

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie (B0511A030007)
Studijní obor: B-BI (0511RA030007)



Lenka Kuchyňková

Diverzita vrbovek (rod *Epilobium*) a metody studia jejich hybridizace

Diversity of *Epilobium* and methods to explore their hybridization

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Zdeněk Kaplan, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

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

V Praze, 19. 07. 2023

Podpis.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Zdeňku Kaplanovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a cenné rady při sestavování práce. Také bych chtěla poděkovat Bc. Tereze Klausové za podporu a pomoc při korekci textu.

Abstrakt

Vrbovka (*Epilobium*) patří mezi rody, na jehož evoluci se významně podílí mezidruhov \acute{a} hybridizace. Tento proces sice generuje evoluční novinky a m \acute{u} že v \acute{e} st ke speciaci, m \acute{u} že v \acute{s} ak m \acute{i} t za n \acute{a} sledek i genetickou erozi a extinkci. Tato pr \acute{a} ce se v \acute{e} nuje p $\acute{r$ edev \acute{s} im z \acute{a} stupc \acute{u} m rodu *Epilobium*, kter \acute{e} jsou mezidruhov \acute{a} hybridizac \acute{i} potenci \acute{a} ln \acute{e} ohro \acute{z} eni. Z \acute{c} esk \acute{e} kv \acute{e} teny je to p $\acute{r$ edev \acute{s} im skupina vz \acute{a} cn \acute{y} ch horsk \acute{y} ch vrbovek zahrnuj \acute{c} *E. nutans*, *E. alsinifolium* a *E. anagallidifolium*. Krom \acute{e} \acute{c} ast \acute{e} mezidruhov \acute{e} hybridizace pak komplikuje situaci v t \acute{e} to skupin \acute{e} i minuci \acute{z} nost rozli \acute{s} ovac \acute{y} ch znak \acute{u} .

Re \acute{s} er \acute{s} e tak \acute{e} shrnuje dostupn \acute{e} metody, kter \acute{e} mohou b \acute{y} t ke studiu mezidruhov \acute{e} hybridizace využity v r \acute{a} mci navazuj $\acute{c$ í diplomov \acute{e} pr \acute{a} ce.

Kl \acute{i} čov \acute{a} slova: *Epilobium*, mezidruhov \acute{a} hybridizace, extinkce, p \acute{r} utokov \acute{a} cytometrie, molekul \acute{a} rn \acute{i} markery

Abstract

Willowherbs (*Epilobium*) belong to the genera whose evolution is significantly affected by interspecific hybridization. Although this process often generates evolutionary novelties and leads to speciation, it can also result in genetic erosion and extinction. This thesis is mainly focused on the Czech *Epilobium* species that are potentially endangered by interspecific hybridization. The emphasis falls on the group of rare mountain willowherbs including *E. nutans*, *E. alsinifolium* and *E. anagallidifolium*. In addition to frequent interspecific hybridization, the research of this group is also complicated by the subtlety of distinguishing morphological features.

The review also summarizes the available methods that can be used to study interspecific hybridization in the follow-up thesis.

Key words: *Epilobium*, interspecific hybridization, extinction, flow cytometry, molecular markers

Obsah

1. Úvod	6
2. Mezidruhov\acute{a} hybridizace	7
2.1. Význam mezidruhov \acute{e} hybridizace v evoluci rostlin	7
2.2. Reprodukčně izolační bariéry.....	9
2.3. Ohrožení vzácných druhů mezidruhovou hybridizací	10
2.4. Hybridizace s účastí <i>Epilobium adenocaulon</i>	12
3. Charakteristika rodu <i>Epilobium</i> L.	13
3.1. Zařazení v systému cévnatých rostlin	13
3.2. Stručná charakteristika rodu.....	13
3.3. Ekologie a rozšíření.....	13
3.4. Karyologie	14
3.5. Vnitřní členění rodu a vztahy s příbuznými rody.....	14
4. Charakteristika <i>Epilobium</i> sect. <i>Epilobium</i>	15
4.1. Morfologická charakteristika rodu	15
4.2. Důležité determinační znaky	16
4.3. Karyologie	16
4.4. Charakteristika vybraných zástupců.....	18
4.4.1. <i>Epilobium nutans</i> F. W. SCHMIDT – vrbovka nicí	18
4.4.1.1. Důležité determinační znaky	18
4.4.1.2. Ekologie a rozšíření v ČR	18
4.4.2. <i>Epilobium alsinifolium</i> VILL. – vrbovka žabincolistá.....	19
4.4.2.1. Důležité determinační znaky	19
4.4.2.2. Ekologie a rozšíření v ČR	19
4.4.3. <i>Epilobium anagallidifolium</i> LAM. – vrbovka drchničkolistá.....	20
4.4.3.1. Důležité determinační znaky	20

4.4.3.2.	Ekologie a rozšíření v ČR	20
4.4.4.	<i>Epilobium palustre</i> L. – vrbovka bahenní	21
4.4.4.1.	Důležité determinační znaky	21
4.4.4.2.	Ekologie a rozšíření v ČR	21
4.4.5.	<i>Epilobium obscurum</i> SCHREB. – vrbovka tmavá	22
4.4.5.1.	Důležité determinační znaky	22
4.4.5.2.	Ekologie a rozšíření v ČR	22
5.	Metody studia mezidruhové hybridizace	23
5.1.	Průtoková cytometrie	23
5.2.	Molekulární markery	24
5.2.1.	Sekvence ITS.....	25
5.2.2.	Chloroplastová DNA.....	26
6.	Navazující diplomová práce	26
6.1.	Cíle diplomové práce	26
6.2.	Pilotní výsledky.....	27
7.	Závěr.....	27
8.	Použitá literatura.....	28

1. Úvod

Vrbovka (*Epilobium*) je celosvětově rozšířený rod zahrnující asi 250 druhů dvouděložných rostlin. Skládá se z několika sekcí, avšak v evropské květeně jsou původní pouze druhy patřící do *Epilobium* sect. *Epilobium*. Na evoluci rodu se významně podílí mezidruhovú hybridizace. Mezidruhovú hybridizaci běžně zabraňuje soubor mechanismů a vlastností označovaný jako reprodukčně-izolační bariéry. Ty však můžou být oslabeny v okamžiku, kdy se spolu dostanou do kontaktu druhy, které byly dříve delší dobu oddělené. K tomu může docházet například během biologických invazí. Pokud se početný invazní druh setká s některým ze vzácných původních druhů a začne se s ním křížit, může to mít pro málo početný druh fatální následky (Levin 2002).

Mezi ohrožené vrbovky České republiky patří skupina horských druhů zahrnující *E. nutans*, *E. alsinifolium* a *E. anagallidifolium* a dále druhy *E. obscurum* a *E. palustre*, které s horskými vrbovkami sdílí stanoviště. Tyto druhy mohou být ohroženy křížením s invazní *E. adenocaulon*, která se na našem území dramaticky rozšířila v průběhu minulého století (Smejkal 1997a).

Ačkoliv jsou jednotlivé druhy od sebou morfologicky relativně dobře odlišené, právě časté mezidruhovú křížení a minuciéznost rozlišovacích znaků výrazně komplikuje jejich studium (Smejkal 1997a, Danihelka 2019). Tato práce si tak klade za cíl sestavit ucelený přehled vzácných horských druhů vrbovek České republiky, jejich rozlišovacích znaků a jejich rozšíření. Shrnuje také současné poznatky o mezidruhovú hybridizaci, její evoluční úloze i možné roli při zániku ohrožených druhů. Důležitou součástí práce tvoří přehled metod, kterými lze mezidruhovú hybridizaci studovat a získat tak o ní nové poznatky.

2. Mezdruhová hybridizace

2.1. Význam mezdruhové hybridizace v evoluci rostlin

Pojem hybridizace označuje proces křížení dvou populací či skupin populací, které jsou odlišné alespoň v nějakém dědičném znaku (Harrison 1993). Tento fenomén je u rostlin poměrně častý, avšak je dobré zmínit, že pravděpodobně není rovnoměrně zastoupený napříč celým fylogenetickým stromem. Ellstrand a kolegové (1996) ve své studii dospěli k závěru, že ve studovaných regionech je hybridizace častá jen mezi relativně malou částí čeledí a ještě menší skupinou rodů. K podobným výsledkům došel i Whitney s kolegy (2010b), avšak přidává, že četnost hybridizace je kvůli metodologickým omezením pravděpodobně podceněná.

Nejčastěji dochází k hybridizaci mezi dvěma druhy stejného rodu, velmi vzácně se ale můžeme setkat i s mezirodovými kříženci. Nejvíce takových případů bylo zaznamenáno v čeledích *Poaceae*, *Asteraceae* a *Orchideaceae* (Whitney et al. 2010b).

Místo, kde se jednotlivé populace rostlin setkávají a poté kříží, se označuje jako hybridní zóna (Barton & Hewitt 1985). V okamžiku, kdy dochází i ke zpětnému křížení F1 generace hybridů s rodičovskými druhy a k následné tvorbě zpětných hybridů, vzniká hybridní roj (Harrison 1993). Hybridní zóny bývají většinou úzké a omezené na přímý kontakt obou rodičovských druhů (Rieseberg et al. 1999). Byly však zaznamenány i případy, kdy se hybridní genotyp ukázal jako lépe adaptovaný aktuálním podmínkám a mohl se tak rozšířit, či dokonce osídlit novou niku (Neuffer et al. 1999, Rieseberg et al. 2007). Směr selekce a fitness vzniklého křížence se tak pravděpodobně významně podílí na výsledném charakteru hybridní zóny.

Význam mezdruhové hybridizace v evoluci rostlin dlouho představoval poměrně kontroverzní téma. Rozšířený biologický koncept druhu pracuje s tím, že mezdruhová hybridizace bude spíš vzácnější a pokud k ní dojde, bude převažovat sterilní potomstvo. To staví mezdruhovou hybridizaci na úroveň krátkodobého „šumu“ či evoluční slepé uličky (Wagner 1970).

Dnes převažuje spíš názor, že tento proces hraje nemalou roli v evoluci rostlin. V důsledku mezdruhové hybridizace může docházet ke vzniku evolučních novinek, ke speciaci, ale i k zániku druhů. Bylo například ukázáno, že pokud v rámci hybridizace dochází i ke zpětnému křížení hybridů s rodičovskými druhy, může zároveň dojít k přenosu určitých adaptivních znaků z jednoho rodičovského druhu na druhý (Martin et al. 2006, Whitney et al. 2010a). Tento jev nazýváme introgrese, resp. adaptivní introgrese.

I samotný hybrid však může nést výhodnou kombinaci rodičovských znaků. Takový jedinec pak získá kompetiční výhodu nad svými rodiči, je schopný se lépe adaptovat měnícím

se podmínkám anebo obsadit novou nikou (Neuffer et al. 1999, Bleeker 2003, Rieseberg et al. 2007).

Další výhodou přináší hybridům heterózní efekt. Jedná se o obecný termín pro jev, při kterém má první generace kříženců často vyšší fitness než oba rodičovské druhy. Ačkoliv je tento jev vědcům už dlouho známý, nebyl jeho mechanismus dosud úplně objasněn (Goulet et al. 2017).

Pokud se mezi hybridem a rodičovským druhem vytvoří dostatečně silné reprodukčně-izolační bariéry, může dojít ke vzniku nového druhu. Podle toho, zda zároveň dojde i ke zmnožení chromozomové sady, rozlišujeme speciace allopolyploidní a homoploidní. Je nasnadě, že allopolyploidní mechanismus speciace zároveň poskytuje prostor pro vytvoření okamžité izolační bariéry mezi nově vzniklým druhem a jeho rodiči (Buerkle 2003). Zamezení zpětného křížení hybridu s rodičovskými druhy je důležitým krokem při vzniku nového druhu. Homoploidní speciace žádný takto elegantní vznik reprodukčně-izolační bariéry nenabízí, což je i jedním z důvodů, proč se považuje allopolyploidní způsob speciace za častější (Rieseberg & Willis 2007). Nelze ovšem tvrdit, že homoploidní speciace nenabízí žádnou možnost izolace nově vzniklého druhu od jeho rodičů. Diskutovaným mechanismem jsou například časté chromozomové přestavby, které (nejen) tento typ speciace doprovázejí (Rieseberg et al. 1999).

Polyploidizace také snižuje pravděpodobnost chyb během meiózy. Homoploidní hybrid totiž obsahuje dvě potenciálně odlišné sady chromozomů, které si mohou být natolik nepodobné, že během meiózy nedojde k jejich správnému spárování. To vede ke snížení fertility či k úplné sterilitě homoploidního hybridu (Hegarty & Hiscock 2008). Není proto překvapením, že s rostoucí divergencí rodičovských druhů roste i pravděpodobnost allopolyploidní hybridizace na úkor hybridizace homoploidní (Chapman & Burke 2007).

Hybridizace ovšem často přináší i negativní důsledky. Z výše uvedeného je patrné, že mezidruhová kříženci mohou trpět sníženou fertilitou nebo úplnou sterilitou. K tomu se často přidává i snížená životaschopnost.

Investicí do sterilního hybridního potomstva se navíc populace mohou dostat za udržitelnou mez, při které nevzniká dostatek čistého potomstva na jejich obnovu. To může vést až k zániku daného druhu (Rhymer & Simberloff 1996). Podobný účinek má ale i tvorba fertálních hybridů. Ti mohou sloužit jako prostředek pro introgresi genů mezi rodičovskými druhy. Pokud k takovému genovému toku bude docházet dostatečně dlouho, čistý genotyp jednoho z rodičů nakonec vymizí (Levin 2002). Je zřejmé, že extinkce bude častěji postihovat vzácnější druhy, není to však podmínkou (Wolf et al. 2001, Levin 2002). Příkladem může být pobřeží San Francisca, kde se původní *Spartina foliosa* kříží s nově zavlečenou *S. alternifolia*.

Ačkoliv je *S. alternifolia* na lokalitě podstatně vzácnější, produkuje mnohonásobně víc pylu než původní *S. foliosa*. To má za následek, že většina životaschopných semen původního druhu je hybridního původu (Antila et al. 1998).

2.2. Reprodukčně izolační bariéry

Na to, zda k mezidruhové hybridizaci bude vůbec docházet, má vliv existence a síla reprodukčně izolačních bariér. Jedná se o soubor mechanismů a vlastností, které předchází existenci mezidruhových kříženců nebo jejich fertilitě, a které se podílejí na udržení integrity jednotlivých druhů (Levin 1978).

Reprodukčně izolační bariéry se tradičně dělí podle fáze životního cyklu, ve které působí. Nejčastěji se lze setkat s rozdělením na prezygotické bariéry, tedy bariéry působící před vznikem zygoty, a postzygotické bariéry, tedy bariéry působící až po vzniku zygoty (Levin 1978). U rostlin se také často rozlišují prepolynační (působí před opylením) a postpolynační bariéry (působí až po něm) (Baack et al. 2015).

První nápadnou prepolynační bariéru tvoří areály rozšíření daných taxonů. Jejich prostorové rozlišení a míra překryvu určuje možnost vzájemného kontaktu druhů a tedy i to, jestli může dojít k mezidruhové hybridizaci (Dell'Olivo et al. 2011). Podobně, ale v menším měřítku, mohou být taxony odděleny i na základě rozrůzněných ekologických preferencí (Funk et al. 2006, Lowry et al. 2008, Čertner et al. 2015).

Taxony nemusí být oddělené pouze prostorově. Reprodukční izolaci lze pozorovat i v časovém měřítku, konkrétně na základě odlišností v době kvetení. Zajímavým příkladem jsou severoamerické populace *Mimulus guttatus*, které se kromě ekologických nároků odlišují i dobou kvetení (Lowry et al. 2008). Autoři této studie následně diskutují, že vzhledem k silné reprodukční izolaci se vlastně jedná o dva dobře definované biologické druhy.

Zdá se, že poměrně vlivnou prepolynační bariéru představují specifické nároky opylovačů. Vlastnosti květů, jako je jejich morfologie, barva nebo vůně, tak mají výrazný efekt na možnost přenosu pylu mezi jednotlivými druhy (Ramsey et al. 2003). Bylo například ukázáno, že dva blízce příbuzné druhy orchidejí jsou od sebe poměrně silně odděleny množinou opylovačů, kteří je navštěvují. Rozhodujícím faktorem se v tomto případě zdá být vůně květu (Whitehead & Peakall 2014).

Dalším mechanismem, pomocí kterého si nově vzniklý druh může udržet vlastní integritu, je zvýšená preference samooplození (Lowe & Abbott 2004). Přejít k samoopylení zajišťuje, že si rostlina s hybridním genotypem najde stejného partnera. Vzniklý hybrid bude mezi četnějšími rodičovskými druhy pravděpodobně v početní nevýhodě, což znesnadní jeho

spáření s dalším hybridním jedincem. Nakonec tak dojde k jeho postupnému vymizení (tzv. „minority cytotype exclusion“, Levin 1975).

K izolaci může dojít i po přenesení pylového zrna na bliznu. Pyl se v takovém případě nemusí na cizí blizně uchytit a vyklíčit. Pokud vyklíčí, pylová láčka nemusí být schopná dosáhnout vajíčka. U neotropických zázvorů s odlišnými rozměry květů pozorujeme reprodukčně izolační bariéru přesně v této vlastnosti, protože pylová láčka druhu s kratším pestíkem není schopná dorůst k vajíčku druhu s delším pestíkem (Kay 2006).

Postzygotické bariéry zahrnují snížené množství viabilních semen, omezenou životaschopnost hybridů nebo jejich případnou sterilitu. Za těmito jevy stojí různé genetické mechanismy, včetně umlčování genů a chromozomových přestaveb (Baack et al. 2015). Je však možné i to, že intermediární fenotyp hybridu nebude dobře prospívat ani v jedné z nik rodičovských druhů a na základě toho bude jeho životaschopnost snižena (Widmer et al. 2009).

Z dostupných studií vyplývá, že větší váhu mají spíše prezygotické bariéry (Baack et al. 2015). Extrémním případem jsou již zmiňované zázvory, u kterých jsou vzhledem k poměrně robustním prezygotickým bariérám ty postzygotické poměrně slabé (Kay 2006). Jako protipříklad lze uvést komplex *Chamaecrista desvauxii*, kde mezi jednotlivými variantami existují takřka výhradně postzygotické bariéry (Costa et al. 2007).

Na efektivním oddělení druhů se však v přírodě nejčastěji podílejí různé kombinace reprodukčně izolačních bariér, a to jak prezygotických, tak postzygotických. Síla a typ reprodukčně izolačních bariér navíc může záležet na tom, jaký ze dvou rodičovských druhů funguje při tvorbě hybridu jako mateřský a jaký jako otcovský (Chari & Wilson 2001, Kay 2006). To má za následek asymetrický genový tok mezi hybridizujícími populacemi (Field et al. 2010).

2.3. Ohrožení vzácných druhů mezidruhovou hybridizací

Kontakt vzácného druhu s jeho nově zavlečeným nepůvodním protějškem může představovat vážnou hrozbu pro jeho další přežití. Vzhledem k jejich předchozí geografické izolaci je možné, že reprodukčně izolační bariéry těchto druhů budou poměrně slabé (Todesco et al. 2016). Nově introdukovaný druh je navíc často početnější než původní ohrožený taxon. Pod takovým tlakem může dojít k jejich vzájemné hybridizaci.

Jak již bylo naznačeno, problémem může být samotná hybridizace a to i za předpokladu, že vznikající kříženci jsou sterilní. Reprodukční úsilí investované do tvorby sterilních hybridů je totiž z hlediska zachování druhu vlastně ztracené (Rhymer & Simberloff 1996). V podobné situaci se možná ocitl český endemit *Cerastium alsinifolium*, který se kříží se svým častějším

souputníkem *Cerastium arvense*. Ačkoliv mezi těmito druhy nebyla prokázána tvorba zpětných kříženců, intenzita mezidruhové hybridizace mezi *C. alsinifolium* a *C. arvense* je poměrně vysoká (Vít et al. 2014). Mikrostanoviště endemita nebylo navíc v tomto případě v minulosti dobře identifikováno, a tedy ani primárně chráněno. Další ochranné úsilí by tak mělo směřovat k zamezení šíření *C. arvense* do těchto nově rozpoznávaných mikrostanovišť (Vít et al. 2014). Zmíněná studie tak podtrhuje důležitost podobně orientovaných biosystematických studií.

Se zvýšeným rizikem mezidruhové hybridizace souvisí i narušení přirozeného stanoviště ohroženého druhu. Různé, často člověkem způsobené disturbance totiž mohou vést ke kontaktu dříve izolovaných druhů. Hrozbou v tomto případě může být jak nově zavlečený, tak i původní taxon (Rhymer & Simberloff 1996). Vhodnou ilustraci tohoto problému poskytuje endemit Kanárských ostrovů *Argyranthemum coronopifolium*. Tento druh se hojně kříží s početnějším *Argyranthemum frutescens*, a to údajně do takové míry, že v přírodě zbývá pouze pár geneticky čistých jedinců (Levin 2002). Hybridizace těchto druhů byla pravděpodobně umožněna stavbou silnic. Nové silnice totiž fungují jako skvělé migrační trasy, pomocí kterých se mohl *A. frutescens* dostat na nové lokality. Kříženci navíc pro svůj růst preferují světliny, které vznikají v důsledku stavebních prací (Brochmann 1984).

Podobně český subendemit *Viola lutea* subsp. *sudetica* se kříží s *Viola tricolor*. *Viola tricolor* bývá do horských oblastí zavlekována s vápencovým šterkem (Krahulcová et al. 1996). Mezi druhy dochází ke zpětnému křížení a rozsah rozšíření hybridů se za dobu sledování výrazně rozrostl. Kříženci se vyskytují především na lokalitách s častou disturbancí, hlavně v okolí silnic. Zajímavé je, že hybridy v tomto případě obsadily i úplně nové niky, na kterých se předtím žádný druh z rodu *Viola* nevyskytoval (Krahulcová et al. 1996).

Lehce odlišné hrozbě je vystaven rakouský endemit *Knautia carinthiaca*. Ten je od hojnějšího druhu *Knautia arvensis* relativně dobře oddělen svými ekologickými preferencemi, avšak může se s ním křížit na stanovištích přechodného charakteru (Čertner et al. 2015). *Knautia carinthiaca* je v současnosti známá z jediné lokality. Od *K. arvensis* ji zde dělí pás lesa, na jehož okraji však vzniká hybridní roj. Pokud by pokračovala ruderalizace této lokality, mohlo by dojít k dalším kontaktům *K. carinthiaca* a *K. arvensis* a tedy i k výraznějšímu ohrožení endemického druhu hybridizací (Čertner et al. 2015).

Nezanedbatelné riziko představuje také křížení původních druhů s jejich člověkem využívanými příbuznými. Zplanělé jedince těchto užitkových druhů je navíc často těžké odlišit od jedinců původního druhu, což poměrně komplikuje jejich studium. Mezi takto ohrožené taxony patří třešeň *Prunus fruticosa*, která se v přírodě kříží dokonce se dvěma dalšími druhy

z rodu *Prunus*. S nepůvodní *Prunus cerasus* tvoří fertillní homoploidní hybridy, kteří jsou schopni zpětného křížení s rodičovskými druhy (Macková et al. 2018).

Kabátová s kolegy (2014) se ve své práci zabývali taxonomicky poměrně složitou skupinou leknínů (rod *Nymphaea*), jejichž určování komplikují mimo jiné zplanělé zahradní kultivary a mezidruhovú hybridizace. Stejně jako v první zmíněné studii (Macková et al. 2018), i zde se při identifikaci původních rostlin a zplanělých kultivarů osvědčila průtoková cytometrie. V tomto případě se ukázalo, že oba studované druhy leknínů, které jsou pro území České republiky původní, spolu hybridizují jen vzácně (Kabátová et al. 2014).

2.4. Hybridizace s účastí *Epilobium adenocaulon*

Příkladem rostliny, která se nově rozšířila na území České republiky a která tak má potenciál se křížit s místními původními druhy, je vrbovka žláznatá (*Epilobium adenocaulon*, donedávna známá spíše pod jménem *E. ciliatum*). Tento druh se v průběhu minulého století rozšířil ze Severní Ameriky do Evropy a rychle zde zdomácněl (Smejkal 1997a). Objevily se i různé doklady o tom, že se *E. adenocaulon* kříží s místními druhy rodu *Epilobium*. Bleeker a kolegové (2007) se zabývali mezidruhovú hybridizací mezi původními a nepůvodními německými druhy a zjistili, že *E. adenocaulon* zde tvoří hybridy se sedmi(!) původními druhy. Intenzita této hybridizace a míra ohrožení původních vrbovek zůstává kvůli nedostatku dat stále nezodpovězenou otázkou (Bleeker et al. 2007).

Kříženci vrbovek se vyznačují značnou sterilitou. Mají obvykle zkrácené tobočky, které jsou kratší než u obou rodičovských druhů a často se ani neotvírají. Obsahují převážně zakrnělá semena a jen malý podíl ± velikostně normálních semen, obvykle intermediárního vzhledu. Květenství a plodenství kříženců jsou nápadně prodloužená a bohatá. Na vegetativních částech se podobně jako u semen kombinují znaky obou rodičů (Daníhelka 2019).

V České republice bylo dosud zjištěno 10 hybridních kombinací s účastí *E. adenocaulon* (Smejkal 1997a, Daníhelka 2019). Mezi původními druhy postiženými hybridizací byly zjištěny i druhy horských vrbovek (Krahulec 1999), které patří mezi ohrožené druhy (Grulich 2012). Rozsah této hybridizace a míra ohrožení populací našich původních horských vrbovek však zůstává neznámá.

Tato práce si klade za cíl sestavit přehled diverzity a rozšíření našich horských vrbovek a ukázat možné metody studia jejich mezidruhovú hybridizace. Vlastní navržený výzkum bude cílem navazující diplomové práce.

3. Charakteristika rodu *Epilobium* L.

3.1. Zařazení v systému cévnatých rostlin

(Podle Angiosperm Phylogeny Group 2016, Wagner et al. 2007)

Oddělení: *Magnoliophyta*

Třída: *Rosopsida*

Řád: *Myrtales*

Čeleď: *Onagraceae*

Podčeleď: *Onagroideae*

Rod: *Epilobium*

3.2. Stručná charakteristika rodu

Vzhledem k zaměření práce bych v této podkapitole chtěla především představit diverzitu rodu a způsoby, kterými se zástupci ostatních sekcí odlišují od sekce *Epilobium* rozšířené ve střední Evropě. Detailnější morfologická charakteristika této sekce viz kapitola 4.

Celý rod zahrnuje jak jednoleté (sect. *Boisduvalia*, sect. *Epilobiopsis*, sect. *Crossostigma*, sect. *Xerolobium*) tak víceleté byliny. Mezi charakteristické znaky patří pyl uvolňovaný v tetradách (velmi zřídka však i jednotlivě), zřetelné hypanthium, vykrojené korunní lístky a chalazální chochol chmýru na vrcholu semene (vyjma sekundární ztráty u sect. *Boisduvalia*). O synapomorfii lze uvažovat pouze v případě prvních dvou jmenovaných znaků, ovšem ani pro ně není podpora v literatuře příliš silná (Baum et al. 1994).

Květy mohou být aktinomorfní a vzácněji i zygomorfní, 4 kališní lístky nejčastěji zelené, ale mohou být i lehce zbarvené, 4 vykrojené korunní lístky většinou růžové, vzácněji ale i bělavé, nažloutlé nebo sytě oranžové (sect. *Zauschneria*).

Rostliny jsou nejčastěji autogamní, vzácněji entomogamní. Mezi ostatními sekcemi v tomto ohledu vyčnívá sect. *Zauschneria*, jejíž zástupci jsou primárně opylováni kolibříky. Kolibříci také vzácně navštíví i zástupce jediného rodu sekce *Xerolobium* (Wagner et al. 2007).

3.3. Ekologie a rozšíření

Epilobium je největším rodem v rámci čeledi *Onagraceae*. Zástupce rodu *Epilobium* najdeme v temperátních oblastech všech kontinentů s výjimkou Antarktidy. V tropech je výskyt taxonu omezen na horské oblasti s temperátními podmínkami (Solomon 1982, Wagner et al. 2007). Oblastí vzniku je pravděpodobně Severní Amerika, jejíž území dodnes představuje jediné

původní areály výskytu většiny sekcí tohoto rodu (Raven 1976, Seavey & Raven 1978, Wagner et al. 2007). Výjimku tvoří sekce *Boisduvalia*, *Epilobiopsis* (po jednom druhu v Jižní Americe) a především sekce *Epilobium*. Zástupci sekce *Epilobium* jsou celosvětově rozšíření a v rámci diskutovaného rodu tak představují jedinou původní součást evropské květeny (Wagner et al. 2007). V Evropě se však také můžeme setkat s neofytem *E. brachycarpum*, který náleží do monotypické sekce *Xerolobium* (Gregor et al. 2013).

3.4. Karyologie

Pro rod *Epilobium* jsou charakteristické malé, tečkovité chromozomy (Kurabayashi et al. 1962). Sekce *Epilobium* má základní chromozomové číslo $n=18$ a je pravděpodobně sesterská ke všem zbývajícím sekcím. U nich najdeme poměrně rozmanité počty chromozomů ($n= 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 30$) (Baum et al. 1994, Wagner et al. 2007).

Baum a kolegové (1994) se ve své fylogenetické studii přiklánějí k názoru, že základním chromozomovým číslem je pro celý rod $x=18$, a že diverzita chromozomových čísel v rámci jednotlivých sekcí vznikla sérií aneuploidních redukcí a polyploidizací. V takovém případě by celý tribus *Epilobiae* (*Chamaenerion* má rovněž $x= 18$) byl primitivně polyploidní, neboť pro další blízké příbuzné taxony platí $x=10$ a $x=11$ (Wagner et al. 2007). Tuto teorii později potvrdila i další studie (Levin et al. 2004).

3.5. Vnitřní členění rodu a vztahy s příbuznými rody

Rod *Epilobium* se společně s až třemi dalšími rody (*Boisduvalia*, *Chamaenerion* a *Zauschneria*) tradičně řadil do tribu *Epilobiae*. Vnitřní vztahy v rámci tribu a přesné úrovně jednotlivých taxonů však zůstávaly poměrně dlouho neobjasněné. Raven (1976) například ve své práci rozpoznával v rámci *Epilobiae* pouze dva rody, a to *Epilobium* a *Boisduvalia*. *Chamaenerion* a *Zauschneria* pak považoval za vnitřní skupiny rodu *Epilobium*. Důvodem pro vyčlenění *Boisduvalia* na úroveň samostatného rodu zde byla kombinace jednoletosti druhů tohoto taxonu a absence pro *Epilobium* jinak charakteristického chalazálního chocholu chmýru na vrcholu semene (Raven 1976). Autor se zároveň vymezuje vůči názorům některých jiných botaniků, podle nichž tvoří samostatný rod i *Chamaenerion* (Raven 1976). Pro vyčlenění této skupiny byl naopak Holub (1972), který argumentuje značnou morfologickou odlišností a dobrou genetickou izolací obou taxonů.

Samostatné postavení taxonu *Chamaenerion* bylo potvrzeno až s nástupem molekulárních technik. Analýzy na základě sekvencí ITS a *trnL-F* ukázaly, že *Chamaenerion* je monofyletická skupina sesterská ke všem ostatním druhům rodu *Epilobium* (Baum et al.

1994, Levin et al. 2004). Dnes se nejčastěji vyčleňuje na úroveň samostatného rodu jako *Chamaenerion* SÉG (česky vrbka). Holub (1972) ve svém článku navrhl použití jména *Chamerion* (RAF.) RAF. Toto označení se ujalo a lze se s ním stále setkat (Wagner et al. 2007, také v Květeně ČR: Smejkal 1997b). Zejména američtí autoři však v současné době považují za správné jméno *Chamaenerion* SÉG. (Sennikov 2018, Hoch & Gandhi 2022).

Naopak *Boisduvalia* i *Zauschneria* se na základě molekulárních analýz řadí na úrovni sekcí do rodu *Epilobium* (Baum et al. 1994, Levin et al. 2004).

Podle aktuální monografie čeledi *Onagraceae* z roku 2007 se rod *Epilobium* dělí do osmi sekcí, z čehož pouze rostliny patřící do *Epilobium* sect. *Epilobium* jsou v Evropě původní (Wagner et al. 2007).

4. Charakteristika *Epilobium* sect. *Epilobium*

4.1. Morfologická charakteristika rodu

Zpracováno podle Smejkal (1997a) s úpravami a dodatky autorky.

Epilobium sect. *Epilobium* tvoří s asi 150 druhy největší sekci rodu (Wagner et al. 2007). Patří sem vytrvalé, mnohdy už první rok kvetoucí byliny. Lodyha může být větvená i nevětvená, listy alespoň v její dolní části vstřícné (nebo přeslenité), směrem nahoru mohou přecházet ve střídavé. Květy jsou aktinomorfni, většinou poměrně malé, hypanthium krátké ale zřetelné, 4 kališní lístky zelené nebo lehce narudlé, 4 korunní lístky obsrdčité, dvoulaločné až hluboce dvouklané; barvou růžové až nachové, vzácněji bělavé nebo nažloutlé (*E. luteum*). Blizna celistvá kyjovitá, elipsoidní nebo 4laločná. Tyčinek 8 ve dvou kruzích (4+4), pylová zrna charakteristicky v tetradách. Plodem je podlouhlá čtyřhranná tobolka se čtyřmi pouzdry, která se otevírá pouzdrosečně. Semena této sekce jsou často drobná (cca 2 mm)¹, v obrysu vejčitá, na vrcholu je vždy přítomen chalazální chochol chmýru a někdy též průsvitný límečkovitý přívěsek (Smejkal 1997a).

Květy často protandrické (Wagner et al. 2007). Rostliny autogamní nebo entomogamní (Wagner et al. 2007).

Časté je i vegetativní rozmnožování pomocí různých obnovovacích orgánů, které se po vytvoření adventivních kořenů oddělí od rodičovské rostliny.

¹ Tendence k vytváření většího počtu menších semen mohla přispět k celosvětovému rozšíření sekce (Seavey et al. 1977).

4.2. Důležité determinační znaky

Určování jednotlivých druhů vrbovek není zpravidla jednoduché. Jejich správnou determinaci komplikuje zejména minucióznost důležitých znaků, značná vnitrodruhová variabilita a fakt, že se na jednom stanovišti spolu běžně vyskytuje více druhů. K tomu se přidává i častá tvorba mezidruhových kříženců. Při determinaci je praktické si všimnout následujících znaků:

Typ odění – Vrbovky mají na svém povrchu dva typy chlupů: krycí trichomy, které jsou jednoduché a na konci zašpičatělé, a chlupy kyjovitého tvaru, které jsou na konci tupé či lehce rozšířené. Z kyjovitých chlupů je vhodné vyčlenit ještě ty žláznaté, které jsou zpravidla delší a mají sekreční aktivitu. Jednotlivé druhy vrbovek lze mezi sebou odlišit na základě přítomnosti různých typů chlupů a také podle toho, který orgán pokrývají (Krajšek et al. 2006).

Obnovovací orgány (inovace) – Vyrůstají zpravidla v druhé polovině vegetační sezóny. Každý z druhů je schopný tvořit pouze jeden typ těchto obnovovacích orgánů.

- (1) Turiony vznikají z podzemních pupenů (Smejkal 1997a), alespoň zpočátku mají podobu ztlustlých, nezelených, střechovitě uspořádaných listů. U některých druhů se dostávají na povrch, zezelenají a tvoří nové růžice. Jedinci vzniklí z turionů mohou vypadat netypicky, což komplikuje jejich determinaci (Danihelka 2019).
- (2) Podzemní výběžky mají zřetelná internodia, listy jsou nezelené, šupinovité, ale jsou od sebe víceméně oddálené (turiony jsou oproti tomu tvořeny listy, které jsou střechovitě uspořádané).
- (3) Listové růžice vznikají z nadzemních pupenů (Smejkal 1997a). Vyznačují se velmi krátkými internodii, zelené listy tak mají podobu nadzemní růžice u báze stonku.
- (4) Nadzemní výběžky nemají zkrácená internodia a mohou tak být poměrně dlouhé. Jsou olistěné a vznikají opět z nadzemních pupenů.

Semena – Další spolehlivé diagnostické znaky poskytují semena. Zde je vhodné se zaměřit zejména na povrch osemení (hladký nebo papilnatý), na přítomnost průsvitného límečkovitého přívěsku a na jejich celkový tvar a velikost. Kříženci vrbovek bývají do velké míry sterilní, jejich semena jsou tak často zakrnělá (Danihelka 2019).

Tvar blizny – Blizna je buď celistvá (kyjovitá nebo elipsoidní) nebo 4laločná.

4.3. Karyologie

Pro rostliny patřící do této sekce je charakteristický diploidní počet chromozomů, přičemž $n=18$ (Baum et al. 1994, Wagner et al. 2007). Zajímavou skutečností je, že v rámci sekce se vyskytují skupiny druhů či jednotlivé druhy, které se od sebe odlišují v několika nebo v jedné reciproční translokaci. Seavey a Raven (1977a) tyto translokace dělí do několika skupin. Ty nejhojnější

z nich označují jako AA, BB a CC. Ancestrální translokací je pravděpodobně BB (Seavey & Raven 1978). Toto chromozomové uspořádání je charakteristické především pro eurasijské, australské a africké druhy vrbovek. Najdeme je ale i u některých bazálnějších severoamerických druhů a u druhů příbuzných cirkumboreálně rozšířené vrbovce *Epilobium palustre* (Seavey & Raven 1977a, Seavey & Raven 1978).

Většina severoamerických taxonů má chromozomové uspořádání označované jako AA, které se od BB liší jedinou translokací. Zajímavé je, že translokace AA se pravděpodobně nezávisle na americké skupině objevila i u tří evropských druhů, z nichž je v rámci této práce důležité jmenovat *E. alsinifolium* (Seavey & Raven 1977a).

Poslední zmíněnou skupinu tvoří druhy patřící do příbuznosti *E. alpinum*. Liší se od BB v jedné translokaci (v jiné než AA, tzn. od AA se liší ve dvou translokacích) a Seavey a Raven ji označují jako CC. Z českých vrbovek najdeme toto chromozomové uspořádání u druhu *E. anagallidifolium* (Seavey & Raven 1977a).

Tyto tři skupiny rozhodně nepopisují veškerou variabilitu, kterou můžeme v sekci najít. Za zmínku stojí ještě *E. nutans*, která podle vzorků ze Švýcarska zapadá do skupiny BB, materiál z tehdejšího Československa však tomuto chromozomovému uspořádání neodpovídá (Seavey & Raven 1977b). Rostliny sebrané v západních Čechách se od ostatních ve skupině BB liší v jedné další translokaci. Pokud tyto rostliny zkřížíme s rostlinami ze skupin AA a CC, tvoří během meiózy chromozomové řetězce nebo prstence. Jak moc je tato translokace v rámci druhu *E. nutans* rozšířená, se autorům nepodařilo zjistit (Seavey & Raven 1977b).

4.4. Charakteristika vybraných zástupců

Do výběru jsou kromě našich vzácných horských druhů zahrnuty i dva další druhy (*E. palustre* a *E. obscurum*), protože se studovanou horskou skupinou sdílí stanovištní preference, což umožňuje mezidruhovou hybridizaci.

4.4.1. *Epilobium nutans* F. W. SCHMIDT – vrbovka nicí

Epilobium nutans F.W. SCHMIDT Fl. Boëm.4:82, 1794

Synonyma: *Epilobium alpinum* subsp. *nutans* (F. W. SCHMIDT) ČELAK. in Prodr. Fl. Böhmen: 550 (1875). - *Epilobium anagallidifolium* var. *nutans* (F. W. SCHMIDT) POHL in Tent. Fl. Bohem.: 64 (1910). – *Epilobium hornemannii* SCHUR in Enum. Pl. Transsilv.: 212 (1866), nom. illeg.

4.4.1.1. Důležité determinační znaky

Lodyha jednoduchá, s 2(–4) výraznějšími liniemi chlupů, na bázi spíše lysá, v horní části i na plochách přitiskle pýřitá (Smejkal 1997a, Krajšek et al. 2006). Listy v dolní části rostliny jsou vstřícné, obvejčité až obvejčité kopist'ovité. Listy v horní části lodyhy jsou pak nejčastěji střídavé a podlouhlejší. Listy jsou na líci lysé, pouze na okraji mohou být pýřité (Danihelka 2019). *Epilobium nutans* tvoří tenké, olistěné nadzemní výběžky.

Vrchol lodyhy nesoucí květy je zdatelně ohnutý dolů (nicí), během dozrávání plodů se postupně narovává. Blizna je celistvá kyjovitá. Hypanthiální trubka je přitiskle pýřitá, podle některých autorů zde mohou být přítomny i žláznaté trichomy (Krajšek et al. 2006). Tobolka je alespoň zpočátku také hustě přitiskle pýřitá, obdobně lze i na jejím povrchu vzácněji nalézt žláznaté trichomy.

Semena 1–1,5 mm dlouhá, úzce obvejcovitě vřetenovitá, na obou koncích zúžená, osemení je lehce papilnaté (Seavey et al. 1977, Danihelka 2019). Průsvitný límečkovitý přívěšek na vrcholu semene je přítomen.

4.4.1.2. Ekologie a rozšíření v ČR

Epilobium nutans preferuje osvětlená místa na březích horských potůčků a prameništ' s mírně tekoucí vodou. V nižších horských polohách se může vyskytovat i na více zastíněných lesních prameništích (Smejkal 1997a). Roste na vlhčích, zrašelinělých, na živiny chudších a kyselejších půdách (Kaplan et al. 2018).

V České republice se s ní setkáme v příhraničních pohořích, především pak v Krkonoších, Hrubém Jeseníku a na Šumavě. Existují i údaje z Krušných hor, Orlických hor, Jizerských hor, Králického Sněžníku a Moravskoslezských Beskyd, avšak na těchto lokalitách se v současné době už pravděpodobně nevyskytuje (Kaplan et al. 2018). Tento ústup je zřejm

způsoben odvodňováním, eutrofizací a zarůstáním dříve vhodných lokalit (Kaplan et al. 2018). Ve třetím vydání červeného seznamu rostlin České republiky je *E. nutans* hodnoceno jako C2, neboli silně ohrožený taxon z důvodu vzácnosti a výrazného ústupu (Grulich 2012).

4.4.2. *Epilobium alsinifolium* VILL. – vrbovka žabincolistá

Epilobium alsinifolium VILLARS Prosp. Pl. Dauph. 45, 1779.

Synonyma: *Epilobium alpinum* var. *alsinifolium* (VILL.) BOLZON in Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., 21: 191 (1914). – *Epilobium origanifolium* LAM. in Encycl. 2: 376 (1786).

České synonymum: Vrbovka ptačincolistá (Smejkal 1997a, Květena ČR)

4.4.2.1. Důležité determinační znaky

Lodyha nejčastěji jednoduchá, vzácně s několika krátkými větvemi; lysá, jen s 2(–4) málo zřetelnými liniemi chlupů nebo řídce roztroušeně žláznatá (Smejkal 1997a, Krajšek et al. 2006). Dolní listy jsou vstřícné, vejčité či lehce obvejčité a celokrajné, listy v horní části rostliny přecházejí ve střídavé, spíše vejčité kopinaté, na okraji s několika málo drobnými zuby. Všechny listy jsou především lysé, místy lze najít několik málo krycích nebo žláznatých chlupů (Krajšek et al. 2006). Lodyha i listy jsou v porovnání s dalšími horskými druhy relativně masitější a silnější. Rostlina tvoří dlouhé, nažloutlé podzemní výběžky s několika páry bledých vejčitých listů.

Vrchol lodyhy nesoucí květy může být lehce dolů ohnutý, avšak zpravidla ne tak nápadně jako u *E. nutans*. Blizna je úzce kyjovitá a celistvá, vzácněji může být na vrcholu lehce vykrojená (Smejkal 1997a). Květy i poupata jsou v porovnání s ostatními druhy poměrně velké. (Kytövuori 1972). Hypanthiální trubka je jen řídce pokrytá žláznatými a krycími chlupy, totéž platí pro mladou tobolku (Kytövuori 1972, Krajšek et al. 2006)

Semena jsou (1,0)–1,2–1,5 mm dlouhá (Smejkal 1997a), úzce obvejcovitě vřetenovitá, na vrcholu s protáhlým krčkem, osemení hladké (Seavey et al. 1977). Průsvitný límečkovitý přívěšek na vrcholu semene je drobný, ale přítomný (Smejkal 1997a).

4.4.2.2. Ekologie a rozšíření v ČR

Vyskytuje se nejčastěji na horských lučních prameništích a na březích horských potoků, vzácněji pak na vlhkých lesních světlínách a lesních prameništích. Roste na vlhkých nebo mokřých, různě minerálně bohatých, mírně kyselých či neutrálních půdách (Smejkal 1997a).

V České republice je výskyt *E. alsinifolium* omezen zásadně na oreofytikum. Nejvíce lokalit se udává z Krkonoš a Hrubého Jeseníku, několik málo lokalit pak najdeme také na Šumavě (Kaplan et al. 2018). Na našem území se vyskytuje nejčastěji v nadmořské výšce nad

1000 metrů (s maximem do 1440 m n. m.), vzácněji se pak dostává i do míst s nižší nadmořskou výškou (s minimem kolem 650 m n. m.) (Kaplan et al. 2018).

Ve třetím vydání červeného seznamu rostlin České republiky je *E. alsinifolium* hodnoceno jako C3, tzn. ohrožený taxon (Grulich 2012), zejména kvůli vzácným, ale poměrně stabilním populacím (Kaplan et al. 2018).

4.4.3. *Epilobium anagallidifolium* LAM. – vrbovka drechničkolistá

Epilobium anagallidifolium LAMARCK Encycl. Méth. Bot. 2: 376,1786.

Synonyma: *Epilobium alpinum* L. subsp. *anagallidifolium* (LAM.) ČELAK. Prodr. Fl. Böhm. 3:550, 1875. – *Epilobium alpinum* auct. p. p.

4.4.3.1. Důležité determinační znaky

Lodyha je vždy jednoduchá, lysá, jen se dvěma málo zřetelnými liniemi chlupů (Smejkal 1997a, Krajšek et al. 2006). Nejhornější listy mohou být střídavé, jinak jsou listy spíše ve vstřícném postavení. Listy obvejčité až vejčité eliptické, tupé, z obou stran víceméně lysé (Krajšek et al. 2006). Rostlina často roste v trsech. Jako obnovovací orgány zde fungují dlouhé nadzemní výběžky nesoucí drobné, obvejčité až okrouhlé listy (Smejkal 1997a).

I u tohoto druhu může být vrchol lodyhy nesoucí květy dolů ohnutý. Blizna je celistvá kyjovitá. Hypanthiální trubka není pokryta přitisklými krycími trichomy, ovšem žláznaté chlupy jsou přítomny. Tobolka je ještě o něco výrazněji žláznatá než hypanthiální trubka (Krajšek et al. 2006).

Semena 1,1–1,5 mm dlouhá, úzce obvejcovitě vřetenovitá, k vrcholu zúžená, osemení hladké (Danihelka 2019, Seavey et al. 1977). Průsvitný límečkovitý přívěšek na vrcholu semene je přítomen (Danihelka 2019).

4.4.3.2. Ekologie a rozšíření v ČR

Epilobium anagallidifolium se vyskytuje nejčastěji na horských lučních prameništích, na březích a náplavách horských potoků, případně ve vlhkých skalních šterbinách. Roste na trvale vlhkých, různě minerálně bohatých, neutrálních a mírně kyselých půdách (Smejkal 1997a).

V České republice najdeme *E. anagallidifolium* pouze v centrální části Krkonoš a v nejvyšší části Hrubého Jeseníku (Kaplan et al. 2018). Druh byl známý i z lokalit na Šumavě, avšak zde byl naposledy nalezen v roce 1914 (Kaplan et al. 2018).

Ve třetím vydání červeného seznamu rostlin České republiky je *E. anagallidifolium* hodnoceno jako C2 neboli neboli taxon silně ohrožený především kvůli jeho vzácnosti (Grulich 2012).

4.4.4. *Epilobium palustre* L. – vrbovka bahenní

Epilobium palustre LINNAEUS Sp. Pl. 348, 1753.

4.4.4.1. Důležité determinační znaky

Lodyha jednoduchá nebo lehce větvená, alespoň u vrcholu přitiskle pýřitá, někdy s méně viditelnými liniemi kadeřavých chlupů, žláznaté chlupy mohou být přítomny (Danihelka 2019, Krajšek et al. 2006). Postavené listů vstřícné, ty nejhornější mohou být střídavé. Listy převážně dlouze kopinaté až čárkovité, především na okrajích a při žilnatině přitiskle pýřité, většinou celokrajné s podvinutými okraji. Rostlina vytváří dlouhé a tenké nadzemní výběžky s několika oddálenými páry malých šupinovitých listů (Smejkal 1997a).

Vrchol lodyhy nesoucí květy může být opět lehce dolů ohnutý. Blizna je celistvá kyjovitá. Hypanthiální trubka je přitiskle pýřitá, někdy i lehce žláznatá (Krajšek et al. 2006). Tobolky jsou obdobně jako hypanthiální trubka poměrně hustě přitiskle pýřité, žláznaté chlupy mohou být také přítomny.

Semena 1,6–2,0 mm dlouhá, úzce obvejcovitě vřetenovitá, k oběma koncům pozvolně zúžená (Smejkal 1997a). Osemení je hustě papilnaté (Seavey et al. 1977). Průsvitný límečkovitý přívěšek na vrcholu semene je zde poměrně nápadný (Smejkal 1997a).

Druh je považován za poměrně proměnlivý (Smejkal 1997a). To má za následek, že i přes svůj poměrně odlišný vzhled bývá zaměňován s *E. obscurum*, *E. nutans* nebo s různými kříženci.

4.4.4.2. Ekologie a rozšíření v ČR

Vyskytuje se na vlhkých rašelinných nebo slatinných loukách, lučních prameništích, březích potoků a rybníků nebo tůňek, typicky na trvale mokřích nebo vlhkých půdách (Smejkal 1997a).

Epilobium palustre není v České republice výhradně omezeno na oreofytikum, avšak těžiště jeho výskytu je spíše ve vyšších nebo středních polohách (Kaplan et al. 2018). Druh lze najít i na vhodných lokalitách v termofytiku, avšak vlivem lidské činnosti (vysušování a odvodňování luk, intenzivní zemědělství) takové lokality ubývají.

Ve třetím vydání červeného seznamu rostlin České republiky je *E. palustre* hodnoceno jako C4a neboli méně ohrožený, vzácnější taxon vyžadující pozornost (Grulich 2012).

4.4.5. *Epilobium obscurum* SCHREB. – vrbovka tmavá

Epilobium obscurum SCHREBER Spicil. Fl. Lips. 147,155, 1771.

Synonyma: *Epilobium virgatum* LAM. Encycl. Méth. Bot. 2:375, 1786. – *Epilobium tetragonum* auct. vetust. bohem. p. p.

4.4.5.1. Důležité determinační znaky

Lodyha může být jednoduchá i větvená, s 2(–4) liniemi chlupů, na bázi spíše lysá, v horní části po celém obvodu přitiskle pýřitá (Smejkal 1997a, Krajšek et al. 2006). Postavení listů na bázi vstřícné, směrem vzhůru spíše střídavé. Listy kopinaté, tmavě zelené, na okraji zubaté, většinou spíše lysé (horní listy mohou být při okraji a podél žilnatiny lehce pýřité). *Epilobium obscurum* vytváří dlouhé nadzemní výběžky s několika páry od sebe vzdálených, malých, tmavě zelených listů (Smejkal 1997a).

Vrchol lodyhy může být za květu lehce dolů ohnutý. Blizna je celistvá kyjovitá. Hypanthiální trubka bývá přitiskle šedavě pýřitá i žláznatá (Smejkal 1997a, Krajšek et al. 2006). Tobolky jsou podobně jako hypanthiální trubka žláznaté i přitiskle pýřité.

Semena 1,0–1,3 mm dlouhá, obvejcovitá, na vrcholu zaokrouhlená, osemení hustě papilnaté (Seavey et al. 1977, Danihelka 2019).

4.4.5.2. Ekologie a rozšíření v ČR

Epilobium obscurum typicky vyhledává různá vlhká místa. Vyskytuje se tak na březích lučních i lesních pramenišť, potoků, tůní nebo rybníků. Najdeme jej také na vlhkých loukách, na vlhkých lesních pasekách, v lesních či lučních příkopech, v říčních náplavách nebo na dnech letněných rybníků. (Smejkal 1997a).

V České republice je *E. obscurum* nejčastější opět ve středních a vyšších polohách, především na místech s hustou sítí vodních toků a množstvím vhodných podmáčených luk. Tento druh je také častý v rybníčních pánvích (Smejkal 1997a). V termofytiku je jeho výskyt omezený, místy úplně chybí.

Ve třetím vydání červeného seznamu rostlin České republiky je *E. obscurum* hodnoceno jako C3 neboli ohrožený taxon (Grulich 2012). Důvodem je úbytek jeho populací především v nižších polohách, a to pravděpodobně odvodňování vlhkých luk (Kaplan et al. 2018).

5. Metody studia mezidruhové hybridizace

5.1. Průtoková cytometrie

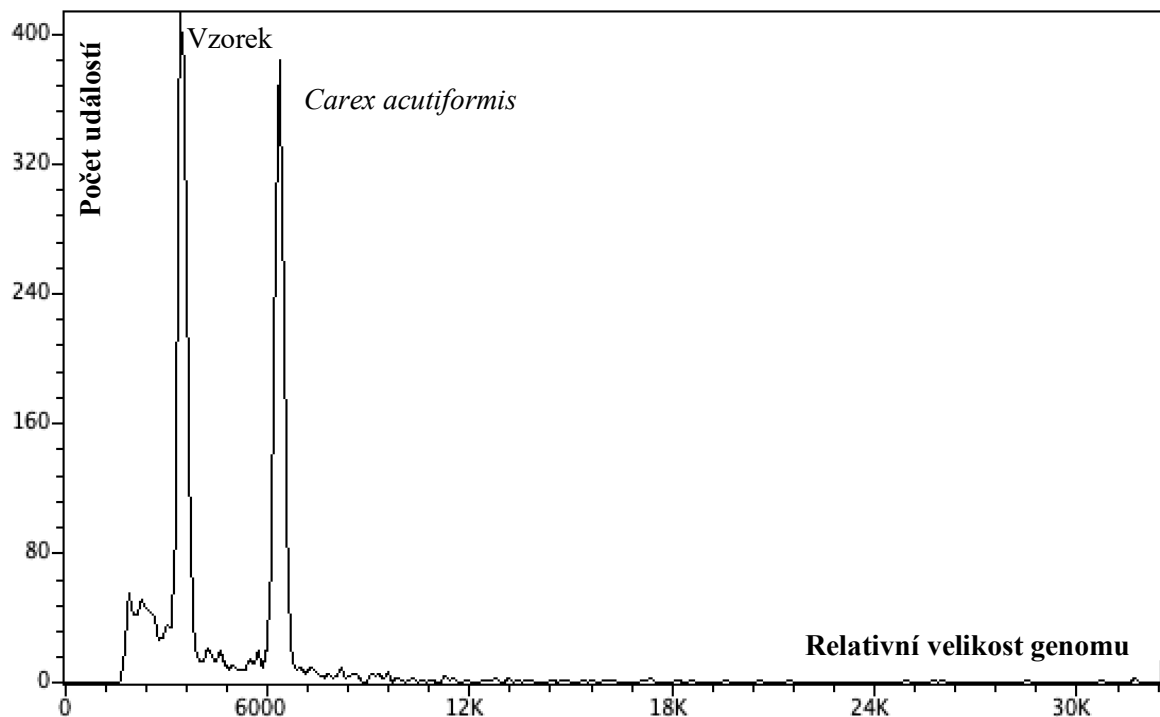
Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) je metoda, která výzkumníkům umožňuje studovat různé optické vlastnosti jednotlivých buněk měřeného vzorku. Vzorek se do průtokového cytometru vkládá v podobě buněčné suspenze obarvené fluorescenční barvou. Přístroj vzorek nasaje a pomocí proudu unášecí kapaliny usměrní partikule tak, aby byla laserovým paprskem ozářena každá z nich jednotlivě (Robinson & Grégori 2007). Emitované světlo a jeho intenzita jsou pak zaznamenány detektorem. Tento princip umožňuje relativně jednoduše a rychle získat mnoho informací o velkém množství buněk/částic.

V botanice je častou aplikací této metody měření velikosti genomu. Velikost genomu se nejčastěji udává v absolutních jednotkách; tedy v počtu páru bází (bp) a v pikogramech (pg). Lze ovšem operovat i s relativní velikostí genomu, tedy s poměrem DNA obsahu našeho vzorku a jiné rostliny, jejíž obsah DNA je předem známý (Greilhuber et al. 2007). K měření množství genetické informace v buňce pomocí FCM se používá několik DNA specifických fluorescenčních barev, z nichž v poslední době jsou asi nejčastější DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) a PI (propidium jodid). Výhodou PI je, že se váže k celému řetězci DNA (ale navíc také k dsRNA) a lze tak s využitím tohoto barviva získat údaj o velikosti genomu v absolutních jednotkách (Doležel et al. 2007). DAPI se váže pouze na určité AT bohatší úseky, nelze tak pomocí tohoto barvení s přesností stanovit velikost genomu v absolutních číslech (Šmarda et al. 2012). Na druhou stranu se udává, že barvení DAPI často vede k přesnějším a lépe reprodukovatelným výsledkům (Shapiro 2003). Možným vysvětlením tohoto jevu je například menší specifita PI vůči DNA a větší citlivost PI vůči různému sbalení chromatinu a cytosolickému pozadí (Price et al. 2000, Loureiro et al. 2006, Doležel et al. 2007, Loureiro et al. 2010).

Pro snazší interpretaci je dobré do cytometrické analýzy vzorku zahrnout interní standard (Doležel et al. 2007). Interní standard je tkáň rostliny s předem známou velikostí genomu, která se zpracovává a analyzuje společně s námi měřeným vzorkem (obr. 1). S ohledem na tuto kontrolu pak lze porovnávat jednotlivá měření mezi sebou, nebo v případě barvení PI stanovit velikosti genomu v absolutních jednotkách.

Při studiu mezidruhové hybridizace lze využít faktu, že velikost genomu je v rostlinné říši velmi variabilní a zároveň druhově relativně specifická (Leitch & Bennett 2007, Loureiro et al. 2010). Za předpokladu, že studované druhy se liší ve velikosti genomu (udávaná hranice

je minimálně 7% rozdíl), je možné rozpoznat jejich mezidruhové křížence (Loureiro et al. 2010).



Obr. 1: Výstup z průtokového cytometru. Na vodorovné ose jsou bezrozměrné jednotky udávající odlišnost měřených částic (nebo také relativní velikost genomu), na svislé ose je pak počet měřených událostí. *Carex acutiformis* zde představuje interní standard, vůči kterému je možné vztáhnout údaj získaný ze souběžně měřeného vzorku.

Vhodnost průtokové cytometrie ke studiu mezidruhové hybridizace v rodu *Epilobium* zůstává otázkou. Kromě rychlého vadnutí a obsahu sekundárních metabolitů by mohl být problém i poměrně malý rozdíl ve velikosti genomu některých druhů (Šmarda et al. 2019).

5.2. Molekulární markery

Molekulární markery představují citlivý nástroj často schopný detekovat i historicky vzdálené hybridizační události. Principem tohoto souboru metod je detekce a porovnávání polymorfismů na úrovni buněčného metabolismu (např. isozymy – různé varianty enzymů) nebo na úrovni DNA (v dnešní době nejčastější). Výhodou genetických metod je zejména zviditelnění polymorfismů, které by na úrovni fenotypu² zůstaly skryté. Sekvence DNA také často poskytuje větší množství variability dostupné pro studium a na rozdíl od fenotypu nepodléhá vlivům prostředí.

² Expresce enzymů je taktéž součástí fenotypu rostliny, neboť je často závislá na okolním prostředí a může se lišit v rámci jednotlivých rostlinných tkání a orgánů (Kumar et al. 2009)

Mezi hlavní molekulární metody patří analýza polymorfismů na úrovni sekvence DNA. Takovými polymorfismy jsou například bodové mutace (tedy záměna jednoho nukleotidu za jiný), nebo inserce a delece, které mění délku studovaného úseku. Dále je možné studovat polymorfismy týkající se délky repetitivních sekvencí (např. mikrosatelity) anebo přítomností či absencí štěpných míst pro různé restriční endonukleázy (např. RFLP).

5.2.1. Sekvence ITS

Mezi populární molekulární markery ve fylogenetických studiích patří sekvence ITS (internal transcribed spacer). Jedná se o nekódující úsek jaderné DNA, který je součástí cistronu pro ribozomální RNA. ITS je v genomu přítomný v několika stovkách (či tisících) kopií. Tato vlastnost může být při fylogenetických studiích výhodná, neboť zpravidla zjednodušuje proces izolace. Sekvence ITS je navíc poměrně krátká (cca 500 bp až 700 bp) což navíc usnadňuje i amplifikaci a následné sekvenování (Baldwin et al. 1995). Úsek ITS je také mezi všemi rostlinami poměrně univerzální, což umožňuje jeho amplifikaci bez předchozí znalosti sekvence s pomocí už vyrobené sady primerů (Álvarez & Wendel 2003).

Tento úsek je také ve většině případů dostatečně variabilní na to, aby bylo možné na základě jeho sekvence rozlišit jednotlivé druhy. V rámci rodu *Epilobium* potvrdil tento fakt ve své studii například Baum s kolegy (1994).

V souvislosti s ITS bývá často diskutován proces „sladěné evoluce“ (*concerted evolution*). Ačkoliv se geny pro rDNA vyskytují v buňce ve stovkách až tisících kopií, jejich vzájemná variabilita je velmi nízká. Tedy místo toho, aby se jednotlivé kopie od sebe lišily náhodně vzniklými mutacemi, sdílí tento set mutací všechny kopie v genomu (Álvarez & Wendel 2003). Tento stav je pravděpodobně výsledkem hromadné genové konverze, nerovnoměrného crossing overu a dalších procesů, které se souhrnně označují jako molekulární tah (Elder & Turner 1995).

Zmíněný předpoklad ovšem nemusí platit pro mezidruhové křížence. Vzhledem k tomu, že kříženci obsahují genetickou informaci obou rodičů náležících k různým druhům, může se u nich objevit i několik odlišných variant ITS. Zvláště u F1 hybridů se proto na pozicích, kde se jednotlivé rodičovské druhy vzájemně liší, vyskytují polymorfismy. Při dobré znalosti variability v ITS u jednotlivých druhů lze díky těmto polymorfismům mnohdy identifikovat konkrétní rodičovské druhy kříženců. Jednotlivé kopie úseku ITS je možné získat pomocí bakteriálního klonování.

5.2.2. Chloroplastová DNA

I u chloroplastové DNA (cpDNA) nás zajímají polymorfismy na úrovni sekvence studovaného úseku (i když je možné zvolit i jiné přístupy, například mapování restrikčních míst). Oproti jaderné DNA je však cpDNA výrazně konzervativnější, podléhá tedy méně mutacím a její evoluce je pomalejší (Clegg & Zurawski 1992). Jedná se o relativně praktickou vlastnost, neboť při její analýze lze napříč různými druhy použít jednu sadu primerů (což ušetří čas i peníze; Clegg & Zurawski 1992). Nejvýznamnějším rozdílem však je, že chloroplastová DNA se u většiny rostlin dědí uniparentálně, nejčastěji po mateřské linii. Tímto způsobem lze získat informace i o směru genového toku, konkrétně při studiu mezidruhové hybridizace je možné zjistit, který z rodičovských druhů byl matkou hybrida. Analýza cpDNA navíc umožňuje odhalit i časově vzdálenější hybridizaci, popř. introgresi (Palmer 1985).

Pomocí cpDNA je však možné provést i rozsáhlejší fylogenetické studie. Levin s kolegy (2004) analyzoval pomocí *trnL-F* úseku cpDNA vnitřní fylogenetické vztahy v rámci rodu *Epilobium*. Výsledky této studie odpovídaly předchozí práci Baum et al. 1994, ve které byla fylogeneze vrbovek sestavena na základě úseku ITS.

6. Navazující diplomová práce

6.1. Cíle diplomové práce

Navazující diplomová práce se bude věnovat především vzácnějším českým druhům horských vrbovek a míře jejich ohrožení mezidruhovou hybridizací. Mezi stěžejní otázky a cíle následné výzkumné práce patří:

- 1) Četnost křížení studovaných druhů s invazní vrbovkou *Epilobium adenocaulon*
- 2) Četnost křížení studovaných druhů s jinými druhy vrbovek (*E. palustre* a *E. obscurum*) popř. četnost vzájemného křížení mezi studovanými druhy
- 3) Screening populací studovaných vrbovek a jejich variability v rámci území České republiky
- 4) Porovnání morfologie s výsledky laboratorních metod
- 5) Prozkoumat vhodnost průtokové cytometrie pro studium tohoto rodu

Kromě průtokové cytometrie bude v rámci laboratorních metod analyzována i sekvence ITS a vybrané úseky cpDNA.

6.2. Pilotní výsledky

Na Šumavských lokalitách navštívených v roce 2022 nebyl nalezen žádný kříženec s *E. adenocaulon* a přímo na lokalitách horských vrbovek ani *E. adenocaulon* samotné. Vypadá to, že zdejší horská prameniště jsou před invazí tohoto nepůvodního druhu zatím chráněna. Ohrožené vrbovky se zde ale vyskytují pouze na několika málo lokalitách a kříží se mezi sebou navzájem.

Dle předběžných výsledků je na základě dat z průtokové cytometrie do jisté míry možné rozlišit mezi jednotlivými druhy vrbovek. Měření jsou navíc narušená sekundárními metabolity méně, než se předem očekávalo (viz obr. 1). Pro spolehlivější interpretaci dosavadních výsledků je však zajisté potřeba získat více měření z dalších populací.

7. Závěr

Tato práce shrnuje současné znalosti o diverzitě rodu vrbovka (*Epilobium*) a relevantní související biologické vlastnosti. V rámci celého rodu dochází k časté mezidruhové hybridizaci, což hraje podstatnou roli v jeho evoluci. Mezidruhová hybridizace může generovat evoluční novinky nebo vést ke speciaci, může ale být i příčinou genetické eroze a extinkce. Zánik hrozí především vzácným a ohroženým taxonům, které jsou kromě mezidruhového křížení často i pod vlivem dalších tlaků.

Existenci fertálních mezidruhových kříženců v přírodě často předchází soubor vlastností, které souhrnně označujeme jako reprodukčně-izolační bariéry. Pokud ale spolu přijdou do kontaktu druhy, které byly dříve oddělené, mohou být tyto bariéry oslabeny.

Příkladem vzácných vrbovek české květeny je skupina výhradně horských druhů, jmenovitě *E. nutans*, *E. anagallidifolium* a *E. alsinifolium*. Tyto druhy se na svém stanovišti setkávají s poněkud častějšími *E. palustre* a *E. obscurum* a mohou se spolu křížit. Rešerše shrnuje dostupné informace o rozšíření a morfologii těchto druhů a poskytuje podklady k usnadnění jejich determinace.

Zmíněné druhy tvoří mezidruhové křížence také s invazí *E. adenocaulon*. Míra této hybridizace, a tedy ani míra jejich ohrožení, však není na území České republiky známá. Součástí práce je tak i přehled metod, kterými lze mezidruhovou hybridizaci studovat a které by následně mohly pomoci k rozšíření našich znalostí o zkoumaných druzích.

8. Použitá literatura

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

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, CHASE, M. W., CHRISTENHUSZ, M. J., FAY, M. F., BYNG, J. W., JUDD, W. S., SOLTIS, D. E., MABBERLEY, D. J., SENNIKOV, A. N., SOLTIS, P. S., & STEVENS, P. F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20.

ANTTILA, C. K., DAEHLER, C. C., RANK, N. E., & STRONG, D. R. (1998). Greater male fitness of a rare invader (*Spartina alterniflora*, *Poaceae*) threatens a common native (*Spartina foliosa*) with hybridization. *American Journal of Botany*, 85(11), 1597–1601.

BAACK, E., MELO, M. C., RIESEBERG, L. H., & ORTIZ-BARRIENTOS, D. (2015). The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytologist*, 207(4), 968–984.

BALDWIN, B. G., SANDERSON, M. J., PORTER, J. M., WOJCIECHOWSKI, M. F., CAMPBELL, C. S., & DONOGHUE, M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2), 247–277.

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

BAUM, D. A., SYTSMA, K. J., & HOCH, P. C. (1994). A phylogenetic analysis of *Epilobium* (*Onagraceae*) based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Systematic Botany*, 19(3), 363–388.

BLEEKER, W. (2003). Hybridization and *Rorippa austriaca* (*Brassicaceae*) invasion in Germany. *Molecular Ecology*, 12(7), 1831–1841.

BLEEKER, W., SCHMITZ, U., & RISTOW, M. (2007). Interspecific hybridisation between alien and native plant species in Germany and its consequences for native biodiversity. *Biological Conservation*, 137(2), 248–253.

BROCHMANN, C. (1984). Hybridization and distribution of *Argyranthemum coronopifolium* (*Asteraceae–Anthemideae*) in the Canary Islands. *Nordic Journal of Botany*, 4(6), 729–736.

- BUERKLE, C. A., WOLF, D. E., & RIESEBERG, L. H. (2003). The origin and extinction of species through hybridization. In: BRIGHAM, C. A., & SCHWARTZ, M. W. (eds): *Population viability in plants: Ecological studies*, vol 165, p. 117–141, Springer, Berlin, Hiedelberg.
- CLEGG, M. T., & ZURAWSKI, G. (1992). Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. In: SOLTIS, P. S., SOLTIS, D. E., & DOYLE J. J. (eds): *Molecular Systematics of Plants*, p. 1–13, Springer, Boston, MA.
- COSTA, C. B. N., LAMBERT, S. M., BORBA, E. L., & DE QUEIROZ, L. P. (2007). Post-zygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (*Leguminosae–Caesalpinioideae*). *Annals of Botany*, 99(4), 625–635.
- ČERTNER, M., KOLÁŘ, F., SCHÖNSWETTER, P., & FRAJMAN, B. (2015). Does hybridization with a widespread congener threaten the long-term persistence of the Eastern Alpine rare local endemic *Knautia carinthiaca*?. *Ecology and Evolution*, 5(19), 4263–4276.
- DANIHELKA J. (2019). *Epilobium* L. – vrbovka. In: KAPLAN, Z., DANIHELKA, J., CHRTEK, J. JUN., KIRSCHNER, K., ŠTECH, M. & ŠTĚPÁNEK, J. (eds): *Klíč ke květeně České republiky*. Ed. 2., p. 598–605, Academia Praha.
- DELL'OLIVO, A., HOBALLAH, M. E., GÜBITZ, T., & KUHLEMEIER, C. (2011). Isolation barriers between *Petunia axillaris* and *Petunia integrifolia* (*Solanaceae*). *Evolution*, 65(7), 1979–1991.
- DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., & SUDA, J. (2007). Flow Cytometry with Plants: an Overview. In: DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., & SUDA, J. (eds): *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. p. 41–61, John Wiley & Sons.
- ELDER JR, J. F., & TURNER, B. J. (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*, 70(3), 297–320.
- ELLSTRAND, N. C., WHITKUS, R., & RIESEBERG, L. H. (1996). Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 5090–5093.
- FIELD, D. L., AYRE, D. J., WHELAN, R. J., & YOUNG, A. G. (2011). Patterns of hybridization and asymmetrical gene flow in hybrid zones of the rare *Eucalyptus aggregata* and common *E. rubida*. *Heredity*, 106(5), 841–853.

- FUNK, D. J., NOSIL, P., & ETGES, W. J. (2006). Ecological divergence exhibits consistently positive associations with reproductive isolation across disparate taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3209–3213.
- GOULET, B. E., RODA, F., & HOPKINS, R. (2017). Hybridization in plants: old ideas, new techniques. *Plant Physiology*, 173(1), 65–78.
- GREGOR, T., BÖNSEL, D., STARKE-OTTICH, I., TACKENBERG, O., WITTIG, R., & ZIZKA, G. (2013). *Epilobium brachycarpum*: a fast-spreading neophyte in Germany. *Tuexenia*, 33, 259–283.
- GREILHUBER, J., TEMSCH, E. M., & LOUREIRO, J. C. (2007). Nuclear DNA Content Measurement. In: DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., & SUDA, J. (eds): *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. p. 67–99, John Wiley & Sons.
- GRULICH, V. (2012). Red List of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia*, 84(3), 631–645.
- HARRISON, R. G. (1993): Hybrids and hybrid zones: historical perspective. In: HARRISON, R. G. (eds): *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, p. 3–12 Oxford.
- HEGARTY, M. J., & HISCOCK, S. J. (2008). Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current Biology*, 18(10), 435–444.
- HOCH, P. C., & GANDHI, K. (2020). Nomenclatural changes in *Onagraceae*. *PhytoKeys*, 145, 57–62.
- HOLUB, J. (1972). Taxonomic and nomenclatural remarks on *Chamaenerion* auct. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 7, 81–90.
- CHAPMAN, M. A., & BURKE, J. M. (2007). Genetic divergence and hybrid speciation. *Evolution*, 61(7), 1773–1780.
- CHARI, J., & WILSON, P. (2001). Factors limiting hybridization between *Penstemon spectabilis* and *Penstemon centranthifolius*. *Canadian Journal of Botany*, 79(12), 1439–1448.

- KABÁTOVÁ, K., VÍT, P., & SUDA, J. (2014). Species boundaries and hybridization in central–European *Nymphaea* species inferred from genome size and morphometric data. *Preslia*, 86(2), 131–154.
- KAPLAN, Z., DANIHELKA, J., CHRTEK JR, J., PRANČL, J., DUCHÁČEK, M., EKRT, L., KIRSCHNER, J., BRABEC, J., ZÁZVORKA, J., TRÁVNÍČEK, B., DŘEVOJAN, P., ŠUMBEROVÁ, K., KOCIÁN, P., WILD, J., & PETŘÍK, P. (2018). Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 7. *Preslia*, 90(4), 425–531.
- KAY, K. M. (2006). Reproductive isolation between two closely related hummingbird pollinated neotropical gingers. *Evolution*, 60(3), 538–552.
- KRAHULCOVÁ, A., KRAHULEC, F., & KIRSCHNER, J. (1996). Introgressive hybridization between a native and an introduced species: *Viola lutea* subsp. *sudetica* versus *V. tricolor*. *Folia Geobotanica*, 31, 219–244.
- KRAHULEC, F. (1999). Two new hybrids of *Epilobium ciliatum* (*Onagraceae*). *Preslia*, 71(3), 241–248.
- KRAJŠEK, S. S., DERMASTIA, M., & JOGAN, N. (2006). Determination key for Central European *Epilobium* species based on trichome morphology. *Botanica Helvetica*, 116, 169–178.
- KUMAR, P., GUPTA, V. K., MISRA, A. K., MODI, D. R., & PANDEY, B. K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2(4), 141–162.
- KURABAYASHI, M., LEWIS, H., & RAVEN, P. H. (1962). A comparative study of mitosis in the *Onagraceae*. *American Journal of Botany*, 49(9), 1003–1026.
- KYTÖVUORI, I. (1972). The Alpinae group of the genus *Epilobium* in northernmost Fennoscandia. A morphological, taxonomical and ecological study. *Annales Botanici Fennici*, 9(4), 163–203.
- LEITCH, I. J., & BENNETT, M. D. (2007). Genome Size and its Uses: the Impact of Flow Cytometry. In: DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., & SUDA, J. (eds): *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. p. 153–174, John Wiley & Sons.

- LEVIN, D. A. (1975). Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon*, 24(1), 35–43.
- LEVIN, D. A. (1978). The origin of isolating mechanisms in flowering plants In: HECHT, M. K., STEERE, W. C., WALLACE, B. (eds): *Evolutionary Biology*. *Evolutionary Biology*, vol 11, p. 185–317, Springer US.
- LEVIN, D. A. (2002). Hybridization and extinction: in protecting rare species, conservationists should consider the dangers of interbreeding, which compound the more well-known threats to wildlife. *American Scientist*, 90(3), 254–261.
- LEVIN, R. A., WAGNER, W. L., HOCH, P. C., HAHN, W. J., RODRIGUEZ, A., BAUM, D. A., KATINAS L., ZIMMER, E. A., & SYTSMA, K. J. (2004). Paraphyly in tribe *Onagreae*: insights into phylogenetic relationships of *Onagraceae* based on nuclear and chloroplast sequence data. *Systematic Botany*, 29(1), 147–164.
- LOUREIRO, J., RODRIGUEZ, E., DOLEŽEL, J., & SANTOS, C. (2006). Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Annals of Botany*, 98(3), 515–527.
- LOUREIRO, J., TRÁVNÍČEK, P., RAUCHOVA, J., URFUS, T., VIT, P., ŠTECH, M., CASTRO S. & SUDA, J. (2010). The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia*, 82(1), 3–21.
- LOWE, A. J., & ABBOTT, R. J. (2004). Reproductive isolation of a new hybrid species, *Senecio eboracensis* Abbott & Lowe (*Asteraceae*). *Heredity*, 92(5), 386–395.
- LOWRY, D. B., ROCKWOOD, R. C., & WILLIS, J. H. (2008). Ecological reproductive isolation of coast and inland races of *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 62(9), 2196–2214.
- MACKOVÁ, L., VÍT, P., & URFUS, T. (2018). Crop-to-wild hybridization in cherries—Empirical evidence from *Prunus fruticosa*. *Evolutionary Applications*, 11(9), 1748–1759.
- MARTIN, N. H., BOUCK, A. C., & ARNOLD, M. L. (2006). Detecting adaptive trait introgression between *Iris fulva* and *I. brevicaulis* in highly selective field conditions. *Genetics*, 172(4), 2481–2489.

- NEUFFER, B., AUGÉ, H., MESCH, H., AMARELL, U., & BRANDL, R. (1999). Spread of violets in polluted pine forests: morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. *Molecular Ecology*, 8(3), 365–377.
- PALMER, J. D. (1985). Chloroplast DNA and molecular phylogeny. *Bioessays*, 2(6), 263–267.
- PRICE, H. J., HODNETT, G., & JOHNSTON, J. S. (2000). Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Annals of Botany*, 86(5), 929–934.
- RAMSEY, J., BRADSHAW JR, H. D., & SCHEMSKE, D. W. (2003). Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (*Phrymaceae*). *Evolution*, 57(7), 1520–1534.
- RAVEN, P. H. (1976). Generic and sectional delimitation in *Onagraceae*, tribe *Epilobieae*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 63(2), 326–340.
- RHYMER, J. M., & SIMBERLOFF, D. (1996). Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1), 83–109.
- RIESEBERG, L. H., & WILLIS, J. H. (2007). Plant speciation. *Science*, 317(5840), 910–914.
- RIESEBERG, L. H., KIM, S. C., RANDELL, R. A., WHITNEY, K. D., GROSS, B. L., LEXER, C., & CLAY, K. (2007). Hybridization and the colonization of novel habitats by annual sunflowers. *Genetica*, 129, 149–165.
- RIESEBERG, L. H., WHITTON, J., & GARDNER, K. (1999). Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics*, 152(2), 713–727.
- ROBINSON, J. P., & GRÉGORI, G. (2007). Principles of Flow Cytometry. In: DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., & SUDA, J. (eds): *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. p. 19–39, John Wiley & Sons.
- SEAVEY, S. R., & RAVEN, P. H. (1977a). Chromosomal evolution in *Epilobium* sect. *Epilobium* (*Onagraceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 127, 107–119.

- SEAVEY, S. R., & RAVEN, P. H. (1977b). Chromosomal evolution in *Epilobium* sect. *Epilobium* (*Onagraceae*), II. *Plant Systematics and Evolution*, 128, 195–200.
- SEAVEY, S. R., & RAVEN, P. H. (1978). Chromosomal evolution in *Epilobium* sect. *Epilobium* (*Onagraceae*), III. *Plant Systematics and Evolution*, 130, 79–83.
- SEAVEY, S. R., MAGILL, R. E., & RAVEN, P. H. (1977). Evolution of seed size, shape, and surface architecture in the tribe *Epilobieae* (*Onagraceae*). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 64(1), 18–47.
- SENNIKOV, A. N. (2011). *Chamerion* or *Chamaenerion* (*Onagraceae*)? The old story in new words. *Taxon*, 60(5), 1485–1488.
- SHAPIRO, H. M. (2005). *Practical flow cytometry*. p. 1–22, John Wiley & Sons.
- SMEJKAL M. (1997a). *Epilobium* L. – vrbovka. In: SLAVÍK, B., CHRTEK, J. JUN., & TOMŠOVIC, P. (eds): *Květena České republiky* 5, p. 99–132, Academia, Praha.
- SMEJKAL M. (1997b). *Chamerion* (Rafin.) Rafin. – vrbka. In: SLAVÍK, B., CHRTEK, J. JUN., & TOMŠOVIC, P. (eds): *Květena České republiky* 5, p. 95–99, Academia, Praha.
- SOLOMON, J. C. (1982). The systematics and evolution of *Epilobium* (*Onagraceae*) in South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 69(2), 239–335.
- ŠMARDA P., KNÁPEK O., BŘEZINOVÁ A., HOROVÁ L., GRULICH V., DANIHELKA J., VESELÝ P., ŠMERDA J., ROTREKLOVÁ O. & BUREŠ P. (2019). Genome sizes and genomic guanine+cytosine (GC) contents of the Czech vascular flora with new estimates for 1700 species. *Preslia*, 91(2), 117–142.
- ŠMARDA, P., BUREŠ, P., ŠMERDA, J., & HOROVÁ, L. (2012). Measurements of genomic GC content in plant genomes with flow cytometry: a test for reliability. *New Phytologist*, 193(2), 513–521.
- TODESCO, M., PASCUAL, M. A., OWENS, G. L., OSTEVIK, K. L., MOYERS, B. T., HÜBNER, S., HEREDIA, S. M., HAHN, M. A., CASEYS, C., BOCK, D. G., & RIESEBERG, L. H. (2016). Hybridization and extinction. *Evolutionary applications*, 9(7), 892–908.

- VÍT, P., WOLFOVÁ, K., URFUS, T., TAJEK, P., & SUDA, J. (2014). Interspecific hybridization between rare and common plant congeners inferred from genome size data: assessing the threat to the Czech serpentine endemic *Cerastium alsinifolium*. *Preslia*, 86(1), 95–117.
- WAGNER JR, W. H. (1970). Biosystematics and evolutionary noise. *Taxon*, 19(2), 146–151.
- WAGNER, W. L., HOCH, P. C., & RAVEN, P. H. (2007). Revised classification of the *Onagraceae*. *Systematic Botany Monographs*, 83, 1–222.
- WHITEHEAD, M. R., & PEAKALL, R. (2014). Pollinator specificity drives strong prepollination reproductive isolation in sympatric sexually deceptive orchids. *Evolution*, 68(6), 1561–1575.
- WHITNEY, K. D., AHERN, J. R., CAMPBELL, L. G., ALBERT, L. P., & KING, M. S. (2010a). Patterns of hybridization in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 12(3), 175–182.
- WHITNEY, K. D., RANDELL, R. A., & RIESEBERG, L. H. (2010b). Adaptive introgression of abiotic tolerance traits in the sunflower *Helianthus annuus*. *New Phytologist*, 187(1), 230–239.
- WIDMER, A., LEXER, C., & COZZOLINO, S. (2009). Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity*, 102(1), 31–38.
- WOLF, D. E., TAKEBAYASHI, N., & RIESEBERG, L. H. (2001). Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology*, 15(4), 1039–1053.