

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Botanika



Bc. Helena Mašterová

Hybridizace orobinců *Typha latifolia* a *T. angustifolia*

Hybridization of cattails *Typha latifolia* and *T. angustifolia*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Tomáš Fér, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 1. 5. 2013

Podpis

Abstrakt

Tato práce se zabývá hybridizací dvou druhů orobinců, *Typha latifolia* (orobinec širokolistý) a *T. angustifolia* (o. úzkolistý), na území České republiky. Cílem této práce bylo zjistit, jak často dochází k hybridizaci *T. latifolia* a *T. angustifolia*, zda je hybridizace umožněna překrývající se dobou kvetení těchto druhů a zda je možné tyto druhy v kultuře kontrolovaně křížit. K detekci hybridních jedinců byly použity mikrosatelitové DNA markery, které umožňují odhalit hybridizační procesy a odlišit hybridy od rodičovských druhů.

Pomocí molekulárních analýz bylo zjištěno, že na území České republiky dochází k hybridizaci *T. latifolia* a *T. angustifolia*, ale hybridizace není příliš častá. Z 267 analyzovaných jedinců bylo 130 jedinců čistý druh *T. latifolia*, 108 jedinců čistý druh *T. angustifolia* a 29 jedinců hybridních. Z hybridních jedinců bylo 23 pokročilých hybridů, 5 zpětných kříženců a pouze 1 jedinec byl F1 hybrid. Doba kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* se překrývá, což umožňuje hybridizaci, a nepůsobí tedy jako prezygotická reprodukční izolační bariéra, a gamety *T. latifolia* a *T. angustifolia* tak spolu mohou splývat. Při kontrolovaných kříženích se na samičích palicích *T. latifolia* i *T. angustifolia* vytvořila semena, která ale byla neživotaschopná, protože neklíčila. To naznačuje, že zde působí nějaké postzygotické reprodukční izolační bariéry, které způsobují, že většina vzniklých semen je neživotaschopných a nemohou se v přírodě uchytit. V rámci práce byly získané výsledky srovnány s výsledky ze Severní Ameriky, kde dochází k rozsáhlé hybridizaci *T. latifolia* a *T. angustifolia* za vzniku F1 hybridu *T. ×glauca* (o. sivý). K hybridizaci dochází pouze v případě, pokud se doba kvetení obou druhů překrývá. Hybridy *T. ×glauca* pak kvetou ve stejnou dobu jako rodičovské druhy a pokud nejsou zcela sterilní, mohou se dále křížit mezi sebou nebo zpětně křížit s oběma rodičovskými druhy. V populacích nicméně převažují F1 hybridy, kteří zde vznikají opakovaně a jsou považováni za vysoce invazní rostliny, protože se vegetativním růstem rychle šíří a vytváří husté monotypické porosty, které vytlačují oba rodičovské druhy i druhy původní.

Klíčová slova: *Typha latifolia*, *T. angustifolia*, mezidruhová hybridizace, *T. ×glauca*, mikrosatelity, fenologie kvetení, kontrolovaná křížení

Abstract

This study investigates the hybridization of two species of cattails, *Typha latifolia* (Common Cattail) and *T. angustifolia* (Narrow-leaved Cattail) in the Czech Republic. The aim of this study was to determine, how often *T. latifolia* and *T. angustifolia* hybridize, whether hybridization is allowed by overlapping flowering time of these species and whether it is possible these species controlled cross in a culture. For detection of hybrid individuals were used microsatellite DNA markers, which allow to detect hybridization events and differentiate hybrids from the parental species.

Molecular analysis revealed that hybridization of *T. latifolia* and *T. angustifolia* occurs in the Czech Republic, but it is not frequent. Of the 267 analyzed individuals, 130 individuals were pure species *T. latifolia*, 108 individuals pure species *T. angustifolia* and 29 individuals were hybrids. Of the hybrids, 23 were advanced hybrids, 5 were backcrosses and only one individual was F1 hybrid. Flowering time of *T. latifolia* and *T. angustifolia* overlaps, which allows hybridization, and flowering time to not act as a prezygotic reproductive isolation barrier and gametes *T. latifolia* and *T. angustifolia* can blend together. In controlled crosses the female spikes *T. latifolia* and *T. angustifolia* created seeds, but these were unviable, because they didn't germinate. This suggests that some postzygotic reproductive isolation barriers exist and cause the majority resulting seeds is non-viable and doesn't attach in nature. The results of this study were compared with results from North America, where extensive hybridization of *T. latifolia* and *T. angustifolia* occurs and creates the F1 hybrid *T. ×glauca*. The hybridization only occurs, if the flowering times of both species overlap. If hybrids *T. ×glauca* bloom at the same time as the parental species and if they are not completely sterile, they can also hybridize with each other or backcross with both parental species. However, F1 hybrids dominate in populations, are produced repeatedly and are considered highly invasive plants, because they spread rapidly through vegetative growth and create dense monotypic stands that displace both parental and native species.

Key words: *Typha latifolia*, *T. angustifolia*, interspecific hybridization, *T. ×glauca*, microsatellites, flowering phenology, controlled crosses

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární rešerše.....	3
2.1	Mezidruhová hybridizace.....	3
2.2	Mezidruhová hybridizace a invaznost.....	4
2.3	Hybridizace <i>T. latifolia</i> a <i>T. angustifolia</i> v Severní Americe.....	6
2.3.1	Fenologie kvetení <i>T. latifolia</i> a <i>T. angustifolia</i>	6
2.3.2	Status <i>T. ×glauca</i>	7
2.4	Hybridizace <i>T. latifolia</i> a <i>T. angustifolia</i> v Evropě.....	8
2.4.1	<i>T. ×glauca</i> v evropských flórách.....	9
2.5	Zařazení rodu <i>Typha</i> v systému cévnatých rostlin.....	10
2.6	Morfologie <i>T. latifolia</i> , <i>T. angustifolia</i> a <i>T. ×glauca</i>	10
2.7	Rozmnožování <i>T. latifolia</i> , <i>T. angustifolia</i> a <i>T. ×glauca</i>	12
2.8	Rozšíření <i>T. latifolia</i> , <i>T. angustifolia</i> a <i>T. ×glauca</i> v Severní Americe a v Evropě.....	14
2.8.1	Původ <i>T. angustifolia</i> v Severní Americe.....	15
2.9	Ekologie <i>T. latifolia</i> , <i>T. angustifolia</i> a <i>T. ×glauca</i> v Severní Americe a v Evropě.....	15
2.10	Invaznost <i>T. latifolia</i> , <i>T. angustifolia</i> a <i>T. ×glauca</i> v Severní Americe.....	17
2.11	Mikrosatelity a jejich využití v populační genetice.....	18
2.11.1	Mikrosatelity.....	18
2.11.2	Využití mikrosatelitů v populační genetice.....	19
2.11.3	Statistické vyhodnocování mikrosatelitových dat.....	22
3	Metodika.....	24
3.1	Sběr vzorků.....	24
3.2	Sledování fenologie kvetení.....	30
3.3	Kontrolovaná křížení v kultuře a v terénu.....	32
3.4	Klíčení semen z pokusných křížení.....	37
3.5	Molekulární analýzy.....	37
3.6	Statistické vyhodnocení mikrosatelitových dat.....	45
3.6.1	Výpočty populačně-genetických parametrů.....	45
3.6.2	Tvorba fylogenetických stromů.....	45
3.6.3	Analýza hlavních koordinát (<i>Principal coordinate analysis</i> , PCoA) a její vizualizace.....	46
3.6.4	Zjišťování genetické struktury v programu Structure 2.3.3.....	46
3.6.5	Analýza prostorové autokorelace.....	47
3.7	Statistické vyhodnocení morfologických dat.....	48
3.7.1	Analýza hlavních komponent (<i>Principal component analysis</i> , PCA).....	48
3.7.2	Lineární diskriminační analýza (<i>Linear discriminant analysis</i> , LDA).....	49
4	Výsledky.....	50
4.1	Sledování fenologie kvetení.....	50
4.2	Kontrolovaná křížení v kultuře a klíčení semen z pokusných křížení.....	53
4.3	Molekulární analýzy.....	53
4.4	Statistické vyhodnocení mikrosatelitových dat.....	59
4.4.1	Populačně-genetické parametry.....	59
4.4.2	Tvorba fylogenetických stromů.....	63
4.4.3	Analýza hlavních koordinát (PCoA).....	67
4.4.4	Zjišťování genetické struktury v programu Structure 2.3.3.....	71
4.4.5	Analýza prostorové autokorelace.....	74

4.5	Statistické vyhodnocení morfologických dat.....	78
4.5.1	Analýza hlavních komponent (PCA).....	78
4.5.2	Lineární diskriminační analýza (LDA).....	81
5	Diskuze.....	84
5.1	Fenologie kvetení	84
5.2	Kontrolovaná křížení a klíčení semen z pokusných křížení	85
5.3	Hybridizace <i>T. latifolia</i> a <i>T. angustifolia</i>	87
5.4	Morfologie <i>T. latifolia</i> , <i>T. angustifolia</i> a hybridů	89
5.5	Alely detekované u <i>T. latifolia</i> a <i>T. angustifolia</i>	90
5.6	Populace <i>T. latifolia</i> a <i>T. angustifolia</i>	92
6	Závěr.....	94
7	Seznam literatury	96
8	Přílohy	109
8.1	Příloha č. 1	109
8.2	Příloha č. 2	126
8.3	Příloha č. 3	132
8.4	Příloha č. 4	133
8.5	Příloha č. 5	140

1 Úvod

Mezidruhov \acute{a} hybridizace je u rostlin velmi rozšířeným jevem a je považována za důležitý evoluční proces (Wissemann 2007). I když je řada hybridů neživotaschopných nebo méně zdatných než rodičovské druhy a v prostředí se neuchytí (Rieseberg & Ellstrand 1993), někteří se na nové prostředí dokáží adaptovat (Wissemann 2007) a hybridizace tak může vést až ke vzniku nového druhu (Briggs & Walters 2001). Hybridizace je v poslední době také často spojována se vznikem invaznosti. U některých hybridů se mohou objevit genetické výhody, díky nimž jsou hybridi zdatnější než rodičovské druhy a jsou schopní je překonat. V některých případech dochází k jejich rychlému šíření do prostředí a vzniku invaznosti (Ellstrand & Schierenbeck 2000; Schierenbeck & Ellstrand 2009).

V Severní Americe se vyskytují dva druhy orobinců, *Typha latifolia* L. (orobinec širokolistý) a *T. angustifolia* L. (o. úzkolistý). *T. latifolia* je druhem původním, který je široce rozšířený v celé Severní Americe (Smith 1967; Grace & Harrison 1986; Galatowitsch et al. 1999; Smith 2000; Selbo & Snow 2004), naproti tomu *T. angustifolia* je druh nepůvodní, který byl v polovině 19. století neúmyslně zavlečen prvními Evropany na východní pobřeží (Stuckey & Salamon 1987; Ciotir et al. 2012). Odtud se začal šířit směrem na západ a šíření je doprovázeno rozsáhlou hybridizací s *T. latifolia*. Na smíšených stanovištích těchto dvou druhů se pak hojně vyskytují populace F1 hybridů nazývaných *Typha* \times *glauca* Godr. (Hotchkiss & Dozier 1949; Fassett & Calhoun 1952; Smith 1967; Lee 1975; Galatowitsch et al. 1999; Kuehn et al. 1999; Snow et al. 2010; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011). Rodičovské druhy se kříží pouze na lokalitách, kde se překrývá jejich doba kvetení (Ball & Freeland 2013), zatímco na lokalitách, kde je doba kvetení oddělená nebo se překrývá jen velmi málo, ke křížení nedochází (Selbo & Snow 2004). F1 hybridi pak kvetou ve stejnou dobu jako rodičovské druhy, čímž je umožněno také zpětné křížení (Kuehn et al. 1999; Hyde 2005; Ball & Freeland 2013). Zpětní kříženci s oběma rodičovskými druhy a pokročilí hybridi se ale v populacích vyskytují méně často (Smith 1967; Kuehn et al. 1999; Selbo & Snow 2004; Snow et al. 2010; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011), protože F1 hybridi jsou většinou sterilní (Smith 1967; Kuehn et al. 1999). Hybridi jsou velmi úspěšné invazní rostliny, které se díky vegetativnímu růstu rychle šíří a vytváří husté monotypické porosty. Tyto porosty vytlačují jednak rodičovské druhy, ale i ostatní původní mokřadní druhy a snižují tak diverzitu mokřadních společenstev (Galatowitsch et al. 1999; Woo & Zedler 2002; Shih & Finkelstein 2008; Tuchman et al. 2009; Travis et al. 2010).

V Evropě se *T. latifolia* i *T. angustifolia* vyskytují hojně v temperátní zóně (Meusel et al. 1965; Smith 1967) a koexistují spolu pravděpodobně celý Holocén. Zda dochází k hybridizaci i na území Evropy ale nebylo nikdy podrobněji zkoumáno, proto se o této problematice prakticky nic neví. V řadě evropských flór je hybrid *T.* \times *glauca* uveden, ale podrobnější morfologický popis či výskyt ve většině flór chybí. Zdá se tedy, že *T. latifolia*

a *T. angustifolia* se kříží jen velmi vzácně. Podobně studie z Ukrajiny, která se zabývala genetickou a klonální diverzitou *T. latifolia* a *T. angustifolia*, nenašla ve smíšených populacích žádné hybridy (Tsyusko et al. 2005). Naproti tomu ve východních Čechách na přehradě Rozkoš byl nedávno identifikován první geneticky potvrzený evropský hybrid (F. Krahulec, BÚ AV ČR; T. Fér, PřF UK, nepublikovaná data). K hybridizaci tedy dochází i na území Evropy, ale není již zřejmé, jak často a jakou část z populace hybridů tvoří.

V diplomové práci si kladu několik cílů. Za prvé zjistit, zda dochází k překryvu kvetení obou rodičovských druhů i na území České republiky a zda překryv kvetení vede k hybridizaci. Za druhé zjistit, zda při mezidruhovém křížení vznikají semena a zda jsou životaschopná. Za třetí zjistit, jak častí jsou hybridy v populacích v České republice. K objasnění této problematiky byly použity mikrosatelitové DNA markery (Tsyusko-Omeltschenko et al. 2003), neboť umožňují odhalit hybridizační procesy a spolehlivě rozlišit rodičovské druhy a hybridy (Snow et al. 2010).

Otázky, které si kladu ve své diplomové práci:

- 1) Dochází na území České republiky k překryvu doby kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia*? Je důvodem vzácnosti hybridů různá fenologie kvetení?
- 2) Lze úspěšně provést kontrolovaná křížení oběma směry? Mohou hybridní semena vůbec vzniknout?
- 3) Jaký je další vývoj hybridních semen a semenáčků? Jsou hybridní semena životaschopná?
- 4) Dochází na území České republiky k hybridizaci mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia*?
- 5) Jaká je frekvence výskytu hybridů v populacích? Vyskytují se v populacích také pokročilí hybridy a zpětní kříženci?

2 Literární rešerše

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat hybridizaci orobinců *T. latifolia* a *T. angustifolia* na území České republiky pomocí studia morfologie a mikrosatelitových molekulárních markerů a porovnat hybridizaci těchto druhů mezi Českou republikou a Severní Amerikou. V úvodní části pojednávám o důležitých aspektech mezidruhové hybridizace, které práci zasazují do širšího kontextu. Dále srovnávám poznatky o hybridizaci těchto druhů v Severní Americe a v Evropě a uvádím základní informace o morfologii, rozmnožování, rozšíření, ekologii a invaznosti těchto druhů. V závěru této kapitoly pojednávám o mikrosatelitech a o jejich použití v populační genetice.

2.1 Mezidruhová hybridizace

Mezidruhová hybridizace (mezidruhové křížení) je důležitým mechanismem, který na Zemi generuje biologickou diverzitu (Wisseman 2007). Je jedním z procesů tzv. saltanční speciace (náhlé, skokové) (Hegarty & Hiscock 2005), kdy nový druh vzniká náhle vlivem skokových změn v průběhu evoluce uvnitř sympatricky se vyskytujících rodičovských populací. Dalšími mechanismy významných skokových změn jsou například polyploidizace (zmnožení počtu chromozómových sad v genomu), změny v uspořádání a v počtu chromozómů, změny v reprodukčním chování či stabilizace hybridních derivátů (Briggs & Walters 2001).

Mezidruhová hybridizace je u rostlin velmi častým jevem (Wisseman 2007). Hybridi (mezidruhová kříženci) se vyznačují kombinací rodičovských a intermediárních morfologických znaků, ale často nesou také znaky zcela nové nebo extrémní (Rieseberg & Ellstrand 1993). Kombinace nových znaků pak může umožnit radiaci a adaptaci na nová prostředí, protože tyto nové genetické kombinace nejsou v rodičovském prostředí vystaveny selekčnímu tlaku (Wisseman 2007). Reprodukční zdatnost hybridů může být stejná jako u rodičovských druhů, nebo dokonce vyšší (Arnold & Hodges 1995), a někteří hybridi mohou dokonce rodičovské druhy překonat (Bleeker 2007). Díky hybridizaci může docházet i k tzv. introgresi, kdy se vzniklí hybridi zpětně kříží s jedním z rodičovských druhů. Tím dochází k přenosu genů jednoho druhu do druhého (Anderson 1949) a stírají se tak rozdíly mezi dříve izolovanými rodičovskými populacemi (Briggs & Walters 2001).

V přírodě existuje řada geografických a ekologických izolačních mechanismů (např. allopatrický výskyt, rozdílné ekologické nároky či odlišná fenologie kvetení), které brání spontánní hybridizaci a genovému toku mezi druhy. Velmi často ale dochází k jejich narušení (např. kontinentálním driftem, dálkovými migracemi, často také lidskou činností), což může následně vést k mezidruhovému křížení. Příkladem porušení ekologických izolačních mechanismů je například hybridizace mezi druhy *Geum rivale* (kuklík potoční) a *G. urbanum* (k. městský; *Rosaceae*). Oba druhy se v současnosti na území Evropy

vyskytují sympatricky, dříve však byly izolovány ekologickými nároky. V důsledku působení člověka na vegetaci ale došlo na některých místech ke zhroucení přirozených ekologických izolačních mechanismů a druhy se začaly křížit za vzniku *G. × intermedium* (Briggs & Walters 2001). Zavlečením druhu *Spartina alterniflora* (*Poaceae*) do Velké Británie došlo k porušení geografických izolačních mechanismů a tento druh začal hybridizovat s příbuzným druhem *S. maritima*, který je v dané oblasti původní, za vzniku statného hybridu *S. anglica*, který se invazně šíří a vytváří husté porosty (Thompson 1991).

Ve své diplomové práci se zabývám hybridizací dvou druhů orobinců, *T. latifolia* a *T. angustifolia*. V Severní Americe dochází k rozsáhlému křížení těchto druhů za vzniku F1 hybridu *T. × glauca* (Hotchkiss & Dozier 1949; Fassett & Calhoun 1952; Smith 1967; Lee 1975; Galatowitsch et al. 1999; Kuehn et al. 1999; Olson et al. 2009; Snow et al. 2010; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011), který je považován za vysoce invazní rostlinu (Galatowitsch et al. 1999; Shih & Finkelstein 2008; Tuchman et al. 2009; Travis et al. 2010).

2.2 Mezidruhov^á hybridizace a invaznost

Hybridizace mezi druhy nebo různými populacemi může být příčinou evolučních změn, které mohou u hybridů zapříčinit vznik invaznosti (Ellstrand & Schierenbeck 2000; Rieseberg et al. 2007). Při hybridizaci dochází k míchání rozdílných genotypů a vznikající populace hybridů tak mohou mít oproti rodičovským druhům genetické výhody, například zvýšenou genetickou diverzitu, a mohou být invaznější než rodičovské druhy (Ellstrand & Schierenbeck 2000; Schierenbeck & Ellstrand 2009).

Ellstrand & Schierenbeck (2000) navrhli čtyři možné mechanismy, kterými může hybridizace zapříčinit vznik invaznosti – vznik evolučních novinek (*evolutionary novelty*), zvyšování genetické variability (*increase of genetic variation*), redukce mutační zátěže (*dumping genetic load*) a fixace heterozygosity (*fixed heterosis*). Při hybridizaci vznikají evoluční novinky (Ellstrand & Schierenbeck 2000; Rieseberg et al. 2007), které vznikají fixací intermediárních znaků, rekombinací znaků od obou rodičovských druhů nebo ze znaků, které překračují fenotyp obou rodičů (Ellstrand & Schierenbeck 2000). Při následném křížení hybridního potomstva pak dochází ke zvětšování genového *poolu*. Většina vzniklých genotypů nemá žádné adaptace na prostředí, ale u některých se objevují lepší adaptace na určité prostředí než mají rodičovské druhy (Stebbins 1969). Hybridizací také dochází ke zvyšování genetické variability (Ellstrand & Schierenbeck 2000; Rieseberg et al. 2007). Hybridní populace mají větší genetickou variabilitu než populace rodičovské a mohou tak být evolučně úspěšnější (Stebbins 1969). Hybridizace umožňuje malým a izolovaným populacím uniknout z mutační zátěže, protože u těchto populací dochází k hromadění škodlivých mutací a tím ke snižování zdatnosti. Hybridizací mezi takovými populacemi dochází k redukci škodlivých alel a hybridi tak mají větší zdatnost než

rodičovské druhy (Ellstrand & Schierenbeck 2000). Poslední možnou příčinou úspěšnosti hybridů je zvyšování genetické variability fixací heterozygosity (Stebbins 1985; Ellstrand & Schierenbeck 2000; Reed & Frankham 2003). Zvýšení zdatnosti oproti rodičovským druhům tak může být samo o sobě příčinou invaznosti hybridů (Ellstrand & Schierenbeck 2000).

Výše uvedené mechanismy se mohou na vzniku invaznosti podílet současně a často nemusí být jasné, který se na vzniku invaznosti skutečně podílí. Například u hybridu *Spartina anglica* není jasné, zda se na vzniku invaznosti podílí spíše vznik evolučních novinek nebo zvýšená zdatnost fixací heterozygosity, nebo zda se tyto dva mechanismy podílí současně (Ellstrand & Schierenbeck 2000).

Rychlost a úspěšnost invaze je dále ovlivněna stabilizačními mechanismy, které udržují hybridní populace v novém prostředí. Na stabilizaci hybridních populací se podílí převážně klonální šíření, vytváření koalescentních komplexů, kdy se hybridi zpětně kříží s jedním nebo s oběma rodičovskými druhy až dojde ke splynutí těchto taxonů, a vznik allopolyploidie (Ellstrand & Schierenbeck 2000), v menší míře se uplatňuje také agamospermie a permanentní heterozygosity (Holsinger & Ellstrand 1984; Ellstrand & Schierenbeck 2000). Klonální šíření a allopolyploidie se uplatňují u hybridů, jejichž rodičovské taxony jsou dobře diferencované a mají vyvinuté silné reprodukční izolační bariéry. Tito hybridi jsou často sterilní a jejich další šíření je umožněno klonálním rozmnožováním nebo v důsledku nějaké genetické změny, například polyploidizace. Koalescentní komplexy vytváří hybridi, jejichž rodičovské taxony jsou blízké příbuzné a reprodukční izolační bariéry mezi nimi jsou slabé nebo neexistují (Schierenbeck & Ellstrand 2009). Stabilizace hybridních populací vznikem allopolyploidie se uplatňuje například u hybridu *Spartina anglica* šířícího se ve Velké Británii. Tento statný allotetraploidní hybrid se pomocí semen a oddenků začal rychle šířit a kolonizovat slané mokřiny, kde vytváří husté monotypické porosty, které vytlačují rodičovské druhy i druhy původní (Thompson 1991). Rozsáhlé šíření hybridů *Tamarix chinensis* × *T. ramosissima* je podpořené tvorbou koalescentních komplexů s oběma rodičovskými druhy a zároveň klonálním rozmnožováním (Schierenbeck & Ellstrand 2009). *Tamarix chinensis* (tamaryšek čínský) a *T. ramosissima* (t. kaspický; *Tamaricaceae*) byly zavlečeny do Severní Ameriky, kde se začaly vzájemně křížit za vzniku F1 hybridů (Gaskin & Schaal 2002), kteří dále tvoří pokročilé generace hybridů a zpětně se kříží s oběma rodičovskými druhy (Gaskin & Kazmer 2009). Hybridi jsou silně invazní a mají negativní dopad na přirozené ekosystémy (Gaskin & Kazmer 2009). Hybridní druh *Fallopia* × *bohemica* (křídlatka česká; *Polygonaceae*) se v Evropě rychle šíří klonálním růstem. Hybrid vzniká křížením nepůvodních druhů *F. japonica* var. *japonica* a *F. sachalinensis* a je vysoce invazní (Bailey et al. 2009), protože díky silnému klonálnímu růstu rychle kolonizuje nová stanoviště a vytlačuje okolní druhy (Adachi et al. 1996).

Klonální růst se podílí na udržování a šíření hybridu *T. ×glauca* v Severní Americe, který je zde považován za vysoce invazní druh, neboť se rozsáhlým oddenkovým růstem rychle šíří a vytváří husté monotypické porosty, které vytlačují rodičovské druhy i druhy původní (Galatowitsch et al. 1999; Woo & Zedler 2002; Tuchman et al. 2009).

2.3 Hybridizace *T. latifolia* a *T. angustifolia* v Severní Americe

V Severní Americe na smíšených stanovištích *T. latifolia* a *T. angustifolia* dochází k hybridizaci těchto druhů a téměř všude je možné najít populace F1 hybridů nazývaných *T. ×glauca* (Hotchkiss & Dozier 1949; Fassett & Calhoun 1952; Smith 1967; Lee 1975; Galatowitsch et al. 1999; Kuehn et al. 1999; Olson et al. 2009; Snow et al. 2010; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011). Na základě experimentálního křížení bylo zjištěno, že mateřským druhem je vždy *T. angustifolia* a že pyl poskytuje *T. latifolia*. Jedině tímto směrem vznikala životaschopná semena a životaschopné semenáčky. Pokud byla použita jako mateřská rostlina *T. latifolia*, nevznikala žádná semena (Smith 1967; Lee 1975). Podle výsledků Kuehn et al. (1999) semena tímto směrem vznikala, ale jen ve velmi malém množství. Pozdější molekulární studie, které použily chloroplastovou DNA, potvrdily, že maternálním rodičem hybridů v populacích je skutečně *T. angustifolia*, nikoliv *T. latifolia* (Kuehn et al. 1999; Ball & Freeland 2013). Vznik hybridů souvisí s fenologií kvetení obou rodičovských druhů.

2.3.1 Fenologie kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia*

Na stanovištích, kde se doba kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* překrývá, dochází k rozsáhlé hybridizaci, naopak na stanovištích, kde oba druhy kvetou v jinou dobu, je hybridizace vzácná.

Selbo & Snow (2004) sledovaly fenologii kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* v uměle vytvořeném mokřadu v Ohio (Severní Amerika). Autorky zjistily, že *T. angustifolia* zde začíná kvést přibližně o 2 týdny dříve než *T. latifolia*, ale kvete o něco déle, a dochází tak k malému překrytí kvetení obou druhů. Mezidruhové opylení a vznik hybridů *T. ×glauca* se tak zdá málo pravděpodobné, protože většina samičích květů *T. angustifolia* je již odumřelá a není schopná přijmout pyl od *T. latifolia*. To potvrdila i analýza RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), podle které nebyla žádná ze sebraných rostlin v této lokalitě hybridní.

Podobnou studii provedli Hyde (2005) a Ball & Freeland (2013), ale dospěli k odlišným výsledkům. Hyde (2005) sledovala fenologii kvetení na dvou narušených stanovištích v Michiganu (Northern Lower Michigan, Severní Amerika), kde se vyskytovaly všechny 3 druhy – *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca*. Autorka zjistila, že doba kvetení se překrývá u všech tří druhů a mezidruhová hybridizace tedy možná je. Podobně Ball & Freeland (2013) sledovali fenologii kvetení na dvou smíšených

stanovištích v Ontariu (Kanada) a také zjistili, že se doba kvetení u všech tří druhů překrývá a že hybridizace je zde velmi častá. Překryv kvetení *T. ×glauca* s oběma rodičovskými druhy navíc umožňuje také zpětné křížení. Autoři dále pomocí chloroplastové DNA potvrdili, že mateřským druhem hybridů v populacích je *T. angustifolia*.

2.3.2 Status *T. ×glauca*

Status *T. ×glauca* byl v minulosti poměrně sporný. Někteří botanici se domnívali, že se jedná o vzdálený druh, naopak jiní se domnívali, že jde o hybridní taxon. Druh tak byl popsán mnoha botaniky pod různými synonymy, což vneslo zmatek do taxonomie rodu.

Pouhý popis morfologie nedokázal tento spor vyřešit. Druh *T. glauca* byl poprvé popsán ve Francii botanikem Godronem (1861) v díle Flore de Lorraine, který popsal tento druh s intermediárními znaky jako druh odlišný od *T. latifolia* a *T. angustifolia*, nikoliv hybridní. Stejný názor měla i řada dalších botaniků (Ascherschön & Graebner 1896 – 98; Graebner 1900; Hegi 1936). Později Hotchkiss & Dozier (1949) uvedli, že některé znaky mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* jsou sice intermediární, ale jsou jednoznačné a snadno rozlišitelné, a že se tedy o hybridní druh nejedná. Naopak někteří botanici se domnívali, že *T. ×glauca* je hybridní taxon mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia*. Kronfeld (1889) uvedl, že *T. ×glauca* je synonymum pro křížence mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* a Figert (1890) o rok později popsal křížence mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia*, kteří měli intermediární mezeru mezi palicemi. Podobně Fassett & Calhoun (1952) našli při svém výzkumu intermediární jedince *T. ×glauca* a popsali je jako hybridy mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia*. Našli také jedince, kteří měli znaky jednoho nebo druhého rodičovského druhu, a proto se domnívali, že vzácně také dochází k introgresi. Rozřešení přinesl až Smith (1967), který experimentálně křížil *T. latifolia* a *T. angustifolia*, aby zjistil, zda mezi těmito druhy může vůbec docházet ke křížení a zda jsou rodičovskými druhy *T. ×glauca*. Pokusným křížením získal experimentální hybridy, kteří byli ve většině znacích intermediární a byli velmi podobní rostlinám z přírody popisovaných jako *T. ×glauca*. Pozoroval také jedince, kteří měli intermediární znaky mezi F1 hybridy a *T. angustifolia* a usoudil, že vzácně dochází k introgresi směrem k *T. angustifolia*. Smith tak poskytl konečný důkaz, že mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* k hybridizaci skutečně dochází a že *T. ×glauca* je jejich hybridní potomek. Jeho popis *T. ×glauca* se shodoval s popisem údajných hybridních rostlin z Evropy označovaných jako *T. latifolia* × *T. angustifolia*, což nasvědčuje tomu, že k hybridizaci dochází i v Evropě.

Hybridi *T. ×glauca* z přirozených porostů byli definitivně potvrzeni až použitím moderních molekulárních metod. K identifikaci hybridů v přírodních porostech byly jako první využity analýzy isozymů. Tyto analýzy ovšem přinesly poněkud odlišné výsledky. Lee (1975) na základě svých výsledků jasně odlišil rodičovské druhy *T. latifolia*

a *T. angustifolia* a prokázal hybridizaci i introgresi ve směru k *T. angustifolia*. Hybridi byli v intermediární pozici mezi rodiči, u zpětných kříženců docházelo k překrytí morfologických znaků s *T. angustifolia*. Další autoři (Suda 1977; Mashburn et al. 1978; Sharitz et al. 1980), kteří také použili analýzu isozymů, ale vyvrátili, že mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* dochází k hybridizaci. Hybridní status *T. ×glauca* definitivně potvrdila až molekulární metoda RAPD (Kuehn et al. 1999). Pomocí této metody bylo také zjištěno, že se v populacích kromě F1 hybridů vzácně vyskytují i pokročilí hybridi. Dále se ukázalo, že F1 hybridi jsou morfologicky velmi variabilní a dají se jen velmi obtížně odlišit od rodičovských druhů. Nález chloroplastového haplotypu *T. angustifolia* u *T. ×glauca* potvrdil dřívější domněnky (Smith 1967; Krattinger 1975), že mateřským druhem je *T. angustifolia* (Kuehn et al. 1999; Ball & Freeland 2013).

Ke spolehlivější identifikaci hybridů, pokročilých hybridů a zpětných kříženců se ukázaly být vhodnější polymorfní kodominantní mikrosatelitové DNA markery, protože mají v každém lokusu více alel, na rozdíl od dominantních (binárních) RAPD markerů, které v každém lokusu mají nebo nemají jednu alelu (Weising et al. 2005). Analýzu mikrosatelitů k identifikaci hybridních rostlin *T. ×glauca* v Severní Americe poprvé úspěšně použili Snow et al. (2010). F1 hybridi měli v každém lokusu jednu mikrosatelitovou alelu od každého rodiče. Kromě F1 hybridů byli nalezeni i pokročilí hybridi a zpětní kříženci. Změřením morfologických znaků a užitím diskriminační analýzy bylo dále zjištěno, že F1 hybridi mají znaky intermediární mezi rodiči a zpětní kříženci se ve znacích překrývají s F1 hybridy a rodičovskými druhy. Stejně mikrosatelitové lokusy úspěšně použili také Kirk et al. (2011).

2.4 Hybridizace *T. latifolia* a *T. angustifolia* v Evropě

O hybridizaci mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* v Evropě se ví velmi málo a zdá se, že v Evropě k hybridizaci dochází velmi vzácně. První a jediný nález hybridní rostliny v Evropě pochází z přehrady Rozkoš u České Skalice ve východních Čechách (F. Krahulec, BÚ AV ČR, ústní sdělení). Genetická analýza mikrosatelitů potvrdila, že jeden vzorek je skutečně kříženec *T. latifolia* a *T. angustifolia*, protože měl v každém lokusu alely od obou rodičů (T. Fér, PřF UK, ústní sdělení). Na přehradě bohužel orobince již nerostou, proto nemohly být odebrány další vzorky k molekulárním analýzám. Naopak studie z Ukrajiny, ve které autoři zkoumali genetickou a klonální diverzitu *T. latifolia* a *T. angustifolia* pomocí analýzy mikrosatelitů, neobjevila ve smíšených populacích žádné hybridy (Tsyusko et al. 2005).

2.4.1 *T. ×glauca* v evropských flórách

V řadě evropských flór existuje záznam o *T. ×glauca*, ačkoliv ne vždy je uvedeno, zda se jedná o hybrida. V některých flórách je uveden dokonce popis a výskyt.

Výskyt *T. ×glauca* je zmiňován ve flórách Německa (Ascherson & Graebner 1898 – 1899; Schube 1904; Krause 1906; Koch 1907; Vollmann 1914; Niedenzu 1922; Schmeil & Fitschen 1941; Hempel 1994; Griese 1998), Rakouska (Schube 1904), Švýcarska (Koch 1907; Heß et al. 1967), Francie (Grenier 1856; Acloque 1904; Rouy 1912; Chassagne 1956; Molinier 1980; Corillion 1981; De Langhe et al. 1983) a Korsiky (Grenier 1856; Rouy 1912; Jauzein 2007), Belgie a Lucemburska (De Langhe et al. 1983), Holandska (Ooststroom & Reichgelt 1964), Španělska (Penzig 1901; Castroviejo 2007), Skandinávie (Holmberg 1922; Hämet-Ahti L. et al. 1986), Velké Británie (Sell & Murrell 1996; Preston 2002), Polska (Mowszowicz 1973) a Estonska (Kuusk et al. 1979).

V několika flórách je uveden pouze název *T. glauca* a není zde dále uvedeno, zda se jedná o hybrida či nikoliv (Grenier 1856; Penzig 1901; Acloque 1904). Ve většině flór je uveden jen název hybrida *T. angustifolia* × *latifolia* (*T. latifolia* × *angustifolia*) a jeho synonymum *T. glauca* (*T. ×glauca*). Morfologický popis hybrida a jeho výskyt v daném státě je zaznamenán ve flórách Německa (Ascherson & Graebner 1898 – 1899; Griese 1998), Francie (Grenier 1856; Acloque 1904; Rouy 1912; De Langhe et al. 1983) a Korsiky (Grenier 1856; Rouy 1912), Velké Británie (Sell & Murrell 1996; Preston 2002), Skandinávie (Holmberg 1922; Hämet-Ahti et al. 1986), ve flóře Švýcarska (Heß et al. 1967), Belgie a Lucemburska (De Langhe et al. 1983), Španělska (Castroviejo 2007) a Holandska (Ooststroom & Reichgelt 1964). Autoři obecně popisují *T. ×glauca* jako mohutný druh, vysoký až 4 m, s listy modrozelené či šedo-zelené barvy. Znaky v květenství jsou intermediární mezi rodičovskými druhy. Mezi samčí a samičí palicí je mezera nebo se palice dotýkají. Pyl a plody se často nevytváří, ale někteří jedinci mohou být fertillní a produkovat pyl i plody. Pyl je pak tvořen monádami, diádami, triádami až tetradami. Hybridi se množí vegetativně pomocí oddenků a tvoří rozsáhlé porosty. Ve španělské (Castroviejo 2007) a holandské (Ooststroom & Reichgelt 1964) flóře jsou dokonce obrázky listu, samičího květu (listence, chlupy, blizny) a pylu. Ve flóře Velké Británie (Preston 2002) je i mapka rozšíření *T. ×glauca* na Britských ostrovech.

Hybrid je zmíněn i ve čtyřech československých flórách (Domin & Podpěra 1928; Domin 1936; Dostál 1950, 1989), kde je uveden pouze jeho výskyt – na Třeboňsku, u Chocně a u Podivína, a v Klíči ke květeně České republiky, kde je uveden pouze jeho název a rodičovské druhy (Kaplan 2002).

Záznam o *T. ×glauca* se nachází i v několika souhrnných evropských flórách (Nyman 1878 – 1882; Abromeit 1898; Glück 1936; Hegi 1980; Walters 1980). Abromeit (1898) uvádí popis hybrida a jeho výskyt, Hegi (1980) uvádí, že hybridi *T. ×glauca* nejsou vzácní a rozsáhlým vegetativním růstem přerůstají rodičovské druhy.

2.5 Zařazení rodu *Typha* v systému cévnatých rostlin

Rod *Typha* (orobinec) je řazen do čeledi *Typhaceae* (orobincovité), do řádu *Poales* (lipnicotvaré) a do skupiny *Commelinidae*, *Liliopsida* (jednoděložné). Do této čeledi je řazen ještě společně s rodem *Sparganium* (zevar) (Judd et al. 2002; Stevens 2012).

V Severní Americe se vyskytují čtyři druhy orobinců: *T. latifolia* (o. širokolistý), *T. angustifolia* (o. úzkolistý), *T. domingensis* a hybridní druh *T. ×glauca* (o. sivý) (Hotchkiss & Dozier 1949; Smith 1967; Smith 2000; Selbo & Snow 2004). Z Evropy je udáván výskyt pěti druhů orobinců: *T. latifolia*, *T. angustifolia*, *T. minima* (o. nejmenší), *T. laxmani* (o. sítinovitý) a *T. shuttleworthii* (o. stříbrošedý) (Hegi 1980; Walters 1980; Dostál 1989). V České republice jsou *T. minima* a *T. shuttleworthii* považovány za vyhynulé druhy a *T. laxmani* za druh kriticky ohrožený (Procházka 2001).

V současné době neexistuje žádná kvalitní celosvětová taxonomická revize rodu, a proto není jasné, kolik druhů rod přesně zahrnuje. Nevyjasněné druhové pojetí a popis řady druhů, poddruhů a variet velkým množstvím jmen tak vnáší do taxonomie a nomenklatury velký zmatek. Nicméně existuje již recentní fylogeneze rodu *Typha* (Kim & Choi 2011).

2.6 Morfologie *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca*

Rod *Typha* zahrnuje vodní nebo poloterestrické vytrvalé byliny, které mají přímé lodyhy a tlusté plazivé oddenky. Listy jsou vzpřímené, čárkovité, ploché a vyrůstají ve dvou řadách (Dostál 1950, 1989; Walters 1980). Na konci jsou zašpičatělé a uvnitř se nachází aerenchym (Walters 1980). Květy jsou jednopohlavné a jsou uskupené v koncová květenství, která jsou složená ze dvou válcovitých palic (lidově zvané „doutníky“) – dolní palice je samičí, horní je samčí, záhy opadávající. Květy nemají okvěti a na bázi se nachází dlouhé chlupy. V samčích květech jsou nejčastěji 3 tyčinky (zřídka 1 až 7), samičí květy jsou v úžlabí drobného listenu. Semeník je svrchní a jednopouzdrý. Plodem je nažka na dlouhé stopce (gynofor) porostlé dlouhými chlupy (Dostál 1950, 1989).

Determinace druhů může být obtížná, protože morfologické znaky jsou velmi variabilní a druhy jsou si navíc vzájemně podobné (Hotchkiss & Dozier 1949; Smith 1967). V Severní Americe, a zřejmě i jinde, je správná determinace dále ztížena mezitaxonovou hybridizací a malou znalostí frekvence výskytu hybridů. Ke spolehlivější identifikaci jednotlivých druhů a hybridů je proto vhodné použít molekulární DNA markery (Kuehn et al. 1999; Selbo & Snow 2004; Snow et al. 2010; Kirk et al. 2011).

V následující tabulce (tab. č. 1) jsou zaznamenány nejdůležitější morfologické znaky druhů *T. latifolia* (obr. č. 1) a *T. angustifolia* (obr. č. 2), na základě kterých se tyto druhy určují. Tyto morfologické znaky odpovídají spíše popisu evropských rostlin, rostliny ze Severní Ameriky se mohou v některých znacích lišit (R. Wildová, ústní sdělení).

Tab. č. 1: Morfologické znaky druhů *T. latifolia* a *T. angustifolia*. Převzato z Dostál 1950, 1989, Walters 1980 a upraveno.

	<i>T. latifolia</i>	<i>T. angustifolia</i>
výška lodyhy	1 – 2,5 m	1 – 3 m
délka listů	stejně dlouhé nebo kratší než lodyha	stejně dlouhé nebo delší než lodyha
šířka listů	0,8 – 2 cm	0,3 – 1 cm
barva listů	šedozelená, bledě zelená	tmavě zelená
listová pochva	v ústí otevřené, kraje volné	v ústí uzavřené, kraje volné
mezera mezi palicemi	0 – 2,5 cm	0,5 – 12 cm
délka ♀ palice	5 – 21 cm	8 – 35 cm
šířka ♀ palice	1,8 – 3 cm	1,3 – 2,5 cm
barva ♀ palice	tmavě hnědá, černohnědá	tmavě hnědá, červenohnědá
listeny v ♀ květech	chybí	šupinovitě
délka blizny	stejně dlouhá nebo kratší než chlupy na plodních stopkách	stejně dlouhá nebo delší než chlupy na plodních stopkách
barva a tvar blizny	tmavě hnědá, černohnědá, elipticky ztlustlá	tmavě hnědá, široká a zploštělá
chlupy v ♂ květech	jednoduché	vidličnaté nebo šupinovitě
uskupení pylu	tetrády	monády
velikost semen	0,9 – 1,6 mm	1 – 1,3 mm
doba kvetení	červenec – srpen	červen – srpen
počet chromozómů	$2n = 2x = 30$	$2n = 2x = 30$



Obr. č. 1: *T. latifolia* (o. širokolistý) (1).



Obr. č. 2: *T. angustifolia* (o. úzkolistý) (2).

Morfologické znaky *T. ×glauca* (obr. č. 3) jsou poměrně variabilní a často se překrývají se znaky rodičovských druhů (Hotchkiss & Dozier 1949; Fassett & Calhoun 1952; Smith 1967; Kuehn et al. 1999; Kuehn & White 1999; Olson et al. 2009), což velmi znesnadňuje správné a jednoznačné určení hybridů. To je dále znesnadněno podobností *T. ×glauca* s hybridy *T. domingensis* × *T. latifolia*, kteří se vyskytují na jihu Severní Ameriky (Smith 1967). Udává se, že F1 hybridy jsou často statní (Smith 2000; Selbo & Snow 2004; Travis et al. 2010) a v mnoha znacích intermediární mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* (Sharitz et al. 1980). Genety F1 hybridů jsou většinou větší než genety *T. latifolia* a *T. angustifolia* (Travis et al. 2010).



Obr. č. 3: *T. ×glauca* (o. sivý) (3).

K dobrému odlišení těchto tří druhů se ukázala být vhodná lineární diskriminační analýza vybraných morfologických znaků (Kuehn & White 1999; Snow et al. 2010). Kuehn & White (1999) použili k rozlišení *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca* tyto 4 znaky: šířka listu, délka mezery mezi samčí a samičí palicí, délka samičí palice a šířka blizny. Rodičovské druhy vytváří dvě vzdálené skupiny a F1 hybridy tvoří třetí skupinu, která je intermediární mezi nimi. Snow et al. (2010) se pokusili rozlišit ještě zpětné křížence a pokročilé hybridy. Jako nejlepší znaky pro rozlišení rodičovských druhů, F1 hybridů, pokročilých hybridů a zpětných kříženců vybrali tyto znaky: log (šířka/délka nejdelšího listu), log (průměr stonku/délka nejdelšího listu), délka samičí palice, šířka samičí palice, délka mezery mezi palicemi a průměr stonku. Rodičovské druhy opět vytváří dvě vzdálené skupiny a F1 hybridy tvoří třetí skupinu mezi nimi, pokročilí hybridy se také nachází mezi rodičovskými druhy, ale zpětní kříženci se překrývají s rodičovskými druhy a F1 hybridy. K přesné identifikaci je tedy vždy nutné použít molekulární analýzy.

2.7 Rozmnožování *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca*

Rostliny *T. latifolia* a *T. angustifolia* začínají kvést až v druhém roce života (Yeo 1964; Smith 1967). Drobné jednopohlavné květy jsou uspořádané do dvou oddělených palic – samčí se nachází nahoře, pod ní je palice samičí (Krattinger 1975). Samičí květy dozrávají o 1 až 2 dny dříve než samčí, květenství je tedy protogynní, a jsou pro pyl receptivní asi 4 týdny, ale největší množství receptivních květů je během prvních dvou týdnů kvetení (Smith 1967; Krattinger 1975). Rostliny produkují velké množství pylu, *T. latifolia* 70 až 105 miliónů tetrad, *T. angustifolia* až 174 miliónů monád, což je přibližně o polovinu méně než u *T. latifolia*. Pyl je přenášen větrem (anemogamie) a je funkční nejméně 4 týdny, je

však velmi citlivý na vysokou vlhkost a příliš vysoké a nízké teploty (Krattinger 1975). U obou druhů se uplatňuje jak cizosprášení, tak samosprášení (Smith 1967; Krattinger 1975). U *T. latifolia* dochází častěji k samosprášení, neboť mezera mezi palicemi je menší a tetrády mají větší hmotnost a většina pylu tak padá přímo na samičí květenství. U *T. angustifolia* se naopak více uplatňuje cizosprášení, protože monády mají menší hmotnost a udrží se ve vzduchu déle (pokud není silný vítr), a protože samčí květenství je umístěné výš (Krattinger 1975). K samosprášení dochází i mezi lodyhami stejné genety, tzn. mezi stejnými klony (Krattinger 1975), proto je v hustých porostech orobinců nízká genetická variabilita (Lamote et al. 2005; Tsyusko et al. 2005). Apomixie (agamospermie) se v rodě *Typha* vyskytuje velmi vzácně (Krattinger 1975).

Plodem je velmi malá jednosemenná nažka na dlouhé stopce (obr. č. 4) (Dostál 1950). Nažky jsou produkované v ohromném množství (Smith 1967) – až 222 000 v každém květenství (Yeo 1964). K jejich uvolňování dochází po prasknutí palice, když je květenství suché (Krattinger 1975). Nažky jsou rozšiřovány větrem (anemochorie). Tomu napomáhají chlupy na plodních stopkách, které fungují jako padák a plody jsou tak nesený na dlouhé vzdálenosti (Smith 1967; Krattinger 1975). Plody se mohou šířit i vodou (hydrochorie) (Vogt et al. 2004; Neff & Baldwin 2005; Boedeltje et al. 2008). Semena jsou životaschopná zhruba 3 až 4 roky (Smith



Obr. č. 4: Nažka *T. latifolia* na dlouhé stopce s chlupy (4).

1967) a klíčí jen při dostatečné vlhkosti (Krattinger 1975). Slouží především ke kolonizaci volných stanovišť (McNaughton 1968). Na stanovištích s dalšími rostlinami je klíčení semen a růst semenáčků omezené (Smith 1967; McNaughton 1968), protože dospělí jedinci limitují uchycení a růst semenáčků a jejich opad obsahuje silné inhibitory klíčení semen (McNaughton 1968). V hustých porostech proto dominuje vegetativní rozmnožování (Grace & Wetzel 1981a).

Rostliny *T. latifolia* a *T. angustifolia* se rozmnožují také velmi efektivně vegetativně pomocí masivního oddenkového růstu (Smith 1967). Vegetativní rozmnožování slouží především k lokální kolonizaci stanovišť (McNaughton 1975). Jednotlivé klony jsou spojeny oddenky po 2 až 3 roky (Kuehn et al. 1999). Klonální rozmnožování, stejně jako samosprášení, snižuje genetickou variabilitu v hustých porostech orobinců.

Dospělí hybridi *T. ×glauca* jsou většinou sterilní, protože při sporogenezi dochází k nepravidelné meióze (Smith 1967; Kuehn et al. 1999). Někteří F1 hybridy tvoří malé procento funkčního pylu, který je tvořen směsí monád, diád, triád a tetrad, s převahou monád (Smith 1967; Finkelstein 2003; Selbo & Snow 2004; Hyde 2005) a tetrad (Hyde

2005), ale produkce životaschopných semen je velmi vzácná a ve srovnání s rodiči velmi nízká (Smith 1967; Selbo & Snow 2004). F1 hybridi proto přetrvávají v populacích hlavně díky vegetativnímu rozmnožování oddenky, pomocí kterých formují husté porosty (Smith 1967; Kuehn et al. 1999; Selbo & Snow 2004; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011). Podle nejnovější studie mohou někteří F1 hybridi tvořit značné množství funkčního pylu, až 80 %, a mohou se tak zpětně křížit s rodičovskými druhy (Hyde 2005).

V populacích převažují F1 hybridi (Kuehn et al. 1999; Selbo & Snow 2004; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011), kteří vznikají opakovaně (Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011). Vzácně vznikají pokročilí F2 hybridi nebo zpětní kříženci s oběma rodičovskými druhy (Smith 1967; Kuehn et al. 1999; Selbo & Snow 2004; Snow et al. 2010; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011), kteří jsou fertillní a jsou schopni produkovat více semen než F1 hybridi (Smith 1967). Více semen pak produkují zpětní kříženci s *T. angustifolia*, produkce semen zpětným křížením s *T. latifolia* je podstatně menší (Smith 1967).

Životaschopná hybridní semena a semena zpětných kříženců jak s *T. latifolia*, tak s *T. angustifolia*, se dají úspěšně získat i kontrolovaným křížením v kultuře a takto vzniklá semena velmi dobře klíčí i v umělých podmínkách (Levy 2007).

2.8 Rozšíření *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca* v Severní Americe a v Evropě

Rod *Typha* tvoří dominanty mokřadní vegetace skoro po celém světě, kromě chladnějších oblastí (Meusel et al. 1965; Smith 1967), a vytváří husté monotypické porosty (Dykyjová & Květ 1978; Grace & Wetzel 1981a). Nachází se jak v sladkých, tak v brakických vodách (Suda et al. 1977), a kolonizuje nejrůznější zamokřená stanoviště (okraje rybníků a jezer, mokřiny, škarpy podél cest; Sharitz et al. 1980). Dokáže růst na stanovištích se zvýšeným obsahem živin (Galatowitsch et al. 1999; Tuchman et al. 2009) i na stanovištích kontaminovaných těžkými kovy (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) (Manios et al. 2003).

V Severní Americe se vyskytuje hojněji *T. latifolia*, který je zde původní (Smith 1967; Grace & Harrison 1986; Galatowitsch et al. 1999; Smith 2000; Selbo & Snow 2004). Je široce rozšířený v temperátní zóně po celé Severní Americe, na jihu Kanady a také ve střední Aljašce (Smith 2000). Naproti tomu *T. angustifolia* má omezenější geografické rozšíření. Nachází se na východním pobřeží Severní Ameriky, na jižním pobřeží Atlantiku, v oblasti Velkých jezer a jeho výskyt zasahuje až k Velkým planinám. Nachází se též na jihu Kanady a izolovaně také na pár lokalitách na západním pobřeží v severní a střední Kalifornii (Smith 2000). *T. ×glauca* je široce rozšířený v temperátní zóně Severní Ameriky téměř všude, kde se vyskytují rodičovské druhy sympatricky (Smith 1967; Galatowitsch et al. 1999; Shih & Finkelstein 2008; Olson et al. 2009; Snow et al. 2010; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011). Má podobné rozšíření jako *T. angustifolia*, ale méně rozsáhlé

(Galatowitsch et al. 1999), a často se vyskytuje i v oblastech, kde se rodičovské druhy nenachází (Smith 1967).

V Evropě se *T. latifolia* i *T. angustifolia* vyskytují hojně v temperátní zóně, ale druh *T. angustifolia* je méně častý (Meusel et al. 1965; Smith 1967). Oba druhy koexistují v Evropě pravděpodobně celý Holocén.

2.8.1 Původ *T. angustifolia* v Severní Americe

Na původ *T. angustifolia* v Severní Americe existují dva rozdílné názory. Prvním z předpokladů je, že *T. angustifolia* je v Severní Americe nepůvodní a že byl v první polovině 19. století zavlečen Evropany na východní pobřeží. Odtud se šířil k Velkým jezerům a dále na západ. Tuto domněnku podporuje fakt, že ve flórách východních států z roku kolem 1800 nejsou žádné záznamy o *T. angustifolia*. První záznamy z několika severovýchodních lokalit spadají do 2. poloviny 19. století (Stuckey & Salamon 1987). Opačný názor přináší palynologické studie, jejichž autoři se domnívají, že *T. angustifolia* se vyskytoval na východním pobřeží Severní Ameriky už před příchodem Evropanů (Carmichael 1980; Pederson et al. 2005; Shih & Finkelstein 2008). Nálezy pylových zrn *T. angustifolia*, jejichž stáří se odhaduje na 1 200 až 2 700 let, v sedimentových vrstvách naznačují, že se tento druh musel v Severní Americe vyskytovat před příchodem Evropanů (Carmichael 1980; Pederson et al. 2005). Tuto domněnku podporují také nálezy hybridu *T. ×glauca*, jejichž stáří je přibližně 1 200 let, což naznačuje, že *T. angustifolia* byl v Severní Americe pravděpodobně daleko dříve (Pederson et al. 2005). Nový pohled na tuto problematiku přinesla studie Ciotir et al. z roku 2012. Autoři použili analýzu mikrosatelitů a sekvence chloroplastové DNA k porovnání genotypů *T. latifolia* a *T. angustifolia* z Evropy a Severní Ameriky. Na základě výsledků z modelování (*Approximate Bayesian computation*) autoři potvrdili pravděpodobnost hypotézy, že *T. angustifolia* byl zavlečen do Severní Ameriky z Evropy, protože evropské a americké populace jsou geneticky podobné, a že tato introdukce je relativně recentní.

2.9 Ekologie *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca* v Severní Americe a v Evropě

V Severní Americe mají *T. latifolia* a *T. angustifolia* různé stanovištní nároky (Smith 1967). *T. latifolia* roste ve sladkých vodách (Fassett & Calhoun 1952; McMillan 1959) převážně na nenarušených stanovištích, například v močálech, bažinách, na okrajích rašelinných jezer, na vlhkých loukách (Smith 1967). Místy se ale vyskytuje na stanovištích s nestabilními podmínkami, kde roste spolu s *T. angustifolia*. *T. angustifolia* se nachází většinou na narušených stanovištích s relativně nestabilními podmínkami (Smith 1967). Je obecně tolerantnější ke stresovým faktorům – toleruje nízké koncentrace solí (Fassett & Calhoun 1952; McMillan 1959), snáší lépe sucho a kolísání hladiny vody (McMillan

1959; Grace & Wetzel 1981a; 1998). Na severovýchodě USA a jihovýchodě Kanady dochází k překryvu výskytu obou druhů a vznikají zde smíšené porosty (Smith 1967; Selbo & Snow 2004). Na těchto stanovištích pak dochází mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* ke kompetici a k segregaci podle vodní hloubky (Grace & Wetzel 1981a, 1998; Waters & Shay 1990, 1992). *T. latifolia* se vyskytuje spíše v mělkých vodách, kde je kompetičně silnější než *T. angustifolia*. *T. angustifolia* je slabším kompetitorem a dominuje spíše v hlubších vodách (Grace & Wetzel 1981a, 1998; Waters & Shay 1990, 1992; Travis et al. 2010). Tento rozdíl v kompetiční zdatnosti je dán rozdílnou morfologií obou druhů (Grace & Wetzel 1981a). *T. latifolia* má širší listy než *T. angustifolia* a dosahuje větší listové plochy, navíc produkuje listy ve vegetační sezóně dříve a je tolerantnější k zastínění (Grace & Wetzel 1981b). Na začátku sezóny tak může dosáhnout vyšší růstové rychlosti a vyprodukovat více biomasy než *T. angustifolia* a může jej vytlačit z mělkých vod do hlubších. *T. angustifolia* je díky vysokým úzkým listům a rozsáhlé tvorbě oddenků schopný růst v hluboké vodě a může tak uniknout z kompetice (Grace & Wetzel 1981a). Nejnovější studie z roku 2012, která se zabývá distribucí *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca* podle hloubkového gradientu (McKenzie-Gopsill et al. 2012), ale přinesla úplně odlišné výsledky. Autoři na 18 smíšených stanovištích ve východní oblasti kolem Velkých jezer testovali, zda tyto tři druhy preferují rozdílnou hloubku vody a zda dochází k segregaci podle hloubkového gradientu. Ke správné identifikaci druhů použili analýzu mikrosatelitů. Autoři zjistili, že mezi druhy k žádnému rozdělení podle hloubky nedochází a že všechny tři druhy soupeří o podobné habitaty. *T. ×glauca* se vyskytuje zejména na eutrofních narušených stanovištích s nestabilními podmínkami, jako jsou například škrapy podél silnic, umělé rybníky, stepní mokřady, částečně odvodněná nebo jinak narušená jezera, estuáry podél mořských pobřeží, kde často dochází ke kolísání hladiny vody (McMillan 1959; Smith 1967; Olson et al. 2009). Podobně jako *T. angustifolia* toleruje nízké koncentrace solí (Smith 1967). Roste podél širokého gradientu vodní hloubky a vykazuje fenotypovou plasticitu na různou hloubku vodního sloupce – s měnicí se hloubkou vody se mění jak výška lodyh, tak jejich hustota (Waters & Shay 1990, 1992). Se vzrůstající hloubkou vody dochází ke vzrůstu výšky lodyh, čímž mohou hybridy limitovat dostupnost světla a živin a překonat tak ostatní rostlinné druhy (Travis et al. 2010). Na smíšených stanovištích všech tří druhů může být *T. ×glauca* dominantní a může nad oběma rodiči převládat (Smith 1967; Galatowitsch et al. 1999).

V Evropě mají *T. latifolia* a *T. angustifolia* podobné ekologické nároky. Oba druhy tvoří typické dominanty eutrofních mokřadů a vyskytují se na podobných stanovištích, například kolem rybníků, na březích pomalu tekoucích řek. *T. angustifolia* je schopný růstu i v mezotrofních vodách. *T. latifolia* je obecně méně tolerantní k periodickému vysychání a ke kolísání vodní hladiny. Naproti tomu *T. angustifolia* je lépe adaptován na tyto stresové podmínky a roste převážně v hlubších vodách. *T. latifolia* je považován za pionýrský druh, který osidluje nově vzniklá stanoviště a stojí tak na počátku sukcese. Vykazuje vyšší

stupeň lokální kolonizace vzhledem k *T. angustifolia* (Hejný & Husák 1978). Při sběru vzorků jsem vyzorovala, že *T. latifolia* má tendenci růst v mělké vodě u břehu a *T. angustifolia* naopak ve větší hloubce dál od břehu, ale na řadě smíšených stanovišť se oba druhy vzájemně prorůstaly bez ohledu na hloubku vody.

2.10 Invaznost *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca* v Severní Americe

Všechny tři druhy jsou v současné době v Severní Americe považovány za invazní plevele mokřadů (Galatowitsch et al. 1999; Shih & Finkelstein 2008; Tuchman et al. 2009; Travis et al. 2010), protože se rozsáhlým oddenkovým růstem a vysokou produkcí semen rychle šíří (Smith 1967) a vytváří husté monotypické porosty (Grace & Wetzel 1981a), které vytlačují původní rostlinné druhy a redukuje tak diverzitu (Shih & Finkelstein 2008). Hojně převládají především v pobřežních mokřadech kolem Velkých jezer (Shih & Finkelstein 2008).

T. angustifolia je považován za invaznější než *T. latifolia*, protože se v posledním století šířil rychleji (Hotchkiss & Dozier 1949; Galatowitsch et al. 1999; Smith 2000). Na začátku 19. století se z východního pobřeží Severní Ameriky začal šířit směrem na západ do regionu Velkých jezer a na Středozápad a od počátku do první poloviny 20. století byl rozsah nárůstu značně větší než u *T. latifolia*. V pobřežních oblastech na severovýchodě pak došlo k ustálení rychlosti šíření, ale ve vnitrozemí a v severnějších oblastech se rychlost invaze dále zvětšovala až do roku 1970. Přibližně od roku 1980 se oba druhy šíří stejnou rychlostí a pokračují v šíření v narušených mokřadech. Vyšší rychlost invaze *T. angustifolia* byla zřejmě v důsledku zvýšené lidské aktivity v tomto období, díky které vzrostl výskyt narušených mokřadů (Shih & Finkelstein 2008).

T. ×glauca je považován za nejagresivnější z těchto tří druhů. Je invazní především na severovýchodě Severní Ameriky (Shih & Finkelstein 2008), hlavně v oblasti kolem Velkých jezer (Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011). Dosahuje velkých velikostí (až přes 3 m) a pomocí oddenkového růstu se rychle šíří a vytváří husté monotypické porosty, které jsou efektivnější ve vytlačování původních druhů a snižování diverzity než rodičovské druhy (Galatowitsch et al. 1999; Woo & Zedler 2002; Tuchman et al. 2009). Na stanovištích s *T. ×glauca* dále dochází k akumulaci velkého množství opadu, který podporuje další růst hybridu (Tuchman et al. 2009). Pod opadem dochází k redukci světla (Farrer & Goldberg 2009) a mladé oddenky původních druhů nejsou schopné zajistit dostatek zdrojů pro růst před dosažením odpovídající úrovně osvětlení pro fotosyntézu (Tuchman et al. 2009). Přítomnost *T. ×glauca* také zvyšuje množství organické hmoty a koncentraci živin (NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-}) (Angeloni et al. 2006; Tuchman et al. 2009). Hybridi produkují větší množství biomasy než ostatní druhy, díky čemuž efektivněji zachycují uhlík. Dekompozicí listů, podzemní tkáně, případně vylučováním exudátů pak

dochází ke zvyšování půdní organické hmoty a koncentrace živin (Álvarez & Bécares 2006; Angeloni et al. 2006). Tento negativní efekt na původní společenstva má *T. ×glauca* jak na eutrofních stanovištích, protože zde dokáže lépe využívat zvýšenou dostupnost živin než původní druhy (Wo & Zedler 2002; Craft et al. 2006), tak i na stanovištích chudých na živiny, která svou přítomností o živiny obohacuje (Tuchman et al. 2009). Negativní efekt nebyl zjištěn u nově kolonizovaných stanovišť, protože zde ještě nedošlo k akumulaci vrstvy opadu (Tuchman et al. 2009).

Všechny tři druhy vykazují zvýšenou invaznost a kompetitivní sílu oproti ostatním mokřadním rostlinám díky zvýšené lidské činnosti, která narušuje ekosystémovou integritu v mokřadech. Šíření by mohlo být omezeno snížením narušení v mokřadech jako je nárůst vodní hladiny či přísun živin (Shih & Finkelstein 2008).

2.11 Mikrosatelity a jejich využití v populační genetice

2.11.1 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou repetitivní sekvence DNA, které jsou tvořeny opakováním zpravidla mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidů (vzácně i penta- a hexanukleotidů). Bývají proto označovány jako krátké tandemové repetice (*short tandem repeats*, STRs) nebo repetice jednoduchých sekvencí (*simple sequence repeats*, SSRs). Délka mikrosatelitového lokusu dosahuje obvykle délky 5 až 40 opakování. Počet opakování v konkrétním místě DNA definuje alelu. Délka alely se zjistí PCR amplifikací daného lokusu pomocí primerů kompatibilních k okolním sekvencím a následnou kapilární elektroforézou v automatickém sekvenátoru (Weising et al. 2005).

Podle uspořádání repetice rozlišujeme 3 typy mikrosatelitů: jednoduché (*simple*), složené (*compound*) a přerušované (*interrupted*). U jednoduchých mikrosatelitů není opakování ničím přerušeno (např. $(AC)_n$, kde n označuje počet opakování nukleotidové sekvence). Složené mikrosatelity jsou tvořené dvěma za sebou jdoucími mikrosatelity o různé sekvenci nukleotidové repetice (např. $(AC)_n(TG)_n$). U přerušovaných mikrosatelitů dochází k přerušování nukleotidových repetice bázemi (např. $(AC)_nTGTAGG(AC)_n$) (Jarne & Lagoda 1996). U většiny druhů převažují dinukleotidové repetitivní sekvence (Wang et al. 1994; Schug et al. 1998). Z dinukleotidů je nejrozšířenější opakování $(CA)_n$ (Ellegren 2004), u rostlin naopak převažuje opakování $(AT)_n$ (Lagercrantz et al. 1993). Mikrosatelity se nachází i v chloroplastové DNA, kde naopak převažují mononukleotidové repetitivní sekvence (Provan et al. 2001). V molekulárních analýzách se nejčastěji používají dinukleotidy, trinukleotidy a tetranukleotidy (Li et al. 2002).

Mikrosatelity se vyskytují hojně v celém genomu a nacházejí se především v nekódujících oblastech, kde jsou zastoupeny všechny typy repetitivních sekvencí, od mono- po hexanukleotidy (Metzgar et al. 2000). Velmi vzácně se nachází v oblastech kódujících proteiny (Wang et al. 1994; Edwards et al. 1998; Wren et al. 2000; Li et al.

2002) a zde pak převažují tri- a hexanukleotidy oproti ostatním typům repetitivních sekvencí (Metzgar et al. 2000; Tóth et al. 2000; Li et al. 2002).

Ačkoliv jsou mikrosatelity považovány za evolučně neutrální DNA markery, některé hrají roli v důležitých biologických procesech. Bylo prokázáno, že mikrosatelity mohou hrát roli v organizaci chromatinu a struktuře chromozómů (Li et al. 2002). Řada mikrosatelitů a minisatelitů jsou tzv. horká místa (*hotspots*) pro rekombinaci (Jeffreys et al. 1998). Mikrosatelity mohou také ovlivňovat replikaci DNA, enzymy řídící buněčné cykly, aktivitu genů a v oblastech intronů mohou ovlivňovat genovou transkripci. Některé mikrosatelity také slouží jako vazebná místa pro různé regulační proteiny a řada z nich může také ovlivňovat genovou translaci. Tyto funkčně důležité mikrosatelity mohou být pod silným selekčním tlakem ze strany prostředí, a proto nemohou být neutrální (Li et al. 2002).

2.11.2 Využití mikrosatelitů v populační genetice

Využití mikrosatelitů v populační genetice vychází z jejich specifických vlastností. Mikrosatelity jsou velmi početné a rozmístěné po celém genomu. Jsou vysoce polymorfni – jejich vysoká mutační rychlost (10^{-2} až 10^{-6} na lokus za generaci) generuje značné množství alel, které se liší svou délkou (počtem opakování dané repetyce v rámci alely) (Schlötterer 2000, 2004). Jsou kodominantní, což znamená, že můžeme rozlišit heterozygoty od homozygotů, a jsou vysoce druhově specifické (Selkoe & Toonen 2006; Mandák 2011). To může být za určitých okolností výhodné, například při kontaminaci studované DNA je malá pravděpodobnost amplifikace DNA jiného organismu (Selkoe & Toonen 2006; Mandák 2011), ale také nevýhodné – pro každý studovaný druh je potřebné vyvinout specifický pár primerů pro PCR, což je finančně i časově velmi náročné (Zane et al. 2002).

Mikrosatelity se používají například k analýze rodičovství (*parentage analysis*) a k identifikaci klonů (Queller et al. 1993; Ellegren 2004), kdy lze pomocí analýzy mikrosatelitů s vysokou pravděpodobností určit rodiče daného jedince a zda dva jedinci náleží k jednomu klonu či nikoliv. Například Dow & Ashley (1996) použili analýzu mikrosatelitů k analýze rodičovství a k určení prostorových vztahů mezi dospělými stromy a semenáčky u druhu *Quercus macrocarpa* (*Fagaceae*). Do analýzy bylo zahrnuto 62 dospělých stromů a 100 semenáčků z jedné lokality. Na základě mikrosatelitové analýzy autoři zjistili, že se na stanovišti nacházely pouze čtyři stromy, které byly mateřskými rodiči většiny semenáčků. Dále byla zjištěna vysoká míra opylení na velké vzdálenosti (více jak polovina semenáčků byla opylena pylem ze stromů, které se nacházely mimo studovanou lokalitu) a vysoká míra šíření semen na větší vzdálenosti.

Mikrosatelity jsou také vhodnými markery pro měření různých populačně-genetických charakteristik, například stanovení velikosti a struktury populace, genetické

proměnlivosti a míry genového toku, individuální genotypování jedinců a vztahy jedinců v populaci, historie populací, detekce migrací (Selkoe & Toonen 2006; Mandák 2011), demografické procesy (Ellegren 2004; Selkoe & Toonen 2006; Mandák 2011). Například Edh et al. (2007) použili jaderné a chloroplastové mikrosatelity k určení populační struktury a genového toku mezi geograficky izolovanými populacemi endemického druhu *Brassica cretica* (*Brassicaceae*) na Krétě. Na základě mikrosatelitové analýzy autoři zjistili vysoký stupeň populační diferenciace a relativně nízkou vnitropopulační diverzitu. Dále zjistili, že mezi populacemi dochází jen velmi zřídka k migracím.

V poslední době jsou mikrosatelity také hojně využívány ke studiu mezidruhovému hybridizace, protože dovolují odhalit hybridizační procesy a spolehlivě tak rozlišit rodičovské druhy, F1 hybridy, pokročilé hybridy a zpětné křížence (Snow et al. 2010). V řadě studií použili autoři analýzu mikrosatelitů k odhalení mezidruhovému hybridizace jak u rostlin, tak u živočichů.

Field et al. (2010) pomocí analýzy mikrosatelitů zkoumali asymetrický genový tok ve smíšených populacích druhů *Eucalyptus aggregata* a *E. rubida* (*Myrtaceae*) v jižní Austrálii. K analýze použili 6 mikrosatelitových lokusů a k dispozici měli 421 vzorků. Na základě analýzy mikrosatelitů autoři zjistili, že se ve smíšených populacích vyskytují jak F1 hybridy a pokročilé hybridy, tak zpětní kříženci, kteří vznikali převážně zpětným křížením s *E. aggregata*. To naznačuje, že větší genetický vstup do hybridních populací má druh *E. aggregata*. Gomez et al. (2010) použili mikrosatelity k odhalení hybridizace mezi dříve izolovanými druhy rodu *Coffea* (*Rubiaceae*) – *Coffea canephora*, *C. liberica* a *C. arabica*. Tyto tři druhy byly od roku 1850 opakovaně introdukovány do Nové Kaledonie kvůli kultivaci. Řada plantáží byla ale opuštěna a kultivary se tak vyvíjely v přírodních podmínkách. Autoři použili 26 mikrosatelitových lokusů, aby identifikovali čisté druhy a hybridy. V populacích bylo nalezeno velké množství hybridních jedinců, což naznačuje, že v minulosti mezi druhy docházelo ke genovému toku a vytvořila se zde hybridní zóna. Mikrosatelity byly také úspěšně použity k detekci hybridizace mezi dvěma druhy orchidejí vyskytujícími se v Brazílii, *Epidendrum fulgens* a *E. puniceoluteum* (*Orchidaceae*). Tyto druhy mají odlišnou ploidní úroveň – *E. fulgens* je diploidní ($2n = 2x = 24$ chromozómů), *E. puniceoluteum* je tetraploidní ($2n = 4x = 52$ chromozómů). Ve studii byly použity jaderné i chloroplastové mikrosatelity k analýze 463 jedinců z 8 populací. V 6 smíšených populacích byli nalezeni F1 hybridy i pokročilé hybridy a také několik zpětných kříženců, kteří vznikají spíše křížením s druhem *E. fulgens*. Ačkoliv tedy mají oba druhy odlišný počet chromozómů a odlišnou ploidní úroveň, což může působit jako silná reprodukční bariéra, dochází mezi těmito druhy orchidejí k mezidruhovému hybridizaci (Pinheiro et al. 2010).

Mikrosatelity jsou také hojně využívány k detekci hybridizace u živočichů. Brown et al. (2010) pomocí mikrosatelitů odhalili mezidruhovému hybridizaci mezi dvěma druhy buňáků (*Pterodroma*; *Procellariidae*), b. trinidadským (*P. arminjoniana*)

a b. proměnlivým (*P. neglecta*). B. trinidadský se vyskytuje na ostrově Round Island v Indickém oceánu, ale hnízdí také na ostrově Trindade Island v jižním Atlantiku, kde se vyskytuje b. proměnlivý. Na ostrově Round Island se také vyskytují zvláště vypadající jedinci, kteří jsou podobní b. proměnlivému. Autoři na základě analýzy 9 mikrosatelitových lokusů zjistili, že zvláště vypadající jedinci jsou skutečně hybridy mezi těmito dvěma druhy a že k mezidruhové hybridizaci a zpětnému křížení dochází pravděpodobně po mnoho generací. Godinho et al. (2011) použili analýzu mikrosatelitů k detekci mezidruhové hybridizace mezi vlkem obecným (*Canis lupus*; *Canidae*) a domestikovanými psy na Pyrenejském poloostrově. Autoři chtěli určit rozdíly mezi vlky a psy, frekvenci a směr hybridizace. K tomu použili 42 mikrosatelitových lokusů. Na základě analýzy autoři zjistili, že vlci a psi tvoří dvě geneticky odlišné skupiny a že hybridy se vyskytují v populacích poměrně hojně, ale ke zpětnému křížení dochází velmi vzácně. Dále také zjistili, že častěji dochází ke křížení samic vlků a samců psů. Mikrosatelity byly úspěšně použity k odhalení mezidruhové hybridizace u bezobratlých. Kronauer et al. (2011) studovali hybridizaci u dvou druhů východoafrických nájezdních mravenců, *Dorylus molestus* a *D. wilverthi* (*Formicidae*). K analýze bylo použito 5 mikrosatelitových lokusů, pomocí nichž autoři zjistili, že se v populacích vyskytují jak hybridní jedinci, tak zpětní kříženci. Ve všech výše zmíněných studiích použili autoři k detekci hybridních jedinců Bayesovské shlukování v programu Structure (Pritchard et al. 2000) a Field et al. (2010), Pinheiro et al. (2010) a Godinho et al. (2011) ještě použili k přesnějšímu rozlišení pokročilých hybridů a zpětných kříženců program Newhybrids (Anderson & Thompson 2002).

Snow et al. (2010) úspěšně použili analýzu mikrosatelitů k identifikaci hybridních rostlin *T. ×glauca* ze Severní Ameriky. Autoři použili 9 z 11 dinukleotidových mikrosatelitových lokusů (obr. č. 5), které byly v roce 2003 vyizolovány z *T. angustifolia* a které jsou vysoce polymorfni a obsahují velký počet alel (Tsyusko-Omelchenko et al. 2003). Z těchto 9 mikrosatelitových lokusů pouze 7 lokusů dokázalo odlišit rodičovské druhy od hybridů a detekovat pokročilé a zpětné křížence. Stejně mikrosatelitové lokusy použili také Kirk et al. (2011), kteří zjišťovali, zda se hybridy *T. ×glauca* vyskytují v Severní Americe na širším prostorovém měřítku, a tyto lokusy byly také použity k identifikaci hybrida z přehrady Rozkoš (T. Fér, PřF UK, nepublikovaná data). Proto jsem ve svých analýzách použila stejné lokusy, které použili výše zmínění autoři.

Locus	Primer Sequence 5' → 3'	GenBank Accession Number	Touchdown Temperature	Clone Repeat Sequence	Size (bp)	Multi P CR	Primer Concentration (μM)
TA 3 U	TGGATACGGCAGTGTTA	AF536553	60	(AC) ₁₂ ... (AG) ₁₃	219	A	0.3
TA 3 L	Fam GAGTTGGGAAGAAGGGATTA						
TA 5 U	ACTGCCATCAATAGAA	AF536555	60	(AG) ₂₁	298	E	0.5
TA 5 L	Fam GAAGGAACCAAAATCTAA						
TA 7 U	Ned ATTCAACCCAAACTCTAACAA	AF536556	60	(AC) ₉ ... (AG) ₁₇	218	A	0.3
TA 7 L	CACCCAAAGGACACACATT						
TA 8 U	Ned TCTTCGCTGAAAGTGACATAC	AF536557	60	(AC) ₁₁	286	E	0.3
TA 8 L	ATTGGCTTCGTTGGATT						
TA 13 U	Fam ATTTTGGGAGCACTAT	AF536549	55	(AC) ₁₀	94	C	0.5
TA 13 L	CACCTTTTATTAAATTCAC						
TA 15 U	Hex GAATAAAGCTGCCCTAACT	AF536552	60	(AG) ₇ ... (AC) ₈	178	B	0.5
TA 15 L	TCCACCACCTCAACC						
TA 16 U	GCCAAAGTTCATAAGAT	AF536550	55	(CT) ₁₇	195	C	0.3
TA 16 L	Hex CCGTAACCTCTTTAATATC						
TA 18 U	Hex CAACTCCACTCTGTGAG	AF536551	60	(CT) ₂₉	309	A	0.5
TA 18 L	TTGGCTCCTAGTTAGTCT						
TA 19 U	CGGAGGGAAGTATGA	AF536546	60	(AG) ₉	108	D	0.5
TA 19 L	Hex ATCTACTCAATCCGAGTT						
TA 20 U	Ned ATGCCTAGTGGGATTC	AF536547	60	(AG) ₁₀	98	D	0.3
TA 20 L	CACACTTATTTTCGAACAA						
TA 21 U	Fam GTATGCCCAACTAGC	AF536548	60	(AC) ₈ ... (AG) ₇	283	B	0.3
TA 21 L	ATACCTGAGAGGGAATAAG						

Obř. ř. 5: 11 mikrosatelitových lokusů vyzolovaných z *T. angustifolia* (převzato z Tsyusko-Omel'tchenko et al. 2003).

2.11.3 Statistické vyhodnocování mikrosatelitových dat

Pro statistické zpracování mikrosatelitových dat existuje řada statistických metod implementovaných v řadě programů. Tyto programy nám umožňují například sledovat počty a frekvence alel ve studovaném vzorku nebo zjistit genetickou vzdálenost mezi jedinci.

V programu MSA 4.05 (Dieringer & Schlötterer 2003) můžeme spočítat různé populačně-genetické parametry, například popisné statistiky pro populaci a lokusy (počet a frekvence alel pro jednotlivé lokusy a populace, očekávaná a pozorovaná heterozygosita (H_e)), genetické vzdálenosti mezi jedinci a populacemi, F-statistiku (rozdělení genetické variability v rámci populací a mezi populacemi; Weir & Cockerham 1984). V tomto programu můžeme také vytvořit vstupní soubory pro další programy, například Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010).

Vztahy mezi jedinci a populacemi lze znázornit pomocí fylogenetických stromů, které jsou vytvářeny na základě matic párových vzdáleností mezi jedinci nebo populacemi. Pro jejich tvorbu existují různé algoritmy, například shlukovací analýza UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) nebo metoda Neighbor-joining (Saitou & Nei 1987). Fylogenetické stromy lze vytvářet například v programech Phylip 3.69 (Felsenstein 2005), SYN-TAX 5.1 (Podani 1997), FAMD 1.30 (Schlüter & Harris 2006). K prohlížení fylogenetických stromů je možné použít například programy FigTree 1.4.0 (Rambaut 2012), TreeView 1.6.6 (Page 1996).

K vyjádření prostorových vztahů mezi jedinci a populacemi můžeme také použít mnohorozměrnou Analýzu hlavních koordinát (*Principal coordinate analysis*, PCoA). Tato metoda znázorňuje podobnosti nebo rozdíly mezi jednotlivci a/nebo skupinami. Původně n -rozměrný prostor molekulárních znaků redukuje do dvou nebo tří rozměrů a výsledkem pak může být dvou- nebo trojrozměrný graf. Analýzu hlavních koordinát můžeme provést například v programu SYN-TAX 5.1 (Podani 1997) nebo FAMD 1.30 (Schlüter & Harris 2006).

Bayesovské klastrování jedinců (Corander et al. 2012) můžeme provést například v programu Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000). Bayesovské klastrování zachycuje genetickou strukturu v populacích a ukazuje vztahy mezi jedinci a populacemi. Program Structure 2.3.3 pak hledá nejpravděpodobnější model rozdělení jedinců do určitého, předem neurčeného, počtu klastrů (skupin), který je na základě molekulárních dat nejlepší. K hledání ideálního modelu je využíváno Markovových řetězců (*Markov chain*, MC), které postupně konvergují k nějakému optimálnímu řešení. Výsledky lze dále zpracovat pomocí programu Distruct (Rosenberg 2004), který graficky znázorní pravděpodobnostní rozřazení jedinců do jednotlivých klastrů (skupin).

V programu SPAGeDi 1.3 (Hardy & Vekemans 2002) je možné udělat analýzu prostorové autokorelace, pomocí které zjistíme, jak je genetická podobnost korelována s geografickou vzdáleností (*isolation by distance*). Analýza nám tedy umožňuje sledovat, do jaké vzdálenosti jsou si jedinci geneticky podobní.

3 Metodika

3.1 Sběr vzorků

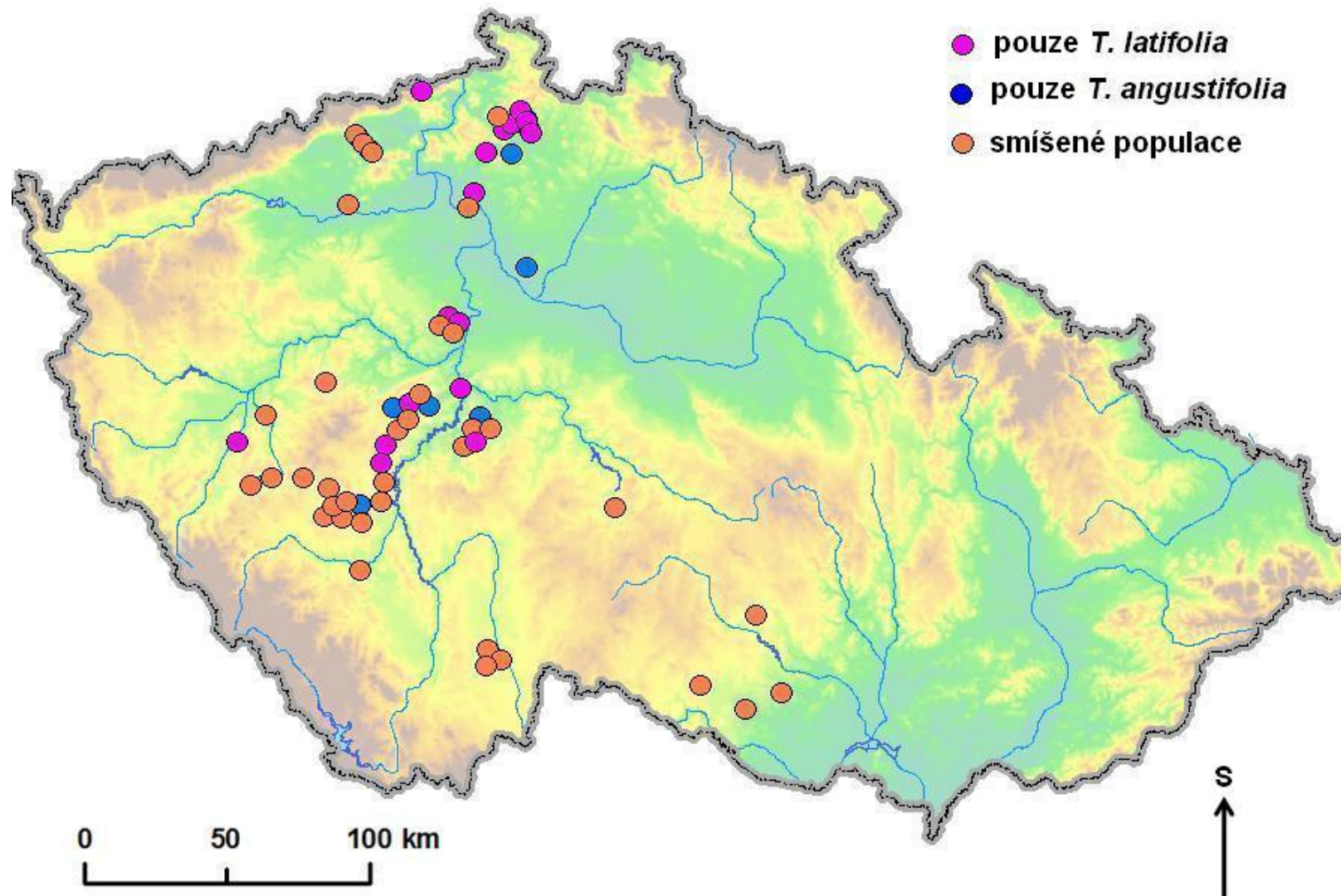
Z důvodu problematického odlišení hybridů od rodičovských druhů kvůli jejich morfologické variabilitě a překrývání znaků mezi hybridy a rodičovskými druhy (Hotchkiss & Dozier 1949; Fassett & Calhoun 1952; Smith 1967; Kuehn et al. 1999; Kuehn & White 1999; Olson et al. 2009), je nutné pro jasnou identifikaci taxonů použít také molekulární analýzy. Abych tedy zjistila, zda se také v českých populacích vyskytují hybridy, měřila jsem na jednotlivých rostlinách morfologické znaky a sbírala jsem vzorky rostlin k molekulárním analýzám.

Vzorky jsem sbírala především ve smíšených populacích, protože je zde větší šance výskytu hybridů. Vzorky jsem neodebírala náhodně, ale zaměřila jsem se také na jedince, kteří byli morfologicky přechodní mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* a tudíž to mohli být hybridy. Celkem jsem nasbírala 499 vzorků listů (235 z *T. latifolia*, 264 z *T. angustifolia*) z 62 populací – z toho bylo 37 populací smíšených, 19 populací jen s *T. latifolia* a 6 jen s *T. angustifolia* (obr. č. 6).

Rybníky se smíšenými populacemi jsem nejdříve vybírala na základě údajů v Databance flóry České republiky (<http://florabase.cz/databanka/index.php>). Po objetí několika rybníků jsem ale zjistila, že tyto údaje, ačkoliv nejstarší byly pouze z roku 2000, často neodpovídají skutečnosti – druhy se zde vůbec nevyskytovaly nebo se zde vyskytoval pouze jeden druh. Proto jsem začala rybníky vybírat náhodně a to tak, aby v dané oblasti bylo větší množství rybníků blízko sebe (např. jižní Čechy) a abych měla vzorky z různých částí České republiky (severní Čechy, západní Čechy, atd.). Vybrané rybníky jsem poté objela a na rybnících, na kterých se vyskytoval alespoň jeden druh, jsem sesbírala vzorky listů. Populace na Moravě jsem vybrala na základě údajů v České národní fytoecnologické databázi (Chytrý & Rafajová 2003). Tyto údaje se ukázaly být spolehlivé, ve vybraných smíšených populacích se vyskytovaly oba druhy. Rybníky na Třeboňsku mi pomohla vybrat Mgr. Andrea Kučerová Ph.D. z Botanického ústavu Akademie věd České republiky v Třeboni, která se mnou vybrané rybníky objela a pomohla mi najít vhodná místa ke sběru rostlin. Seznam všech populací, ve kterých jsem sbírala vzorky, je zobrazen v tabulce č. 2.

V každé populaci jsem podle velikosti dané populace odebrala vzorky listů z 3 až 5 jedinců od každého druhu. Protože se oba druhy velmi hojně rozmnožují vegetativně pomocí oddenků (Smith 1967), sbírala jsem vzorky z jedinců vzdálených od sebe minimálně 5 m, abych snížila pravděpodobnost, že dva různé vzorky budou patřit stejnému klonu. Ještě před odběrem vzorku jsem na každém jedinci změřila těchto 7 morfologických znaků: šířka nejdelšího listu, délka nejdelšího listu, šířka samičí palice, délka samičí palice, délka mezery mezi palicemi, výška lodyhy (od kořenů po špičku nejdelšího listu), průměr

stonku (nad kořeny). Tyto znaky použili Snow et al. (2010) a ukázalo se, že to jsou nejdůležitější znaky pro odlišení *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridů. Abych mohla změřit délku rostliny a průměr stonku, bylo nutné každou rostlinu vytrhnout a přeměřit na břehu. Naměřené údaje jsem zaznamenávala do tabulky (tab. č. 3 a 4, příloha č. 1). Odebrané vzorky mladých listů (cca 4 cm²) jsem vložila do čajových sáčků, sáčky jsem popsala a vložila je do sáčků se silikagelem, který vzorky vysušil. Usušené vzorky jsem použila k molekulárním analýzám (kapitola 3.5 Molekulární analýzy), naměřené morfologické znaky jsem zpracovala pomocí mnohorozměrných statistických metod (kapitola 3.7 Statistické vyhodnocení morfologických dat).



Obr. č. 6: Mapka populací, ve kterých jsem sbírala vzorky. Růžová barva označuje populace jen s *T. latifolia*, modrá populace jen s *T. angustifolia* a oranžová smíšené populace.

Tab. č. 2: Seznam populací, ve kterých jsem sbírala vzorky. V prvním sloupci je číslo populace, ve druhém název rybníku nebo nádrže, ve třetím popis lokality a ve čtvrtém a pátém sloupci jsou uvedené souřadnice místa sběru vzorků. Růžová barva značí populace pouze s *T. latifolia*, modrá populace pouze s *T. angustifolia* a oranžová smíšené populace. Zelená barva značí populace, ve kterých byli na základě analýzy mikrosatelitů nalezeni hybridi.

č. p.	rybník, vodní nádrž	popis lokality	zeměpisná šířka	zeměpisná délka
1	Jinonický rybník	SVV okraj rybníku, 238 m SSZ od Kostela sv. Vavřince	50°2'58.868"	14°21'57.609"
2	Panský rybník	JJZ okraj rybníku, 100 m JZZ od Jinonického zámku	50°3'10.308"	14°21'18.353"
3	retenční nádrž N1	podél okraje okolo celé nádrže, 447 m SSZ od stanice metra Lužiny	50°2'51.224"	14°19'39.168"
4	Farářský rybník	S okraj rybníku, 428 m JVV od Neveklova	49°45'2.037"	14°32'12.733"
5	menší rybník u rybníka Michovce	SVV okraj rybníku, 712 m SSZ od Doloplazů	49°45'7.427"	14°35'2.623"
6	Velký sedlečský rybník	S okraj rybníku, 569 m SSV od Sedlečka	49°41'41.799"	14°31'56.406"
7	bez názvu	JVV okraj nádrže, 583 m JJV od Hradištka	49°51'54.104"	14°24'43.178"
8	Jámský rybník	SSZ okraj rybníku, 756 m od SZZ od Klimětic	49°41'13.892"	14°30'5.706"
9	strouha u Jámského rybníka	strouha 40 m SSZ od rybníku Přední Dubínek	49°41'2.382"	14°30'4.690"
10	pole u Jámského rybníka	pole 65 m S od rybníku Zadní Dubínek	49°40'57.724"	14°30'15.458"
11	Huťský rybník	SSV okraj rybníku, 558 m SSZ od Staré Huti	49°47'7.548"	14°11'43.620"
12	vodní nádrž Asuán	SZZ okraj nádrže, 408 m SSZ od Nové Vsi; JJZ okraj nádrže, 331 m SSZ od Nové Vsi	50°2'39.730"; 50°2'37.414"	14°20'57.249"; 14°20'58.625"
13	Dolní rybník	SVV okraj rybníku, 1,9 km JVV od Voznice	49°48'26.144"	14°14'1.392"
14	Svatopolský rybník	SVV okraj rybníku, 473 m Z od Budínku	49°45'21.470"	14°10'59.888"
15	rybník Homolka	V okraj rybníku při ústí potoka Kocába, 848 m JZZ od Višňové	49°42'15.411"	14°8'4.942"
16	Sladkovský rybník	J okraj rybníku, 384 m SSZ od Zbenic	49°35'41.300"	14°5'11.102"
17	bez názvu	SZZ okraj rybníku při ústí potoka Obrtka, 915 m Z od Velešic	50°29'15.558"	14°20'52.642"
18	potok Libchava	pravý břeh potoka, 147 m SZZ od Horní Libchavy	50°42'49.872"	14°29'30.365"
19	Dobranovský potok	pravý břeh potoka, 249 m SZZ od Bukovan	50°43'1.485"	14°34'30.524"
20	Bobří rybník	SVV okraj rybníku, 1,1 km JVV od Pihelu	50°43'48.775"	14°33'28.094"
21	Černý rybník	Z okraj rybníku při ústí potoka, 2,2 km V od Velké Bukoviny	50°43'54.635"	14°25'20.308"
22	Mlýnský rybník	J okraj rybníku, 529 m JZZ od Tisé	50°46'54.886"	14°1'30.277"
23	rybník Barbora	SSV okraj rybníku, 392 m SVV od Duchcova	50°36'20.451"	13°45'17.883"
24	rybník U sklárny	SSV okraj rybníku, 684 m V od Duchcova	50°36'13.116"	13°45'33.713"
25	rybník Mářinka	JJV okraj rybníku, 633 m JZZ od Světce	50°34'31.310"	13°48'12.111"
26	bez názvu	JJV okraj rybníku, 1,9 km SSZ od Lenešic	50°23'20.362"	13°44'35.021"

27	Cekovský rybník	SSV okraj rybníku, 292 m SZZ od Cekova	49°49'24.268"	13°45'37.995"
28	Nový rybník	SVV okraj rybníku, 1,8 km JVJ od Starého Plzece	49°41'26.027"	13°29'45.101"
29	bez názvu	JVV okraj rybníku, 198 m JZZ od Vodokrt	49°35'22.138"	13°23'14.938"
30	bez názvu	S okraj rybníku, 738 m JZZ od Čepince	49°27'57.047"	13°28'30.131"
31	rybník Pazderna	JZZ okraj rybníku, 1,1 km SZZ od Nepomuku	49°29'27.363"	13°34'4.422"
32	Kostelní rybník	J okraj rybníku, 911 m SSZ od Mladého Smolivce	49°30'45.277"	13°43'41.430"
33	rybník Hejný	SSZ okraj rybníku, 1,5 km JVJ od Zalužan	49°32'11.885"	14°6'13.820"
34	rybník Zhoř	SSZ okraj rybníku, 941 m SSV od Vrábska	49°28'22.128"	14°6'32.859"
35	rybník Markovec u Žižky	Z okraj rybníku, 1,1 km JVJ od Sodoměře	49°14'44.147"	14°3'39.207"
36	rybník Pančár	V okraj rybníku, 764 m JJZ od Radobytců	49°24'22.844"	14°1'53.609"
37	rybník Labuť	JVV okraj rybníku, 463 m JZZ od Myštic	49°27'4.972"	13°57'55.872"
38	rybník Velký Škrabák	Z okraj rybníku při ústí potoka, 1 km Z od Závěšiny	49°29'5.418"	13°51'16.344"
39	Velký mačkovský rybník	SZZ okraj rybníku, 1,3 km SSZ od Mačkova	49°24'39.885"	13°52'36.873"
40	Velký drážský rybník	SVV okraj rybníku, 1,1 km SZZ od Pacelic	49°24'50.961"	13°55'36.813"
41	rybník Kaneček	SZZ okraj rybníku při ústí potoka, 1,4 km SSV od Blatné	49°26'4.506"	13°53'35.370"
42	rybník Strašák	JJZ okraj rybníku, 666 m J od Lhotic	49°33'12.724"	15°14'55.228"
43	Syrovický rybník	SZZ okraj rybníku, 576 m SZZ od Nových Syrovic	49°1'8.841"	15°46'0.345"
44	rybník Stračina	S okraj rybníku při ústí potoka, 881 m JVJ od Nárámeče	49°15'47.050"	15°59'10.111"
45	bez názvu	SSV okraj rybníku, 343 m JVJ od Horních Kounic	49°1'32.816"	16°9'24.626"
46	Bojanovický rybník	podél okraje okolo celého rybníku, 555 m JJV od Bojanovic	48°57'48.981"	15°59'29.541"
47	Břilický rybník	JVV okraj rybníku, 613 m JJV od Břilic	49°0'47.656"	14°44'44.702"
48	rybník Káňov	JZZ okraj rybníku, 742 m J od Přeseky	49°2'2.615"	14°43'50.216"
49	rybník U sv. Víta	podél okraje okolo celého rybníku, 1,7 km JZZ od Nové Hlíny	49°1'24.080"	14°46'42.649"
50	rybník Jelito	JJV okraj rybníku, 787 m JJV od Prosenické Lhoty	49°41'3.925"	14°29'25.987"
51	Panský rybník	Z okraj rybníku, 529 m J od Borovky	49°46'9.666"	14°31'39.343"
52	bez názvu	podél okraje okolo celého rybníku, 798 m JVJ od Mokrovrat	49°47'33.573"	14°15'43.920"
53	Sychrovský rybník	SSZ okraj rybníku, 307 m SSZ od Sychrova	49°45'48.992"	14°6'48.496"
54	bez názvu	JZZ okraj rybníku, 631 m JJV od Konětopy; JJV okraj rybníku, 712 m JJV od Konětopy	50°16'12.806"; 50°16'11.529"	14°39'29.732"; 14°39'35.677"
55	Kravský rybník	JVV okraj rybníku, 1,1 km SVV od Rybnova	50°37'28.028"	14°30'16.722"
56	Vejšický rybník	SVV okraj rybníku, 703 m SSZ od Lučkovic	49°26'54.880"	13°59'52.021"
57	rybník Stražil	SSV okraj rybníku, 338 m SSZ od Stěžova	49°38'56.109"	14°5'38.227"

58	bez názvu	SSZ okraj nádrže, 273 m JJV od Předonína	50°26'14.920"	14°20'1.573"
59	příkop u silnice	příkop u silnice 1,7 km JJZ od Kravařů	50°37'9.839"	14°22'55.694"
60	příkop u železničních kolejí	příkop u železničních kolejí 476 m SSV od Stružnice	50°41'50.508"	14°27'34.296"
61	Pivovarský rybník	JJV okraj rybníku, 463 m JVV od Dolního Pihelu	50°43'20.596"	14°34'20.941"
62	bez názvu	J okraj nádrže, 207 m S od Chudoples	50°27'37.001"	14°55'49.001"

3.2 Sledování fenologie kvetení

V Severní Americe pokud se kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* překrývá, tak dochází k mezidruhovému křížení a následnému vzniku hybridů *T. ×glauca* (Hyde 2005; Ball & Freeland 2013). Pokud se ale kvetení překrývá nepatrně nebo je úplně oddělené, tak k hybridizaci nedochází (Selbo & Snow 2004). Obdobná data z Evropy nebyla k dispozici, proto jsem sledovala fenologii kvetení těchto dvou druhů, abych zjistila, zda na území České republiky dochází k překryvu kvetení mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* a zda je mezidruhové opylení vůbec možné.

Kvetení jsem sledovala dva roky po sobě (v roce 2011 a 2012) na těchto čtyřech vodních tělesech v Praze, kde se vyskytují oba druhy: Jinonický rybník, Panský rybník, vodní nádrž Asuán a retenční nádrž N1 Stodůlky (tab. č. 5). V každé populaci jsem si, podle velikosti dané populace, vybrala 2 až 30 jedinců (v menší populaci méně rostlin), které jsem označila stahovacími páskami s popiskami. V roce 2011 jsem si takto označila celkem 20 jedinců od každého druhu, v roce 2012 30 jedinců od každého druhu. Některé označené rostliny ale nevytvořily květenství a některé byly poničeny kolemjdoucími lidmi, proto byl konečný počet sledovaných jedinců nižší (tab. č. 5)

Na přelomu května a června po dobu přibližně 2 až 3 týdnů jsem u označených jedinců každý den sledovala, zda samčí palice spráší pyl a zda jsou samičí palice receptivní (palice je odhalená a je schopná přijmout pyl). Tyto údaje jsem zaznamenávala do tabulek (tab. č. 6a – c, 7a – d, příloha č. 2). Protože u samičích palic je obtížné určit, kdy už palice není schopna přijmout pyl, brala jsem jako ukončení receptivnosti konec sprášení samčích palic (R. Wildová, ústní sdělení). Ze zaznamenaných údajů o kvetení jsem poté v MS Excelu sestrojila dva spojnicové grafy, které zachycují fenologii kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* v roce 2011 a v roce 2012.

Po ukončení sledování fenologie kvetení jsem ze sledovaných rostlin odebrala vzorky listů pro molekulární analýzy, abych se ujistila, že sledovaní jedinci byli skutečně druhy *T. latifolia* a *T. angustifolia*, a na každé rostlině jsem změřila 7 morfologických znaků (viz výše) a zaznamenala je do tabulky (tab. č. 3 a 4, příloha č. 1). Z některých sledovaných rostlin jsem vzorky odebrat nemohla, protože byly zničeny kolemjdoucími lidmi.

Tab. č. 5: Seznam populací orobinců s konečnými počty sledovaných jedinců v roce 2011 a 2012. V prvním sloupci je číslo populace, ve druhém sloupci vodní těleso, na kterém byla fenologie kvetení sledována, ve třetím sloupci popis lokality, ve čtvrtém sloupci zeměpisná šířka a délka dané lokality a v pátém až osmém sloupci jsou počty jedinců, na kterých byla sledována fenologie kvetení v roce 2011 a 2012. Číslo v závorce udává původní počet sledovaných jedinců v dané populaci, číslo před závorkou konečný počet sledovaných jedinců.

č. p.	vodní těleso	popis lokality	zeměpisná šířka; zeměpisná délka	rok 2011		rok 2012	
				počet rostlin <i>T. latifolia</i>	počet rostlin <i>T. angustifolia</i>	počet rostlin <i>T. latifolia</i>	počet rostlin <i>T. angustifolia</i>
1	Jinonický rybník	SVV okraj rybníku, 238 m SSZ od Kostela sv. Vavřince	50°2'58.868"; 14°21'57.609"	5	0	7	0
2	Panský rybník	JJZ okraj rybníku, 100 m JZZ od Jinonického zámku	50°3'10.308"; 14°21'18.353"	6	0	7 (9)	0
12	nádrž Asuán	SZZ okraj nádrže, 408 m SSZ od Nové Vsi; JJZ okraj nádrže, 331 m SSZ od Nové Vsi	50°2'39.730"; 14°20'57.249" 50°2'37.414"; 14°20'58.625"	2	2 (5)	7	0 (1)
3	retenční nádrž N1	podél okraje okolo celé nádrže, 447 m SSZ od stanice metra Lužiny	50°2'51.224"; 14°19'39.168"	4	13 (15)	7	27 (29)
celkem sledovaných jedinců				17	15	28	27

3.3 Kontrolovaná křížení v kultuře a v terénu

Abych zjistila, zda hybridní semena mohou vůbec vznikat, zkusila jsem oba druhy vzájemně zkřížit. Pokusná křížení jsem prováděla především v Botanické zahradě Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (Na Slupi), ale několik jedinců jsem také zkřížila ve dvou přírodních populacích (populace č. 1 a 3, tab. č. 2), abych zachovala přirozené podmínky. Křížení jsem vyzkoušela oběma směry – mateřská rostlina *T. latifolia* a otcovská rostlina *T. angustifolia*, mateřská rostlina *T. angustifolia* a otcovská rostlina *T. latifolia*.

Křížení v Botanické zahradě jsem prováděla na rostlinách, které si zde pěstují ve dvou bazéncích od dubna 2011. Celkem 24 rostlin (12 rostlin *T. latifolia*, 12 rostlin *T. angustifolia*) jsem nasbírala v říjnu 2010 ve čtyřech populacích v Praze (tab. č. 8). Protože jsem v této době ještě neměla k dispozici vlastní bazénky, musela jsem nechat rostliny přezimovat v Botanické zahradě Botanického ústavu Akademie věd České republiky v Průhonicích. Zde jsem rostliny (kus stonku s oddenkem s novým výhonkem) zasadila do květináčů s hlínou smíchanou s pískem a nechala je zde v zakopaných nádržích přezimovat. V dubnu 2011 jsem rostliny převezla do Botanické zahrady Na Slupi, kde jsem je přesadila do větších květináčů a umístila do bazénků s vodou (každý druh do jednoho bazénku) (obr. č. 7, tab. č. 9). Hladina vody byla udržována 5 cm nad půdou.

Tab. č. 8: Počty sebraných rostlin *T. latifolia* a *T. angustifolia* ve čtyřech přírodních populacích k pěstování v bazéncích v botanické zahradě. V prvním sloupci je uvedené číslo populace, ve druhém sloupci vodní těleso, ze kterého byly rostliny sebrány, ve třetím sloupci popis lokality, ve čtvrtém sloupci zeměpisná šířka a délka dané lokality a v pátém a šestém sloupci jsou počty sebraných rostlin *T. latifolia* a *T. angustifolia* z dané populace. – = v populaci se daný druh nevyškytoval.

č. p.	vodní těleso	popis lokality	zeměpisná šířka; zeměpisná délka	počet rostlin <i>T. latifolia</i>	počet rostlin <i>T. angustifolia</i>
1	Jinonický rybník	SVV okraj rybníku, 238 m SSZ od Kostela sv. Vavřince	50°2'58.868"; 14°21'57.609"	6	–
13	vodní nádrž Asuán	SZZ okraj nádrže, 408 m SSZ od Nové Vsi; JJZ okraj nádrže, 331 m SSZ od Nové Vsi	50°2'39.730"; 14°20'57.249"; 50°2'37.414"; 14°20'58.625"	6	3
3	retenční nádrž N1	podél okraje okolo celé nádrže, 447 m SSZ od stanice metra Lužiny	50°2'51.224"; 14°19'39.168"	–	6
63	Milíčovský rybník	SSV okraj rybníku, 1 km JVV od stanice metra Háje	50°1'36.223"; 14°32'27.067"	–	3

Tab. č. 9: Označení rostlin v bazéncích. V prvním a třetím sloupci je číslo rostliny v bazénku a ve druhém a čtvrtém sloupci je vodní těleso, ze kterého daný jedinec pochází.

1. bazének – <i>T. angustifolia</i>		2. bazének – <i>T. latifolia</i>	
č. r.	vodní těleso	č. r.	vodní těleso
1	retenční nádrž N1	13	Jinonický rybník
2	retenční nádrž N1	14	Jinonický rybník
3	Milíčovský rybník	15	Jinonický rybník
4	Milíčovský rybník	16	Jinonický rybník
5	retenční nádrž N1	17	nádrž Asuán
6	nádrž Asuán	18	Jinonický rybník
7	retenční nádrž N1	19	nádrž Asuán
8	Milíčovský rybník	20	nádrž Asuán
9	nádrž Asuán	21	nádrž Asuán
10	retenční nádrž N1	22	nádrž Asuán
11	retenční nádrž N1	23	Jinonický rybník
12	nádrž Asuán	24	nádrž Asuán



Obr. č. 7: Bazénky v Botanické zahradě Na Slupi k pěstování rostlin *T. latifolia* a *T. angustifolia* pro kontrolovaná křížení.

Všechny rostliny, kromě jedné *T. angustifolia* z Milíčovského rybníku (rostlina č. 4), se ujaly a vytvořily lodyhy s listy. V některých květináčích, hlavně u druhu *T. angustifolia*, vyrostlo z oddenku dokonce více lodyh najednou (až 5 klonů), takže celkový počet jedinců se zvýšil. Přestože jsem rostliny během května přihnojovala hnojivem Nympha-Flor NF (Hü-Ben) pro lepší nasazení květů, rostliny v prvním roce nevykvetly a nemohla jsem tedy provést pokusná křížení. V říjnu jsem proto rostliny zazimovala, aby přes zimu nezmrzly – ostříhala jsem lodyhy s listy, oba bazénky jsem skoro celé vypustila a zasypala listím. Před zazimováním jsem ještě z každé rostliny

odebrala vzorek listu pro molekulární analýzy, abych se ujistila, že rostliny v bazéncích jsou skutečně druhy *T. latifolia* a *T. angustifolia*.

Na přelomu února a března 2012, kdy už teplota v noci neklesala pod 0 °C, jsem listí z bazénků odstranila a rostliny jsem opět zalila vodou tak, aby hladina vody byla 5 cm nad půdou. Všechny rostliny zimu přežily a vytvořily lodyhy s listy a v některých květináčích vyrostlo opět více klonálních jedinců. Koncem května 2012 začaly rostliny postupně vytvářet samčí a samičí palice. Pokud byly v květináči alespoň dvě rostliny s palicemi, u jedné z nich jsem ustříhla samčí palici, abych zabránila samosprášení, a samičí palici jsem obalila papírovým svačinovým sáčkem (R. Wildová, ústní sdělení) a zavázala, abych zabránila cizosprášení mezi jedinci stejného druhu (obr. č. 8). To jsem postupně provedla u všech rostlin. Pokud byl v květináči pouze jeden jedinec s palicemi, týkalo se to především druhu *T. latifolia*, samčí palici jsem neustříhla, protože by mi chyběl pyl k opylení, a nechala jsem ji dozrát. Během června začaly samčí palice postupně dozrávat, proto jsem nejdříve každý den, později ob den, chodila do zahrady kontrolovat, zda nějaká samčí palice spráší pyl. Pokud ano, ustříhla jsem tuto palici a potřela jsem jejím pylem jednu ze zakrytých samičích palic opačného druhu a také jsem pro kontrolu použila pyl k samosprášení samičí palice stejného jedince. Obě opylené palice jsem zakryla papírovým sáčkem a zavázala. Papírový sáček jsem označila písmenem X (křížení) nebo S (samosprášení), abych věděla, které palice byly už opyleny (obr. č. 9). Takto jsem postupovala přibližně 14 dní až do doby, kdy už nebyly žádné samčí palice, které by sprášely pyl.



Obr. č. 8: Samičí palice *T. angustifolia* bez samčí palice zakrytá papírovým sáčkem tak, aby nemohlo dojít k samovolnému samosprášení ani k cizosprášení. Vlevo je vidět rostlina, jejíž samčí palice byla později použita k sprášení samičí palice *T. latifolia*.

Mezidruhová křížení jsem prováděla zcela náhodně, ale přednostně jsem vždy sprášila samičí palici, která byla zralá – byla zcela odhalená a na jejím povrchu byly vidět blizny s čnělkami, které vytvářely na povrchu palice lesklý povlak (obr. č. 10a a 10b). V tabulce č. 10a a 10b je vidět, které rostliny jsem vzájemně zkřížila a u kterých jsem provedla samosprášení.



Obr. č. 9: Opylené samičí palice *T. angustifolia*. Sáček s písmenem S zakrývá palici, která byla opylena vlastním pylem, sáček s písmenem X zakrývá palici, která byla opylena pylem z druhu *T. latifolia*.



Obr. č. 10a a 10b: Zralá samičí palice *T. angustifolia*. Na povrchu palice jsou viditelné blizny s čnělkami.

Tab. č. 10a a 10b: V tabulce č. 10a je zaznamenáno, které rostliny byly zkříženy, datum, kdy bylo křížení provedeno, a datum sebrání samičí palice s vytvořenými semeny. V tabulce č. 10b jsou rostliny, které byly samosprášeny pylem ze stejného jedince, datum, kdy bylo samosprášení provedeno a datum sebrání samičí palice s vytvořenými semeny. Samičí palice jsou označeny symbolem ♀, samčí symbolem ♂.

Tab. č. 10a

křížení		datum	
♀	♂	křížení	sebrání palice
3	14	1. 6. 2012	22. 11. 2012
1	14	2. 6. 2012	12. 12. 2012
11	14	2. 6. 2012	12. 12. 2012
8	22b	2. 6. 2012	12. 12. 2012
9	22a	3. 6. 2012	12. 12. 2012
23	12	3. 6. 2012	12. 12. 2012
14	10	3. 6. 2012	22. 11. 2012
17	3a	3. 6. 2012	19. 8. 2012
2	13	4. 6. 2012	12. 12. 2012
18	3b	4. 6. 2012	22. 11. 2012
5	16	6. 6. 2012	12. 12. 2012
22	1	6. 6. 2012	22. 11. 2012
12	15	6. 6. 2012	22. 11. 2012
7	17	8. 6. 2012	3. 12. 2012
10	19	11. 6. 2012	12. 12. 2012

Tab. č. 10b

samosprášení	datum	
♀	samosprášení	sebrání palice
14	2. 6. 2012	12. 12. 2012
22b	2. 6. 2012	12. 10. 2012
22a	3. 6. 2012	3. 12. 2012
3a	3. 6. 2012	12. 12. 2012
7	3. 6. 2012	12. 12. 2012
10	3. 6. 2012	12. 12. 2012
12	3. 6. 2012	22. 11. 2012
13	4. 6. 2012	3. 12. 2012
3b	4. 6. 2012	12. 12. 2012
1a	6. 6. 2012	12. 12. 2012
1b	6. 6. 2012	12. 12. 2012
16	6. 6. 2012	3. 12. 2012
15	6. 6. 2012	12. 12. 2012
18	11. 6. 2012	12. 12. 2012

Během léta a na podzim 2012 jsem pravidelně chodila kontrolovat, zda se na samičích palicích vytvořila semena. Také jsem kontrolovala, zda nedošlo k poškození papírového sáčku (protržení, promočení) a papírový sáček jsem případně vyměnila. Sáčky jsem z palic sundala v polovině září, kdy už bylo jisté, že nemůže dojít k opylení cizím pylem. Palice jsem nechala na rostlinách do té doby, než samy pukly a semena se z nich začala uvolňovat. Měla jsem tak jistotu, že semena dozrála. Poté jsem celou samičí palici ustříhla, vložila do popsaného papírového sáčku a uschovala v chladném prostředí. Data sběru samičích palic jsou vidět v tabulce č. 10a a 10b.

Pokusná křížení jsem provedla také ve dvou přírodních populacích – na Jinonickém rybníku a na retenční nádrži N1. Na Jinonickém rybníku jsem opylila čtyři samičí palice *T. latifolia* pylem ze čtyř rostlin *T. angustifolia* z retenční nádrže N1. Na retenční nádrži N1 jsem opylila čtyři samičí palice *T. angustifolia* pylem ze čtyř rostlin *T. latifolia*, které rostly na stejném místě (tab. č. 11). Opylené palice jsem opět zakryla papírovými sáčky, aby nedošlo k opylení cizím pylem, a rostliny jsem pravidelně chodila kontrolovat. Ze všech rostlin (opylených i těch, jejichž pyl jsem k opylení použila) jsem opět odebrala vzorky listů pro molekulární analýzy. Na všech opylených palicích se postupně vytvořila semena, než ale stačila dozrát, byly všechny palice bohužel utrženy a zničeny kolemjdoucími lidmi.

Tab. č. 11: Křížení rostlin v přírodních populacích. V prvním sloupci je označení samičí rostliny v populaci, ve druhém a třetím sloupci jsou uvedeny rostliny, které byly zkříženy, a číslo populace, ze které pocházely, ve čtvrtém sloupci je uvedené datum křížení. Samičí palice jsou označeny symbolem ♀, samčí palice symbolem ♂.

označení v populaci	křížení		datum křížení
	♀	♂	
K1	<i>T. angustifolia</i> , p. č. 3	<i>T. latifolia</i> , p. č. 3	31. 5. 2012
K2	<i>T. angustifolia</i> , p. č. 3	<i>T. latifolia</i> , p. č. 3	3. 6. 2012
K3	<i>T. angustifolia</i> , p. č. 3	<i>T. latifolia</i> , p. č. 3	3. 6. 2012
K4	<i>T. angustifolia</i> , p. č. 3	<i>T. latifolia</i> , p. č. 3	3. 6. 2012
K5	<i>T. latifolia</i> , p. č. 1	<i>T. angustifolia</i> , p. č. 3	5. 6. 2012
K6	<i>T. latifolia</i> , p. č. 1	<i>T. angustifolia</i> , p. č. 3	5. 6. 2012
K7	<i>T. latifolia</i> , p. č. 1	<i>T. angustifolia</i> , p. č. 3	5. 6. 2012
K8	<i>T. latifolia</i> , p. č. 1	<i>T. angustifolia</i> , p. č. 3	5. 6. 2012

3.4 Klíčení semen z pokusných křížení

Abych u semen navodila proces jarovizace, nechala jsem odebrané palice 14 dní v teplotě pod bodem mrazu, poté 14 dní v teplotě okolo 4 až 8 °C a nakonec 14 dní při pokojové teplotě (20 °C). Semena jsem poté vysela na substrát pro výsev a množení (Substrát pro výsev a množení AGRO, AGRO CS), kterým jsem naplnila dva sadbovače – jeden pro semena z pokusného křížení (palice č. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 18, 22, 23), druhý pro semena ze samosprášení (palice č. 1a, 1b, 3a, 3b, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 22a, 22b). Z každé odebrané palice jsem na třech místech náhodně vybrala celkem 10 semen, která jsem položila na vlhký substrát. Aby substrát nevyschl, vložila jsem sadbovače do misek s větším množstvím vody a takto jsem je umístila do klimaboxu (Conviroon Adaptis A-1000, TC-kit) s cyklem 12 hodin světlo/30 °C/70% vlhkost a 12 hodin tma/10 °C/70% vlhkost. Semena jsem chodila pravidelně kontrolovat, přitom jsem doplnila odpařenou vodu, a do tabulky jsem si zaznamenávala, zda semena klíčí a kolik jich vyklíčilo.

Vyšetí semen, která vznikla křížením, jsem 2x opakovala, celkem jsem tedy vysela 480 hybridních semen z 16 palic (330 semen z palic *T. angustifolia*, 150 semen z palic *T. latifolia*).

3.5 Molekulární analýzy

Molekulární analýzy jsem prováděla v DNA laboratoři Katedry Botaniky PřF UK (<http://botany.natur.cuni.cz/dna/>). K mikrosatelitové analýze jsem použila DNA, kterou jsem extrahovala z vysušených vzorků listů. Nepoužila jsem všechny nasbírané vzorky, ale z každé populace jsem vybrala 3 (4 – 5) jedince od každého druhu, kteří vykazovali odlišnosti v morfologických znacích. Celkem jsem zanalyzovala 267 vzorků, z toho 41 vzorků z populací pouze s jedním druhem a 226 vzorků z populací smíšených.

Nejdříve jsem si vzorky listů nadrtila pomocí mlýnku Mixer Mill 200 (Retsch) – do 2ml eppendorfků jsem na malé kousky natrhala přibližně 0,5 g suchého materiálu

a do každé eppendorfky jsem přidala dvě wolframkarbidové kuličky. Poté jsem eppendorfky vložila do plastových držáků mlýnku a vzorky jsem drtila 3 minuty, případně déle, při frekvenci 27 000 otáček za minutu, dokud nebyla listová pletiva rozmělněna na jemný prášek. Poté jsem následovala protokol extrakce DNA roztokem CTAB (cetyltrimethylammonium bromid; modifikováno dle Doyle & Doyle 1987; postup viz příloha č. 3). Koncentraci extrahované DNA a její čistotu jsem změřila pomocí spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Naměřené hodnoty čistoty a koncentrace jsem si zaznamenala do sešitu. Pro PCR (*Polymerase chain reaction*) reakci jsem si extrahovanou DNA naředila do objemu 50 µl o koncentraci 10 ng/µl. Extrahovanou i naředěnou DNA jsem skladovala v ledničce při 4 °C.

Pro PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů jsem použila 8 vybraných primerových párů (Tsyusko-Omeltchenko et al. 2003) o koncentraci 25 pmol/µl (tab. č. 12). Protože jednotlivé primery kopírují různé úseky DNA a jsou různě barevně značené, vytvořila jsem si 2 multiplexy primerů (I, II), každý o celkovém objemu 50 µl. Amplifikuje se tak více lokusů naráz, čímž se sníží jak náklady, tak čas na analýzu. Objemové zastoupení jednotlivých primerů v multiplexech je vidět v tabulce č. 13 a 14.

Tab. č. 12: Vybrané primerové páry pro PCR reakci převzaté z Tsyusko-Omeltchenko et al. (2003). V prvním sloupci je název primerového páru, ve druhém sloupci délka mikrosatelitového lokusu, ve třetím sloupci je v závorce repetitivní báze a číslo za závorkou udává počet opakování, ve čtvrtém sloupci je fluorescenční značení primeru a v posledním sloupci je rozdělení primerů do dvou multiplexů podle barev a délek.

Primer	délka úseku	repetitivní báze	Fluorescenční značení	Multiplex
TA3	219	(AC) ₁₂ ...(AG) ₁₃	6-FAM	I
TA5	298	(AG) ₂₁	6-FAM	I
TA7	218	(AC) ₉ ...(AG) ₁₇	NED	I
TA8	286	(AC) ₁₁	NED	I
TA15	178	(AG) ₇ ...(AC) ₈	HEX	I
TA16	195	(CT) ₁₇	HEX	II
TA20	98	(AG) ₁₀	NED	II
TA21	283	(AC) ₈ ...(AG) ₇	6-FAM	II

Tab. č. 13: Objemové zastoupení jednotlivých primerů v multiplexu I. U každého reverse a forward primeru je uvedeno jeho objemové zastoupení v daném multiplexu a v poslední buňce je uveden celkový objem vody v multiplexu I.

reverse primer	TA3	TA5	TA7	TA8	TA15	+ 29 µl H₂O
objem (µl)	2	2	1,5	2	3	
forward primer	TA3	TA5	TA7	TA8	TA15	
objem (µl)	2	2	1,5	2	3	

Tab. č. 14: Objemové zastoupení jednotlivých primerů v multiplexu II. U každého reverse a forward primeru je uvedeno jeho objemové zastoupení v daném multiplexu a v poslední buňce je uveden celkový objem vody v multiplexu II.

reverse primer	TA16	TA20	TA21	+ 38 μl H₂O
objem (μ l)	2	1,5	2,5	
forward primer	TA16	TA20	TA21	
objem (μ l)	2	1,5	2,5	

Pro PCR amplifikaci jsem si vytvořila dvě PCR směsi. Jejich složení je uvedené v tabulce č. 15. Do směsí jsem použila Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN), který již obsahuje látky důležité pro správné fungování PCR reakce (DNA polymeráza, PCR buffer, MgCl₂, dNTP). PCR směsi jsem po 4 μ l rozpipetovala do stripů a přidala jsem 1 μ l naředěné DNA. Stripy jsem umístila do gradientového termocykleru Eppendorf mastercycler s následujícím teplotním programem:

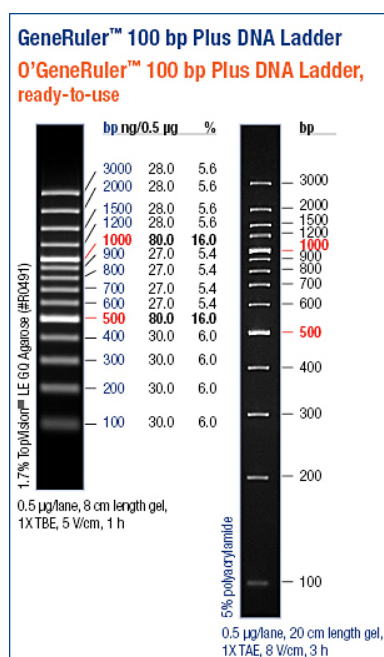
95 °C 15 min
 94 °C 30 s
 50 °C 1 min 30 s } 30x
 72 °C 1 min
 60 °C 30 min
 10 °C

Tab. č. 15: Složení PCR směsí I a II. V prvním sloupci jsou uvedené jednotlivé složky směsí a ve druhém sloupci jejich objemové zastoupení.

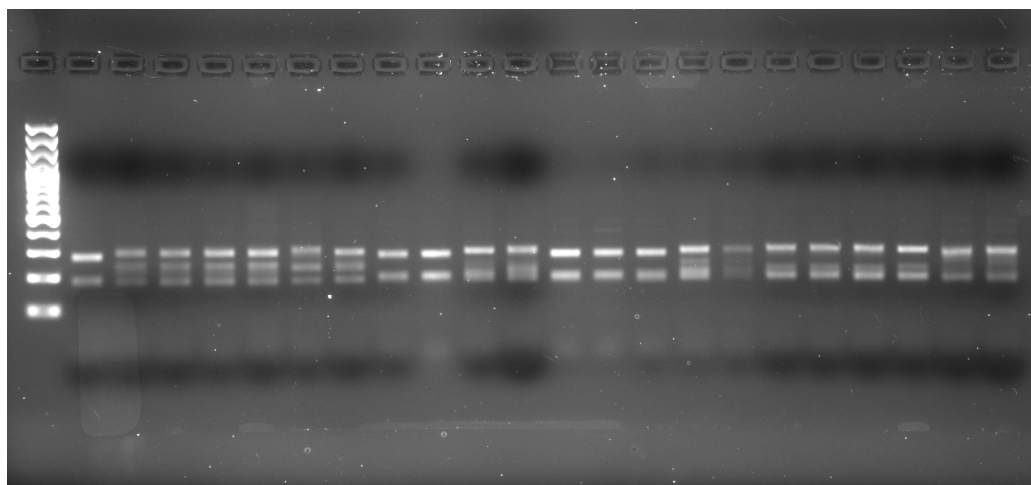
PCR směs I	μl
sterilní Milli-Q H ₂ O	1
Multiplex PCR Master Mix	2,5
multiplex primerů I	0,5
PCR směs II	μl
sterilní Milli-Q H ₂ O	1
Multiplex PCR Master Mix	2,5
multiplex primerů II	0,5

Úspěšnost amplifikace jsem otestovala na 1,8% agarosovém TAE gelu v TAE pufu. Před nanesením vzorků na gel jsem ke každému vzorku přidala 35 μ l sterilní Milli-Q vody, protože PCR produkty byly hodně koncentrované. Na gel jsem poté nanasla 1,5 μ l žebříčku O'GeneRuler 100bp Ladder Plus (Fermentas) (obr. č. 11) a 5 μ l produktu obarveného 1 μ l barvičky a spustila jsem elektroforézu. Po ukončení elektroforézy, cca po 25 minutách, jsem gel umístila do UV transluminátoru (Herolab UVT-20M) dokumentačního systému Kodak Gel Logic 100 a pomocí softwaru 1D Image Analysis (Kodak) jsem ho nasnímala do počítače. Pokud na gelu byly vidět proužky (obr. č. 12), byla amplifikace úspěšná a došlo tedy k namnožení určitých fragmentů DNA. Pokud byla amplifikace úspěšná, připravila jsem vzorky pro fragmentační analýzu na automatickém sekvenátoru. Smíchala jsem 10 μ l deionizovaného formamidu a 0,25 μ l fluorescenčně značeného žebříčku GeneScan™ 400HD ROX™ Size Standard (ABI). Tento žebříček obsahuje 21 označených

fragmentů nukleotidů o těchto délkách: 50, 60, 90, 100, 120, 150, 160, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 290, 300, 320, 340, 360, 380, 400, a je tak možné identifikovat délku každého fragmentu produktu. Tuto směs jsem po 10 µl rozpipetovala do stripů a přidala jsem 1 µl PCR produktu. Vzorky jsem poté denaturovala 3 minuty při 95 °C. Takto připravené vzorky jsem odnesla do sekvenační laboratoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7 (<http://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>), kde byla provedena fragmentační analýza na šestnáctikapilárním sekvenátoru 3130xl Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems, při které byly mikrosatelitové alely elektroforeticky rozděleny podle délky.



Obr. č. 11: Žebříček O'GeneRuler 100bp Ladder Plus (Fermentas) používaný při gelové elektroforéze.



Obr. č. 12: Vizualizace PCR amplifikace DNA multiplexem I – na 1,8% TAE agarosovém gelu jsou patrné proužky namnožených fragmentů vzorků č. 33, 75, 76, 77, 78, 122, 158, 186, 187, 225, 306, 335, 348, 350, 388, 392, 461, 462, 465, 527, 532 a 534 (tab. č. 3 a 4, příloha č. 1). Vlevo je vidět žebříček.

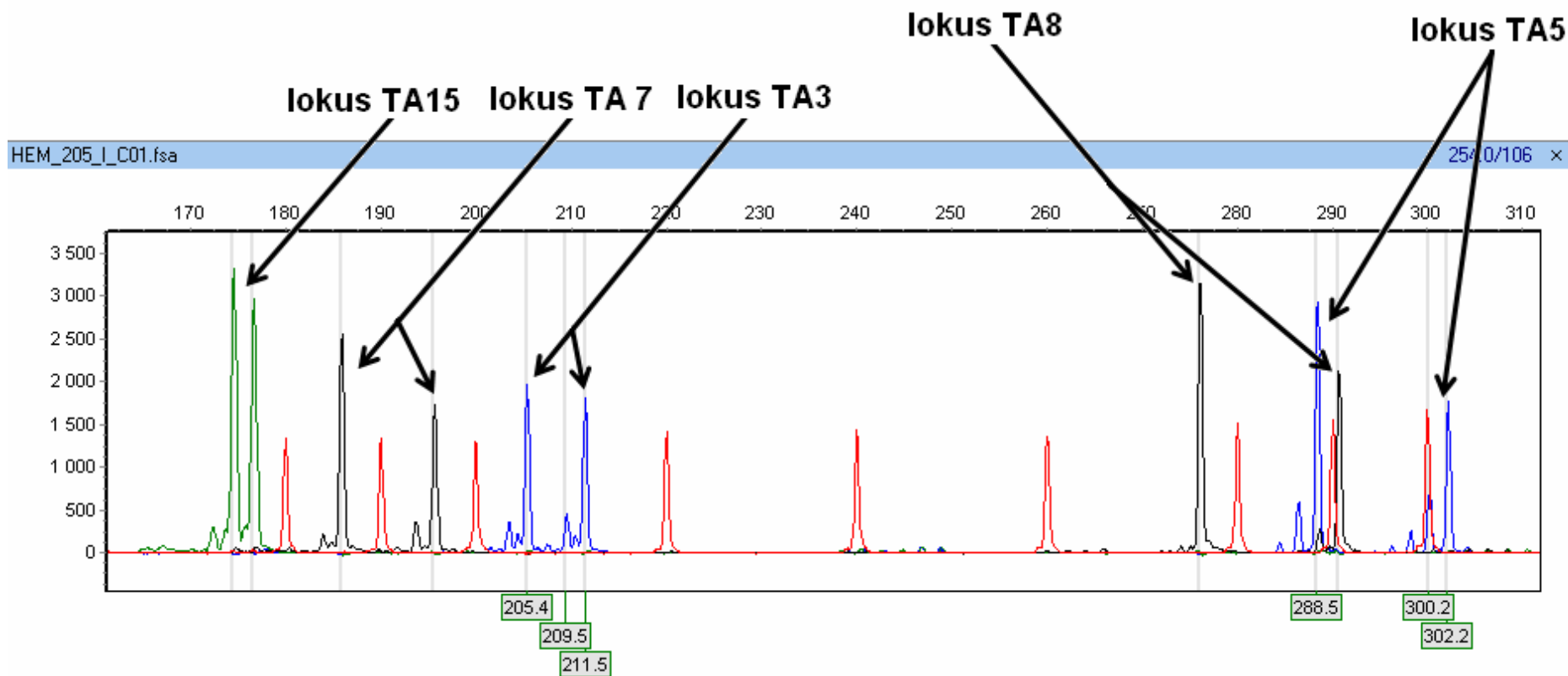
Ze sekvenátoru jsem dostala data ve formátu *.fsa. Tato data jsem si prohlížela a analyzovala v programu GeneMarker (Soft Genetics). Po načtení dat jsem si jako templát projektu (*Template of the Project*) zvolila ABI, jako standard (*Size Standard*) HD400, jako barvu standardu (*Standard Color*) červenou (*Red*) a jako typ analýzy (*Analysis Type*) fragmentační analýzu rostlinného materiálu (*Fragment Plant*). Další nastavení jsem ponechala ve výchozím formátu. Data se mi v GeneMarkeru zobrazila jako různě barevné píky, které představují namnožené mikrosatelitové fragmenty DNA. V multiplexu I se zobrazily modré (primer TA3 a TA5) a žluté píky (primer TA7 a TA8) ve dvou oblastech a v jedné oblasti zelený pík (primer TA15) (obr. č. 13), v multiplexu II se zobrazily zelený (primer TA 16), žlutý (primer TA20) i modrý pík (primer TA21) pouze v jedné oblasti (obr. č. 14). Píky jsem si postupně podle jednotlivých barev prohlížela a délky jednotlivých fragmentů jsem manuálně zaznamenávala do tabulky vytvořené v MS Excelu (tab. č. 16, příloha č. 4). Jako minimální intenzitu píku pro vyhodnocení jsem brala hodnotu 500. Hodnoty píků často nebyly v celých číslech, proto jsem musela délky fragmentů zaokrouhlovat, a to buď na lichá nebo sudá čísla, ale vždy u každého primeru stejně. Homozygoti měli v jednom lokusu pouze jednu alelu (v tabulce pro stejný primer dvě stejná čísla), naopak heterozygoti dvě alely (v tabulce pro stejný primer dvě různá čísla).

Jednotlivé alely jsem si dále barevně označila podle toho, jakému druhu náleží – růžovou barvou jsem označila alely *T. latifolia*, modrou barvou alely *T. angustifolia* (tab. č. 16, příloha č. 4). Použila jsem rozdělení, které uvádí Snow et al. (2010), a upravila jsem ho podle použitého zaokrouhlování. Alely typické pro druh *T. latifolia* jsou většinou kratší než alely typické pro *T. angustifolia* a často je mezi nimi větší nebo menší délkový rozdíl. U těchto alel nebyl problém s určením, kterému druhu patří. U alel, které na sebe přímo navazovaly nebo které Snow et al. (2010) nedetekovali, jsem se řídila výsledky z programu Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000). Program Structure 2.3.3 jasně rozdělil většinu jedinců podle alel do dvou skupin ($K = 2$), odpovídajícím druhům *T. latifolia* a *T. angustifolia*, přičemž každá skupina měla své specifické alely. Pouze malá skupina jedinců byla zařazena do třetí skupiny. Jedinci v této skupině sdílely alely obou rodičovských druhů a jsou to tedy pravděpodobní hybridy. Zvláštní alely, které svou délkou odpovídají spíše druhu *T. latifolia*, ale patří druhu *T. angustifolia*, jsem také přiřadila k druhu na základě výsledků z programu Structure 2.3.3. O jednotlivých alelách více viz kapitola 4. Výsledky.

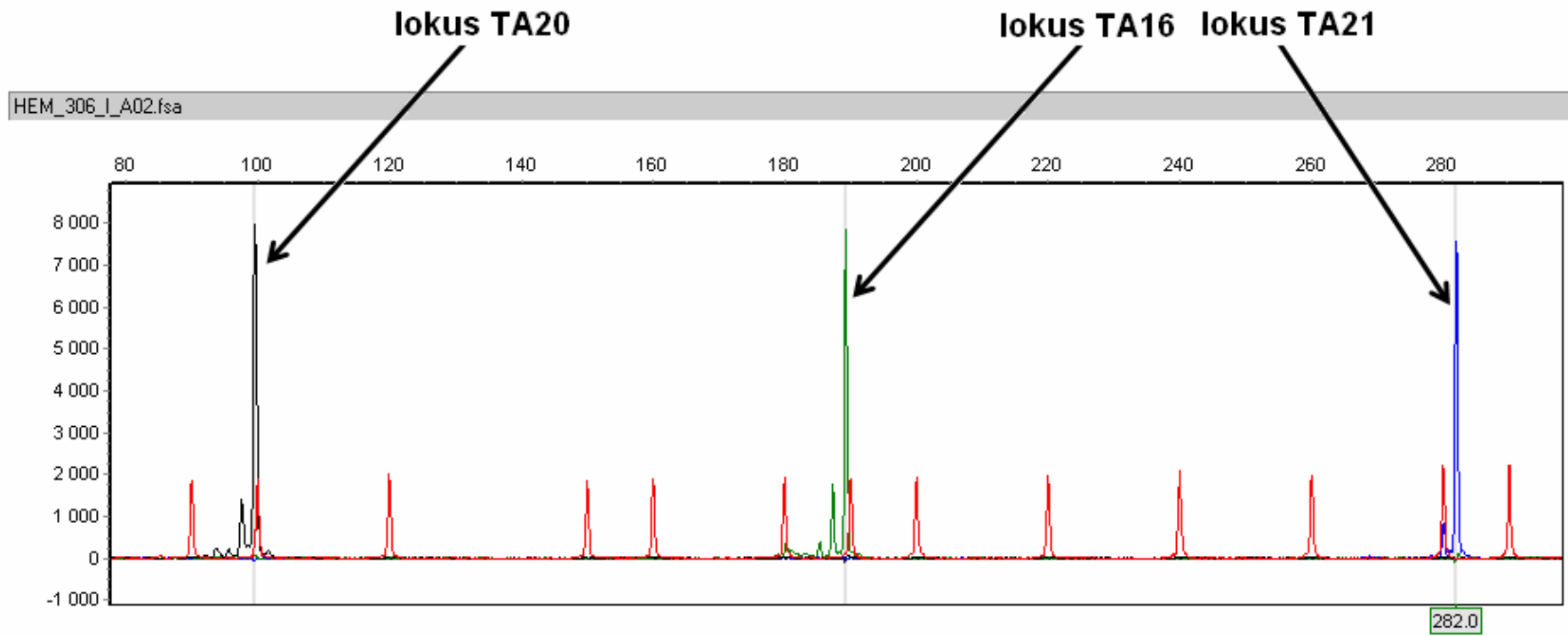
Hybridy jsem podle alelického složení dále rozdělila na F1 hybridy, pokročilé hybridy a zpětné křížence k *T. angustifolia*. Použila jsem rozdělení, které uvádí Kirk et al. (2011), protože ale autoři použili pro rozdělení pouze 6 mikrosatelitových lokusů, upravila jsem toto rozdělení pro 8 lokusů. Pokud měl hybridní jedinec v každém lokusu jednu alelu *T. latifolia* a jednu alelu *T. angustifolia*, byl označen jako F1 hybrid. Pokud měl hybridní jedinec pět lokusů s alelami jednoho druhu a jeden lokus s alelami od

druhého druhu nebo s jednou alelou *T. latifolia* a jednou alelou *T. angustifolia*, byl označen jako pokročilý hybrid. Pokud měl hybridní jedinec jeden lokus se dvěma alelami *T. angustifolia* a čtyři lokusy s jednou alelou *T. latifolia* a jednou alelou *T. angustifolia*, pak byl označen jako zpětný kříženec k *T. angustifolia*.

Na základě výsledků z molekulárních analýz jsem upravila mapku s populacemi, ve kterých jsem sbírala vzorky rostlin. Barevně jsem odlišila populace jen s *T. latifolia* (růžová barva), populace jen s *T. angustifolia* (modrá barva), smíšené populace bez hybridů (oranžová barva), smíšené populace s hybridy (zelená barva) a populace s *T. angustifolia* a hybridy (žlutá barva).



Obr. č. 13: Píky pro vzorek č. 205 (druh *T. angustifolia*) v multiplexu I zobrazené v programu GeneMarker (Soft Genetics). Osa y zobrazuje intenzitu píků, na ose x je délka fragmentů. Červeně je zobrazen žebříček GeneScan 400HD ROX (ABI), žlutá barva je v programu zobrazována jako černá. Černými šipkami jsou znázorněné jednotlivé mikrosatelitové lokusy. V každé barvě jsou vidět 2 vysoké píky o různých velikostech, které odpovídají alelám. Jedinec je tedy v těchto lokusech heterozygotní.



Obr. č. 14: Píky pro vzorek č. 306 (druh *T. angustifolia*) v multiplexu II zobrazené v programu GeneMarker (Soft Genetics). Osa y zobrazuje intenzitu píků, na ose x je délka fragmentů. Červeně je zobrazen žebříček GeneScan 400HD ROX (ABI), žlutá barva je v programu zobrazována jako černá. Černými šipkami jsou znázorněny jednotlivé mikrosatelitové lokusy. V každé barvě je vidět pouze 1 vysoký pík, který odpovídá alelám. Jedinec je tedy v těchto lokusech homozygotní.

3.6 Statistické vyhodnocení mikrosatelitových dat

3.6.1 Výpočty populačně-genetických parametrů

Z tabulky s hodnotami délek mikrosatelitových fragmentů jsem vytvořila v MS Excelu čtyři vstupní matice pro program MSA 4.05 (Dieringer & Schlötterer 2003) – první matici pro *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy, druhou pro *T. latifolia* a *T. angustifolia*, třetí jen pro *T. latifolia* a čtvrtou jen pro *T. angustifolia*. Tyto matice jsem uložila ve formátu *.txt. Postupně jsem je otevřela v programu MSA 4.05 a vypočítala tyto populačně-genetické parametry: párové genetické vzdálenosti mezi jedinci a mezi populacemi na základě proporce sdílených alel (*proportion of shared alleles*, D_{ps} ; Bowcock et al. 1994) a na základě Neiovy genetické vzdálenosti (*Nei's chord distance*, D_a ; Nei et al. 1983) a očekávanou heterozygositu (*expected heterozygosity*, H_e). Program na základě zadaných parametrů vytvořil pro každou matici adresář s řadou tabulek a textových souborů s výsledky všech výpočtů.

Z tabulky *Allelecount* v adresáři *Allelecount* jsem vytvořila v MS Excelu tabulku s počty alel pro jednotlivé lokusy pro všechny tři druhy. Z této tabulky a z tabulky *Hetexp* v adresáři *Single_data* jsem dále v MS Excelu vytvořila pro *T. latifolia* a *T. angustifolia* tabulku s těmito s vnitropopulačními charakteristikami: počet jedinců v populaci, počet multilokusových genotypů v populaci, počet alel v populaci, počet unikátních alel v populaci, očekávaná heterozygosita (H_e) a celková očekávaná heterozygosita (H_e).

Do adresáře *Distance_data* se ve formátu *.txt uložily vypočítané matice vzdáleností mezi jedinci a mezi populacemi. Matice vzdáleností mezi jedinci vypočítané na základě proporce sdílených alel (*POSA_Ind.txt*) jsem použila pro vytvoření fylogenetických stromů a k analýze hlavních koordinát (*Principal Coordinate Analysis*, PCoA).

3.6.2 Tvorba fylogenetických stromů

Pro tvorbu fylogenetických stromů, které v diplomové práci prezentuji, jsem použila matice vzdáleností vypočítané na základě proporce sdílených alel (D_{ps}). Stromy vytvořené z matic vzdáleností vypočítaných na základě Neiovy genetické vzdálenosti (D_a) byly velmi podobné stromům vytvořených z matic vzdáleností vypočítaných na základě proporce sdílených alel (D_{ps}), a proto tyto stromy v diplomové práci již neuvádím.

Příslušnou matici vzdáleností jsem zkopírovala do adresáře programu Phylip 3.69 (Felsenstein 2005) a uložila ji s koncovkou *.phy. Poté jsem spustila program neighbor.exe, který je součástí programu Phylip 3.69, vložila jsem do něj matici a nastavila jsem výpočet nezakořeněného stromu metodou Neighbor-joining (Saitou & Nei 1987). Po analýze se v adresáři vytvořily dva výstupní soubory – *outfile*

a *outtree*. Soubor *outtree* jsem použila k vykreslení stromu – zkopírovala jsem ho do adresáře programu FigTree 1.4.0 (Rambaut 2012), uložila s koncovkou *.ph a následně otevřela v programu FigTree 1.4.0, který strom vykreslil. Takto jsem vytvořila tři fylogenetické stromy – strom pro *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy, strom pro *T. latifolia* a strom pro *T. angustifolia*.

3.6.3 Analýza hlavních koordinát (*Principal coordinate analysis, PCoA*) a její vizualizace

Analýzu hlavních koordinát (*Principal coordinate analysis, PCoA*) jsem provedla v programu SYN-TAX 5.1 (Podani 1997). K analýze jsem opět použila matice vzdáleností mezi jedinci vypočítané na základě proporce sdílených alel (D_{ps}) v programu MSA 4.05. Matici vzdáleností bylo potřeba pro program SYN-TAX 5.1 upravit – z matice jsem v poznámkovém bloku vytvořila dva vstupní soubory: soubor s daty, který jsem uložila s koncovkou *.txt, a soubor s popisky dat, který jsem uložila s koncovkou *.lab. Soubor s daty jsem poté v programu SYN-TAX 5.1 překonvertovala na *Semimatrix* soubor, který jsem v programu otevřela a následně jsem také otevřela soubor s popisky dat. Poté jsem zvolila výpočet pro 5 os a provedla analýzu hlavních koordinát. Výstupem analýzy byly dva textové soubory s procenty variability pro každou osu a s jednoduchým grafem a soubor s koncovkou *.ord s vypočítanými hodnotami koordinát pro všech 5 os.

Analýzu hlavních koordinát jsem vizualizovala v programu FAMD 1.30 (Schlüter & Harris 2006). Vstupní matici jsem vytvořila z výstupního textového souboru s koncovkou *.ord – vykopírovala jsem hodnoty koordinát prvních tří os a vložila je do matice pro program FAMD 1.30. Poté jsem v programu FAMD 1.30 otevřela PCoA 3D Viewer a importovala jsem do něj vstupní matici. Výsledkem byl trojrozměrný ordinační diagram. Pro jasnější znázornění jsem tento diagram natočila tak, aby třetí osa byla skrytá (kolmo na rovinu tvořenou ostatními dvěma osami) a vytvořila jsem tak přehlednější dvourozměrný diagram. Ordinační diagramy jsem tímto způsobem vytvořila tři – první pro *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy, druhý jen pro *T. latifolia* a třetí jen pro *T. angustifolia*.

3.6.4 Zjišťování genetické struktury v programu Structure 2.3.3

Protože je výpočet velmi náročný, spustila jsem program Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) na volně dostupném serveru Bioportal (<https://www.bioportal.uio.no/>, University of Oslo, Norway; Kumar et al. 2009), kde je program Structure 2.3.3 nainstalovaný. Pro výpočty jsem si připravila v poznámkovém bloku dva vstupní soubory – soubor s daty a soubor s parametry analýzy (*mainparams*). Tyto soubory jsem nahrála na Bioportal. Pro analýzu jsem použila *admixture model with correlated allele frequencies*, který uvažuje, že jedinci mohou mít společný původ a mohou sdílet nějakou část svého genomu, tudíž

frekvence alel v různých populacích mohou být podobné. Tento model tak zlepšuje rozdělení blízké příbuzných jedinců do klastrů (skupin). Počet generací burn-in řetězce byl nastaven na 100 000 kroků, počet generací běhu na 1 000 000 kroků. Dále jsem v *Parameter section* nastavila parametry analýzy – počáteční $K = 1$ (*K value start*), zvyšování K po 1 (*K value steps*), maximální $K = 9$ (*K value end*) a 10 opakování pro každé K (*Number of replicates*). Další parametry jsem ponechala stejné jako výchozí a spustila jsem analýzu. Po ukončení analýzy jsem si z Bioportalu stáhla výstupní soubory, které jsem zpracovala pomocí skriptů *Structure-sum-2009.r* (Ehrich et al. 2007) v prostředí R (R Development Core Team 2008). Pomocí skriptů jsem spočítala pravděpodobnost modelu ($\text{LnP}(D)$) ve vztahu ke vzrůstajícímu K , podobnost mezi jednotlivými běhy algoritmu pro dané K (Nordborg et al. 2005) a také ΔK (Evano et al. 2005) pro určení optimálního počtu klastrů (skupin).

Z výsledků *Structure-sum-2009.r* (Ehrich et al. 2007) jsem dále připravila 5 vstupních souborů pro tvorbu grafického znázornění rozřazení jedinců do jednotlivých skupin v programu *Distruct* (Rosenberg 2004). Výstupem programu byl soubor s koncovkou *.ps, který jsem pomocí programu *GhostScript* a *GSView 5.0* (Ghostgum Software Pty Ltd) překonvertovala do formátu PDF a tím se vytvořil barevný sloupcový diagram s rozdělením jednotlivých druhů.

3.6.5 Analýza prostorové autokorelace

Pro analýzu prostorové autokorelace v programu *SPAGeDi 1.3* (Hardy & Vekemans 2002) jsem v MS Excelu vytvořila vstupní matici, která obsahovala dva typy dat – genetická data (délky mikrosatelitových fragmentů) a geografické vzdálenosti mezi jedinci. Geografické vzdálenosti mezi jedinci jsem vypočítala jako přímé vzdálenosti z geografických souřadnic v programu *Geographic Distance Matrix Generator 1.2.3* (Ersts 2006). Takto jsem vytvořila 2 vstupní matice – jednu pro *T. latifolia* a druhou pro *T. angustifolia*. U obou matic jsem odstranila klonální jedince. Z matice pro *T. latifolia* jsem navíc odstranila lokusy TA20 a TA21, protože nejsou variabilní. Do matice jsem zadala výpočet pro 10 vzdálenostních tříd, které program sám definoval. Matici jsem uložila ve formátu *.txt a načetla ji do programu *SPAGeDi 1.3*.

V programu jsem nastavila výpočet párového koeficientu Moranovo I mezi jedinci (Hardy & Vekemans 1999). Standardní chyby koeficientů vzdálenosti byly odhadnuty metodou *jackknife* s 15 000 opakováními a výpočty byly testovány 15 000 permutacemi. Výstupem analýzy byl textový soubor, ve kterém byly zaznamenány frekvence alel pro jednotlivé kategorie, statistické výstupy regresních analýz a matice párových prostorových vzdáleností a genetických koeficientů. Vzdálenostní třídy vypočítané pro *T. latifolia* byly 23,4 km, 36,4 km, 49,5 km, 68,4 km, 79,9 km, 100,4 km, 119,1 km, 142,6 km, 186,6 km a 321,1 km, pro *T. angustifolia* 18,2 km, 34,2 km, 45,1 km, 59,7 km, 73,3 km, 89,3 km,

103,2 km, 129,7 km, 155,4 km a 319,9 km. Z výstupní matice párových prostorových vzdáleností a genetických koeficientů jsem poté v MS Excelu sestrojila dva spojnicové grafy s vynesemím hodnot Moranova I a jeho 95% konfidenčního intervalu pro jednotlivé vzdálenostní třídy, jeden pro *T. latifolia* a druhý pro *T. angustifolia*, a také jsem vytvořila dvě souhrnné tabulky s výstupy autokorelační analýzy pro *T. latifolia* a pro *T. angustifolia*.

3.7 Statistické vyhodnocení morfologických dat

Naměřené hodnoty morfologických znaků jsem použila k analýze hlavních komponent a k lineární diskriminační analýze, abych zjistila, zda se dají hybridy na základě morfologie odlišit od rodičovských druhů. Při určování druhů *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridů jsem vycházela z výsledků analýzy mikrosatelitů.

3.7.1 Analýza hlavních komponent (*Principal component analysis, PCA*)

K analýze hlavních komponent (PCA) jsem použila program PAST (Hammer et al. 2001). Použila jsem hodnoty 7 morfologických znaků, které byly naměřeny na každé rostlině před odebráním vzorku (tab. č. 3 a 4, příloha č. 1), protože to jsou nejdůležitější znaky pro odlišení *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridů (viz kapitola 3.1 Sběr vzorků). Pro lepší rozlišení druhů jsem do analýzy zahrнула také poměr délka/šířka samičí palice a poměr délka/šířka nejdelšího listu. Jedince s chybějícími údaji jsem v analýze ponechala, chybějící hodnotu jsem v matici nahradila symbolem „?“. Do analýzy hlavních komponent jsem zahrнула všechny tři druhy – *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy. Hodnoty znaků jsem vykopírovala z tabulky v MS Excelu, vložila je do programu a provedla jsem analýzu hlavních koordinát. Protože jsem data předem nestandardizovala, provedla jsem ještě korelační analýzu hodnot všech znaků. Výstupem analýzy byl dvourozměrný graf a tabulka udávající procenta variability všech os.

V programu PAST jsem také pro *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy vytvořila pro každý změřený morfologický znak krabicový graf, aby bylo vidět, jestli se druhy v jednotlivých znacích vzájemně překrývají či nepřekrývají. Do programu jsem ke každému druhu vložila naměřené hodnoty jednoho znaku a zadala jsem vytvoření krabicového grafu. Takto jsem vytvořila 7 krabicových grafů pro každý z měřených znaků. V programu jsem dále mezi dvojicemi *T. latifolia*/*T. angustifolia*, *T. latifolia*/hybridi a *T. angustifolia*/hybridi pro každý znak spočítala párový t-test, pomocí kterého jsem pro každou dvojici získala *p*-hodnotu, díky níž jsem zjistila, zda se druhy v jednotlivých znacích mezi sebou signifikantně odlišují. *p*-hodnota byla testována na 1% hladině významnosti a odhadnuta 1000 permutacemi.

3.7.2 Lineární diskriminační analýza (*Linear discriminant analysis, LDA*)

Pro lineární diskriminační analýzu v programu SAS 9.3 (SAS Institute Inc.) jsem si připravila v poznámkovém bloku 2 vstupní matice – matici s morfologickými daty a matici s příkazy pro analýzu. Do matice s morfologickými daty jsem opět zahrнула naměřené hodnoty 7 morfologických znaků a poměry délka/šířka samičí palice a délka/šířka nejdelšího listu. Jedince s chybějícími údaji jsem do analýzy nezahrнула. Obě matice jsem uložila s koncovkou *.txt. Takto uložená data jsem zkopírovala a vložila do programu SAS 9.3. Nastavila jsem výpočet pro 2 osy a spustila analýzu. Výsledkem analýzy byl dvourozměrný graf, tabulka s procenty variability vyjádřenými jednotlivými osami, tabulka s korelačními koeficienty určujícími, jak jsou jednotlivé znaky důležité pro odlišení skupin, a tabulka udávající souřadnice každého bodu v prostoru grafu.

Diskriminační analýzu jsem také vyzkoušela se znaky, které použili Snow et al. (2010). Autoři použili těchto 5 znaků: log (šířka/délka listu), log (průměr stonku/délka listu), délka palice, šířka palice, délka mezery. Graf s těmito znaky vypadal velmi podobně jako graf se znaky, které jsem do analýzy zahrнула já, a proto zde tento graf již neuvádím.

Rozmístění hybridů v prostoru grafu diskriminační analýzy jsem dále porovnávala s jejich alelickým složením, abych zjistila, zda alelické složení ovlivňuje morfologický vzhled hybridů. Protože oddělení obou druhů je definováno první diskriminační osou, vynesla jsem proti sobě pozici hybridu na této ose a počet alel, které má od *T. latifolia* a od *T. angustifolia*.

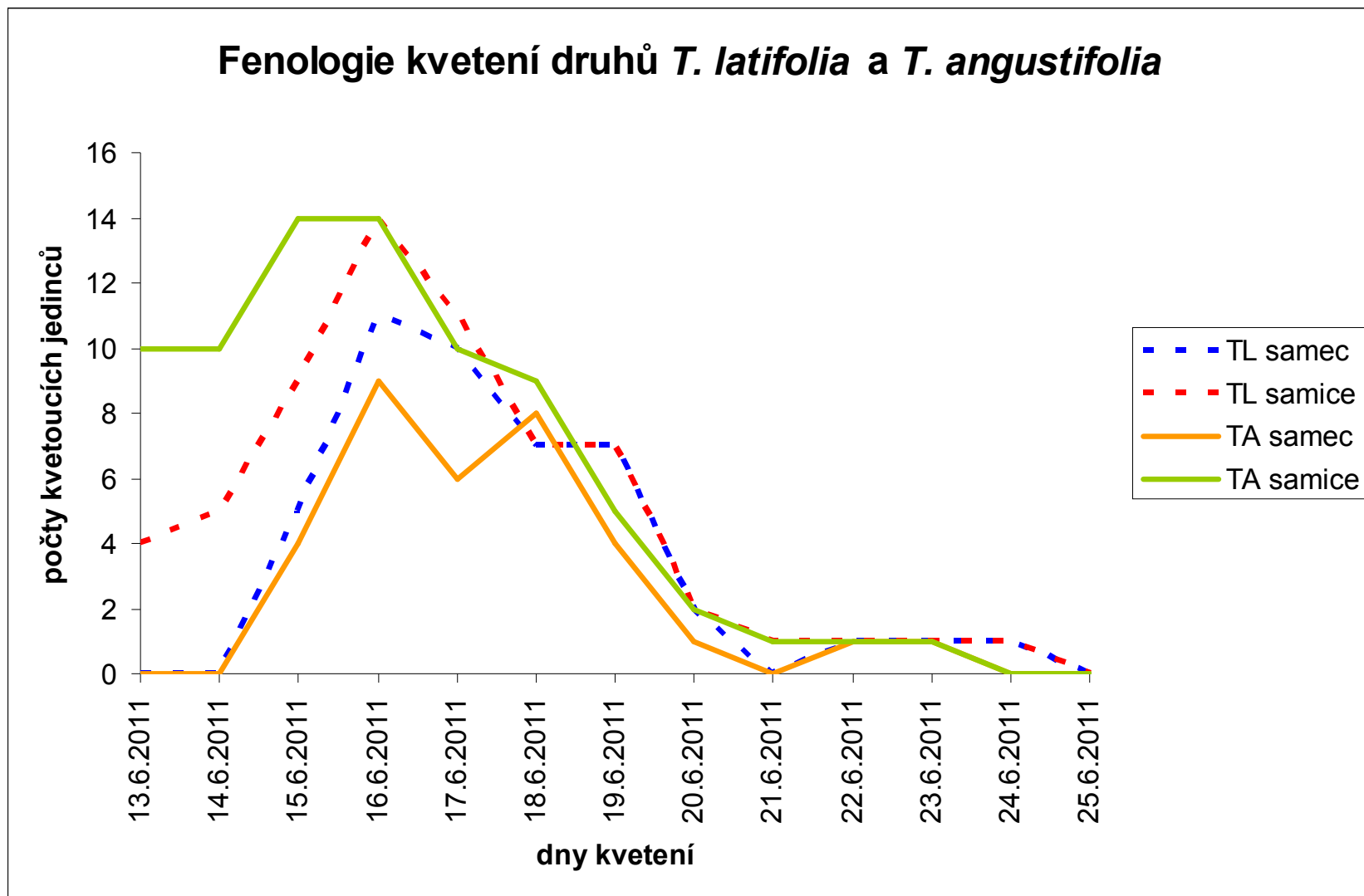
4 Výsledky

4.1 Sledování fenologie kvetení

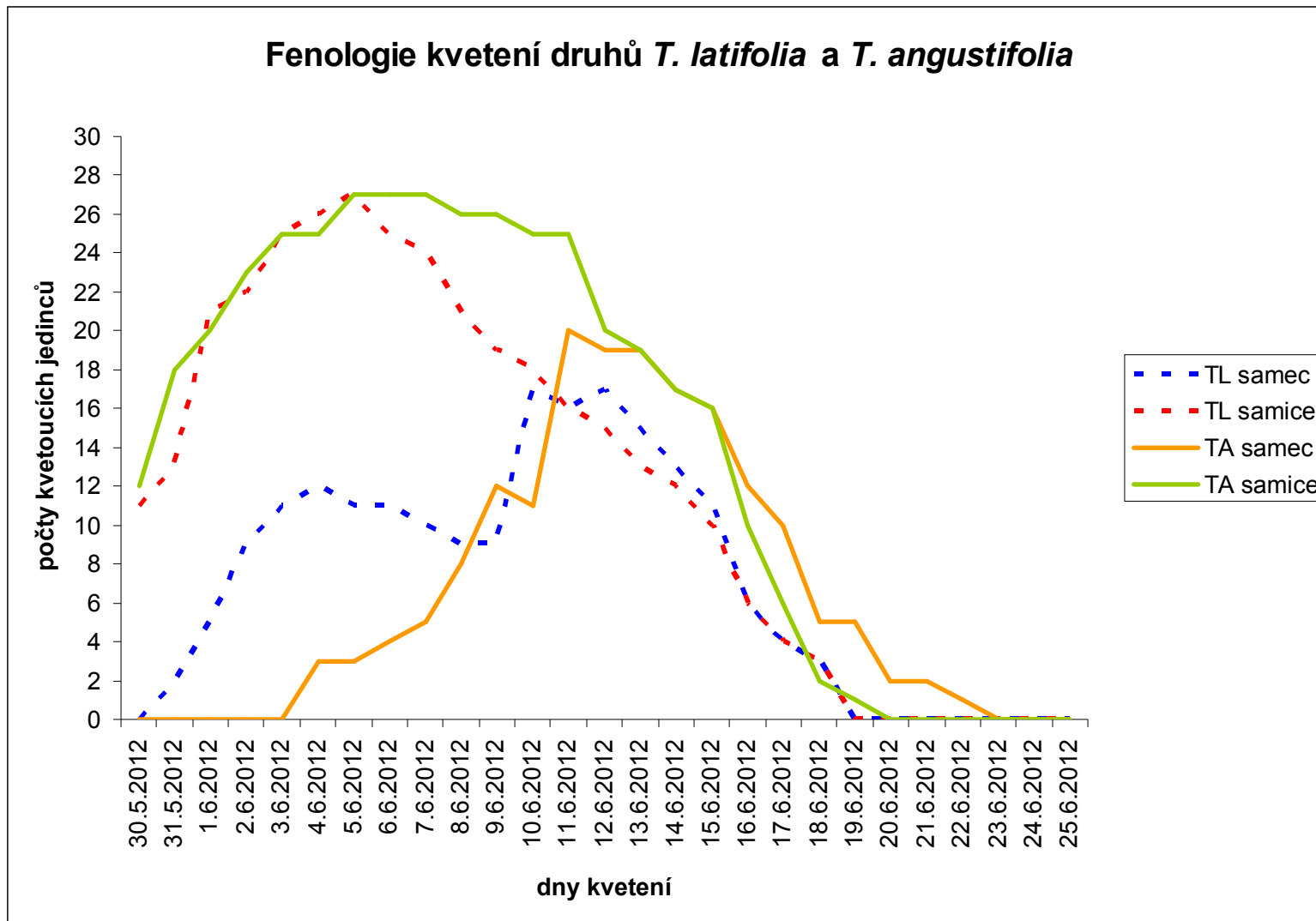
Na základě nasbíraných dat z pozorování fenologie kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* jsem v MS Excelu vytvořila dva spojnicové grafy pro rok 2011 a 2012 (obr. č. 15 a 16). Na obou grafech je jasně vidět, že mezi druhy *T. latifolia* a *T. angustifolia* dochází na území České republiky k úplnému překryvu kvetení a mezidruhové opylení tudíž možné je. Protože jsem v roce 2011 začala pozorovat fenologii kvetení o 15 dní později než v roce 2012, nemohla jsem z dat vytvořit jeden datový soubor a vytvořit tak jeden souhrnný graf fenologie kvetení pro oba roky.

Na obou grafech je také vidět, že samičí květy obou druhů vykvétají přibližně o 2 až 3 dny dříve než samčí květy. To je v souladu s faktem, že květenství je označováno jako protogynní – samičí květy vykvétají o pár dní dříve než květy samčí (Smith 1967; Krattinger 1975). Z nasbíraných dat v roce 2012 je dále patrné, že samičí květy obou druhů jsou fertillní v průměru 13 dní, kdežto samčí květy spráší pyl průměrně 7 dní. Pro rok 2011 jsem obdobné výpočty nemohla udělat, protože jsem v tomto roce začala sledovat fenologii kvetení o několik dní později a někteří jedinci již v té době kvetli. Nicméně i z těchto dat vyplývá, že samičí květy kvetou déle než květy samčí.

Molekulární analýza mikrosatelitů potvrdila, že všechny sledované rostliny byly čistý druh *T. latifolia* nebo *T. angustifolia*.



Obr. č. 15: Graf fenologie kvetení *T. latifolia* (TL) a *T. angustifolia* (TA) v roce 2011. Na ose *x* jsou dny kvetení, na ose *y* počty kvetoucích jedinců (receptivní samičí palice, sprášeující samčí palice). Celkem bylo sledováno 17 jedinců *T. latifolia* a 15 jedinců *T. angustifolia*.



Obr. č. 16: Graf fenologie kvetení *T. latifolia* (TL) a *T. angustifolia* (TA) v roce 2012. Na ose *x* jsou dny kvetení, na ose *y* počty kvetoucích jedinců (receptivní samičí palice, sprášeující samčí palice). Celkem bylo sledováno 28 jedinců *T. latifolia* a 27 jedinců *T. angustifolia*.

4.2 Kontrolovaná křížení v kultuře a klíčení semen z pokusných křížení

Semena se vytvořila na všech sledovaných samičích palicích, kromě tří palic (1 palice *T. angustifolia* a 2 palice *T. latifolia*), které se během vývoje zdeformovaly a semena nevytvořily. Všechna semena vypadala zcela normálně, jako semena vzniklá přirozeně v přírodě – nažka na dlouhém gynoforu s chlupy na bázi, nevykazovala žádné viditelné abnormality.

Ze zasetých semen vyklíčila a vytvořila semenáčky pouze semena ze samosprášení, kromě semen ze tří palic (č. 13, 14, 22b), semena z pokusného křížení nevyklíčila, ani po opakovaném zasetí jiných semen. Z 480 zasetých hybridních semen žádné nevyklíčilo a nepodařilo se tedy experimentálně ověřit, že se oba druhy kříží za vzniku životaschopných semen. Celkem ze 140 semen vzniklých samosprášením vyklíčilo pouze 20 semen, což je pouze 14 %. Nepozorovala jsem žádný rozdíl v klíčení semen *T. latifolia* i *T. angustifolia*, semena obou druhů vyklíčila do tří dnů od zasetí a u každého druhu vyklíčila 1 až 3 semena. V tabulce č. 17 je uvedené, kolik z 10 semen odebraných z každé samosprášené palice vyklíčilo.

Molekulární analýza mikrosatelitů potvrdila, že všechny rostliny, které byly použity ke kontrolovanému křížení v kultuře, byly čistý druh *T. latifolia* nebo *T. angustifolia*.

Tab. č. 17: Počty vyklíčených z 10 zasetých semen ze samosprášených palic. V levém sloupci je samičí palice, na které semena vznikla, v pravém sloupci je počet vyklíčených semen a semenáčků. – = semena z této palice nevyklíčila.

♀ palice	počet vyklíčených semen a semenáčků
1a	2
1b	2
3a	2
3b	2
7	1
10	1
12	2
13	–
14	–
15	2
16	3
18	1
22a	2
22b	–

4.3 Molekulární analýzy

Druhově specifické alely byly definovány na základě publikace Snow et al. (2010) a na základě analýzy v programu Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) (viz dále). Program Structure 2.3.3 rozdělil většinu jedinců podle alel do dvou skupin ($K = 2$) odpovídajícím

druhům *T. latifolia* a *T. angustifolia*. Jedinci byli do těchto dvou skupin zařazeni s 99% a vyšší pravděpodobností. Alely nalezené u těchto jedinců byly druhově specifické a jedinci s různou kombinací těchto alel byli považováni za hybridní.

Celkem jsem detekovala 103 alel, z toho jen 22 alel *T. latifolia* a 81 alel *T. angustifolia*. Dále jsem detekovala alely, které by délkově spadaly k alelám *T. latifolia*, ale patří k alelám *T. angustifolia*. Program Structure 2.3.3 jasně zařadil jedince s těmito alelami do druhu *T. angustifolia*. Jedná se o alelu 186 v lokusu TA7, alelu 265 v lokusu TA8 a alely 166 a 168 v lokusu TA16 (tab. č. 18). Tyto alely by bylo potřeba osekvenovat a podívat se, zda zde nedošlo k delecím.

Z 267 zanalyzovaných jedinců bylo 130 čistý druh *T. latifolia* a 108 jedinců čistý druh *T. angustifolia* (tab. č. 16, příloha č. 4). Tito jedinci měli všechny alely od jednoho nebo druhého druhu. Typické F1 hybridní *pattern*, kdy jedna alela z lokusu pochází od *T. latifolia* a druhá od *T. angustifolia*, jsem našla pouze u jednoho vzorku – vzorek č. 534 (Břilický rybník, Třeboň) (červeně označený vzorek v tab. č. 19). Zbylí jedinci (28) vykazovali různou kombinaci alel rodičovských druhů, v některých lokusech byli hybridní a v některých měli všechny alely od jednoho rodičovského druhu, a pravděpodobně se jedná o pokročilé hybridy či zpětné křížence. Na základě alelického složení bylo detekováno 23 pravděpodobných pokročilých hybridů (dále jen pokročilí hybridi) a pouze 5 pravděpodobných zpětných kříženců (dále jen zpětní kříženci). Všichni zpětní kříženci byli pouze k druhu *T. angustifolia* (tab. č. 19).

Hybridní jedinci byli nalezeni v 13 populacích (tab. č. 19). Většina pokročilých hybridů a zpětných kříženců pochází ze stanovišť, kde se vyskytovaly oba druhy. Pouze čtyři pokročilí hybridi (vzorky č. 209, 210, 211 – populace č. 54, vzorek č. 125 – populace č. 52) pochází z rybníků, kde rostl jen druh *T. angustifolia* (první tři vzorky z rybníku v Konětopech a poslední z rybníku u obce Mokrovraty) (tab. č. 2, kapitola 3.1 Sběr vzorků). Hybridní nejsou vázáni jen na určitou geografickou oblast, ale nachází se v různých oblastech České republiky, a k hybridizaci dochází náhodně na celém území České republiky (obr. č. 17).

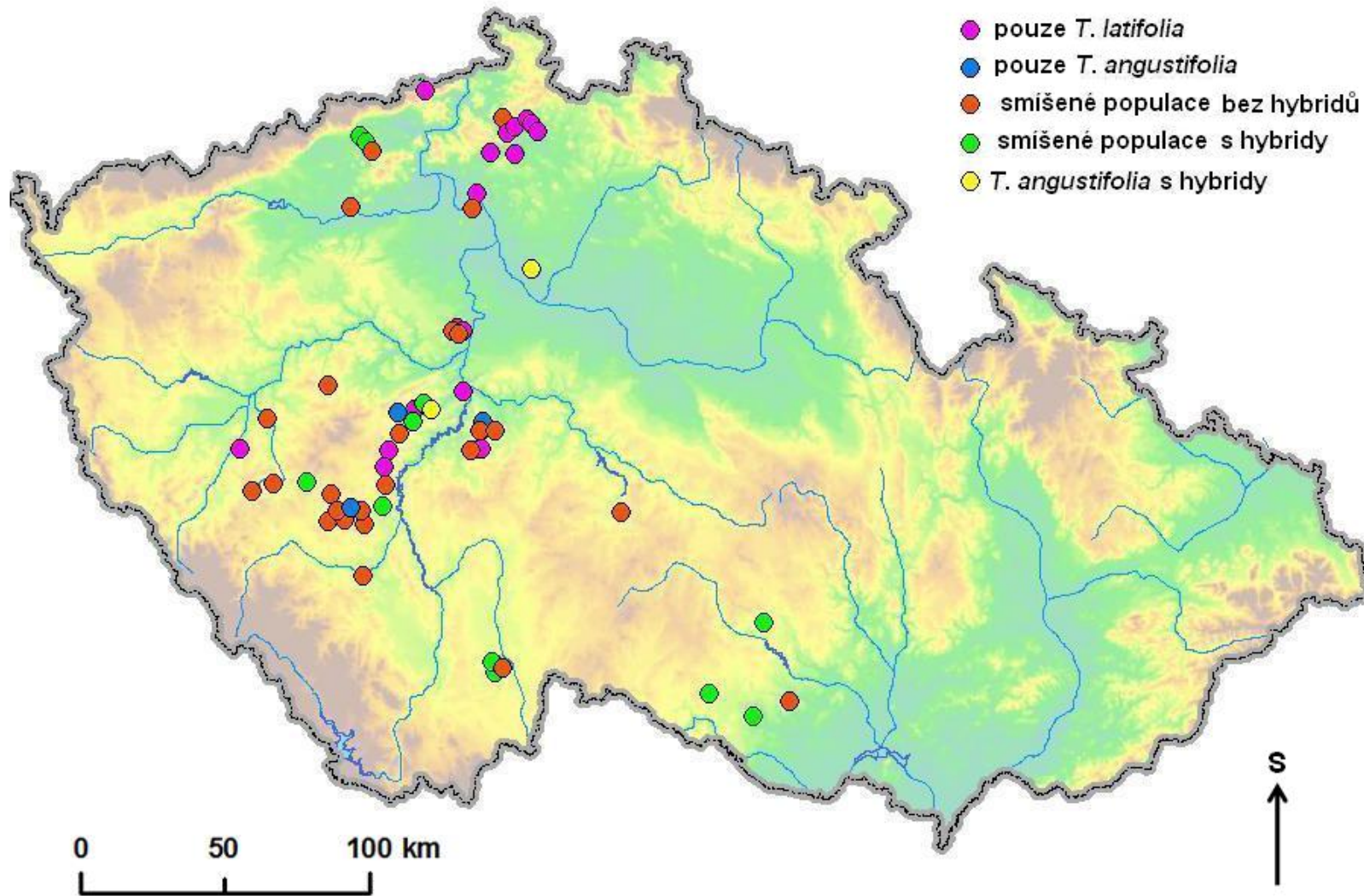
Tab. č. 18: Tabulka s hodnotami délek mikrosatelitových lokusů pro jednotlivé primery. Růžová barva označuje alely *T. latifolia*, modrá alely *T. angustifolia*. Převzato ze Snow et al. (2010) a doplněno o mnou nalezené alely. Barevné označení primerů odpovídá jejich fluorescenčnímu značení.

primer →	TA3	TA5	TA7	TA8	TA15	TA16	TA20	TA21
délka fragmentu ↓	173	279	180	265	165	166	90	280
	175	281	186	269	175	168	96	282
	177	283	188	271	177	178	98	284
	179	287	190	275	179	180	100	
	199	289	192	277		182	102	
	201	291	194	289		184		
	205	293	196	291		186		
	207	295	202	293		188		
	209	297	204	295		190		
	211	299	208			192		
	213	303	212			194		
	221	305	218			196		
	223	307	220			198		
	225	309	222			200		
	227		224			204		
	231		228			206		
			230			208		
			232			210		
			234			214		
			236			216		
			240			220		
			248			222		
			252			224		
						226		
						228		
						230		
						236		
						246		
						248		

Tab. č. 19: Jedinci vykazující různou kombinaci alel rodičovských druhů. V prvním sloupci je uvedené číslo vzorku, ve druhém sloupci je uvedené číslo populace a v dalších šestnácti sloupcích jsou uvedené délky 8 mikrosatelitových lokusů. V posledních čtyřech sloupcích je u každého hybridu uvedeno, kolik lokusů má s jednou alelou od *T. latifolia* a jednou alelou od *T. angustifolia*, kolik lokusů má s oběma alelami od *T. latifolia*, kolik lokusů má s oběma alelami od *T. angustifolia* a o jaký pravděpodobný typ hybridu se jedná. Růžová barva označuje alely *T. latifolia*, modrá barva alely *T. angustifolia*. Červenou barvou je označen jediný F1 hybrid (vzorek č. 534). Barevné označení primerů odpovídá jejich fluorescenčnímu značení. Na konci tabulky je na ukázkou uveden jeden čistý jedinec *T. latifolia* (vzorek č. 1) a jeden čistý jedinec *T. angustifolia* (vzorek č. 41). ? = chybějící data, PH = pokročilý hybrid, ZK = zpětný kříženec, TA = *T. angustifolia*.

č. v.	č. p.	primer																počet lokusů s jednou alelou od <i>T. latifolia</i> a jednou alelou od <i>T. angustifolia</i>	počet lokusů s oběma alelami od <i>T. latifolia</i>	počet lokusů s oběma alelami od <i>T. angustifolia</i>	pravděpodobný typ hybridu
		TA3		TA5		TA7		TA8		TA15		TA16		TA20		TA21					
125	52	207	213	289	289	186	228	275	291	175	177	194	230	96	100	280	284	2	0	6	PH
154	13	211	213	289	289	228	236	291	291	175	177	190	192	96	100	280	282	2	0	6	PH
156	13	213	213	287	287	228	228	275	291	175	177	192	194	100	100	280	282	2	0	6	PH
157	13	211	213	289	289	228	236	289	291	175	177	190	192	96	100	280	282	2	0	6	PH
159	13	213	213	289	289	228	228	275	291	175	177	192	194	100	100	280	282	2	0	6	PH
195	23	177	177	281	281	190	190	271	271	175	175	180	180	90	90	282	282	0	7	1	PH
203	14	213	213	289	305	186	186	289	289	175	175	194	194	96	100	280	280	0	2	6	PH
209	54	205	207	287	291	186	196	275	289	175	177	190	194	96	100	280	282	2	0	6	PH
210	54	205	207	287	291	186	196	275	289	175	177	190	194	96	100	280	282	2	0	6	PH
211	54	205	207	287	291	186	196	275	289	175	177	190	194	96	100	280	282	2	0	6	PH
228	23	205	211	289	303	186	196	277	291	175	177	166	194	98	100	280	282	2	0	6	PH
232	23	205	211	289	303	186	196	277	291	175	177	166	194	98	100	280	282	2	0	6	PH
233	23	205	211	289	303	186	196	277	291	175	177	166	194	98	100	280	282	2	0	6	PH
276	32	199	221	289	289	186	196	289	289	177	177	184	184	90	90	280	280	0	3	5	PH
282	24	207	213	289	303	186	196	277	293	175	177	168	194	98	100	280	282	2	0	6	PH
284	24	207	213	289	303	186	196	277	293	175	177	168	194	98	100	280	282	2	0	6	PH
285	24	205	211	289	303	186	196	277	291	175	177	168	194	98	100	280	282	2	0	6	PH
325	34	177	177	281	281	190	190	271	271	175	175	184	184	90	90	280	282	1	7	0	PH
377	34	177	199	281	293	186	190	271	291	177	177	184	206	90	96	280	282	7	0	1	ZK k TA
378	34	177	199	279	291	190	202	271	291	177	177	184	206	90	102	282	282	6	0	2	ZK k TA
383	34	177	199	279	291	190	202	271	291	177	177	184	206	90	102	282	282	6	0	2	ZK k TA
405	43	179	179	281	281	190	190	271	271	?	?	184	184	90	90	280	282	1	6	0	PH

409	44	177	179	279	281	190	190	271	271	175	175	180	184	90	90	280	282	1	7	0	PH
410	44	177	177	279	281	190	190	271	271	175	175	184	184	90	90	280	282	1	7	0	PH
526	46	211	211	289	289	186	186	289	291	175	177	192	196	98	100	280	282	2	0	6	PH
527	46	211	211	289	289	186	186	289	291	175	177	192	196	98	100	280	282	2	0	6	PH
532	47	177	207	281	289	190	248	271	275	177	177	194	206	100	100	282	282	4	0	4	ZK k TA
534	47	177	205	281	289	190	236	269	291	175	177	180	220	90	100	280	282	8	0	0	F1 hybrid
539	48	177	207	281	289	190	248	271	275	177	177	194	206	100	100	282	282	4	0	4	ZK k TA
1	1	177	177	281	281	190	190	271	271	175	175	184	184	90	90	280	280	–	–	–	–
41	12	199	207	289	289	228	234	277	277	177	177	190	222	96	100	282	282	–	–	–	–



Obr. č. 17: Mapka populací, ve kterých byly sebrány vzorky. Růžové barva značí populace pouze s *T. latifolia*, modrá populace pouze s *T. angustifolia*, oranžová smíšené populace bez hybridů, zelená smíšené populace s hybridy a žlutá populace s *T. angustifolia* a hybridy. Celkem bylo zanalyzováno 267 vzorků z 57 populací. Hybridy se vyskytují v různých oblastech České republiky.

4.4 Statistické vyhodnocení mikrosatelitových dat

4.4.1 Populačně-genetické parametry

V tabulce č. 20 jsou zaznamenané počty alel pro jednotlivé lokusy pro *T. latifolia*, *T. angustifolia* a pro hybridy. Červenou barvou jsou v tabulce označené alely, které se u daného druhu vyskytují nejčastěji. Je patrné, že alely, které se nejčastěji vyskytují u *T. latifolia* a *T. angustifolia*, se také nejčastěji vyskytují u hybridů. Pouze v lokusu TA3 se u hybridů vyskytuje nejčastěji alela 213 místo alely 211, která je v tomto lokusu nejběžnější pro *T. angustifolia*, a v lokusu TA5 se u hybridů vyskytuje nejčastěji alela 281 místo alely 279, která je v tomto lokusu nejběžnější pro *T. latifolia*.

Tabulka č. 21 uvádí základní vnitropopulační charakteristiky pro populace *T. latifolia* a *T. angustifolia* – počet jedinců v populaci, počet multilokusových genotypů v populaci, počet alel v populaci, počet unikátních alel v populaci, očekávanou heterozygositu (H_e) a celkovou očekávanou heterozygositu (H_c). U druhu *T. latifolia* je minimální počet jedinců v populaci 1 a maximální počet jedinců v populaci je 5, minimální počet multilokusových genotypů v populaci je 1 a maximální počet multilokusových genotypů v populaci je 4, minimální počet alel v populaci je 8 a maximální počet alel v populaci je 14, minimální počet unikátních alel v populaci je 1 a maximální počet unikátních alel v populaci je 8. U druhu *T. angustifolia* je minimální počet jedinců v populaci 1 a maximální počet jedinců v populaci je 7, minimální počet multilokusových genotypů v populaci je 1 a maximální počet multilokusových genotypů v populaci je 4, minimální počet alel v populaci je 8 a maximální počet alel v populaci je 24, minimální počet unikátních alel v populaci je 1 a maximální počet unikátních alel v populaci je 15.

Heterozygosita je obecně vyšší u druhu *T. angustifolia*, kde dosahuje maximální hodnoty 0,75 a minimální hodnoty 0,08. U druhu *T. latifolia* je maximální hodnota heterozygosity 0,50 a minimální hodnota 0,07. Celková heterozygosita pro *T. latifolia* je 0,22, pro *T. angustifolia* 0,60. V populacích *T. angustifolia* je tedy větší podíl heterozygotů, naproti tomu v populacích *T. latifolia* převažují homozygoti. Výpočet heterozygosity může být ale výrazně zkreslen kvůli malému počtu jedinců v populacích. Z tabulky je dále patrné, že v populacích *T. angustifolia* se obecně vyskytuje více alel i více unikátních alel než v populacích *T. latifolia*, což je v souladu s předešlou informací o vyšší heterozygositě u druhu *T. angustifolia*. Počty multilokusových genotypů v populacích obou druhů jsou přibližně stejné, v průměru jsou v každé populaci dva multilokusové genotypy.

Tab. č. 20: Počty alel pro lokusy TA3, TA5, TA7, TA8, TA15, TA16, T20 a TA21 pro *T. latifolia* (TL), *T. angustifolia* (TA) a pro hybridy (H). Růžová barva označuje alely *T. latifolia* a modrá alely *T. angustifolia*. Červená barva označuje alely, které se u daného druhu vyskytují nejčastěji. Je patrné, že alely, které se nejčastěji vyskytují u *T. latifolia* a *T. angustifolia*, se také nejčastěji vyskytují u hybridů.

lokus TA3				lokus TA5				lokus TA7				lokus TA8				lokus TA15				lokus TA16				lokus TA20				lokus TA21			
alela	TL	TA	H	alela	TL	TA	H	alela	TL	TA	H	alela	TL	TA	H	alela	TL	TA	H	alela	TL	TA	H	alela	TL	TA	H	alela	TL	TA	H
173	10	0	0	279	164	0	4	180	4	0	0	265	0	2	0	165	5	0	0	166	0	11	3	90	260	0	16	280	260	0	26
175	44	0	0	281	94	0	12	186	0	79	18	269	18	0	1	175	251	0	27	168	0	3	3	96	0	28	8	282	0	203	31
177	178	0	13	283	2	0	0	188	2	0	0	271	242	0	15	177	0	215	29	178	3	0	0	98	0	27	8	284	0	13	1
179	28	0	3	287	0	4	5	190	251	0	16	275	0	24	8	179	0	1	0	180	84	0	4	100	0	117	24				
199	0	29	4	289	0	92	24	192	3	0	0	277	0	37	6					182	13	0	0	102	0	44	2				
201	0	10	0	291	0	11	5	194	0	5	0	289	0	44	10					184	158	0	12								
205	0	25	8	293	0	56	1	196	0	20	10	291	0	93	16					186	2	0	0								
207	0	45	8	295	0	19	0	202	0	4	2	293	0	13	2					188	0	4	0								
209	0	8	0	297	0	5	0	204	0	3	0	295	0	3	0					190	0	15	5								
211	0	51	10	299	0	2	0	208	0	3	0									192	0	20	6								
213	0	26	11	303	0	13	6	212	0	6	0									194	0	47	16								
221	0	9	1	305	0	3	1	218	0	3	0									196	0	29	2								
223	0	6	0	307	0	8	0	220	0	12	0									198	0	10	0								
225	0	4	0	309	0	3	0	222	0	1	0									200	0	15	0								
227	0	2	0					224	0	5	0									204	0	7	0								
231	0	1	0					228	0	33	7									206	0	7	5								
								230	0	5	0									208	0	3	0								
								232	0	5	0									210	0	4	0								
								234	0	7	0									214	0	1	0								
								236	0	5	3									216	0	1	0								
								240	0	14	0									220	0	6	1								
								248	0	1	2									222	0	7	0								
								252	0	5	0									224	0	8	0								
																				226	0	1	0								
																				228	0	4	0								
																				230	0	1	1								
																				236	0	3	0								
																				246	0	2	0								
																				248	0	7	0								

Tab. č. 21: Základní vnitropopulační charakteristiky pro *T. latifolia* a *T. angustifolia* – počet jedinců v populaci, počet multilokusových genotypů v populaci, počet alel v populaci, počet unikátních alel v populaci, očekávaná heterozygosita (H_e) v populaci a celková očekávaná heterozygosita (H_c). V prvním sloupci je číslo populace. – = v populaci se daný druh nevyskytuje.

č. p.	<i>T. latifolia</i>					<i>T. angustifolia</i>				
	počet jedinců	počet multilokusových genotypů	počet alel	počet unikátních alel	očekávaná heterozygosita (H_e)	počet jedinců	počet multilokusových genotypů	počet alel	počet unikátních alel	očekávaná heterozygosita (H_e)
1	2	2	10	0	0,17	–	–	–	–	–
2	4	1	8	0	0,00	–	–	–	–	–
3	3	3	12	1	0,23	7	2	11	0	0,18
4	4	2	12	2	0,17	3	2	14	0	0,42
5	3	2	11	2	0,15	3	1	9	0	0,08
6	1	1	12	8	0,50	4	1	13	0	0,36
7	2	2	10	0	0,17	–	–	–	–	–
8	1	1	8	0	0,00	–	–	–	–	–
9	1	1	10	4	0,25	–	–	–	–	–
10	1	1	8	0	0,00	–	–	–	–	–
11	3	3	13	4	0,23	–	–	–	–	–
12	3	1	9	0	0,08	3	2	13	0	0,33
13	3	3	9	0	0,08	1	1	12	8	0,50
14	4	4	12	0	0,20	1	1	13	10	0,63
15	1	1	8	0	0,00	3	2	17	1	0,48
16	1	1	8	0	0,00	–	–	–	–	–
17	1	1	9	2	0,13	–	–	–	–	–
18	1	1	8	0	0,00	–	–	–	–	–
19	1	1	9	2	0,13	–	–	–	–	–
20	1	1	8	0	0,00	–	–	–	–	–
21	5	4	13	0	0,24	2	2	20	12	0,63
22	2	2	9	0	0,08	–	–	–	–	–
23	1	1	8	0	0,00	–	–	–	–	–
24	3	3	11	0	0,22	–	–	–	–	–
25	3	3	12	2	0,21	3	3	19	6	0,49
26	3	2	11	1	0,18	3	2	11	0	0,22

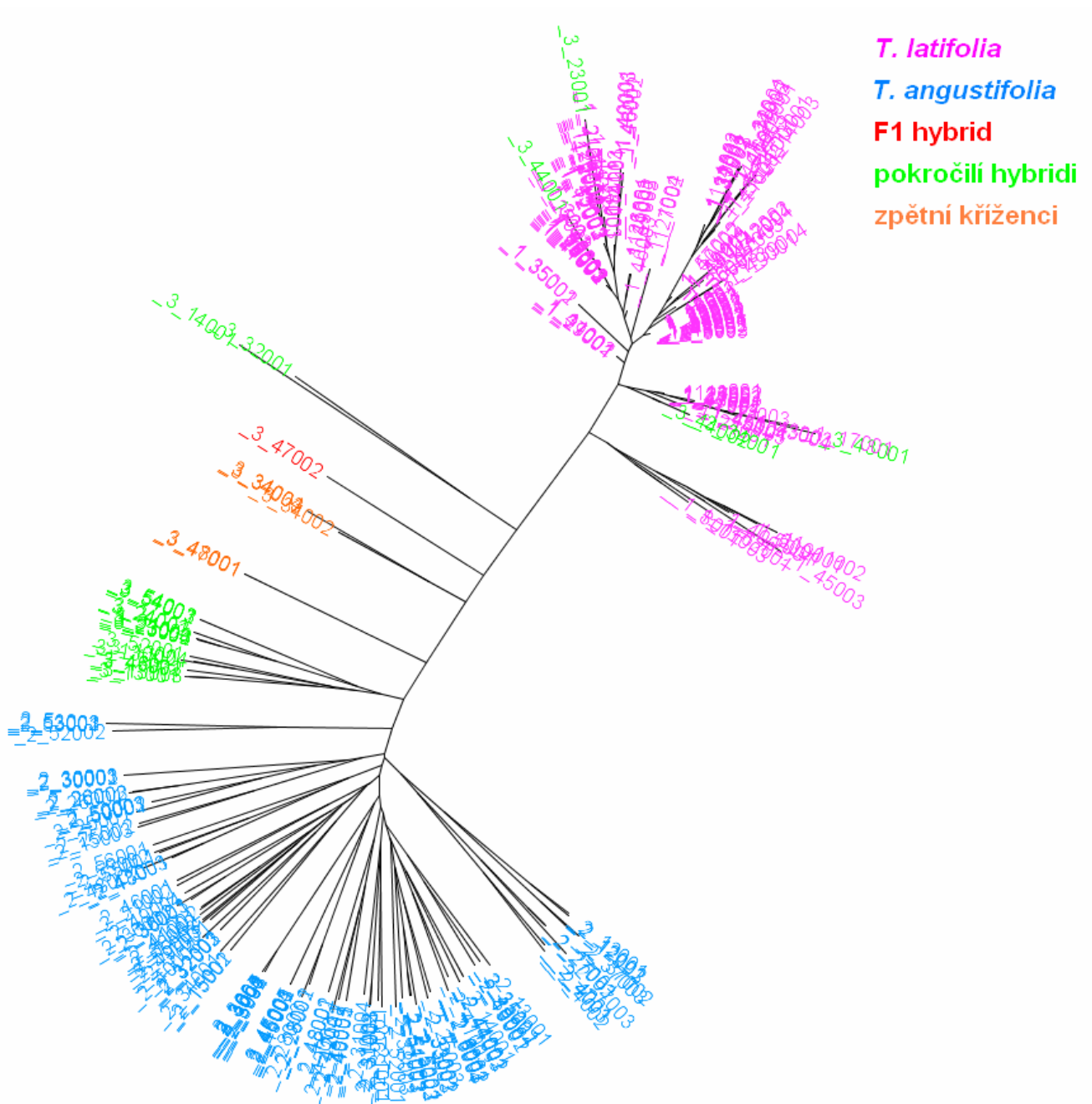
27	3	3	10	0	0,14	3	3	16	1	0,53	
28	3	2	10	0	0,13	3	2	16	2	0,48	
29	3	3	11	1	0,18	-	-	-	-	-	
30	3	1	8	0	0,00	3	1	8	0	0,00	
31	1	1	9	2	0,13	4	3	19	6	0,46	
32	2	1	8	0	0,00	3	1	13	0	0,38	
33	3	2	10	1	0,12	3	1	11	0	0,23	
34	2	2	9	0	0,08	1	1	11	6	0,38	
35	2	1	10	0	0,17	2	1	14	0	0,50	
36	3	2	9	0	0,07	3	2	12	0	0,29	
37	3	1	8	0	0,00	3	3	17	6	0,40	
38	3	3	11	1	0,18	3	3	24	15	0,53	
39	5	3	12	1	0,19	1	1	13	10	0,63	
40	3	3	11	1	0,18	3	2	15	2	0,40	
41	3	3	11	0	0,20	3	3	20	7	0,51	
42	4	3	11	0	0,14	3	2	13	2	0,25	
43	4	2	10	0	0,09	3	2	13	0	0,37	
44	3	3	11	1	0,19	3	1	11	0	0,23	
45	5	3	14	1	0,27	5	1	13	0	0,35	
46	3	2	10	1	0,11	1	1	10	4	0,25	
47	3	3	11	2	0,13	-	-	-	-	-	
48	3	1	8	0	0,00	2	1	11	0	0,25	
49	1	1	10	4	0,25	5	4	24	3	0,55	
50	2	2	10	2	0,10	3	1	11	0	0,23	
51	-	-	-	-	-	3	2	11	0	0,22	
52	-	-	-	-	-	2	2	20	12	0,63	
53	-	-	-	-	-	3	1	11	0	0,23	
55	-	-	-	-	-	3	3	19	5	0,50	
56	-	-	-	-	-	1	1	14	12	0,75	
62	1	1	10	4	0,25	-	-	-	-	-	
celková očekávaná heterozygosita (H_e)					0,22	celková očekávaná heterozygosita (H_e)					0,60

4.4.2 Tvorba fylogenetických stromů

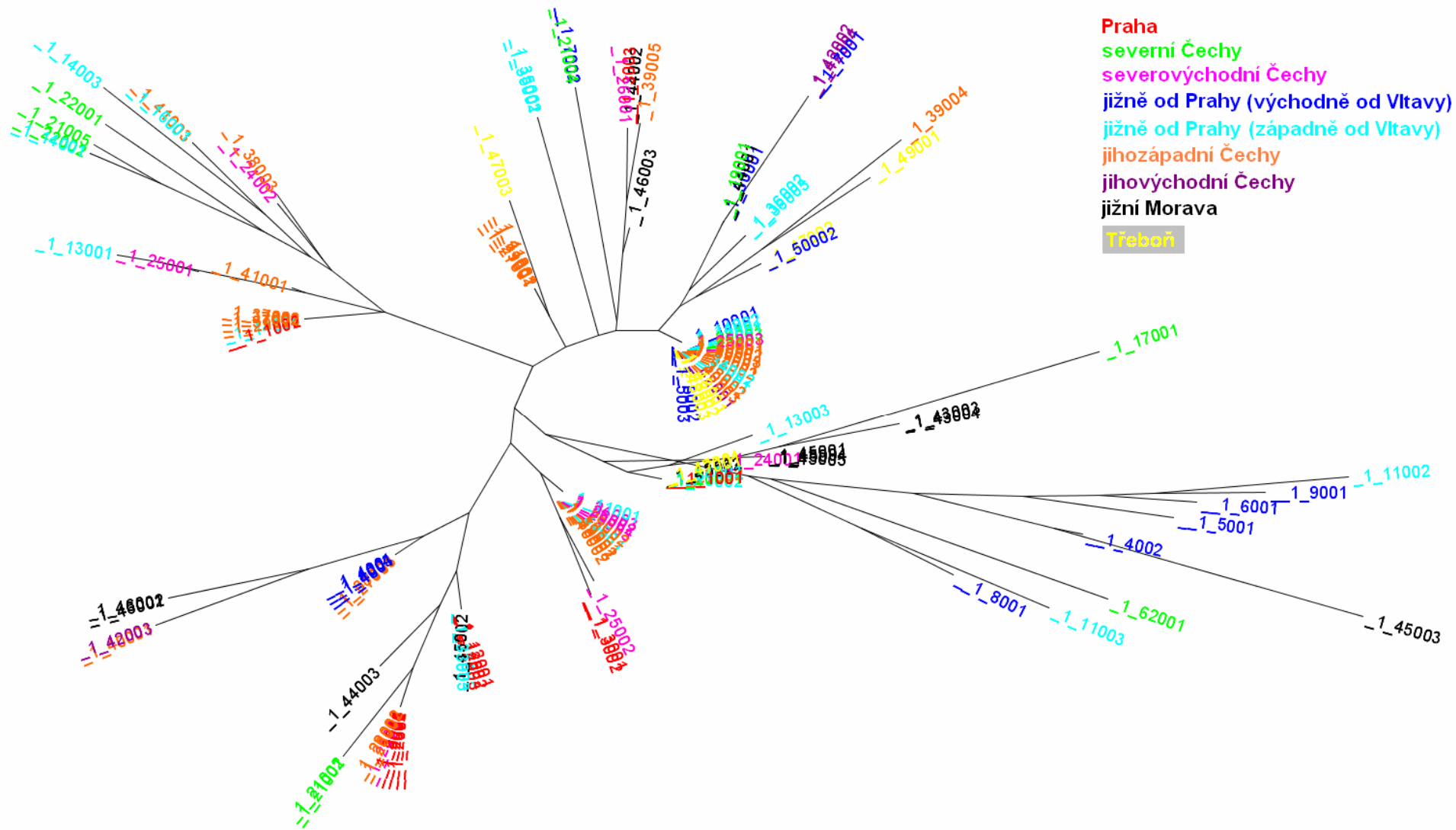
Všechny nezakořeněné fylogenetické stromy, které jsou zde prezentovány, byly vytvořeny metodou Neighbor-joining (Saitou & Nei 1987) z matic vzdáleností vypočítaných na základě proporce sdílených alel (D_{ps}). Stromy vytvořené z matic vzdáleností vypočítaných na základě Neiovy genetické vzdálenosti (D_a) zde nejsou prezentovány, neboť jsou velmi podobné stromům vytvořených z matic vzdáleností vypočítaných na základě proporce sdílených alel (D_{ps}).

Na stromu pro *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy je vidět jasné oddělení rodičovských druhů a hybridů (obr. č. 18). Dále je patrné, že hybridy (červená, zelená a oranžová barva) jsou blíže u druhu *T. angustifolia* (modrá barva), což naznačuje podobnost hybridů spíše k tomuto druhu. F1 hybrid, pokročilí hybridy a zpětní kříženci se spolu nenachází na stejných větvích, ale oddělují se do samostatných větví. Pět pokročilých hybridů bylo ale zařazeno na větev s *T. latifolia* (růžová barva). Jedná se o vzorky č. 405 (3_43001), 409 (3_44001), 410 (3_44002), 195 (3_32001) a 325 (3_34001) (tab. č. 19). Tito pokročilí hybridy mají všechny alely od *T. latifolia* a pouze jednu alelu od *T. angustifolia*, a proto byli přiřazeni k této větvi.

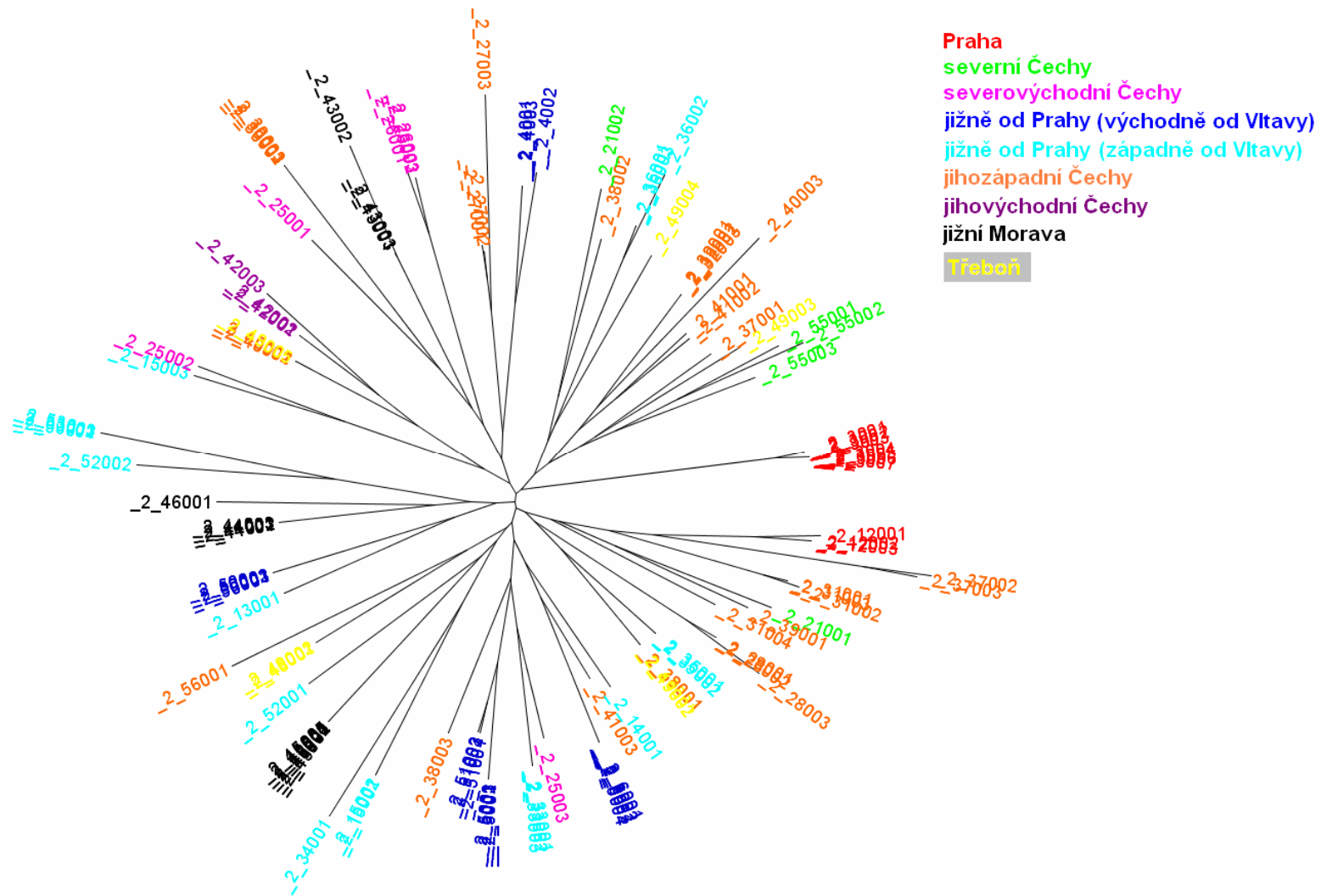
Na stromech zvlášť pro populace *T. latifolia* (obr. č. 19) a *T. angustifolia* (obr. č. 20) jsou jednotlivé populace barevně označené podle toho, v jaké geografické oblasti v Čechách se nachází. Červenou barvou jsou označené populace z Prahy, zelenou barvou populace ze severních Čech, růžovou barvou populace ze severovýchodních Čech, modrou barvou populace jižně od Prahy východně od Vltavy, tyrkysovou barvou populace jižně od Prahy západně od Vltavy, oranžovou barvou populace z jihozápadních Čech, fialovou barvou populace z jihovýchodních Čech, žlutou barvou populace z Třeboně a černou barvou populace z jižní Moravy. Stromy vypadají velmi podobně, na obou stromech není vidět žádné jasné oddělení některé z výše jmenovaných skupin, populace z různých geografických oblastí se nacházejí na stejných větvích. Navíc se někteří jedinci z jedné populace nachází v různých částech stromu. Pouze na stromu pro populace *T. angustifolia* (obr. č. 20) je vidět oddělení jediné skupiny a to skupiny populací z Prahy (červená barva).



Obr. č. 18: Fylogenetický strom vytvořený metodou Neighbour-joining pro *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy v programu Phylip 3.69, vizualizovaný v programu FigTree 1.4.0. Růžová barva znázorňuje *T. latifolia*, modrá *T. angustifolia*, červená F1 hybridy, zelená pokročilí hybridy a oranžová zpětné křížence. Z obrázku je patrné jasné oddělení 3 skupin – *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy. F1 hybrid, pokročilí hybridy a zpětné křížence se oddělují do samostatných větví. Pět pokročilých hybridů bylo přiřazeno na větev *T. latifolia*. Tito hybridy mají všechny alely od *T. latifolia* a pouze jednu alelu od *T. angustifolia*, proto byli přiřazeni právě k větví *T. latifolia*.



Obr. č. 19: Fylogenetický strom vytvořený metodou Neighbour-joining pro populace *T. latifolia* v programu Phylip 3.69, vizualizovaný v programu FigTree 1.4.0. Na stromu není patrné žádné oddělení skupin, navíc se někteří jedinci z jedné populace nachází v různých částech stromu.

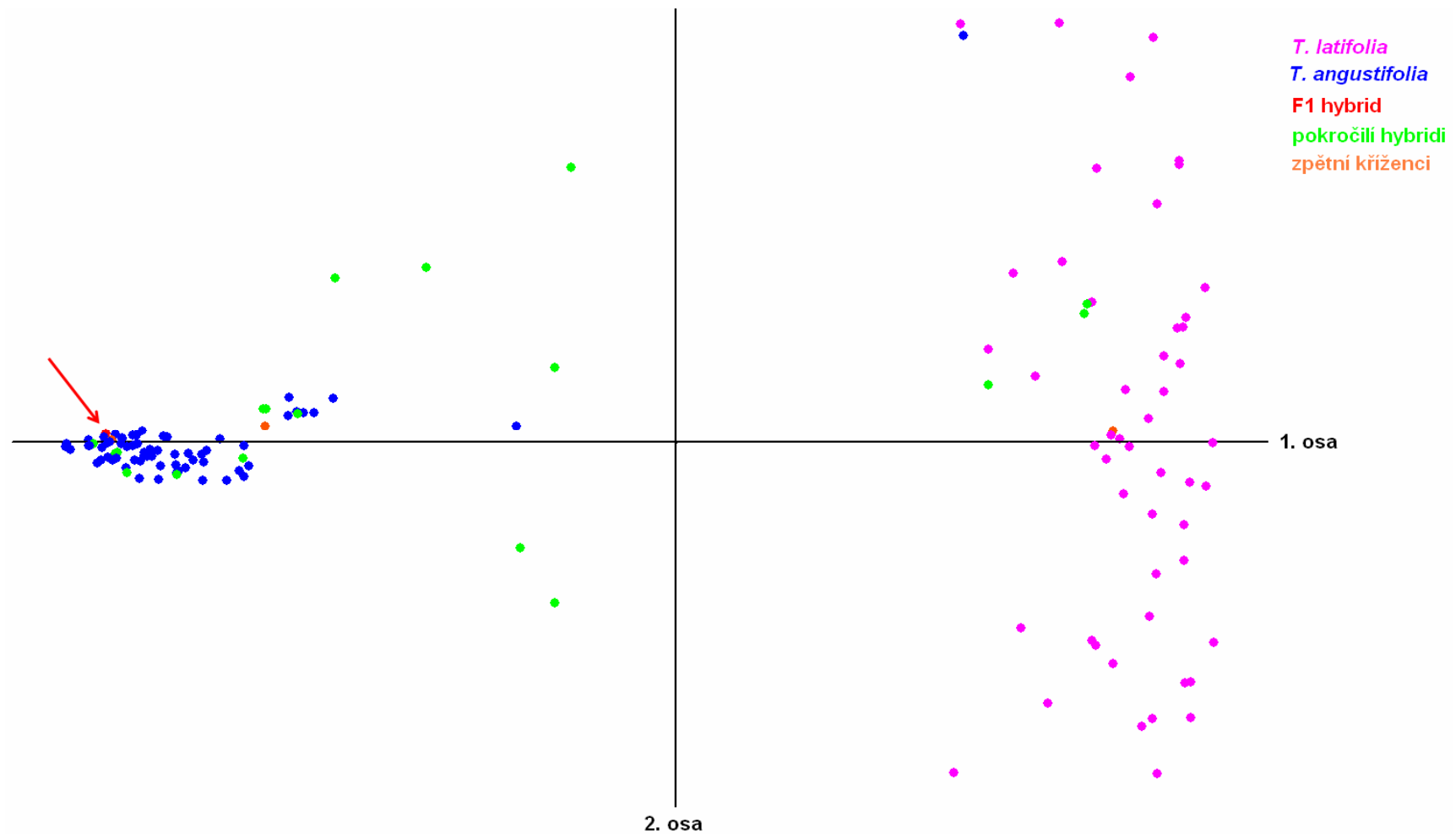


Obr. č. 20: Fylogenetický strom vytvořený metodou Neighbour-joining pro populace *T. angustifolia* v programu Phylip 3.69, vizualizovaný v programu FigTree 1.4.0. Na stromu není patrné žádné oddělení skupin, jediná skupina, která se mírně oddělila, je skupina populací z Prahy (červená barva). Někteří jedinci z jedné populace se opět nachází v různých částech stromu.

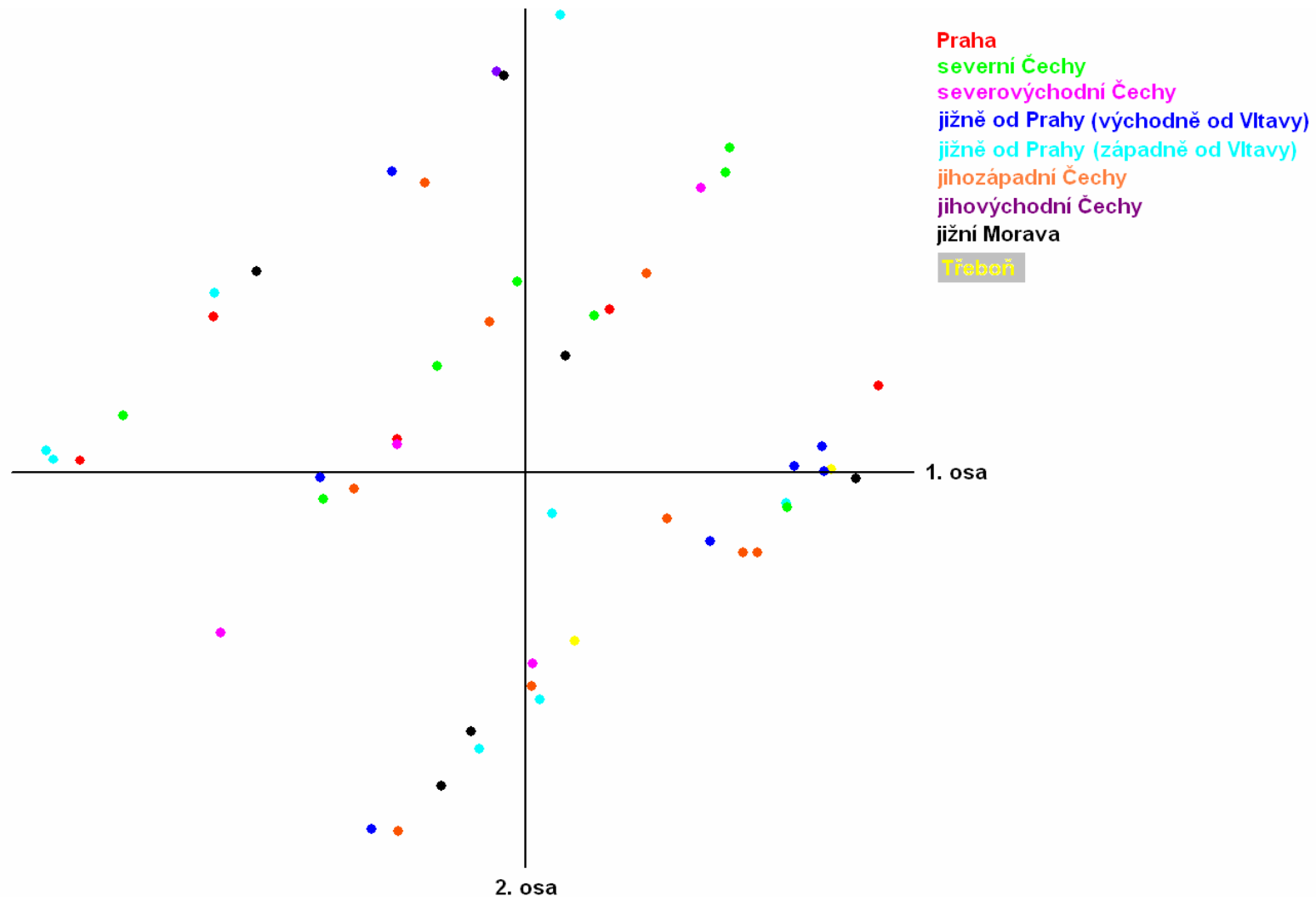
4.4.3 Analýza hlavních koordinát (PCoA)

Analýza hlavních koordinát pro *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy (obr. č. 21) ukazuje podobné *pattern*, jaké je vidět na fylogenetickém stromu (obr. č. 18), ale oddělení druhů není tak jasné. *T. latifolia* (růžová barva) a *T. angustifolia* (modrá barva) se jasně oddělují do dvou vzdálených skupin. Pokročilí hybridy a zpětní kříženci nevytváří samostatnou skupinu, ale tvoří přechod mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia*, přičemž většina jich je opět blíže *T. angustifolia*, což naznačuje podobnost spíše k tomuto druhu. Jediný F1 hybrid se nachází přímo ve shluku *T. angustifolia*. Čtyři hybridy se ale nachází u *T. latifolia*. Stojí za povšimnutí, že to nejsou stejní hybridy, až na jeden vzorek (č. 325), kteří se oddělili u *T. latifolia* i na fylogenetickém stromu. Jedná se o dva pokročilé hybridy (vzorek č. 526 a 527) a jednoho zpětného křížence (vzorek č. 532). Tito hybridy mají většinu alel od druhu *T. angustifolia*. Pouze pokročilý hybrid č. 325 se přiřadil k *T. latifolia* jak na fylogenetickém stromu, tak na diagramu analýzy hlavních koordinát. První osa diagramu vysvětluje 42,9 % pozorované variability, druhá osa 4,1 % pozorované variability.

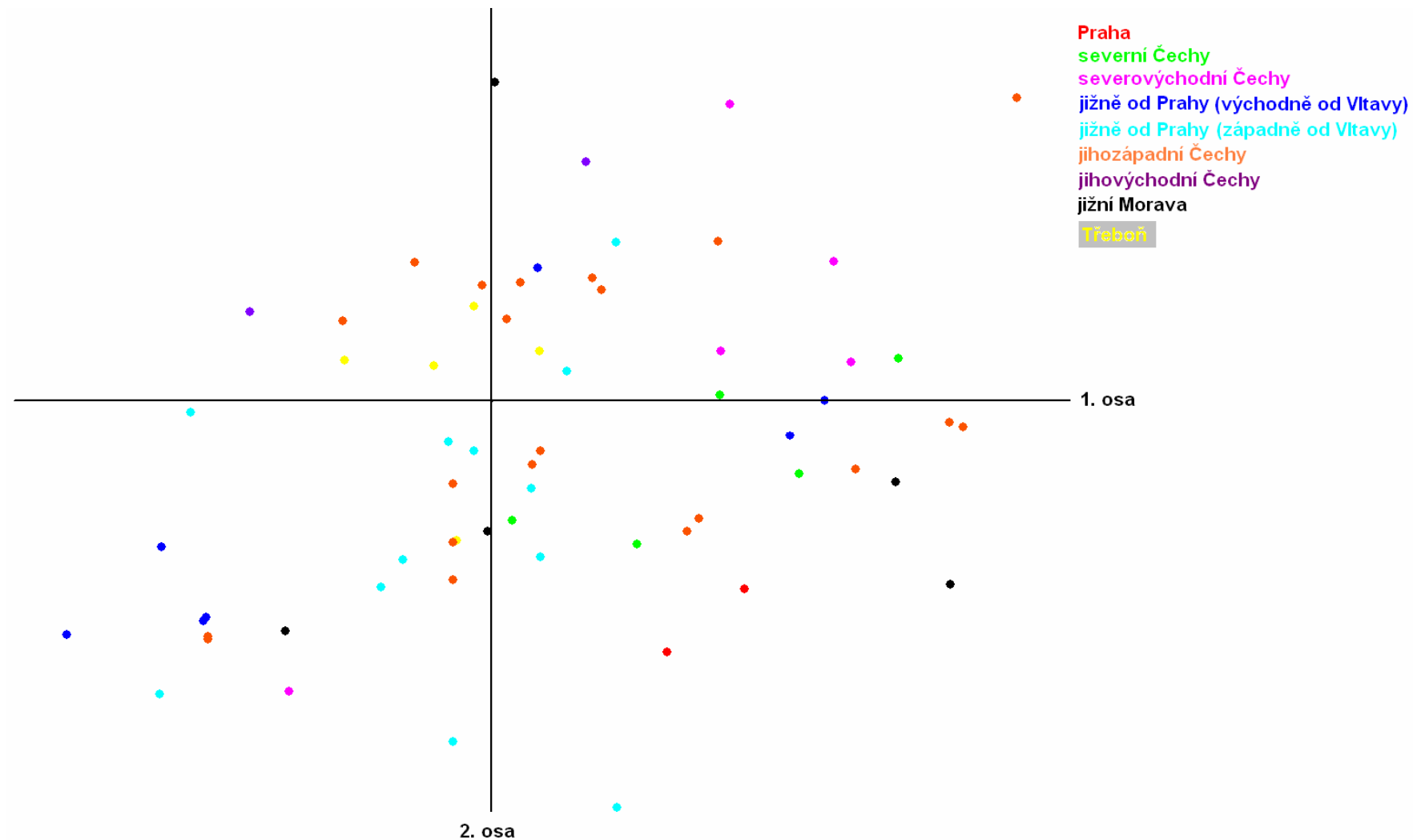
Diagramy pro populace *T. latifolia* (obr. č. 22) a *T. angustifolia* (obr. č. 23) ukazují podobné *pattern*, jaké je vidět na fylogenetických stromech pro oba druhy. Analýza hlavních koordinát neoddělila jednotlivé geografické oblasti do shluků, populace ze stejných geografických oblastí jsou rozptýlené. Na diagramu pro populace *T. latifolia* (obr. č. 22) je vidět slabý náznak oddělení skupiny populací nacházejících se jižně od Prahy východně od Vltavy (modrá barva). Podobně na diagramu pro populace *T. angustifolia* (obr. č. 23) se mírně odděluje skupina populací ze severovýchodních Čech (růžová barva). Skupina populací z Prahy (červená barva), která se jasně oddělila na fylogenetickém stromu, se zde vůbec neodděluje. Na diagramu pro populace *T. latifolia* vysvětluje první osa 25,5 % pozorované variability, druhá osa 17,6 % pozorované variability. Na diagramu pro populace *T. angustifolia* vysvětluje první osa 8,8 % pozorované variability a druhá osa 7,8 % pozorované variability.



Obr. č. 21: Analýza hlavních koordinát pro *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy v programu SYN-TAX 5.1, vizualizovaná v programu FAMD 1.30. Růžová barva znázorňuje *T. latifolia*, modrá *T. angustifolia*, červená F1 hybrida, zelená pokročilé hybridy a oranžová zpětné křížence. Červená šipka označuje jediného F1 hybrida. *T. latifolia* a *T. angustifolia* se jasně oddělují do dvou vzdálených skupin. Hybridy jsou rozptýleni mezi rodičovskými druhy a většina jich je blíže *T. angustifolia*, tři pokročilí hybridy a jeden zpětný kříženec se ale nachází u *T. latifolia*. Jediný F1 hybrid se nachází přímo ve shluku *T. angustifolia*. První osa vysvětluje 42,9 % pozorované variability, druhá osa 4,1 % pozorované variability.



Obr. č. 22: Analýza hlavních koordinát pro *T. latifolia* v programu SYN-TAX 5.1, vizualizovaná v programu FAMD 1.30. Jednotlivé geografické oblasti nevytváří shluky, populace ze stejných geografických oblastí jsou různě rozptýlené. Slabý náznak oddělení skupiny populací je vidět u populací nacházejících se jižně od Prahy východně od Vltavy (modrá barva). První osa vysvětluje 25,5 % pozorované variability, druhá osa 17,6 % pozorované variability.

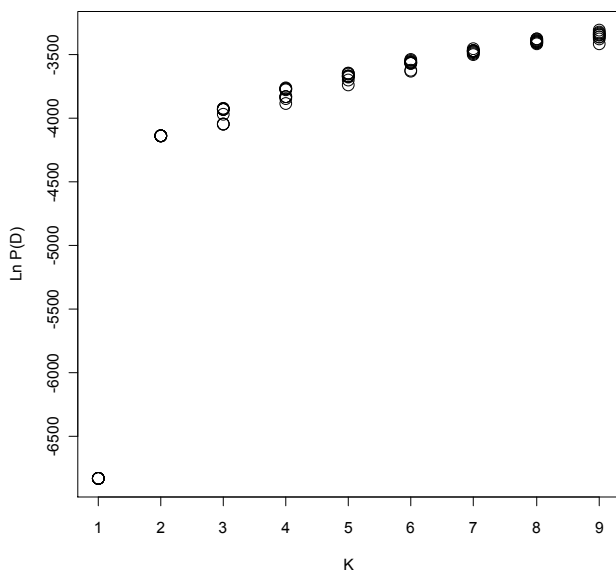


Obr. č. 23: Analýza hlavních koordinát pro *T. angustifolia* v programu SYN-TAX 5.1, vizualizovaná v programu FAMD 1.30. Jednotlivé geografické oblasti opět nevytváří shluky, populace ze stejných geografických oblastí jsou různě rozptýlené. Slabý náznak oddělení skupiny populací je vidět u populací nacházejících se v severovýchodních Čechách (ružová barva). První osa vysvětluje 8,8 % pozorované variability, druhá osa 7,8 % pozorované variability.

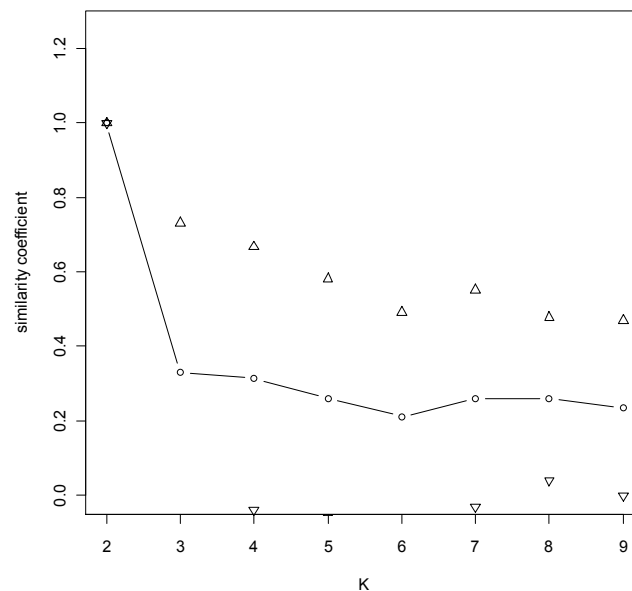
4.4.4 Zjišťování genetické struktury v programu Structure 2.3.3

Program Structure 2.3.3 a následná analýza výstupů pomocí skriptu Structure-sum-2009.r (Ehrich et al. 2007) podpořila jako nejlepší rozdělení všech jedinců do dvou skupin ($K = 2$). Při pohledu na obrázek č. 24, který znázorňuje zlogaritmovanou pravděpodobnost modelu ($\ln P(D)$) se vzrůstajícím počtem skupin (K), je patrné, že v případě počtu dvou skupin ($K = 2$) dochází v tomto bodě k narovnávaní křivky. Další graf (obr. č. 25) znázorňuje podobnost mezi jednotlivými běhy algoritmu pro dané K (Nordborg et al. 2005). Nejvyšší koeficient podobnosti (1) má pouze $K = 2$ a všechny běhy konvergují k jednomu řešení pouze při rozdělení do dvou skupin. Třetí graf (obr. č. 26) znázorňuje tzv. deltaK (Evano et al. 2005), které je jednoznačně nejvyšší pro $K = 2$.

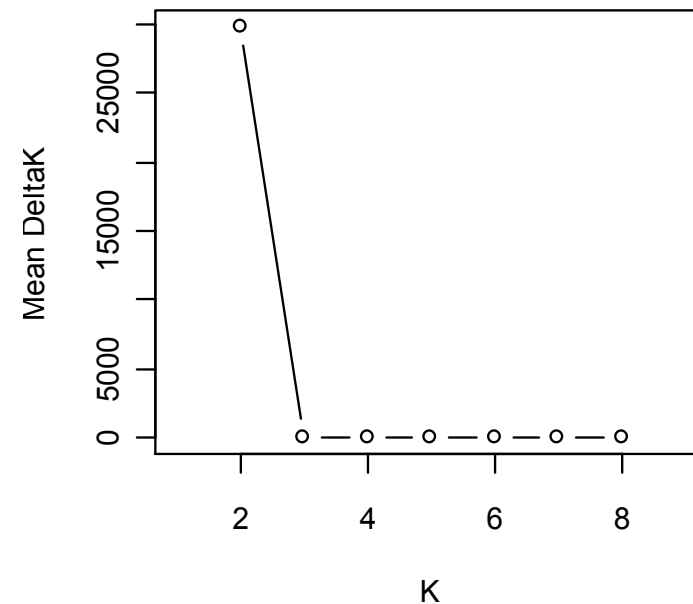
Grafické znázornění rozřazení jedinců do skupin je vidět na sloupcovém diagramu na obrázku č. 27. Čistí jedinci vytvořili jasně oddělené skupiny odpovídající počtu $K = 2$ – skupinu *T. latifolia* (růžová barva) a skupinu *T. angustifolia* (modrá barva). Jedinci byli do těchto skupin přiřazeni s 99,8% pravděpodobností. Hybridi vytvořili třetí přechodnou skupinu. Do této skupiny byli zařazeni hybridy, kteří měli určitou pravděpodobnost pro zařazení do skupiny *T. latifolia* a zároveň určitou pravděpodobnost pro zařazení do skupiny *T. angustifolia*. Byli sem ale zařazeni i hybridy, kteří měli 99,2% pravděpodobnost pro zařazení do skupiny *T. latifolia* nebo *T. angustifolia*. Jedná se o jedince č. 325, 409, 410, 405, 195, 203, 125, 154, 156, 157, 159, 209, 210, 211, 228, 232, 233, 282, 284, 285, 526 a 527. Tito hybridy mají jen jednu nebo dvě alely od *T. latifolia* nebo *T. angustifolia*. I přesto ale byli zařazeni mezi hybridy a v diagramu se jeví jako téměř celý růžový nebo téměř celý modrý sloupeček ve skupině hybridy.



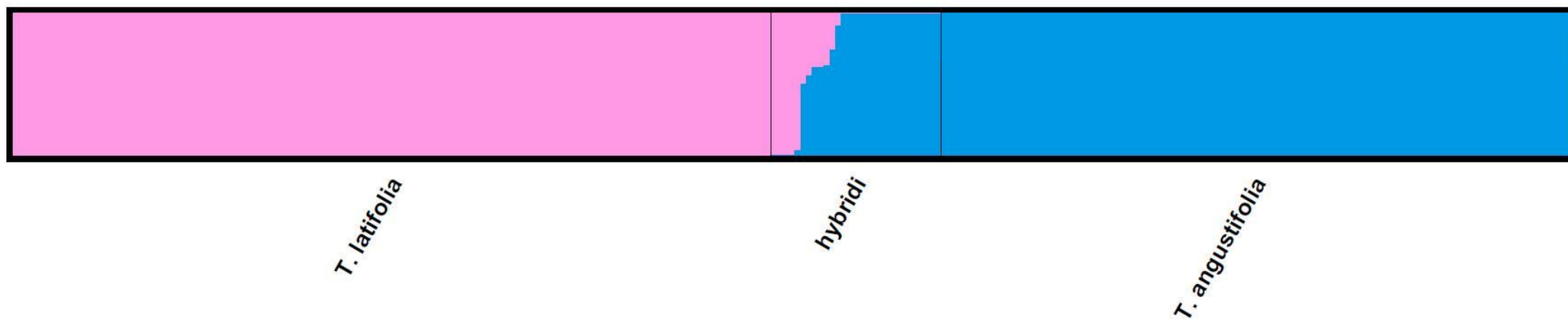
Obr. č. 24: Pravděpodobnost modelu ($\text{Ln}P(D)$) se vzrůstajícím počtem skupin (K). Na ose x jsou určené počty skupin, na ose y logaritmus pravděpodobnosti modelu. Ideální počet skupin je 2 ($K = 2$), protože v tomto bodě dochází k narovnávaní křivky. Výstup analýzy z programu Structure 2.3.3 zpracovaný pomocí skriptů Structure-sum-2009.r.



Obr. č. 25: Podobnost mezi jednotlivými běhy algoritmu pro dané K . Na ose x jsou určené počty skupin, na ose y koeficient podobnosti. Jako nejlepší vychází rozdělení do dvou skupin ($K = 2$), protože má nejvyšší koeficient podobnosti (1) a všechny běhy konvergují k jednomu řešení. Výstup analýzy z programu Structure 2.3.3 zpracovaný pomocí skriptů Structure-sum-2009.r.



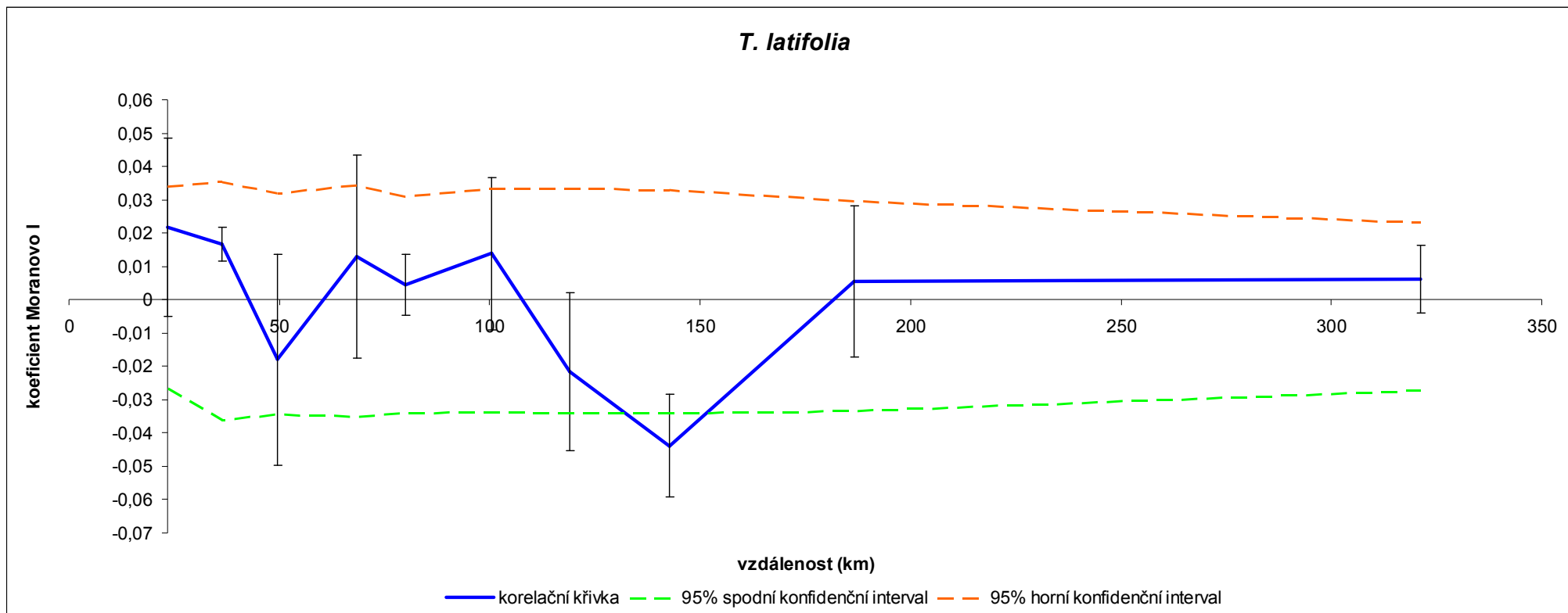
Obr. č. 26: Optimální počet klastrů. Na ose x jsou určené počty skupin, na ose y deltaK. Nejlepší rozdělení jedinců je do dvou skupin ($K = 2$), protože má nejvyšší deltaK. Výstup analýzy z programu Structure 2.3.3 zpracovaný pomocí skriptů Structure-sum-2009.r.



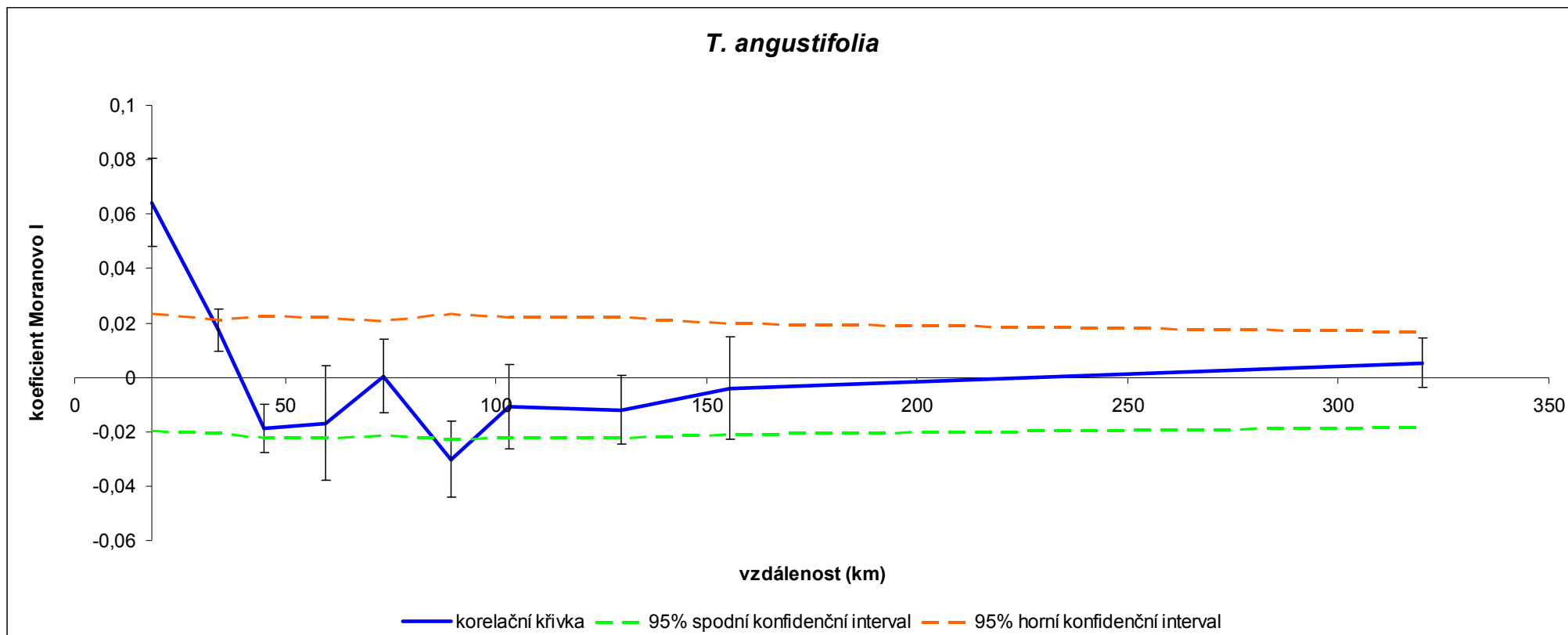
Obr. č. 27: Vizualizace nejlepšího modelu rozřazení jedinců do skupin podle genetické podobnosti z programu Structure 2.3.3 v programu Distruct. Poměr barev ve sloupci odpovídá pravděpodobnosti příslušnosti daného jedince do dané skupiny. Dochází k jasnému oddělení skupiny *T. latifolia* a skupiny *T. angustifolia* a mezi těmito skupinami se oddělila přechodná skupina hybridů.

4.4.5 Analýza prostorové autokorelace

Slabá genetická podobnost mezi jedinci byla nalezena pouze u druhu *T. angustifolia* a to pouze uvnitř populací, dále není korelace genetické a geografické vzdálenosti signifikantní (obr. č. 29). U druhu *T. latifolia* není korelace genetické a geografické vzdálenosti vůbec signifikantní, ani uvnitř populací (obr. č. 28). Není tedy možné říci, zda si jedinci z blízkých populací geneticky podobní. V tabulce č. 22a a 22b jsou zaznamenány souhrnné výstupy analýzy.



Obr. č. 28: Prostorová autokorelace 99 vzorků *T. latifolia* z celé České republiky. Na ose *x* je vzdálenost v km, na ose *y* je korelační koeficient Moranovo I. Modrá křivka znázorňuje korelaci mezi genetickou podobností a geografickou vzdáleností. U každého bodu je svislou čarou vyznačena standardní chyba koeficientu vzdálenosti odhadnutá procedurou *jackknife* (15 000 opakování). Oranžová a zelená křivka znázorňují konfidenční intervaly. Vzdálenostní třídy pro *T. latifolia* jsou uvedené v tabulce č. 22a. Korelace mezi jedinci *T. latifolia* není signifikantní, ani uvnitř populací.



Obr. č. 29: Prostorová autokorelace 68 vzorků *T. angustifolia* z celé České republiky. Na ose x je vzdálenost v km, na ose y je korelační koeficient Moranovo I. Modrá křivka znázorňuje korelaci mezi genetickou podobností a geografickou vzdáleností. U každého bodu je svislou čarou vyznačena standardní chyba koeficientu vzdálenosti odhadnutá procedurou *jackknife* (15 000 opakování). Oranžová a zelená křivka znázorňují konfidenční intervaly. Vzdálenostní třídy pro *T. angustifolia* jsou uvedené v tabulce č. 22b. Korelace mezi jedinci *T. angustifolia* je signifikantní pouze uvnitř populací, dále je korelace nesignifikantní.

Tab. č. 22a a 22b: Souhrnné tabulky s výstupy autokorelační analýzy pro *T. latifolia* a *T. angustifolia*. V analýze bylo použito 10 vzdálenostních tříd a pro každou třídu byl spočítán párový koeficient Moranovo I. Maximální vzdálenosti jsou udávány jako přímé geografické vzdálenosti v km. Nejmenší vzdálenostní třída pokrývá vnitropopulační úroveň. V každé tabulce je pro každou vzdálenostní třídu dále uveden počet párů, průměrná vzdálenost, střední chyba odhadu odhadnutá metodou *jackknife* přes lokusy a *p*-hodnota odhadnutá permutacemi. Korelace mezi genetickou a geografickou vzdáleností je u obou druhů nesignifikantní. Slabá korelace je pouze u druhu *T. angustifolia* uvnitř populací, dále je korelace genetické a geografické podobnosti nesignifikantní.

Tab. č. 22a

<i>T. latifolia</i>										
vzdálenostní třídy	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
maximální vzdálenost (km)	23,4	36,4	49,5	68,4	79,9	100,4	119,1	142,6	186,6	321,1
počet párů	568	428	484	463	484	491	482	481	487	483
průměrná vzdálenost (km)	11,4	30,3	45	59,5	75,4	90,7	109,4	132,2	156,6	238,9
Moranovo I	0,0163	0,0160	-0,0150	0,0165	0,0052	0,0153	-0,0177	-0,0453	0,0027	0,0050
střední chyba odhadu (SE)	0,0268	0,0052	0,0317	0,0304	0,0090	0,0227	0,0237	0,0154	0,0227	0,0101
<i>p</i> -hodnota	0,1749	0,3402	0,2700	0,4466	0,7735	0,4015	0,2009	0,0167	0,7182	0,6331

Tab. č. 22b

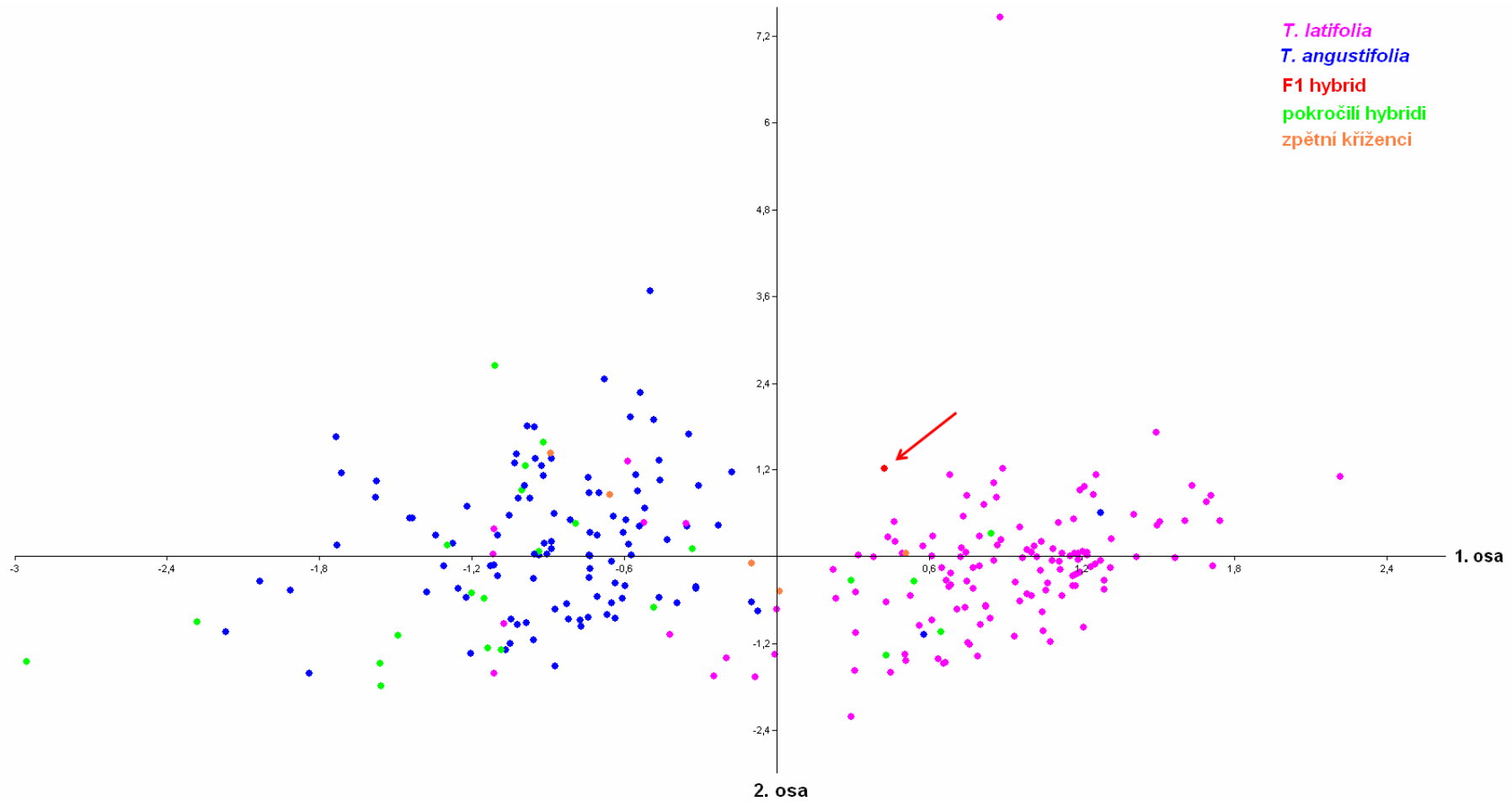
<i>T. angustifolia</i>										
vzdálenostní třídy	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
maximální vzdálenost (km)	18,2	34,2	45,1	59,7	73,3	89,3	103,2	129,7	155,4	319,9
počet párů	229	249	211	229	238	213	225	233	229	222
průměrná vzdálenost (km)	8,1	26,3	40,0	52,4	68,2	81,1	97,0	118,0	142,3	206,6
Moranovo I	0,0647	0,0175	-0,0188	-0,0173	0,0005	-0,0299	-0,0100	-0,0120	-0,0046	0,0051
střední chyba odhadu (SE)	0,0162	0,0077	0,0089	0,0211	0,0134	0,0141	0,0155	0,0126	0,0188	0,0092
<i>p</i> -hodnota	0,0000	0,0950	0,1015	0,1367	0,9672	0,0090	0,3354	0,2796	0,6683	0,5610

4.5 Statistické vyhodnocení morfologických dat

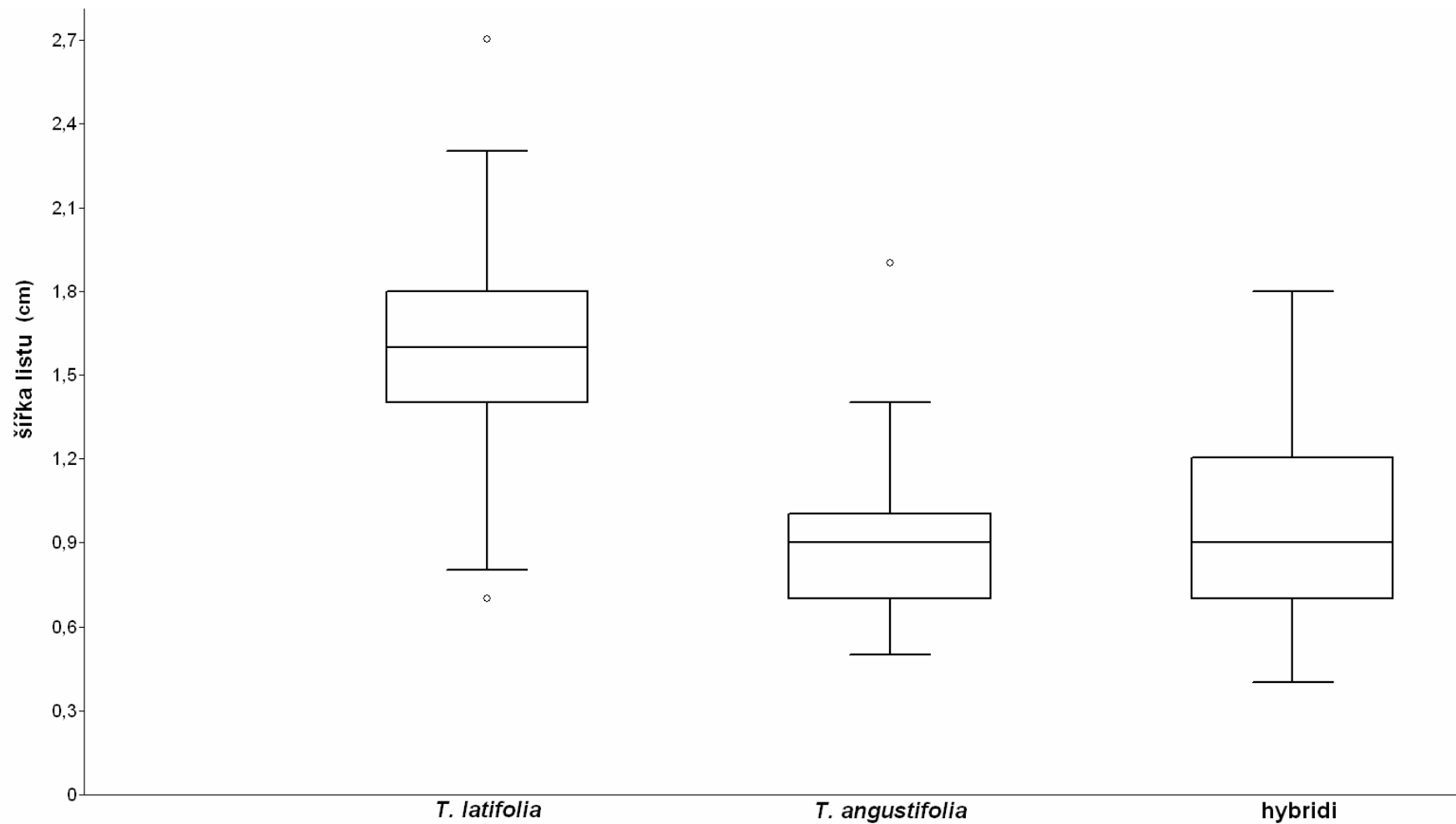
4.5.1 Analýza hlavních komponent (PCA)

Na základě 7 morfologických znaků a poměrů délka/šířka samičí palice a délka/šířka nejdelšího listu se poměrně dobře oddělují 2 skupiny – *T. latifolia* (růžová barva) a *T. angustifolia* (modrá barva) (obr. č. 30). Pokročilí hybridní kříženci netvoří žádný shluk a jsou rovnoměrně rozptýleni mezi jedinci *T. latifolia* a *T. angustifolia*, více hybridů je však ve shluku *T. angustifolia*. Jediný F1 hybrid se nachází mimo shluky obou rodičovských druhů. První osa vyjadřuje 41,7 % variability, druhá osa 28,3 % variability.

Na obrázku č. 31 je zobrazen krabicový graf znázorňující rozpětí šířky listů u *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridů. Je patrné, že *T. angustifolia* a hybridy se v šířce listu značně překrývají, zatímco *T. latifolia* se s *T. angustifolia* a hybridy překrývá jen mírně. Mírné odlišení *T. latifolia* od *T. angustifolia* a hybridů je signifikantní ($p < 0,01$). Dalších 6 krabicových grafů pro zbylých 6 znaků je vidět v příloze č. 5 (obr. č. 32 – 37). Na grafech znázorňujících rozpětí průměru stonků (obr. č. 32), rozpětí délky mezer mezi palicemi (obr. č. 33) a rozpětí šířky samičích palic (obr. č. 34) je vidět podobné *pattern* jako na grafu pro rozpětí šířky listů – u druhu *T. angustifolia* a hybridů se tyto znaky značně překrývají, ale *T. latifolia* se s nimi překrývá jen mírně. Tento rozdíl mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* a *T. latifolia* a hybridy je opět signifikantní ($p < 0,01$). Rozpětí délky nejdelších listů (obr. č. 35) a rozpětí výšky lodyh (obr. č. 36) se u všech tří druhů přerývá, nicméně mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* je nepatrný rozdíl, který je signifikantní ($p < 0,01$). Hybridy se v těchto znacích překrývají s oběma rodičovskými druhy. Na grafu znázorňujícím rozpětí délky samičích palic (obr. č. 37) můžeme vidět, že všechny tři druhy se v tomto znaku značně překrývají a není mezi nimi signifikantní rozdíl ($p > 0,01$). Tabulka s p -hodnotami pro každý znak a pro každou dvojici (tab. č. 23) je v příloze č. 5. Z tabulky jasně vyplývá, že *T. latifolia* a *T. angustifolia* se ve všech znacích, kromě délky samičí palice, signifikantně odlišují a že hybridy se ve čtyřech znacích signifikantně odlišují od *T. latifolia*, ale od *T. angustifolia* se signifikantně neodlišují.



Obr. č. 30: Analýza hlavních komponent 7 morfologických znaků a poměrů délka/šířka samičí palice a délka/šířka nejdelšího listu pro 130 jedinců *T. latifolia*, 108 jedinců *T. angustifolia*, 23 pokročilých hybridů, 5 zpětných kříženců a 1 F1 hybrida v programu PAST. Rodičovské druhy a hybridy byli určeni na základě mikrosatelitové analýzy. Růžová barva znázorňuje *T. latifolia*, modrá *T. angustifolia*, červená F1 hybrida, zelená pokročilé hybridy a oranžová zpětné křížence. Červená šipka označuje jediného F1 hybrida. *T. latifolia* a *T. angustifolia* se oddělují do dvou skupin, pokročilí hybridy a zpětní kříženci nevytváří žádný shluk, ale jsou rozptýleni mezi jedinci *T. latifolia* a *T. angustifolia*. Jediný F1 hybrid se nachází mimo shluky rodičovských druhů. První osa vyjadřuje 41,7 % variability, druhá osa 28,3 % variability.

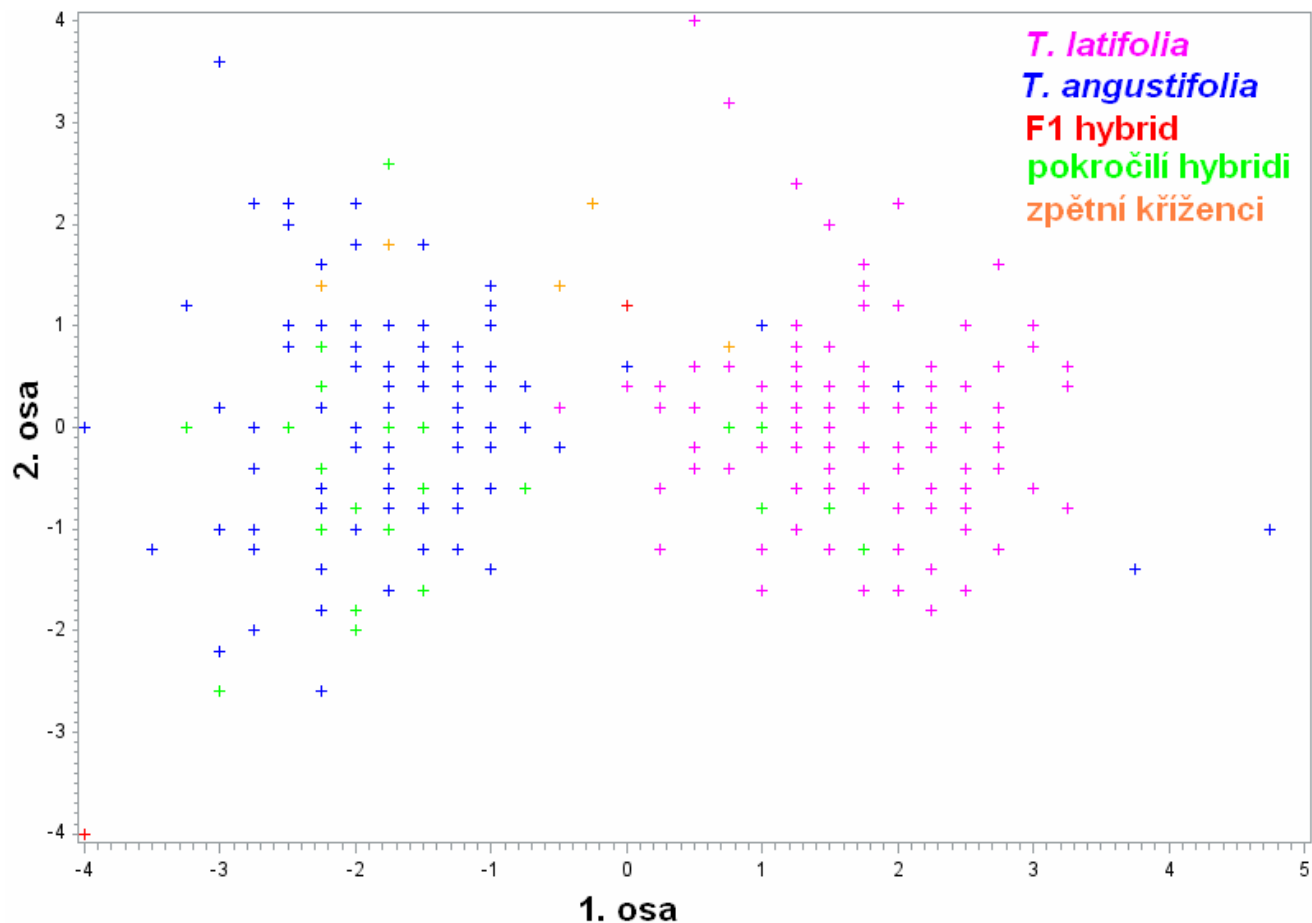


Obr. č. 31: Krabicový graf znázorňující rozpětí šířky listů u *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridů. Na ose *x* jsou *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridy, osa *y* znázorňuje šířku listu. Prázdné body znázorňují odlehlé hodnoty znaků, vodorovná čára v krabici znázorňuje medián hodnoty znaku a anténa znázorňuje maximální a minimální hodnoty znaku. U *T. angustifolia* a hybridů se šířka listů značně překrývá, zatímco *T. latifolia* se s *T. angustifolia* a hybridy překrývá mírně. Toto odlišení *T. latifolia* od *T. angustifolia* a hybridů je signifikantní ($p < 0,01$).

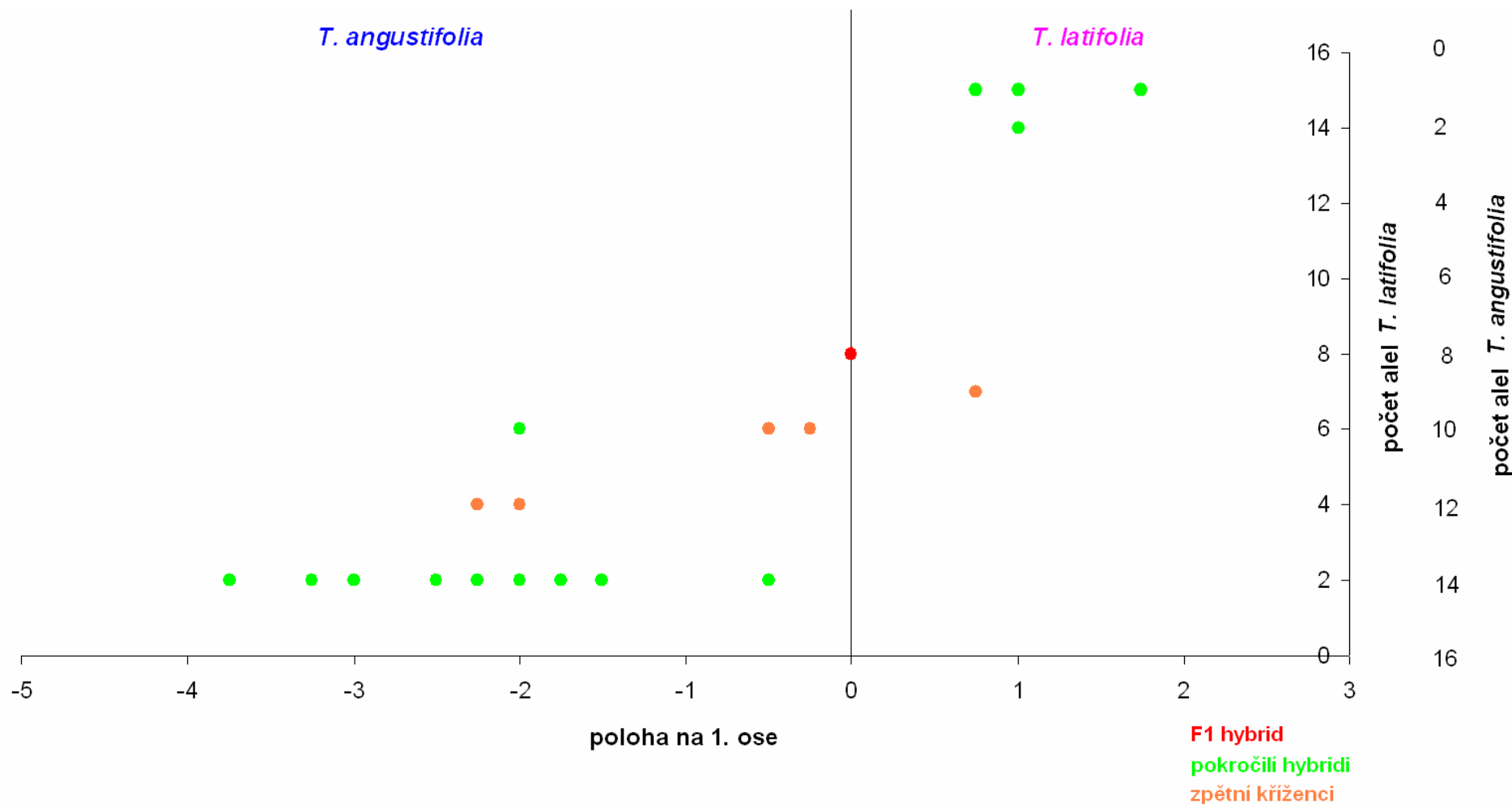
4.5.2 Lineární diskriminační analýza (LDA)

Diskriminační analýza, podobně jako analýza hlavních komponent, poměrně dobře odděluje 2 skupiny – *T. latifolia* (růžová barva) a *T. angustifolia* (modrá barva) (obr. č. 38). Oddělení skupin je ale jasnější než v analýze hlavních komponent. Pokročilí hybridní a zpětní kříženci opět nevytváří kompaktní shluk, ale jsou poměrně rovnoměrně rozptýleni mezi shluky *T. latifolia* a *T. angustifolia*, ačkoliv více hybridů je ve shluku *T. angustifolia*. Jediný F1 hybrid se nachází přesně mezi shluky rodičovských druhů. První osa vyjadřuje 99 % pozorované variability, druhá osa 1 % pozorované variability. Skupiny se tedy oddělují podle první osy. Nejlepší znaky pro oddělení skupin jsou poměr délka/šířka nejdelšího listu (95,9 %), šířka nejdelšího listu (87,9 %), šířka samičí palice (80,7 %) a délka mezery mezi palicemi (74,7 %). Jedná se o charakteristické morfologické znaky udávané ve flórách pro rozlišení druhů *T. latifolia* a *T. angustifolia* (tab. č. 1, kapitola 2.6 Morfologie *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca*).

Alelické složení pravděpodobně ovlivňuje morfologický vzhled hybridů. Pokročilí hybridní a zpětní kříženci, kteří mají více alel od druhu *T. latifolia*, se podobají více tomuto druhu a nachází se ve shluku *T. latifolia* (růžová barva), naopak pokročilí hybridní a zpětní kříženci, kteří mají více alel od druhu *T. angustifolia*, se podobají více tomuto druhu a nachází se ve shluku *T. angustifolia* (obr. č. 39). F1 hybrid má polovinu alel od *T. latifolia* a polovinu alel *T. angustifolia* a nachází se přesně mezi těmito dvěma shluky.



Obr. č. 38: Diskriminační analýza 7 morfologických znaků a poměrů délka/šířka samičí palice a délka/šířka nejdelšího listu pro 126 jedinců *T. latifolia*, 101 jedinců *T. angustifolia*, 23 pokročilých hybridů, 5 zpětných kříženců a 1 F1 hybridu v programu SAS 9.3. Rodičovské druhy a hybridy byli určeni na základě mikrosatelitové analýzy. Růžová barva znázorňuje *T. latifolia*, modrá *T. angustifolia*, červená F1 hybridu, zelená pokročilé hybridy a oranžová zpětné křížence. *T. latifolia* a *T. angustifolia* se oddělují do dvou jasných skupin. Pokročilí hybridy a zpětní kříženci nevytváří žádný shluk, ale jsou rozptýleni mezi jedinci *T. latifolia* a *T. angustifolia*. Jediný F1 hybrid se nachází přesně mezi shluky rodičovských druhů. Hybridy ve shluku *T. latifolia* mají více alel tohoto druhu a podobají se více tomuto druhu, hybridy ve shluku *T. angustifolia* mají více alel tohoto druhu a podobají se více tomuto druhu. První osa vyjadřuje 99 % pozorované variability, druhá osa 1 % pozorované variability.



Obr. č. 39: Poloha hybridů v prostoru v diskriminační analýze a jejich alelické složení. Levá půlka grafu vymezuje shluk *T. angustifolia*, pravá půlka vymezuje shluk *T. latifolia*. Osa x představuje 1. osu, na ose y jsou počty alel od druhu *T. latifolia* a od druhu *T. angustifolia*. S rostoucím počtem alel *T. latifolia* a s klesajícím počtem alel *T. angustifolia* se pokročilí hybridi a zpětní kříženci podobají více druhu *T. latifolia* a nachází se v tomto shluku. Naopak s klesajícím počtem alel *T. latifolia* a rostoucím počtem alel *T. angustifolia* se pokročilí hybridi a zpětní kříženci podobají více druhu *T. angustifolia* a nachází se v tomto shluku. F1 hybrid s polovičním množstvím alel od *T. latifolia* a *T. angustifolia* se nachází v intermediární pozici mezi shluky.

5 Diskuze

Analýza mikrosatelitů se ukázala jako vhodná metoda pro odlišení druhů *T. latifolia* a *T. angustifolia* a k detekci hybridů. V 13 populacích bylo nalezeno celkem 29 jedinců, kteří měli hybridní *pattern*. Pomocí analýzy v programu Structure 2.3.3 se podařilo detekovat specifické alely pro *T. latifolia* a *T. angustifolia* a hybridi měli různou kombinaci rodičovských alel. Existence hybridů byla dále podpořena třemi statistickými přístupy. Sledováním fenologie kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* bylo zjištěno, že doba kvetení obou druhů se překrývá, což umožňuje mezidruhové křížení. Při kontrolovaném křížení v kultuře se podařilo získat hybridní semena, ale při klíčících pokusech se ukázalo, že jsou neživotaschopná.

5.1 Fenologie kvetení

V Severní Americe, pokud dochází k překryvu kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia*, se tyto druhy kříží za vzniku hybridu *T. ×glauca*. Hybridi pak kvetou ve stejnou dobu jako rodičovské druhy a mohou se dále křížit mezi sebou nebo zpětně křížit (Hyde 2005; Ball & Freeland 2013). Naopak pokud je kvetení oddělené nebo dochází k nepatrnému překrytí, k hybridizaci těchto druhů nedochází (Selbo & Snow 2004). Zdá se tedy, že fenologie kvetení funguje jako reprodukční izolační bariéra. Všechny tyto studie byly vypracovány na lokalitách v oblasti Velkých jezer, kde jsou velmi podobné klimatické podmínky (<http://cs.allmetsat.com/>). Geografická poloha tedy sama o sobě pravděpodobně nemá vliv na dobu kvetení. Je možné, že kvetení mohou ovlivňovat lokální podmínky na stanovišti, například množství živin, teplota vody či hloubka vody, zatím ale neexistuje žádná studie, která by se zabývala fenologií kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* a zároveň ekologií na stanovišti. Také je možné, že se mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* začínají na některých lokalitách vytvářet reprodukční izolační bariéry v podobě oddělené doby kvetení. *T. angustifolia* je v Severní Americe nepůvodním druhem (Stuckey & Salamon 1987; Ciotir et al. 2012) a při jeho zavlečení na kontinent pravděpodobně nebyly mezi *T. latifolia* a *T. angustifolia* vyvinuté reprodukční izolační bariéry, které by bránily mezidruhovému křížení. Protože se na některých lokalitách kvetení překrývá pouze krátce, *T. angustifolia* vykvetá daleko dříve než *T. latifolia* (Selbo & Snow 2004), je možné, že mezi druhy pomalu vznikají reprodukční izolační bariéry v podobě oddělené doby kvetení. Časem by mohlo dojít až k úplnému oddělení doby kvetení ve smíšených porostech, kdy by mezidruhová hybridizace nebyla vůbec možná.

Jak je vidět z grafů fenologie kvetení, na území České republiky se doba kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* úplně překrývá. Jelikož na území České republiky k hybridizaci dochází, ačkoliv ne příliš často, jak vyplývá z analýzy mikrosatelitů, fenologie kvetení pravděpodobně nefunguje jako reprodukční izolační bariéra. Oba druhy spolu na území Evropy, oproti Severní Americe, koexistují delší dobu. Navíc velmi často

vytváří smíšené porosty, jak je udáváno v řadě evropských flór, proto mají mezi sebou pravděpodobně vyvinuté nějaké jiné reprodukční izolační bariéry, než je oddělení doby kvetení, které brání hojnému mezidruhovému křížení a rozsáhlé introgresi, které pozorujeme v některých oblastech Severní Ameriky (Hotchkiss & Dozier 1949; Fassett & Calhoun 1952; Smith 1967; Lee 1975; Galatowitsch et al. 1999; Kuehn et al. 1999; Olson et al. 2009; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011). Zřejmě se jedná o nějaké postzygotické bariéry, které způsobují, že hybridní semena jsou ve většině případů neživotaschopná (viz dále).

Fenologii kvetení jsem sledovala na malém geografickém měřítku, pouze na čtyřech pražských lokalitách. Proto by bylo zajímavé sledovat kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* na širším geografickém měřítku v rámci celé České republiky a na více lokalitách, aby bylo jasné, zda se doba kvetení překrývá na celém území České republiky nebo zda je překryv zaznamenaný na pražských lokalitách ojedinělý a je ovlivněn lokálními ekologickými podmínkami.

Samičí květy *T. latifolia* i *T. angustifolia* vykvetly o několik dní dříve než květy samčí, což je v souladu s faktem, že je květenství označováno jako protogynní – samičí květy vykvétají o pár dní dříve než květy samčí (Smith 1967; Krattinger 1975). I v Severní Americe vykvétají samičí květy o pár dní dříve než květy samčí (Selbo & Snow 2004; Hyde 2005; Ball & Freeland 2013). Doba, po kterou samčí palice obou druhů spráší pyl, je v České republice i v Severní Americe přibližně stejná. V Severní Americe je pyl sprášen průměrně 10 dní (Hyde 2005), v České republice průměrně 7 dní, není zde tedy žádný výrazný rozdíl. Samičí květy obou druhů jsou fertilní v průměru 13 dní, tedy delší dobu než květy samčí. Žádná americká studie neuvádí, jak dlouho jsou samičí květy obou druhů fertilní, proto jsem tyto údaje nemohla porovnat. Nicméně se domnívám, že doba, kdy jsou samičí květy fertilní, bude podobná jako v České republice, protože u samčích květů není významný rozdíl.

5.2 Kontrolovaná křížení a klíčení semen z pokusných křížení

Při kontrolovaném křížení oběma směry i kontrolovaném samosprášení se téměř na všech samičích palicích *T. latifolia* i *T. angustifolia* vytvořila semena, kromě tří palic, které se během vývoje zdeformovaly a semena nevytvořily. Jelikož byly při pokusných kříženích všechny opylené palice zakryté papírovými sáčky, byly vystavené jiným podmínkám. Mohlo zde dojít k zapaření, také mohl být omezen přístup vzduchu k vyvíjejícím se semenům, proto se mohly palice zdeformovat a semena nevytvořit. Protože se semena vytvořila i na palicích, které byly opyleny pylem opačného druhu, zdá se, že prezygotické reprodukční izolační bariéry, které by bránily splývání gamet dvou odlišných druhů, zde nefungují a gamety dvou odlišných druhů spolu mohou splývat a mohou se tvořit hybridní semena. Po zasetí všech semen vyklíčila v klimaboxu pouze kontrolní semena vzniklá

samosprášením. Ačkoliv tedy hybridní semena vznikají, působí zde pravděpodobně nějaké postzygotické reprodukční izolační bariéry, díky kterým jsou hybridní semena neživotoschopná a neklíčí, a to i v případě semen, jejichž mateřským druhem je *T. angustifolia*. Naproti tomu v Severní Americe hybridní semena vzniklá kontrolovaným křížením v kultuře klíčí velmi úspěšně a dávají vznik hybridním semenáčkům *T. ×glauca* (Levy 2007). Jelikož kontrolní semena vyklíčila, je velmi nepravděpodobné, že by hybridní semena byla během pokusného křížení poškozena nebo že by pokusné podmínky byly nastaveny špatně, protože oba typy semen byly uchovávány a pěstovány ve stejných podmínkách. Bylo by proto zajímavé zjistit, co způsobuje neživotoschopnost hybridních semen, například zda dochází k degeneraci hybridního endospermu, který není schopen poskytnout výživu pro vyvíjející se semeno, nebo zda jsou rodičovské genomy v embryu inkompatibilní nebo je inkompatibilita mezi embryem a mateřským endospermem.

Analýza mikrosatelitů odhalila v populacích několik pokročilých hybridů a zpětných kříženců, jeden vzorek byl dokonce F1 hybrid. I když bylo těchto jedinců málo, evidentně malé procento hybridních semen může být životoschopné a dokáže vyklíčit. Na každé palici vzniká až 222 000 semen (Yeo 1964), což je ohromné množství, a je možné, že životoschopných hybridních semen je na palici jen pár. Ačkoliv jsem tedy zasetí hybridních semen opakovala 3x (celkem 30 semen z každé palice, dohromady 480 hybridních semen), je možné, že jsem při náhodném výběru opakovaně zasela zrovna ta semena, která nebyla životoschopná, a pro zachycení hybridů by bylo potřeba zasít daleko větší množství semen, protože frekvence vzniku životoschopných semen je velmi nízká.

Ze semen vzniklých samosprášením vyklíčilo u obou druhů pouze malé množství semen, pouhých 14 % (z každé palice z 10 zasetých semen přibližně 2 semena). To mohlo být způsobeno extrémní inbrední zátěží, protože samičí palice byly opyleny pylem ze stejného jedince. Klíčení dalších semen mohlo být navíc omezeno již rostoucími semenáčky, které klíčení dalších semen a růst dalších semenáčků inhibují (McNaughton 1968). V rámci pokusných křížení nebylo provedeno cizosprášení mezi jedinci stejného druhu, ale bylo provedeno pouze samosprášení stejných klonů. Cílem tohoto pokusu bylo získat životoschopná semena, která sloužila jako kontrola, zda nebyla semena při kontrolovaném křížení poškozena a zda byly následně v klimaboxu nastaveny správné teplotní a světelné podmínky. Studium rozmnožovacího systému (intenzita a možnosti selfingu) v rodě *Typha* nebylo cílem těchto pokusných křížení.

Mezi klíčením semen z *T. latifolia* a *T. angustifolia* jsem nepozorovala žádné rozdíly, semena obou druhů vyklíčila stejně rychle a přibližně ve stejném množství (2 z 10 zasetých semen). Naopak Levy (2005) pozorovala při svých pokusech s klíčením semen a pěstováním semenáčků *T. latifolia*, *T. angustifolia* a *T. ×glauca* v různých podmínkách vyšší klíčivost u *T. latifolia* oproti *T. angustifolia* i *T. ×glauca*.

5.3 Hybridizace *T. latifolia* a *T. angustifolia*

V Severní Americe dochází k rozsáhlé hybridizaci *T. latifolia* a *T. angustifolia* za vzniku invazního F1 hybridu *T. ×glauc*a (Hotchkiss & Dozier 1949; Fassett & Calhoun 1952; Smith 1967; Lee 1975; Galatowitsch et al. 1999; Kuehn et al. 1999; Olson et al. 2009; Snow et al. 2010; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011). Křížení je možné pouze pokud se u obou druhů překrývá doba kvetení (Hyde 2005; Ball & Freeland 2013). Pokud se doba kvetení nepřekrývá, nebo dochází jen k nepatrnému překrytí, k hybridizaci nedochází (Selbo & Snow 2004). F1 hybridy pak kvetou ve stejnou dobu jako rodičovské druhy, čímž je umožněno také zpětné křížení (Kuehn et al. 1999; Ball & Freeland 2013). Ve smíšených populacích převažují F1 hybridy, kteří v nich tvoří hojnou část (Kuehn et al. 1999; Selbo & Snow 2004; Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011) a kteří vznikají opakovaně (Travis et al. 2010; Kirk et al. 2011). Méně často se vyskytují pokročilí F2 hybridy a zpětní kříženci s oběma rodičovskými druhy (Smith 1967; Kuehn et al. 1999; Selbo & Snow 2004; Travis et al. 2010; Snow et al. 2010; Kirk et al. 2011), protože F1 hybridy jsou většinou sterilní (Smith 1967; Kuehn et al. 1999).

Analýza mikrosatelitů odhalila, že i na území České republiky se vyskytují hybridy a že i zde dochází k hybridizaci mezi druhy *T. latifolia* a *T. angustifolia*. Ale hybridizace není zdaleka tak častá jako v Severní Americe, kde hybridy tvoří značnou část ve smíšených populacích. Z celkového množství analyzovaných vzorků pouze 11 % vykazovalo hybridní *pattern*. Zdá se, že v českých populacích, narozdíl od amerických, převažují spíše pokročilí hybridy a zpětní kříženci. Pouze jeden vzorek byl jasný F1 hybrid, který měl v každém lokusu jednu alelu od *T. latifolia* a jednu od *T. angustifolia*, zbylí jedinci vykazovali různou kombinaci alel rodičovských druhů. K primární hybridizaci tedy dochází extrémně vzácně a F1 hybridů je v populacích málo. F1 hybridy jsou alespoň částečně fertily a pokud se v populacích dokáží udržet, pak se kříží mezi sebou a zpětně kříží s rodičovskými druhy za vzniku pokročilých hybridů a zpětných kříženců, kterých je v populacích většina. Sekundární hybridizace je tedy pravděpodobně hojnější než primární hybridizace.

Převážná většina hybridů byli pravděpodobní pokročilí hybridy (23 jedinců), pravděpodobní zpětní kříženci tvořili pouze malou část (5 jedinců). Všichni zpětní kříženci pak vznikli křížením F1 hybridů pouze s druhem *T. angustifolia*. V Severní Americe naopak převažují zpětní kříženci k *T. angustifolia* nad pokročilými hybridy (Kirk et al. 2011), což může souviset s tím, že F1 hybridy jsou většinou sterilní (Smith 1967; Kuehn et al. 1999), ale pokud tvoří funkční pyl (Hyde 2005), je pro ně příhodnější zkřížit se s jedním z rodičovských druhů, který je fertily. Protože v českých populacích byli detekováni převážně pokročilí hybridy, zdá se, že F1 hybridy se rozmnožují především mezi sebou nezávisle na rodičovských druzích a v populacích se pak vyskytují převážně pokročilí hybridy. Pro jasnější pochopení dynamiky hybridů v populacích by bylo potřeba

vrátit se do populací, kde byli hybridní detekováni, posbírat v nich daleko větší množství vzorků a podívat se, jakou část z populací hybridů tvoří a jaký typ hybridů se v populacích vyskytuje nejčastěji, a teprve pak bychom mohli přesněji usuzovat, jak často F1 hybridy vznikají a jak často se kříží mezi sebou a zpětně kříží s rodičovskými druhy.

K úplně odlišným výsledkům dospěli na Ukrajině (Tsyusko et al. 2005). Autoři také použili analýzu mikrosatelitů a ve smíšených populacích nedetekovali žádné hybridy. *T. latifolia* a *T. angustifolia* vytvořily na nezakořeněném stromu dvě jasně oddělené skupiny. Tato studie se ale zabývala především genetickou a klonální diverzitou v populacích *T. latifolia* a *T. angustifolia* a tomu odpovídal i sběr vzorků. Autoři vybírali k molekulárním analýzám jedince, kteří vypadali jako jasný druh *T. latifolia* nebo jasný druh *T. angustifolia*. Tím snížili pravděpodobnost odebrání vzorku z hybridního jedince, a právě proto možná nedetekovali žádné hybridy. Já jsem naopak odebírala vzorky z jedinců, kteří vypadali odlišně od *T. latifolia* a *T. angustifolia* a jejichž morfologické znaky byly intermediární mezi rodičovskými druhy, abych tak zvýšila pravděpodobnost, že odeberu vzorek z hybridního jedince. Je také možné, že na Ukrajině k hybridizaci *T. latifolia* a *T. angustifolia* nedochází, protože zde působí nějaké reprodukční izolační bariéry, které v České republice nefungují. Určitě by bylo zajímavé podívat se, zda je právě tím faktorem, který brání mezidruhovému křížení *T. latifolia* a *T. angustifolia* na Ukrajině, oddělená doba kvetení, která v České republice jako reprodukční bariéra nefunguje, nebo nějaký jiný typ reprodukčních izolačních bariér.

Fakt, že i na území České republiky dochází k hybridizaci *T. latifolia* a *T. angustifolia*, je také podpořen nezakořeněným stromem vytvořeným metodou Neighbor-joining (Saitou & Nei 1987), výsledky z analýzy hlavních koordinát (PCoA) a výsledky z analýzy v programu Structure 2.3.3. Na stromu i na diagramu z analýzy hlavních koordinát je také vidět, že hybridní jedinci jsou většinou blíže druhu *T. angustifolia* a zdá se tedy, že hybridy jsou více podobní spíše tomuto druhu. To může souviset s tím, že mateřským druhem hybridů, stejně jako v Severní Americe (Kuehn et al. 1999; Ball & Freeland 2013), je druh *T. angustifolia*. V rámci diplomové práce ale nebyla udělána analýza chloroplastového haplotypu (viz Kuehn et al. 1999), která by potvrdila, že i u hybridních jedinců nalezených na území České republiky je mateřským druhem *T. angustifolia*. Nelze tedy s jistotou konstatovat, že podobnost hybridních jedinců spíše s druhem *T. angustifolia* je dána tím, že je to jejich mateřský druh. Pět pokročilých hybridů se také odděluje v blízkosti skupiny *T. latifolia*. Na stromu jsou to pokročilí hybridy, kteří mají většinu alel od druhu *T. latifolia* a jen dvě alely od druhu *T. angustifolia*. Na diagramu analýzy hlavních koordinát jsou to naopak dva pokročilí hybridy a jeden zpětný kříženec, kteří mají více alel od druhu *T. angustifolia*, což je zvláštní. Je to možná způsobené tím, že alely, které mají od druhu *T. latifolia*, se u tohoto druhu vyskytují nejčastěji. Kirk et al. (2011) provedli se stejnými daty (matice genetických vzdáleností ze 7 mikrosatelitových lokusů) analýzu hlavních komponent (PCA) a i tato analýza velmi

jasně odlišila 3 skupiny – *T. latifolia*, *T. angustifolia* a F1 hybridy. Rodičovské druhy se oddělují podle první osy do dvou vzdálených skupin a F1 hybridy tvoří třetí skupinu mezi nimi. Pokročilí hybridy a zpětní kříženci jsou rovnoměrně rozptýleni mezi těmito třemi skupinami.

Nejjasnější důkaz o hybridizaci *T. latifolia* a *T. angustifolia* ukázala analýza v programu Structure 2.3.3. Program na základě dat z analýzy mikrosatelitů jasně oddělil *T. latifolia* a *T. angustifolia* do dvou skupin ($K = 2$) a jedinci, kteří vykazovali hybridní *pattern*, měli namíchanou pravděpodobnost příslušnosti do jedné nebo druhé skupiny. Více hybridů je opět podobných spíše druhu *T. angustifolia*, což může souviset s tím, že *T. angustifolia* je mateřským rodičem hybridů (viz výše). K úplně stejným výsledkům dospěli i Snow et al. (2010). *T. latifolia* a *T. angustifolia* se jim také oddělily do dvou skupin ($K = 2$) a hybridy měli namíchanou pravděpodobnost příslušnosti do jedné nebo druhé skupiny. Většina hybridů je pak podobná spíše druhu *T. angustifolia*. Je tedy zcela jasné, že jedinci ze třetí skupiny, kteří nebyli zařazeni k *T. latifolia* ani k *T. angustifolia*, jsou hybridy, neboť i v Severní Americe se hybridy vyčleňují do samostatné skupiny.

Jak je vidět na mapce s populacemi, ve kterých byly odebrány vzorky, hybridy se nachází v populacích v různých geografických oblastech České republiky, takže hybridizace není vázána na určitou oblast. Většina hybridů se pak vyskytuje ve smíšených populacích, ale čtyři hybridy byli nalezeni v populacích jen s *T. angustifolia*. Je možné, že hybridní semena vznikla v jiné populaci, kde se vyskytovaly oba rodičovské druhy, a že byla větrem zanesena do populace jen s druhem *T. angustifolia*, kde se uchytila. Šíření semen pomocí větru na velké vzdálenosti je totiž velmi efektivní (Smith 1967; Krattinger 1975). Druhou možností je, že v populaci jen s druhem *T. angustifolia* se vyskytoval dříve i druh *T. latifolia* a hybridní jedinci vznikli právě v této době a byli schopní se na tomto stanovišti lépe udržet než druh *T. latifolia*.

5.4 Morfologie *T. latifolia*, *T. angustifolia* a hybridů

Druhy *T. latifolia* a *T. angustifolia* se jednoznačně oddělují i na základě morfologických znaků, ale oddělení hybridů, definovaných na základě analýzy mikrosatelitů, již není tolik patrné. To je způsobené zřejmě tím, že hybridy jsou morfologicky velmi variabilní a často se svými znaky překrývají s rodičovskými druhy (Hotchkiss & Dozier 1949; Fassett & Calhoun 1952; Smith 1967; Kuehn et al. 1999; Kuehn & White 1999; Olson et al. 2009). To je vidět i na krabicových grafech pro každý změřený morfologický znak, kdy se hybridy rozpětím svých znaků překrývají s jedním nebo s oběma rodičovskými druhy, zatímco rodičovské druhy se od sebe více či méně odlišují a tato odlišnost je signifikantní.

V analýze hlavních komponent (PCA) i v lineární diskriminační analýze (LDA) vytváří rodičovské druhy dva jasně oddělené shluky, zatímco pokročilí hybridy a zpětní kříženci jsou poměrně rovnoměrně rozptýleni mezi nimi, ačkoliv většina se jich nachází ve

shluku *T. angustifolia*. Pouze jediný nalezený F1 hybrid se zobrazil v obou analýzách přesně v intermediární pozici mezi rodičovskými druhy. Stejně rozdělení pozorovali i Snow et al. (2010), kteří použili pouze lineární diskriminační analýzu. *T. latifolia* a *T. angustifolia* se oddělily do dvou vzdálených skupin a v intermediární pozici mezi rodičovskými druhy se oddělila skupina F1 hybridů a skupina pokročilých hybridů, kteří jsou opět blíže druhu *T. angustifolia*, protože je to jejich mateřský druh. Zpětní kříženci se pak překrývají s F1 hybridy a s tím rodičovským druhem, se kterým se zpětně zkřížili. F1 hybridy jsou tedy v morfologických znacích intermediární mezi rodičovskými druhy a zpětní kříženci se podobají více tomu rodičovskému druhu, se kterým se zpětně zkřížili.

Zdá se, že morfologický vzhled hybridů je ovlivněn jejich alelickým složením, které určuje, jak budou hybridy vypadat. Hybridy, kteří mají více alel od druhu *T. latifolia*, vypadají více jako tento druh, a hybridy, kteří mají více alel od druhu *T. angustifolia*, vypadají naopak více jako tento druh. F1 hybridy, kteří mají přesně polovinu alel *T. latifolia* a polovinu alel *T. angustifolia*, jsou pak morfologicky intermediární mezi oběma rodičovskými druhy.

Do diskriminační analýzy jsem zahrnula lehce odlišné morfologické znaky, než které použili Snow et al. (2010), protože rozdělení na základě jejich znaků nebylo u českých rostlin tak jasné. To může být způsobené drobnými morfologickými odlišnostmi mezi severoamerickými a českými rostlinami. Například rostliny *T. angustifolia* ze střední Evropy jsou oproti severoamerickým rostlinám velmi robustní, s širokými listy i palicemi (R. Wildová, ústní sdělení). Nicméně nejlepším znakem pro oddělení jednotlivých skupin jak v Severní Americe, tak v České republice, se ukázal být poměr šířky a délky listu, který Snow et al. (2010) navíc zlogaritovali. Nicméně rozlišení hybridů od rodičovských druhů pouze na základě jednoho znaku nemusí být spolehlivé a pro přesné určení hybridů je vždy nutné použít molekulární analýzu mikrosatelitů.

5.5 Alely detekované u *T. latifolia* a *T. angustifolia*

Celkem jsem detekovala 103 alel, z toho bylo 81 alel *T. angustifolia* a jen 22 alel *T. latifolia*. Tsyusko et al. (2005) také detekovali větší množství alel u druhu *T. angustifolia* (123 alel) a menší množství u druhu *T. latifolia* (52 alel). Rozdílné množství alel může souviset s tím, že primery pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů byly původně vyvinuty pro druh *T. angustifolia* (Tsyusko-Omeltchenko et al. 2003) a jejich cross-amplifikace u *T. latifolia* s sebou nese sníženou variabilitu a díky možnému výskytu nulových alel i sníženou heterozygositu (Weising et al. 2005). Rozdílné množství alel ale může také souviset se způsobem rozmnožování těchto druhů. U obou druhů se v rozdílné míře uplatňuje cizosprášení i samosprášení (Smith 1967; Krattinger 1975). U *T. latifolia* se uplatňuje více samosprášení, protože samčí a samičí palice jsou blíže u sebe nebo se přímo dotýkají, proto je větší pravděpodobnost, že pyl uvolněný ze samčí

palice dopadne na samičí palici stejného jedince. Navíc *T. latifolia* produkuje pyl v tetrádách, takže je těžší než pyl uvolňovaný v monádách a padá přímo na samičí květenství. Naopak *T. angustifolia* má mezi samčí a samičí palicí mezeru a pyl uvolňuje v monádách, takže pyl je lehčí a udrží se déle ve vzduchu, čímž se snižuje pravděpodobnost samosprášení a zvyšuje pravděpodobnost cizosprášení (Krattinger 1975). Větší počet alel detekovaných na Ukrajině je navíc ovlivněn větším počtem nasbíraných a analyzovaných vzorků. V Severní Americe je počet detekovaných alel pro *T. latifolia* podobný jako v Evropě (21 alel), ale počet detekovaných alel *T. angustifolia* je oproti Evropě výrazně menší (21) (Snow et al. 2010). Autoři sice použili jen 7 primerů (nepoužili primer TA15), nicméně menší počet alel je pravděpodobně ovlivněn jiným faktorem. *T. angustifolia* není v Severní Americe původní druh a byl sem pravděpodobně zavlečen prvními Evropany v 2. polovině 19. století (Stuckey & Salamon 1987; Ciotir et al. 2012). Zavlečených jedinců bylo zřejmě málo, tudíž i různých genotypů bylo málo, a těchto pár jedinců se rozmnožovalo a šířilo dál směrem na západ po celých Spojených státech a za tak krátkou dobu nedošlo v populacích k vyselektování nových alel.

Všechny alely, které jsem detekovala, byly druhově specifické a nepřekrývaly se mezi druhy. Ani Tsyusko et al. (2005) nenašli žádné alely, které by se mezi druhy překrývaly. Snow et al. (2010) ale takové alely detekovali. V lokusech TA3, TA7, TA8, TA16 a TA20 našli alely, které nebyly druhově specifické a byly společné pro *T. latifolia* i *T. angustifolia*. Zřejmě se jedná o artefakt metody RAPD, kterou autoři použili pro rozlišení rodičovských druhů a hybridů. Na základě tohoto rozlišení autoři určovali, které mikrosatelitové alely jsou specifické pro daný druh, avšak rozlišení rodičovských druhů a hybridů metodou RAPD mohlo být nepřesné a mohlo dojít ke špatnému určení jedinců do druhů. Snow et al. (2010) také našli alely, které nebyly specifické ani pro jeden druh. Jedná se o alely 182 a 186 v lokusu TA7 a alelu 181 v lokusu TA16. Alely 186 a 181 jsem také našla a na základě výsledků z programu Structure 2.3.3, který jedince s těmito alelami jasně zařadil do příslušné skupiny, jsem tyto alely přiřadila k příslušnému druhu – alelu 186 do druhu *T. angustifolia*, ačkoliv délkově by patřila druhu *T. latifolia*, a alelu 181 do druhu *T. latifolia*. V lokusech TA8 a TA16 jsem našla alely, které by délkově patřily druhu *T. latifolia*, ale program Structure 2.3.3 zařadil jedince s těmito alelami do skupiny *T. angustifolia*. Tyto alely, a také alelu 186 v lokusu TA7, by bylo potřeba osekvenovat a podívat se, co se v těchto alelách událo. Pokud v nich došlo například k nějakým deletcím v oblasti *flanking region*, mohlo dojít k výraznému zkrácení daného mikrosatelitového lokusu a ačkoliv by tento lokus náležel podle délky druhu *T. latifolia*, tak ve skutečnosti náleží druhu *T. angustifolia*. Není překvapivé, že alely, které se nejčastěji vyskytují u *T. latifolia* a u *T. angustifolia*, se také nejčastěji vyskytují u hybridů.

5.6 Populace *T. latifolia* a *T. angustifolia*

V Evropě i v Severní Americe je obecně v populacích *T. latifolia* menší očekávaná heterozygosita a v populacích *T. angustifolia* naopak větší. V českých populacích je u druhu *T. angustifolia* očekávaná heterozygosita 0,60 a u druhu *T. latifolia* 0,22. V ukrajinských populacích je očekávaná heterozygosita velmi podobná, u druhu *T. angustifolia* 0,49 a u druhu *T. latifolia* 0,29 (Tsyusko et al. 2005). Populace v Severní Americe se v tomto také nijak neliší, očekávaná heterozygosita u druhu *T. angustifolia* je 0,43 a u druhu *T. latifolia* 0,30 (Kirk et al. 2011). V populacích *T. latifolia* tedy převažují homozygotní jedinci a v populacích *T. angustifolia* naopak heterozygotní jedinci. V populacích *T. angustifolia* lze také nalézt více alel i více unikátních alel než v populacích *T. latifolia*. Vyšší heterozygosita a více alel u druhu *T. angustifolia* a menší heterozygosita a méně alel u druhu *T. latifolia* může opět souviset se způsobem rozmnožování těchto druhů v kombinaci se sníženou alelickou variabilitou při cross-amplifikaci u *T. latifolia*.

Tsyusko et al. (2005) našli v populacích obou druhů značné množství klonálních jedinců, ačkoliv se snažili sbírat vzorky z jedinců rostoucích dál od sebe, aby zabránili sběru vzorků ze stejných klonů. Oba druhy se ovšem velmi hojně rozmnožují vegetativně masivním růstem oddenků (Smith 1967) a tento typ rozmnožování v hustých porostech orobinců dominuje (Grace & Wetzel 1981a). Slouží především k lokální kolonizaci stanovišť (McNaughton 1975), protože semena nejsou schopná se v hustých porostech uchytit a klíčit (Smith 1967; McNaughton 1968). Já jsem také v populacích obou druhů našla jedince se stejnými genotypy, kteří pravděpodobně představují klonální jedince, ačkoliv jsem se snažila zamezit sběru stejných klonů tím, že jsem sbírala jedince rostoucí minimálně 2 m od sebe. Je tedy možné, že orobince se dokáží pomocí oddenků šířit i na větší vzdálenosti než jsou 2 m. Klonální jedince jsem určila pouze na základě toho, zda měli shodný genotyp, a nemohu tedy s jistotou říct, zda jsem doopravdy odlišila jednotlivé klony. Pro jasnou identifikaci klonů je potřeba použít statistické výpočty, na základě kterých můžeme říct, že dva jedinci se stejným genotypem nejsou klony a že stejné alelické složení mají díky nezávislému sexuálnímu procesu (P_{sex} ; Arnaud-Haond 2007). Cílem této práce nebylo prostudovat klonální diverzitu *T. latifolia* a *T. angustifolia*, ale hybridizaci těchto druhů, a tomu byl přizpůsoben i design sběru vzorků.

Nezakořeněný strom ani analýza hlavních koordinát neukázala v populacích ani mezi populacemi *T. latifolia* a *T. angustifolia* žádnou strukturu. Na obou stromech se populace ze stejných geografických populací nijak vzájemně neshlukují a jsou různě rozptýlené, naopak na stejných větvích se nachází populace z různých geografických oblastí. Na diagramech je vidět velmi podobné *pattern*, populace ze stejných geografických oblastí jsou různě rozptýlené a nevytváří žádné jasně oddělené shluky. Naproti tomu ukrajinské populace vytvořily na stromu jasně oddělené větve podle

jednotlivých geografických oblastí (Tsyusko et al. 2005). Je to způsobené pravděpodobně tím, že Tsyusko et al. (2005) odebrali a analyzovali v každé populaci mnohem více vzorků než já (celkem nasbírali 659 vzorků), navíc se jednotlivé populace nacházely na mnohem větším geografickém měřítku, od 25 do 700 km. Autoři tak detekovali vysokou genetickou variabilitu mezi jednotlivými populacemi a populace se díky tomu velmi dobře oddělily podle jednotlivých geografických oblastí. Tsyusko et al. (2005) dále pozorovali u populací *T. latifolia* slabou signifikantní korelaci mezi genetickou a geografickou vzdáleností. To znamená, že jedinci si jsou geneticky podobní pouze na velmi malé vzdálenosti. Já jsem naopak pozorovala slabou signifikantní korelaci u populací *T. angustifolia*, ale pouze na vnitropopulační úrovni. Tento rozdíl může být opět ovlivněn větším množstvím vzorků odebraných v jednotlivých ukrajinských populacích.

6 Závěr

Na základě výsledků z analýzy mikrosatelitů jsem zjistila, že na území České republiky dochází k hybridizaci orobinců *T. latifolia* a *T. angustifolia*. Zdá se ale, že hybridizace není příliš častá. Z 267 zanalyzovaných jedinců vykazovalo hybridní *pattern* jen 29 jedinců. Pouze jeden jedinec byl typický F1 hybrid, 23 jedinců byli pravděpodobní pokročilí hybridi a 5 jedinců pravděpodobní zpětní kříženci k *T. angustifolia*. Hybridní jedinci byli nalezeni v 13 populacích. V českých populacích tedy převažují spíše pokročilí hybridi a zpětní kříženci. Hybridizace *T. latifolia* a *T. angustifolia* byla také podpořena několika statistickými výstupy, ve kterých se rodičovské druhy jasně oddělily do dvou vzdálených skupin a hybridi vytvořili třetí skupinu.

Na základě shlukování v programu Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) jsem detekovala 81 specifických alel pro druh *T. angustifolia* a 22 specifických alel pro druh *T. latifolia*. Pokročilí hybridi a zpětní kříženci měli alely obou rodičovských druhů v různé kombinaci, v některých lokusech byli hybridní a v některých měli obě alely od jednoho rodičovského druhu. F1 hybridi měli v každém lokusu jednu alelu *T. latifolia* a jednu alelu *T. angustifolia*.

Hybridní se pouze na základě morfologie nedají od rodičovských druhů odlišit, protože se s nimi svými znaky překrývají. V analýze hlavních komponent i v lineární diskriminační analýze se oba rodičovské druhy jasně oddělily, ale pokročilí hybridi a zpětní kříženci byli roztroušeni mezi nimi, přičemž více jich bylo ve shluku *T. angustifolia*. Jediný F1 hybrid byl přesně v intermediární pozici mezi rodičovskými druhy. Dále jsem zjistila, že morfologický vzhled hybridů je zřejmě ovlivněn jejich alelickým složením, které určuje, jak budou hybridi vypadat. Pokud má hybrid více alel druhu *T. latifolia*, tak se podobá více právě tomuto druhu a v analýze hlavních komponent i v lineární diskriminační analýze se pak nachází ve shluku *T. latifolia*. Má-li více alel *T. angustifolia*, pak se podobá více tomuto druhu a nachází se ve shluku *T. angustifolia*.

Jelikož hybridizace *T. latifolia* a *T. angustifolia* není příliš častá, existují na území České republiky nějaké reprodukční izolační bariéry, které brání hojnému křížení těchto druhů. Doba kvetení *T. latifolia* a *T. angustifolia* se na území České republiky zcela překrývá, což hybridizaci těchto druhů umožňuje, a doba kvetení tedy jako reprodukční izolační bariéra nepůsobí. A nepůsobí zde pravděpodobně ani žádné jiné prezygotické reprodukční izolační bariéry, které by bránily splývání dvou cizích gamet, protože při pokusném křížení těchto druhů se na samičích palicích *T. latifolia* i *T. angustifolia* vytvořila hybridní semena, která vypadala zcela normálně jako semena vznikající přirozeně v přírodě. Po zasetí hybridních semen se ale ukázalo, že semena nejsou životaschopná, protože nevyklíčila, což naznačuje, že mezidruhovému křížení brání nějaké postzygotické reprodukční izolační bariéry. I přesto ale musí být nepatrná část hybridních

semen životaschopná a tato semena se dokáží v populacích uchytit a dát vznik hybridním jedincům.

V budoucnu by bylo velmi zajímavé podívat se, zda k hybridizaci *T. latifolia* a *T. angustifolia* dochází i na území jiných evropských států a jaké mechanismy hybridizaci brání nebo ji naopak umožňují. Rovněž by stálo za pozornost zjistit, který druh je mateřským rodičem českých hybridů a zda k hybridizaci dochází ve stejném směru jako v Severní Americe, kde je mateřským druhem hybridů *T. angustifolia*. V neposlední řadě by bylo vhodné zaměřit se na to, proč hybridní semena neklíčí a co způsobuje jejich neživotaschopnost.

7 Seznam literatury

Abromeit J. (1898): Flora von Ost- und Westpreussen. I. Samenpflanzen oder Phanerogamen. 1. Hälfte (Bogen 1 – 25). R. Friedländer & Sohn, Berlin.

Acloque A. (1904): Flore de la région méditerranéenne de la France. Alpes Maritimes, Var, Bouches du Rhone, Gard, Herault, Aude, Pyrénées orientales, Corse. Librairie J. B. Bailliére et fils, Paris.

Adachi N., Terashima I. & Takahashi M. (1996): Central die-back of monoclonal stands of *Reynoutria japonica* in an early stage of primary succession on Mount Fuji. *Annals of Botany* 77: 477 – 486.

Álvarez J. A. & Bécares E. (2006): Seasonal decomposition of *Typha latifolia* in a free-water surface constructed wetland. *Ecological Engineering* 28: 99 – 105.

Anderson E. (1949): Introgressive hybridization [online]. John Wiley Sons, New York, Chapman & Hall, London. [cit.8.3.2013] Dostupné z <http://books.google.cz/books?id=SAj9G3NWv7UC&printsec=frontcover&dq=Introgressive+hybridization+anderson&hl=cs&ei=vwodTICmL5GB_Qa87pmlDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&ved=0CDYQ6AEwAw#v=onepage&q=Introgressive%20hybridization%20anderson&f=false>.

Anderson E. C. & Thompson E. A. (2002): A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217 – 1229.

Angeloni N. L., Jankowski K. J., Tuchman N. C. & Kelly J. J. (2006): Effects of an invasive cattail species (*Typha × glauca*) on sediment nitrogen and microbial community composition in a freshwater wetland. *FEMS Microbiol Letters* 263: 86 – 92.

Arnaud-Haond S., Duarte C. M., Alberto F. & Serrão E. A. (2007): Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology* 16: 5115 – 5139.

Arnold M. L. & Hodges S. A. (1995): Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents?. *TREE* 10: 67 – 71.

Ascherson P. & Graebner P. (1896 – 1898): Synopsis der Mitteleuropäischen Flora. Erster Band. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.

Ascherson P. & Graebner P. (1898 – 1899): Flora des Nordostdeutschen Flachlandes (ausser Ostpreussen). Verlag von Gebrüder Borntraeger, Berlin.

Bailey J. P., Bímová K. & Mandák B. (2009): Asexual spread versus sexual reproduction and evolution in Japanese Knotweed s.l. sets the stage for the “Battle of the Clones”. *Biological Invasions* 11:1189 – 1203.

Ball D. & Freeland J. R. (2013): Synchronous flowering times and asymmetrical hybridization in *Typha latifolia* and *T. angustifolia* in northeastern North America. *Aquatic Botany* 104: 224 – 227.

- Bleeker W. (2007): Interspecific hybridization in *Rorippa* (*Brassicaceae*): patterns and processes. *Systematics and Biodiversity* 5: 311 – 319.
- Boedeltje G., Ozinga W. A. & Prinzing A. (2008): The trade-off between vegetative and generative reproduction among angiosperms influences regional hydrochorous propagule pressure. *Global Ecology and Biogeography* 17: 50 – 58.
- Bowcock A. M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J. R. & Cavalli-Sforza L. L. (1994): High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455 – 457.
- Briggs D. & Walters S. M. (2001): *Proměnlivost a evoluce rostlin*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Brown R. M., Nichols R. A., Faulkes C. G., Jones C. G., Bugoni L., Tatayah V., Gottelli D. & Jordan W. C. (2010): Range expansion and hybridization in Round Island petrels (*Pterodroma* spp.): evidence from microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* 19: 3157 – 3170.
- Carmichael D. P. (1980): A record of environmental change during recent millennia in the Hackensack tidal marsh, New Jersey. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107: 514 – 524.
- Castroviejo S. (2007): *Typhaceae*. In: Castroviejo S., Luceño M., Galán A., Jiménez Mejías P., Cabezas F. & Medina L. [eds.] (2007): *Flora iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. XVIII, Cyperaceae – Pontederiaceae*. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Chassagne M. (1956): *Inventaire Analytique de la Flore d'Auvergne et contrées limitrophes des départements voisins. Tome I*. Editions Paul Lechevalier, Paris.
- Chytrý M. & Rafajová M. (2003): Czech National Phytosociological Database: basic statistics of the available vegetation-plot data. *Preslia, Praha* 75: 1 – 15.
- Ciotir C., Kirk H., Row J. R. & Freeland J. (2012): Intercontinental dispersal of *Typha angustifolia* and *T. latifolia* between Europe and North America has implications for *Typha* invasions. *Biological Invasions*. (in press)
- Corander J., Cheng L., Marttinen P., Sirén J. & Tang J. (2012): BAPS: Bayesian analysis of population structure. Manual v.6.0. Department of Mathematics and statistics, University of Helsinki, Finland.
- Corillion R. (1981): *Flore et végétation de la vallée de la Loire (cours occidental: de l'Orléanais à l'estuaire)*. 1. Texte. Imprimerie JOUVE, Paris.
- Craft C., Krull K. & Graham S. (2006): Ecological indicators of nutrient enrichment, freshwater wetlands, Midwestern United States (U.S.). *Ecological Indicators* 7: 733 – 750.
- De Langhe J. E., Delvosalle L., Duvigneaud J., Lambinon J. & Vanden Bergen C. (1983): *Nouvelle Flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et*

des Régions voisines. Ptéridophytes et Spermatophytes. Troisième édition. Editions du Patrimoine du Jardin botanique national de Belgique, Meise.

Dieringer D. & Schlötterer C. (2003): Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167 – 169.

Domin K. & Podpěra J. (1928): Klíč k úplné květeně republiky československé. Druhé vydání Polívkova klíče k úplné květeně zemí Koruny české. I. Oddíl všeobecný. R. Prombergerer, Olomouc.

Domin K. (1936): *Preslia*: věstník československé botanické společnosti XIII – XV, 1934 – 1936. Československá botanická společnost, Praha.

Dostál J. (1950): *Květena ČSR II*. Přírodovědecké nakladatelství, Praha.

Dostál J. (1989): *Nová Květena ČSSR II*. Academia, Praha.

Dow B. D. & Ashley M. V. (1996): Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5: 615 – 627.

Doyle J. J. & Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19: 11 – 15.

Dykyjová D. & Květ J. (1978): *Pond littoral ecosystems*. Springer Verlag, New York.

Edh K., Widén B. & Ceplitis A. (2007): Nuclear and chloroplast microsatellites reveal extreme population differentiation and limited gene flow in the Aegean endemic *Brassica cretica* (*Brassicaceae*). *Molecular Ecology* 16: 4972 – 4983.

Edwards Y. J. K., Elgar G., Clark M. S. & Bishop M. J. (1998): The Identification and Characterization of Microsatellites in the Compact Genome of the Japanese Pufferfish, *Fugu rubripes*: Perspectives in Functional and Comparative Genomic Analyses. *Journal of Molecular Biology* 278: 843 – 854.

Ehrich D., Gaudeul M., Assefa A., Koch M., Mummenhoff K. & Nemomissa S. (2007): Genetic consequences of Pleistocene range shifts: Contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology* 16: 2542 – 2559.

Ellegren H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435 – 445.

Ellstrand N. C. & Schierenbeck K. A. (2000): Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants?. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 7043 – 7050.

Ersts P. J. (2006): *Geographic Distance Matrix Generator* (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation, New York.

- Evano G., Regnaut S. & Goudet J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611 – 2620.
- Excoffier L. & Lischer H. E. L. (2010): Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564 – 567.
- Farrer E. C. & Goldberg D. E. (2009): Litter drives ecosystem and plant community changes in cattail invasion. *Ecological Applications* 19: 398 – 412.
- Fassett N. C. & Calhoun B. (1952): Introgression between *Typha latifolia* and *T. angustifolia*. *Evolution* 6: 367 – 379.
- Felsenstein J. (2005): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Field D. L., Ayre D. J., Whelan R. J. & Young A. G. (2010): Patterns of hybridization and asymmetrical gene flow in hybrid zones of the rare *Eucalyptus aggregata* and common *E. rubida*. *Heredity*: 1 – 13.
- Figert E. (1890): *Deutsche botanische Monatschrift* 8: 55 – 57.
- Finkelstein S. A. (2003): Identifying pollen grains of *Typha latifolia*, *Typha angustifolia*, and *Typha × glauca*. *Canadian Journal of Botany* 81: 985 – 990.
- Galatowitsch S. M., Anderson N. O. & Ascher P. D. (1999): Invasiveness in wetland plants in temperate North America. *WETLANDS* 19: 733 – 755.
- Gaskin J. F. & Schaal B. A. (2002): Hybrid *Tamarix* widespread in U.S. invasion and undetected in native Asian range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 99: 11256 – 11259.
- Gaskin J. F. & Kazmer D. J. (2009): Introgression between invasive saltcedars (*Tamarix chinensis* and *T. ramosissima*) in the USA. *Biological Invasions* 11: 1121 – 1130.
- Glück H. (1936): Heft 15: Pteridophyten und Phanerogamen. In: Pascher A. [ed.] (1936): *Die Süßwasser-flora Mitteleuropas*. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Godinho R., Llana L., Blanco J. C., Lopes S., Álvares F., García E. J., Palacios V., Cortés Y., Talegón J. & Ferrand N. (2011): Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 20: 5154 – 5166.
- Godron D. A. (1861): *Flore de Lorraine*. Tome second [online]. Baillié J. B. et fils, Paris. [cit.9.3.2013] Dostupné z
<http://books.google.cz/books?id=1TZEAAAAYAAJ&pg=PA557&dq=flora+de+lorraine&hl=cs&ei=epInTPrpGYK6OIf7iKoC&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CDeQ6AEwAg#v=onepage&q&f=false>.

- Gomez C., Batti A., Le Pierrés D., Campa C., Hamon S., Kochko A., Hamon P., Huynh F., Despinoy M. & Poncet V. (2010): Favourable habitats for *Coffea* inter-specific hybridization in central New Caledonia: combined genetic and spatial analyses. *Journal of Applied Ecology* 47: 85 – 95.
- Grace J. B. & Wetzel R. G. (1981a): Habitat partitioning and competitive displacement in Cattails (*Typha*): experimental field studies. *The American Naturalist* 118: 463 – 474.
- Grace J. B. & Wetzel R. G. (1981b): Phenotypic and genotypic components of growth and reproduction in *Typha latifolia*: experimental studies in marshes of differing successional maturity. *Ecology* 62: 789 – 801.
- Grace J. B. & Harrison J. S. (1986): The biology of Canadian weeds: 73. *Typha latifolia* L., *Typha angustifolia* L. and *Typha* × *glauca* Godr. *Canadian Journal of Plant Science* 66: 361 – 379.
- Grace J. B. & Wetzel R. G. (1998): Long-term dynamics of *Typha* populations. *Aquatic Botany* 61: 137 – 146.
- Graebner P. (1900): *Typhaceae*. In: Engler A. [ed.] (1900): *Das Pflanzenreich*. IV.8. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig und Berlin.
- Grenier (1856): *Typhaces*. In: Grenier & Godron [eds.] (1856): *Flore de France. Description des plantes qui croissent naturellement en France en Corse*. Tome troisième. F. Savy, Libraire-éditeur, Paris.
- Griese J. (1998): *Typhaceae*. In: Baumann H., Griese J., Kleinstaub A., Künkele S., Philippi G., Rösch M., Rosenbauer S., Sebald O. & Seybold S. [eds.] (1998): *Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs. Band 8: Spezieller Teil (Spermatophyta, Unterklassen Commelinidae Teil 2, Arecidae, Liliidae Teil 2) Juncaceae bis Orchidaceae*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Hammer Ø., Harper D.A.T. & Ryan P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1 – 9.
- Hämet-Ahti L., Suominen J., Ulvinen T., Uotila P. & Vuokko S. (1986): *Retkeilykasvio*. Suomen Luonnonsuojelun Tuki Oy, Helsinki.
- Hardy O. J. & Vekemans X. (1999): Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity* 83: 145 – 154.
- Hardy O. J. & Vekemans X. (2002): SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618 – 620.
- Hegarty M. J. & Hiscock S. J. (2005): Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist* 165: 411 – 423.

- Hegi G. (1936): *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*. Volume 1. J. F. Lehmanns Verlag, München.
- Hegi G. (1980): *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, Volume 2 (1). Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- Hejný S. & Husák Š. (1978): Higher plant communities. In: Dykyjová D. & Květ J. [eds.] (1978): *Pond littoral ecosystems*. Springer Verlag, Berlin.
- Hempel W. (1994): *Typhaceae* JUSS. In: Rothmaler W. [ed.] (1994): *Exkursionsflora von Deutschland*. Band 4, Gefäßpflanzen: Kritischer Band. 8. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Heß H. E., Landolt E. & Hirzel R. (1967): *Flora der Schweiz und angrenzender Gebiete*. Band I: *Pteridophyta* bis *Caryophyllaceae*. Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart.
- Holmberg O. R. (1922): *Skandinaviens flora*. Hartmans handbook I. Häfte 1. P. A. Nordstedt & Söners Förlag, Stockholm.
- Holsinger K. E. & Ellstrand N. C. (1984): The evolution and ecology of permanent translocation heterozygotes. *The American Naturalist* 124: 48 – 71.
- Hotchkiss N. & Dozier H. L. (1949): Taxonomy and distribution of N. American Cat-tails. *American Midland Naturalist* 41: 237 – 254.
- Hyde J. E. (2005): The flowering phenology and pollen viability of *Typha latifolia*, *Typha angustifolia*, and *Typha x glauca* in northern Lower Michigan: implications for hybridization and evolution. Department of Ecology & Evolutionary Biology, University of Michigan, Ann Arbor Michigan.
- Jarne P. & Lagoda P. J. L. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* 11: 424 – 429.
- Jauzein P. (2007): *Typhaceae*. In: Jeanmonod D. & Gamisans J. [eds.] (2007): *Flora Corsica*. Édisud, un éditeur de la Compagnie des éditions de la Lesse, Aix-en-Provence.
- Jeffreys A. J., Murray J. & Neumann R. (1998): High-resolution mapping of crossovers in human sperm defines a minisatellite associated recombination hotspot. *Molecular Cell* 2: 267 – 273.
- Judd W. S., Campbell Ch. S., Kellog E. A., Stevens P. F. & Donoghue M. J. (2002): *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc., USA.
- Kaplan Z. (2002): *Typhaceae*. In: Kubát K. (2002): *Klíč ke květeně České republiky*. Academia, Praha.
- Kim C. & Choi H.-K. (2011): Molecular systematics and character evolution of *Typha* (*Typhaceae*) inferred from nuclear and plastid DNA sequence data. *TAXON* 60: 1417 – 1428.

- Kirk H., Connolly C. & Freeland J. R. (2011): Molecular genetic data reveal hybridization between *Typha angustifolia* and *Typha latifolia* across a broad spatial scale in eastern North America. *Aquatic Botany* 95: 189 – 193.
- Koch W. D. J. (1907): Synopsis der Deutschen und Schweizer Flora. Dritte, neubearbeitete Auflage in Verbindung mit namhaften Botanikern. Dritter Band. O. R. Reisland, Leipzig.
- Krattinger K. (1975): Genetic mobility in *Typha*. *Aquatic Botany* 1: 57 – 70.
- Krause E. H. L. (1906): 1. Band: Nadelhölzer. Lilien. Kolbenschilfe. Kolbenblumen. Coniferae, Liliiflorae. Pandanales. Spathiflorae. In: Sturms J. [ed.] (1906): Flora von Deutschland in Abbildungen nach der Natur. Zweite, umgearbeitete Auflage. Verlag von K. G. Lutz, Stuttgart.
- Kronauer D. J. C., Peters M. K., Schöning C. & Boomsma J. J. (2011): Hybridization in East African swarm-raiding army ants. *Frontiers in Zoology* 8: 1 – 13.
- Kronfeld M. (1889): Monographie der Gattung *Typha* Tourn. (*Typhinae* Agdh., *Typhaceae* Schul-Engl.). In: Fritsch C. [ed.] (1889): Verhandlungen der kaiserlich-königlichen zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien. Gesellschaft, Wien.
- Kuehn M. M., Minor J. E. & White B. N. (1999): An examination of hybridization between the cattail species *Typha latifolia* and *Typha angustifolia* using random amplified polymorphic DNA and chloroplast DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 1981 – 1990.
- Kuehn M. M. & White B. N. (1999): Morphological analysis of genetically identified cattails *Typha latifolia*, *Typha angustifolia*, and *Typha ×glauca*. *Canadian Journal of Botany* 77: 906 – 912.
- Kumar S., Skjæveland Å, Orr R. J. S., Enger P., Ruden T., Mevik B.-H., Burki F., Botnen A. & Shalchian-Tabrizi K. (2009): AIR: A batch-oriented web program package for construction of supermatrices ready for phylogenomic analyses. *BMC Bioinformatics* 10: 1 – 7.
- Kuusk V., Talts S. & Viljasoo L. (1979): Eesti NSV flora XI. Tallinn, Valgus.
- Lagercrantz U., Ellegren H. & Anderson L. (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research* 21: 1111 – 1115. (abstrakt)
- Lamote V., Loose M. D., Bockstaele E. V. & Roldán-Ruiz I. (2005): Evaluation of AFLP markers to reveal genetic diversity in *Typha*. *Aquatic Botany* 83: 296 – 309.
- Lee D. W. (1975): Population variation and introgression in North American *Typha*. *Taxon* 24: 633 – 641.
- Levy S. (2007): The invasiveness of the cattail hybrid *Typha ×glauca*: a study of seedling growth rates. Department of Evolution, Ecology & Organismal Biology, Ohio State University, Columbus.

Li Y. C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A. & Nevo E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453 – 2465.

Mandák B. (2011): Mikrosatelity – jejich funkce, význam a použití v současné biologii. *Zprávy České Botanické Společnosti* 25: 79 – 94.

Manios T., Stentiford E. I. & Miller P. A. (2003): The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. *Ecological Engineering* 20: 65 – 74.

Mashburn S. J., Sharitz R. R. & Smith M. H. (1978): Genetic variation among *Typha* populations of the Southeastern United States. *Evolution* 32: 681 – 685.

McKenzie-Gopsill A., Kirk H., Van Drunen W., Freeland J. R. & Dorken M. E. (2012): No evidence for niche segregation in a North American Cattail (*Typha*) species complex. *Ecology and Evolution* 2: 952 – 961.

McMillan C. (1959): Salt tolerance within a *Typha* population. *American Journal of Botany* 46: 521 – 526.

McNaughton S. J. (1968): Autotoxic feedback in relation to germination and seedling growth in *Typha latifolia*. *Ecology* 49: 367 – 369.

McNaughton S. J. (1975): r- and K-selection in *Typha*. *The American Naturalist* 109: 251 – 261.

Metzgar D., Bytof J. & Wills C. (2000): Selection Against Frameshift Mutations Limits Microsatellite Expansion in Coding DNA. *Genome Research* 10: 72 – 80.

Meusel H., Jäger E. & Weinert E. (1965): Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Molinier R. (1980): Catalogue des plantes vasculaires des Bouches-du-Rhone. Imprimerie Municipale, Marseille.

Mowszowicz J. (1973): Rośliny wodne krajowe. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Łódź.

Neff K. P. & Baldwin A. H. (2005): Seed dispersal into wetlands: techniques and results for a restored tidal freshwater marsh. *WETLANDS* 25: 392 – 404.

Nei M., Tajima F. & Tateno Y. (1983): Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153 – 170.

Niedenzu F. (1922): Flora von Deutschland. Zum Gebrauche auf Exkursionen, in Schulen und zum Selbstunterricht. Zweiundzwanzigste, verbesserte Auflage. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin.

Nordborg M., Hu T. T., Ishino Y., Jhaveri J., Toomajian C., Zheng H., Bakker E., Calabrese P., Gladstone J., Goyal R., Jakobsson M., Kim S., Morozov Y., Padhukasahasram B., Plagnol V., Rosenberg N. A., Shah C., Wall J. D., Wang J., Zhao K., Kalbfleisch T., Schulz V., Kreitman M. & Bergelson J. (2005): The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. PLoS Biology 3: 1289 – 1299.

Nyman C. F. (1878 – 1882): Conspectus florae Europaeae, seu enumeratio methodica. Plantarum phanerogamarum europae indigenarum, indicatio distributionis geographicae singularum etc. Typis officinae bohlinianae, Örebro Sueclae.

Olson A., Paul J. & Freeland J. R. (2009): Habitat preferences of cattail species and hybrids (*Typha* spp.) in eastern Canada. Aquatic Botany 91: 67 – 70.

Ooststroom S. J. & Reichgelt T. J. (1964): *Typhaceae*. In: Ooststroom S. J., Reichgelt T. J., Van der Veen R., De Jongh S. E., Stafleu F. A. & Westhoff V. [eds.] (1964): Flora Neerlandica. Deel I, Aflevering 6, 1. Alismataceae – 15. Typhaceae. Koninklijke nederlandse botanische vereniging, Amsterdam.

Page R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357 – 358.

Pederson D. C., Peteet D. M., Kurdyla D. & Guilderson T. (2005): Medieval Warming, Little Ice Age, and European impact on the environment during the last millennium in the lower Hudson Valley, New York, USA. Quaternary Research 63: 238 – 249.

Penzig O. (1901): Flora Pyrenaea per Ordines Naturales gradatim digesta. Volumen Quartum. Ulricus Hoeplius, Mediolani.

Pinheiro F., Barros F., Palma-Silva C., Meyer D., Fay M. F., Suzuki R. M., Lexer C. & Cozzolino S. (2010): Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). Molecular Ecology 19: 3981 – 3994.

Podani J. (1997): SYN-TAX 5.1: A new version for PC and Macintosh computers. Coenoses 12:149 – 152.

Preston C. D. (2002): *Typha*. In: Preston C. D., Pearman D. A. & Dines T. D. [eds.] (2002): New atlas of the british & irish flora. An Atlas of the Vascular Plants of Britain, Ireland, the Isle of Man and the Channel Island. Oxford University press, Oxford.

Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945 – 959.

Procházka F. [ed.] (2001): Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). Studio REFOS, Praha.

Provan J., Powell W. & Hollingsworth P. M. (2001): Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. TRENDS in Ecology & Evolution 16: 142 – 147.

Queller D. C., Strassmann J. E. & Hughes C. R. (1993): Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution* 8: 285 – 288. In: Selkoe K. A. & Toonen R. J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615 – 629.

R Development Core Team (2008): R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Rambaut A. (2012): FigTree v1.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.

Reed D. H. & Frankham R. (2003): Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230 – 237.

Rieseberg L. H. & Ellstrand N. C. (1993): What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization?. *Critical Reviews in Plant Science* 12: 213 – 241.

Rieseberg L. H., Kim S. CH., 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.

Rosenberg N. A. (2004): Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137 – 138.

Rouy G. (1912): Flore de France. Description des plantes qui croissent spontanément en France, en Corse et en Alsace-Lorraine. Tome XIII. Société des sciences naturelles de la Charente-Inférieure, Paris.

Saitou N. & Nei M. (1987): The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406 – 425.

Schierenbeck K. A. & Ellstrand N. C. (2009): Hybridization and the evolution of invasiveness in plants and other organisms. *Biological Invasions* 11:1093 – 1105.

Schlötterer C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365 – 371.

Schlötterer C. (2004): The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63 – 69.

Schlüter P. M. & Harris S. A. (2006): Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6: 569 – 572.

Schmeil O. & Fitschen J. (1941): Flora von Deutschland. Ein Hilfsbuch zum Bestimmen der in Deutschland wildwachsende und häufig angebauten Pflanzen. 52. und 53. Auflage. Verlag von Quelle & Meyer, Leipzig.

Schube T. (1904): Flora von Schlesien, preußischen und österreichischen Anteils. Verlag von Wilh. Gottl. Korn, Breslau.

- Schug M. D., Werrerstrand K. A., Gaudette M. S., Lim R. H., Hutter C. M & Aquadro C. F. (1998): The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 7: 57 – 70.
- Selbo S. M. & Snow A. A. (2004): The potential for hybridization between *Typha angustifolia* and *Typha latifolia* in a constructed wetland. *Aquatic Botany* 78: 361 – 369.
- Selkoe K. A. & Toonen R. J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615 – 629.
- Sell P. & Murrell G. (1996): Flora of Great Britain and Ireland. Volume 5, *Butomaceae – Orchidaceae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sharitz R. R., Wineriter S. A., Smith M. H. & Liu E. H. (1980): Comparison of isozymes among *Typha* species in the eastern United States. *American Journal of Botany* 67: 1297 – 1303.
- Shih J. G. & Finkelstein S. A. (2008): Range dynamics and invasive tendencies in *Typha latifolia* and *Typha angustifolia* in eastern North America derived from herbarium and pollen records. *WETLANDS* 28: 1 – 16.
- Smith S. G. (1967): Experimental and natural hybrids in North American *Typha* (*Typhaceae*). *American Midland Naturalist* 78: 257 – 287.
- Smith S.G. (2000): *Typhaceae* [online]. In: Flora of North America, Volume 22. Oxford, New York. [cit. 8.3.2013] Dostupné z <http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=10926>.
- Snow . A. A., Travis S. E., Wildová R., Fér T., Sweeney P. M., Marburger J. E., Windels S., Kubátová B., Goldberg D. E. & Mutegi E. (2010): Species-specific SSR alleles for studies of hybrid cattails (*Typha latifolia* × *T. angustifolia*; *Typhaceae*) in North America. *American Journal of Botany* 97: 1 – 7.
- Stebbins G. L. (1969): The significance of hybridization for plant taxonomy and evolution. *Taxon* 18: 26 – 35.
- Stebbins G. L. (1985): Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72: 824 – 832.
- Stevens P. F. (2001 a dál): Angiosperm Phylogeny Website (APWeb) [online]. Version 12, červenec 2012. [cit. 8.3.2013] Dostupné z <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>.
- Stuckey R. L. & Salamon D. P. (1987): *Typha angustifolia* in North America: a foreigner masquerading as a native. Department of Botany, The Ohio State University, Columbus, Ohio. (abstrakt)
- Suda J. R., Sharitz R. R. & Straney D. O. (1977): Morphological aberrations in *Typha* populations in a post-thermal aquatic habitat. *American Journal of Botany* 64: 570 – 575.

- Thompson J. D. (1991): The Biology of an invasive plant: what makes *Spartina anglica* so successful?. *BioScience* 41: 393 – 401.
- Tóth G., Gáspári Z. & Jurka J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10: 967 – 981.
- Travis S. E., Marburger J. E., Windels S. & Kubátová B. (2010): Hybridization dynamics of invasive cattail (*Typhaceae*) stands in the Western Great Lakes Region of North America: a molecular analysis. *Journal of Ecology* 98: 7 – 16.
- Tsyusko-Omeltchenko O. V., Schable N. A., Smith M. H. & Glenn T. C. (2003): Microsatellite loci isolated from narrow-leaved cattail *Typha angustifolia*. *Molecular Ecology Notes* 3: 535 – 538.
- Tsyusko O. V., Smith M. H., Sharitz R. R. & Glenn T. C. (2005): Genetic and clonal diversity of two cattail species, *Typha latifolia* and *T. angustifolia* (*Typhaceae*), from Ukraine. *American Journal of Botany* 92: 1161 – 1169.
- Tuchman N. C., Larkin D. J., Geddes P., Wildova R., Jankowski K. J. & Goldberg D. E. (2009): Patterns of environmental change associated with *Typha × glauca* invasion in Great Lakes coastal wetland. *WETLANDS* 29: 964 – 975.
- Vogt K., Rasran L. & Jensen K. (2004): Water-borne seed transport and seed deposition during flooding in a small river-valley in Northern Germany. *Flora* 199: 377 – 388.
- Vollmann F. (1914): *Flora von Bayern*. Verlagsbuchhandlung Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Walters S. M. (1980): *Typha* L. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A. [eds.] (1980): *Flora Europaea*, Volume 5. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wang Z., Weber J. L., Zhong G. & Tanksley S. D. (1994): Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 1 – 6. (abstrakt)
- Waters I. & Shay J.M. (1990): A field study of the morphometric response of *Typha glauca* shoots to a water depth gradient. *Canadian Journal of Botany* 68: 2339 – 2343.
- Waters I. & Shay J.M. (1992): Effect of water depth on population parameters of a *Typha glauca* stand. *Canadian Journal of Botany* 70: 349 – 351.
- Weir B. & Cockerham C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358 – 1370. (online)
- Weising K. et al. (2005): *DNA fingerprinting in plants. Principles, methods, and applications*. CRC Press Taylor & Francis Group, USA.
- Wissemann V. (2007): Plant evolution by means of hybridization. *Systematics and Biodiversity* 5: 243 – 253.

Woo I. & Zedler J. B. (2002): Can nutrients alone shift a sedge meadow towards dominance by the invasive *Typha × glauca*? WETLANDS 22: 509 – 521.

Wren J. D., Forgacs E., Fondon J. W., Pertsemlidis A., Cheng S. Y., Gallardo T., Williams R. S., Shohet R. V., Minna J. D. & Garner H. R. (2000): Repeat Polymorphisms within Gene Regions: Phenotypic and Evolutionary Implications. The American Journal of Human Genetics 67: 345 – 356.

Yeo R. R. (1964): Life history of common cattail. Weeds 12: 284 – 288.

Zane L., Bargelloni L. & Patarnello T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: review. Molecular Ecology 11: 1 – 16.

Internetové adresy použitých obrázků v textu, řazeno podle pořadí obrázků v textu

- 1 = <http://www.honeysomeaquaticnursery.co.uk/shop/images/Typha%20Latifolia.jpg>
- 2 = http://www.online-utility.org/image/ImageCache?file=2/2f/Typha_angustifolia2.JPG/800px-Typha_angustifolia2.JPG
- 3 = http://dnr.wi.gov/topic/Invasives/photos/images/medium/CattailsC_xglauca.jpg
- 4 = <http://img.aktualne.centrum.cz/515/29/5152913-obrazem-fascinujici-fotografie-semen-z-mikroskopu.jpg>

Internetové zdroje

<http://cs.allmetsat.com/>
<http://florabase.cz/databanka/index.php>