde o rostliny 25–50 cm vysoké, s 6–10 podlouhle kopinatými, alespoň ve spodní části lodyhy tupě zakončenými listy, které jsou téměř vždy beze skvrn. Květenství je husté, podlouhlé až válcovité, květy jsou bílé, pysk široký, nevýrazně trojlaločný s prostředním lalokem často kratším než postranními. Stanovištěm tohoto poddruhu jsou vlhké slatinné nížinné louky, nebo i mezofilnější louky na hlubších půdách v podhůří. Více autorů jako znak udává nažloutlou barvu pysku (Borsos 1961, Průša 2005, Ponert 2019), chybí však jasná dokumentace tohoto znaku na živých rostlinách. Podle Wucherpfenniga (2004) je tento znak často zmiňován díky žloutnutí květů po vylisování rostlin do formy herbářové položky. Na lokalitách tohoto druhu se však často vyskytují i rostliny s narůžovělými květy a je proto nejspíš vhodnější uvádět jako znak tohoto taxonu častý výskyt bělokvětvých forem v populaci, než bělokvětost považovat za absolutní determinační znak (Taraška 2014). Ploidní stupeň je shodný s nominální subspecií, rostliny jsou tedy tetraploidní (Průša 2005, Taraška 2014, Ponert 2019). Celkové rozšíření tohoto druhu je nedostatečně známé, morfologicky odpovídající rostliny se vyskytují v oblasti celého karpatského oblouku, přičemž na západ sahají lokality až do Slovinska a na jih do Bosny a Hercegoviny. Na Slovensku jde o vzácný taxon s jednotkami lokalit v západní a střední části státu.

1.3.4. *Dactylorhiza maculata* subsp. *sooana*

Dactylorhiza maculata subsp. *sooana* Borsos ex Batoušek, Taraška & Trávn. je formálně teprve nedávno platně popsán (Taraška et al. 2021) vyskytující se na jihovýchodě České republiky, na Slovensku a v severním Maďarsku. Rostliny odpovídající tomuto poddruhu byly popsány již v roce 1959 (Borsos 1959) jako *Dactylorchis fuchsii* subsp. *sooana*, toto jméno však bylo invalidní, jelikož nebyl stanoven jeho holotyp (také později zveřejněné kombinace založené na tomto basionymu jsou invalidní, ač byly často užívány v literatuře, např. Průša 2005, Kubát 2011). Podle

současného pojetí diskutovaného taxonu (Taraška et al. 2021) k němu náleží náleží 26–67 cm vysoké rostliny, většinou s 5–9 listy s tmavými podlouhlými skvrnami; spodních 3–6 listů pochvovitě objímá lodyhu, horní listy jsou bezpochevné; nejspodnější list je obvejčitého tvaru s tupým zakončením (podobně jako u *D. maculata* subsp. *fuchsii*); pysky květů jsou trojlaločné; rozpětí hodnot Heslop-Harrisonova indexu hodnotícího tvar pysku je 1,2–1,5. Od *D. maculata* subsp. *fuchsii* se tento taxon liší především zbarvením okvěť, které je vždy velmi světlé až bílé, ovšem většinou s kontrastní fialovou kresbou. Prašná pouzdra jsou světle žlutá, narozdíl od všech ostatních zástupců okruhu prstnatce plamatého ve střední Evropě. Pro tento poddruh je charakteristická také vždy přítomná a většinou velmi výrazná skvrnitost lodyhy i listů. Od zbytku fylogeneticky blízkých taxonů se *D. maculata* subsp. *sooana* odlišuje také ploidním stupněm, jedinci tohoto poddruhu jsou vždy diploidní (Taraška et al. 2021). Roste na mezofilních až vlhčích loukách a ve světlých bukových lesích, většinou v podhorských oblastech. Na Slovensku se vyskytuje vzácně v nižších pohořích napříč celým územím (Malé a Biele Karpaty, Strážovské vrchy, Slánske vrchy, Nízke Beskydy).

1.3.5. *Dactylorhiza maculata* subsp. *averyanovii*

Poddruh *D. maculata* subsp. *averyanovii* Jagiełło byl popsán také relativně nedávno (Jagiełło 1988), z okolí obce Zieleniec na polské straně Orlických hor. Popis tohoto nového taxonu byl následující: Rostliny malé, jen 17–30(38) cm vysoké; listy v počtu 4–6(7), kopinaté, 8–13 cm dlouhé, asi 1,5 cm široké, s drobnými tmavými skvrnami, horní listy listenovité; květenství velmi krátká, chudokvětá, s růžovo-bílými květy; pysk typický pro *D. maculata* subsp. *maculata*, trojlaločný, jeho střední lalok obvykle kratší laloků postranních, Heslop-Harrisonův index tvaru pysku 0,98–1,2(1,3). Počet chromosomů $2n = 80$. Na slovenském území byly rostliny morfologicky odpovídající tomuto popisu nalezeny v roce 1990, Dítě (2002) je však ve své publikaci přiřazuje k taxonu popsánému ze západní Evropy a nazývanému *Dactylorhiza ericetorum* (E. F. Linton) Aver. (syn.: *Dactylorhiza maculata* subsp. *ericetorum* (E. F. Linton) Verm.). Taraška (2014) ve své diplomové práci (podobně jako už dříve Vermeulen 1947) poukazuje na totožnost *D. ericetorum* s *D. maculata* subsp. *maculata* a navrhuje odlišné rostliny ze Slovenska považovat za *Dactylorhiza maculata* subsp. *averyanovii*, jelikož při statistické analýze morfologie porovnávající rostliny ze slovenských lokalit a z polského *locus classicus* mezi nimi nezjistil signifikantní rozdíly. Hlavními morfologickými znaky odlišujícími *Dactylorhiza maculata* subsp. *averyanovii* od nominálního poddruhu jsou velice dlouhé, čárkovité listy a světle zbarvený, poměrně široký pysk. *D. maculata* subsp. *averyanovii* se kromě morfologických znaků od ostatních taxonů z okruhu prstnatce plamatého odlišuje i stanovištními preferencemi, roste na oligotrofních rašeliništích a v rašelinných borech, často ve vysoké vrstvě rašelínku. Na Slovensku jde o velice vzácný poddruh s pouhými jednotkami lokalit v blízkosti Oravské přehrady u hranic s Polskem.

1.3.6. *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes*

Dactylorhiza maculata subsp. *elodes* (Griseb.) Soó je poměrně kontroverzní taxon, jímž se zabývá i výzkumná část této práce. Byl popsán Grisebachem jako *Orchis elodes* Griseb. již roku 1845 (Sczepanski 2006) z dnes již zaniklé lokality Bournager Moor ležící na hranicích Německa a Nizozemska. Podle původního popisu by se tento taxon měl od *D. maculata* subsp. *maculata* lišit kopinatými, do stran rozestálými listy, které jsou na lodyze v nižším počtu, listeny přesahujícími

semeník, úžšími okvětními lístky, velmi krátkou a úzkou ostruhou a časnější dobou kvetení (Grisebach 1845 sec. cit. in Vermeulen 1947, Sczepanski 2006). Tento poddruh se vyskytuje na nížinných oligotrofních rašeliništích. Prakticky od jeho popisu nepanoval na tento taxon ustálený názor. Někteří autoři ho synonymizovali se z Britských ostrovů popsanou *Dactylorhiza ericetorum* (E. F. Linton) Aver. (Godfery 1921, Stephenson & Stephenson 1922), která je však podle všeho totožná s *D. maculata* subsp. *maculata* (Taraška 2014), jiní ho považovali za ekologicky odlišný poddruh od nominátní subsp. *maculata* (Keller & Soó 1940). Až Vermeulen (1947) navštívil *locus classicus* a provedl důkladný popis tohoto taxonu. Množství nejasností ohledně taxonomické pozice rostlin z populací v oblasti nizozemsko-německého pohraničí pravděpodobně pramenilo ze skutečnosti, že mnoho autorů původní lokality nikdy nenavštívilo a své domněnky tak zakládali pouze na herbářovém materiálu sebraném Grisebachem a na jeho slovním popisu (Sczepanski 2006). Podle Sczepanského (l.c.) je hlavním znakem odlišujícím tento poddruh od nominátní subspecie velmi krátká a úzká ostruha, ostatní determinační znaky zmiňované Grisebachem (1845) jsou podle něj ovlivněny převážně podmínkami na stanovištích výskytu tohoto poddruhu, který Sczepanski považuje také za ekologicky dobře diferencovaný. Zatímco nominátní subsp. *maculata* se v západním Německu vyskytuje na vlhkých, většinou mírně kyselých loukách chudých na živiny, subsp. *elodes* exkluzivně vyhledává rašeliniště s hojným výskytem vřesovcovitých rostlin. Ze Slovenska je tento taxon udáván více autory (Dítě 2002, Vlčko et al. 2003). Sczepanski (2006) však předpokládá, že v těchto případech šlo o záměny s jinými zástupci okruhu *D. maculata*. Je zřejmé, že rostliny vyskytující se na lokalitách v Západních Beskydech přiřazované k *D. maculata* subsp. *elodes* jsou morfologicky odlišné od rostlin z ostatních populací v regionu. Dítě (2002) je popisuje takto: štíhlé rostliny, vysoké 10–35 cm, s tenkou lodyhou; listy 3–4, čárkovité, často neskvrnité, nejdelší dosahující téměř k bázi květenství; květenství krátké, s 15–35 květy růžové až fialové barvy se zřetelnou tmavofialovou kresbou; střední lalok pysku většinou nevýrazný, zděli postranních laloků; ostruha velmi tenká, dlouhá 6–9 mm. Mělo by jít o tetraploidní rostliny, vyskytující se na oligotrofních až přechodových rašeliništích v podhorském až horském stupni. Jelikož se tento popis neshoduje s popisem rostlin z Nizozemí a Německa, klade si tato práce za cíl porovnat rostliny z obou oblastí a vyvodit klasifikační důsledky z tohoto porovnání.

2. CÍLE PRÁCE

Tato práce se zaměřuje na studium slovenských (a jedné polské) populací označovaných středoevropskou literaturou (Dítě 2002, Vlčko et al. 2003) jako *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes*, zejména na jejich morfologii a cytologii. V souvislosti s nimi si klade za cíl najít odpovědi na následující otázky:

1. Jaké morfologické charakteristiky jsou typické pro uvedené populace?
2. K jakému cytotypu patří tyto rostliny?
3. Shodují se rostliny ze slovensko-polského pohraničí označované jako *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* s rostlinami popsány pod tímto jménem z *area classica* (v Nizozemsku a Německu)?
4. Vyskytují se ve studované oblasti výskytu údajné *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* kříženci s jinými prstnatci a pokud ano, jaká je jejich morfologie a ploidie?

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Sběr dat a rostlinného materiálu

Sběr morfometrických dat a vzorků rostlinného materiálu proběhl v roce 2021 v oblastech Západních Beskyd a Západních Tater na severu Slovenska a v oblasti Obniżenie Orawsko-Podhalańskie v jižním Polsku. Celkem byly analyzovány 3 populace, po jedné v každé z oblastí. Lokality byly vybrány na základě znalosti rozšíření domnělého taxonu *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* na slovensko-polském pohraničí (Vlčko et al. 2003). Trojice analyzovaných populací reprezentuje většinu relevantních lokalit výskytu zkoumaného taxonu v regionu (na dalších známých lokalitách byl zaznamenán jen velmi vzácný výskyt a/nebo netypicky vyvinuté rostliny). Na lokalitách byly nalezeny převážně rostliny odpovídající charakteristice údajné *D. maculata* subsp. *elodes* a výběr rostlin pro morfometriku byl tedy proveden náhodně, zároveň však takovým způsobem, aby bylo pokryto pokud možno maximální rozpětí variability tohoto taxonu na lokalitě. Pouze na lokalitě Mútnianská pila (MTP) se v lesních partiích lokality vyskytovaly rostliny odpovídající vzhledem poddruhu *D. maculata* subsp. *fuchsii* (širší, tupě zakončené listy s výraznými skvrnami, hluboce dělený pysk), které samozřejmě do morfometrické analýzy zahrnuty nebyly. Na zbývajících dvou lokalitách nebyly kromě údajné *D. maculata* subsp. *elodes* jiné taxony z okruhu prstnatce plamatého zaznamenány, alespoň ne v typickém morfologickém provedení (vzácně se zde vyskytovali jedinci morfologicky přechodní k *D. maculata* subsp. *fuchsii*, ti rovněž měření nebyli). Populacím byly pro použití ve statistických analýzách přiřazeny třípísmenné zkratky. Rostliny ze všech tří populací, které byly studovány morfometricky a také karyologicky za použití metody průtokové cytometrie. U několika rostlin z lokality Bialy potok (BIP) byl pomocí roztlačkových preparátů nezralých prašníků zjištěn počet chromosomů. Morfometrická data k rostlinám *D. maculata* subsp. *elodes* z lokalit v Německu a Nizozemsku laskavě poskytl V. Taraška (jeden z konzultantů této práce), stejně tak, jako morfometrická data zjištěná pro populaci druhu *D. majalis* (Rchb.) P. F. Hunt et Summerh. Lokality a taxony na nich zkoumané viz Tab. 1

Poznámka: Z důvodu nápadné morfologické rozdílnosti rostlin uváděných v literatuře jako *D. maculata* subsp. *elodes* z obou porovnávaných oblastí (*area classica*: nizozemsko-německé pohraničí versus slovensko-polské pohraničí), bylo pro rostliny z oblasti Západních Beskyd B. Trávníčkem (vedoucí této práce) navrženo pracovní jméno *D. maculata* subsp. *arcana* nom. prov. (*arcanus* = tajemný, tajný (z lat.)), které je pro přehlednost používáno i dále v textu této práce (i ve zkrácené formě jako *D. *arcana*).

lokality	zkratka	souřadnice	n	taxony	datum sběru
Mútnianská pila	MTP	49°28'12.7"N, 19°17'7.8"E	20	<i>D. *arcana</i> , <i>D. majalis</i>	27.06.2021
Bialy potok	BIP	49°17'2.4"N, 19°50'47.7"E	24	<i>D. *arcana</i> , <i>D. majalis</i>	28.06.2021
Peciská	PEC	49°17'27.4"N, 19°44'41.0"E	15	<i>D. *arcana</i> , <i>D. majalis</i>	29.06.2021
Borkenberge	BOR	51°46'47.7"N, 7°18'37.9"E	22	<i>D. *elodes</i>	17.06.2016
Leggelderveld	LEG	52°52'34.5"N, 6°22'53.4"E	15	<i>D. *elodes</i>	17.06.2016
Vidnavské mokřiny	VID	50°22'46.6"N, 17°11'55.3"E	10	<i>D. majalis</i>	13.05.2022

Tab. 1: Lokality analyzovaných populací rodu *Dactylorhiza*, jejich zkratky používané ve statistických analýzách, geografické souřadnice lokalit, jména taxonů, které se na nich vyskytují a datum sběru dat. *D. *arcana* = *D. maculata* subsp. *arcana* nom. prov., *D. *elodes* = *D. maculata* subsp. *elodes* (Griseb.) Verm., *D. majalis* = *D. majalis* (Rchb.) P. F. Hunt et Summerh., n = velikost souboru jedinců použitých pro cytologické a morfologické analýzy z dané lokality

3.2. Analýza ploidie a počtu chromosomů

Všechny rostliny *Dactylorhiza maculata* subsp. *arcana* nom. prov. použité pro analýzu morfologie byly zkoumány cytologicky metodou průtokové cytometrie s cílem zjistit odhad ploidního stupně. U dvou jedinců z lokality Bialy potok (BIP) a dvou jedinců z lokality Borkenberge (BOR) byly z roztakových preparátů nezralých prašníků spočítány chromosomy.

3.2.1. Stanovení chromosomového počtu

Ke zjištění chromosomového počtu byla použita metoda roztakových preparátů. Z důvodu vysokého očekávaného somatického počtu chromosomů ($2n = 80$; např. Jagiełło & Lankosz-Mróz 1988) byly chromosomy počítány v preparátech připravených z nezralých prašníků, kde se buňky nacházejí v haploidním stavu (předpoklad: $n = 40$). K barvení byla použita Feulgenova reakce (např. Weiss et al. 2003). Po odebrání byla poupata nafixována ve směsi 96% ethanolu a koncentrované kyseliny octové v poměru 3:1. Po návratu z lokalit byly vzorky přesunuty do chladničky, kde byly uchovány až do doby zpracování. Před přípravou preparátů byly vzorky vyjmuty z fixáže a promyty vodou. Následně byly po dobu třiceti minut macerovány v 5M roztoku HCl při teplotě 20 °C. Před barvením v Schiffově roztoku byly opět promyty destilovanou vodou. Barvení probíhalo po dobu 1–2 hodin bez přístupu světla. Po nabarvení byla poupata osušena a v roztoku 45% kyseliny octové z nich byly na podložním sklíčku odpreparovány brylky nesoucí pylová zrna. Následoval roztlak pomocí krycího skla. Preparáty byly pozorovány pod 400násobným zvětšením (10x40) a v případě nalezení buněk ve vhodné fázi meiózy byly přesunuty pod mikroskop s 1000násobným zvětšením a snímacím zařízením. Obarvené chromosomy byly následně počítány ze zhotovených digitálních snímků, a to alespoň u tří buněk u všech analyzovaných jedinců. Pro stanovení počtu chromosomů byly zhotoveny preparáty ze 6 jedinců z lokality Peciská a z 5 jedinců z lokality Borkenberge, preparáty vhodné ke spočítání chromosomů se však podařilo zhotovit pouze ze dvou jedinců z lokality Peciská a z jednoho jedince z lokality Borkenberge.

3.2.2. Stanovení odhadu ploidního stupně a přesného obsahu DNA

Metodou průtokové cytometrie bylo analyzováno všech 63 jedinců ze tří populací determinovaných na jejich lokalitách jako *Dactylorhiza maculata* subsp. *arcana* nom. prov. s cílem zjistit odhad jejich ploidního stupně. Kromě toho bylo za účelem porovnání s domnělými kříženci na cytometru obdobně změřeno i 9 rostlin určených dohromady na všech 3 společných lokalitách jako *D. majalis* (Rchb.) a 7 rostlin považovaných za křížence mezi těmito dvěma taxony. Cytometrické analýze bylo také podrobena šest rostlin použitých ke zjištění počtu chromosomů a výsledky dvojice jedinců u kterých se podařilo chromosomový počet zjistit byly použity ke kalibraci výsledků cytometrie. Obsah DNA (4x) byl zjišťován ze živých buněk semeníků, ve kterých dochází k endoreplikaci v menší míře než ve vegetativních orgánech. Postupná částečná endoreplikace (progressively partial endoreplication; PPE; Trávníček et al. 2015; Hřibová et al. 2016) je proces, při kterém u vegetativních buněk dochází k replikaci části úseků DNA a v případě měření pomocí průtokové cytometrie vede její výskyt v buňkách vzorku k těžko interpretovatelným výsledkům s více píky v histogramu.

Z morfometricky analyzovaných rostlin byly odebrány 2–3 semeníky spolu s květy a po odpreparování pysků použitých na morfometriku byly skladovány v chladničce v plastových

zkumavkách s navlhčeným ubrouskem po dobu ne více než 10 dnů. Pro přípravy vzorků a měření byl použit protokol pro cytometrii s vnitřním standardem (Doležel et al. 2007).

Semeníky byly nejprve vyjmuty ze zkumavek a spolu se vzorkem standardu *Pisum sativum* 'Ctirad' (2C = 9.09 pg; Doležel et al. 1998) přesunuty do Petriho misky. V případě jedné rostliny z lokality Peciská (PEC) se píky standardu a vzorku překrývaly a vzorek byl proto změřen znovu za použití *Secale cereale* 'Dankovske' (2C = 16,19 pg; Doležel et al. 1998) jakožto standardu. Následně byl pomocí automatické pipety přidán 1 ml pufru LB01 s přidaným PVP (Doležel et al. 2007) a oba vzorky byly nasekány pomocí žiletky. Vzniklá suspenze byla pomocí automatické pipety přefiltrována přes 40- μ m nylonový filtr do plastové kyvety obsahující cca 300 μ l stejného pufru. K suspenzi bylo přidáno 50 μ l barviva DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol). Měření bylo provedeno na cytometru Partec ML (Partec GmbH., Německo) s UV-led diodou (Partec GmbH., Německo) jako excitačním zdrojem. Při získání atypických výsledků byly vzorky vždy alespoň jednou přeměřeny, aby se zamezilo výskytu chyb ve výsledcích.

Výstupem měření byl histogram znázorňující počet částic o dané intenzitě fluorescence odpovídající obsahu DNA. Typický histogram obsahoval tři píky, levý odpovídající standardu, prostřední odpovídající buňkám vzorku v G1 fázi a pravý odpovídající buňkám vzorku v G2 fázi. Průměrná pozice píků (průměrná fluorescence) a jejich variačních koeficientů (CV) byla zjištěna pomocí softwaru kompatibilního s cytometrem. Pro zjištění relativního obsahu DNA byl u každého vzorku vypočítán poměr mezi průměrnou hodnotou fluorescence buněk vzorku v G1 fázi a průměrnou hodnotou fluorescence buněk standardu.

Pro zjištění přesného obsahu DNA byly tři vybrané vzorky z lokality Mútne (MTP3, MTP5 a MTP14) a také tři vzorky z rostlin použitých pro zjištění chromosomového počtu (jeden z dvojice vzorků, u nichž se podařilo chromosomy spočítat) změřeny na cytometru Partec PAS (Partec GmbH., Německo) vybaveného zeleným laserem Cobolt Samba (532 nm, 100 mW, Cobolt AB, Švédsko). Příprava vzorků probíhala obdobně jako u měření s DAPI, pouze před barvením bylo přidáno 50 μ l RNázy a vzorek byl obarven 50 μ l barviva PI (propidium-jodid). Vynásobením poměru mezi hodnotami píků vzorku a standardu obsahem DNA standardu bylo zjištěno množství DNA v buňkách vzorku. Každý jedinec byl změřen 3krát a výsledky byly zprůměrovány.

Pro porovnání rostlin *D. *arcana* s populacemi *D. maculata* subsp. *elodes* z Německa a Nizozemska byla využita data naměřená z tohoto území Taraškou et al. na cytometru Partec ML ve Vídni v roce 2016. Jako barvivo bylo použito PI (propidium-jodid). Zatímco vzorky *D. *arcana* byly měřeny třikrát pro dosažení požadované přesnosti pro zjištění absolutní velikosti genomu, vzorky *D. *elodes* byly měřeny pouze jednou a je tedy pravděpodobné, že je jejich přesnost nižší.

3.3. Morfometrická analýza

Morfologické znaky *Dactylorhiza *arcana* byly měřeny na celkem 63 rostlinách dohromady ze všech tří lokalit tohoto taxonu, které byly předběžně na základě morfologie takto určeny. Cytometrická analýza však poukázala na pravděpodobně hybridní původ některých z těchto jedinců (kříženci *D. *arcana* s *D. majalis*) na lokalitách Bialy potok a Peciská. Tito jedinci byli tedy ze statistických analýz porovnávajících slovensko-polské (*D. *arcana*) a německo-nizozemské (*D. *elodes*) populace vyloučeni a celkový počet rostlin použitých pro analýzu morfologie se tak snížil na 50. Počet rostlin *D. *elodes* z lokalit v *area classica* použitých pro toto porovnání byl 37. Pro

morfometrickou charakteristiku jedinců byla použita sada kvantitativních, ordinálních i kategoriálních znaků, která se osvědčila V. Taraškovi pro účely výzkumu *Dactylorhiza maculata* agg. (Taraška 2014). Znaky byly měřeny nedestruktivně na nadzemních orgánech živých, dobře vyvinutých rostlin ve vhodné fenofázi (začátek až vrchol kvetení) přímo na lokalitě, pouze v případě květů byl šetrně proveden jejich odběr a poté byly tentýž den na skeneru vytvořeny digitální snímky jejich pysků. Měřeno bylo celkem 46 morfologických znaků, pro účely statistické analýzy jich ale bylo použito pouze 38. Z důvodu obtížného porovnání a přílišné subjektivity hodnocení byly vyřazeny znaky „tvar listů“, „tvar skvrn“ a „umístění skvrn“, kvůli nulové variabilitě byl vyřazen znak „barva prašných pouzder“. Jelikož do morfometrického datasetu z lokalit ze západního Německa a východního Nizozemska (*D. *elodes*) nebyly zahrnuty některé znaky (vzdálenost od báze po nejširší místo 1. listu; šířka lodyhy pod květenstvím; délka 2. listenu a délka 2. semeníku) musely být i tyto vyřazeny ze statistických analýz porovnávajících *D. *elodes* a *D. *arcana*., byly však použity při porovnání *D. *arcana* s *D. majalis* a jejich křížencem. Ze spodní části květenství každé rostliny byly odebrány minimálně 2, ideálně však 3, dobře vyvinuté květy se semeníkem, nikoliv však nejspodnější květ, jehož rozměry i tvar jsou často atypické. Než byly pysky květů skenovány, byly květy uchovávány v plastových zkumavkách s navlhčeným ubrouskem, aby nedošlo k jejich vyschnutí. Ke zhotovení digitálních skenů byl z květů odpreparován pysk i s ostruhou, semeník byl dále uchován ve zkumavce v ledničce, aby mohl být později použit pro cytometrickou analýzu. Květní pysk byl následně položen lícovou stranou na sklo skeneru a zajištěn ve zploštělé poloze podložním sklíčkem. Znaky měřené na zhotovených skenech pysku viz Obr. 1. Pro měření byl z trojice květů z jedné rostliny vybrán vždy svými rozměry průměrný, nejméně nepoškozený pysk. Spolu s květy bylo skenováno i měřítko sloužící ke kalibraci vzniklých snímků. Měření rozměrů pysků z digitálních skenů proběhlo v programu ImageJ 1.42q (Rasband 2009). Seznam znaků i s použitými zkratkami a typem znaku (kategoriální, kvantitativní, ordinální) je uveden v tabulce 2 (Tab. 2). Z hodnot primárních kvantitativních znaků bylo vypočítáno několik indexů uvedených v tabulce 3 (Tab. 3). U všech měřených jedinců byla provedena fotodokumentace zachycující habitus rostliny, její květenství a první a druhý list. Fotodokumentace typických jedinců *D. *arcana*, hybrida *D. *arcana* × *D. majalis* a *D. *elodes* viz přílohy 1, 2 a 3.

Tab. 2: Seznam primárních znaků použitých pro morfologickou charakteristiku zkoumaných prstnaticů, 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. Barva lodyhy byla měřena v její spodní části. Za 1. list byl považován nejspodnější list na lodyze který měl vyvinutou listovou čepel.

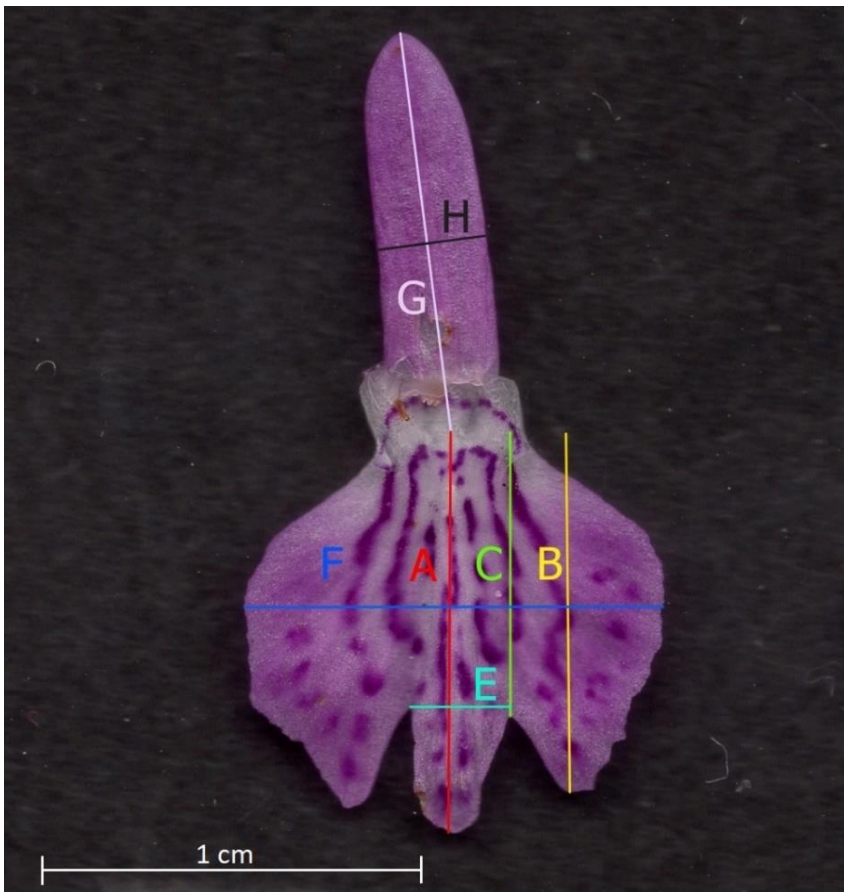
zkratka	název znaku	jednotka	typ
b_lod	barva lodyhy (zelená, fialovo-zelená, fialová)	-	kateg.
b_vret	barva osy květenství (zelená, fialovo-zelená, fialová)	-	kateg.
b_sem	barva semeníků (zelená, fialovo-zelená, fialová)	-	kateg.
b_listenu	barva listenů (zelená, fialovo-zelená, fialová)	-	kateg.
skvrn	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.

Tab. 2: Pokračování

b_vne	intenzita zbarvení vnější části okvěti	-	kateg.
b_vnit	intenzita zbarvení vnitřní části okvěti	-	kateg.
b_pysk	intenzita zbarvení pysku	-	kateg.
kres	intenzita kresby na pysku	-	kateg.
d_ost	relativní délka ostruhy vůči délce semeníku	-	kateg.
b_ost	intenzita zbarvení ostruhy	-	kateg.
Vys	výška nadzemní části rostliny	cm	kvant.
Int_1	délka prvního internodia (vzdálenost pochvy 1. a 2. listu)	mm	kvant.
Int_2	délka druhého internodia (vzdálenost pochvy 2. a 3. listu)	mm	kvant.
Osa	délka osy květenství	mm	kvant.
poc_List	celkový počet listů	-	kvant.
poc_List_ns	počet horních, bezpochevných listů	-	kvant.
d_L1	délka 1. listu	mm	kvant.
s_L1	šířka 1. listu	mm	kvant.
uhel_L1	úhel 1. listu vůči lodyze	stupně	kvant.
d_L2	délka 2. listu	mm	kvant.
s_L2	šířka 2. listu	mm	kvant.
BN_L2	vzdálenost od konce pochvy po nejširší část 2. listu	mm	kvant.
uhel_L2	úhel 2. listu vůči lodyze	stupně	kvant.
listen_2	délka listeny 2. květu v květenství	mm	kvant.
semenik_2	délka semeníku 2. květu v květenství	mm	kvant.
s_lod	šířka lodyhy pod květenstvím	mm	kvant.
A	délka pysku	mm	kvant.
B	délka postranního laloku pysku	mm	kvant.
C	délka pysku ku jeho zářezu	mm	kvant.
E	šířka pysku	mm	kvant.
F	šířka prostředního laloku pysku	mm	kvant.
G	délka ostruhy	mm	kvant.
H	šířka ostruhy	mm	kvant.

Tab. 3: Přehled bezjednotkových indexů vypočítaných z primárních kvantitativních znaků, jejich zkratky použité pro účely statistických analýz a vzorec sloužící k výpočtu.

zkratka	název indexu	výpočet
H-H_ind.	Heslop-Harrisonův index	$2A/(B+C)$
G/H	index délky ostruhy	G/H
A-C/E	index délky středního laloku pysku	$(A-C)/E$
B/C	index hloubky zářezu pysku	B/C
d_L1/s_L1	index délky 1. listu	d_L1/s_L1
d_L2/s_L2	index délky 2. listu	d_L2/s_L2
L2_ind.	index tvaru 2. listu	$BN_L2/(d_L2-BN_L2)$
grac_ind.	index gracility	$Vys/(s_lod*poc_List)$



Obr. 1: Znaký měřené na digitálním skenu pysku

3.4. Statistické vyhodnocení dat

Před statistickým vyhodnocením pomocí testů byla u všech souborů dat provedena základní deskriptivní statistika, aby bylo zamezeno zahrnutí chybných hodnot do následujících statistických testů. Porovnávány byly nejprve populace taxonů *D. maculata* subsp. *arcana* nom. prov. (dále v textu jako *D. *arcana*), *D. maculata* subsp. *elodes* (Griseb.) Verm. (dále *D. *elodes*), aby bylo možné zhodnotit správnost původní (literární) determinace rostlin ze slovenských a polských populací. U sedmi rostlin ze slovenských a polských lokalit určených předběžně podle morfologie na lokalitě jako *D. *arcana* (2 z lokality Bialy potok, 5 z lokality Peciská) prokázala cytometrická analýza intermediární velikost genomu mezi *D. *arcana* a *D. majalis*, z čehož vyplynulo, že jde s vysokou pravděpodobností o jejich hybridy a nikoliv o *D. *arcana*. Hodnoty znaků těchto hybridních rostlin byly tedy také statisticky analyzována a použita byla i data naměřená na rostlinách druhu *D. majalis*. Obě provedená porovnání byla z pohledu statistické metodiky obdobná. Výsledek statistického testu byl považován za signifikantní při hodnotě testového kritéria odpovídající $P < 0,05$. Za vysoce signifikantní byly považovány výsledky s $P < 0,001$. Statistické analýzy probíhaly v programu NCSS 9 (Hintze 2013) a v sadě definic MorphoTools 1.01 (Koutecký 2015) v prostředí R.

3.4.1. Analýzy kvantitativních znaků

Pro analýzu kvantitativních znaků byly z důvodu nenormálního rozložení dat použity neparametrické obdoby testů porovnávacích výběry. V případě porovnání *D. *arcana* a *D. *elodes* to byl Mann-Whitneyho U-test, v případě porovnání *D. *arcana*, *D. majalis* a jejich domnělého křížence to byl Kruskal-Wallisův test a následně Tukey-Kramerův test mnohonásobného porovnání. Hodnoty vybraných znaků pro jednotlivé populace taxonů *D. *arcana* a *D. *elodes* byly vizualizovány pomocí krabičkových diagramů, stejně tak jako porovnání taxonů *D. *arcana*, *D. majalis* a jejich domnělého křížence. Statistické testy byly provedeny v programu NCSS, tabulky a grafy byly vytvořeny v programech Microsoft Excel a NCSS.

3.4.2. Analýza kategoriálních znaků

U zaznamenaných kategoriálních znaků byla porovnáována četnost výskytu konkrétních hladin znaku v populacích či pro taxony metodou kontingenčních tabulek. Pro porovnání taxonů byl použit Pearsonův χ^2 test. Četnosti výskytu zaznamenaných hladin znaku byly znázorněny pomocí skládaných sloupcových grafů. Statistické testy byly provedeny v programu NCSS, tabulky a grafy byly vytvořeny v programech Microsoft Excel a NCSS.

3.4.3. Analýza hlavních komponent (PCA) a diskriminační analýza (CDA)

Soubory většiny znaků byly porovnány metodou analýzy hlavních komponent (PCA). Nejprve byla sestrojena korelační matice dvojic znaků na základě které byl při porovnání *D. *arcana* a *D. *elodes* vyloučen znak „počet bezpochevných listů“ z důvodu jeho silné korelace ($r = 0,91$) se znakem „počet listů“. Použit byl Pearsonův korelační koeficient. Výsledky analýzy hlavních komponent v podobě hodnot variability vysvětlené prvními dvěma osami mnohorozměrného prostoru jsou uvedeny v textu, grafické výstupy viz Obr. 14 a 23. V návaznosti byla provedena také diskriminační analýza sloužící k vyhledání znaků nejlépe odlišujících zvolené sobory jedinců (taxony). Hodnoty kanonických skóre pro nejvýznamnější znaky jsou uvedeny v textu, výsledky jsou graficky znázorněny formou scatterplotů (Obr. 15 a 24). Analýza hlavních komponent i diskriminační analýza byly provedeny pomocí MorphoTools. Postup byl obdobný u porovnání *D. *arcana*, *D. majalis* a jejich domnělého křížence, pouze zde po provedení korelační analýzy nebyl před PCA vyloučen žádný ze znaků.

4. VÝSLEDKY

4.1. Karyologická analýza

4.1.1. Zjištění chromosomového počtu

Počet chromosomů u obou úspěšně analyzovaných jedinců *D. *arcana* z lokality Peciská odpovídal euploidnímu tetraploidnímu stavu ($n = 40$), stejně tak počet chromosomů u jedné rostliny *D. *elodes* z lokality Borkenberge v západním Německu. Fotografie roztlakových preparátů z obou lokalit viz Obr. 2.

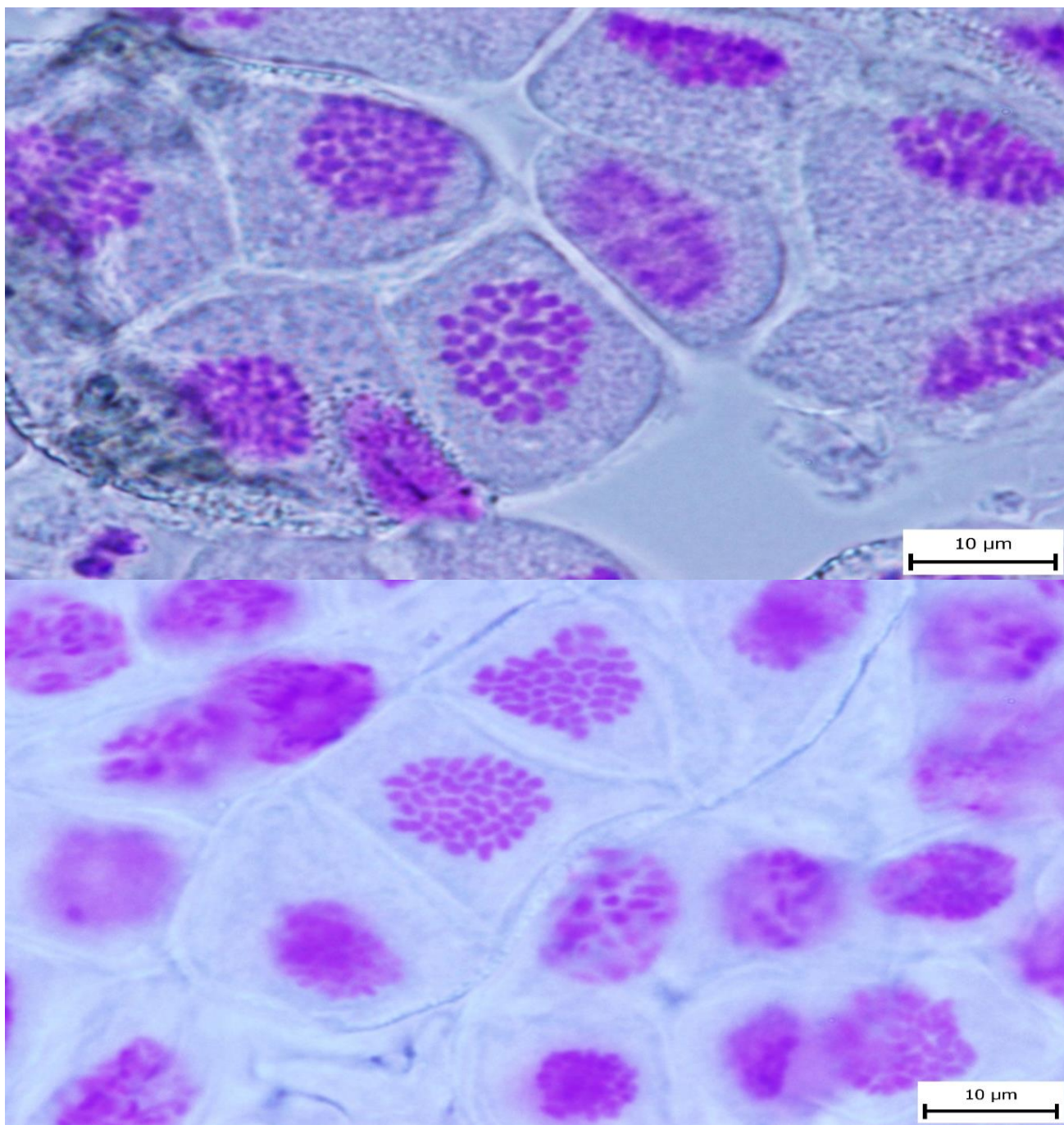
4.1.2. Odhad ploidního stupně a stanovení přesného obsahu DNA

Ploidní stupeň byl zjištěn u 79 rostlin tří taxonů (*Dactylorhiza *arcana.*, *D. majalis*, *D. majalis* × *D. *arcana*) ze tří populací, u dalších 6 jedinců (po třech z lokalit Mútniansky potok a Bialy potok) byl navíc stanoven i absolutní obsah DNA. Z těchto celkem 85 jedinců odpovídalo 83 obsahem DNA-tetraploidnímu chromosomovému počtu, u jednoho jedince odpovídala naměřená hodnota DNA-hexaploidnímu stavu a u jednoho jedince odpovídala naměřená hodnota DNA-triploidnímu stavu. DNA-hexaploidní jedinec pravděpodobně vznikl díky splynutí redukované a neredukované rodičovské gamety, mechanismem zvaným autopolyloidie, původ triploidního jedince je pravděpodobně v hybridizaci *D. *arcana* s diploidní *D. maculata* subsp. *fuchsii*, která se ve zkoumané oblasti také vyskytuje. Genom prstnaticů ze západní Evropy byl průměrně o 4,0% větší než genom prstnaticů ze slovensko-polského pohraničí. K porovnání obou výběrů byl z důvodu malé velikosti vzorku ($n=6$) u *Dactylorhiza maculata* subsp. *arcana* nom. prov. použit neparametrický Mann-Whitneyho U-test, který při hladině významnosti 5% zamítl hypotézu o shodnosti výběrů ($Z = 3,84$, $P < 0,001$). K tomuto rozdílu však mohlo přispět i použití různých cytometrů. Typické výstupy z cytometru ve formě histogramů viz Obr. 3. Krabíčkový graf porovnávající obsah DNA v buňkách obou taxonů viz Obr. 4, tabulka znázorňující hodnoty velikosti genomu u různých populací viz Tab. 4.

Navzdory stejnému ploidnímu stupni je obsah jaderné DNA u *D. *arcana* oproti *D. majalis* přibližně 1,2krát nižší, díky čemuž bylo možné identifikovat jejich křížence, u kterých byly hodnoty fluorescence intermediární (Obr. 5). Tímto způsobem bylo ze dvou lokalit (BIP, PEC) zpětně rozpoznáno 9 vysoce pravděpodobných kříženců determinovaných podle morfologie na lokalitě původně jako *D. *arcana*. Kombinace obou rodičů a křížence byla pro demonstrativní účely změřena i bez vnitřního standardu (Obr. 3). Všichni měření jedinci jsou zahrnuti v Obr. 6, který demonstruje vyšší relativní obsah DNA v buňkách hybridů i rostlin *D. majalis* napříč populacemi.

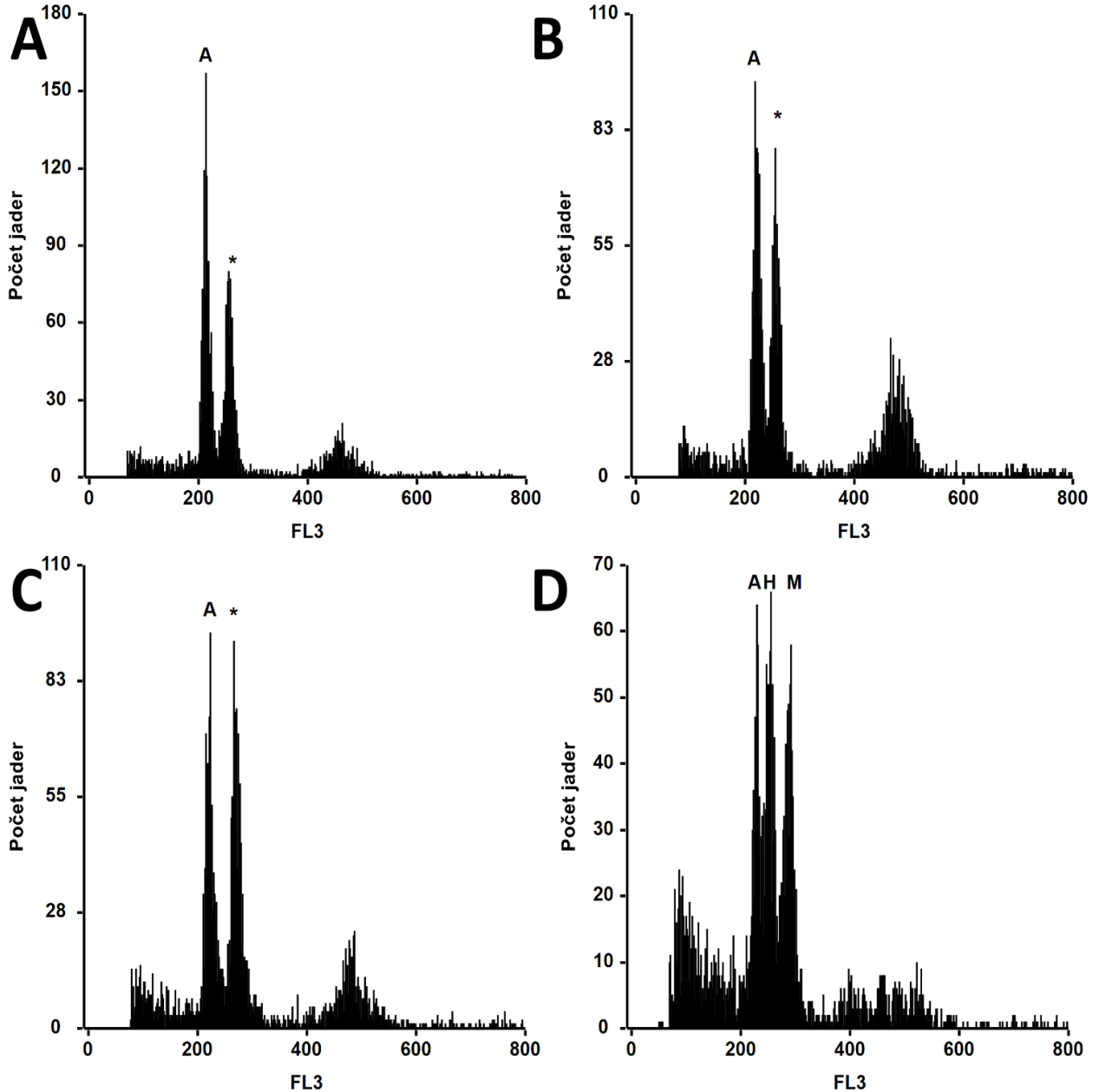
Tab. 4: Průměrný obsah DNA u zkoumaných taxonů změřený na cytometru Partec PAS (*D. *arcana*) a na cytometru Partec ML (*D. *elodes*) při použití barviva PI, (n – počet analyzovaných jedinců z populace, SD – směrodatná odchylka)

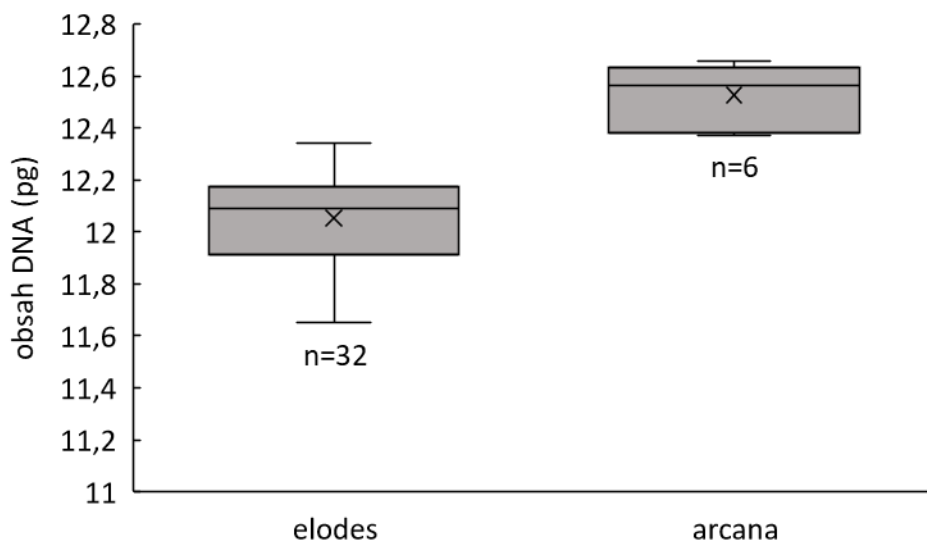
	n	průměrný obsah DNA (pg)	SD	stupeň ploidie
Mútne (<i>D. *arcana</i>)	3	12,55	0,13	4x
Bialy potok (<i>D. *arcana</i>)	3	12,50	0,09	4x
Borkenberge (<i>D. *elodes</i>)	17	12,05	0,16	4x
Leggelderveld (<i>D. *elodes</i>)	15	12,06	0,18	4x



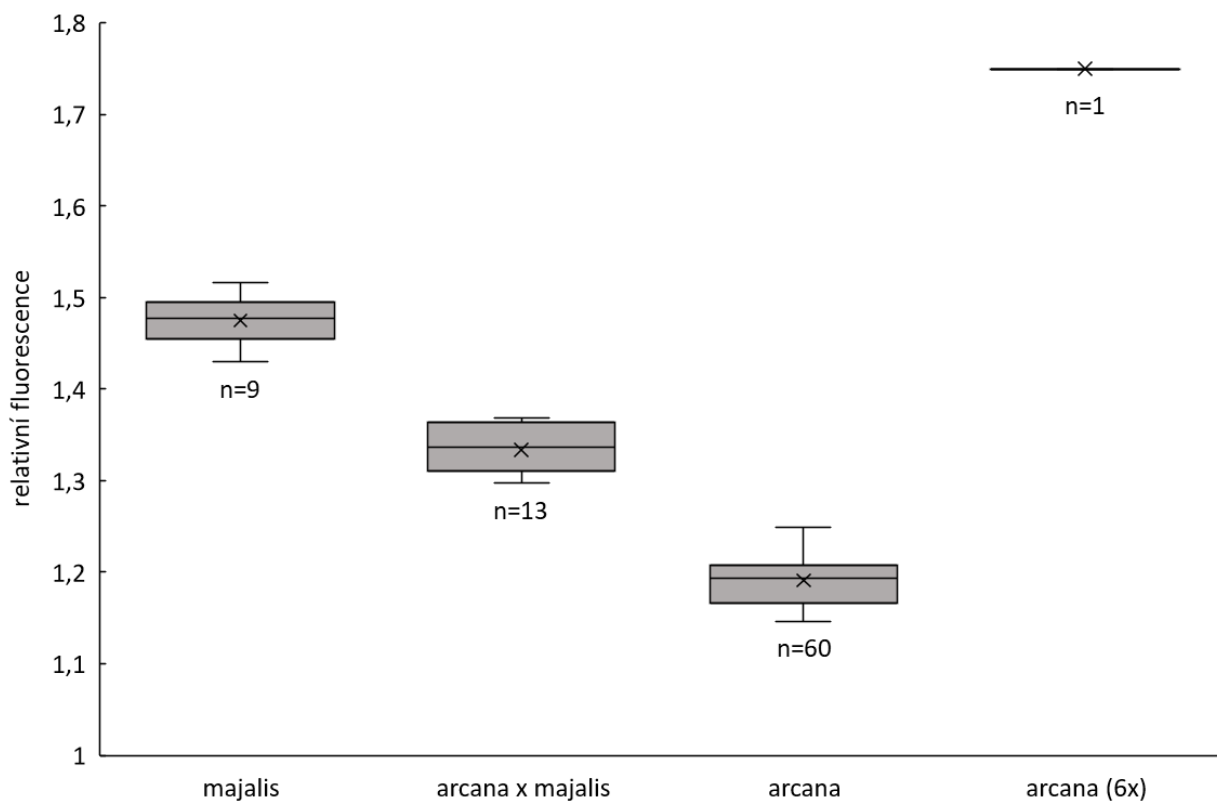
Obr. 2: Snímky roztakových preparátů prašníků z lokalit Borkenberge (*D. *elodes*, nahoře) a Bialy potok (*D. *arcana*, dole). V obou vzorcích bylo v jednotlivých buňkách spočítáno 40 chromosomů.

Obr. 3: Grafické výstupy z průtokového cytometru ve formě histogramů. Na každém z histogramů odpovídají dva štíhlé levé píky obsahu DNA v buňkách v G1 fázi ve vzorcích standardu (levý pík, označený A) a analyzovaném vzorku (pravý pík, označený *), nižší pík vpravo od těchto dvou odpovídá obsahu DNA v buňkách v G2 fázi. A = vzorek rostliny 11 z lokality Mútnianska pila, B = vzorek rostliny 10 z lokality Bialy potok, C = vzorek rostliny 11 z lokality Peciská, D = trojice vzorků *D. *arcana*, hybrid a *D. majalis* měřená bez standardu, píky jsou označeny odpovídajícím způsobem (A, H, M). Jako standard byl při měření použit vzorek *Pisum sativum* 'Ctirad' (2C = 9.09 pg).

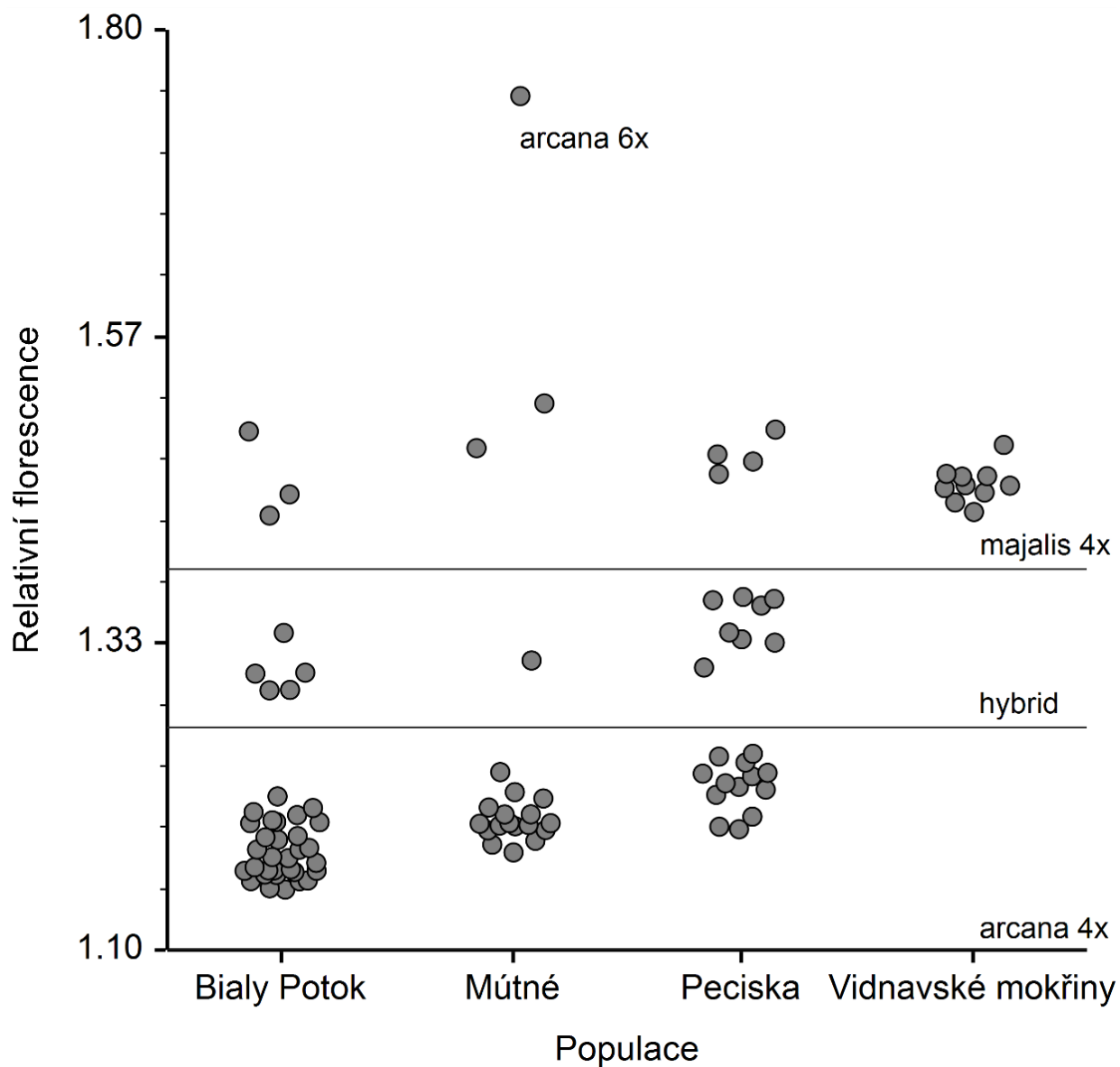




Obr. 4: Porovnání velikosti genomu u taxonů *D. *elodes* a *D. *arcana*. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián, křížek průměr a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. n = počet analyzovaných jedinců.



Obr. 5: Hodnoty poměru píků vzorků a vnitřního standardu (*Pisum sativum* 'Ctirad'; $2C = 9.09$ pg; Doležel et al. 1998) u rodičovských taxonů a jejich křížence. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián, křížek průměr a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. n = počet analyzovaných jedinců.



Obr. 6: Shrnutí hodnot poměru píků vzorků a vnitřního standardu (*Pisum sativum* 'Ctirad'; 2C = 9.09 pg; Doležel et al. 1998) pro jednotlivé populace a taxony. Kolečka reprezentují změřené jedince.

4.2. Morfometrická analýza

4.2.1. Porovnání taxonů *Dactylorhiza maculata* subsp. *arcana* a *D. maculata* subsp. *elodes*

4.2.1.1. Kvantitativní znaky

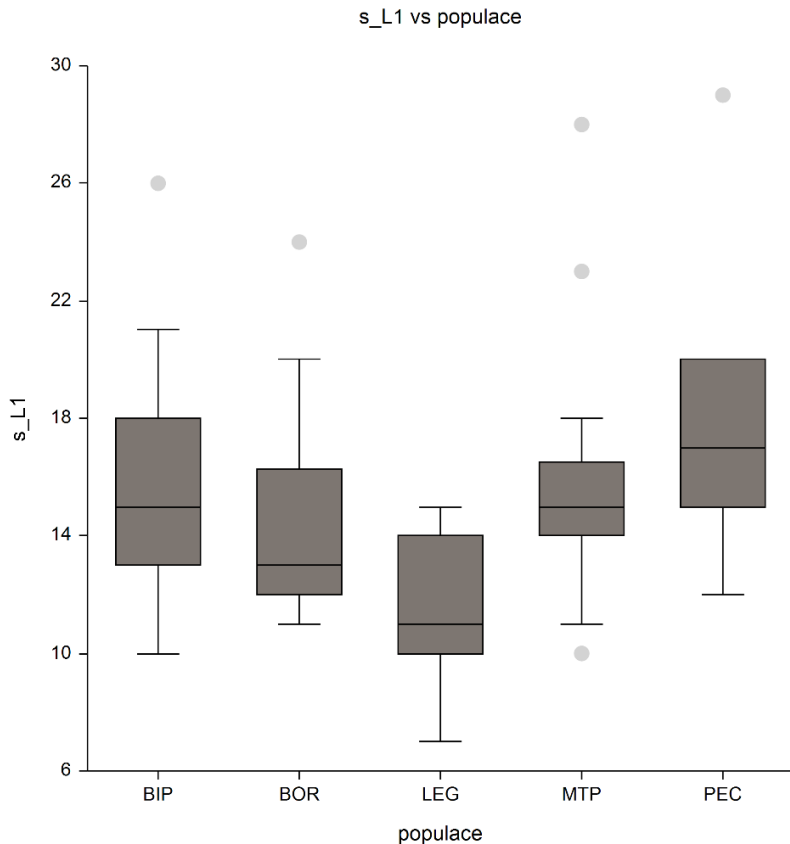
Pro hodnoty kvantitativních znaků (včetně indexů) u jednotlivých taxonů byla nejprve provedena deskriptivní statistika a následně porovnání pomocí Mann-Whitneyho U-testu. Rozdíly byly při zvolené 5% hladině významnosti signifikantní u většiny znaků, u velké části z nich byla hodnota P dokonce nižší než 0,1 %. Výjimkou byly znaky Int_2, d_L1, uhel_L1, d_L2 a délka pysku (A), u kterých nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi zkoumanými taxony. Základní statistické údaje pro kvantitativní znaky a výsledky Mann-Whitneyho U-testu shrnuje Tab. 5. Pro vizualizaci vybraných vysoce signifikantních znaků byly navíc sestrojeny krabičkové grafy pro populace a populační hodnoty byly porovnány metodou neparametrické analýzy variance (Kruskal-Wallisův test) a následně Tukeyho-Kramerova testu mnohonásobného porovnání.

Tab. 5: Základní statistické údaje pro primární kvantitativní znaky a indexy a výsledky neparametrického Mann-Whitneyho U-testu porovnání taxonů *D. *arcana* a *D. *elodes*. Signifikantní výsledky statistického testu ($P < 0,05$) jsou zvýrazněny. Hodnoty primárních kvantitativních znaků jsou uvedeny v mm. Vysvětlivky zkratk znaků viz Tab. 1.

znak	<i>D. arcana</i> (n = 50)				<i>D. elodes</i> (n = 37)				Mann-Whitney U-test		
	průměr	SD	min	max	průměr	SD	min	max	Z		P
Vys	365,88	85,21	210,00	670,00	326,49	56,78	195,00	450,00	-2,027	0,0426	< 0,050
Int_1	33,00	17,65	10,00	73,00	41,73	12,08	21,00	65,00	3,2095	0,0013	< 0,010
Int_2	49,22	21,82	8,00	100,00	46,16	11,85	24,00	72,00	-0,677	0,4987	0,499
Osa	49,14	11,65	27,00	98,00	58,51	16,99	30,00	110,00	2,884	0,0039	< 0,010
poc_List	5,82	1,01	4,00	8,00	6,70	1,56	4,00	10,00	2,8025	0,0051	< 0,010
poc_List_ns	2,49	1,05	1,00	5,00	3,24	1,44	1,00	6,00	2,5108	0,012	< 0,050
d_L1	102,67	28,70	50,00	174,00	98,73	27,94	49,00	147,00	-0,3	0,7641	0,764
s_L1	16,25	3,99	10,00	29,00	13,16	3,24	7,00	24,00	-4,055	5E-05	< 0,001
uhel_L1	32,65	12,34	10,00	60,00	33,65	16,69	10,00	75,00	-0,205	0,8375	0,838
d_L2	129,45	32,42	80,00	219,00	124,43	25,82	78,00	190,00	-0,317	0,7512	0,751
s_L2	15,57	4,20	9,00	31,00	13,30	3,04	9,00	21,00	-2,87	0,0041	< 0,010
BN_L2	87,75	29,28	42,00	180,00	56,81	20,59	15,00	105,00	-4,964	1E-06	< 0,001
uhel_L2	26,76	11,91	10,00	60,00	20,27	12,74	5,00	60,00	-2,963	0,003	< 0,010
A	8,85	1,21	6,26	11,92	8,87	0,93	7,01	10,83	0,2874	0,7738	0,774
B	7,86	1,14	5,92	10,59	9,04	0,85	7,29	11,15	4,6325	4E-06	< 0,001
C	6,16	1,19	4,14	10,06	7,44	0,84	5,91	9,66	5,2325	0	< 0,001
E	2,78	0,39	1,73	3,45	2,29	0,44	1,31	3,18	-4,81	2E-06	< 0,001
F	10,36	1,34	7,27	13,74	10,95	1,07	8,85	13,57	2,3669	0,0179	< 0,050
G	9,37	1,15	7,38	12,31	6,12	1,13	3,52	7,98	-7,878	0	< 0,001
H	2,36	0,36	1,46	3,26	1,30	0,23	0,72	1,76	-7,87	0	< 0,001
H-H_ind.	1,27	0,09	1,04	1,47	1,08	0,05	0,97	1,21	-7,35	0	< 0,001
G/H	4,06	0,81	2,38	6,57	4,83	1,15	2,75	7,81	3,4279	0,0006	< 0,001
A-C/E	0,97	0,25	0,24	1,48	0,62	0,18	0,19	0,97	-6,182	0	< 0,001
B/C	1,29	0,12	1,05	1,56	1,22	0,08	1,06	1,38	-3,043	0,0023	< 0,010
d_L1/s_L1	6,44	1,63	3,44	10,53	7,61	1,92	4,10	12,70	2,8573	0,0043	< 0,010
d_L2/s_L2	8,58	2,02	5,15	13,33	9,70	2,54	5,10	17,27	2,2189	0,0265	< 0,050
L2_ind.	2,26	0,92	0,62	4,62	0,96	0,56	0,19	3,13	-6,564	0	< 0,001

4.2.1.1.1. šířka 1. listu (s_{L1})

Pro znak „šířka 1. listu (s_{L1})“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí populací. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že nejvíc se od ostatních odlišuje populace Leggelderveld (LEG), ve které jsou hodnoty šířky prvního listu průměrně nejnižší. Populace s výskytem *D. *arcana* (BIP, MTP, PEC) se mezi sebou navzájem nelišily. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 6. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 7.



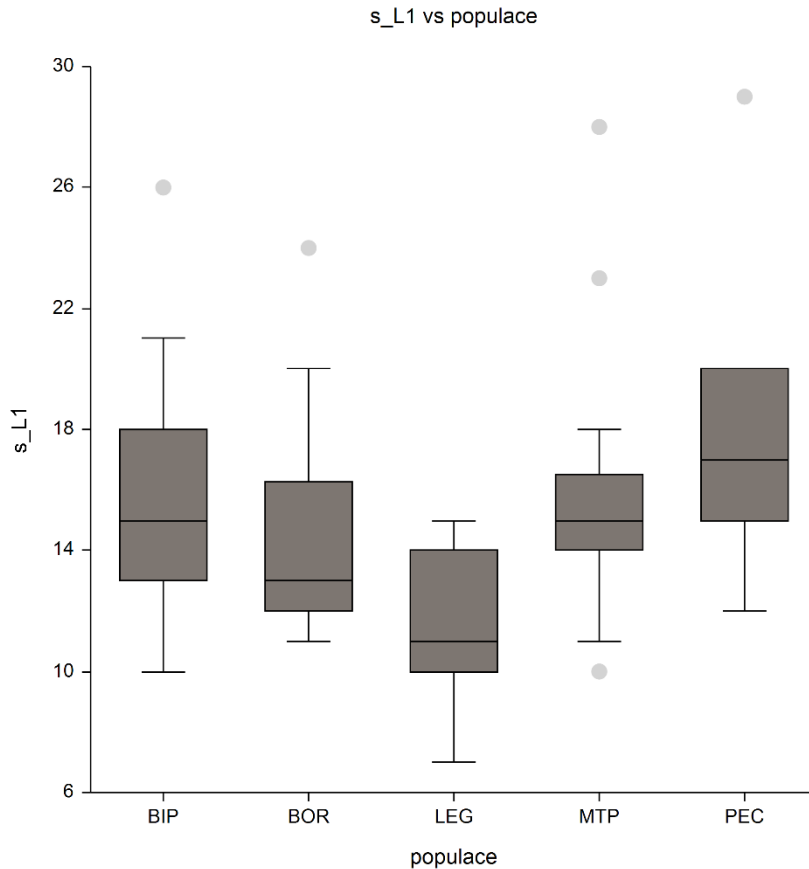
Obr. 7: Hodnoty znaku „šířka 1. listu“ pro jednotlivé populace. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí. Na lokalitách Bialý potok (BIP), Mútňianska pila (MTP) a Peciská (PEC) se vyskytuje *D. *arcana*, na lokalitách Borkenberge (BOR) a Leggelderveld (LEG) se vyskytuje *D. *elodes*.

Tab. 6: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „šířka 1. listu“. Pokud jsou populace signifikantně odlišné ($P < 0,05$), je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns. BIP = Bialý potok, BOR = Borkenberge, LEG = Leggelderveld, MTP = Mútňianska pila, PEC = Peciská, *arc.* = *D. *arcana*, *elo.* = *D. *elodes*

s_{L1}	BIP (<i>arc.</i>)	BOR (<i>elo.</i>)	LEG (<i>elo.</i>)	MTP (<i>arc.</i>)	PEC (<i>arc.</i>)
BIP (<i>arc.</i>)					
BOR (<i>elo.</i>)	ns				
LEG (<i>elo.</i>)	+	ns			
MTP (<i>arc.</i>)	ns	ns	+		
PEC (<i>arc.</i>)	ns	ns	+	ns	

4.2.1.1.2. délka postranního laloku pysku (B)

Pro znak „délka postranního laloku pysku (B)“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí populací. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že nejvíc se od ostatních odlišuje populace Mútnianská pila (MTP), ve které jsou hodnoty délky postranního laloku průměrně nejnižší. Populace s výskytem *D. *arcana* (BIP, MTP, PEC) se mezi sebou navzájem nelišily. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 7. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 8.



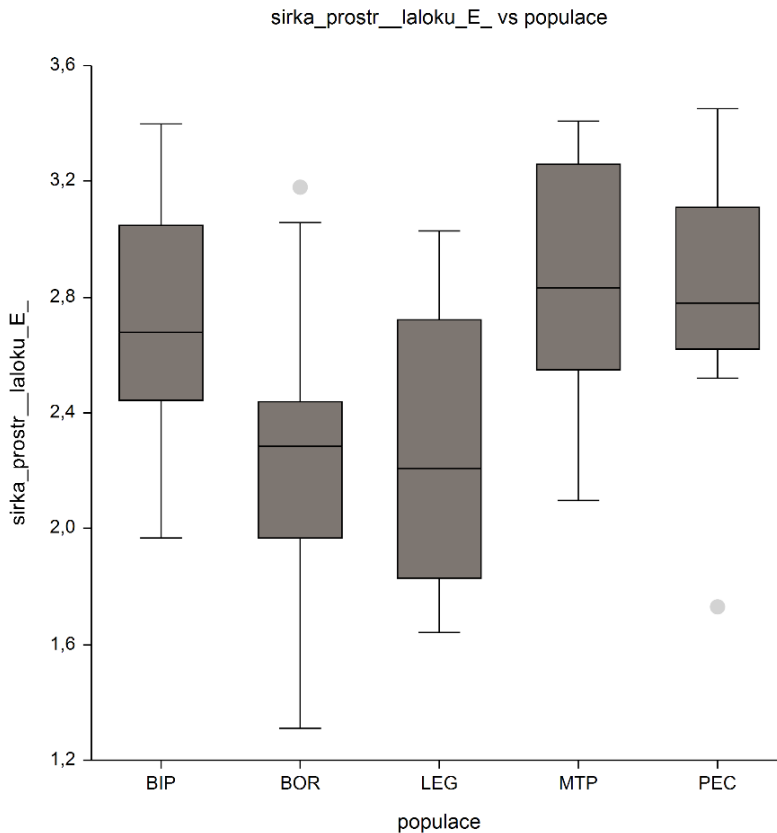
Obr. 8: Hodnoty znaku „délka postranního laloku pysku (B)“ pro jednotlivé populace. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí. Na lokalitách Bialy potok (BIP), Mútnianska pila (MTP) a Peciská (PEC) se vyskytuje *D. *arcana*, na lokalitách Borkenberge (BOR) a Leggelderveld (LEG) se vyskytuje *D. *elodes*.

Tab. 7: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „délka postranního laloku pysku (B)“. Pokud jsou populace signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns. BIP = Bialy potok, BOR = Borkenberge, LEG = Leggelderveld, MTP = Mútnianska pila, PEC = Peciská, *arc.* = *D. *arcana*, *elo.* = *D. *elodes*

B	BIP (<i>arc.</i>)	BOR (<i>elo.</i>)	LEG (<i>elo.</i>)	MTP (<i>arc.</i>)	PEC (<i>arc.</i>)
BIP (<i>arc.</i>)					
BOR (<i>elo.</i>)	ns				
LEG (<i>elo.</i>)	+	ns			
MTP (<i>arc.</i>)	ns	ns	+		
PEC (<i>arc.</i>)	ns	ns	+	ns	

4.2.1.1.3. šířka postranního laloku pysku (E)

Pro znak „šířka postranního laloku pysku (E)“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí populací. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že se populace částečně seskupují podle taxonů. Populace *D. *elodes* (BOR, LEG) se neliší mezi sebou navzájem, ale liší se od populací BIP, MTP a PEC, respektive BIP a MTP. Hodnoty tohoto znaku byly vyšší u populací *D. *arcana*. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 8. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 9.



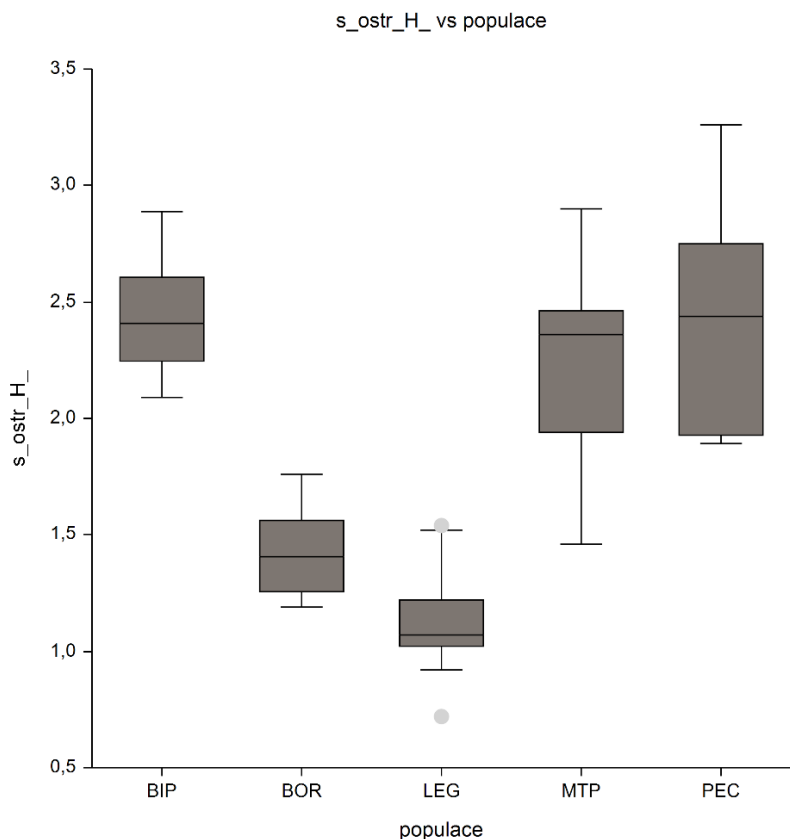
Obr. 9: Hodnoty znaku „šířka postranního laloku pysku (E)“ pro jednotlivé populace. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí. Na lokalitách Bialy potok (BIP), Mútnianska pila (MTP) a Peciská (PEC) se vyskytuje *D. *arcana*, na lokalitách Borkenberge (BOR) a Leggelderveld (LEG) se vyskytuje *D. *elodes*.

Tab. 8: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „šířka postranního laloku pysku (E)“. Pokud jsou populace signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns. BIP = Bialy potok, BOR = Borkenberge, LEG = Leggelderveld, MTP = Mútnianska pila, PEC = Peciská, *arc.* = *D. *arcana*, *elo.* = *D. *elodes*

E	BIP (<i>arc.</i>)	BOR (<i>elo.</i>)	LEG (<i>elo.</i>)	MTP (<i>arc.</i>)	PEC (<i>arc.</i>)
BIP (<i>arc.</i>)					
BOR (<i>elo.</i>)	+				
LEG (<i>elo.</i>)	+	ns			
MTP (<i>arc.</i>)	ns	+	+		
PEC (<i>arc.</i>)	ns	+	ns	ns	

4.2.1.1.4. šířka ostruhy (H)

Pro znak „šířka ostruhy (H)“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí populací. Použitím Tukeyho-Kramerova testu bylo zjištěno, že se populace seskupují podle taxonů, tedy že populace BIP, MTP a PEC se neliší mezi sebou navzájem ale liší se od populací BOR a LEG. Hodnoty tohoto znaku byly vyšší u populací *D. *arcana*. V populacích BOR a LEG jsou hodnoty tohoto znaku obecně nižší, i mezi nimi byl však nalezen signifikantní rozdíl. Výsledky Tukeyho-Kramerova testu viz Tab. 9. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 10.



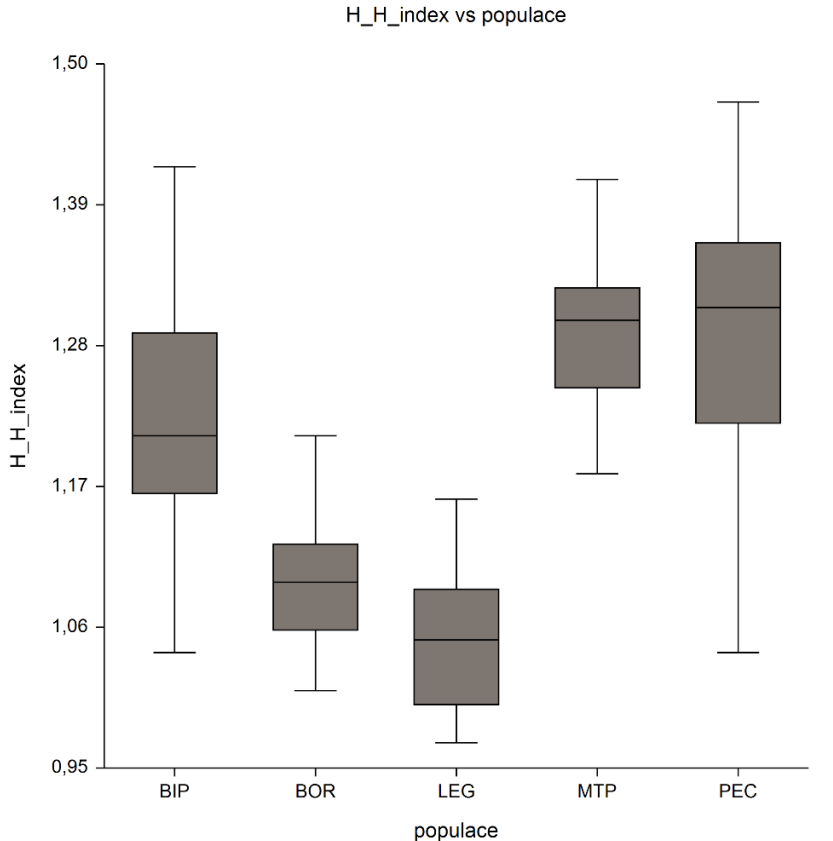
Obr. 10: Hodnoty znaku „šířka ostruhy (H)“ pro jednotlivé populace. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí. Na lokalitách Bialý potok (BIP), Mútnianska pila (MTP) a Peciská (PEC) se vyskytuje *D. *arcana*, na lokalitách Borkenberge (BOR) a Leggelderveld (LEG) se vyskytuje *D. *elodes*.

Tab. 9: Výsledky Tukeyho-Kramerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „šířka ostruhy (H)“. Pokud jsou populace signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns. BIP = Bialý potok, BOR = Borkenberge, LEG = Leggelderveld, MTP = Mútnianska pila, PEC = Peciská, *arc.* = *D. *arcana*, *elo.* = *D. *elodes*

H	BIP (<i>arc.</i>)	BOR (<i>elo.</i>)	LEG (<i>elo.</i>)	MTP (<i>arc.</i>)	PEC (<i>arc.</i>)
BIP (<i>arc.</i>)					
BOR (<i>elo.</i>)	+				
LEG (<i>elo.</i>)	+	+			
MTP (<i>arc.</i>)	ns	+	+		
PEC (<i>arc.</i>)	ns	+	+	ns	

4.2.1.1.5. Heslop-Harrisonův index (H-H_ind.)

Pro znak „Heslop-Harrisonův index“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí populací. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že se populace seskupují podle taxonů, tedy že v rámci taxonu se neliší mezi sebou, ale taxony se navzájem odlišují. V populacích *D. *arcana* byly hodnoty tohoto znaku průměrně vyšší. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 10. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 11.



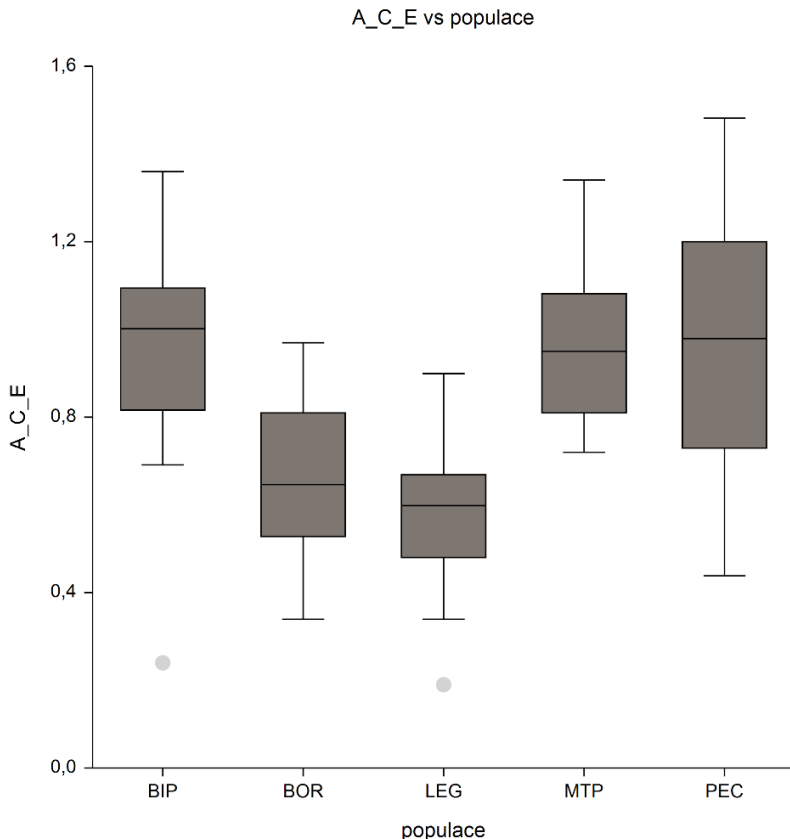
Obr. 11: Hodnoty znaku „Heslop-Harrisonův index (H-H_ind.)“ pro jednotlivé populace. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí. Na lokalitách Bialý potok (BIP), Mútnianska pila (MTP) a Peciská (PEC) se vyskytuje *D. *arcana*, na lokalitách Borkenberge (BOR) a Leggelderveld (LEG) se vyskytuje *D. *elodes*.

Tab. 10: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „Heslop-Harrisonův index (H-H_ind.)“. Pokud jsou populace signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns. BIP = Bialý potok, BOR = Borkenberge, LEG = Leggelderveld, MTP = Mútnianska pila, PEC = Peciská, *arc.* = *D. *arcana*, *elo.* = *D. *elodes*

H-H_ind.	BIP (<i>arc.</i>)	BOR (<i>elo.</i>)	LEG (<i>elo.</i>)	MTP (<i>arc.</i>)	PEC (<i>arc.</i>)
BIP (<i>arc.</i>)					
BOR (<i>elo.</i>)	+				
LEG (<i>elo.</i>)	+	ns			
MTP (<i>arc.</i>)	ns	+	+		
PEC (<i>arc.</i>)	ns	+	+	ns	

4.2.1.1.6. index délky středního laloku pysku (A-C/E)

Pro znak „index délky středního laloku pysku (A-C/E)“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí populací. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že se populace seskupují podle taxonů, tedy že v rámci taxonu se neliší mezi sebou, ale taxony se navzájem odlišují. V populacích *D. *arcana* byly hodnoty tohoto znaku průměrně vyšší. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 11. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 12.



Obr. 12: Hodnoty znaku „index délky středního laloku pysku (A-C/E)“ pro jednotlivé populace. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí. Na lokalitách Bialý potok (BIP), Mútnianska pila (MTP) a Peciská (PEC) se vyskytuje *D. *arcana*, na lokalitách Borkenberge (BOR) a Leggelderveld (LEG) se vyskytuje *D. *elodes*.

Tab. 11: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „index délky středního laloku pysku (A-C/E)“. Pokud jsou populace signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns. BIP = Bialý potok, BOR = Borkenberge, LEG = Leggelderveld, MTP = Mútnianska pila, PEC = Peciská, *arc.* = *D. *arcana*, *elo.* = *D. *elodes*

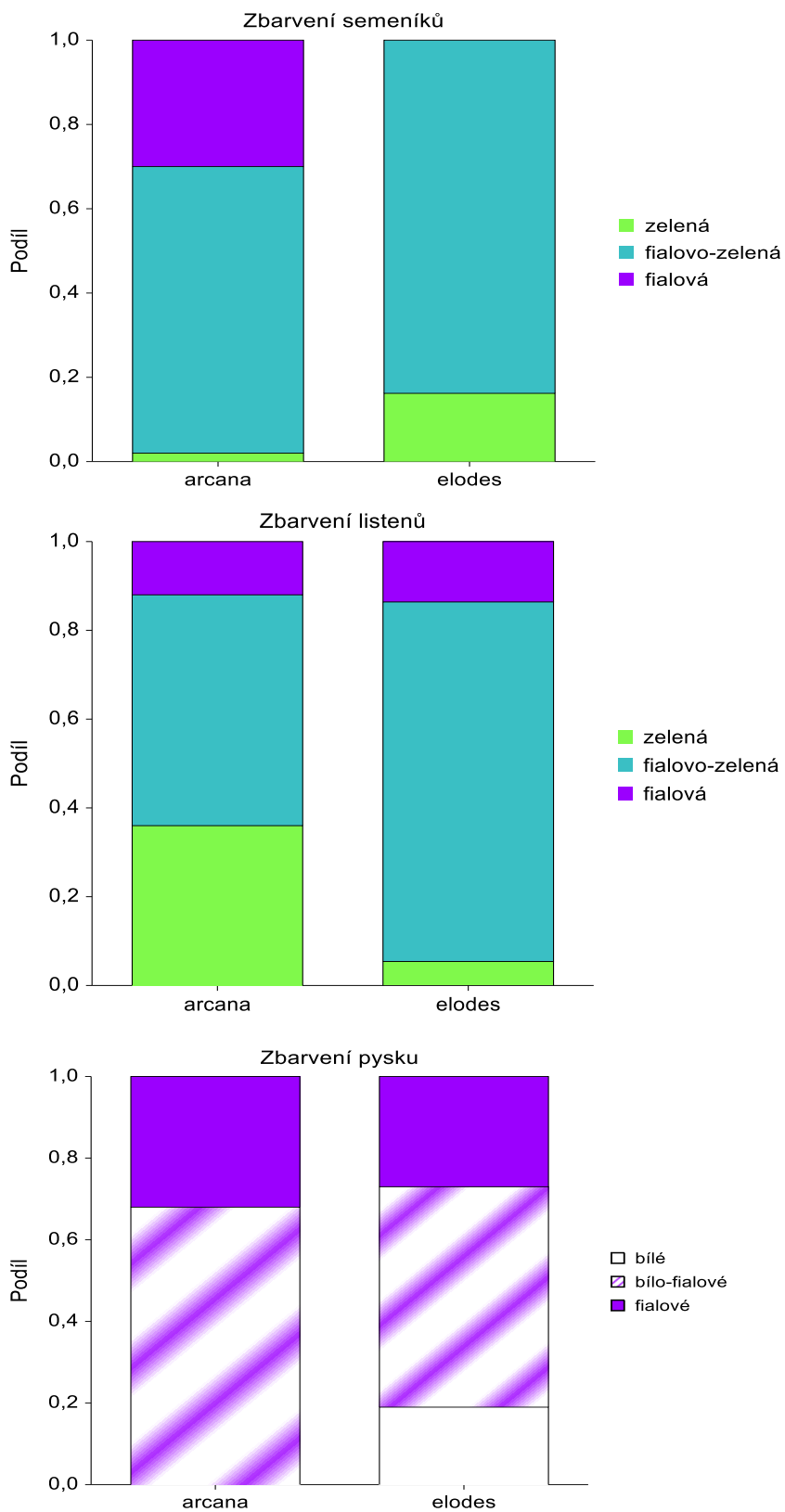
A-C/E	BIP (<i>arc.</i>)	BOR (<i>elo.</i>)	LEG (<i>elo.</i>)	MTP (<i>arc.</i>)	PEC (<i>arc.</i>)
BIP (<i>arc.</i>)					
BOR (<i>elo.</i>)	ns				
LEG (<i>elo.</i>)	ns	ns			
MTP (<i>arc.</i>)	+	+	+		
PEC (<i>arc.</i>)	ns	+	+	ns	

4.2.1.2. Kategoriální znaky

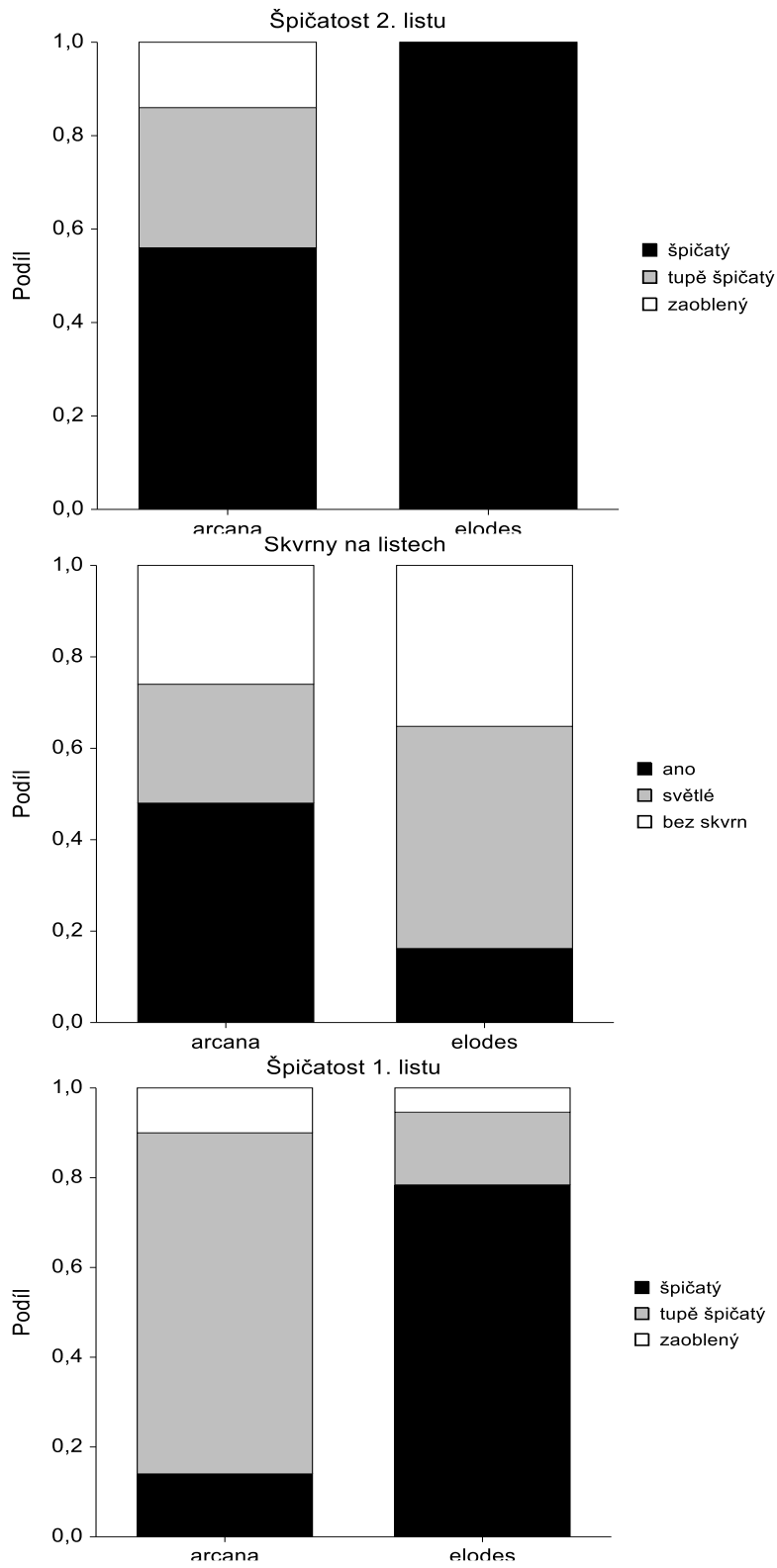
Analyzováno bylo celkem 15 kvantitativních znaků charakterizujících zbarvení a tvary rostlinných orgánů. Počty jedinců s danou hodnotou znaku u obou taxonů byly zaneseny do kontingenčních tabulek a pro jejich porovnání byl použit Pearsonův χ^2 test. Rozdíly mezi taxony vyšly jako signifikantní u 7 znaků, vysoce signifikantní ($P < 0,001$) byly rozdíly mezi taxony u znaků „zlab_L2“, „vrch_L1“ a „vrch_L2“. Kontingenční tabulky pro jednotlivé znaky a výsledky χ^2 testů viz Tab. 12. Frekvence výskytu jednotlivých kategorií znaků u obou taxonů byly vizualizovány pomocí skládaných sloupcových grafů. Vybrané grafy porovnávající znaky, u kterých byl nalezen signifikantní rozdíl viz Obr. 13.

Tab. 12: Počty jedinců v kategorii znaku pro oba zkoumané taxony 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. 1. n – velikost vzorku jedinců daného taxonu

znak	<i>D. arcana</i> (n = 50)			<i>D. elodes</i> (n = 37)			χ^2 test		
	počet jedinců v kategorii						χ^2	DF	P
	kategorie			kategorie					
	zelená	f.-zelená	fialová	zelená	f.-zelená	fialová			
b_lod	50	0	0	35	2	0	2,77	1	0,09627
b_vret	6	36	8	14	23	0	12,40	2	0,00203
b_sem	1	34	15	6	31	0	17,15	2	< 0,01
b_listenu	18	26	6	2	30	5	12,36	2	< 0,01
	kategorie			kategorie					
	bílá	růžová	fialová	bílá	růžová	fialová			
b_vne	0	35	15	1	28	8	2,01	2	0,36594
b_vnit	0	42	8	1	28	8	1,90	2	0,38676
b_pysk	0	34	16	7	20	10	10,30	2	< 0,01
b_ost	0	36	14	0	27	10	0,01	1	0,92004
	kategorie			kategorie					
	výrazně								
	plochý	mírně žl.	žl.	plochý	mírně žl.	výrazně žl.			
zlab_L1	17	25	8	1	15	21	4,07	2	0,13097
zlab_L2	5	31	14	0	16	21	20,19	2	< 0,001
	kategorie			kategorie					
	špičatý	tupě špič.	zaoblený	špičatý	tupě špič.	zaoblený			
vrch_L1	6	38	6	29	6	2	39,32	2	< 0,001
vrch_L2	28	15	7	37	0	0	21,79	2	< 0,001
	kategorie			kategorie					
	chybí	světlé	tmavé	chybí	světlé	tmavé			
skvrn	13	13	24	13	18	6	9,88	2	< 0,01
	kategorie			kategorie					
	světlá	tmavá		světlá	tmavá				
kres	4	46		8	29		3,32	1	0,06852
	kategorie			kategorie					
	delší s.	zdéli s.	kratší s.	delší s.	zdéli s.	kratší s.			
d_ost	30	20	0	23	14	0	0,04	1	0,83809



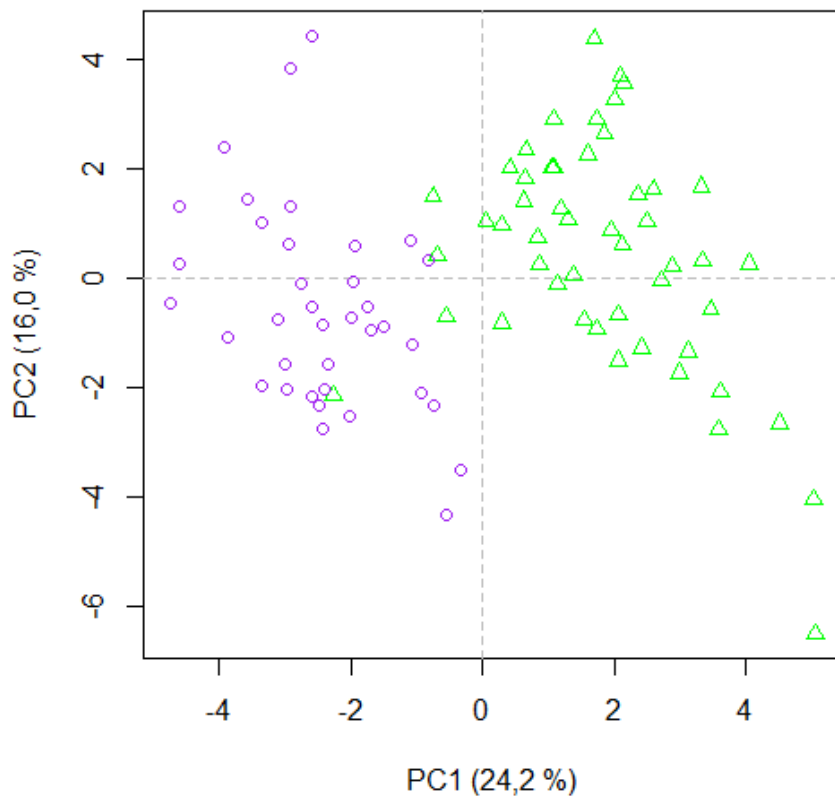
Obr. 13: Skládané sloupcové grafy četnosti výskytu jednotlivých kategorií kvalitativních znaků u obou zkoumaných taxonů. Znáznorněny jsou znaky, u kterých byl rozdíl mezi taxony signifikantní.



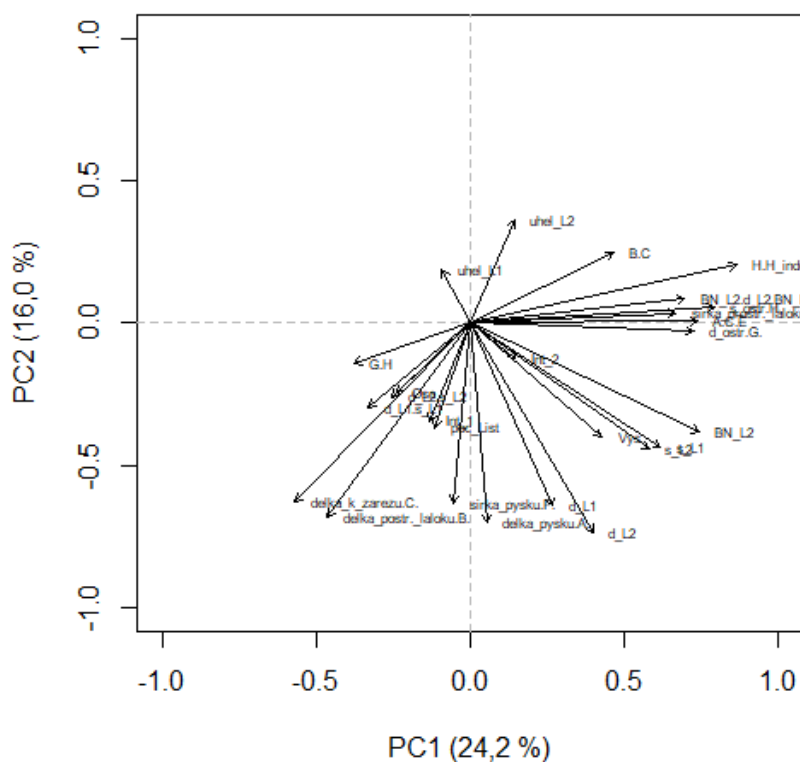
Obr. 13: Pokračování

4.2.1.3. Analýza hlavních komponent (PCA) a kanonická diskriminační analýza (CDA)

Pro porovnání celého souboru znaků u obou taxonů byla použita analýza hlavních komponent. Z důvodu silné kladné korelace mezi znaky *poc_List* a *poc_List_ns* ($r > 0,9$) byl z dalších analýz vyřazen znak *poc_List_ns*. Na grafech analýzy hlavních komponent (viz Obr. 14, 15) jsou dobře patrné dvě oddělené skupiny reprezentující porovnávané taxony (*Dactylorhiza maculata* subsp. *arcana* nom. prov a *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes*). První osa vysvětluje 24,2 % variability, druhá 16,0 %. Metodou PCA byl zjištěn také příspěvek jednotlivých znaků k rozložení jedinců v mnohazměrném prostoru (viz Obr. 8). Jako nejvýznamnější se zdají být znaky týkající se morfologie květu (H-H_ind., H, G,) určující rozložení podél první osy a morfologické znaky na listech, ale i některé znaky na květech (d_L2, BN_L2, s_L1, B, C) vysvětlující variabilitu podle první i druhé osy. Naopak znaky měřené na lodyze (Int_1, Int_2, Osa, poc_List) vysvětlují poměrně malou část variability a jsou pravděpodobně ovlivněné především celkovou vitalitou rostliny v určitých podmínkách prostředí spíše než příslušností k jednomu z taxonů.

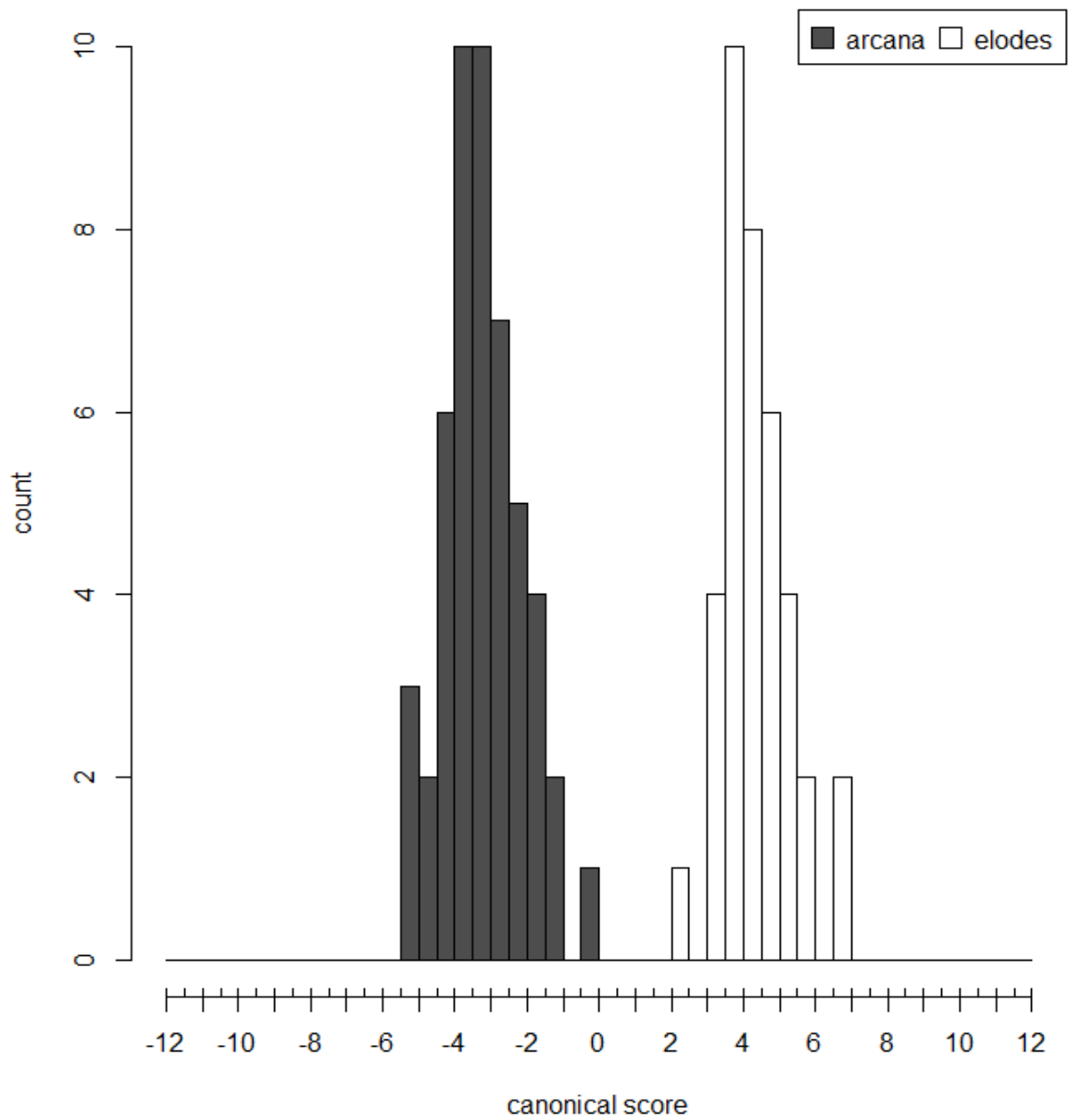


Obr. 14: Grafické znázornění analýzy hlavních komponent (PCA) pro jedince obou taxonů. Jedinci taxonu *D. *arcana* jsou označeni fialovými kolečky, jedinci taxonu *D. *elodes* jsou označeni zelenými trojúhelníčky.



Obr. 15: Grafické znázornění analýzy hlavních komponent (PCA) pro znaky.

V návaznosti na analýzu hlavních komponent byla provedena také diskriminační analýza vybírající ze znaků ty, které nejlépe odlišují zkoumané taxony. Použita byla stejná sada kvantitativních znaků jako v případě analýzy hlavních komponent. Nejvýznamnějšími znaky odlišujícími oba taxony jsou index délky středního laloku ($CCA1 = -3,53$), Heslop-Harrisonův index ($CCA1 = 1,03$), délka postranního laloku ($CCA1 = 0,67$) a šířka ostruhy ($CCA = -0,64$). Absolutní hodnoty kanonických skóre pro ostatní znaky byly nižší než 0,5. Graf kanonických skóre pro oba taxony viz Obr. 16.



Obr. 16: Celkové kanonické skóre diskriminační analýzy obou studovaných taxonů.

4.2.2. Porovnání taxonů *Dactylorhiza maculata* subsp. *arcana*, *D. majalis* a jejich předpokládaného křížence

4.2.2.1. Kvantitativní znaky

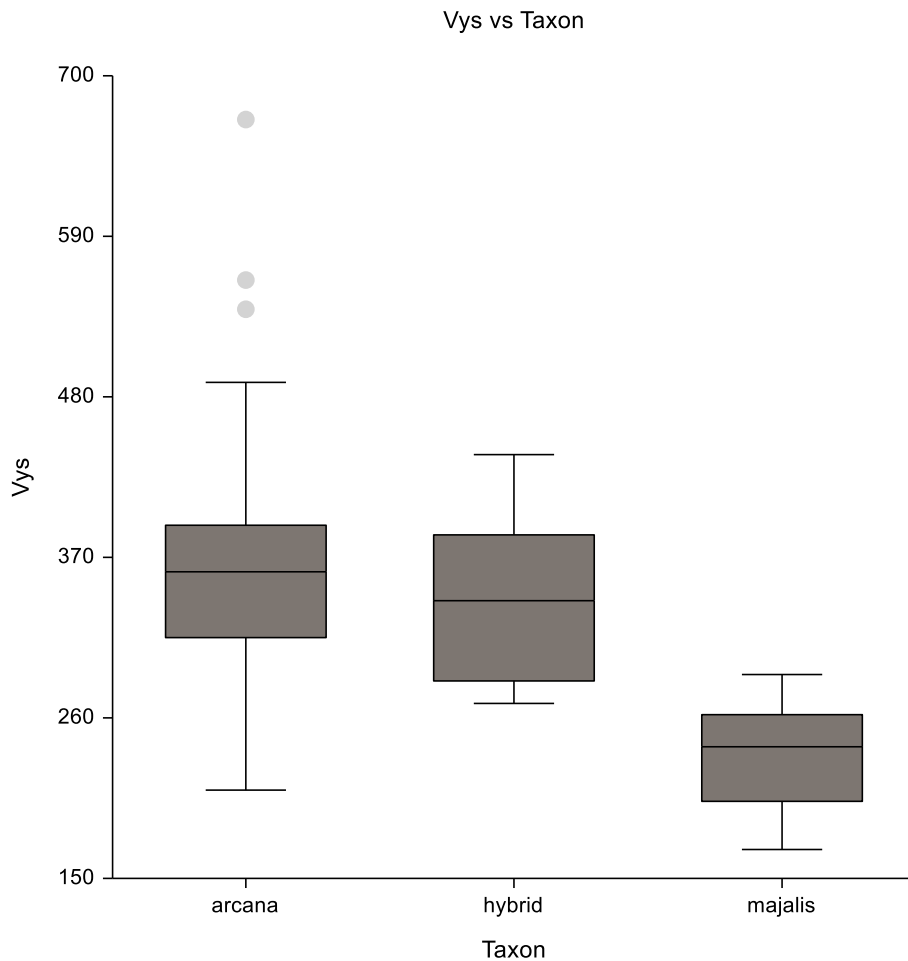
Trojice porovnávaných taxonů byla nejdříve charakterizována pomocí klasické deskriptivní statistiky. Provedeny byly také testy normality rozložení dat, které ji ve většině případů vyloučily, a proto byla pro další porovnání použita neparametrická obdoba analýzy variance, Kruskal-Wallisův test. Tabulka shrnující základní deskriptivní statistiku a výsledky Kruskal-Wallisova testu viz Tab. 13. Pro vybrané znaky s vysoce signifikantními rozdíly mezi taxony byly navíc zhotoveny krabičkové diagramy a byl u nich proveden Tukeyho-Kramerův test mnohonásobného porovnání. U žádného znaku nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi všemi třemi taxony navzájem, kříženec byl u konkrétního znaku většinou bližší jednomu z rodičovských taxonů. U některých znaků to byly ale právě hybridní rostliny jejichž hodnoty se lišily od obou rodičovských taxonů, které si byly svými hodnotami bližší. Toto může být způsobeno celou řadou faktorů, nevyjímaje malou velikost vzorků, rozdílnou stanovištní preferenci, ale například i heterózní efekt.

Znak	<i>D. arcana</i> (n = 50)				<i>D. arcana</i> x <i>D. majalis</i> (n=9)				<i>D. majalis</i> (n=10)				Kruskal-Wall. test		
	průměr	SD	min	max	průměr	SD	min	max	průměr	SD	min	max	H	P	DF
Vys	365,88	85,21	210,00	670,00	338,89	57,54	270,00	440,00	232,00	38,82	170,00	290,00	21,63	< 0,001	2
Int_1	33,00	17,65	10,00	73,00	36,33	8,12	24,00	48,00	23,20	9,16	5,00	38,00	5,04	0,080	2
Int_2	49,22	21,82	8,00	100,00	50,11	9,62	37,00	66,00	36,70	11,06	21,00	52,00	4,34	0,114	2
Osa	49,14	11,65	27,00	98,00	49,33	12,97	34,00	72,00	56,00	7,38	45,00	70,00	6,11	< 0,050	2
poc_List	5,82	1,01	4,00	8,00	3,22	0,44	3,00	4,00	3,40	0,52	3,00	4,00	38,73	< 0,001	2
poc_List_ns	2,49	1,05	1,00	5,00	1,67	0,87	1,00	3,00	1,30	0,67	1,00	3,00	12,42	< 0,050	2
d_L1	102,67	28,70	50,00	174,00	96,44	29,41	70,00	167,00	84,10	12,59	61,00	106,00	4,05	0,132	2
s_L1	16,25	3,99	10,00	29,00	15,67	2,83	12,00	21,00	24,20	4,57	19,00	32,00	19,30	< 0,001	2
BN_L1	72,44	22,37	38,00	130,00	62,89	15,32	47,00	92,00	37,60	7,34	28,00	50,00	24,38	< 0,001	2
uhel_L1	32,65	12,34	10,00	60,00	34,44	10,44	25,00	55,00	65,00	13,74	30,00	80,00	19,70	< 0,001	2
d_L2	129,45	32,42	80,00	219,00	126,33	30,89	82,00	170,00	109,30	11,85	92,00	124,00	3,39	0,184	2
s_L2	15,57	4,20	9,00	31,00	16,00	4,36	8,00	21,00	25,20	5,87	17,00	37,00	18,83	< 0,001	2
BN_L2	87,75	29,28	42,00	180,00	75,89	26,13	20,00	103,00	44,90	8,54	34,00	58,00	20,57	< 0,001	2
uhel_L2	26,76	11,91	10,00	60,00	25,56	7,68	15,00	35,00	37,00	14,18	20,00	60,00	5,18	0,075	2
listen_2	17,84	4,05	9,00	31,00	17,78	2,49	14,00	22,00	24,93	4,00	18,10	30,60	17,73	< 0,001	2
semenik_2	10,50	1,82	8,00	16,00	10,44	1,51	8,00	13,00	12,30	1,88	8,60	14,70	6,81	< 0,050	2
s_lod	2,76	0,65	1,50	4,20	3,21	0,48	2,60	3,90	3,55	0,88	2,30	5,50	11,14	< 0,010	2
A	8,85	1,21	6,26	11,92	8,71	0,73	7,58	9,49	7,48	0,48	6,24	7,99	12,04	< 0,010	2
B	7,86	1,14	5,92	10,59	7,87	0,64	7,15	9,31	5,88	0,69	4,60	7,16	21,06	< 0,001	2
C	6,16	1,19	4,14	10,06	6,65	0,48	6,06	7,34	4,83	0,62	3,75	5,72	16,85	< 0,001	2
E	2,78	0,39	1,73	3,45	3,00	0,60	1,86	4,02	2,98	0,31	2,45	3,45	3,83	0,148	2
F	10,36	1,34	7,27	13,74	10,97	0,86	9,58	12,31	9,91	1,26	8,16	12,54	5,25	0,072	2
G	9,37	1,15	7,38	12,31	9,86	1,11	7,96	11,15	10,23	0,66	9,46	11,77	6,39	< 0,050	2
H	2,36	0,36	1,46	3,26	2,89	0,32	2,49	3,38	3,00	0,36	2,30	3,53	23,70	< 0,001	2
H-H_ind.	1,27	0,09	1,04	1,47	1,20	0,09	1,02	1,32	1,41	0,09	1,25	1,53	16,32	< 0,001	2
G/H	4,06	0,81	2,38	6,57	3,43	0,38	2,84	4,13	3,46	0,44	2,84	4,34	10,96	< 0,010	2
A-C/E	0,97	0,25	0,24	1,48	0,66	0,25	0,26	0,98	0,90	0,20	0,62	1,27	10,54	< 0,010	2
B/C	1,29	0,12	1,05	1,56	1,19	0,14	1,06	1,52	1,22	0,09	1,11	1,34	8,56	< 0,050	2
d_L1/s_L1	6,44	1,63	3,44	10,53	6,16	1,36	4,28	9,28	3,59	0,83	2,38	4,55	22,12	< 0,001	2
d_L2/s_L2	8,58	2,02	5,15	13,33	8,19	1,81	4,57	10,25	4,54	1,03	2,49	5,94	23,47	< 0,001	2
L2_ind.	2,26	0,92	0,62	4,62	1,66	0,71	0,32	2,70	0,72	0,21	0,51	1,23	23,26	< 0,001	2
Vys/s_lod*poc_List	25,11	10,00	9,52	50,00	34,00	9,50	21,79	50,57	20,56	6,56	10,91	34,78	8,86	< 0,050	2

Tab. 13: Základní deskriptivní statistika pro taxony *D. *arcana*, *D. majalis* a jejich křížence spolu s výsledky Kruskal-Wallisova testu. Za signifikantní byl považován výsledek s $P < 0,05$ a takovému jsou v tabulce tučně zvýrazněny. Kódování znaků viz Tab. 1., SD = směrodatná odchylka, DF = počet stupňů volnosti

4.2.2.1.1. výška rostliny (Vys)

Pro znak „výška rostliny (Vys)“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí taxonů. Z krabičkového diagramu vyplývá, že nejvyšší hodnoty tohoto znaku mají jedinci taxonu *Dactylorhiza *arcana*. *D. majalis* má hodnoty tohoto znaku nejnižší a kříženci jsou intermediární, avšak spíše se blíží hodnotami tohoto znaku. *D. *arcana*. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 14. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 17.



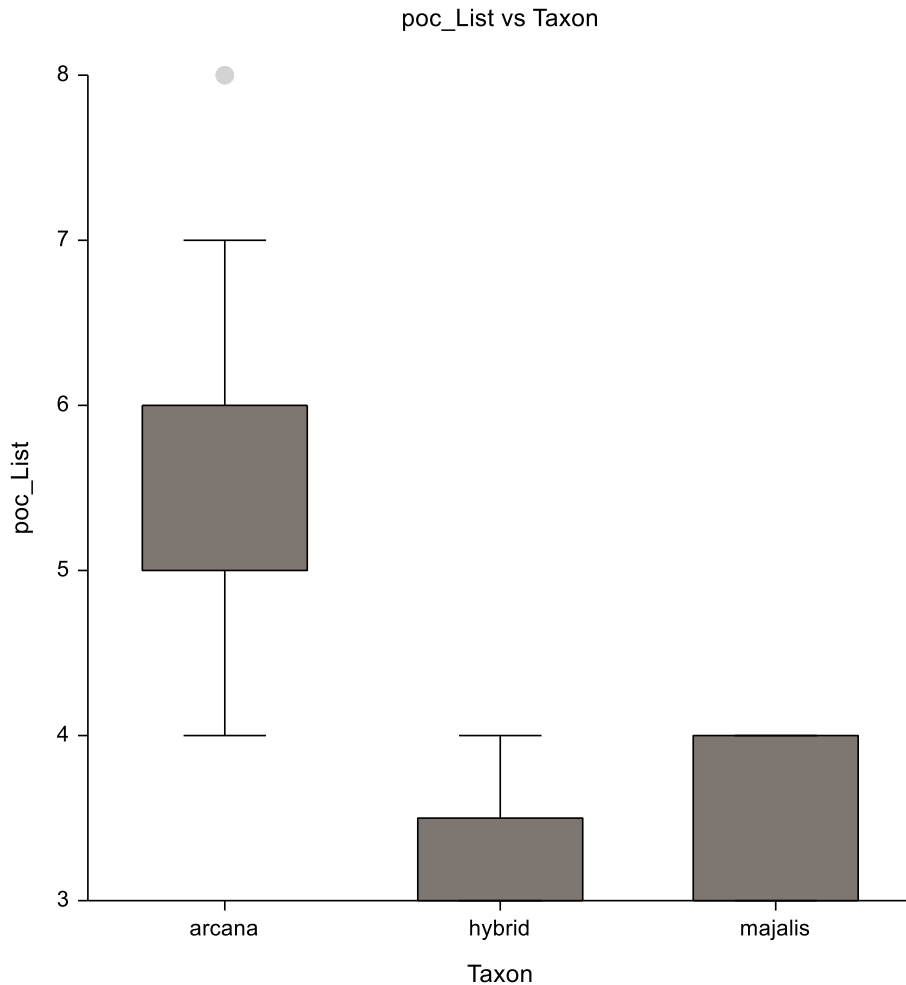
Obr. 17: Hodnoty znaku „výška rostliny“ pro jednotlivé taxony. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí.

Tab. 14: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „výška rostliny“. Pokud jsou taxony signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns.

Vys	arcana	hybrid	majalis
arcana			
hybrid	ns		
majalis	+	+	

4.2.2.1.2. počet listů (p_List)

Pro znak „počet listů (p_List)“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí taxonů. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že nejvíc se od ostatních odlišuje *Dactylorhiza *arcana*, u které byl celkový počet listů průměrně až dvakrát vyšší než u *D. majalis* a jejich křížence. Kříženec a *D. majalis* se od sebe navzájem nelišily. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 15. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 18.



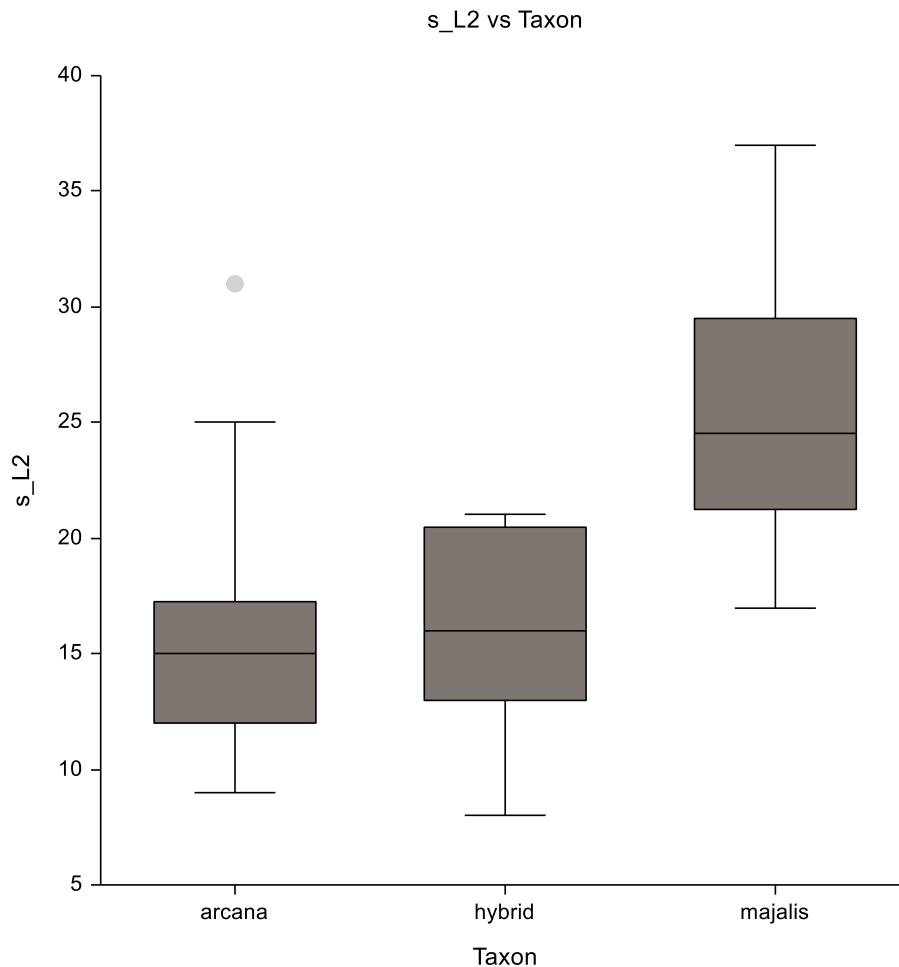
Obr. 18: Hodnoty znaku „výška rostliny“ pro jednotlivé taxony. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí.

Tab. 15: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „počet listů“. Pokud jsou taxony signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns.

poc_List	arcana	hybrid	majalis
arcana			
hybrid	+		
majalis	+	ns	

4.2.2.1.3. šířka 2. listu (s_{L2})

Pro znak „šířka 2. listu (s_{L2})“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí taxonů. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že nejvíc se od ostatních odlišuje *Dactylorhiza majalis*, u které byla šířka 2. listu přibližně 1,6krát vyšší než u *D. *arcana* a jejich křížence. Rozdíl mezi křížencem a *D. *arcana* nebyl signifikantní. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 16. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 19.



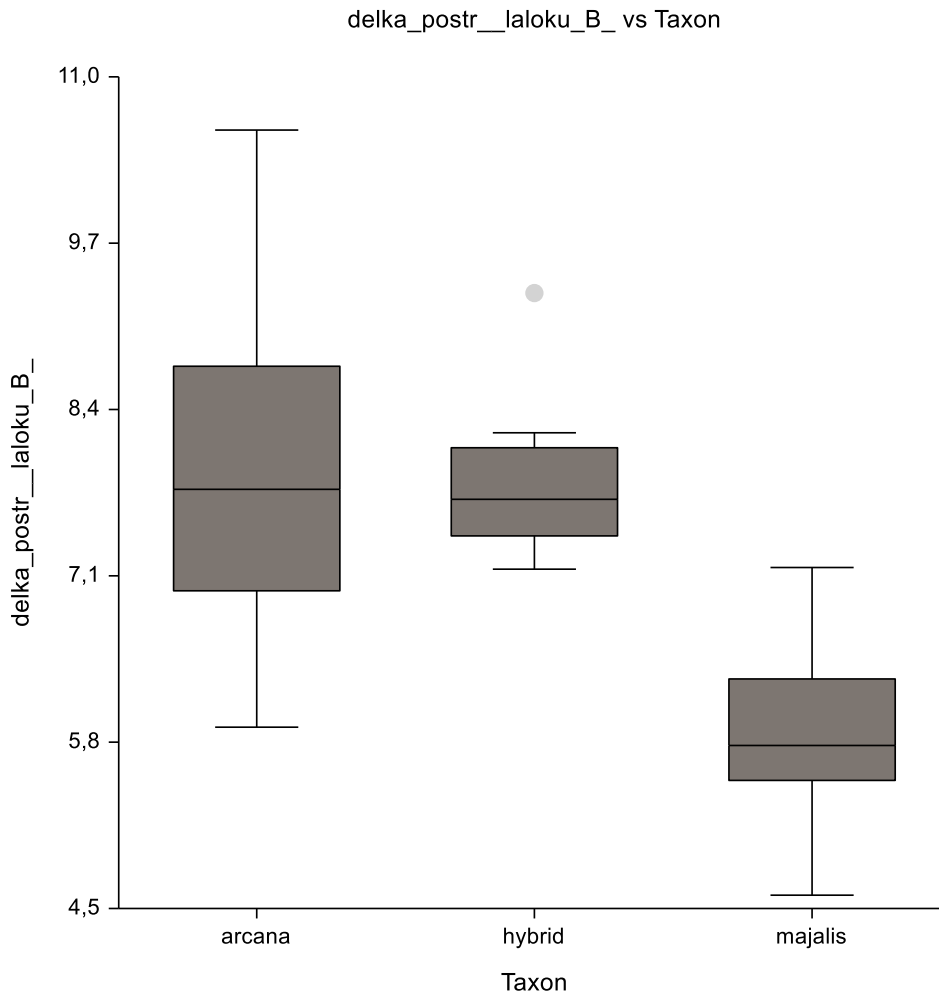
Obr. 19: Hodnoty znaku „výška rostliny“ pro jednotlivé taxony. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí.

Tab. 16: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „šířka 2. listu“. Pokud jsou taxony signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns.

s_{L2}	arcana	hybrid	majalis
arcana			
hybrid	ns		
majalis	+	+	

4.2.2.1.4. délka postranního laloku pysku (B)

Pro znak „délka postranního laloku pysku (B)“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí taxonů. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že nejvíc se od ostatních odlišuje *Dactylorhiza majalis*, u které byla délka postranního laloku pysku průměrně 1,3x nižší než u *D. *arcana* a jejich křížence. Rozdíl mezi křížencem a *D. *arcana* nebyl signifikantní. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 17. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 20.



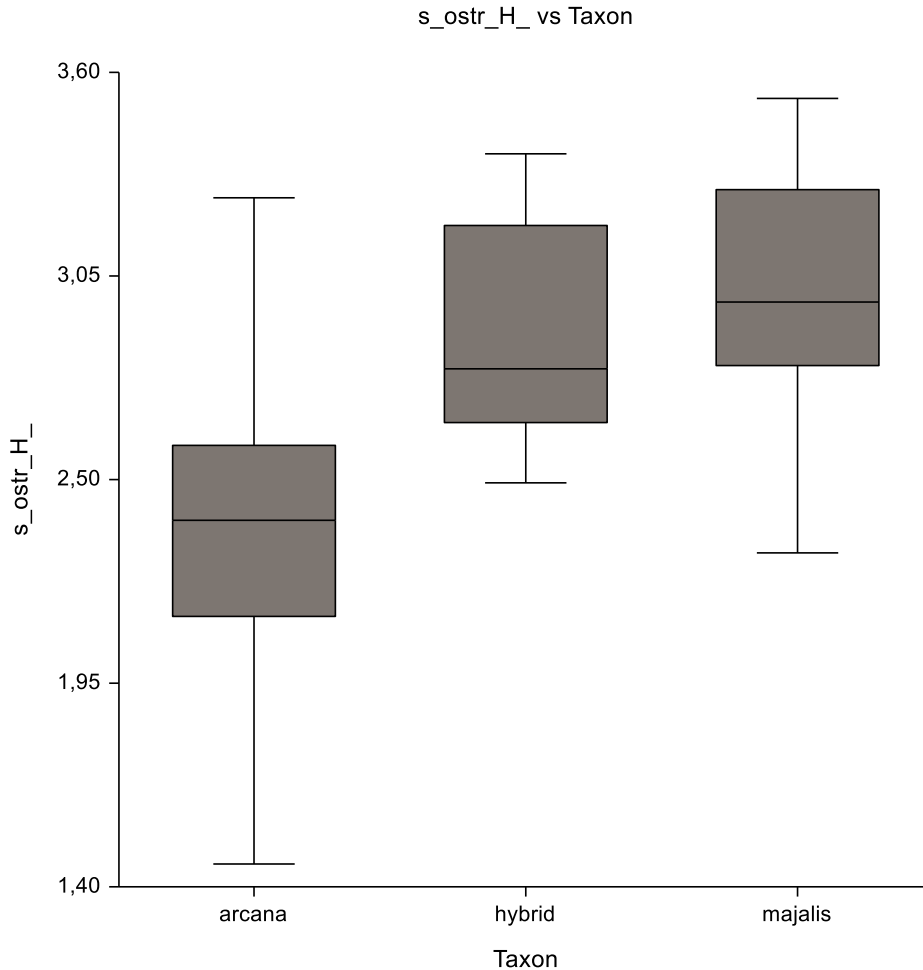
Obr. 20: Hodnoty znaku „výška rostliny“ pro jednotlivé taxony. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí.

Tab. 17: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „délka postranního laloku pysku“. Pokud jsou taxony signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označena +, pokud ne, je označena ns.

B	arcana	hybrid	majalis
arcana			
hybrid	ns		
majalis	+	+	

4.2.2.1.5. šířka ostruhy (H)

Pro znak „šířka ostruhy (H)“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí taxonů. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že nejvíc se od ostatních odlišuje *Dactylorhiza *arcana*, u které byla šířka ostruhy přibližně 1,3krát nižší než u *D. majalis* a jejich křížence. Hodnoty tohoto znaku u křížence byly intermediární, rozdíl mezi křížencem a *D. majalis* však nebyl signifikantní. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 18. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 21.



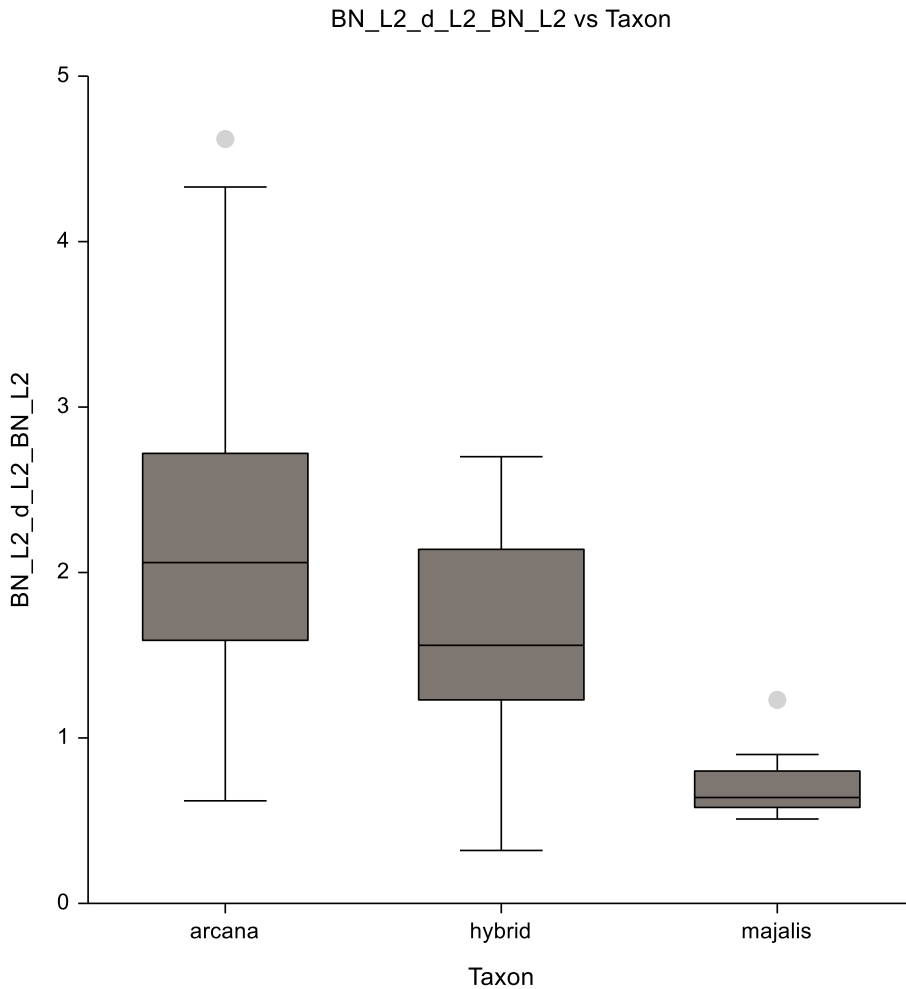
Obr. 21: Hodnoty znaku „šířka ostruhy“ pro jednotlivé taxony. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehle hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí.

Tab. 18: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „šířka ostruhy“. Pokud jsou taxony signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označena +, pokud ne, je označena ns.

H	arcana	hybrid	majalis
arcana			
hybrid	+		
majalis	+	ns	

4.2.2.1.6. index tvaru 2. listu (*L2_ind.*)

Pro znak „index tvaru 2. listu (*L2_ind.*)“ zjistil Kruskal-Wallisův test vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) mezi alespoň jednou dvojicí taxonů. Použitím Tukeyho-Krammerova testu bylo zjištěno, že nejvíc se od ostatních odlišuje *Dactylorhiza majalis*, u které byla index tvaru 2. listu přibližně 2,3krát vyšší než u hybridu a 3,2krát nižší než u *D. *arcana*. Rozdíl mezi křížencem a *D. *arcana* však nebyl signifikantní, pravděpodobně kvůli malé velikosti vzorku hybridních rostlin. Výsledky Tukeyho-Krammerova testu viz Tab. 19. Hodnoty znaků pro jednotlivé populace jsou graficky vyjádřeny pomocí krabičkového grafu viz Obr. 22.



Obr. 22: Hodnoty znaku „index tvaru 2. listu“ pro jednotlivé taxony. Tělo diagramu definuje 25. a 75. percentil, horizontální čára představuje medián a vousy ukazují rozpětí variability mezi 10. a 90. percentilem. Jako body jsou znázorněny odlehlé hodnoty vzdálené od mediánu o více než 1,5 násobek mezikvartilového rozpětí.

Tab. 19: Výsledky Tukeyho-Krammerova testu mnohonásobného porovnání pro znak „index tvaru 2. listu“. Pokud jsou taxony signifikantně odlišné ($P < 0,05$) je buňka s jejich kombinací označená +, pokud ne, je označená ns.

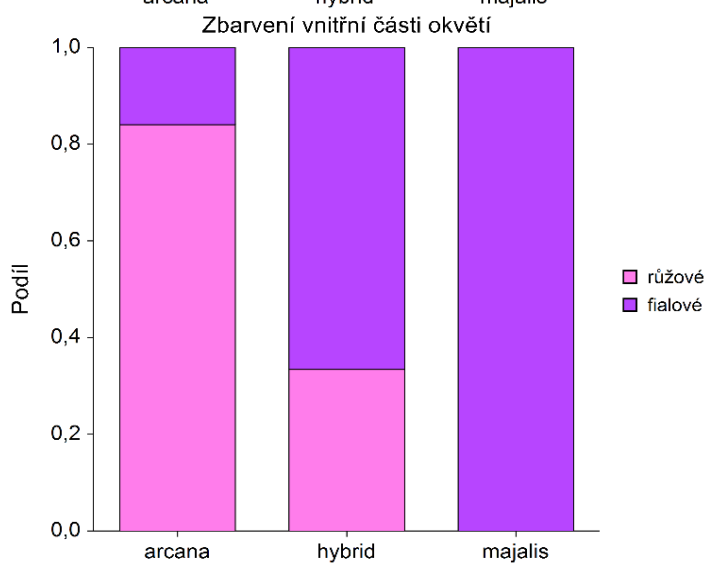
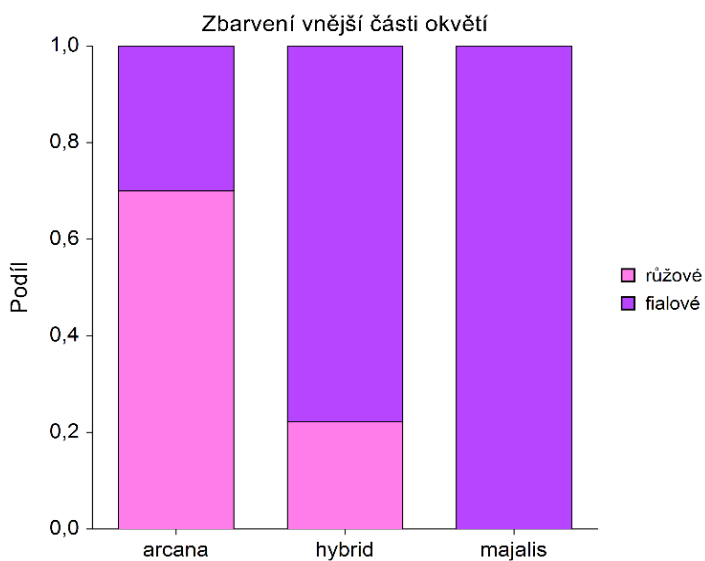
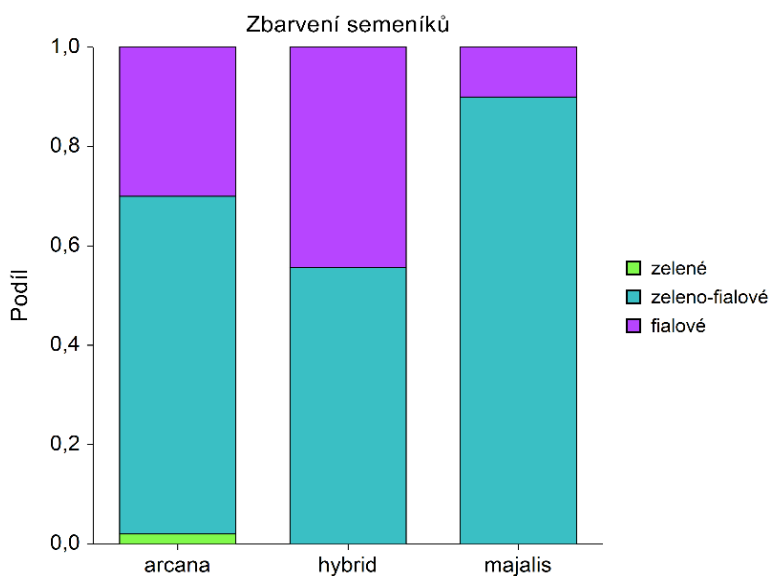
<i>L2_ind.</i>	arcana	hybrid	majalis
arcana			
hybrid	ns		
majalis	+	+	

4.2.2.2. Kategoriální znaky

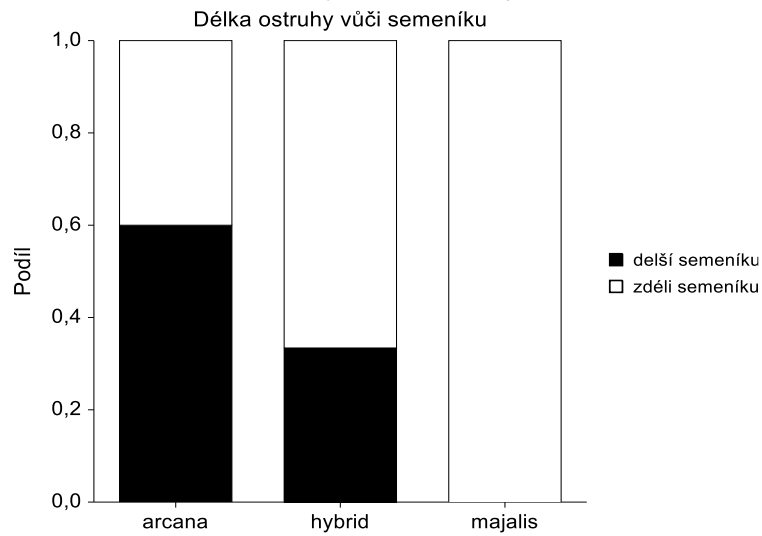
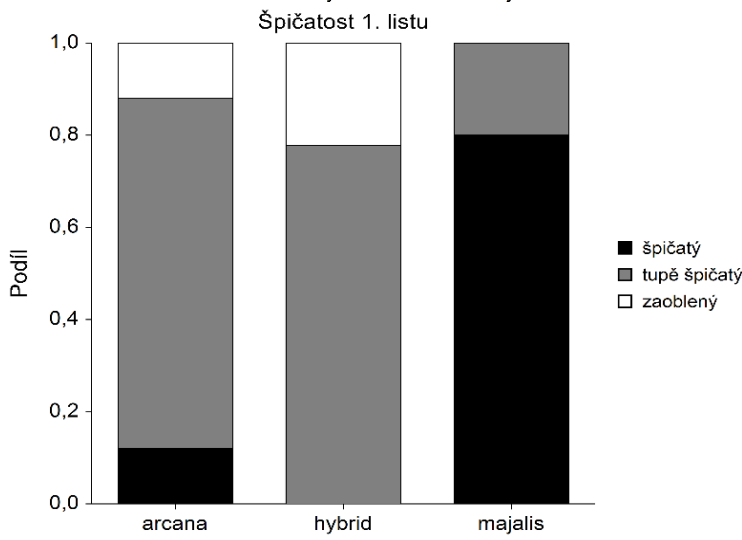
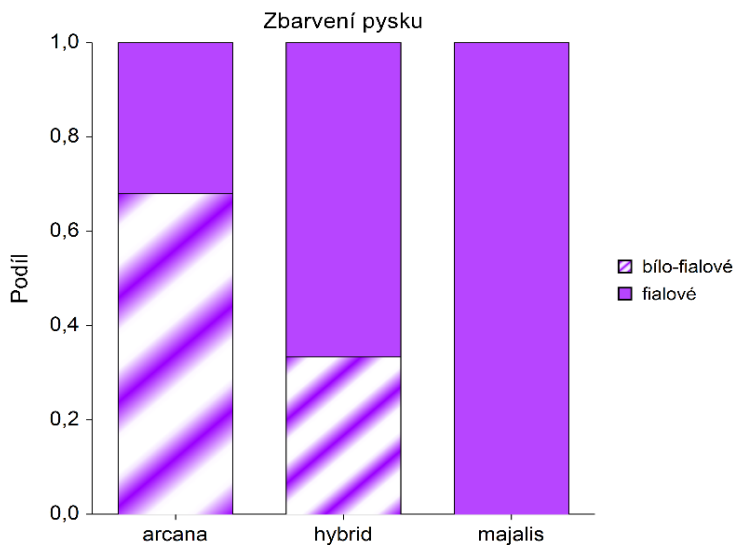
Analyzováno bylo celkem 14 kvantitativních znaků charakterizujících zbarvení a tvary rostlinných orgánů. Oproti porovnání *Dactylorhiza *arcana* a *D. *elodes* byl vyřazen znak barva lodyhy (b_Lod), jelikož při zvoleném souboru jedinců vykazoval nulovou variabilitu. Počty jedinců s danou hodnotou znaku u obou taxonů byly zaneseny do kontingenčních tabulek a pro jejich porovnání byl použit Pearsonův χ^2 test. Signifikantní rozdíly mezi taxony byly zjištěny u osmi znaků, z toho u pěti byly rozdíly vysoce signifikantní ($P < 0,001$). Kontingenční tabulky pro jednotlivé znaky a výsledky χ^2 testů viz Tab. 20. Vysoce signifikantní rozdíly byly zaznamenány u všech znaků týkajících se zbarvení květů a také u porovnání tvaru vrcholu prvního listu. Zejména v případě barvy květů byl zaznamenán intermediární charakter hybridního taxonu, jehož zbarvení bylo často tmavší než zbarvení *D. *arcana*, ale vždy světlejší, než zbarvení *D. majalis*. Vybrané znaky se signifikantními rozdíly mezi taxony byly znázorněny pomocí krabičkových diagramů (viz Obr. 23).

Tab. 20: Počty jedinců v kategorii znaku pro zkoumané taxony 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. 1. f.-zel. = fialovo zelená, stř. žl. = středně žlábkovitý, výr. žl. = výrazně žlábkovitý, tupě šp. = tupě špičatý, DF = počet stupňů volnosti

znak	arcana (n = 50)			hybrid (n = 9)			majalis (n=10)			χ^2	χ^2 test DF	P
	počet jedinců v kategorii			počet jedinců v kategorii			počet jedinců v kategorii					
	kategorie			kategorie			kategorie					
	zelená	f.-zel.	fialová	zelená	f.-zel.	fialová	zelená	f.-zel.	fialová			
b_vret	6	36	8	1	7	1	1	9	0	2,06	4	0,720
b_sem	1	34	15	0	5	4	0	9	1	3,26	4	0,520
b_listenu	18	26	6	0	9	0	1	9	0	10,35	4	< 0,050
	kategorie			kategorie			kategorie					
	růžová	fialová		růžová	fialová		růžová	fialová				
b_vne	35	15		2	7		0	10		20,52	2	< 0,001
b_vnit	42	8		3	6		0	10		30,56	2	< 0,001
b_pysk	34	16		3	6		0	10		17,21	2	< 0,001
b_ost	36	14		4	5		0	10		18,51	2	< 0,001
	kategorie			kategorie			kategorie					
	plochý	stř. žl.	vyr.žl.	plochý	stř. žl.	vyr. žl.	plochý	stř. žl.	vyr. žl.			
zlab_L1	17	25	8	1	7	1	5	4	1	3,92	4	0,420
zlab_L2	5	31	14	0	8	1	3	7	0	8,46	4	0,076
	kategorie			kategorie			kategorie					
	špičatý	tupě šp.	zaoblený	špičatý	tupě šp.	zaoblený	špičatý	tupě šp.	zaoblený			
vrch_L1	6	38	6	0	7	2	8	2	0	27,11	4	< 0,001
vrch_L2	28	15	7	3	6	0	10	0	0	13,49	4	< 0,010
	kategorie			kategorie			kategorie					
	chybí	světlé	tmavé	chybí	světlé	tmavé	chybí	světlé	tmavé			
skvrn	13	13	24	2	0	7	0	5	5	8,44	4	0,077
	kategorie			kategorie			kategorie					
	světlá	tmavá		světlá	tmavá		světlá	tmavá				
kres	4	46		0	9		0	10		1,61	2	0,450
	kategorie			kategorie			kategorie					
	delší sem.	zdéli sem.		delší sem.	zdéli sem.		delší sem.	zdéli sem.				
d_ost	30	20		3	6		0	10		12,89	2	< 0,010



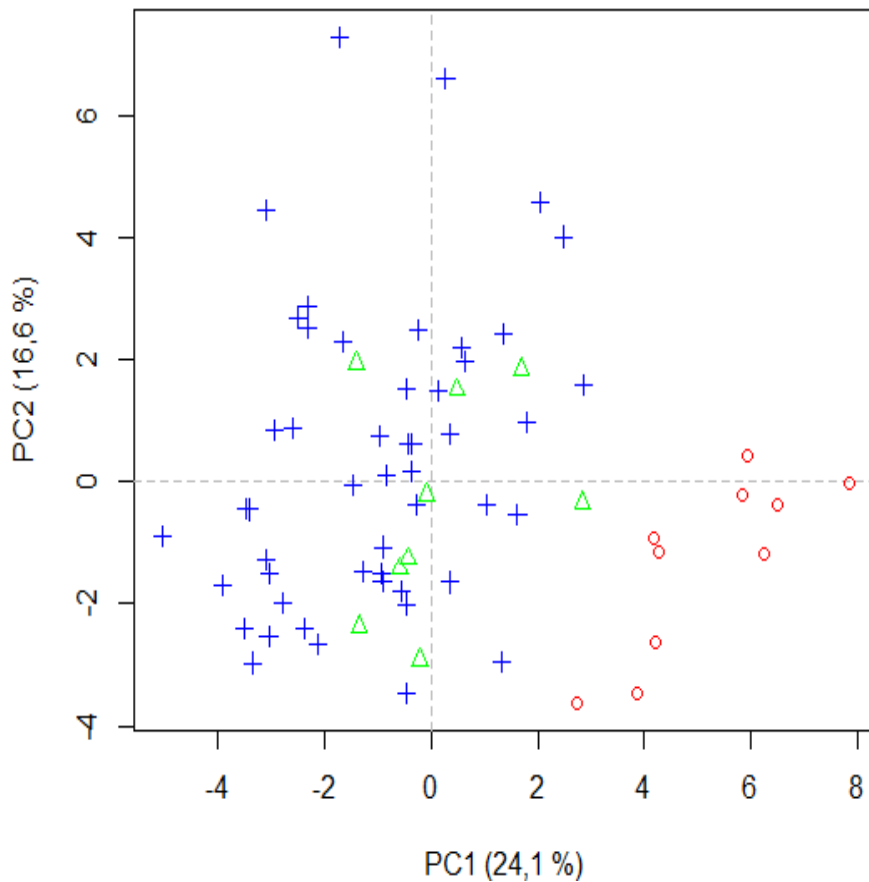
Obr. 23: Skládané sloupcové grafy četnosti výskytu jednotlivých kategorií kvalitativních znaků u zkoumaných taxonů. Hodnoty odpovídají podílu z celku. Vybrány byly znaky u kterých byl rozdíl mezi taxony signifikantní.



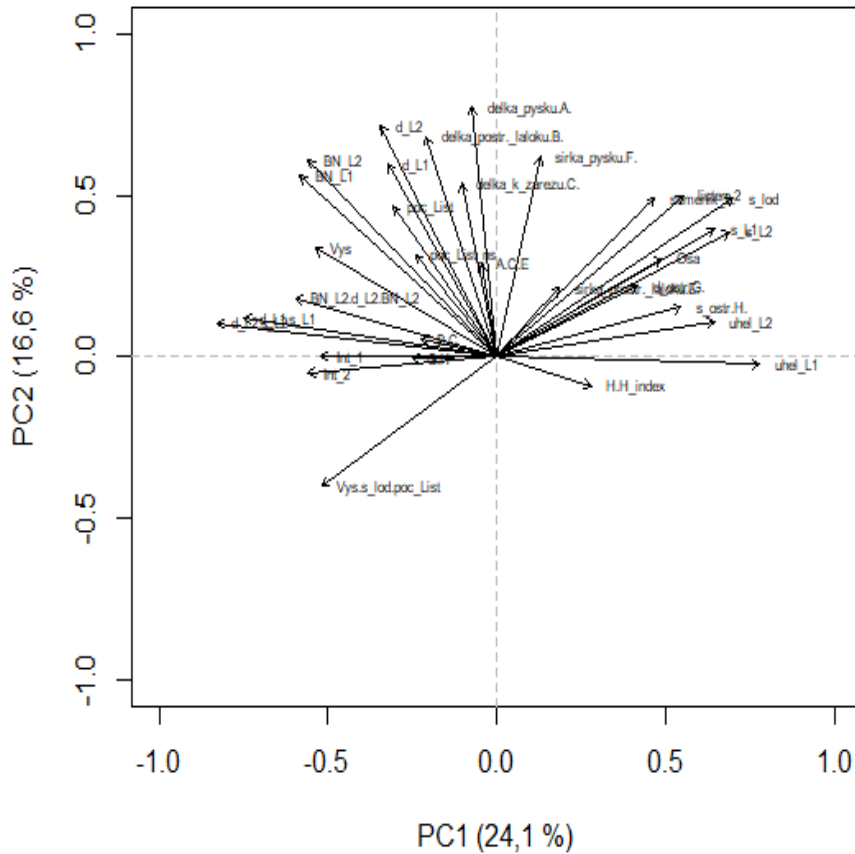
Obr. 23: Pokračování

4.2.2.3. Analýza hlavních komponent (PCA) a kanonická diskriminační analýza (CDA)

Pro porovnání celého souboru znaků u *Dactylorhiza *arcana*, *D. majalis* a jejich křížence byla použita analýza hlavních komponent. Analyzovány byly hodnoty 32 znaků, oproti porovnání *D. *arcana* a *D. *elodes* to byly navíc znaky BN_L1, listen_2, semenik_2, s_lod a L2_ind.. Na grafu analýzy hlavních komponent (viz Obr. 24, 25) jsou patrné dobře oddělené skupiny reprezentující rodičovské taxony (modré křížky a červená kolečka), symboly reprezentující hybridní jedince se podle prvních dvou os analýzy hlavních komponent slučují s *D. *arcana*. První osa vysvětluje 24,1 % variability, druhá 16,6 %. Dále byl zjištěn také příspěvek jednotlivých znaků k rozložení jedinců v mnohazměrném prostoru (viz Obr. 23). Nejvýznamnější znaky rozdělující jedince podle první osy jsou indexy tvaru 1. a 2. listu (d_L1/s_L1, d_L2/s_L2), podle druhé osy rozdělují soubor jedinců především znaky měřené na květech (délka pysku (A), délka postranního laloku pysku (B) a šířka pysku (F)). Ostatní významné znaky (BN_L1, BN_L2, d_L2, s_lod, listen_2, grac_ind.) kombinují vliv 1. a 2. osy.

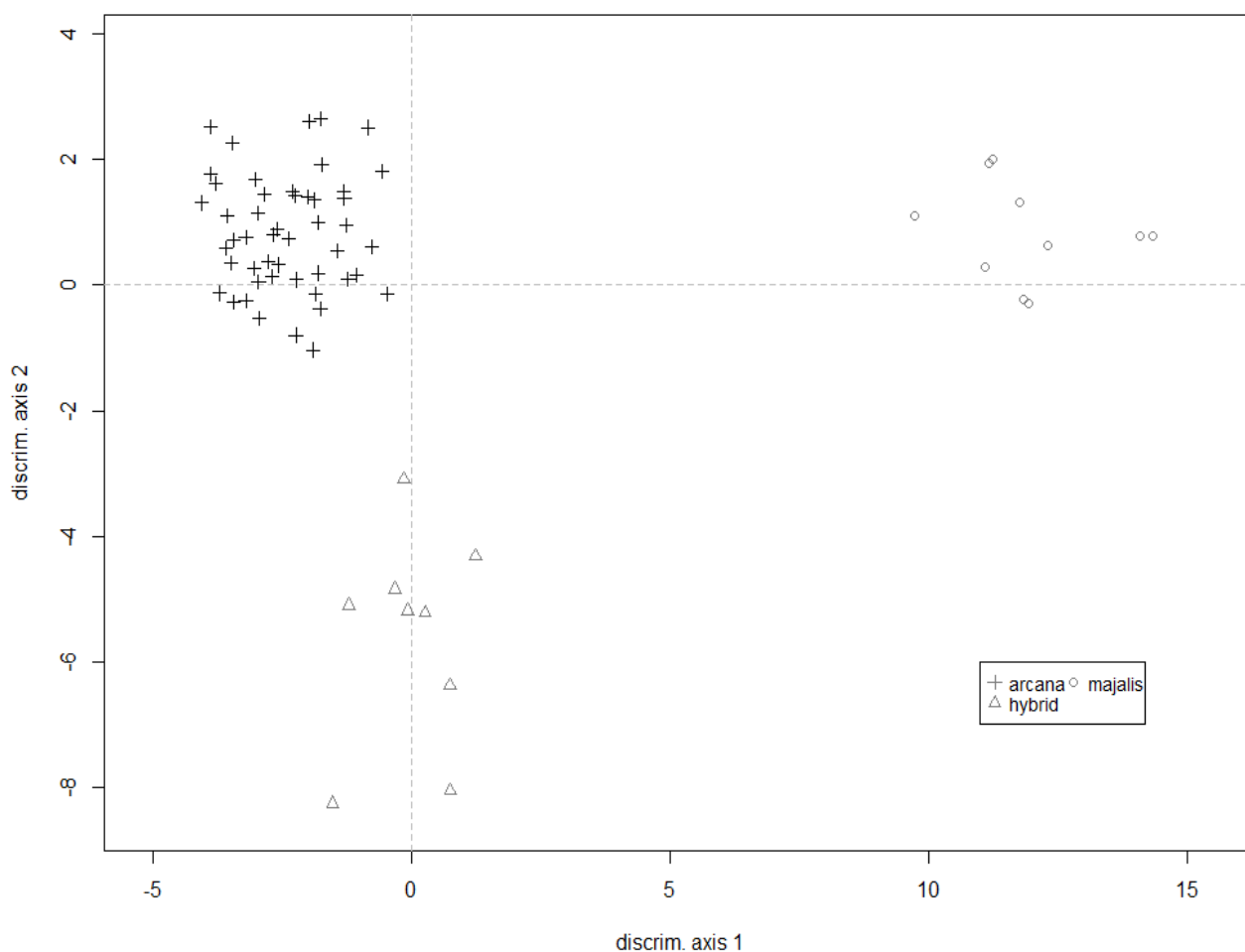


Obr. 24: Grafické znázornění analýzy hlavních komponent (PCA) pro jedince trojice zkoumaných taxonů (vlevo) a pro na nich měřené znaky (vpravo). Jedinci taxonu *Dactylorhiza *arcana* jsou označeni modrými křížky, jedinci taxonu *D. majalis* jsou označeni červenými kolečky a jejich kříženci zelenými trojúhelníky.



Obr. 25: Grafické znázornění analýzy hlavních komponent (PCA) pro měřené znaky.

V návaznosti na analýzu hlavních komponent byla provedena také diskriminační analýza vybírající ze znaků ty, které nejlépe odlišují zkoumané taxony. Použita byla stejná sada kvantitativních znaků jako v případě analýzy hlavních komponent. Diskriminační analýza odlišuje oba rodičovské taxony podél první osy a jejich křížence podél osy druhé. Nejvýznamnějšími znaky odlišujícími oba taxony jsou především znaky měřené na pysku, Heslop-Harrisonův index ($CCA1 = 4,26$, $CCA2 = 8,77$), index délky středního laloku ($CCA1 = 2,02$, $CCA2 = 1,12$), index hloubky zářezu ($CCA1 = -1,46$, $CCA2 = -5,53$) a délka pysku ($CCA1 = -1,40$, $CCA2 = -1,23$). Absolutní hodnoty kanonických skóre pro ostatní znaky byly nižší než 1. Graf kanonických skóre pro oba taxony viz Obr. 26.



Obr. 26: Grafické znázornění kanonických skóre trojice taxonů formou scatterplotu. discrim.axis 1 = CCA1, discrim.axis 2 = CCA2

5. DISKUZE

5.1. Ploidní stupeň, chromosomový počet a absolutní velikost genomu

Ploidní stupeň byl pomocí metody průtokové cytometrie zjištěn u celkem 85 jedinců tří taxonů (*Dactylorhiza *arcana*, *D. majalis*, *D. majalis* × *D. *arcana*) ze tří populací (Mútnianska pila, Bialy potok, Peciská). U 83 z nich odpovídaly naměřené hodnoty relativní fluorescence tetraploidnímu stavu, u jednoho jedince z lokality Mútnianská pila (MTP9) byla relativní fluorescence výrazně vyšší odpovídající hexaploidnímu stavu, u jednoho jedince z lokality Peciská (PEC19) byla relativní fluorescence nižší, odpovídající triploidnímu stavu. Obě rostliny s netradičními výsledky byly dvakrát přeměřeny, v případě triploidní rostliny i s jiným vzorkem standardu. Zdá se, že hexaploidní jedinci se v populacích vstavačovitých s malou frekvencí vyskytují poměrně pravidelně (Ståhlberg & Hedrén 2008, Trávníček et al. 2012, Taraška 2014), jejich vznik je pravděpodobně podmíněn splnutím redukované a neredukované gamety v semeníku mateřské rostliny (Averyanov 1979). Jako jediný možný způsob vzniku rostlin s triploidním chromosomovým počtem se jeví hybridizace mezi di- a tetraploidními rodičovskými jedinci. Jelikož se v oblasti nálezu triploidního jedince (západní okraj Tater) prokazatelně vyskytují jak tetraploidní, tak diploidní jedinci z okruhu *D. maculata* (Taraška et al. 2021) (ti sice nebyli zaznamenáni přímo na této lokalitě, přenos pylu a

zejména diaspor je však u čeledi *Orchidaceae* možný i na poměrně velké vzdálenosti; Murren 1998)), zdá se tato možnost být nejpravděpodobnějším vysvětlením výskytu triploidního jedince na lokalitě Peciská. Z důvodu předpokládané introgrese genů z diploidního rodiče tak nebyla tato rostlina zahrnuta do morfologických analýz. Navzdory stejné ploidii bylo díky rozdílnému obsahu DNA možné pomocí průtokové cytometrie rozpoznat mezi jedinci skupinu rostlin s přibližně 1,2krát menší velikostí genomu, kteří byli na základě odpovídající reaktivní velikosti genomu identifikováni jako kříženci s na lokalitách se vyskytující *D. majalis*. Hodnoty relativní fluorescence u kříženců jsou intermediární (viz Obr. 6) a mezi jedinci určeným na lokalitě na základě morfologie jako *D. *arcana* jich takto bylo rozpoznáno 7. Žádný z těchto jedinců však nebyl měřen na absolutní velikost genomu a taxonomická příslušnost byla určena pouze z relativních hodnot fluorescence vztažených k fluorescenci standardu.

Chromosomový počet se podařilo zjistit u dvou jedinců z lokality Bialy potok. Ve všech vhodně připravených preparátech s buňkami v ideální meiotické fázi byl v buňkách napočítán haploidní chromosomový počet $n = 40$, odpovídající v literatuře uváděnému $2n = 80$ (Jagiełło & Lankosz-Mróz 1988). Vzhledem k tomu, že hodnoty relativní fluorescence pro dvojici rostlin, u které byly spočítány chromosomy, nijak nevybočovaly ze souboru hodnot získaných u všech lokalit *D. *arcana*, lze se domnívat, že chromosomový počet $2n = 80$ je platný pro všechny 3 analyzované populace tohoto taxonu. I přes to však nelze vyloučit vzácný výskyt aneuploidních rostlin, navzdory tomu, že variabilita naměřených hodnot relativní fluorescence byla poměrně malá ($SD = 0,027$). Kromě rostlin sbíraných v roce 2021 na lokalitě Bialy potok byly chromosomy spočítány také u jednoho vzorku jedince sebraného v roce 2016 na lokalitě Borckenberge v Německu. I u něj byl potvrzen euploidní tetraploidní chromosomový počet pro rod *Dactylorhiza* $2n = 80$. Ačkoliv byla variabilita hodnot relativní fluorescence u západoevropských populací *D. *elodes* ještě nižší ($SD = 0,018$) ani v jejich případě nelze vyloučit vzácný výskyt aneuploidních jedinců.

U šesti jedinců *D. *arcana* (po třech z lokalit Mútninska pila a Bialy potok) byla změřena absolutní velikost genomu metodou průtokové cytometrie s použitím barvia PI (propidium-jodid). Naměřené hodnoty ($2C = 12,53$ pg, $SD = 0,11$) odpovídaly hodnotám uváděným pro tetraploidní *D. maculata* ($2C = 12,69$ pg; Ståhlberg & Hedrén 2008), byly však poněkud vyšší než hodnoty naměřené V. Taraškou u rostlin *D. *elodes* v západním Německu a Nizozemsku ($2C = 12,06$ pg, $SD = 0,17$). Je však možné, že tento rozdíl nemá reálný základ a je způsoben spíše rozdílnou metodikou než skutečným rozdílem ve velikosti genomu obou taxonů. Nelze však vyloučit ani skutečně rozdílnou velikost genomu obou taxonů vzniklou například v důsledku genetických adaptací na rozdílná stanoviště, nebo v důsledku náhodné ztráty, či naopak zisku některých genů.

5.2. Morfometrické studium

Analyzována byla morfologie celkem 110 rostlin ze dvou geografických oblastí (okolí Oravské přehradní nádrže, německo-nizozemské pohraničí) náležejících ke 4 taxonům (*Dactylorhiza *arcana*, *D. *elodes*, *D. majalis*, *D. majalis* × *D. *arcana*). Nejprve byla porovnána morfologie *D. *elodes* a *D. *arcana*. Pomocí neparametrického Mann-Whitneyho U-testu byly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly mezi 22 z 27 kvantitativních znaků a pomocí χ^2 testu u 7 z 15 kvalitativních znaků. Signifikantní rozdíly byly nalezeny i u znaků, jejichž hodnoty by mohly být výrazně ovlivněny stanovištními podmínkami a také fenologickou fází, ve které byly na rostlině měřeny

(výška, délka 1. internodia, délka květenství, počet listů, úhel 2. listu). Všechny vysoce signifikantní rozdíly ($P < 0,001$) však byly nalezeny mezi znaky, které by neměly být výrazněji ovlivněny podmínkami stanoviště a jsou proto taxonomicky mnohem významnější. Jde jednak o znaky na generativních orgánech rostlin, především pak na pysku (délka postranního laloku, délka od báze k zářezu pysku, šířka prostředního laloku, délka a šířka ostruhy, Heslop-Harrisonův index, index délky ostruhy, index délky středního laloku pysku), ale také znaky týkající se tvaru listů (šířka 1. listu, vzdálenost od báze po nejširší místo druhého listu, index tvaru 2. listu). Významnost znaků měřených na pysku pro rozlišení obou taxonů následně potvrdila i kanonická diskriminační analýza, podle které mají nejvyšší kanonické skóre znaky index délky středního laloku (CCA1 = -3,53), Heslop-Harrisonův index (CCA1 = 1,03), délka postranního laloku (CCA1 = 0,67) a šířka ostruhy (CCA = -0,64). Zatímco Heslop-Harrisonův index a šířka ostruhy jsou známy jako důležité určovací znaky pro taxony z okruhu prstnatce plamatého (Heslop-Harrison 1951, Buttler 2000) a v případě šířky ostruhy i speciálně pro *D. *elodes* (Sczepanski 2006), index délky středního laloku a délka postranního laloku se nově ukázaly být důležité pro rozlišení *D. *arcana* a *D. *elodes*. *D. *arcana* z analyzovaných populací má hodnoty indexu délky středního laloku vyšší (průměr 0,97, SD = 0,25), což v praxi znamená delší a užší tvar laloku, *D. *elodes* má hodnoty indexu délky středního laloku nižší (průměr = 0,62, SD = 0,18), což v praxi znamená kratší a širší lalok. Za mezní by bylo možné považovat hodnotu 0,8, pod kterou nekleslo 82 % jedinců *D. *arcana* a naopak ji nepřekročilo 81 % měřených jedinců *D. elodes*. V populacích je však v hodnotách tohoto indexu poměrně značná variabilita, a proto je pro spolehlivé určení potřeba vždy změřit více jedinců v populaci a při určování pracovat s populačním průměrem. Toto je také jedním z hlavních důvodů, proč bude taxon *D. *arcana* vhodné považovat pouze za poddruh *D. maculata* a nikoliv za plnohodnotný druh. Situace je podobná v případě znaku délka postranního laloku pysku. Pro tento znak nacházíme vyšší hodnoty naopak u *D. *elodes* (průměr = 9,04 mm, SD = 0,85) než u *D. *arcana* (průměr = 7,86 mm, SD = 1,14). V případě tohoto znaku navrhuji jako mezní hodnotu délky 8,6 mm, kterou přesahuje 76 % jedinců *D. *elodes* a naopak jí nedosahuje 72 % jedinců z populací *D. *arcana*. Již z těchto hodnot je však jasné, že nejde o tak dobrý determinační znak jako v případě indexu délky středního laloku a v případě jeho použití bude vždy nutné pracovat s populačními hodnotami. U vybraných kvantitativních znaků bylo provedeno také porovnání hodnot znaků na populační úrovni. U všech takto analyzovaných znaků se populace shlukovaly podle předpokládané taxonomické příslušnosti, v případě některých znaků však test mnohonásobného porovnání neoddelil populace podle taxonomické příslušnosti z důvodu podobných hodnot znaků u obou taxonů (šířka 1. listu, délka postranního laloku, index délky prostředního laloku) viz Obr. 7, 8, 12. Analýza hlavních komponent provedená na souboru kvantitativních znaků ukázala dvě skupiny korespondující s taxony poměrně dobře oddělenými podle 1. osy mnohazměrného prostoru. K tomuto rozložení podle předpokladu nejvíce přispívaly již zmiňované znaky na květech, naopak jen malý vliv na rozložení jedinců v mnohazměrném prostoru měly kvantitativní znaky související s aktuální vitalitou rostliny nebo její fenofází (délky 1. a 2. internodia, délka osy květenství, počet listů). Z analyzovaných kvalitativních znaků se nejdůležitějšími pro determinaci zdají být znaky žlábkovitost druhého listu a tvar vrcholu 1. a 2. listu pro které zjistil χ^2 test vysoce signifikantní rozdíl mezi proporcí zastoupených hladin znaku u obou porovnávaných taxonů. *D. *elodes* má v populacích výrazně větší zastoupení jedinců se silně žlábkovitým tvarem 2. listu (57 %) než *D.*

**arcana* (28 %). Jak první, tak druhý lodyžní list jsou u *D. *elodes* častěji špičaté (78 %, 100 %), než u *D. *arcana* (12 %, 56 %). Jako signifikantní vyšel rozdíl také u porovnání barvy pysku, která byla u 19 % analyzovaných jedinců *D. *elodes* čistě bílá, zatímco v populacích *D. *arcana* nebyly zaznamenány žádné rostliny s čistě bílými pysky květů. Signifikantní rozdíl byl zaznamenán i v proporcí jedinců s různou intenzitou skvrnitosti listů, přičemž u *D. *arcana* se výrazně častěji vyskytovali jedinci s kontrastními, tmavými skvrnami (48 %) než v populacích *D. *elodes* (16 %). Všechny zmiňované kvalitativní znaky tak mohou být využity pro rozlišení obou porovnávaných taxonů, vždy je však potřeba pracovat s populací jako celkem.

Pro porovnání *D. *arcana*, s domnělým křížencem *D. majalis* × *D. *arcana* byla použita i data měřená na druhém z předpokládaných rodičovských taxonů, tj. *D. majalis*. Pro tuto část práce nebylo tak důležité najít mezi taxony signifikantní rozdíly, jako ověřit polohu hodnot znaků u domnělého křížence vzhledem k domnělým rodičovským taxonům. Hybridní jedinci mají v rostlinné říši většinou intermediární vzhled, často však může vlivem tzv. heterózního efektu docházet ke vzniku jedinců s hodnotami znaků převyšujícími oba rodičovské taxony. Podobně jako v případě porovnání *D. *arcana* a *D. *elodes* byly nejprve analyzovány kvantitativní znaky, tentokrát však pomocí Kruskal-Wallisova testu, neparametrické období analýzy variance umožňující porovnání hodnot ze tří a více datových souborů. U 25 z 32 znaků byl nalezen signifikantní rozdíl alespoň mezi jednou z dvojic taxonů. Podobně jako u porovnání *D. *arcana* a *D. *elodes* šlo (zejména v případě vysoce signifikantních rozdílů) často o znaky na květech a znaky související s tvarem listů, navíc však jako vysoce signifikantní vyšlo i porovnání celkové výšky rostlin, pravděpodobně díky menší výšce rostlin druhu *D. majalis*. Intermediární hodnoty znaků byly u křížence naměřeny u pouhých 15 z 32 celkových znaků, poměrně často byly navíc hodnoty naměřené na hybridních rostlinách výrazně bližší jednomu z rodičovských taxonů. Toto zjištění je poměrně překvapivé a naznačuje, že morfologie hybridních rostlin je pravděpodobně značně ovlivněná dominantními geny jednoho z rodičů, případně i jinými, negenetickými faktory. Možným vysvětlením by mohlo být i použití jiných, než rodičovských rostlin *D. majalis* pro toto porovnání, morfologie *D. majalis* je však poměrně uniformní nezávisle na lokalitě (alespoň v rámci střední Evropy) a fenofázi a tento fakt proto nejspíš nevedl k výraznějšímu zkreslení výsledků. Naměřené hodnoty znaků lišící se od předpokladu by také mohla vysvětlovat špatná volba domnělého rodičovského taxonu, hodnoty relativní fluorescence jsou však intermediární mezi *D. *arcana* a *D. majalis* a na lokalitách se kromě *D. majalis* nevyskytuje jiný taxon s podobnou velikostí genomu. Výrazně vyšší hodnoty znaků oproti rodičovským taxonům byly zjištěny pouze u tří znaků (délka 1. internodia, šířka prostředního laloku pysku a šířka pysku), přičemž ani jeden z těchto znaků neodráží celkovou mohutnost rostlin a lze tedy konstatovat, že heterózní efekt nehraje v případě hybridizace *D. *arcana* a *D. majalis* významnou roli. I ze znaků, u kterých byly naměřeny vysoce signifikantní rozdíly mezi populacemi, je však většinou patrný pouze výrazný rozdíl mezi *D. *arcana* a *D. majalis*, zatímco hodnoty naměřené u hybridních rostlin jsou často velmi podobné hodnotám zjištěným u jednoho z rodičů. Provedená analýza hlavních komponent podle 1. osy dobře odděluje taxony *D. *arcana* a *D. majalis*, hybridní jedinci v mnohorozměrném prostoru spadají do rozmezí variability hodnot znaků *D. *arcana*. Diskriminační analýz však trojici taxonomických skupin odděluje poměrně dobře a za nejdůležitější determinační znaky považuje znaky měřené na pysku, Heslop-Harrisonův index (CCA1 = 4,26, CCA2 = 8,77), index délky středního laloku (CCA1

= 2,02, CCA2 = 1,12), index hloubky zářezu (CCA1 = -1,46, CCA2 = -5,53) a délka pysku (CCA = -1,40, CCA2 = -1,23). Pro účely porovnání *D. *arcana*, *D. majalis* a jejich křížence byly použity také kvalitativní znaky. χ^2 test porovávající procentuální zastoupení kvalitativního vyjádření znaku u různých taxonů zjistil signifikantní rozdíly ($P < 0,05$) u 8 ze 14 porovnávaných znaků, v případě znaků charakterizujících zbarvení pysku a tvar vrcholu druhého listu byly rozdíly vysoce signifikantní ($P < 0,001$). Především v případě znaků charakterizujících zbarvení květů byly proporce hladin znaku u hybridních jedinců intermediární. Zatímco u *D. *arcana* naprosto převládalo růžové (světlé) zbarvení květů (68–84 % u různých částí květů), u *D. majalis* bylo zbarvení květů uniformně fialové (tmavé) (100 % u všech částí květů). Hybridní jedinci měly květy častěji fialově zbarvené, u každé kategorie však mělo přinejmenším 22 % jedinců alespoň jednu část květu zbarvenou růžově. Zdá se tedy, že minimálně na populační úrovni lze pro alespoň orientační určení diskutovaných hybridních rostlin použít jako znak zbarvení okvětí.

5. 3. Taxonomické důsledky

Mezi rostlinami z lokalit v západním Německu a východním Nizozemsku popsány z té oblasti Grisebachem (1845) jako *Orchis elodes*, a později přesunutými do rodu *Dactylorhiza* jako *D. maculata* subsp. *elodes* Vermeulenem (1947), a rostlinami z lokalit na slovensko-polském pohraničí nedaleko předhradní nádrže Orava, tradičně považovanými slovenskými botaniky (Dítě 2002, Vlčko et al. 2003) za tentýž taxon byla nalezena řada statisticky významných a vysoce významných rozdílů a to jak u kvantitativních, tak kvalitativních znaků. Z tohoto důvodu a také vzhledem k faktu, že tyto populace se nepodobají ani žádnému dalšímu popsanému taxonu z okruhu *D. maculata* agg. (Eccarius 2016) by bylo vhodné popsat rostliny ze slovensko-polského pohraničí jako nový poddruh *D. maculata*, přičemž lze využít pracovní jméno *Dactylorhiza maculata* subsp. *arcana* nom. prov. Rank poddruh je vhodný zejména z důvodu množství kvantitativních znaků potřebných k odlišení nového taxonu a nutnosti pracovat s populačními hodnotami těchto znaků. Nový taxon bude vhodné zařadit pod druh *D. maculata* díky množství morfologických i ekologických charakteristik, které s tímto druhem sdílí (tvar pysku, charakter růstu rostlin, fenologie, typ stanoviště). Vzhledem k jasné odlišnosti oproti západoevropské *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* (a dalším poddruhům *D. maculata*) lze subsp. *arcana* považovat za endemický taxon západoslovensko-polského pohraničí (v širším kontextu endemita Západních Karpat), což by mělo vést ke zvýšenému zájmu o tyto populace i ze strany příslušných orgánů ochrany přírody a potažmo mu do budoucna zajistit lepší podmínky pro ochranu a přežití. Zvláště na lokalitě Mútnianská pila dochází v posledních letech vinou nedostatečného managementu k destrukci (silné zarůstání dřevinami) vhodných stanovišť tohoto poddruhu a intenzivnější zájem slovenské ochrany přírody o tuto lokalitu by tak jistě byl ku prospěchu.

V návaznosti na popis tohoto nového poddruhu druhu *D. maculata* by bylo vhodné popsat také jeho křížence s druhem *D. majalis*, který se poměrně často vyskytuje na všech třech navštívených lokalitách, a to jako novou nothosubspecii mezidruhového hybridu *D. ×vermeuleniana* Soó. Navzdory poměrně obtížnému odlišení hybridních rostlin jen podle morfologických znaků, především od rodiče *D. maculata* subsp. *arcana* jsou výsledky cytologické analýzy dostatečně přesvědčivé, přičemž výskyt tohoto křížence bylo možno takto potvrdit na všech třech navštívených lokalitách.

6. ZÁVĚR

V oblasti slovensko-polského pohraničí v širším okolí Oravské přehradní nádrže byly cytologicky a morfometricky analyzovány tři populace v literatuře (Dítě 2002, Vlčko et al. 2003) přiřazované k taxonu *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* popsánému z německo-nizozemského pohraničí. Cytologická i morfometrická studie byla provedena u celkem 69 jedinců a tato získaná data byla následně použita k porovnání těchto populací s populacemi *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* z oblastí jejího popisu (*area classica*) a s *Dactylorhiza majalis* z českého Slezska (okolí Vidnavy).

U drtivé většiny vzorků ze studovaných populací byl metodou průtokové cytometrie zjištěn stejný DNA-ploidní stupeň, který korespondoval s tetraploidním chromozomovým počtem $2n = 80$ zjištěným paralelně z roztakových preparátů nezralých prašníků z lokality Bialy potok a u jedné rostliny z populace Borkenberge, z areálu výskytu právě *D. maculata* subsp. *elodes*. Zkoumané vzorky populací byly převážně cytotypově homogenní, pouze na lokalitě Mútnianska pila byla nalezena jedna hexaploidní rostlina (patrně autopolyloidní, vzniklá prostřednictvím neredukovaných gamet) a na lokalitě Peciská jedna triploidní rostlina, jejíž vznik lze s největší pravděpodobností přičíst hybridizaci jedince studované populace nakonec taxonomicky odlišené jako *D. maculata* subsp. *arcana* nom. prov (viz níže) a diploidní *D. maculata* subsp. *fuchsii*, která se v oblasti západních Tater také vyskytuje (Taraška et al. 2021).

Morfometrická analýza odhalila významné rozdíly mezi *D. maculata* subsp. *elodes* z *area classica* tohoto taxonu v západní Evropě a populacemi udávanými pod tímto jménem ze slovensko-polského pohraničí, a to jak u kvantitativních, tak kvalitativních znaků. Mezipopulační rozdíly v rámci obou zmíněných oblastí naopak většinou nebyly signifikantní (šlo o 2 populace v západní Evropě a 3 populace na slovensko-polském pohraničí). Z tohoto důvodu bylo navrženo rostliny ze slovensko-polského pohraničí považovat za odlišný samostatný taxon, konkrétně nový poddruh druhu *D. maculata*. Poddruhová kategorie je pro tento taxon vhodná zejména vzhledem k tomu, že většina jeho diferenčních znaků funguje na populační (statistické), nikoliv individuální úrovni. Pro tento, v uvedené oblasti ustálený endemický poddruh, bylo navrženo pracovní jméno *D. maculata* subsp. *arcana* nom. prov. Hlavní znaky, kterými se odlišuje od *D. maculata* subsp. *elodes* jsou index délky středního laloku, Heslop-Harrisonův index tvaru pysku, délka postranního laloku a šířka ostruhy. Důležité jsou také kvalitativní znaky – nevýrazná žlábkovitost druhého listu (v populacích *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* jsou mnohem četnější rostliny s 2. listem výrazně žlábkovitým) a tupější tvar vrcholu prvního i druhého listu (u obou listů jsou v populacích právě *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* mnohem častěji zastoupeny rostliny s výrazně špičatým zakončením listů).

Na všech třech studovaných lokalitách *D. maculata* subsp. *arcana* byly nalezeny také rostliny, u nichž cytologická analýza potvrdila intermediární relativní velikost genomu v porovnání s jedinci tohoto taxonu a s rostlinami *D. majalis*, která se na lokalitách také vyskytovala. Tyto rostliny byly proto považovány za mezidruhové hybridy mezi uvedenými rodičovskými taxony. I u nich byla provedena morfometrická analýza, včetně porovnání s morfometrickými daty obou předpokládaných rodičů (použita byla data *D. *arcana* z lokalit na slovensko-polském pohraničí a data *D. majalis* z PR Vidnavské mokřiny). Ta u mnoha znaků prokázala signifikantní rozdíly mezi hodnotami znaků předpokládaného hybridu a znaků alespoň jednoho z dvojice rodičů. Poměrně překvapivě však hybridní rostliny nevykazovaly intermediární hodnoty měřených znaků, což může

být způsobeno dominancí genů jednoho nebo druhého předpokládaného rodiče pro určitý znak a/nebo silným vlivem negenetických (např. ekologických) faktorů na vzhled (fenotyp) měřených rostlin. Vedle popisu nového poddruhu *D. maculata* subsp. *arcana* by tak bylo vhodné popsat také diskutované hybridní rostliny jako novou nothosubspecii mezidruhového hybrida *D. ×vermeuleniana*.

7. LITERATURA

- Averyanov L. V. (1979): On the intraspecific structure of the taxon *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó s. l. (Orchidaceae). – Bot. Zhurn. 64: 572–582.
- Averyanov L. V. (1983a): The genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae) in the USSR. I. – Bot. Zhur. 68: 889–895.
- Averyanov L. V. (1983b): The genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae) in the USSR. II. – Bot. Zhur. 68: 1160–1165.
- Bateman R. M., Murphy A. R. M., Hollingsworth P. M., Hart M. L., Denholm I. & Rudall P. J. (2018): Molecular and morphological phylogenetics of the digitate-tubered clade within subtribe Orchidinae s.s. (Orchidaceae: Orchideae). – Kew Bulletin 73(4): 54
- Bateman R. M. (2021): Challenges of applying monophyly in the phylogenetic shallows: taxonomic reappraisal of the *Dactylorhiza maculata* group. – Kew Bulletin 76(4): 675–704
- Borsos O. (1959): *Dactylorchis fuchsii* Druce et son affinité dans les flores Hongroise et Carpatique. – Acta Bot. Acad. Hung. 5: 321–325.
- Borsos O. (1961): Geobotanische Monographie der Orchideen der pannonischen und karpatischen Flora V. – Ann. Univ. Budapest, Sect. Biol. 4: 51–82.
- 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): RADseq data track reticulate evolution. Syst. Biol. 61: 91–109.
- Buttler K.P. (2000): Orchideje. Planě rostoucí druhy a poddruhy Evropy, Přední Asie a severní Afriky. – Ikar, Praha.
- Dítě D. (2002): Taxonómia, rozšírenie, ohrozenie a ochrana rodu vstavačovec (*Dactylorhiza* Necker ex Nevski) na Slovensku. – Ms. [Rigor. pr., depon. in: FPV UMB, Banská Bystrica].
- 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. – Ann. Bot. 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.
- Dostál J. (1989): Nová květena ČSSR. – Academia, Praha.
- Druce G. C. (1915): *Orchis maculata* L. and *O. fuchsii*. – Rep. Bot. Soc. Exch. Club Brit. Isles 4: 99–108.
- Dufrêne M., Gathoye J.-L. & Tyteca D. (1991): Biostatistical studies on western European *Dactylorhiza* (Orchidaceae) – the *D. maculata* group. – Plant. Syst. Evol. 175: 55–72.

- Freudenstein J. V., van den Berg C., Goldman D. H., Kores P. J., Molvray M. & Chase M. W. (2004): An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analysis of jackknife branch support strategy. – *American Journal of Botany* 91(1): 149–157.
- Gathoye J.-L. & Tyteca D. (1987): Etude biostatistique des *Dactylorhiza* (Orchidaceae) de Belgique et des territoires voisins. – *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 57: 389–424.
- Godfery M. J. (1921): *Orchis elodes* Grisebach. – *J. Bot. (London)* 59: 305–308.
- Grisebach A. (1845): Über die Bildung des Torfes in den Emsmooren. – *Göttinger Studien*; Göttingen.
- Hedrén M. (2001): Systematics of the *Dactylorhiza euxina/incarnata/maculata* polyploid complex (Orchidaceae) in Turkey: evidence from allozyme data. – *Plant. Syst. Evol.* 229: 23–44.
- Heslop-Harrison J. (1951): A comparison of some Swedish and British forms of *Orchis maculata* L. sens. lat. – *Svensk Bot. Tidskr.* 45: 608–635.
- 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 Biol. Evol.* 8: 1996–2005.
- Jagiełło M. (1988): Analysis of population variability and distribution of species from the *Dactylorhiza maculata* group (Orchidaceae) in Poland. – *Fragm. Florist. Geobot.* 31-32: 333–383.
- Jagiełło M. & Lankosz-Mróz M. (1988): Cytotaxonomic studies in the *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó group in Poland (Orchidaceae). – *Fragm. Florist. Geobot.*, 31-32: 385–394.
- Keller G. & Soó R. de. (1940): Monographie und Iconographie der Orchideen Europas und des Mittelmeergebietes. – II. Bd. Kritische Monographie, enthaltend die Beschreibung der Arten und Unterarten, Rassen, Varietäten, Formen und Bastarde, nebst Literaturangaben und biologischen Anmerkungen. – *Feddes Repert. Sonderbeihft A*; Berlin-Dahlem.
- Koutecký P. (2015): MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. – *Plant. Syst. Evol.* 301(4): 1115–1121.
- Kubát K. (2010): *Dactylorhiza* Nevski – prstnatec. – In: Štěpánková J., Chrtěk J. & Kaplan Z. (eds.), *Květena České republiky* 8: 502–523, Academia, Praha.
- Linné C. (1753): *Species plantarum*. Tom.2. – Laurentius Salvius, p. 942.
- Murren, C. J. & Ellison (1998): Seed dispersal characteristics of *Brassavola nodosa* (Orchidaceae). – *American Journal of Botany* 85: 675–680.
- Ponert J. (2019): *Dactylorhiza* Nevski – prstnatec – In: Kaplan Z., Danihelka J., Chrtěk J., Kirschner J. Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds.), *Klíč ke květeně České republiky*: 183–187, Academia, Praha.

- Procházka F. (2002): *Orchidaceae* Juss. – vstavačovité. – In: Kubát K., Hrouda L., Chrtěk J., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. (eds.), Klíč ke květeně České republiky: 767–783, Academia, Praha.
- Průša D. (2005): Orchideje České republiky. – Computer Press, Brno.
- Rasband W. (2009): ImageJ. – National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Szczepanski S. (2006): Zur Kenntnis einer bislang wenig beachteten Unterart von *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó in Nordrhein-Westfalen: *Dactylorhiza maculata* subsp. *elodes* (Griesb.) Soó. – Jour. Eur. Orch. 38 (4): 867–896.
- Scharfenberg K. (1977): Beiträge zur Kenntnis der Sippenstruktur der Gattung *Dactylorhiza* Necker ex Nevski in den Bezirken Cottbus, Potsdam, Frankfurt (Oder) und Neubrandenburg. – Gleditschia 5: 65–127.
- Soó R. de. (1962). Nomina Nova Generis *Dactylorhiza*. Publikováno autorem, Budapest.
- Ståhlberg D. & Hedrén M. (2010): Evolutionary history of the *Dactylorhiza maculata* polyploid complex (Orchidaceae). – Biol. J. Linn. Soc. 101: 503–525.
- Ståhlberg D. & Hedrén M. (2008): Systematics and phylogeography of the *Dactylorhiza maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia: insights from cytological, morphological and molecular data. – Plant. Syst. Evol. 273: 107–132.
- Ståhlberg D. (2009): Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae). – Evol. Ecol. 23: 295–328.
- Stephenson, T. & Stephenson T. A. (1922): *Orchis elodes* Grisebach. – J. Bot. (London) 60: 337.
- Taraška V. (2014): Karyologická a morfologická variabilita okruhu *Dactylorhiza maculata* v České republice a na západním Slovensku. – Ms. [Dip. pr., Univerzita Palackého, Olomouc; online] Dostupné na: <https://theses.cz/id/5863iq/> [cit. 23.7.2022]
- Taraška V., Batoušek P., Duchoslav M., Tensch E. M., Weiss-Schneeweiss H. & Trávníček B. (2021): Morphological variability, cytotype diversity, and cytogeography of populations traditionally called *Dactylorhiza fuchsii* in Central Europe. – Plant. Syst. Evol. 307:51.
- Trávníček P., Jersáková J., Kubátová K., Krejčíková J., Bateman R. M., Lučanová M., Krajníková E., Těšitelová T., Štípková Z., Amardeilh J.-P., Brzosko E., Jermakowicz E., Cabanne O., Durka W., Efimov P., Hedrén M., Hermosilla C. E., Kreutz K., Kull T., Tali K., Marchand O., Rey M., Schiestl F. P., Čurn V. & Suda J. (2012): Minority cytotypes in European populations of the *Gymnadenia conopsea* complex (Orchidaceae) greatly increase intraspecific and intrapopulation diversity. – Ann. Bot. 110: 977–986.
- Trávníček P., Ponert J., Urfus T., Jersáková J., Vrána J., Hříbová 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. Cytom. Part. A 87:958–966.

Tyteca D. & Gathoye J.-L. (2003): Morphometric analyses of the *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó group in western Europe. – Ber. Arbeitskrs. Heim. Orchid. 20(1): 1–32.

Vermeulen P. (1947): Studies on Dactylorchids – Dizertační práce; Utrecht.

Vlčko J., Dítě, D. & Kolník M. (2003): Vstavačovitě Slovenska – Orchids of Slovakia. – Zvolen.

Vöth W. & Greilhuber J. (1980): Zur Karyosystematik von *Dactylorhiza maculata* s.l. und ihrer Verbreitung, insbesondere in Niederösterreich. – Linzer biol. Beitr. 12(2): 415–468.

Wucherpfennig W. (2004): *Dactylorhiza transsilvanica* (Schur) Soó, eine weitere diploide Sippe aus dem *Dactylorhiza maculata*-Komplex. – Jour. Eur. Orch. 36(4): 935–950.

PŘÍLOHY

Příloha 1: fotodokumentace typických jedinců *D. *arcana* (habitus, květenství, první lodyžní list, pysk květu, stanoviště). Fotografie byly pořízeny na lokalitě Bialy potok.



Příloha 2: fotodokumentace typického jedince *D. *arcana* × *D. majalis* (habitus, květenství, první lodyžní list, pysk květu, stanoviště). Fotografie byly pořízeny na lokalitě Peciská.



Příloha 3: fotodokumentace typického jedince *D. *elodes* (habitus, květenství). Fotografie byly pořízeny na lokalitě Borkenberge v západním Německu. Zveřejněny v rámci této práce jsou se souhlasem autora, Vojtěch Tarašky.

