

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diverzifikace a polyploidní speciace plavuní
(*Lycopodium*) v Evropě

Diplomová práce

Ing. Bc. Linda Šternerová

Školitel: doc. RNDr. Libor Ekrt, Ph.D.

České Budějovice 2024

Šternarová, L., 2024: Diverzifikace a polyploidní speciace plavuní (*Lycopodium*) v Evropě. [Diversification and polyploid speciation of Clubmosses (*Lycopodium*) in Europe. Mgr. Thesis, in Czech.] – 70 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Clubmosses (*Lycopodium*) belong to one of the oldest living lineages of vascular plants. Two species of the genus *Lycopodium* occur in Europe: *L. annotinum* and *L. clavatum*. The species *L. annotinum* has two subspecies: *L. annotinum* subsp. *annotinum* and *L. annotinum* subsp. *alpestre*. Species *L. clavatum* is distinguished into two subspecies: *L. clavatum* subsp. *clavatum* and *L. clavatum* subsp. *monostachyon*. This thesis deals with the current taxonomy and subspecies delimitation of European clubmosses. It aims to find differences between the individual subspecies of *L. annotinum* and *L. clavatum* using cytological, molecular, and morphometric methods.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 24. 6. 2024

.....

Poděkování:

Největší dík patří mému školiteli Liborovi Ekrtovi, který po celou dobu mého (dlouhého) studia nade mnou nezlomil hůl a kdykoliv jsem potřebovala, mi pomohl a poradil. Další obrovské díky patří mým dvěma konzultantkám: Katce Vejvodové za pomoc s vyhodnocením dat, cenné připomínky k práci a podrobnou revizi práce před odevzdáním a Viki Brožové za pomoc s molekulární částí práce, bez nich bych tuto práci dokončila jen s velkými obtížemi. Zároveň děkuji všem, kdo pomáhali sbírat rostliny použité v této diplomové práci, jmenovitě: L. Ekrtovi, K. Vejvodové, V. Brožové, M. Štechovi, P. Kouteckému, V. Dolejškovi, A. Čejkové, E. Hille, P. Novákovi, P. Fišerovi a dalším. V neposlední řadě děkuji své rodině a kamarádům za bezmeznou podporu po celou dobu mého studia.

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární rešerše	2
2.1 Plavuňovité rostliny (Lycopodiopsida)	2
2.2 Evropské plavuně rodu <i>Lycopodium</i> a <i>Spinulum</i>	3
2.2.1 <i>Lycopodium annotinum</i>	4
2.2.2 <i>Lycopodium clavatum</i>	8
2.2.3 Morfologická plasticita plavuní	12
2.2.4 Cytotypová variabilita zkoumaných druhů plavuní	13
3 Metodika	15
3.1 Sběr dat	15
3.2 Průtoková cytometrie	17
3.3 Molekulární metody	18
3.3.1 Izolace DNA	19
3.3.2 PCR	19
3.3.3 Elektroforéza	21
3.3.4 Sekvence	21
3.3.5 Úprava a vyhodnocení sekvencí	21
3.4 Morfometrické analýzy	21
3.5 Testování vlivu prostředí na morfologii zkoumaných druhů	29
4 Výsledky	29
4.1 Průtoková cytometrie	29
4.1.1 Cytotypová variabilita	29
4.1.2 Rozdíly v použitém materiálu	32
4.2 Molekulární metody	32
4.3 Morfometrické analýzy	33
4.3.1 Vzájemná korelace znaků	33
4.3.2 Analýza hlavních komponent	35
4.3.3 Popisné statistiky měřených morfologických znaků	39
4.3.4 Hodnoty vybraných morfologických znaků	42
4.3.5 Vazba morfologických znaků na prostředí	44
4.3.6 Určování poddruhů plavuní zkoumaných druhů	49

5 Diskuze.....	51
5.1 Cytologie zkoumaných druhů plavuní.....	51
5.2 Molekulární analýzy	53
5.3 Porovnání hodnot morfologických znaků s literaturou	55
5.4 Ovlivnění znaků prostředím	60
5.5 Rozšíření severských poddruhů zkoumaných druhů ve střední Evropě.....	61
6 Závěr	62
7 Zdroje použité literatury.....	63
8 Přílohy	71

1 Úvod

Plavuně jsou jedny z nejstarších žijících cévnatých rostlin s fosilním záznamem sahajícím až 420 miliónů let do minulosti (Field et al. 2015, Zhang & Zhou 2021). Třída Lycopodiopsida zahrnuje 1338 druhů rostlin. Jedním z významných rodů homosporických plavuní je právě rod *Lycopodium* který zahrnuje aktuálně 15 druhů rostlin (PPG I 2016), z nichž se v Evropě vyskytují dva: *L. annotinum* L. a *L. clavatum* L. Pro každý z těchto druhů jsou rozlišovány dva poddruhy, pro druh *L. annotinum* se jedná o poddruhy *L. annotinum* subsp. *annotinum* a *L. annotinum* subsp. *alpestre* (Hartm.) Á. Löve & D. Löve, pro druh *L. clavatum* pak o *L. clavatum* subsp. *clavatum* a *L. clavatum* subsp. *monostachyon* (Hook. & Grev.) Sel.

Z taxonomického hlediska je problematické, že u evropských druhů plavuní neexistuje jednoznačná koncepce v hodnocení taxonomické úrovně. V literatuře je tak možné setkat se jak s hodnocením na poddruhové, tak i na druhové úrovni. *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum* je pak také známé jako *L. dubium* Zoëga (Phillip 1978) a *L. clavatum* subsp. *monostachyon* jako *L. lagopus* (Laest. ex C. Hartm.) G. Zinserl. ex Kuzen (Rumsey 2007, Szcześniak et al. 2023). Možné je však setkat se i s konceptem variet: *L. clavatum* var. *monostachyon* Hook. & Grev. (Robinson 1901, Fernald & Bissell 1910) a *L. annotinum* var. *alpestre* (Hans 1916, Leopold 1956). Přesvědčivé argumenty, které by taxonomické vztahy u evropských plavuní řešily, však stále chybí.

Taxony v rámci zkoumaných druhů plavuní se mohly v průběhu evoluce oddělit například mutací genomu, či polyploidizací, což je proces představující multiplikaci genomu v průběhu evoluce (Grant 1981, Soltis et al. 2004) široce se vyskytující u kapradin (Chao et al. 2012, Wang et al. 2020, Chen et al. 2023) a krytosemenných rostlin (Leitch et al. 1997, Soltis et al. 2009, Wu et al. 2020). U homosporických plavuní však zůstává rozsah těchto mechanismů pouze omezeně známý. Na tuto možnou teorii speciace (genomové multiplikace) ukazuje například práce Takamiya & Tanaka (1982), kdy byly v Japonsku objeveny v rámci druhu *L. clavatum* různé ploidní úrovně – kromě diploidních rostlin ($2n=68$), byly popsány i triploidní ($2n=102$) a tetraploidní rostliny ($2n=136$) (Takamiya & Tanaka 1982).

Dosud udávaná chromozomová čísla plavuní z Evropy však naznačují výskyt pouze diploidních rostlin (Löve & Löve 1966, Teppner 1979, Øllgaard 1987). Podle japonských autorů lze rostliny s různou ploidií rozlišit morfologicky na základě délky stopky strobilu (Takamiya & Tanaka 1982, Takamiya 1989).

V navazující práci polských kolegů byly sice popsány rostliny s rozdílnou délkou stopky strobilu, všechny zkoumané rostliny se však ukázaly jako diploidní. Korelace délky stopky a znásobení chromozomové sádky se tedy experimentálně nepotvrdila (Śliwińska-Wyrzychowska et al. 2017). Studie se však omezovala pouze na dvě lokality v jižním Polsku.

V rámci poddruhů jednotlivých druhů evropských plavuní však nalezneme i jiné morfologické rozdíly. *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum* se oproti *L. annotinum* subsp. *alpestre* vyznačuje zejména kvantitativními znaky jako například delšími mikrofyly a strobily. Morfologické rozdíly u subspecií *L. clavatum* jsou pak ještě nápadnější. *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum* má kromě většího vzrůstu také typicky rozvětvenou stopku strobilu, která nese dva výtrusné klasy, oproti tomu *L. clavatum* subsp. *monostachyon* má nevětvenou stopku strobilu nesoucí jediný výtrusný klas. Zatímco nominální taxony se vyskytují téměř v celé Evropě, subspecie *monostachyon* a *alpestre* nalezneme především v severní Skandinávii (Tribsch & Schönswetter 1999, Kukkonen 2000, Tribsch 2000, Szcześniak et al. 2023). Studované druhy navíc vykazují morfologickou variabilitu napříč poddruhy a není jasné do jaké míry jsou morfologické rozdíly v rámci jednotlivých poddruhů podmíněny geneticky, či jsou ovlivněny prostředím, ve kterém se vyskytují.

Předkládaná práce si tak klade za cíl popsat rozdíly mezi jednotlivými taxony na cytologické, molekulární a morfologické úrovni, a to se zaměřením na evropské populace.

2 Literární rešerše

2.1 Plavuňovité rostliny (Lycopodiopsida)

Plavuňovité rostliny jsou raně diverzifikovanou skupinou s fosilním záznamem datujícím se až do doby před 420 miliony let, což z nich tvoří jednu z nejstarších linií cévnatých rostlin vůbec (Field et al. 2015, Zhang & Zhou 2021). V období devonu a karbonu pak dominovaly celosvětové flóře jak svou diverzitou, tak velikostí prýtu. V následujících obdobích však byly nahrazeny dalšími skupinami rostlin jako jsou kapradiny, nahosemenné a krytosemenné rostliny. V dnešní době již tvoří méně než 1 % světové flóry (Field et al. 2015). Těžiště jejich výskytu je v tropech, rozšířeny jsou však na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy (Zhang & Zhou 2021). Diverzitu dnešních plavuní tvoří tři monofyletické řády: Lycopodiales (338 druhů v 16 rodech), Isoëtales (250 druhů) a Selaginellales (700 druhů) (PPG I 2016).

2.2 Evropské plavuně rodu *Lycopodium* a *Spinulum*

Evropské plavuně spadají do řádu Lycopodiales a čeledi Lycopodiaceae, podčeledi Lycopodioideae, která zahrnuje 9 rodů: *Austrolycopodium* Holub, *Dendrolycopodium* A. Haines, *Diphasiastrum* Holub, *Diphasium* C. Presl ex Rothm., *Lycopodiastrum* Holub ex R. D. Dixit, *Lycopodium*, *Pseudodiphasium* Holub, *Pseudolycopodium* Holub a *Spinulum* A. Haines (PPG I 2016). Podle nové klasifikace PPG I (Pteridophyte Phylogeny Group) se studované druhy řadí každý do jiného rodu a to *Lycopodium* (*L. clavatum*) a *Spinulum* (*L. annotinum*).







Plavuně rodu *Lycopodium* a *Spinulum* jsou suchozemské rostliny, tvořící až několik metrů dlouhé plazivé prýty, které se pseudomonopodiálně větví a zakořeňují do substrátu. Postranní větve jsou vystoupavé se spirálovitě uspořádanými mikrofyly. Mikrofyly mají plavuně dimorfické – zatímco zelené trofofyly jsou kopinaté se zvlněným až zubatým okrajem listu, nezelené sporofyly, v jejichž paždí vyrůstá výtrusnice, jsou široce kopinaté až široce vejčité s nápadným blanitým okrajem. Plavuně tvoří výtrusné klasy, které jsou u rodu *Lycopodium* typicky na stopkách, u rodu *Spinulum* pak nasedají rovnou na olistěnou část prýtu. Výtrusy jsou triletní, mají charakteristickou ornamentaci a klíčí po dvou a více letech (Szcześniak et al. 2023). Gametofyt je podzemní, dlouhověký a mykoheterotrofní (Kubát 1988, Kukkonen 2000, Zhang & Iwatsuki 2013, Kaplan et al. 2019, Szcześniak et al. 2023).

V roce 2003 (Haines 2003) byly přeřazeny tři druhy (*L. annotinum*, *L. canadense* a *L. subarcticum*) z rodu *Lycopodium* do nově vzniklého rodu *Spinulum*. Došlo tak podle podobné logiky, jakou byl přeřazen rod *Diphasiastrum* z původního rodu *Lycopodium* (Holub 1975, Wagner 1992), kdy mají morfologicky odlišné druhy stejnou taxonomickou úroveň napříč systémem plavuní (PPG I 2016, Zhang & Zhou 2021, Szcześniak et al. 2023). Morfologické rysy nového rodu *Spinulum* byly převzaty z publikace Øllgaard (1987), kde byly použity pro sekci *annotinum* v rámci rodu *Lycopodium* (Tab. 1).

Mezi rody existují i genetické rozdíly, které potvrzují molekulární analýzy (Wilkstöm & Kenrick 2001, Chen et al. 2021, Herrera et al. 2022). Chen et al. (2021) pak popisuje rod *Lycopodium* a *Spinulum* jako dobře odlišené sesterské klady. Dalším z argumentů je pravděpodobná genetická bariéra, která zabraňuje hybridizaci rodů *Lycopodium* a *Spinulum*, zatímco v rámci známých taxonů rodu *Spinulum* se hybridy vyskytují (Szcześniak et al. 2023).

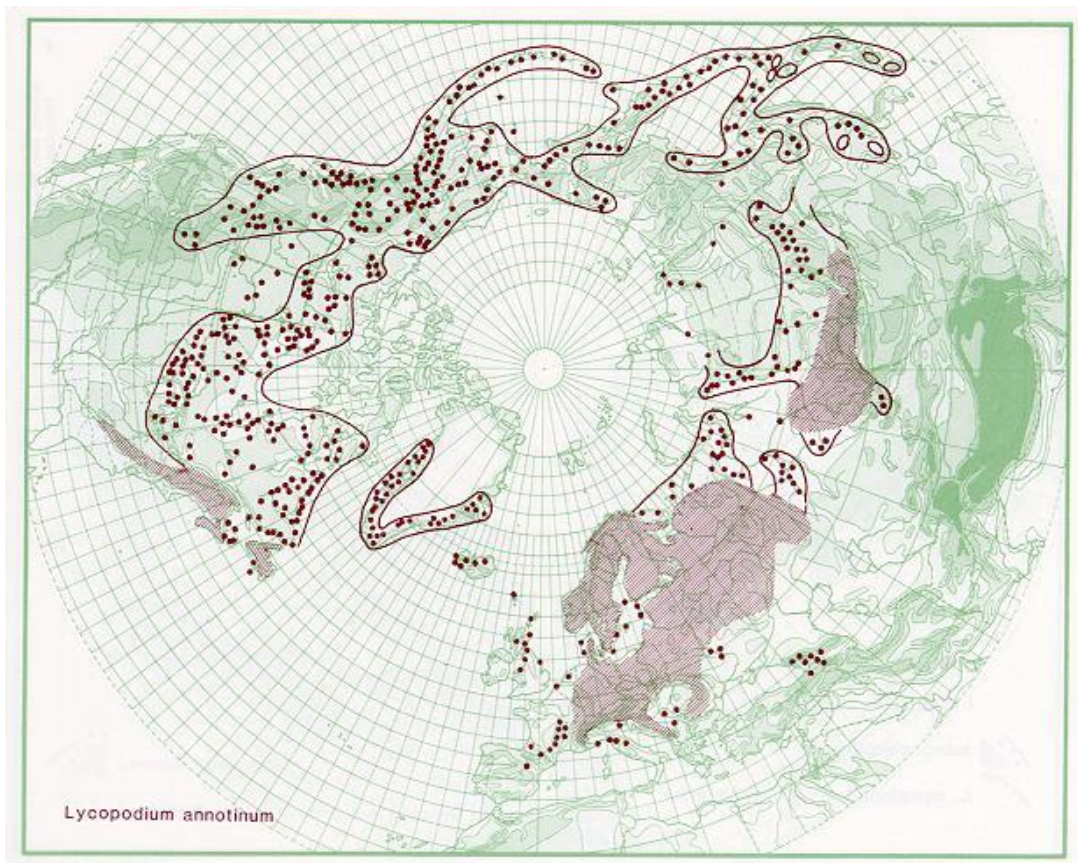
V české botanické nomenklatuře nebyla rodová změna doposud přijata (Danihelka et al. 2012, Kaplan et al. 2019, Kaplan et al. 2019b) a v rámci této diplomové práce bude druh *S. annotinum* v souladu se stávajícím vymezením označován jako *L. annotinum*.

Tab. 1: Morfologické rozdíly mezi rody *Lycopodium* a *Spinulum* podle Øllgaard (1987). Nákresy mikrofylů a výtrusných klasů pocházejí z publikace Kaplan et al. (2019), fotografie spor pocházejí z publikace Chen et al. (2021).

	<i>Lycopodium</i>	<i>Spinulum</i>
prýt	postranní větve anizodichotomické, větvení po celé délce	postranní větve ortotropní, větvení pouze u báze
mikrofyl	přítomnost hyalinních chlupů, či jiných blanitých útvarů na špičce 	špička mikrofyly bez chlupu, či jiných blanitých útvarů 
strobilus	strobilus na větvené, či nevětvené stopce 	strobilus nasedající přímo na olistěnou špičku 
spory	hustě síťovitá povrchová struktura, zřetelná po celém povrchu 	řidče síťovitá povrchová struktura, v okolí jizvy slabě zřetelná 

2.2.1 *Lycopodium annotinum*

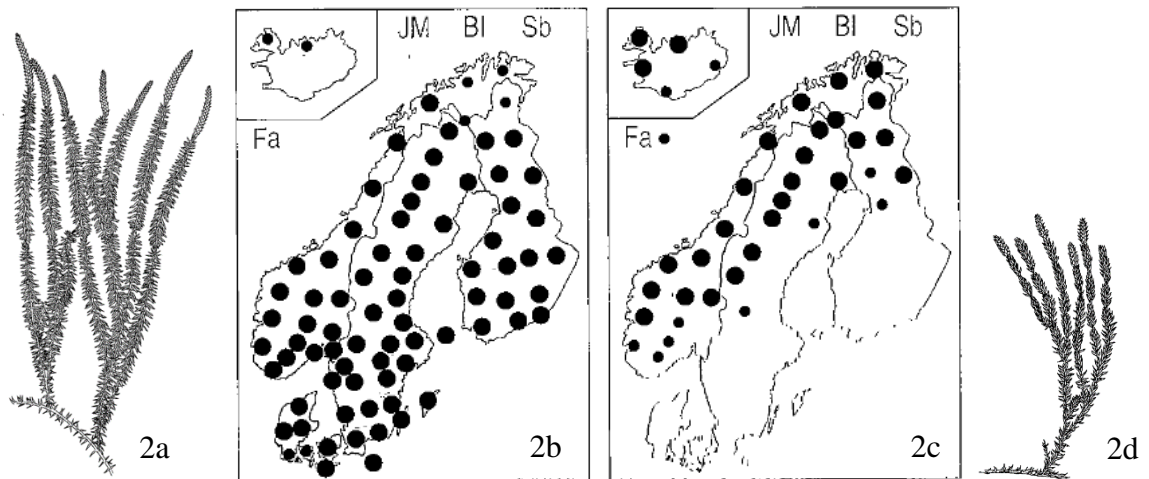
Lycopodium annotinum je suchozemská víceletá rostlina s až dva metry dlouhými plazivými prýty. Stonek je cca 1,5 mm široký. Boční větve jsou vzpřímené, nevětvené či slabě větvené 6–30 cm dlouhé. Mikrofyly jsou čárkovitě kopinaté, 2,5–10 mm dlouhé, až 1,5 mm široké, se zvlněným okrajem, na kterém se mohou vyskytovat zoubky. Postavení mikrofylů je vzpřímené, rovnovážně odstálé, či nazpět ohnuté. Mikrofyly přisedají na lodyhu řídce a lze je vidět. Mladé mikrofyly mohou mít na konci chlup, který však brzy odpadá. Výtrusné klasy jsou jednotlivé, 0,5–4 cm dlouhé a nemají stopku (Kubát 1988, Kukkonen 2000, Zhang & Iwatsuki 2013, Kaplan et al. 2019).



Obr. 1: Mapa rozšíření druhu *Lycopodium annotinum*, převzato z publikace Hultén & Fries (1986).

Druh se vykytuje téměř po celé severní polokouli (Obr. 1). Rozšířen je od nížin po horské oblasti. V jižních oblastech je pak jeho výskyt soustředěn do hor. *Lycopodium annotinum* se v mírném pásmu vyskytuje především v podhorských a horských oblastech, v acidofilních horských a podhorských jehličnatých lesích (vzácně i listnatých), na rašeliništích, v údolí potoků a dnech roklí pískovcových a skalních měst (Kubát 1988, Kukkonen 2000, Kaplan et al. 2019).

V Evropě se v rámci druhu *L. annotinum* vyskytují dva morfologicky odlišné poddruhy (Tab. 2). *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum* (Obr. 2a a 2b) a *L. annotinum* subsp. *alpestre* (Obr. 2c a 2d). Druhý ze zmíněných poddruhů se vyskytuje pouze v cirkum-polární oblasti. V nižších zeměpisných šířkách byl pak poddruh *L. annotinum* subsp. *alpestre* zaznamenán z vysokohorských oblastí, například z Alp, později však byl jeho výskyt vyvrácen. (Kukkonen 2000, Tribsch 2000).



Obr. 2: Nákresy a výskyt poddruhů *Lycopodium annotinum* ve Skandinávii. 2a: Nákres rostliny *L. annotinum* subsp. *annotinum*. 2b: Mapka rozšíření *L. annotinum* subsp. *annotinum* ve Skandinávii. 2c: Mapka rozšíření *L. annotinum* subsp. *alpestre* ve Skandinávii. 2d: Nákres rostliny *L. annotinum* subsp. *alpestre*. Převzato z publikace Kukkonen (2000).

Česká literatura se pak věnuje pouze poddruhu *L. annotinum* subsp. *annotinum* z důvodu, že výskyt severského poddruhu *L. annotinum* subsp. *alpestre* se na našem území nepředpokládá.

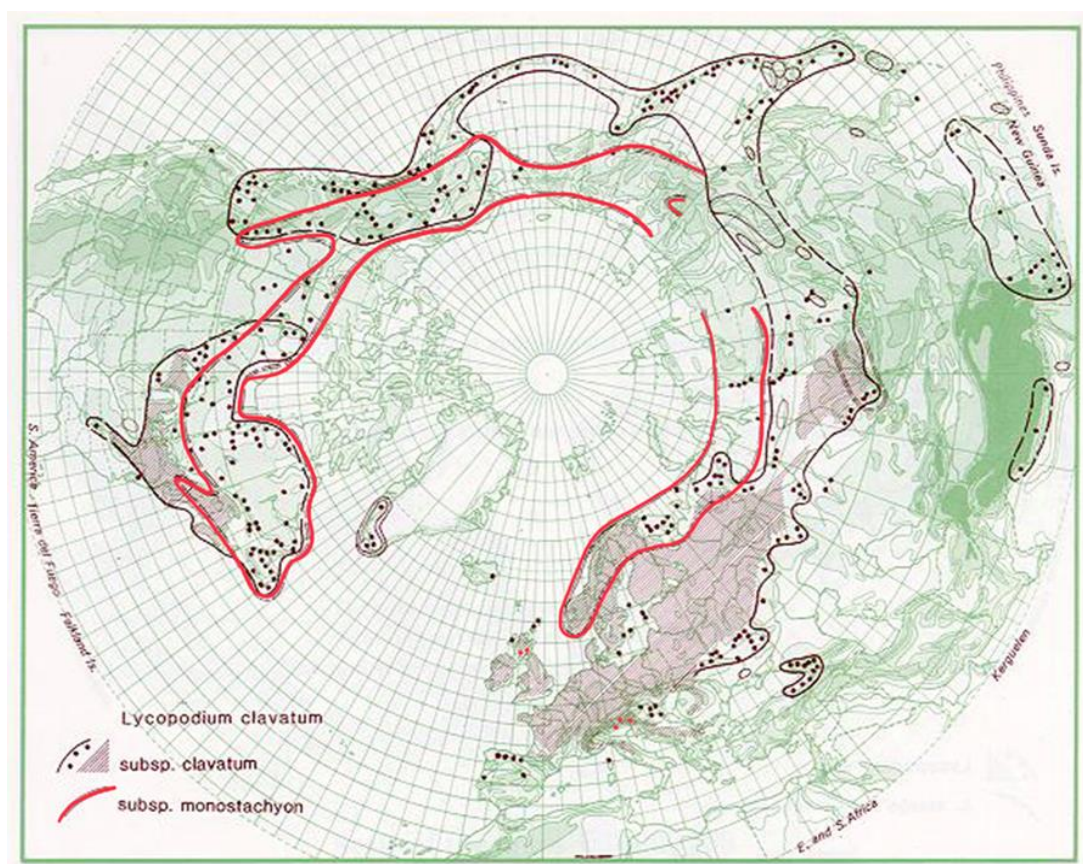
Tab. 2: Hodnoty morfologických znaků *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum* a *L. annotinum* subsp. *alpestre*. Údaje v tabulce jsou syntézou hodnot publikovaných v Kubát (1988), Kukkonen (2000), Tribsch (2000), Fisher et al. (2008).

poddruh	publikace	délka mikrofyly	šířka mikrofyly	postavení mikrofyly	okraj mikrofyly	délka strobilu	délka postranních větví	šířka postranních větví
subsp. <i>annotinum</i>	Kubát 1988	(5)6–9 mm	1–1,25(1,5) mm	rovnovážně odstálé až nazpět ohnuté	celokrajný, častěji drobounce zoubkatý	až 4 cm	10–20(30) cm	
	Kukkonen 2000	4–10 mm		odstálé až dolů ohnuté	pilovitý	1,5–4 cm	10–25 cm	10–16 mm
	Tribsch 2000	(5)6–8(10) mm			zubatý	1,5–3,5(4) cm		10–16 mm
	Fisher et al. 2008	5–8(9) mm		odstátý, téměř vodorovný	jemně vroubkovaný	2–4 cm	10–30 cm	10–30 cm
subsp. <i>alpestre</i>	Kukkonen 2000	2–6 mm		přitisklé, směřující nahoru	celokrajný	0,5–2 cm	4–20 cm	4–10 cm
	Tribsch 2000	3–5(6) mm			(téměř) celokrajný	0,5–1,5(2) cm		3–9(12?) mm

2.2.2 *Lycopodium clavatum*

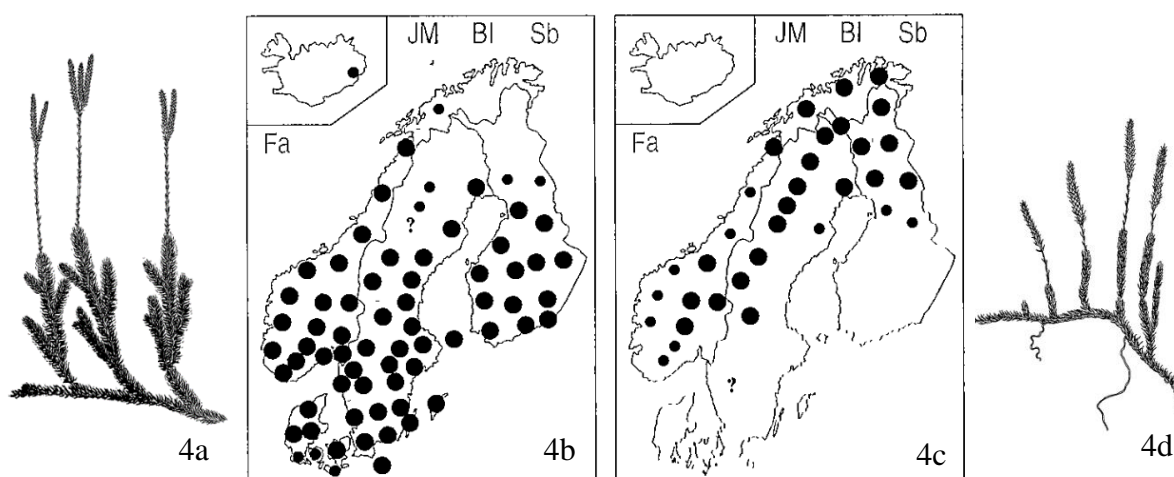
Lycopodium clavatum je suchozemská víceletá rostlina s až více než metr dlouhými plazivými prýty. Stonek je 1,5–2,5 mm široký. Boční větve jsou 3–30 cm dlouhé, vystoupavé až vzprímené, větvené. Mikrofyly jsou čárkovitě kopinaté, (2,5)3–5 mm dlouhé, s celokrajným až zoubkatým okrajem. Na špičce mikrofylů se nachází charakteristický 1,5–4 mm dlouhý bílý chlup. Mikrofyly jsou vzhůru ohnuté, přitisklé až odstávající. Mikrofyly přisedají na bočních větvích hustě a nelze proto vidět stonek. Výtrusné klasy 1–6(8) cm dlouhé nese 2–12(18) cm dlouhá stopka. Na jedné stopce může být 1–4(5) strobilů (Kubát 1988, Kukkonen 2000, Zhang & Iwatsuki 2013, Kaplan et al. 2019).

Druh se vyskytuje v mírném a chladném pásmu Evropy, Asie a Severní Ameriky (Obr. 3). *Lycopodium clavatum* lze nalézt i v Africe a Jižní Americe. V subtropických a tropických oblastech se vykytuje pouze v horách. V mírném pásmu se *L. clavatum* vyskytuje od pahorkatin po horské oblasti. Preferuje otevřenější stanoviště jako jsou vřesoviště, pastviny, smilkové louky, dále acidofilní světlé jehličnaté (vzácně i listnaté) lesy, paseky a lada (Kubát 1988, Kukkonen 2000, Kaplan et al. 2019).



Obr. 3: Mapa rozšíření druhu *Lycopodium clavatum*, převzato z publikace Hultén & Fries (1986), doplněno o výskyt subspecie *monostachyon* z publikací Tribsch & Schönswetter (1999) a Rumsey (2007).

V Evropě se v rámci druhu *L. clavatum* vyskytují dva morfologicky odlišné poddruhy: *L. clavatum* subsp. *clavatum* (Tab. 3, Obr. 4a) a *L. clavatum* subsp. *monostachyon* (Tab. 4, Obr. 4d). Druhý zmíněný taxon se vyskytuje stejně jako *L. annotinum* subsp. *alpestre* v cirkum-polární oblasti. V severních oblastech Skandinávie pak nahrazuje *L. clavatum* subsp. *clavatum* (Obr. 4b a 4c). V nižších zeměpisných šířkách se vyskytuje ve vysokohorském prostředí, např. v Alpách či Karpatech (Tribsch & Schönswetter 1999, Rumsey 2007, Szczęśniak et al. 2023).



Obr. 4: Nákresy a výskyt poddruhů *Lycopodium clavatum* ve Skandinávii. 4a: Nákres *L. clavatum* subsp. *clavatum*. 4b: Mapka rozšíření *L. clavatum* subsp. *clavatum* ve Skandinávii. 4c: Mapka rozšíření *L. clavatum* subsp. *monostachyon* ve Skandinávii. 4d: Nákres *L. clavatum* subsp. *monostachyon*. Převzato z publikace Kukkonen (2000).

Česká literatura se pak věnuje pouze poddruhu *L. clavatum* subsp. *clavatum* z důvodu, že se výskyt severského poddruhu *L. clavatum* subsp. *monostachyon* na našem území nepředpokládá. V Květeně České republiky z roku 1988 (Kubát et al. 1988) ale nalezneme zmínky o variabilitě *L. clavatum* na našem území. Kubát (1988) popisuje rostliny s jediným stopkatým klasem jako varietu *monodactylon* Podp. (též z naší literatury uváděnou jako forma *monostachyum* Desv.). Oproti tomu *L. clavatum* subsp. *monostachyon* popisuje Kubát (1988) jako rostliny s přisedlým či krátce stopkatým klasem. V nižších polohách rostliny s krátce stopkatým jediným klasem nazývá jako varietu *pseudo-annotinum* A. et Gr.

Tab. 3: Hodnoty morfologických znaků *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*. Údaje v tabulce jsou syntézou hodnot publikovaných v Kubát (1988), Tribsch & Schönswetter (1999), Kukkonen (2000), Rumsey (2007), Fisher et al. (2008). * měřeno bez hyalinního chlupu na špičce mikrofyly.

poddruh	publikace	délka mikrofyly	postavení mikrofylů	okraj mikrofyly	počet strobilů	délka strobilu	délka stopky strobilu	délka postranních větví	šířka postranních větví
subsp. <i>clavatum</i>	Kubát 1988	3–5 mm	vzhůru ohnuté až rovnovážně odstávající	celokrajné, nebo jemně zoubkaté	(1)2–3(5)	až 8 cm	2–18 cm		
	Tribsch & Schönswetter 1999	4–5(6)* mm	>45°	(30)70–100 % mikrofylů je zubatých	(1)2–3(7)	(1,5)2–6(8) cm	(2)4–12(15) cm		(4)5–10(12) mm
	Kukkonen 2000	3–5 mm	odstávající	téměř celokrajný	2–4	(1,8)2,5–4,5(6) cm	(2,5)3–8(13) cm	15–30 cm	7–11 mm
	Rumsey 2007	4–6* mm	ostávající až vzhůru ohnutý		(1)2–3(5)		(2,5)3–7(13) cm		
	Fisher et al. 2008	4–5 mm	vzhůru ohnutý	jemně zubatý	(1)2–3(5)	3–6 cm	5–10(18) cm	(5)10–20(30) cm	

Tab. 4: Hodnoty morfologických znaků *Lycopodium clavatum* subsp. *monostachyon*. Údaje v tabulce jsou syntézou hodnot publikovaných v Kubát (1988), Tribsch & Schönswetter (1999), Kukkonen (2000), Rumsey (2007), Fisher et al. (2008). * měřeno bez hyalinního chlupu na špičce mikrofyly.

poddruh	publikace	délka mikrofyly	postavení mikrofyly	okraj mikrofyly	počet strobilů	délka strobilu	délka stopky strobilu	délka postranních větví	šířka postranních větví
subsp. <i>monostachyon</i>	Tribsch & Schönswetter 1999	(2)3–4* mm	<45°	0–20(40) % mikrofyly je zubatých	1 (2)	(0,5)1–2,5 cm	0–2(3) cm		(2)3–5(6) mm
	Kukkonen 2000	2,5–3,5 mm	přitisklé, mírně odstávající	celokrajný, občas mírně zoubkatý	1 (2)	(1)1,5–3(3,5) cm	(0)1–3(4,5) cm	3–10 cm	5–7 mm
	Rumsey 2007	3–5* mm	přitisklý, vzhůru ohnutý		1 (2)		0–1,2 cm		
	Fisher et al. 2008	3–6 mm	přitisklé, vzhůru ohnuté	často jemně zoubkaté	1	1–2 cm	až 2 cm	5–10(15) cm	

2.2.3 Morfologická plasticita plavuní

Morfologie plavuňovitých rostlin nemusí být podmíněna pouze rozdílným taxonomickým hodnocením založeným na genetické diverzitě, ale jejich morfologie může být spoluutvářena i prostředím (Beitel 1979). Mezi faktory prostředí ovlivňující morfologii rostlin patří například intenzita a délka trvání světla, potažmo UV záření, exponovanost stanoviště s ohledem na vítr, mráz, sněhovou pokrývku, ale i samotné mikrostanoviště (Bliss 1962, Beitel 1979).

O morfologické plasticitě se hovoří u různých skupin homosporických plavuní (Beitel 1979). U vranců (*Huperzia*) jsou rostliny ve vyšších nadmořských výškách a na exponovaných stanovištích nižší, kompaktnější, jejich mikrofyly jsou přitisklejší a barva spíše do žluta (Wagner & Beitel 1993, Kukkonen 2000, Aiken et al. 2007). Podobná tvrzení se uvádějí i u rodu *Diphasiastrum* (Beitel 1979, Kukkonen (2000) a *Lycopodium* (Beitel 1979). Relevantní vědecké práce podložené daty však u těchto rodů chybí a z plavuňovitých rostlin je nalezneme pouze u šídlatek (*Isoetes*), kdy bylo zjištěno, že většina vegetativních orgánů je vysoce plastická a silně odráží podmínky prostředí, ve kterém rostlina žije (Kott & Britton 1985, Cavalheiro-Filho et al. 2021). Prostředí může mít dále vliv i na reprodukční strategie, kdy u vranců (*Huperzia*) s přibývajícím nadmořskou výškou stoupá počet gem na jednotlivých rostlinách a převládá vegetativní rozmnožování (Gola 2008).

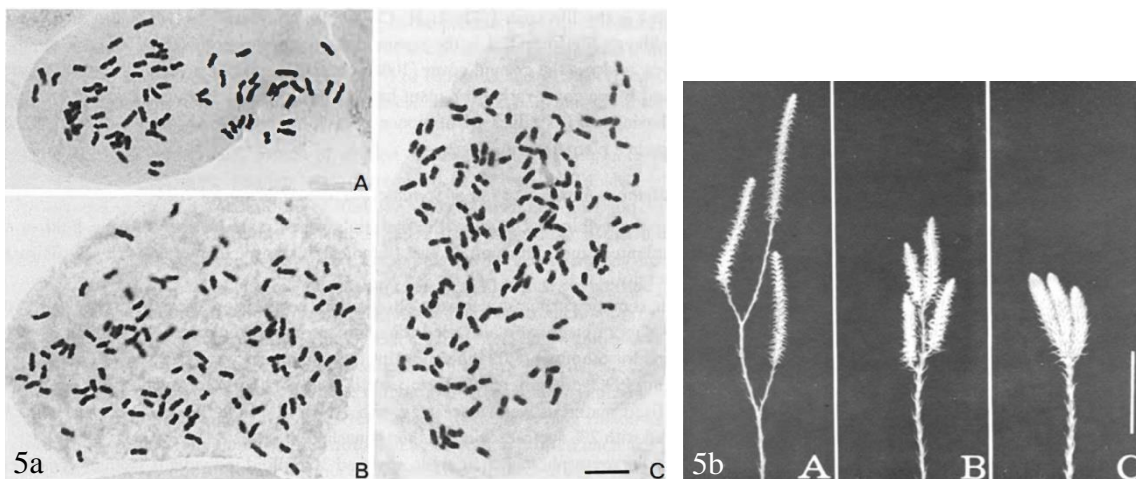
U studovaných druhů plavuní nalezneme rovněž širokou plasticitu morfologických znaků, což vnáší problémy do jejich taxonomie (Śliwińska-Wyrzychowska et al. 2017). Rostliny rostoucí v severní Skandinávii ve vyšších nadmořských výškách jsou spíše nižší, mají světlejší barvu a přitisklé mikrofyly, oproti tomu rostliny ze skandinávských nížin jsou větší, zelenější a mikrofyly jsou spíše odstálé. Avšak obě výše popsané varianty rostlin je možné nalézt na i stejných stanovištích, a tak se předpokládá, že morfologické rozdíly jsou podmíněny geneticky a jedná se o rozdílné poddruhy (Kukkonen 2000). Poddruhový koncept však plně nevysvětluje výskyt, přechodných typů rostlin a není tedy známo, do jaké míry má prostředí vliv na morfologii jednotlivých plavuní, přičemž relevantní eko-fyziologické studie testující morfologickou odpověď rostlin na rozdílné podmínky prostředí chybí.

2.2.4 Cytotypová variabilita zkoumaných druhů plavuní

U plavuní je pro haploidní počet běžně udáváno 34 chromozomů, pro diploidní (somatický) počet tedy 68 chromozomů (Manton 1950, Löve & Löve 1966, Tsai & Shieh 1989). Zejména ve starší literatuře lze najít i jiné chromozomové počty, například v Ehrenberg (1945) udává somatický chromozomový počet 66 pro *L. annotinum* a 58 pro *L. clavatum*. Hadač & Hašková (1956) pak udávají haploidní chromozomový počet pro *L. annotinum* 23–26. Je však možné, že se zde může jednat o nepřesně stanovené počty.

Jiné počty byly také odhaleny v Japonsku, kde byli nalezeni jedinci *L. clavatum* s chromozomovým číslem nejenom $2n = 68$ (diploidi), ale i $2n = 102$ (triploidi) a $2n = 136$ (tetraploidi) (Takamiya & Tanaka 1982). V práci Takamiya (1989) byl dataset rozšířen na 729 jedinců ze 172 lokalit (z původních 121 jedinců (Takamiya & Tanaka 1982)), z nichž bylo 359 jedinců diploidních ($2n = 68$), 172 jedinců triploidních ($2n = 102$) a 189 jedinců tetraploidních ($2n = 136$). Různé chromozomové počty (Obr. 5a) se projevily také na morfologii rostliny (Takamiya & Tanaka 1982), kdy se vzrůstajícím chromozomovým počtem se naměřená délka stopky strobilu zkracovala (Obr. 5b).

V roce 2017 byl proveden obdobný výzkum na dvou lokalitách v jižním Polsku (Śliwińska-Wyrzychowska et al. 2017). I přes značnou morfologickou variabilitu měřených stopek strobilů měly všechny analyzované rostliny pro $2n = 68$ chromozomů (Tab. 5). Vazba délky stopky na ploidii rostlin tedy nebyla potvrzena.



Obr. 5a a 5b: Různé chromozomové počty pro druh *Lycopodium clavatum* a jejich vliv na morfologii strobilu. 5a: Chromozomové počty *L. clavatum*. A: $2n=68$, B: $2n=102$, C: $n=136$. 5b: Morfologické rozdíly mezi jedinci s různým počtem chromozomových sádek, A: 2x, B: 3x, C: 4x. Převzato z publikace Takamiya (1982).

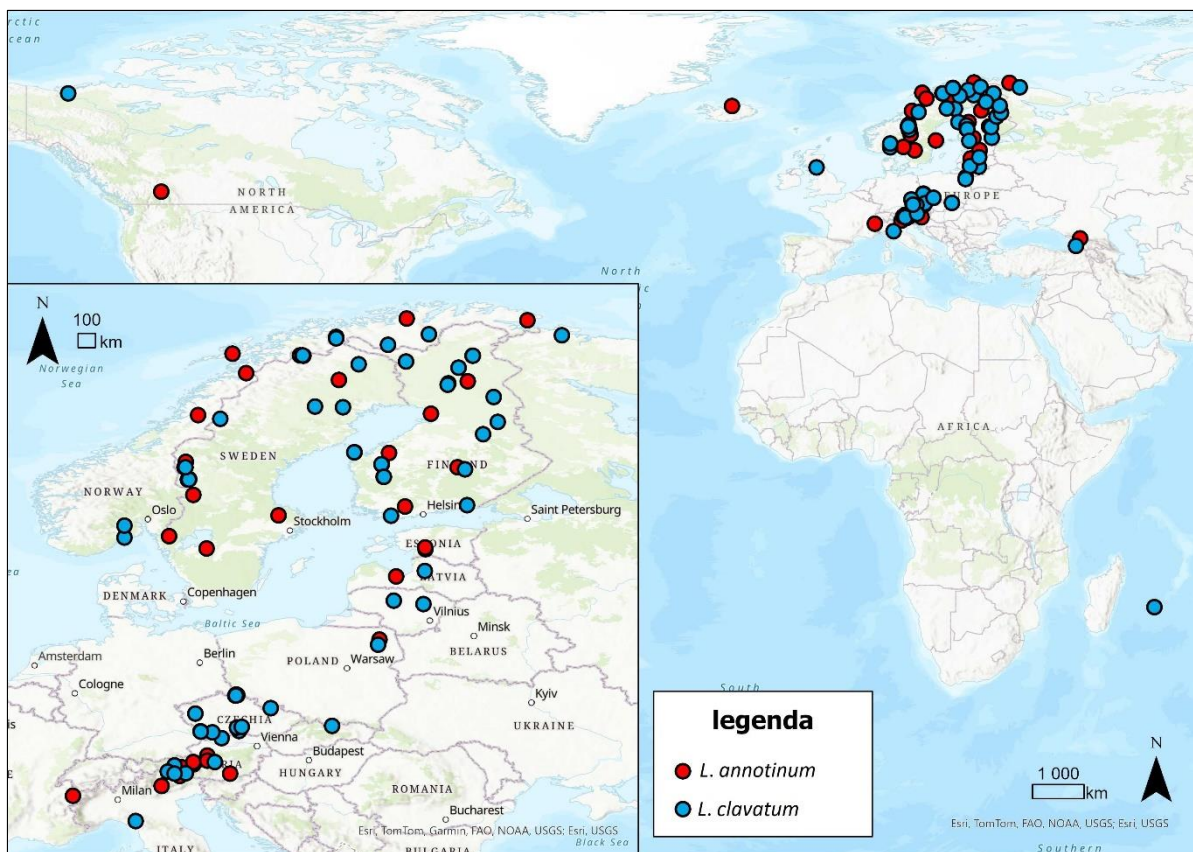
Tab. 5: Přehled chromozomových čísel pro druhy *Lycopodium annotinum* a *L. clavatum* dostupných v literatuře. Haploidní, nebo diploidní chromozomové počty jsou uvedeny podle toho, jak je uváděla daná publikace. V případě, že byl chromozomový počet udáván pro konkrétní poddruh, je daná subspecie uvedena ve sloupci poddruh.

taxon	n	2n	publikace	poddruh
<i>L. annotinum</i>		66	Ehrenberg 1945	-
		68	Manton 1950	-
	23–26		Hadač & Hašková 1956	-
		68	Löve & Löve 1958	subsp. <i>annotinum</i>
		68	Löve & Löve 1958	subsp. <i>alpestre</i>
	34		Sorsa 1961	-
		68	Löve & Löve 1966	subsp. <i>annotinum</i>
		68	Löve & Löve 1966	subsp. <i>alpestre</i>
		68	Tsai & Shieh 1989	-
		68	Takamiya 1992	-
<i>L. clavatum</i>		58	Ehrenberg 1945	-
		68	Manton 1950	-
	34		Mehra & Verma 1957	-
		68	Löve & Löve 1958	subsp. <i>monostachyon</i>
	34		Sorsa 1961	-
		68	Löve & Löve 1966	subsp. <i>clavatum</i>
		68	Löve & Löve 1966	subsp. <i>monostachyon</i>
	34		Teppner 1980	subsp. <i>monostachyon</i>
		68	Takamiya & Tanaka 1982 (Takamiya 1989)	-
		102	Takamiya & Tanaka 1982 (Takamiya 1989)	-
		136	Takamiya & Tanaka 1982 (Takamiya 1989)	-
	34		Øllgaard 1987	subsp. <i>clavatum</i>
	34		Tsai & Shieh 1989	-
		68	Śliwińska-Wyrzychowska et al. 2017	-

3 Metodika

3.1 Sběr dat

Pro diplomovou práci bylo celkem využito 191 vzorků ze 122 lokalit sesbíraných mezi lety 2014–2023. Pro druh *L. annotinum* bylo použito 92 vzorků ze 77 lokalit (Obr. 6 a 7) a pro druh *L. clavatum* 98 vzorků ze 64 lokalit (Obr. 6 a 8). Nejčastěji se jedná o sběry ze střední a severní Evropy. Další referenční sběry pocházejí například z Velké Británie, Kanady, Ruska, Gruzie a Reunionu. Použité vzorky zahrnují jak gradient zeměpisné šířky, tak nadmořské výšky a zahrnují širokou škálu biotopů, kde se plavuně zkoumaných běžně druhů vyskytují (příloha 1). Vzorky byly sesbírány školitelem, autorkou práce a řadou externích spolupracovníků dodávající vzorky do archivu FerDA (Fern and lycophyte genome databank and silica archive), který se nachází na katedře botaniky PřF JU v Českých Budějovicích (Ekrt & Vejdovová, nepubl.).

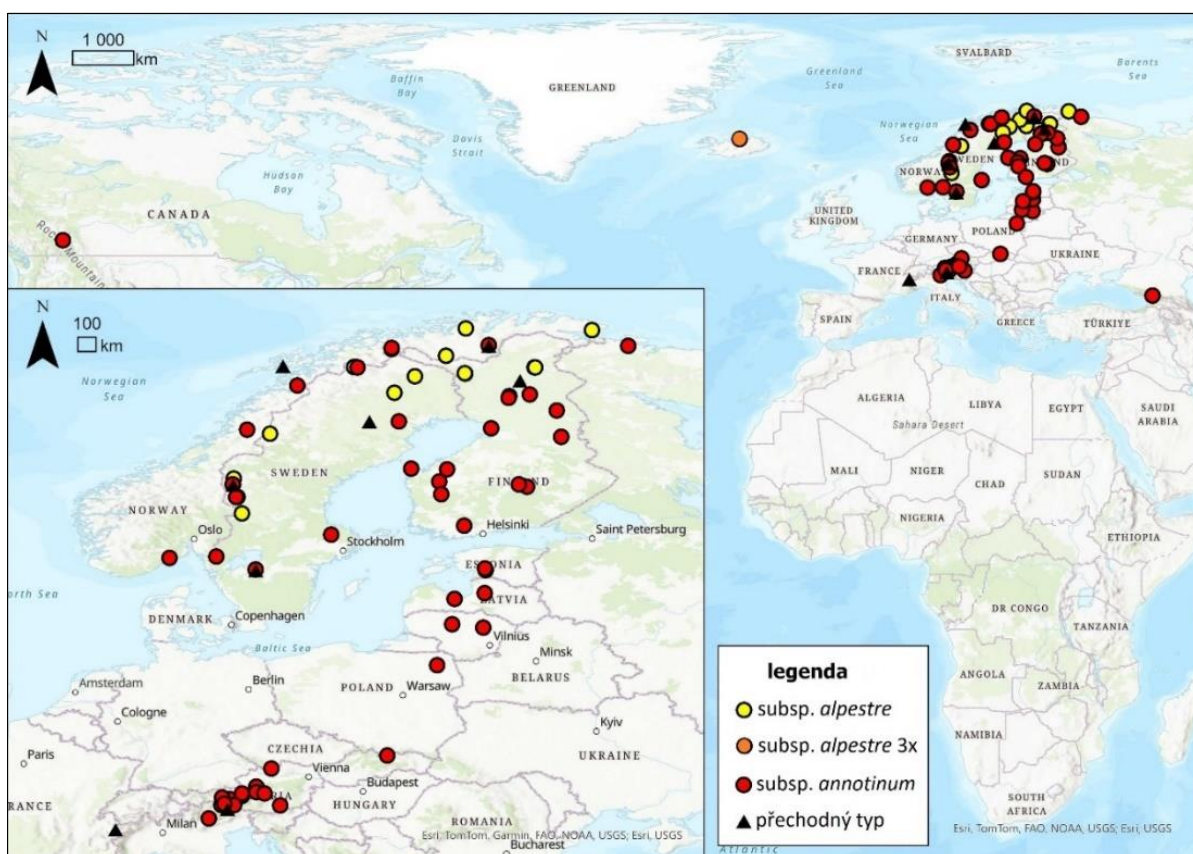


Obr. 6: Mapa vzorků použitých v této diplomové práci s rozlišením na druhy.

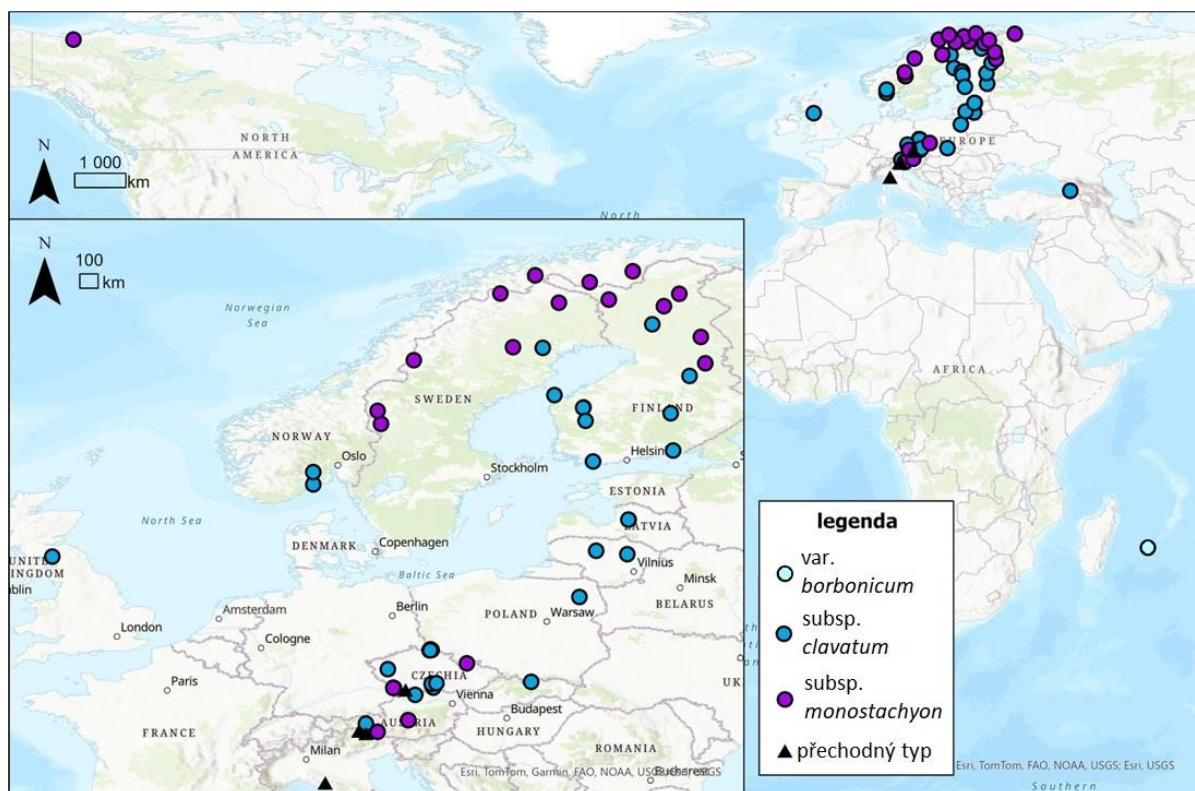
Na jednotlivých lokalitách bylo odebráno 1–5 rostlin na populaci. Vzdálenost mezi odebíranými rostlinami byla podle velikosti populace a vegetativních polykormonů několik metrů. Pokud bylo možno, byly sbírány rostliny s více fertilními prýty. Sebrané rostliny byly po sběru označeny a uloženy do herbáře. Část živé rostliny byla uložena do silikagelu pro analýzy průtokovým cytometrem a molekulární analýzy. U každé lokality sběru byly zaznamenány GPS souřadnice a nadmořská výška.

Herbářové položky jsou uloženy v herbáři katedry botaniky, Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (CBFS). Vzorky v silikagelu jsou uloženy archivu FerDA. Veškeré skeny rostlin v této diplomové práci jsou pořízeny ve stejném měřítku.

Pro účely práce byly jednotlivé poddruhy zkoumaných druhů určeny na základě běžně užívaných morfologických znaků (Tribsch & Schönswetter 1999, Kukkonen 2000, Tribsch 2000, Rumsey 2007). Všechny mapové výstupy byly vytvořeny v programu ArcGIS Pro 3.0.3 (ESRI).



Obr. 7: Mapa vzorků *Lycopodium annotinum* použitých v této diplomové práci s rozlišením na poddruhy a vyznačeným triploidním vzorkem, včetně přechodných typů.



Obr. 8: Mapa vzorků *Lycopodium clavatum* použitých v této diplomové práci s rozlišením na variety a poddruhy, včetně přechodných typů.

3.2 Průtoková cytometrie

Pro stanovení velikosti genomu jednotlivých poddruhů byla použita metoda průtokové cytometrie. Analyzované vzorky pocházely nejčastěji ze živého materiálu, dále z vysušených vzorků v silikagelu a z herbářových položek. Pro práci byl použit protokol s Ottovými pufrý (Otto 1990). Jako interní standardy byly použity *Bellis perennis* ($2C = 3,38$ pg; Schönschwetter et al. 2007) a *Pisum sativum* ($2C = 9,09$ pg; Doležel et al. 1998).

V prvním kroku byla izolována buněčná jádra z mikrofylů. Do Petriho misky byl přidán vzorek (3–5 mikrofylů) a zvolený standard. Následně bylo přidáno 400 μ l pufru Otto I (0,1M kyselina citronová, 0,5% Tween-20; (Otto 1990)) a vzorek byl nasekán žiletkou společně se standardem. Pro odstranění zbytkové tkáně byl vzorek přefiltrován přes nylonovou síťovinu (Uhelon) o velikosti ok 42 μ m. Takto připravený vzorek byl inkubován při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 800 μ l pufru Otto II (0,4M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) s 2-merkptoethanolem (2 mg/ml). Jako barvivo byl použit 4,6-diamidino-2-fenyldol (4 μ g/ml) známý jako DAPI, který se však váže pouze na AT báze, či propidium jodid PI (50 μ g/ml) a RNáza (50 μ g/ml), které barví všechny báze bez rozdílu. Po odstátí byl vzorek měřen pomocí průtokového cytometru.

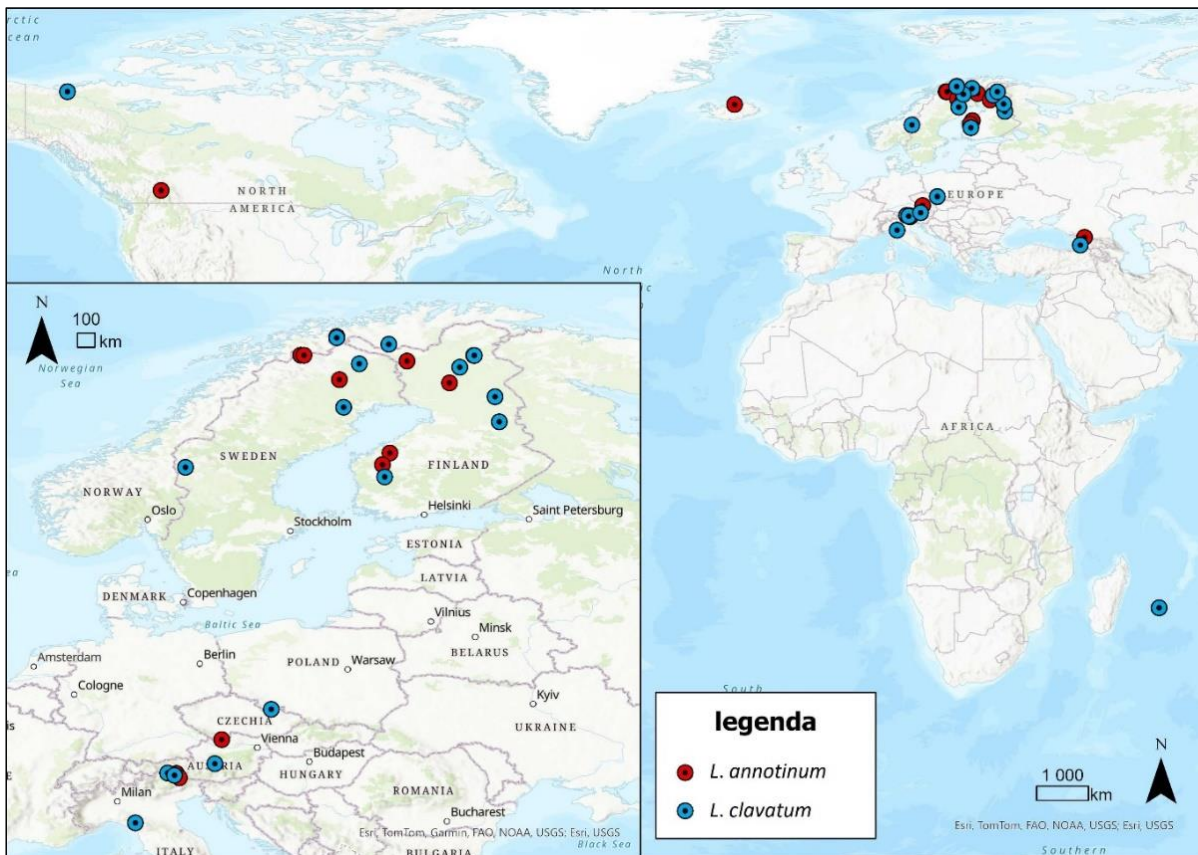
Analýzy vzorků barvených DAPI probíhaly pomocí přístroje CyFlow Space (Sysmex-Partec) s 365 nm UV-LED světelným zdrojem. Intenzita fluorescence byla zaznamenána pro 3000 částic. Pro vzorky barvené PI byl použit přístroj CyFlow Space (Sysmex-Partec) se zeleným laserem (Cobolt Samba 532 nm, 100 mW) a zaznamenaná fluorescence dosahovala 5000 částic. Výsledné histogramy byly vyhodnoceny v programu Flowing Software, verze 2.5.1 (Perttu Terho, University of Turku, freeware).

Pro cytometrické analýzy byly vytvořeny dva datasety: dataset vzorků, pro které byla měřena relativní velikost genomu (barvivo DAPI) a dataset vzorků, pro které byla měřena absolutní velikost genomu (barvivo PI). Preferované bylo použití živého materiálu, v případě, že měření ze živého materiálu nebylo k dispozici bylo použito měření ze silikagelu, či herbáře. Pro oba datasety byly vypočítané popisné statistiky v programu Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Software), v případě datasetu s měřenou relativní velikostí genomu byla vypracována popisná statistika pro oba používané standardy s jejich vzájemným přepočtem dle interní kalibrace.

Data z obou datasetů byla vyhodnocena pomocí analýz variance s Tukeyho testem v programu Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Software). Otestovány tak byly rozdíly ve velikosti genomu mezi jednotlivými poddruhy. Výpočtem podle Šmarda et al. 2008, pak bylo pro rostliny, na kterých byla změřena jak relativní tak absolutní velikost genomu, získáno procentuální zastoupení CG bází. Otestován byl také vliv uchování materiálu pro cytometrická měření na kvalitu analýzy taktéž pomocí analýz variance s Tukeyho testem rovněž v programu Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Software).

3.3 Molekulární metody

Pro molekulární analýzy bylo vybráno celkem 41 rostlin (10 rostlin na poddruh + triploidní jedinec, Obr. 21). Vzorky byly vybrány tak, aby pokrývaly co nejširší geografický gradient dostupných vzorků (Obr. 9). Se vzorkem *L. clavatum* var. *borbonicum* bylo v době provedení molekulárních analýz pracováno jako s poddruhem *L. clavatum* subsp. *clavatum* a nachází se mezi analyzovanými vzorky.



Obr. 9: Mapa vzorků použitých pro molekulární analýzy s rozlišením na druhy.

3.3.1 Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí jednoduché NaOH izolace (Xin et al. 2003; modifikováno). V prvních fázích výzkumu byly odebrány 1–3 mikrofyly pro nalezení optimálního množství DNA ve vzorku. V pozdějších fázích práce byly používány 2 mikrofyly na vzorek, ke kterým bylo přidáno 20 μ l 0,5M NaOH. Odebraný materiál byl drcen pomocí homogenizátoru a sterilního písku. Následně bylo přidáno opět 20 μ l 0,5M NaOH a materiál podle potřeby drcen další 1–2 minuty. Homogenizovaný materiál by poté 2 minuty centrifugován na 13 800 RPM. Vzniklý supernatant byl přenesen do PCR stripu a ředěn 100 mM roztokem Tris-HCl v poměru 1:10. Vzorek byl následně uchováván při -20 °C.

3.3.2 PCR

Získaná DNA byla použita pro amplifikaci dvou chloroplastových a jednoho jaderného ribozomálního úseku za pomoci předem zvolených primerů (Tab. 6). V případě chloroplastové DNA se jednalo o úseky *psbA–trnH*, *trnL* a *trnL–trnF*. Pro amplifikaci úseku *psbA–trnH* byly použity primery *psbA* a *trnH* (Hamilton 1999). Primery pro amplifikaci úseku *trnL* a *trnL–trnF* byly použity podle Taberlet et al. (1991). V případě úseku *trnL* se jednalo o primery Tab. c a Tab. d a u úseku *trnL–trnF* o primery Tab. e a Tab. f. V případě ribozomální jaderné

DNA byl amplifikován úsek ITS (internal transcribed spacer). Úsek byl amplifikován jako celek i po částech ITS1 a ITS2. Pro část ITS1 byla otestovaná kombinace primerů ITS–F (King et al. 2001) a ITS2 (White et al. 1990). Pro úsek ITS2 byly amplifikovány primery ITS3 a ITS4 (White et al. 1990). Pro celý spacer byly otestovány kombinace primerů ITS–F (King et al. 2001) a ITS4 (White et al. 1990), ITS1P (Gulyás et al. 2005) a ITS4 (White et al. 1990), ITS5 a ITS4 (White et al. 1990) a ITS1 (Urbatsch et al. 2000) a ITS4 (White et al. 1990).

Tab. 6: Použité primery pro molekulární analýzy, jejich sekvence a publikace odkud pocházejí.

Název primeru	Sekvence primeru	Publikace
psbA	CGA AGC TCC ATC TAC AAA TGG	Hamilton 1999
trnH	ACT GCC TTG ATC CAC TTG GC	Hamilton 1999
Tab. c	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Taberlet et al. 1991
Tab. d	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	Taberlet et al. 1991
Tab. e	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	Taberlet et al. 1991
Tab. f	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Taberlet et al. 1991
ITS-F	CTC CTT CCT CTA AAT GAT A	King et al. 2001
ITS1	GTC CAC TGA ACC TTA TCA TTT AG	Urbatsch et al. 2000
ITS1P	CCG TAC CAT TTA GAG GAA GGA G	Gulyás et al. 2005
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	White et al. 1990
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	White et al. 1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. 1990
ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	White et al. 1990

Pro jednu PCR reakci bylo použito 5 µl PP Master Mix (Top-Bio), dále 0,6 µl každého primeru, 2,8 µl H₂O a 1 µl izolované DNA (v případě negativní kontroly 1 µl H₂O), v celkovém objemu 10 µl. Pro každý úsek byl zvolen vlastní program.

V případě úseku *psbA–trnH* probíhala počáteční denaturace 3 minuty při 94 °C. Následovalo 50 cyklů, kdy na 30 vteřin dosahovala teplota 94 °C, 30 vteřin 50 °C a po 30 vteřin 72 °C. Extenze na závěr programu probíhala 10 minut při teplotě 72 °C.

U úsecích *trnL* a *trnL–trnF* probíhala reakce podle Testo et al. (2018). Počáteční denaturace probíhala 3 minuty při teplotě 94°C. Následovalo 50 cyklů, kdy 20 vteřin dosahovala teplota 95 °C, 30 vteřin 45 °C a 4 minuty 52 °C. Závěrečná extenze probíhala 7 minut.

U úseku ITS probíhala denaturace při 94 °C 5 minut a následovalo 45 cyklů, kdy 30 vteřin dosahovala teplota 94 °C, 30 vteřin 53 °C a minutu 72 °C. Závěrečná extenze probíhala 10 minut při 72 °C.

V případě použití primeru ITS1 byla reakce upravena podle Urbatsch et al. (2000), kdy denaturace probíhala při 94 °C pět minut, následovalo 30 vteřin při 94 °C, jedna minuta při 52 °C a jeden a půl minuty při 72 °C. Závěrečná extenze cyklu probíhala 7 minut při 72 °C.

3.3.3 Elektroforéza

Po provedené PCR bylo ověřeno její správné proběhnutí pomocí elektroforézy. Do připraveného platička byl napipetován 1 µl nanášecího pufru GelRed sloužící zároveň jako fluorescenční barvivo a 2 µl PCR produktu. Směs byla následně přenesena na 1,5% agarózový gel zalitý TBE puftrem. Dále bylo na gel nanášeno 6 µl 100 pb ladderu. Do vzorků byla také zařazena negativní kontrola pro odhalení případných kontaminací. Samotná elektroforéza probíhala 15–20 minut pod napětím 120V. Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyfocen v UV komoře a vyhodnocen. Při zdařilé PCR reakci obsahoval gel pouze jeden jasně viditelný proužek o správné velikosti.

3.3.4 Sekvence

Pro sekvenaci amplifikovaných úseků bylo do nové 1,5 ml zkumavky bylo přidáno 5 µl forward primeru podle dané reakce, 4 µl H₂O a 1 µl úspěšného PCR produktu. Vzorky byly následně odeslané na zpracování sekvenační firmou GATC Biotech (Eurofins Genomics). PCR produkty nebyly před sekvenováním nijak přečištěny.

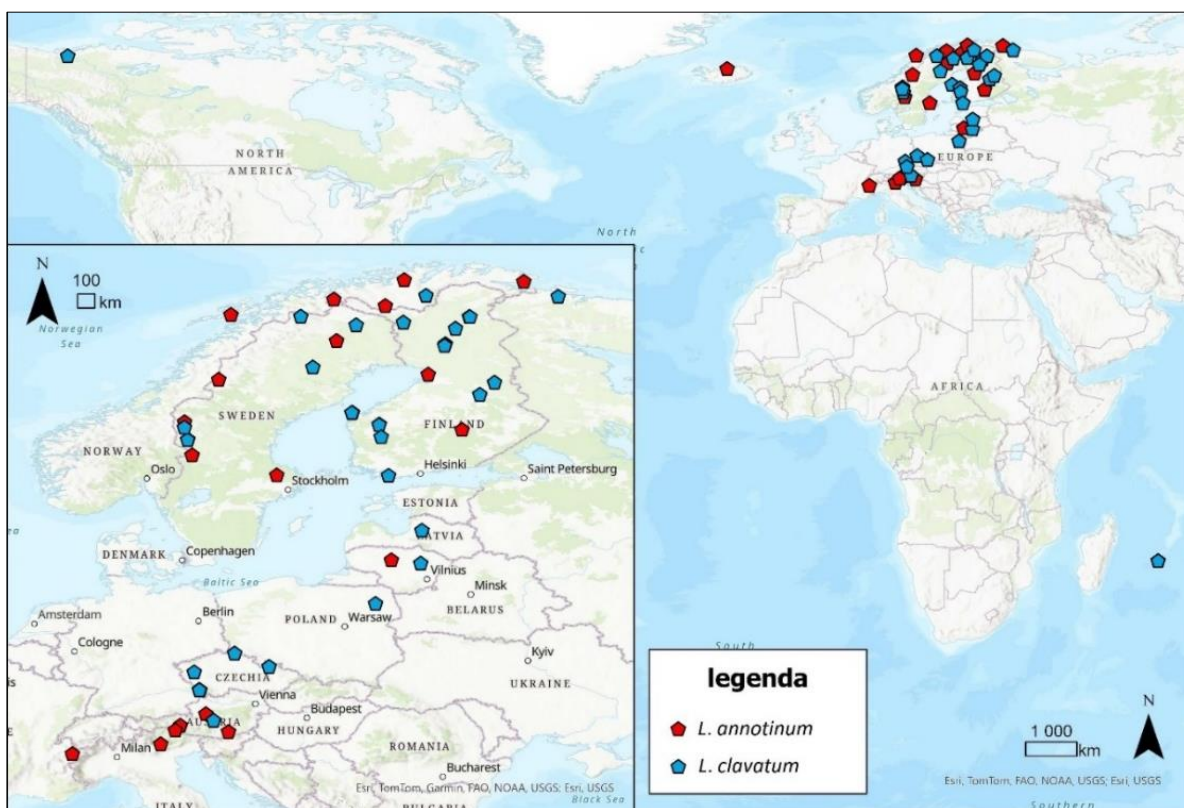
3.3.5 Úprava a vyhodnocení sekvencí

Získané sekvence amplifikovaných úseků byly upraveny v programu GeneStudio verze 2.2.0.0 (GeneStudio, freeware). Začátky a konce sekvencí, které nebylo možné přečíst, byly umazány. Místa v sekvenci, kde došlo k posunu sekvenačního okna, byla jednotlivě vyhodnocena a ručně přepsána na odpovídající bázi. Upravené sekvence byly následně seřazeny v programu BioEdit 7.2.5 (Hall 1999), porovnány mezi sebou a rozřazeny do jednotlivých skupin podle zjištěných haplotypů.

3.4 Morfometrické analýzy

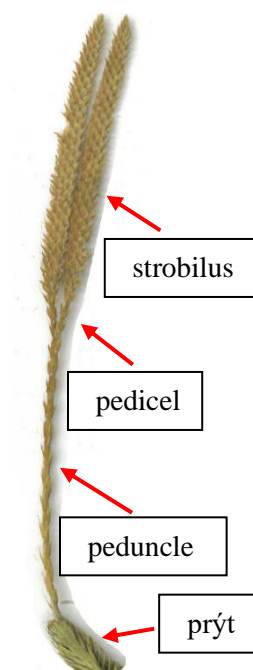
Pro morfometrická měření bylo vybráno celkem 69 vzorků – 15 vzorků na poddruh (Obr. 19, 20, 22 a 23) + 5 vzorků přechodných typů mezi subsp. *annotinum* a *alpestre* (Obr. 47) + 3 vzorky *L. clavatum* var. *borbonicum* (Obr. 24) a jeden triploidní vzorek (Obr. 21). Rostliny zařazené do jednotlivých subspecií byly na měření vybrané tak,

aby odpovídaly popisu daného poddruhu. Měřené rostliny byly zároveň vybírány tak, aby obsáhly co možná nejvíce gradient zeměpisné šířky a nadmořské výšky (Obr. 10).



Obr. 10: Mapa vzorků použitých pro morfometrické analýzy s rozlišením na druhy.

Na celkem 69 rostlinách bylo měřeno 13 kvantitativních a jeden kvalitativní vícestavový znak. Pro každý znak bylo uskutečněno pět měření, která byla následně zprůměrována. Znaky byly zvoleny podle vybraných publikací rozlišujících jednotlivé poddruhy *L. annotinum* a *L. clavatum* (Tribsch & Schönswetter 1999, Kukkonen 2000, Tribsch 2000, Rumsey 2007) a podle zkušeností školitele a konzultantky. Měření byla provedena na suchých, vylisovaných rostlinách. Část znaků byla druhově specifická a z podstaty věci nebyla měřena u obou druhů, např. délka pedunculu/pedicelu (Obr. 11), délka chlupu mikrofyly (Tab. 7) Měřeny byly znaky na mikrofyly, strobilu a prýtu. U znaků měřených na mikrofylech bylo vybráno 5 mikrofyľů nacházejících se ve stejné výšce ve střední části prýtu každé rostliny.

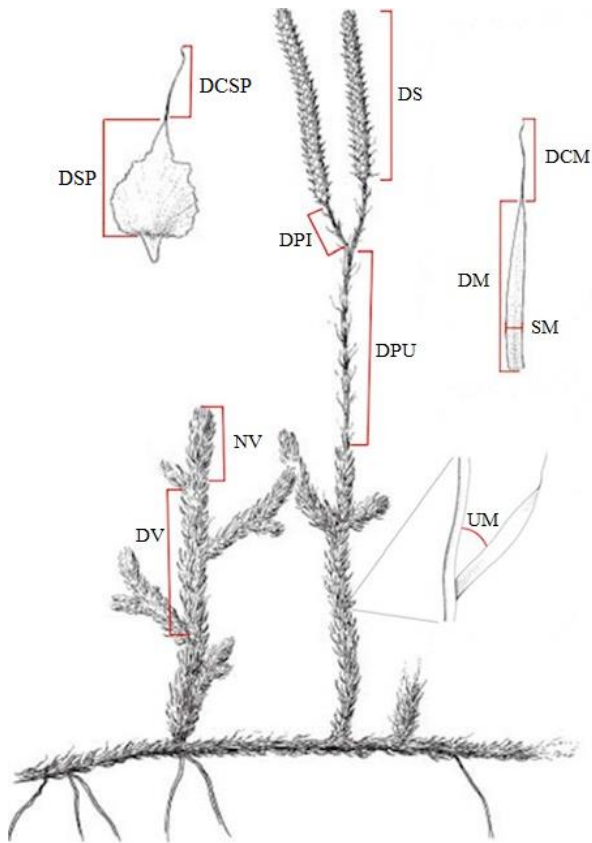


Obr. 11: Výtrusný klas *Lycopodium clavatum* s popsánymi částmi.

Vybrané mikrofyly představovaly mikrofyly průměrné velikosti pro danou rostlinu. Měření probíhalo za pomoci pravítka, úhloměru a mikroskopu Olympus CX31 (Olympus) s kamerou Infinity I Lumenera (Lumenera Corporation) v programu QuickPhoto Camera.

Délka mikrofyly (DM; Obr. 12) byla měřena pomocí pravítka od báze mikrofyly nasedající na lodyžku po vrchol mikrofyly i s chlupem. Šířka mikrofyly (SM; Obr. 12) byla měřena pomocí mikroskopu s kamerou v nejširším místě mikrofyly. Úhel mikrofyly (UM, Obr. 12) byl měřen pravítkem a úhloměrem. Jednalo se o úhel svírající mikrofyl s lodyžkou na pěti mikrofylech. Špička mikrofyly (SPM; Obr. 13 a 14) byla měřena pouze u druhu *L. annotinuma* a to pomocí mikroskopu. Jednalo se o vrchol mikrofyly, který byl oproti okolní tkáni tvořen méně vrstvami buněk a procházel jím tak jasně spodní osvit mikroskopu. Délka chlupu na mikrofyly (DCM; Obr. 12) byla měřena pouze u druhu *L. clavatum*, měřen byl chlup nacházející se na vrcholu mikrofyly od místa nejpatrnějšího zúžení po vrchol chlupu. Znak byl měřen mikroskopem s kamerou pomocí měřicího software.

Pro získání počtu strobilů (PS) byl počítán počet strobilů na jeden peduncle. V případě, že rostlina neobsahovala dostatečné množství strobilů, bylo získáno méně hodnot. Významný je tento určovací znak zejména pro subspecie druhu *L. clavatum*, v případě *L. annotinum* se výskyt více než jednoho strobilu nepředpokládá. Délka strobilu (DS; Obr. 12) byla měřena na každé rostlině na pěti strobilech pravítkem, měřena byla od báze strobilu po jeho vrchol. Délka pedunculu (DPU; Obr. 12) byla měřena od zeleného vrcholu prýtu po rozvětvení na stopce pomocí pravítka. Délka pedicelu (DPI; Obr. 12) byla měřena pomocí pravítka od rozvětvení na stopce strobilu po bázi strobilu. Délka sporofyly (DSP) byla měřena pomocí mikroskopu s kamerou a měřícím software. Z různých strobilů bylo pinzetou opatrně vytrženo 5 sporofylů a ty následně změřeny bez chlupu vyskytujícím se na jeho vrcholu. Délka chlupu sporofyly (DCSP; Obr. 12) byla měřena opět pomocí měřicího software. Měřena byla od vrcholu sporofyly v místě nejpatrnějšího zúžení přechodu mezi vlastním sporofylem a chlupem až po vrchol chlupu. Nejvyšší větvení (NV; Obr. 12) bylo měřeno pravítkem od vrcholu prýtu po nejvyšší větvení lodyžky. Druhé větvení (DV; Obr. 12) bylo měřeno pravítkem od nejvyššího větvení prýtu, po další větvení nacházející se níže na lodyžce.



Obr. 12: Nákres použitých znaků (převzato z E-Flora BC, upraveno). Zkratky znaků viz. Tab. 7.

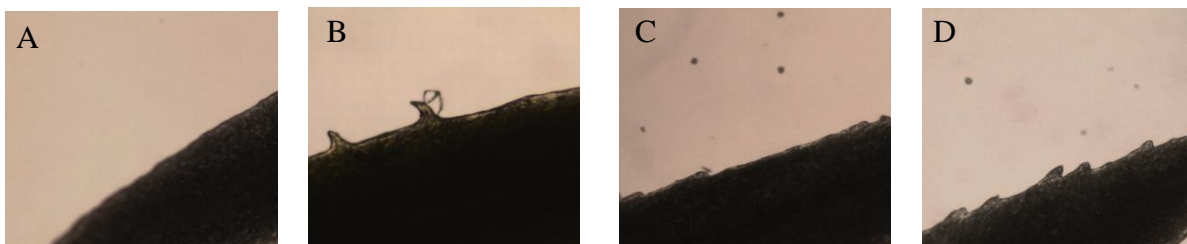


Obr. 13: Detail znaku špička mikrofyly shora u *Lycopodium annotinum* (autor: Stefan Lefnaer).



Obr. 14: Detail znaku špička mikrofyly z boku u *Lycopodium annotinum* (autor: Stefan Lefnaer).

Okraj mikrofyly (OM; Obr. 15–18) je jediný měřený kvalitativní znak. Jeho hodnota byla odvozována na pěti mikrofylech na rostlinu na škále 1–4. Přičemž 1= zvlněný okraj mikrofyly, 2= ostnitě zubatý okraj mikrofyly, 3= zubatý okraj mikrofyly, 4= pilovitý okraj mikrofyly. Za zvlněný byl mikrofyl považován v případě, že se na něm nenacházely žádné ostnitě výstupky, ani zuby. Ostnitě zubatý okraj byl zapsán v případě, že se na okraji jedné poloviny mikrofyly nacházel alespoň jeden ostnitý výstupek. Jako zubatý byl označen okraj, na kterém byly místy zuby, které však nebyly zpětně otočené a zároveň okraj nebyl souvisle pilovitý. Pilovitý okraj byl nápadně pilovitý po celém obvodu mikrofyly.



Obr. 15–18: Detail okraje mikrofyly u *Lycopodium annotinum* a *Lycopodium clavatum*. A: zvlněný okraj, B: ostnitě zubatý okraj, C: zubatý okraj, D: pilovitý okraj.

Tab. 7: Znaký použité pro morfometrické analýzy v této práci včetně jejich zkratk, jednotek, ve kterých byly měřeny a popisu, jakým způsobem byly měřeny.

zkratka	znak	jednotky	popis
DM	délka mikrofyly	cm	délka mikrofyly od báze po vrchol, měřena pravítkem, Obr. 12
SM	šířka mikrofyly	μm	šířka mikrofyly v nejširším místě, měřena pomocí měřicího software, Obr. 12
UM	úhel mikrofyly	stupně	úhel svírající mikrofyl s prýtem, měřeno pravítkem a úhloměrem, Obr. 12
SPM	špička mikrofyly	μm	vrchol mikrofyly, kterým prochází světlo spodního osvitu mikroskopu, měřena pomocí měřicího software, Obr. 13 a 14
DCM	délka chlupu mikrofyly	μm	délka chlupu mikrofyly, měřena pomocí měřicího software, Obr. 12
PS	počet strobilů	ks	počet strobilů na jednom pedunculu, Obr. 12
DS	délka strobilu	cm	délka strobilu od báze po vrchol, měřena pravítkem, Obr. 12
PDU	délka pedunculu	cm	délka stopky strobilu od zeleného vrcholu rostliny po větvení stopky, měřeno pomocí pravítka, Obr. 12
PDI	délka pedicelu	cm	délka stopky strobilu od větvení po bázi strobilu, měřeno pomocí pravítka, Obr. 12
DSP	délka sporofyly	μm	délka sporofyly bez chlupu na jeho vrcholu, měřena pomocí měřicího software, Obr. 12
DCSP	délka chlupu sporofyly	μm	délka chlupu sporofytu, měřena pomocí měřicího software, Obr. 12
NV	nejvyšší větvení	cm	délka prýtu od vrcholu k nejvyššímu větvení na rostlině, měřena pravítkem, Obr. 12
DV	druhé nejvyšší větvení	cm	délka prýtu od nejvyššího větvení po druhé nejvyšší větvení na rostlině, měřena pravítkem, Obr. 12
OM	okraj mikrofyly	stupnice 1–4	okraj mikrofyly na škále 1 (zvlněný) – 4 (pilovitý), Obr. 15–18

Základní popisné statistiky morfologických znaků (průměry, mediány, směrodatné odchylky a další) byly provedeny v programu Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Software). Dále byly provedeny analýzy rozptylu a post hoc analýzy rovněž v programu Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Software). Pro sestrojení mnohorozměrných statistických analýz byl použit program Canoco 5 (Šmilauer & Lepš 2014). Sestrojena byla také korelační matice a na základě Spearmanova koeficientu byla zjištěna korelace mezi jednotlivými morfologickými znaky. V případě zjištění velmi těsné korelace, koeficient vyšší než $|0,90|$, byl jeden z korelovaných znaků vyrazen z následných analýz. Korelační matice byla sestrojena v programu Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Software).

Pro morfometrické analýzy byly použity tři základní datasety – dataset společných znaků druhů a jejich poddruhů (68 rostlin), dataset znaků měřených u *L. annotinum* (36 rostlin) a dataset znaků měřených u *L. clavatum* (32 rostlin).

Pro zjištění morfologické podobnosti/rozdílnosti na základě měřených znaků jednotlivých poddruhů byla provedena analýza hlavních komponent (PCA). Jako operativní taxonomické jednotky bylo použito zařazení do poddruhů. Analýzy byly provedeny jak na výše popsáných základních datasetech, tak byly vytvořeny analýzy bez dvou skupin znaků – znaků na strobilu (PS, DS, DPU, DPI) a znaků na mikrofyly (DM, SM, UM), aby bylo ověřeno, zda lze jednotlivé poddruhy od sebe rozeznat i za pomoci jiných než běžně užívaných znaků. Ze společných analýz a analýz pro *L. clavatum* byl odebrán sterilní vzorek var. *borbonicum*. Celkem bylo provedeno sedm analýz hlavních komponent.

V rámci práce nebyla provedena lineární ani klasifikační diskriminační analýza, z důvodu, že rozdělení rostlin do jednotlivých poddruhů bylo založeno pouze na expertním určení dle morfologie a není podloženo statisticky.



Obr. 19: *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum* ze Švédska (Uppsala), ID vzorku: 18-88 (Příloha 1).



L. annot. alpestre
viz LE @ 4333
Rusko
Kola

Obr. 20: *Lycopodium annotinum* subsp. *alpestre* z Ruska (Kola), ID vzorku: LE 4333 (Příloha 1).



Obr. 21: *Lycopodium annotinum* subsp. *alpestre*, triploid z Islandu (Grenivík), ID vzorku: Čejková-Island (Příloha 1).



Obr. 22: *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum* z Finska (Kontiomäki). ID vzorku: 21-206 (Příloha 1).



Obr. 23: *Lycopodium clavatum* subsp. *monostachyon* z Finska (Suomussalmi), ID vzorku: 21-207 (Příloha 1).



Obr. 24: *Lycopodium clavatum* var. *borbonicum* z Reunionu (Hell Bourgh), ID vzorku: 23-112 (Příloha 1).

3.5 Testování vlivu prostředí na morfologii zkoumaných druhů

Plavuně jsou morfologicky velmi plastické rostliny a předpokládá se, že vliv na jejich morfologii má i prostředí, ve kterém se vyskytují. Z faktorů prostředí byla vybrána zeměpisná šířka a nadmořská výška a jejich vliv na měřené morfologické znaky plavuní, včetně vzájemné interakce, následně otestován v programu CANOCO 5 (Šmilauer & Lepš 2014). Provedena byla redundační analýza (RDA), kdy jako operativní taxonomické jednotky bylo použito zařazení do poddruhů. Pro analýzy k ověření vlivu prostředí na morfologii plavuní byly použity dva datasety – dataset znaků měřených u *L. annotinum* (36 rostlin) a dataset znaků měřených u *L. clavatum* (32 rostlin). Z datasetu znaků měřených u *L. clavatum* pak byly odebrány vzorky *L. clavatum* var. *borbonicum*, z důvodu, že vzorky pocházejí z jedné populace, tudíž jak ze stejné nadmořské výšky, tak zeměpisné šířky a nelze je porovnávat s evropskými poddruhy *L. clavatum*.

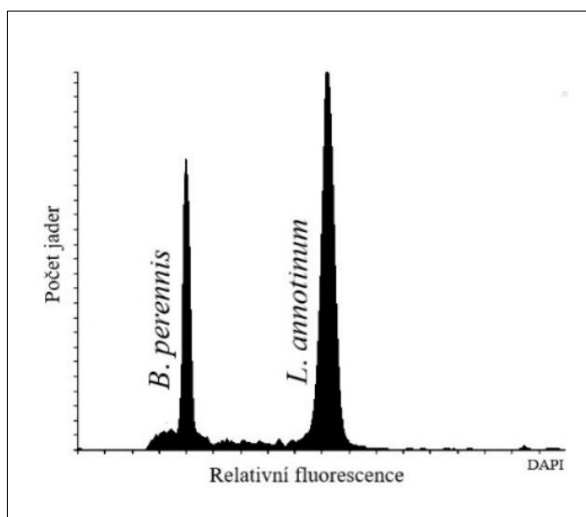
Grafy zobrazující variabilitu znaků úhel mikrofyly (Obr. 41 a 43) a délka strobilu (Obr. 42 a 44) v závislosti na nadmořské výšce a zeměpisné šířce pak byly sestrojeny v programu ArcGIS Pro 3.0.3 (ESRI).

4 Výsledky

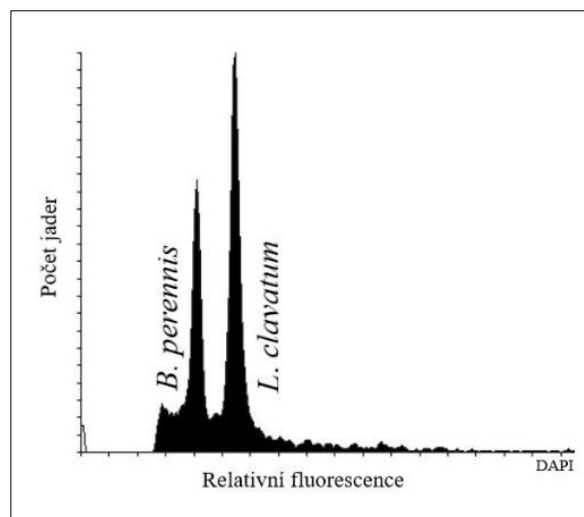
4.1 Průtoková cytometrie

4.1.1 Cytotypová variabilita

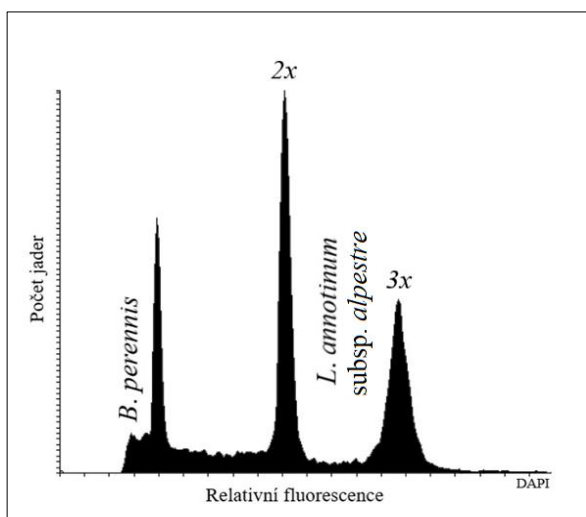
Metodou průtokové cytometrie byly zanalyzovány všechny sesbírané vzorky, přičemž bylo zjištěno, že se druhy *L. annotinum* a *L. clavatum* významně liší relativní i absolutní velikostí genomu (Obr. 25 a 26; Tab. 8 a 9). V případě *L. clavatum* se jednalo o průměrnou hodnotu $2C = 5,83$ pg, u *L. annotinum* $2C = 10,78$ pg. V rámci zkoumaných poddruhů *L. clavatum* měly všechny rostliny téměř totožnou velikost genomu. Populace (tři vzorky) *L. clavatum* var. *borbonicum* z Reunionu (Obr. 28), pak měla genom v průměru o 10 % větší (průměrně $2C = 6,41$ pg). V případě *L. annotinum* byly prokázány dva cytotypy. Většina rostlin náležela jednomu, široce rozšířenému cytotypu, ovšem vzácně byl zaznamenán také o 50 % větší cytotyp, a to u vzorku z Islandu (Obr. 27). Přechodné typy mezi *L. annotinum* subsp. *annotinum* a subsp. *alpestre* se nelišily ani v relativní ani absolutní velikosti genomu.



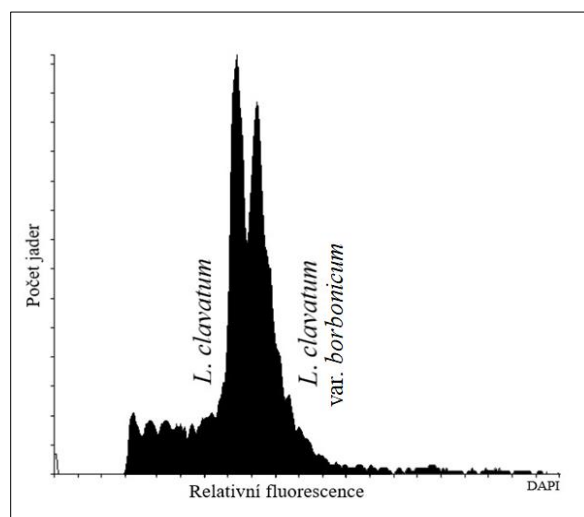
Obr. 25: Histogram relativní fluorescence jader *Lycopodium annotinum* a interního standardu *Bellis perennis*.



Obr. 26: Histogram relativní fluorescence jader *Lycopodium clavatum* a interního standardu *Bellis perennis*.



Obr. 27: Histogram relativní fluorescence jader diploida a triploida *Lycopodium annotinum* subsp. *alpestre* a interního standardu *Bellis perennis*.



Obr. 28: Histogram relativní fluorescence jader *Lycopodium clavatum* a *L. clavatum* var. *borbonicum*.

Tab. 8: Relativní velikosti genomu (barvivo DAPI) pro všechny zkoumané taxony. Hodnoty získané pro standard *Pisum sativum* a z důvodu překryvu poměru s *Lycopodium annotinum* přepočítány na standard *Bellis perennis*. N = počet vzorků, průměr = průměrná hodnota poměru vzorku a standardu, medián = medián poměru vzorku a standardu, min = minimální hodnota, max = maximální hodnota, SD = směrodatná odchylka

druh	subsp. / cytotyp	N	průměr	medián	min	max	SD
RGS (<i>Pisum</i>)	<i>L. a. subsp. annotinum</i>	57	0,98	0,98	0,86	1,01	0,02
	<i>L. a. subsp. alpestre</i>	36	1,00	1,00	0,96	1,06	0,02
	<i>L. a. subsp. alpestre 3x</i>	1	1,50				
	<i>L. c. subsp. clavatum</i>	73	0,56	0,56	0,55	0,58	0,00
	<i>L. c. subsp. monostachyon</i>	25	0,57	0,57	0,55	0,58	0,01
	<i>L. c. var. borbonicum</i>	3	0,61	0,61	0,60	0,62	0,01
RGS (<i>Bellis</i>)	<i>L. a. subsp. annotinum</i>	57	2,29	2,29	2,01	2,36	0,05
	<i>L. a. subsp. alpestre</i>	36	2,32	2,32	2,23	2,46	0,04
	<i>L. a. subsp. alpestre 3x</i>	1	3,49				
	<i>L. c. subsp. clavatum</i>	73	1,32	1,31	1,28	1,36	0,01
	<i>L. c. subsp. monostachyon</i>	25	1,32	1,32	1,29	1,36	0,01
	<i>L. c. var. borbonicum</i>	3	1,43	1,42	1,40	1,45	0,02

Tab. 9: Absolutní velikosti genomu (barvivo PI) pro všechny zkoumané taxony. Hodnoty získané pro standard *Bellis perennis*. N = počet vzorků, průměr = průměrná hodnota velikosti genomu v pg/2C, medián = medián velikosti genomu, min = minimální hodnota, max = maximální hodnota, SD = směrodatná odchylka, AT% = zastoupení AT bází, CG% = zastoupení CG bází

druh	subsp. / cytotyp	N	průměr	medián	min	max	SD	%AT	%CG
velikost genomu	<i>L. a. subsp. annotinum</i>	3	10,30	10,11	10,06	10,73	0,37	55,57	44,43
	<i>L. a. subsp. alpestre</i>	2	10,30		10,29	10,32	0,02	56,23	43,77
	<i>L. a. subsp. alpestre 3x</i>	1	15,98					55,37	44,63
	<i>L. c. subsp. clavatum</i>	4	5,69	5,71	5,55	5,77	0,09	56,47	43,53
	<i>L. c. subsp. monostachyon</i>	4	5,81	5,85	5,54	6,00	0,22	56,06	43,94
	<i>L. c. var. borbonicum</i>	3	6,41	6,48	6,11	6,63	0,27	55,62	44,38

Na základě analýzy variance a post-hoc testu (Tukeyho test) bylo prokázáno, že se jednotlivé poddruhy v rámci druhů neliší na základě velikosti genomu. V případě *L. clavatum* subsp. *clavatum* a subsp. *monostachyon*, byla velikost genomu naprosto totožná ($p = 1,000$). Ani varieta *borbonicum* se pak signifikantně nelišila jak od subspecie *clavatum* ($p = 0,716$), tak od subspecie *monostachyon* ($p = 0,718$). U *L. annotinum* se poddruhy *annotinum* a *alpestre* také nelišily ($p = 0,996$).

4.1.2 Rozdíly v použitém materiálu

Otestován byl také vliv rostlinného materiálu na kvalitu cytometrických analýz. Porovnávány byly získané hodnoty měřené na živém materiálu, materiálu usušeném v silikagelu a herbářovými položkami.

Pro měření pomocí barviva DAPI byly porovnány hodnoty poměru vzorku vůči standardu získané měřením na živém materiálu proti materiálu uchovaném v silikagelu a herbářovým položkám. Pro měření pomocí barviva PI byla porovnána absolutní velikost genomu měřená na živém materiálu a na materiálu usušeném v silikagelu.

Pro ukazatel poměru vzorku vůči standardu (DAPI) byl na základě analýzy variance s Tukeyho testem prokázán signifikantní rozdíl mezi živým materiálem a materiálem uchovávaným v silikagelu ($p = <0,001$) a herbářovým položkám ($p = <0,001$). Procentuální rozdíl porovnávaných hodnot však dosahuje maximálně 1,22 %.

Analýza variance s Tukeyho testem provedená pro absolutní velikost genomu (PI) neprokázala signifikantní rozdíl ($p = 0,252$) mezi měřeními na živém materiálu a materiálu uchovaném v silikagelu.

4.2 Molekulární metody

Otestováno bylo celkem devět kombinací primerů (3 chloroplastové, 6 jaderných) pro dva chloroplastové a jeden ribozomální úsek. PCR však úspěšně proběhla pouze u tří kombinací primerů (*psbA* + *trnH*, Tab. c + Tab. d, Tab. e + Tab. f). Tři fungující kombinace spolehlivě rozlišily rostliny mezi druhy. Vnitrodruhovou variabilitu přinesl pouze jeden chloroplastový úsek, *psbA-trnH*.

V rámci chloroplastového úseku *psbA-trnH* byly odhaleny tři haplotypy. Jeden haplotyp byl zjištěn pro druh *L. clavatum* (A) a dva haplotypy (B a C) byly objeveny v rámci druhu *L. annotinum*. Dvě objevené rostliny se vzácným haplotypem náležely do různých poddruhů (subsp. *annotinum* a *alpestre*). Rozdíly mezi jednotlivými haplotypy však byly zjištěny pouze na dvou pozicích (Tab. 10). V rámci molekulárních analýz nebyly nalezeny úseky, které by jednotlivé poddruhy odlišovaly. Přechodné typy *L. annotinum* v rámci molekulárních analýz nebyly testovány z důvodu, že nebylo možné geneticky rozlišit ani morfologicky zařaditelné rostliny do jednotlivých subspecií.

Tab. 10: Změny v sekvenci chloroplastového úseku *psbA-trnH* pro haplotypy A, B a C.

haplotyp		pozice					
		74–77	85	101	160	208–211	233
A (20)	<i>L. clavatum</i>	----	G	G	A	CAAG	A
B (19)	<i>L. annotinum</i> a	TTTA	T	A	G	TAAA	C
C (2)	<i>L. annotinum</i> b	TTTA	T	A	G	CAA	A
		253	261	263–265	269–271	273	
A (20)	<i>L. clavatum</i>	G	T	TTT	AAA	T	
B (19)	<i>L. annotinum</i> a	A	-	CG-	---	-	
C (2)	<i>L. annotinum</i> b	A	-	CG-	---	-	

4.3 Morfometrické analýzy

4.3.1 Vzájemná korelace znaků

Jednotlivé znaky v rámci zkoumaných druhů byly dále analyzovány pomocí korelační analýzy. Spočítán byl Spearmanův koeficient, pro společné znaky obou druhů a pro znaky měřené v rámci jednotlivých druhů. Analýza neprokázala žádný silně korelovaný znak s korelačním koeficientem vyšším než |0,9|, a proto byly všechny měřené znaky použity i v dalších analýzách.

U společných znaků (Tab. 11) pro oba druhy se ukázaly jako nejvíce korelované znaky délka mikrofyly a úhel mikrofyly (korelační koeficient 0,76). Nejvíce korelované znaky u *L. annotinum* (Tab. 12) jsou délka mikrofyly a délka strobilu (korelační koeficient 0,74). U druhu *L. clavatum* (Tab. 13) byly nejvíce korelované znaky délka strobilu a délka pedunculu (korelační koeficient 0,83).

Tab. 11: Korelační matice pro dataset společných znaků s vyznačenými nejvíce korelovanými znaky. Zkratky znaků viz. Tab. 7.

znak	DM	UM	DS	PS	NV	DV	DMV	DCV	SM	OM
DM		0.76	0.16	-0.15	0.53	0.66	0.29	-0.36	0.58	0.56
UM	0.76		0.15	-0.09	0.47	0.58	0.25	-0.42	0.51	0.58
DS	0.16	0.15		0.63	-0.15	0.22	0.25	0.44	-0.34	-0.09
PS	-0.15	-0.09	0.63		-0.40	-0.12	0.06	0.38	-0.40	-0.19
NV	0.53	0.47	-0.15	-0.40		0.59	0.32	-0.52	0.58	0.49
DV	0.66	0.58	0.22	-0.12	0.59		0.20	-0.31	0.36	0.46
DMV	0.29	0.25	0.25	0.06	0.32	0.20		-0.03	0.36	0.23
DCV	-0.36	-0.42	0.44	0.38	-0.52	-0.31	-0.03		-0.68	-0.43
SM	0.58	0.51	-0.34	-0.40	0.58	0.36	0.36	-0.68		0.56
OM	0.56	0.58	-0.09	-0.19	0.49	0.46	0.23	-0.43	0.56	

Tab. 12: Korelační matice pro dataset znaků měřených u *Lycopodium annotinum* s vyznačenými nejvíce korelovanými znaky. Zkratky znaků viz. Tab. 7.

znak	DM	UM	DS	NV	DV	DSP	DCSP	SM	SP	OM
DM		0.70	0.74	0.29	0.61	0.19	0.57	0.15	-0.40	0.49
UM	0.70		0.67	0.23	0.51	0.14	0.47	-0.01	-0.29	0.41
DS	0.74	0.67		0.42	0.63	0.46	0.56	0.06	-0.17	0.33
NV	0.29	0.23	0.42		0.50	0.41	0.03	0.07	0.03	0.28
DV	0.61	0.51	0.63	0.50		0.20	0.18	0.05	-0.26	0.36
DSP	0.19	0.14	0.46	0.41	0.20		0.16	0.27	-0.01	0.07
DCSP	0.57	0.47	0.56	0.03	0.18	0.16		-0.04	-0.13	0.16
SM	0.15	-0.01	0.06	0.07	0.05	0.27	-0.04		-0.34	0.25
SP	-0.40	-0.29	-0.17	0.03	-0.26	-0.01	-0.13	-0.34		-0.48
OM	0.49	0.41	0.33	0.28	0.36	0.07	0.16	0.25	-0.48	

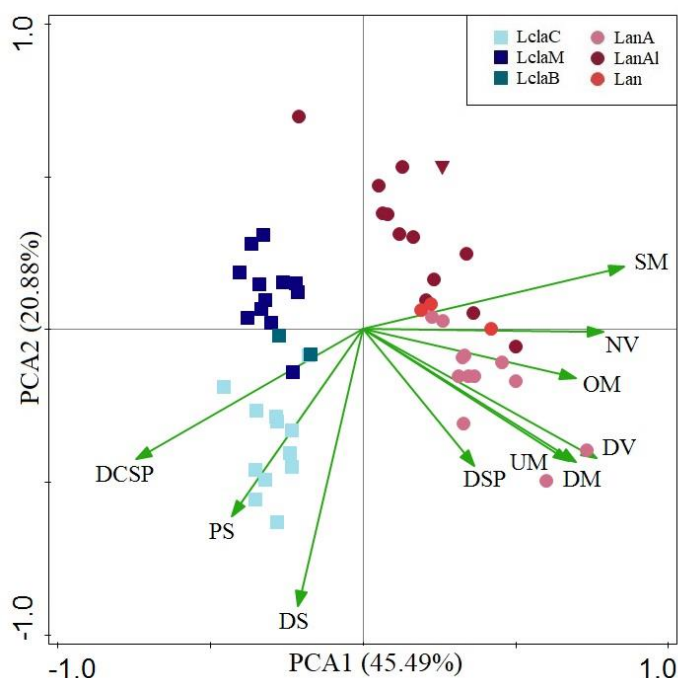
Tab. 13: Korelační matice pro dataset znaků měřených u *Lycopodium clavatum* s vyznačenými nejvíce korelovanými znaky. Zkratky znaků viz. Tab. 7.

znak	DM	UM	DPU	DPI	DS	PS	NV	DV	DSP	DCSP	SM	OM	DCM
DM		0.44	0.52	0.53	0.48	0.39	0.10	0.43	0.12	0.11	0.28	-0.29	0.08
UM	0.44		0.71	0.62	0.64	0.72	-0.34	0.18	0.05	-0.08	0.08	0.09	0.60
DPU	0.52	0.71		0.62	0.83	0.82	-0.17	0.54	0.27	0.02	0.09	0.24	0.52
DPI	0.53	0.62	0.62		0.47	0.54	-0.04	0.44	-0.02	0.20	0.10	-0.01	0.27
DS	0.48	0.64	0.83	0.47		0.62	-0.14	0.48	0.40	0.15	-0.04	0.07	0.53
PS	0.39	0.72	0.82	0.54	0.62		-0.34	0.25	0.32	-0.05	0.13	0.39	0.40
NV	0.10	-0.34	-0.17	-0.04	-0.14	-0.34		0.30	-0.21	-0.08	0.20	-0.15	-0.12
DV	0.43	0.18	0.54	0.44	0.48	0.25	0.30		-0.08	-0.03	-0.13	-0.01	0.12
DSP	0.12	0.05	0.27	-0.02	0.40	0.32	-0.21	-0.08		0.43	0.25	0.25	0.02
DCSP	0.11	-0.08	0.02	0.20	0.15	-0.05	-0.08	-0.03	0.43		0.09	-0.12	-0.05
SM	0.28	0.08	0.09	0.10	-0.04	0.13	0.20	-0.13	0.25	0.09		-0.12	0.02
OM	-0.29	0.09	0.24	-0.01	0.07	0.39	-0.15	-0.01	0.25	-0.12	-0.12		0.19
DCM	0.08	0.60	0.52	0.27	0.53	0.40	-0.12	0.12	0.02	-0.05	0.02	0.19	

4.3.2 Analýza hlavních komponent

Dataset společných znaků

Pro dataset společných znaků byla vytvořena PCA ordinace za účelem vizualizace morfologických rozdílů mezi jednotlivými druhy a poddruhy plavuní (Obr. 29). První osa vysvětluje 45,49 % variability a druhá osa 20,88 % variability. Třetí osa ukazuje 8,59 % vysvětlené variability. V rámci datasetu dochází k jasnému rozlišení druhů. Rozdíly mezi poddruhy jsou patrné zejména u *L. clavatum* subsp. *clavatum* a subsp. *monostachyon*. Varieta *borbonicum* se pak nachází mezi zmíněnými poddruhy *L. clavatum*. Triploidní vzorek *L. annotinum* subsp. *alpestre* se morfologicky neodděluje od ostatních zástupců téže subspecie.



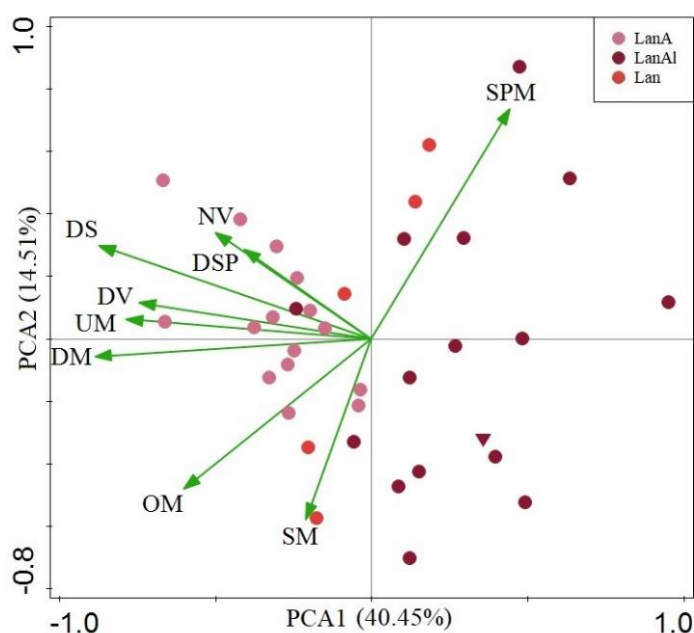
Obr. 29: Analýza hlavních komponent pro dataset společných znaků zahrnující všechny zkoumané taxony a znaky. Obrácený trojúhelník značí triploidního jedince. Zkratky taxonů: LclaC = *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*, LclaB = *L. c.* var. *borbonicum*, LanA = *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum*, LanAl = *L. a.* subsp. *alpestre*, Lan = *L. a.* přechodný typ. Zkratky znaků viz Tab. 7.

Dataset *L. annotinum*

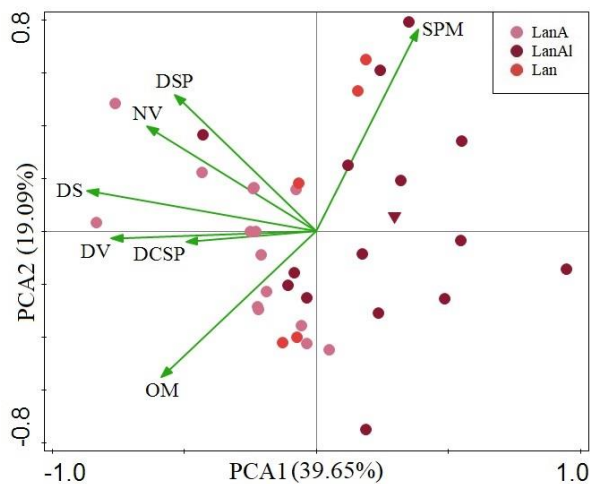
Pro dataset znaků *L. annotinum* byly vytvořeny tři PCA ordinace za účelem vizualizace morfologických rozdílů mezi jednotlivými poddruhy *L. annotinum*. První ordinace (Obr. 30) zahrnuje všechny měřené znaky a její první osa vysvětluje 40,45 % variability, druhá osa vysvětluje 14,5 %, třetí pak 13,6 %. *Lycopodium annotinum* a jeho subspecie nejsou jasně odděleny a tvoří spíše kontinuum, ve které lze však stále poddruhy rozlišit. Významně se

nevylišuje ani jediný triploidní vzorek (vyznačen otočeným trojúhelníkem), který od ostatní vzorků subsp. *alpestre* odlišuje kratším strobilem a širším mikrofylem. Odebráním mikrofylových znaků vznikla druhá PCA ordinace (Obr. 31) ve která na první ose vysvětluje 39,65 % variability, na druhé 19,09 % a na třetí ose 15,34 %. Odebráním naopak strobilových znaků vznikl graf na Obr. 32, jehož první osa vysvětluje 37,25 % variability, druhá osa 15,19 % variability a třetí osa 14,98 %.

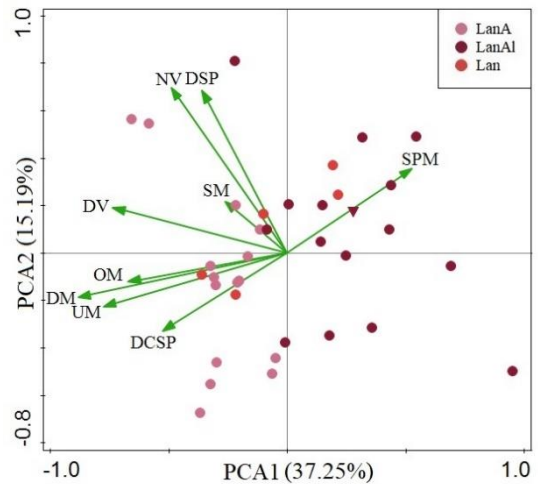
Po odebrání určovacích znaků na mikrofyly došlo k posunu některých vzorků subsp. *alpestre* směrem k vzorků subsp. *annotinum*. Stalo se tak u vzorků, které pocházejí z různých nadmořských výšek a biotopů, všechny vzorky však mají delší strobilus a sporofyly v něm, než ostatní vzorky subsp. *alpestre*. V případě znaků na strobilu dochází k podobné situaci, kdy se některé, zejména vzrůstem větší rostliny subsp. *alpestre*, přibližují k rostlinám subsp. *annotinum*. V případě určování sterilních rostlin lze od sebe rozlišit typické zástupce obou poddruhů, u typů, které se velikostí vymykají dané subspecii je situace složitá. Přechodné typy pak nelze určit ani na základě kombinace mikrofylových a strobilových znaků.



Obr. 30: Analýza hlavních komponent pro dataset *Lycopodium annotinum* zahrnující všechny znaky. Obrácený trojúhelník značí triploidního jedince. Zkratky taxonů: LanA = *L. annotinum* subsp. *annotinum*, LanAl = *L. a.* subsp. *alpestre*, Lan = *L. a.* přechodný typ. Zkratky znaků viz Tab. 7.



Obr. 31: Analýza hlavních komponent pro dataset *L. annotinum* s odebranými znaky na mikrofyly (DM SM, UM). Obrácený trojúhelník značí triploidního jedince. Zkratky taxonů: LanA = *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum*, LanAl = *L. a.* subsp. *alpestre*, Lan = *L. a.* přechodný typ.

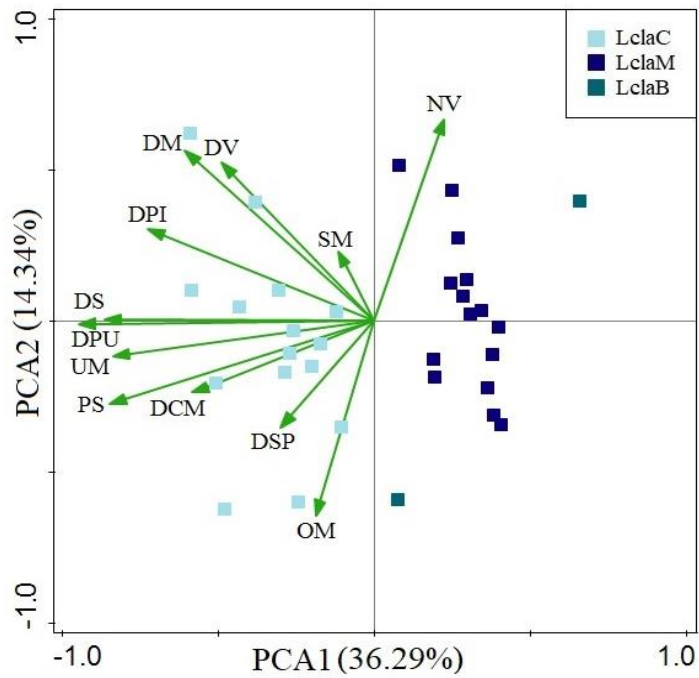


Obr. 32: Analýza hlavních komponent pro dataset *L. annotinum* s odebranými znaky na strobilu (DS). Obrácený trojúhelník značí triploidního jedince. Zkratky taxonů: LanA = *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum*, LanAl = *L. a.* subsp. *alpestre*, Lan = *L. a.* přechodný typ.

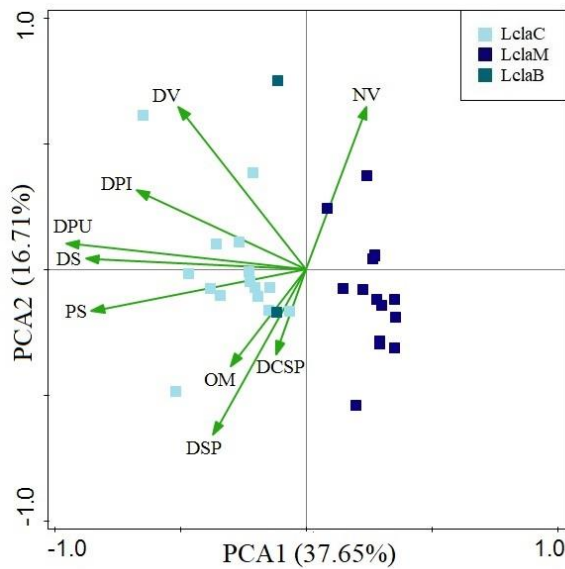
Dataset *L. clavatum*

Pro dataset *L. clavatum* byly vytvořeny další tři PCA ordinace za účelem vizualizace morfologických rozdílů mezi jednotlivými poddruhy *L. clavatum*. V analýze zahrnující všechny měřené znaky (Obr. 33), první ordinační osa vysvětluje 36,29 % variability, druhá osa 14,34 % variability a třetí osa 12,44 % variability. U druhu *L. clavatum* je patrné jasnější oddělení poddruhů *clavatum* a *monostachyon* a lze je mezi sebou rozlišit. Oddělují se i rostliny náležící do variety *borbonicum*, avšak zahrnuté vzorky se od sebe výrazně liší. Po odebrání mikrofylových znaků vznikla druhá ordinace PCA (Obr. 34), jejíž první osa vysvětluje 37,65 % variability, druhá osa 16,71 % a třetí 13,61 % variability. Při odebrání znaků na mikrofyly se od ostatních vzorků subsp. *monostachyon* oddělily dva vzorky, jeden vzorek z České republiky (Jeseníky) a druhý z Kanady (Inuvik). Oba vzorky mají delší chlup na mikrofyly, než ostatní vzorky subsp. *monostachyon*.

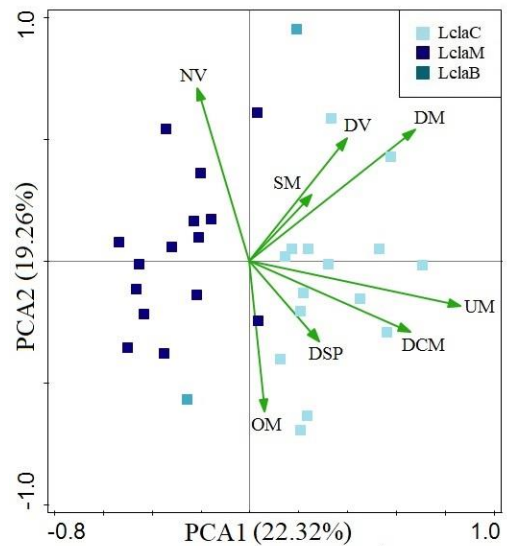
Po odebrání strobilových znaků vznik graf na Obr. 35, jehož první osa vysvětluje 22,32 % variability, druhá osa 19,26 % variability a třetí 17,82 % variability. Po odebrání jak mikrofylových, tak strobilových znaků lze v grafech stále vidět rozestup mezi jednotlivými subspeciemi. Celkově lze říci, že určování v rámci druhu *L. clavatum* je založeno především na strobilových znacích, ačkoliv i znaky na mikrofyly je možné jednotlivé subspecie od sebe rozeznat. Problém však mohou opět tvořit přechodné typy rostlin s jedním dlouhým strobilem na dlouhé nerozvětvené stopce, či drobné rostliny se dvěma strobily na krátkých stopkách.



Obr. 33: Analýza hlavních komponent pro dataset *L. clavatum* zahrnující všechny znaky. Zkratky taxonů: LclaC = *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*, LcaB = *L. c.* var. *borbonicum*. Zkratky znaků viz Tab. 7.



Obr. 34: Analýza hlavních komponent pro dataset *L. clavatum* s odebranými znaky na mikrofyly (DM, SM, UM). Zkratky taxonů: LclaC = *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*, LcaB = *L. c.* var. *borbonicum*.



Obr. 35: Analýza hlavních komponent pro dataset *L. clavatum* s odebranými znaky na strobilu (PD, DS, DPU, DPI). Zkratky taxonů: LclaC = *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*, LcaB = *L. c.* var. *borbonicum*.

4.3.3 Popisné statistiky měřených morfologických znaků

Pro jednotlivé znaky byla v rámci druhů a znaků u nich měřených spočítána popisná statistika jako je aritmetický průměr, medián, minimální a maximální hodnoty a směrodatná odchylka. U kvalitativního znaku (OM) byla uvedena pouze průměrná hodnota pro daný taxon.

U druhu *L. annotinum* se jednotlivé poddruhy liší zejména v hodnotách znaků délka mikrofyly, úhel mikrofyly, délka strobilu a délka chlupu sporofyly, přičemž hodnoty pro poddruh *alpestre* dosahují vždy nižších hodnot, než u subspecie *annotinum* (Tab. 14). Mikrofyly severské subspecie jsou kratší a přitisklejší, strobilus a chlup na sporofyly je rovněž kratší. Poddruh *alpestre* má také kratší lodyžku mezi prvním a druhým větvením na ní a má méně zubaté mikrofyly. Triploidní jedinec se pak morfologií podobá subspecii *alpestre*, jako která byl také určen. Má však přitisklejší mikrofyly, než byly průměrné hodnoty pro subspecii *alpestre*, avšak v rámci této subspecie byly naměřeny i nižší hodnoty. Strobilus je pak také kratší.

U druhu *L. clavatum* se zkoumané poddruhy na rozdíl od *L. annotinum* významně neodlišují na základě délky mikrofyly (Tab. 15). Liší se však stejně jako *L. annotinum* úhlem mikrofyly, kdy *L. clavatum* subsp. *monostachyon* má mikrofyly přitisklejší. Zcela nejvýraznějším znakem je pak počet a délka strobilů a délka jejich stopky, přičemž subspecie *monostachyon* má strobilus pouze jeden a vždy je kratší než u *L. clavatum* subsp. *clavatum*, stejně jako jeho stopka. Varieta *borbonicum* se pak svou morfologií odlišuje od obou zkoumaných subspecií *L. clavatum*.

Tab. 14: Popisná statistika měřených znaků u *Lycopodium annotinum*. N = počet vzorků, průměr = aritmetický průměr hodnot, medián = medián měřených hodnot, min = minimální hodnota znaku, max = maximální hodnota znaku, SD = směrodatná odchylka.

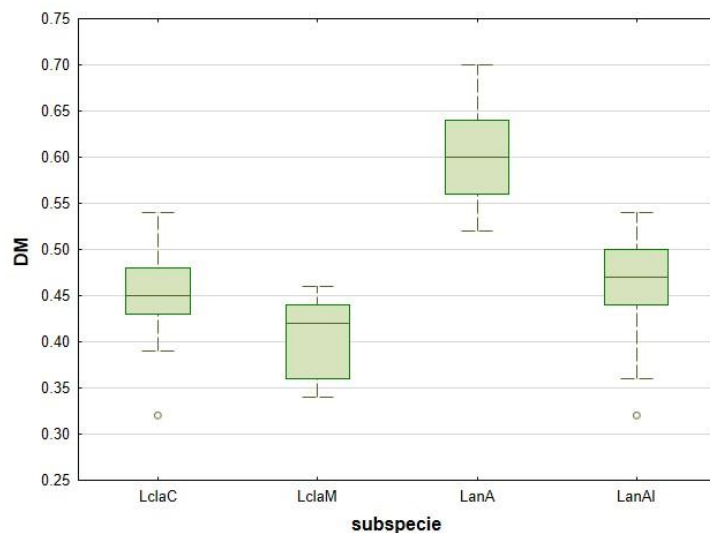
druh	subsp. / cytotyp	znak	N	průměr	medián	min	max	SD
<i>L. annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	DM	15	0,61	0,60	0,52	0,70	0,05
	subsp. <i>alpestre</i>		15	0,46	0,48	0,32	0,54	0,06
	subsp. <i>alpestre</i> 3x		1	0,46				
	subsp. <i>annotinum</i>	SM	15	880,80	863,94	732,68	1061,02	100,52
	subsp. <i>alpestre</i>		15	886,02	939,40	605,96	1251,88	178,19
	subsp. <i>alpestre</i> 3x		1	1165,76				
	subsp. <i>annotinum</i>	UM	15	75,00	76,60	56,00	95,40	10,67
	subsp. <i>alpestre</i>		15	40,87	37,40	14,20	67,40	15,53
	subsp. <i>alpestre</i> 3x		1	19,20				
	subsp. <i>annotinum</i>	SPM	15	382,21	359,68	278,76	547,20	87,43
	subsp. <i>alpestre</i>		15	457,80	426,00	208,74	880,44	204,65
	subsp. <i>alpestre</i> 3x		1	450,78				
	subsp. <i>annotinum</i>	DS	15	2,55	2,47	1,88	3,42	0,44
	subsp. <i>alpestre</i>		15	1,49	1,42	0,56	2,48	0,53
	subsp. <i>alpestre</i> 3x		1	0,90				
	subsp. <i>annotinum</i>	DCSP	15	554,90	506,62	334,36	995,76	209,65
	subsp. <i>alpestre</i>		15	272,06	297,54	108,54	369,42	87,84
	subsp. <i>alpestre</i> 3x		1	486,72				
	subsp. <i>annotinum</i>	NV	15	4,24	3,74	2,23	7,88	1,49
	subsp. <i>alpestre</i>		15	3,75	3,76	0,74	7,70	1,89
	subsp. <i>alpestre</i> 3x		1	3,40				
	subsp. <i>annotinum</i>	DV	15	4,22	3,92	2,34	8,18	1,71
	subsp. <i>alpestre</i>		15	2,37	2,38	1,42	3,82	0,76
	subsp. <i>alpestre</i> 3x		1	2,00				
subsp. <i>annotinum</i>	OM	15	2,73					
subsp. <i>alpestre</i>		15	1,97					
subsp. <i>alpestre</i> 3x		1	1,60					

Tab. 15: Popisná statistika měřených znaků u *Lycopodium clavatum*. N = počet vzorků, průměr = aritmetický průměr hodnot, medián = medián měřených hodnot, min = minimální hodnota znaku, max = maximální hodnota znaku, SD = směrodatná odchylka.

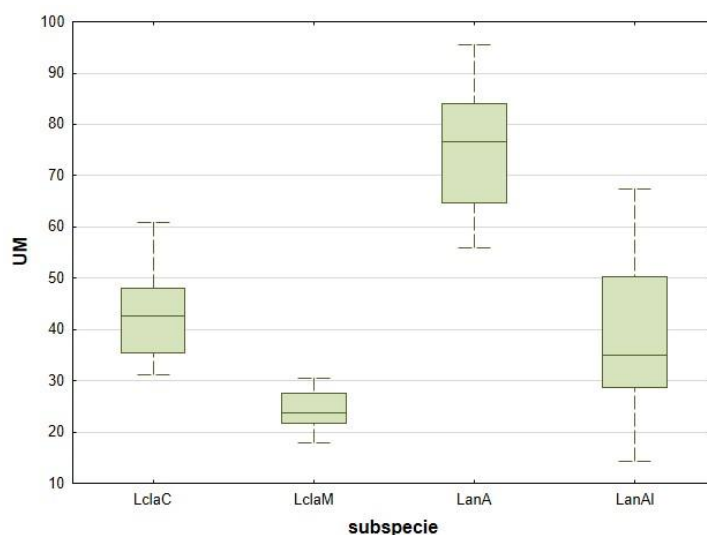
druh	subsp. / cytotyp	znak	N	průměr	medián	min	max	SD
<i>L. clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	DM	15	0,45	0,45	0,32	0,54	0,06
	subsp. <i>monostachyon</i>		15	0,40	0,42	0,34	0,46	0,04
	var. <i>borbonicum</i>		3	0,40	0,36	0,34	0,50	0,09
	subsp. <i>clavatum</i>	SM	15	519,94	513,48	438,80	633,32	60,14
	subsp. <i>monostachyon</i>		15	530,31	520,40	438,96	638,36	52,43
	var. <i>borbonicum</i>		3	493,53	425,14	395,88	659,56	144,53
	subsp. <i>clavatum</i>	UM	15	42,68	42,60	31,20	60,80	7,75
	subsp. <i>monostachyon</i>		15	24,75	23,80	18,00	30,60	3,47
	var. <i>borbonicum</i>		3	27,67	26,80	23,00	33,20	5,15
	subsp. <i>clavatum</i>	DCM	15	2319,07	2223,74	1755,12	3575,04	444,93
	subsp. <i>monostachyon</i>		15	1546,88	1579,02	727,98	2144,48	410,95
	var. <i>borbonicum</i>		3	1918,21	1944,44	1760,04	2050,14	146,82
	subsp. <i>clavatum</i>	PS	15	2,14	2,00	1,00	3,00	0,52
	subsp. <i>monostachyon</i>		15	1,03	1,00	1,00	1,20	0,07
	var. <i>borbonicum</i>		2	1,75	1,75	1,50	2,00	0,35
	subsp. <i>clavatum</i>	DS	15	3,91	3,66	2,50	5,30	0,87
	subsp. <i>monostachyon</i>		15	2,01	1,94	0,84	3,24	0,63
	var. <i>borbonicum</i>		2	2,34	2,34	1,85	2,82	0,69
	subsp. <i>clavatum</i>	PDU	15	6,90	6,33	4,50	11,13	1,89
	subsp. <i>monostachyon</i>		15	1,83	1,42	0,08	3,82	1,07
	var. <i>borbonicum</i>		2	4,64	4,64	4,30	4,98	0,48
	subsp. <i>clavatum</i>	PDI	15	0,54	0,33	0,03	1,32	0,45
	subsp. <i>monostachyon</i>		0					
	var. <i>borbonicum</i>		2	0,70	0,70	0,00	1,40	0,99
	subsp. <i>clavatum</i>	DSP	15	2008,84	2115,76	1590,44	2320,66	222,46
	subsp. <i>monostachyon</i>		15	2019,60	2001,82	1754,50	2387,96	191,92
	var. <i>borbonicum</i>		2	1842,32	1842,32	1601,36	2083,28	340,77
	subsp. <i>clavatum</i>	DCSP	15	1410,38	1494,70	505,06	2515,36	537,12
	subsp. <i>monostachyon</i>		15	1590,45	1566,00	814,82	2600,05	423,66
	var. <i>borbonicum</i>		2	1459,33	1459,33	1341,56	1577,10	166,55
	subsp. <i>clavatum</i>	NV	15	1,68	1,62	1,14	2,38	0,39
	Subsp. <i>monostachyon</i>		15	2,12	1,84	1,26	3,86	0,75
	var. <i>borbonicum</i>		3	2,79	2,60	2,24	3,52	0,66
subsp. <i>clavatum</i>	DV	15	2,41	2,24	1,56	4,90	0,82	
subsp. <i>monostachyon</i>		15	1,85	1,78	1,30	2,64	0,41	
var. <i>borbonicum</i>		3	2,86	3,06	2,34	3,18	0,45	
subsp. <i>clavatum</i>	OM	15	1,31					
subsp. <i>monostachyon</i>		15	1,15					
var. <i>borbonicum</i>		3	1,53					

4.3.4 Hodnoty vybraných morfologických znaků

Mezi znaky na mikrofyly, pomocí kterých lze rozlišit jednotlivé poddruhy zkoumaných druhů se řadí jeho délka (Obr. 36) a úhel (Obr. 37) mikrofyly. Oběma znaky lze ve většině případů rozlišit jak subspecie druhu *L. clavatum*, tak druhu *L. annotinum*.

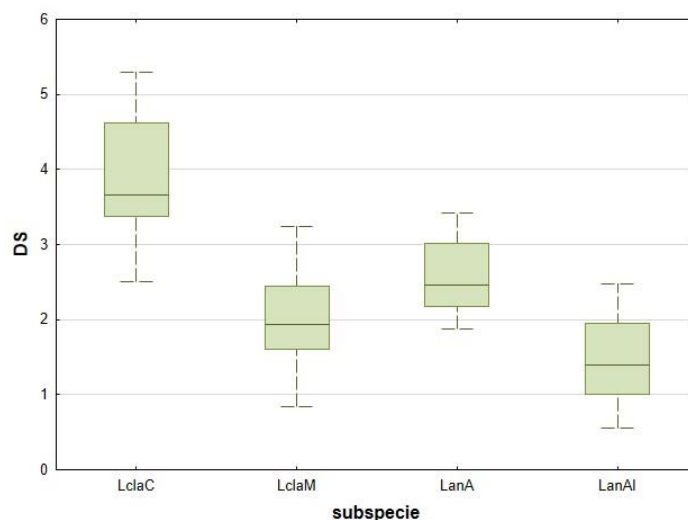


Obr. 36: Krabicové grafy pro znak délka mikrofyly vytvořené pro jednotlivé poddruhy zvlášť. Zkratky taxonů: LclaC = *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*, LanA = *L. annotinum* subsp. *annotinum*, LanAl = *L. a.* subsp. *alpestre*

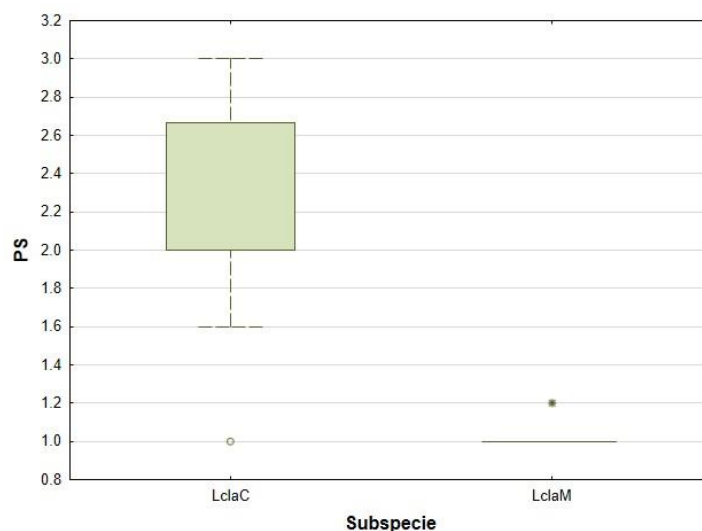


Obr. 37: Krabicové grafy pro znak úhel mikrofyly vytvořené pro jednotlivé poddruhy zvlášť. Zkratky taxonů: LclaC = *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*, LanA = *L. annotinum* subsp. *annotinum*, LanAl = *L. a.* subsp. *alpestre*

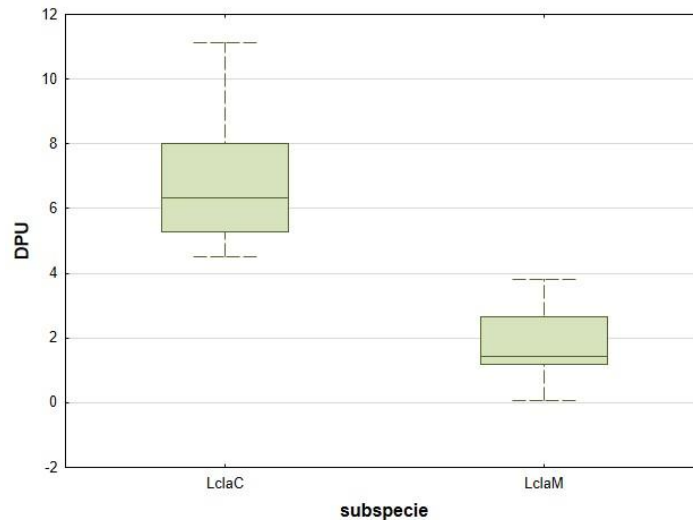
Ze strobilových znaků společných pro oba druhy byl vybrán znak délka stobilu (Obr. 38), který spolehlivě rozlišuje zejména poddruhy druhu *L. clavatum*, ale ve většině případů i poddruhy druhu *L. annotinum*. Další dva znaky jsou typické pro druh *L. clavatum*. Jedná o znak počet stobilů (Obr. 39) a délku pedunculu (Obr. 40). Tyto znaky se především ve vzájemné kombinaci u měřených rostlin jeví jako nejspolehlivější k rozlišení subspecií *clavatum* a *monostachyon*.



Obr. 38: Krabicové grafy pro znak délka stobilu vytvořené pro jednotlivé poddruhy zvlášť. Zkratky taxonů: LclaC = *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*, LanA = *L. annotinum* subsp. *annotinum*, LanAl = *L. a.* subsp. *alpestre*



Obr. 39: Krabicové grafy pro znak počet stobilů vytvořené pro *Lycopodium clavatum*. Zkratky taxonů: LclaC = *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*

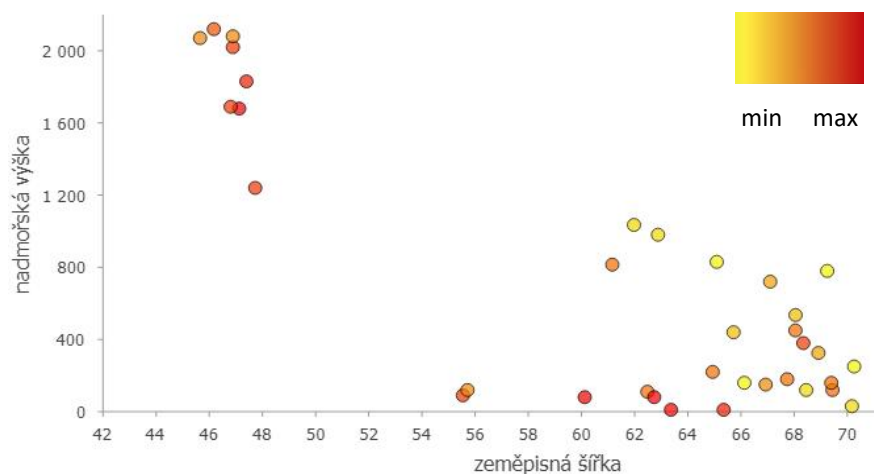


Obr. 40: Krabicové grafy pro znak délka pedunculu vytvořené pro *Lycopodium clavatum*. Zkratky taxonů: LclaC = *L. c.* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*

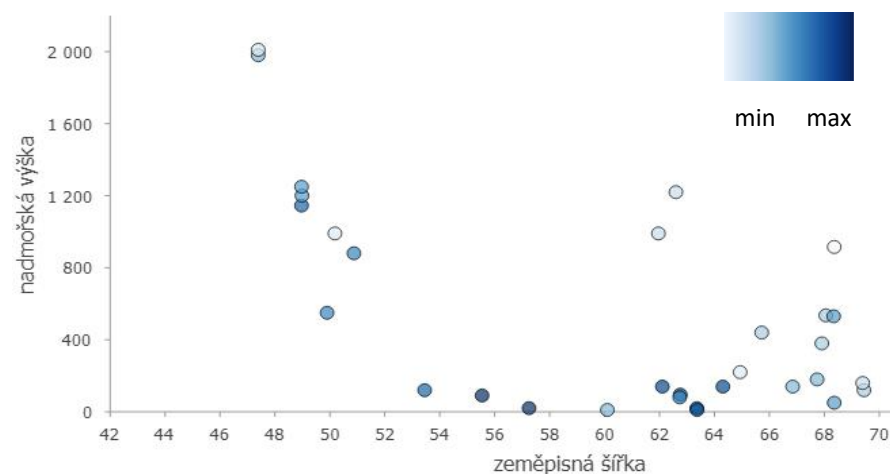
4.3.5 Vazba morfologických znaků na prostředí

Otestována byla také vazba morfologických znaků zkoumaných druhů na podmínky prostředí. Grafy ukazují, že každý druh reaguje na vzrůstající nadmořskou výšku v nižších zeměpisných šířkách jinou odezvou. Vybrány byly znaky úhel mikrofyly a délka strobilu. Úhel mikrofyly se u druhu *L. annotinum* snižuje se zeměpisnou šířkou (Obr. 41), délka strobilu se pak snižuje v kombinaci se zvyšující se nadmořskou výškou (Obr. 42). U druhu *L. clavatum* se úhel mikrofyly snižuje jak se zeměpisnou šířkou, tak s nadmořskou výškou (Obr. 43), stejně pak reaguje znak délka strobilu (Obr. 44).

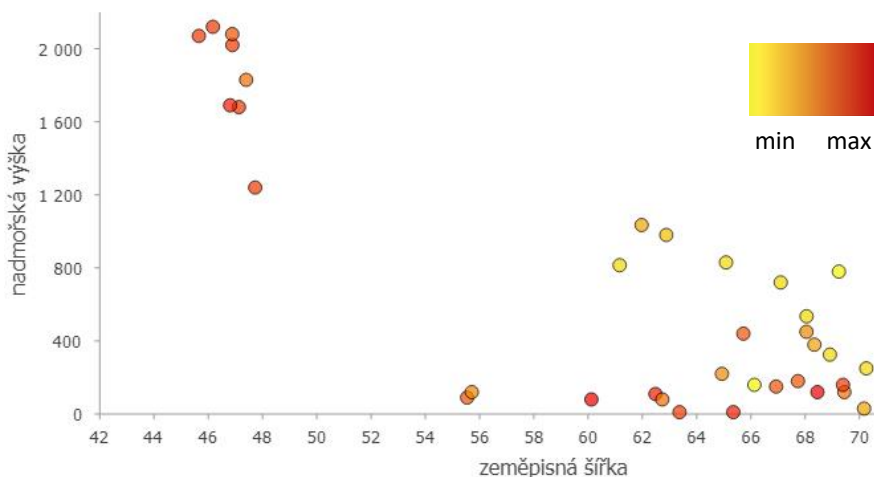
V nižších zeměpisných šířkách tak *L. annotinum* na narůstající nadmořskou výšku hodnotou výše popsaných znaků v podstatě nereaguje, zatímco u druhu *L. clavatum* se stoupající nadmořskou výškou hodnota znaku klesá, rostliny tak tvoří méně kratších strobilů a mikrofyly jsou k lodyžce přitisklejší.



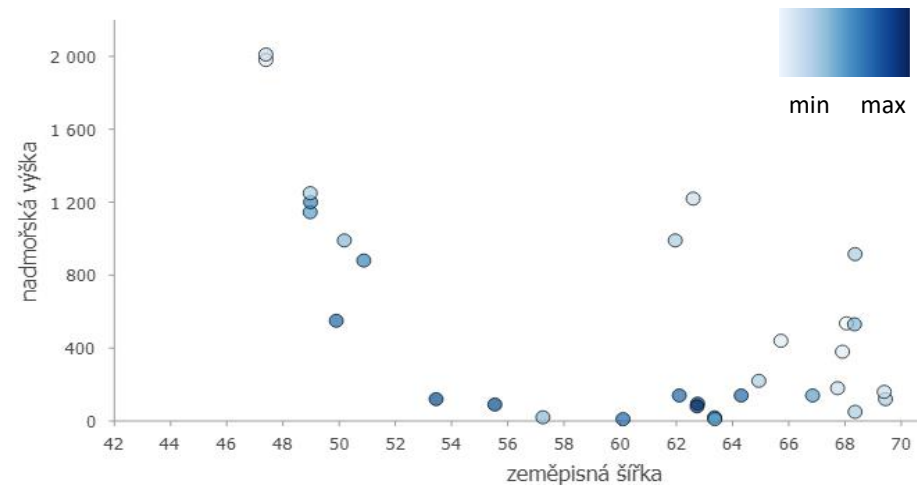
Obr. 41: Graf zobrazující znak úhel mikrofytu v závislosti na zeměpisné šířce a nadmořské výšce, vytvořen pro druh *Lycopodium annotinum*. Žlutá představuje nejnižší měřené hodnoty znaku, červená nejvyšší.



Obr. 43: Graf zobrazující znak úhel mikrofytu v závislosti na zeměpisné šířce a nadmořské výšce, vytvořen pro druh *Lycopodium clavatum*. Světle modrá představuje nejnižší měřené hodnoty znaku, tmavě modrá nejvyšší.



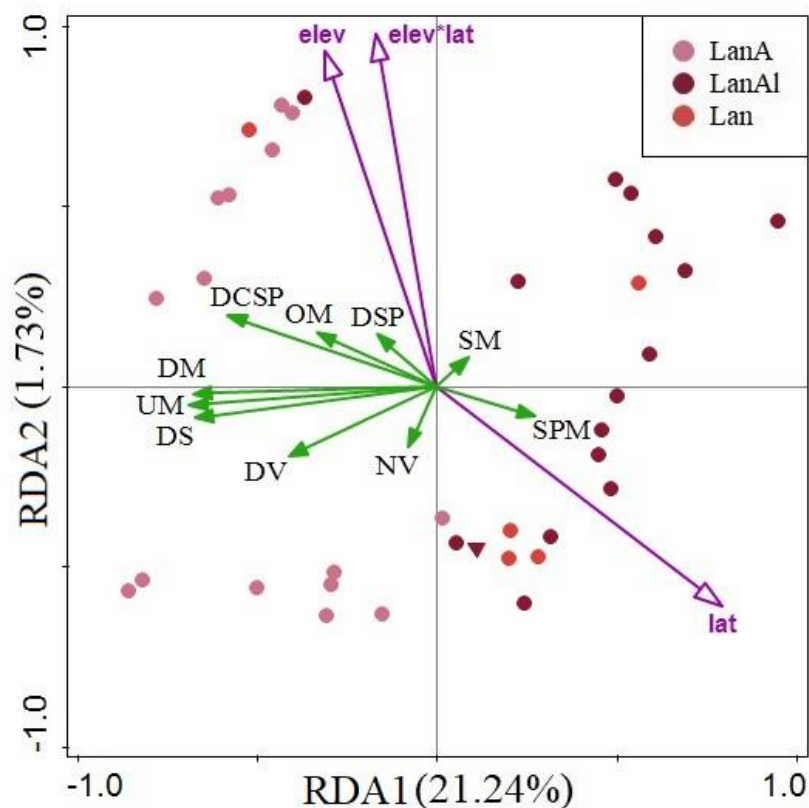
Obr. 42: Graf zobrazující znak délka strobilu v závislosti na zeměpisné šířce a nadmořské výšce, vytvořen pro druh *Lycopodium annotinum*. Žlutá představuje nejnižší měřené hodnoty znaku, červená nejvyšší.



Obr. 44: Graf zobrazující znak délka strobilu v závislosti na zeměpisné šířce a nadmořské výšce, vytvořen pro druh *Lycopodium clavatum*. Světle modrá představuje nejnižší měřené hodnoty znaku, tmavě modrá nejvyšší.

Dataset *L. annotinum* |

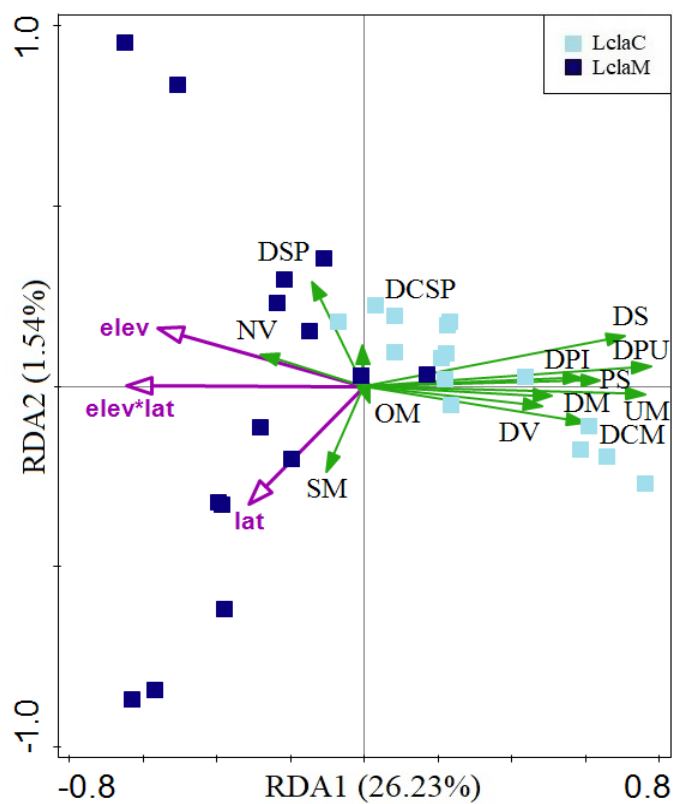
Vliv nadmořské výšky a zeměpisné délky byl otestován pomocí redunční analýzy (RDA). Analýza potvrdila, že subspecie *alpestre* se vyskytuje spíše ve vyšších zeměpisných šířkách, než subspecie *annotinum* (Obr. 45). Jednotlivé poddruhy jsou pak jasně odděleny. S nadmořskou výškou nejsou korelované žádné morfologické znaky, se zeměpisnou šířkou jsou pak negativně korelované znaky, které jsou pro rozlišení jednotlivých poddruhů nedůležité. První osa vysvětluje 21,24 % variability, druhá 1,73 % variability, třetí pak 1,48 % variability.



Obr. 45: Ordinační diagram redunční analýzy pro druh *Lycopodium annotinum*. Obráceným trojúhelníkem je označený triploidní vzorek. Zkratky: elev = nadmořská výška, lat = zeměpisná šířka, elev*lat = interakce zeměpisné šířky a výšky, zkratky taxonů: LanA = *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum*, LanAl = *L. a.* subsp. *alpestre*, Lan = *L. a.* přechodný typ. Zkratky znaků viz Tab. 7.

Dataset *L. clavatum*

Redundační analýza (RDA) byla provedena i pro dataset znaků měřených u *L. clavatum* (Obr. 46). Stejně jako druhu *L. annotinum* analýza potvrdila, že se severská subspecie *monostachyon* vyskytuje spíše ve vyšších zeměpisných šířkách. Jednotlivé poddruhy *L. clavatum* jsou pak jasně oddělené. Zároveň se však ukázala negativní korelace téměř všech strobilových a mikrofylových znaků s interakcí nadmořské výšky a zemědělské šířky. Z procent vysvětlené variability však první osa vysvětluje 26,23 %, druhá 1,54 % a třetí 0,58 %.



Obr. 46: Ordinační diagram redundační analýzy pro druh *Lycopodium clavatum*. Zkratky: elev = nadmořská výška, lat = zeměpisná šířka, elev*lat = interakce zeměpisné šířky a výšky, zkratky taxonů: LclaC = *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum*, LclaM = *L. c.* subsp. *monostachyon*. Zkratky znaků viz Tab. 7.



Obr. 47: *Lycopodium annotinum* z Itálie (Antholz-Obertal). ID vzorku: 22-126 (Příloha 1).



Obr. 48: *Lycopodium clavatum* subsp. *monostachyon* z Rakouska (Planneralm), ID vzorku: 10/8/3 (Příloha 1).



Obr. 49: *Lycopodium clavatum* subsp. *monostachyon* z České republiky (Jeseníky), ID vzorku: 23-52 (Příloha 1).

4.3.6 Určování poddruhů plavuní zkoumaných druhů

Lycopodium annotinum

Poddruhy rodu *L. annotinum* byly v této práci rozlišovány na základě celkového vzrůstu rostliny, velikosti mikrofylů, postavením mikrofylů a velikosti strobilu. Na základě naměřených hodnot byl pak sestaven základní přehled jednotlivých druhů a jejich subspecií.

– **subsp. *annotinum***

Rostlina celkově mohutnější, na exponovaných stanovištích drobnější, téměř po celé Evropě. Délka mikrofylů u subspecie *annotinum* může dosahovat 5–10 mm, průměrně pak 6 mm. Mikrofyly svírají s lodyhou úhel od 50–85° (nejčastěji okolo 75°). Strobilus je dlouhý 1,5–4 cm, nejčastěji okolo 2,5 cm.

– **subsp. *alpestre***

Rostlina je spíše drobná, vázaná na cirkum-polární oblast, její výskyt však nelze spolehlivě vyvrátit ve vysokohorském prostředí nižších zeměpisných šířek. Mikrofyly jsou dlouhé 3–5 mm, nejčastěji okolo 4 mm. Postavení mikrofylů je více přitisklé k lodyze oproti subspecii *annotinum*, úhel svírající mikrofyl a lodyžka se pohybuje mezi 15–65° (průměrně 40°). Strobilus je dlouhý 0,5–2,5 cm, nejčastěji okolo 1,5 cm.

Lycopodium clavatum

Poddruhy druhu *L. clavatum* byly v této práci rozlišovány na základě znaků na výtrusném klasu, ale důležitý je i celkový vzrůst rostliny, délka mikrofyly a jeho postavení (úhel). Zároveň je vhodné stejně jako u *L. annotinum* přihlídnout ke geografické poloze a nadmořské výšce sběru určované rostliny.

– **subsp. *clavatum***

Rostlina rozšířená po celé Evropě s výjimkou nejsevernějších oblastí ve Skandinávii, kde je nahrazena subsp. *monostachyon*. Počet výtrusných klasů se pohybuje nejčastěji mezi 2–3, vzácněji však může mít rostlina klas jeden až pět. Velikost strobilu se nejčastěji pohybuje okolo 4 cm, může být ale 2,5–12 cm dlouhý. Peduncle je 5–11 cm dlouhý, nejčastěji okolo 7 cm. Pedicel měří 0,1–1,3 cm, může ale úplně chybět (průměrně 0,5 cm). Mikrofyly jsou dlouhé 30–55 mm (průměrně 45 mm), hyalinní chlup na špičce dosahuje 15–35 mm. Mikrofyly svírají 30–60° úhel s lodyhou, nejčastěji okolo 40°.

– **subsp. *monostachyon***

Rostlina je drobnější, vázaná na cirkum-polární oblast. V nižších zeměpisných šířkách se vyskytuje ve vysokohorském prostředí, prokázána je např. z Alp a Karpat. Pro rostlinu je typický jediný klas (vzácně i dva), nesený na 0,1–4 dlouhém pedunculu. Ten může i úplně chybět. Pedicel vzhledem k absenci větvení stopky chybí. Výtrusný klas je 1–3 cm, nejčastěji 2 cm dlouhý. Mikrofyly dosahují délky mezi 3–5 mm, nejčastěji pak 4 mm. Hyalinní chlup má délku 0,5-2 mm, v průměru 1,5 mm. Úhel mikrofyly se pohybuje mezi nejčastěji okolo 25° (20-30°).

Výše vypsané znaky a jejich hodnoty jsou použitelné a je s nimi možné jednotlivé poddruhy odlišit. Situaci však komplikují tzv. přechodné typy, které se nacházejí mezi jednotlivými poddruhy jak druhu *L. annotinum* (Obr. 29 a 50), tak *L. clavatum* (Obr. 51).



Obr. 50: Přechodný jedinec *L. annotinum* z Finska (Sodankylä), ID vzorku: 21-218 (Příloha 1).



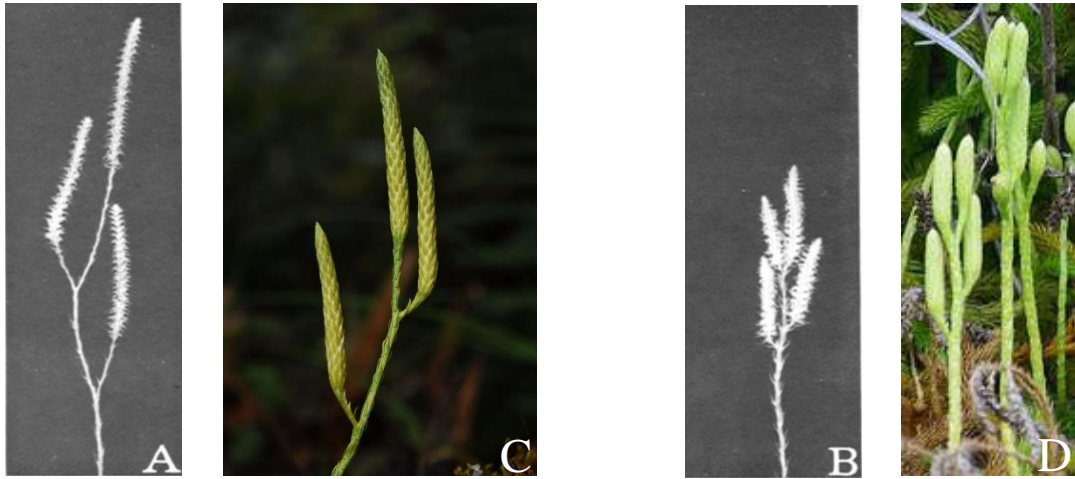
Obr. 51: Přechodný jedinec *L. clavatum* z Finska (Björkö), ID vzorku: 21-233 (Příloha 1).

5 Diskuze

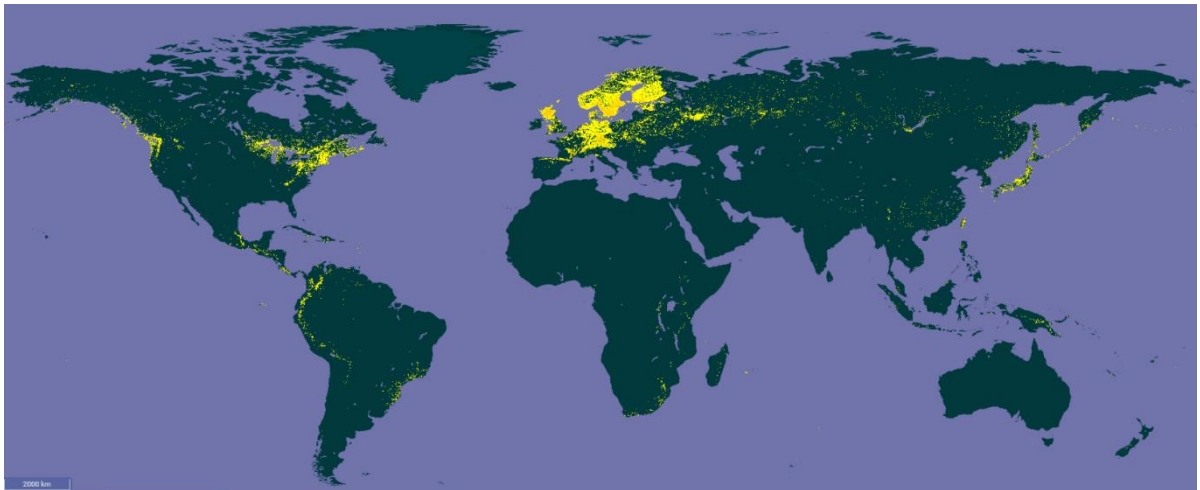
5.1 Cytologie zkoumaných druhů plavuní

V rámci této diplomové práce byly nalezeny celkem dva cytotypy *L. clavatum*, z čehož byl pouze jeden nalezen v Evropě. S přihlédnutím ke zjištěné absolutní velikosti genomu tohoto druhu (Tab. 9) a porovnáním s prací Śliwińska-Wyrzychowska et al. (2017), kde byly jak spočítány chromozomy, tak změřena absolutní velikost genomu zkoumaných rostlin, vychází, že všechny evropské rostliny *L. clavatum* analyzované v rámci této diplomové práce korespondují s diploidní hodnotou představující $2n = 68$ chromozomů. Jiný počet chromozomů pak lze dohledat pouze v pracích Takamiya & Tanaka (1982), Takamiya (1989), kdy byly kromě diploidů nalezeni i triploidi ($2n = 102$) a tetraploidi ($2n = 136$). V rámci zmíněných japonských prací Takamiya & Tanaka (1982), Takamiya (1989) bylo celkem nalezeno 359 jedinců (50 %) diploidních, 189 jedinců (26 %) tetraploidních a 172 jedinců (24 %) triploidních, u nichž se předpokládá vznik hybridizací hlavních cytotypů (Takamiya & Tanaka 1982, Takamiya 1989). Lze tedy říci, že se nejedná o náhodné zmnožení chromozomových sádek u několika rostlin, ale jedná se o fenomén rozšířený v celém Japonsku. V Evropě však nebyla cytotypová variabilita *L. clavatum* prokázána ani v práci Śliwińska-Wyrzychowska et al. (2017) a ani v rámci této diplomové práce.

Vysvětlením, proč byly v Japonsku nalezeny různé cytotypy může být například jiná taxonomická podstata studovaných taxonů. V publikacích Takamiya & Tanaka (1982) a Takamiya (1989) jsou studované rostliny určeny jako *L. clavatum*. Podle doložených fotografií (Obr. 52 a 54) by se však mohlo jednat o druh *L. japonicum* Thunb. (Obr. 53 a 55), který se stejně jako *L. clavatum* vyskytuje v Japonsku (Zhang & Iwatsuki 2013, Obr. 56 a 57), ale u kterého nejsou chromozomové počty známy. Sami autoři zmíněné publikace Zhang & Iwatsuki (2013) upozorňují, že *L. japonicum* je často chybně určováno jako *L. clavatum*. Je proto možné, že se jedná o dva rozdílné druhy (a případně jejich křížence), které nebyly v cytologických pracích Takamiya & Tanaka (1982) a Takamiya (1989) rozlišovány.



Obr. 52–55: Obrázky A a B ukazují rostliny *Lycopodium clavatum* ze studie Takamiya & Tanaka 1982. Obrázky C a D pak ukazují *L. japonicum* (POWO 2024).



Obr. 56: Rozšíření druhu *Lycopodium clavatum* (GBIF 2024).



Obr. 57: Rozšíření druhu *Lycopodium japonicum* (GBIF 2024).

Druhý cytotyp byl nalezen u variety *L. clavatum* var. *borbonicum*, což je jiho-polokoulová varieta vyskytující se pouze na několika ostrovech v Indickém oceánu. Bylo zjištěno, že *L. clavatum* var. *borbonicum* má o 10 % větší genom, než subspecie *L. clavatum* subsp. *clavatum* a *L. clavatum* subsp. *monostachyon*. Tento africký taxon je v literatuře označován buď jako varieta (Badré & Cadet 1978, Gerard 1985), či je řazen k subspecii *L. clavatum* subsp. *clavatum* (POWO 2024), což pouze podtrhuje nejasné taxonomické hodnoty poddruhů a variet u druhu *L. clavatum*.

U druhu *L. annotinum* je pak možné dohledat v literatuře jednotně pouze chromozomové číslo $2n = 68$ (Manton 1950, Löve & Löve 1966, Tsai & Shieh 1989). Chromozomové počty opět odpovídají diploidním rostlinám, což se shoduje i s výsledky této diplomové práce. Podařilo se však nalézt prvního jedince se zmnoženou chromozomovou sádkou. Jedná se o poddruh *L. annotinum* subsp. *alpestre*, získaný v roce 2022 z Islandu (viz Obr. 21). Velikost genomu odpovídala poměru 1,5 vůči ostatním měřeným rostlinám *L. annotinum* a lze tak předpokládat, že se s největší pravděpodobností jedná o triploidního jedince *L. annotinum*, což je zároveň první zaznamenaný případ u tohoto druhu / rodu (*Spinulum*) vůbec. Bohužel byl z této lokality na Islandu získán pouze jeden vzorek a tedy není jasné, zda se jednalo o náhodné zmnožení chromozomové sádky jedince, nebo jestli jsou triploidní rostliny obecně rozšířeným jevem po celém Islandu. Vzhledem k omezenému samplingu zároveň není jasné, zda se na Islandu případně vyskytují i všeobecně rozšíření diploidi a případně i (dosud neobjevení) tetraploidi, o jejichž křížence by v takovém případě mohlo jít, stejně jako je popsáno u sesterského rodu *Diphasiastrum* (Bennert et al. 2011). Alternativně by mohl tento triploid vzniknout i autopolyploidně při splynutí redukované a neredukované buňky, jako k tomu dochází i u jiných výtrusných rostlin (např. Rasbach et al. 1991, Bennert et al. 2005, 2011, Ekrt et al. 2021). Pro potvrzení či vyvrácení předložených hypotéz je však potřeba dalšího výzkumu (molekulární analýza, abortace výtrusů) a výrazné rozšíření datasetu z Islandu, či z navazujících severských oblastí Ameriky a Grónska, odkud nebyly pro tuto diplomovou práci získány žádné vzorky.

5.2 Molekulární analýzy

Alternativním přístupem k rozlišení zkoumaných druhů a jejich poddruhů je molekulární analýza DNA. Práce, která by hledala molekulární rozdíly u plavuní na poddruhové úrovni, zatím nebyla publikována, a tak je tato práce první, která se o to pokouší.

Pro tuto diplomovou práci byly vytipovány tři úseky, dva chloroplastové a jeden jaderný. Z chloroplastových úseků byly zvoleny úseky *psbA–trnH*, *trnL* a *trnL–trnF*, které jsou běžně využívány ve fylogenetických studiích zkoumajících nižší taxonomické úrovně díky jejich variabilitě (Gielly & Taberlet 1994, Ji et al. 2008, Bienek et al. 2015). Jako jaderný úsek byl zvolen ITS, který se rovněž využívá i na nižších taxonomických úrovních (Feliner & Rosselló 2007).

Získané sekvence z chloroplastových úseků se výrazně lišily mezi druhy *L. annotinum* a *L. clavatum*, což je v souladu s tradičním rozdělením druhů i rodů (Haines 2003, PPG I 2016, Zhang & Zhou 2021, Szcześniak et al. 2023).

Vnitrodruhovou variabilitu se pak podařilo odhalit u druhu *L. annotinum* v rámci úseku *psbA–trnH*. Objeveny byly dva haplotypy – jeden široce rozšířený a druhý vzácný. Rostliny, u kterých byl tento vzácný haplotyp prokázán, byly od sebe vzdáleny téměř 200 kilometrů vzdušnou čarou a každá byla určena jako jiný poddruh. Je možné, že se jedná o vnitrodruhovou variabilitu zapříčiněnou časovým, či geografickým oddělením daných populací. Pro bližší informace o povaze a rozšíření tohoto vzácného haplotypu, by však byl potřeba detailnější sampling v dané oblasti a populační sběry.

Vnitrodruhová variabilita v rámci druhu *L. clavatum* nebyla v analyzovaném datasetu objevena. Je však nutné dodat, že molekulární analýzy předložené v této diplomové práci jsou založené na třech úsecích (z nichž pouze jeden vykazuje vnitrodruhovou variabilitu) a je potřeba dalšího hloubkového výzkumu.

Ve studii z roku 2021 byla provedena fylogenetická studie plavuňovitých rostlin Chen et al. (2021), kde bylo využito sedm plastidových markerů, konkrétně *atpA*, *psbA–trnH*, *rbcL*, *rps4*, *rps4–trnS*, *trnL* a *trnL–trnF*. Z těchto sedmi markerů byly použity pro tuto diplomovou práci dva úseky, v rámci práce Chen et al. (2021) však nebyly zkoumány nižší taxonomické jednotky než druhy. V dalším kroku by proto bylo žádoucí otestovat schopnost publikovaných markerů rozlišit jednotlivé taxony na poddruhové úrovni.

5.3 Porovnání hodnot morfologických znaků s literaturou

Naměřené hodnoty morfologických znaků v rámci této práce byly porovnány s literaturou Tribsch & Schönswetter (1999), Kukkonen (2000), Tribsch (2000), Rumsey (2007), Fisher et al. (2008) udávající znaky i jednotlivých poddruhů.

Rostliny druhu *L. annotinum* byly porovnány s publikacemi Kukkonen (2000) a Tribsch (2000). Naměřené hodnoty se u druhu *L. annotinum* téměř shodují s hodnotami uváděnými v literatuře (Tab. 16), ale dají se najít i drobné rozdíly, například Kukkonen (2000) i Tribsch (2000) pro *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum* uvádějí větší rozpětí hodnot velikosti mikrofytlů než bylo naměřeno v rámci této práce. Postavení mikrofytlů podle naměřeného rozpětí hodnot pro úhel mikrofyly lze spíše interpretovat jako odstálé až vzhůru ohnuté, zatímco Tribsch (2000) uvádí pro *L. annotinum* subsp. *annotinum* postavení mikrofytlů odstálé až dolů ohnuté. Kukkonen (2000) popisuje okraj mikrofyly *L. annotinum* subsp. *annotinum* jako pilovitý, v tomto případě jde však o subjektivní hodnocení každého hodnotitele, navíc i v rámci této práce byly objeveny rostliny s nápadně pilovitým okrajem, ačkoliv se nejednalo o převažující okraj mikrofyly zjištěný u subsp. *annotinum*. Délka strobilu se pak s literaturou Kukkonen (2000) a Tribsch (2000) shoduje.

U subspecie *alpestre* se naměřené hodnoty a hodnoty z literatury v případě znaku délka mikrofyly shodují. Naměřené rozpětí úhlu mikrofyly se dá interpretovat jako postavení listu přitisklé, směřující nahoru a je tak v souladu s publikací Kukkonen (2000). Okraj mikrofyly byl u subsp. *alpestre* zjištěn i podobně zubatý až pilovitý jako u subsp. *annotinum*, ačkoliv jeho výskyt byl méně častý než u subsp. *annotinum*. Kubát (1988) pak podotýká, že zuby na okraji mikrofytlů mají pouze zanedbatelnou taxonomickou hodnotu. Délka strobilu byla naměřena i nepatrně delší, než v případě literatury Kukkonen (2000) a Tribsch (2000).

Tab. 16: Porovnání naměřených hodnot morfologických znaků *Lycopodium annotinum* subsp. *annotinum* a *L. annotinum* subsp. *alpestre* s literaturou.

poddruh	publikace	délka mikrofyly	postavení mikrofylů	okraj mikrofyly	délka strobilu
subsp. <i>annotinum</i>	Kukkonen 2000	4–10 mm	odstálé až dolů ohnuté	pilovitý	1,5–4 cm
	Tribsch 2000	(5)6–8(10) mm		zubatý	1,5–3,5(4) cm
	naměřené hodnoty	5–7 mm	55–95°	zubatý	2–3,5 cm
subsp. <i>alpestre</i>	Kukkonen 2000	2–6 mm	přítisklé, směřující nahoru	celokrajný	0,5–2 cm
	Tribsch 2000	3–5(6) mm		(téměř) celokrajný	0,5–1,5(2) cm
	naměřené hodnoty	3–5	15–65°	zvlněný až zubatý	0,5–2,5 cm

Naměřené hodnoty pro druh *L. clavatum* byly porovnávány s publikacemi Tribsch & Schönschwetter (1999), Kukkonen (2000), Rumsey (2007) a Fisher et al. (2008). Zjištěné hodnoty se s autory vybraných publikací významně nerozcházejí (Tab. 17 a 18). Naměřené hodnoty pro délku mikrofyly subsp. *clavatum* se shodují s literaturou. U postavení mikrofylů se autoři shodují i s touto diplomovou prací, pouze Tribsch & Schönschwetter (1999) uvádí, že pro *L. clavatum* subsp. *clavatum* je úhel mikrofyly $>45^\circ$, v rámci této práce však byly naměřeny i nižší hodnoty. Tribsch & Schönschwetter (1999) dále uvádí, že 70–100 % mikrofylů, je zubatých, což je v rozporu se zjištěním v této diplomové práci, kdy bylo rostlin se zubatým mikrofyly méně, než se zvlněným. V rámci práce byly nalezeny rostliny jak se zvlněným okrajem mikrofyly (Kukkonen 2000), tak i zubatým (Fisher et al. 2008). V porovnání se všemi autory byl zjištěn nižší počet strobilů na stopku. V rámci této práce byly napočítány v průměru 2–3 strobily na stopku. Tribsch & Schönschwetter (1999) však uvádějí v ojedinělých případech až 7 výtrusných klasů na stopku, Rumsey (2007) a Fisher et al. (2008) pak uvádějí až 5 strobilů na stopku. Naměřená délka strobilu se pak shodovala se všemi autory. Kukkonen (2000) a Rumsey (2007) pak udávají nižší hodnoty pro délku stopky, než byla zjištěna v rámci práce a udávaná autory Tribsch & Schönschwetter (1999) a Fisher et al. (2008).

U poddruhu *monostachyon* byla zjištěna délka mikrofyly 3–5 mm, což se shoduje i s ostatními autory, pouze Tribsch & Schönswetter (1999) uvádí rozpětí nižší, ačkoliv je uvedená hodnota měřena bez hyalinního chlupu. Postavení listů se shoduje se všemi autory. Okraj mikrofyly uvádí Fisher et al. (2008) často mírně zoubkatý, což se neshoduje se zbývajícími autory ani s touto diplomovou prací, kdy byla přítomnost zoubků u subsp. *monostachyon* spíše vzácná. Zjištěný počet strobilů se shoduje se všemi autory. Zjištěná délka strobilu se pak rozchází s publikací Fisher et al. (2008), kde je uváděna nižší hodnota, ačkoliv Kukkonen (2000) uvádí ze Skandinávie i rostliny subsp. *monostachyon* s 3,5 cm dlouhým strobilem. Naměřená délka stopky strobilu se rozchází s Rumsey (2007), který udává maximálně 1,2 cm dlouhou stopku, přičemž Kukkonen (2000) udává ze Skandinávie stejné rozpětí jako rozpětí zjištěné v rámci této práce (1–3 cm).

Tab. 17: Porovnání naměřených hodnot morfologických znaků *Lycopodium clavatum* subsp. *clavatum* s literaturou. * měřeno bez hyalinního chlupu na špičce mikrofyly.

poddruh	publikace	délka mikrofyly	postavení mikrofyly	okraj mikrofyly	počet strobilů	délka strobilu	délka stopky strobilu
subsp. <i>clavatum</i>	Tribsch & Schönswetter 1999	4–5(6)* mm	>45°	(30)70–100 % mikrofyly je zubatých	(1)2–3(7)	(1,5)2–6(8) cm	(2)4–12(15) cm
	Kukkonen 2000	3–5 mm	odstávající	téměř celokrajný	2–4	(1,8)2,5–4,5(6) cm	(2,5)3–8(13) cm
	Rumsey 2007	4–6* mm	ostávající až vzhůru ohnutý		(1)2–3(5)		(2,5)3–7(13) cm
	Fisher et al. 2008	4–5	vzhůru ohnutý	jemně zubatý	(1)2–3(5)	3–6 cm	5–10(18) cm
	naměřené hodnoty	3–5,5 mm	30–60°	zvlněný až místy zpětně zubatý	(1)2–3	2,5–5 cm	4–11 cm

Tab. 18: Porovnání naměřených hodnot morfologických znaků *Lycopodium clavatum* subsp. *monostachyon* s literaturou. * měřeno bez hyalinního chlupu na špičce mikrofyly.

poddruh	publikace	délka mikrofyly	postavení mikrofyly	okraj mikrofyly	počet strobilů	délka strobilu	délka stopky strobilu
subsp. <i>monostachyon</i>	Tribsch & Schönswetter 1999	(2)3–4* mm	<45°	0–20(40) % mikrofyly je zubatých	1(2)	(0,5)1–2,5 cm	0–2(3) cm
	Kukkonen 2000	2,5–3,5 mm	přitisklé, mírně odstávající	celokrajný, občas mírně zoubkatý	1(2)	(1)1,5–3(3,5) cm	(0)1–3(4,5) cm
	Rumsey 2007	3–5* mm	přitisklý, vzhůru ohnutý		1(2)		0–1,2 cm
	Fisher et al. 2008	3–6 mm	přitisklé, vzhůru ohnuté	často jemně zoubkaté	1	1–2 cm	až 2 cm
	naměřené hodnoty	3–5 mm	20–30°	zvlněný až místy zpětně zubatý	1(2)	1–3 cm	0–3 cm

5.4 Ovlivnění znaků prostředím

V rámci této diplomové práce byl dále testován vliv prostředí na morfologii studovaných druhů plavuní. Z množiny různých vlivů prostředí byly vybrány zeměpisná šířka a nadmořská výška. Ačkoliv podle provedených analýz má na morfologii *L. clavatum* prostředí větší vliv než na *L. annotinum*, z procent vysvětlené variability je zřejmé, že kromě hodnocených vlivů prostředí je morfologie daných poddruhů zřejmě ovlivněna i dalšími faktory. Na morfologii jedinců by mohlo mít vliv i vlastní mikrostanoviště a jeho exponovanost, či konkurence jiných rostlin (Headley et al. 1988, Schwinning & Weiner 1998, Bittebiere et al. 2012). Nelze však opomíjet potenciál kombinace vlivu prostředí a vlivu genetické podstaty materiálu.

Nápadná je také odlišná reakce *L. clavatum* a *L. annotinum* (Obr. 41–44) na zvyšující se nadmořskou výšku v nižších zeměpisných šířkách (konkrétně v Alpách). Druh *L. clavatum* na zvyšující se nadmořskou výšku reaguje snížením počtu strobilů, jejich délky a délky stopek, až na úroveň rostlin ze severu Skandinávie. Celkově je druh *L. clavatum* v závislosti na nadmořské výšce morfologicky variabilní. Snížení počtu strobilů a jejich délky může být zapříčiněno tím, že ve vyšších nadmořských výškách je subsp. *clavatum* nahrazena subsp. *monostachyon*. Tato teorie však nevysvětluje výskyt přechodných typů mezi poddruhy *clavatum* a *monostachyon*.

Potvrzen je však i vliv nadmořské výšky na fertilitu rostlin, čím vyšší nadmořská výška, tím více fertilita rostlin klesá (Bliss 1971). U rodu *Huperzia*, který je charakteristický vegetativním rozmnožováním pomocí gem, bylo zjištěno, že s přibývajícím nadmořskou výškou přibývá i gem a tím pádem má rostlina tendence šířit se spíše vegetativně (Gola 2008), což by mohlo vysvětlovat snižující se počet strobilů u druhu *L. clavatum*. U *L. annotinum* se však délka strobilu s přibývajícím nadmořskou výškou nesnižovala a i ve výškách přes 2000 metrů nad mořem si zachovala hodnoty srovnatelné s rostlinami vyskytujícími se v nížinách ve vyšších zeměpisných šířkách. Druh *L. annotinum* tak s ohledem na nadmořskou výšku tvoří spíše morfologické kontinuum.

Stejná situace nastává u znaku úhel mikrofyly, kdy alpská *L. annotinum* má srovnatelný úhel mikrofyly s rostlinami rostoucími v nižších polohách. *L. clavatum* reaguje na nadmořskou výšku přitisknutím mikrofylů na úroveň rostlin rostoucích okolo 70. rovnoběžky. Rostlina může přisedlostí mikrofylů reagovat na vzrůstající nadmořskou výšku, kdy přitisklejší mikrofyly mohou rostlině poskytovat ochranu před mrazem, suchem, či sluncem, podobně jako slouží ostatním cévnatým rostlinám například trichomy (Wang et al. 2021).

Dalším vysvětlením ale může být fakt, že se zde jedná o rozdílné poddruhy v rámci daných druhů, které se úhlem svých mikrofylů liší na základě genetické variability.

5.5 Rozšíření severských poddruhů zkoumaných druhů ve střední Evropě

V minulém století se začaly objevovat zprávy o výskytu *Lycopodium annotinum* subsp. *alpestre* a *L. clavatum* subsp. *monostachyon* i ve střední Evropě, konkrétně v Alpách (Tavel 1933, Teppner 1975, Pignatti 1983, Lauber & Wagner 1996, Tribsch & Schönswetter 1999). Zatímco v případě *L. clavatum* subsp. *monostachyon* je výskyt v Alpách přijímán a je v současné době považována za rostlinu s arкто-alpínským rozšířením (Teppner 1975, Tribsch & Schönswetter 1999), u *L. annotinum* subsp. *alpestre* je situace jiná. Ačkoliv ji publikace Tavel (1933), Pignatti (1983), Lauber & Wagner (1996) z Alp uvádějí, Tribsch (2000) se při porovnání alpských nálezů a skandinávských rostlin přiklání spíše k variantě, že se jedná o *L. annotinum* subsp. *annotinum*, která je však atypická vlivem prostředí. Při porovnání položek ze Skandinávie a alpských rostlin je zjevné, že zatímco alpské *L. clavatum* (Obr. 48) se svou morfologií skutečně více podobá subsp. *monostachyon* (Obr. 23), než subsp. *clavatum*, alpské *L. annotinum* (Obr. 47) ze stejné nadmořské výšky (2000 metrů nad mořem) je oproti subsp. *alpestre* (Obr. 20) výrazně větší a podobá se spíše subsp. *annotinum* (Obr. 19).

Ačkoliv se výskyt severských subspecií na našem území nepředpokládal, v roce 2023 byla však u Ramzové na sjezdovce v Jeseníkách nalezena rostlina (Obr. 49) morfologicky odpovídající poddruhu *L. clavatum* subsp. *monostachyon*, přičemž nejbližší lokality výskytu tohoto taxonu jsou známé ze slovenských Karpat (Kubát et al. 1988) a rakouských Alp (Teppner 1975, Tribsch & Schönswetter 1999). Při pohledu na rostlinu však není možné jednoznačně říci, zda se jedná o subsp. *monostachyon* či ne. Rostlina má totiž nápadně dlouhé stopky strobilu, což však může být zapříčiněno i tím, že roste v příhodnějších podmínkách než alpské rostliny. Rostliny připomínající *Lycopodium annotinum* subsp. *alpestre* pak z našeho území známé nejsou.

6 Závěr

Diplomová práce se zabývala rozlišením poddruhů *L. annotinum* (*L. annotinum* subsp. *annotinum* a *L. annotinum* subsp. *alpestre*) a *L. clavatum* (*L. clavatum* subsp. *clavatum* a *L. clavatum* subsp. *monostachyon*). Práce se pokusila jednotlivé poddruhy rozlišit na úrovni cytometrické (velikost genomu), molekulární (genetické) a morfologické.

V rámci studovaných druhů *L. annotinum* a *L. clavatum* byly nalezeny rozdíly ve velikosti genomu, přičemž *L. annotinum* má v průměru o 54 % větší genom než druh *L. clavatum*. U druhu *L. annotinum* se mezi zkoumanými poddruhy *L. annotinum* subsp. *annotinum* a *L. annotinum* subsp. *alpestre* nepodařilo nalézt rozdíly ve velikosti genomu. V rámci taxonu *L. annotinum* subsp. *alpestre* byl však odhalen první triploidní jedinec *L. annotinum* vůbec. Jednalo se však o jediný případ jiné než diploidní chromozomové sádky a očekávání ohledně ploidní variability plavuní rodu *Lycopodium* tak nebyla naplněna. Pomocí analýzy velikosti genomu se od sebe nepodařilo rozlišit ani poddruhy *clavatum* a *monostachyon* u druhu *L. clavatum*. U tohoto druhu byla však byla nalezena vnitrodruhová variabilita, kdy varieta *L. clavatum* var. *borbonicum* měla o 10 % větší genom, než *L. clavatum* subsp. *clavatum* a *L. clavatum* subsp. *monostachyon*.

V rámci studovaných taxonů byly nalezeny genetické rozdíly na druhové úrovni, jednotlivé poddruhy se od sebe však molekulárně odlišit nepodařilo. Nalezen byl vzácný haplotyp *L. annotinum*, avšak k objasnění četnosti vzácného haplotypu, či vztahu s běžným haplotypem je potřeba dalšího studia.

Analýzy morfologie zkoumaných druhů a jejich vybraných poddruhů ukázaly, že je možné jednotlivé poddruhy ve většině případů rozlišovat. Nejlepšími znaky k rozeznání jednotlivých poddruhů u obou druhů zkoumaných plavuní se ukázala délka mikrofyly a strobilu, v případě *L. clavatum* pak počet strobilů a délka jejich stopky. Existenci přechodných typů zkoumaných druhů plavuní se nepodařilo objasnit, stejně jako míru ovlivnění morfologie studovaných druhů plavuní prostředím.

K jasnému vymezení jednotlivých poddruhů a sjednocení jejich taxonomické klasifikace bude potřeba komplexního přístupu a dalšího morfologicko-ekofyziologického a molekulárního výzkumu.

7 Zdroje použité literatury

- Aiken S. G., Dallwitz M. J., Consaul L. L., McJannet C. L., Boles R. L., Argus G. W., Gillett J. M., Scott P. J., Elven R., LeBlanc M. C., Gillespie L. J., Brysting A. K., Solstad H., & Harris J. G. (2007): Flora of the Canadian arctic archipelago. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa.
- Badré F., & Cadet T. (1978): The pteridophytes of Réunion Island. *Fern Gazette* 11(6): 349–366.
- Beitel J. M. (1979): Clubmosses (*Lycopodium*) in North America. *Fiddlehead Forum* 5(6).
- Bennert H. W., Horn K., Kauth M., Fuchs J., Bisgaard Jakobsen I. S., Ollgaard B., Schnittler M., Steinberg M., & Viane R. (2011): Flow cytometry confirms reticulate evolution and reveals triploidy in Central European *Diphasiastrum* taxa (Lycopodiaceae, Lycopphyta). *Annals of Botany* 108: 867–876.
- Bennert H. W., Lubienski M., Körner S., & Steinberg M. (2005): Triploidy in *Equisetum* subgenus *Hippochaete* (Equisetaceae, Pteridophyta). *Annals of Botany* 95: 807–815
- Bieniek W., Mizianty M., & Szklarczyk M. (2015): Sequence variation at the three chloroplast loci (matK, rbcL, trnH-psbA) in the Triticeae tribe (Poaceae): comments on the relationships and utility in DNA barcoding of selected species. *Plant Systematics and Evolution* 301: 1275–1286.
- Bittebiere A. K., Renaud N., Clément B., & Mony C. (2012): Morphological response to competition for light in the clonal *Trifolium repens* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 99(4): 646–654.
- Bliss L. C. (1962). Adaptations of arctic and alpine plants to environmental conditions. *Arctic* 15(2): 117–144.
- Bliss L. C. (1971): Arctic and alpine plant life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2(1): 405–438.

- Cavalheiro-Filho S. L., Gestinari L. M. S., Konno T. U. P., Santos M. P., Calderon E. N., Marques M. C. H., Dos Santos F. M. G., Castilho A., Martins R. L., Esteves F. A., & Campos N. V. (2021): Morphological Plasticity in the Endemic Isoëtes Species from Serra dos Carajás, Amazonia, Brazil. *American Fern Journal* 111(3): 174–195.
- Chao Y. S., Liu H. Y., Chiang Y. C., & Chiou W. L. (2012): Polyploidy and speciation in *Pteris* (Pteridaceae). *Journal of Botany*: 2012.
- Chen D., Zhou X., Rothfels C. J., Shepherd L. D., Knapp R., Zhang L., Lu N. T., Fan X., Wan X., Gao X., He H., & Zhang L. (2021): A global phylogeny of Lycopodiaceae (Lycopodiales; lycophytes) with the description of a new genus, *Brownseya*, from Oceania. *Taxon* 71(1): 25–51.
- Chen H., Fang Y., Zwaenepoel A., Huang S., Van de Peer Y., & Li Z. (2023): Revisiting ancient polyploidy in leptosporangiate ferns. *New Phytologist* 237(4): 1405–1417.
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M. A., Nardi L., & Obermayer R. (1998): Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany* 82: 17–26.
- Ehrenberg L. (1945). Kromosomtalen hos några Kärlväxter [The chromosome numbers of some vascular plants]. *Botaniska Notiser* 4: 430–437.
- Ekrt L., Podroužek J., Hornyč O., Košnar J., & Koutecký P. (2021): Cytotypes of bracken (*Pteridium aquilinum*) in Europe: widespread diploids and scattered triploids of likely multiple origin. *Flora* 274: 151725.
- Feliner G. N., & Rosselló J. A. (2007): Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44(2): 911–919.
- Fernald M. L., & Bissell C. H. (1910): The North American variations of *Lycopodium clavatum*. *Rhodora* 12(135): 50–55.

- Field A. R., Testo W., Bostock P. D., Holtum J. A. M., & Waycott M. (2015): Molecular phylogenetics and the morphology of the Lycopodiaceae subfamily Huperzioidae supports three genera: *Huperzia*, *Phlegmariurus* and *Phylloglossum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 635–657.
- Fischer M. A., Oswald K., & Adler W. (2008): *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol*. Ed. 3. Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, Linz.
- GBIF (2024): Global Biodiversity Information Facility. <https://www.gbif.org/>
- Gerard R. V. (1985): GC/MS examination of *Lycopodium* extracts for alkaloid content [disertační práce].
- Gielly L., & Taberlet P. (1994): The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Molecular biology and evolution* 11(5): 769–777.
- Gola E. M. (2008): Reproductive strategies of *Huperzia*. Club mosses, horsetails and ferns in Poland: resources and protection. Wrocław: Polish Botanical Society, Institute of Plant Biology, University of Wrocław: 5–14.
- Grant V. (1981): *Plant speciation*. Columbia university press.
- Gulyás G., Sramkó G., Molnár V. A., Rudnóy S., Illyés Z., Balázs T., & Bratek Z. (2005): Nuclear ribosomal DNA ITS paralogs as evidence of recent interspecific hybridization in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47(2): 61–67.
- Hadač E., & Hašková V. (1956): Taxonomické poznámky o tatranských rostlinách ve vztahu k jejich cytologii. *Biologia (Bratislava)* 11/12: 717–723.
- Haines A. (2003): *The families Huperziaceae and Lycopodiaceae of New England. A taxonomic and ecological reference*. V. F. Thomas Co.
- Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symposium Series* 41: 95–98.
- Hamilton M. B. (1999): Four primer pairs for the amplification of chloroplastic intragenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521–523.

- Hans A. (1916): An interesting hybrid. *American Fern Journal* 6(2): 37–39.
- Headley A. D., Callaghan T. V., & Lee J. A. (1988): Water uptake and movement in the clonal plants, *Lycopodium annotinum* L. and *Diphasiastrum complanatum* (L.) Holub. *New Phytologist* 110(4): 497–502.
- Herrera F., Testo W. L., Field A. R., Clark E. G., Herendeen P. S., Crane P. R., & Shi G. (2022): A permineralized early cretaceous lycopsid from China and the evolution of crown clubmosses. *New Phytologist* 233(5): 2310–2322.
- Holub J. (1975): *Diphasiastrum*, a new genus in Lycopodiaceae. *Preslia* 47: 97–110.
- Hultén E., & Fries M. (1986): Atlas of North European vascular plants north of the Tropic of Cancer.
- Ji S. G., Huo K. K., Wang J., & Pan S. L. (2008): A molecular phylogenetic study of Huperziaceae based on chloroplast *rbcL* and *psbA-trnH* sequences. *Journal of Systematic Evolution* 46(2): 213–219.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M., & Štěpánek J. (Eds). (2019): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Zazvorka J., Koutecký P., Ekrt L., & Wild J. (2019b): Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 8. *Preslia* 91(4): 257–368.
- King R. A., Gornall R. J., Preston C. D., & Croft J. M. (2001): Molecular confirmation of *Potamogeton* × *bottnicus* (*P. pectinatus* × *P. vaginatus*, Potamogetonaceae) in Britain. *Botanical Journal of Linnean Society* 135: 67–70.
- Kott L. S., & Britton D. M. (1985): Role of morphological characteristics of leaves and the sporangial region in the taxonomy of *Isoetes* in northeastern North America. *American Fern Journal*, 75(2): 44–55.
- Kubát K. (1988): Lycopodiophyta - rostliny plavuňovité. In Slavík B. & Hejný S. (eds.), *Květena České republiky* 1: 190–204. Academia, Praha.
- Kukkonen I. (2000): Lycopodiaceae. In Jonsell B. (eds.) *Flora Nordica*, volume 1, Lycopodiaceae to Polygonaceae: 1–13. The Bergius Foundation, Stockholm.

- Lauber K., & Wagner G. (1996): Flora Helvetica. Bern, Stuttgart, Wien: Paul Haupt.
- Leitch I. J., & Bennett M. D. (1997): Polyploidy in angiosperms. Trends in plant science 2(12): 470–476.
- Leopold E. B. (1956): Two late-glacial deposits in southern Connecticut. Proceedings of the National Academy of Sciences 42(11): 863–867.
- Löve Á., & Löve D. (1958): Cytotaxonomy and classification of Lycopods. Nucleus 1: 1–10.
- Löve Á., & Löve D. (1966): Cytotaxonomy of the alpine vascular plants of Mount Washington. University of Colorado Studies. Series of Biology No. 24. University of Colorado, Colorado.
- Manton I. (1950): Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. Cambridge University Press.
- Øllgaard B. 1987: A revised classification of the Lycopodiaceae s. lat. Opera Botanica 92: 153–178.
- Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. Methods in cell biology.
- Philipp M. (1978): Vegetation of a snow bed at Godhavn, West Greenland. Ecography 1(1): 46–53.
- Pignatti S. (1983): Flora d'Italia. Bologna: Edagricole.
- POWO (2024): Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org/>.10.3.2024.
- PPG I. (2016): A community-derived classification for extant lycophytes and ferns: PPG I. Journal of Systematics and Evolution 54: 563–603.
- Rasbach H., Reichstein T., & Schneller J. J. (1991): Hybrids and polyploidy in the genus *Athyrium* (Pteridophyta) in Europe. 2, Origin and description of two triploid hybrids and synthesis of allotetraploids. Botanica Helvetica 94(1): 81–99.

- Robinson B. L. (1901): *Lycopodium clavatum*, var. *monostachyon* in northern Maine. *Rhodora* 3(33): 237–238.
- Rumsey F. J. (2007): An overlooked boreal clubmoss *Lycopodium lagopus* (Laest. ex Hartm.) Zinserl. ex Kusen. (Lycopodiaceae) in Britain. *Watsonia* 26: 477–480.
- Schönswetter P., Suda J., Popp M., Weiss-Schneeweiss H., & Brochmann C. (2007): Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 92–103.
- Schwinning S., & Weiner J. (1998): Mechanisms determining the degree of size asymmetry in competition among plants. *Oecologia* 113: 447–455.
- Śliwińska-Wyrzychowska A., Jędrzejczyk I., & Golczyk H. (2017): Variability of stem morphology in *Lycopodium clavatum* (Lycopodiaceae) is not related to ploidy level. *Plecevo* 150: 112–115.
- Soltis D. E., Albert V. A., Leebens-Mack J., Bell C. D., Paterson A. H., Zheng C., Sankoff D., Depamphilis C. W., Wall P. K., & Soltis P. S. (2009): Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* 96(1): 336–348.
- Soltis D. E., Soltis P. S., & Tate J. A. (2004): Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New phytologist* 161(1): 173–191.
- Sorsa V. (1961): Chromosome studies on Finnish Pteridophyta II. *Hereditas* 47(3-4): 480–488.
- Szczeńniak E., Gola E. M., & Zenkteler E. (2023): *Lykopodiofity Polski: Lycopodiales, Selaginellales, Isoëtales*. *Monographiae Botanicae*.
- Šmarda P., Bureš P., Horová L., Foggi B., & Rossi G. (2008): Genome size and GC content evolution of *Festuca*: Ancestral expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany* 101: 421–433.
- Šmilauer P., & Lepš J. (2014): *Multivariate analysis of ecological data using Canoco 5*. Cambridge University Press.

- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., & Bouvet J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17(5): 1105–1109.
- Takamiya M. (1989): Cytological and ecological studies on the speciation of *Lycopodium clavatum* L. in the Japanese archipelago. *Journal of Science of the Hiroshima University, Series B, Division 2 (Botany)* 22(2): 353–430.
- Takamiya M., & Tanaka R. (1982): Polyploid cytotypes and their habitat preferences in *Lycopodium clavatum*. *The Botanical Magazine Tokyo* 95: 419–435.
- Tavel F. (1933): Nordische Lycopodien in den Schweizeralpen. *Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft* 42: 515–521.
- Teppner V. H. (1975): *Lycopodium lagopus* - neu für die Ostalpen. *Mitt Naturwiss Vereins Steiermark*.
- Teppner V. H. (1980): Karyologie und Systematik einiger Gefasspflanzen der Ostalpen. *Botanische Studien im Gebiet der Planneralp (Niedere Tauern, Steiermark)*. VII. *Phyton* 20(1–2): 73–94.
- Testo W., Øllgaard B., Field A., Almeida T., Kessler M., & Barrington D. (2018): Phylogenetic systematics, morphological evolution, and natural groups in neotropical *Phlegmariurus* (Lycopodiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 125: 1–13.
- Tribsch A. (2000): *Lycopodium annotinum* subsp. *alpestre* - auch in den Alpen? – *Wulfenia*.
- Tribsch A., & Schönswetter P. (1999): *Lycopodium clavatum* ssp. *monostachyon* (*L. lagopus*) in den Ostalpen. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Österreich*.
- Tsai J. L., & Shieh W. C. (1987): Cytotaxonomic studies on the Lycopodiaceae in Taiwan. *Journal of Scientific and Engineering Research (Taiwan)* 24: 49–58
- Urbatsch L. E., Baldwin B. G., & Donoghue M. J. (2000): Phylogeny of the coneflowers and relatives (Heliantheae: Asteraceae) based on nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences and chloroplast DNA restriction site data. *Systematic Botany* 25(3): 539–565.

- Wagner F. S. (1992): Cytological problems in *Lycopodium* sens. lat. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79(3): 719–729.
- Wagner W. H., Jr., & Beitel J. M. In: Flora of North America editorial comitee [eds] (1993): *Lycopodiaceae* Mirbel. Club-moss family. *Flora of North America: North of Mexico* 2: 18–37.
- Wang J., Dong S., Yang L., Harris A., Schneider H., & Kang M. (2020): Allopolyploid speciation accompanied by gene flow in a tree fern. *Molecular Biology and Evolution* 37(9): 2487–2502.
- Wang X., Shen C., Meng P., Tan G., & Lv L. (2021): Analysis and review of trichomes in plants. *BMC plant biology* 21: 1–11.
- White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T., & Taylor J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18(1): 315–322.
- Wikström N., & Kenrick P. (2001): Evolution of Lycopodiaceae (Lycopside): estimating divergencetimes from *rbcL* gene sequences by use of nonparametric rate smoothing. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19(2): 177–186.
- Wu S., Han B., & Jiao Y. (2020): Genetic contribution of paleopolyploidy to adaptive evolution in angiosperms. *Molecular Plant* 13(1): 59–71.
- Xin Z., Velten J. P., Oliver M. J., & Burke J. J. (2003): High-Throughput DNA Extraction Method Suitable for PCR. *BioTechniques* 34(4): 820–826.
- Zhang L. B., & Iwatsuki K. (2013): Lycopodiaceae. In *Flora of China*, Vol. 2–3 (Pteridophytes). Science Press.
- Zhang L. B., & Zhou X. M. (2021): A new classification of Lycopodiales based on molecular phylogenetics, morphology, and spore ornamentation. *Indian Fern Journal* 38: 125–136.

8 Přílohy

Příloha 1: Seznam rostlin použitých pro cytometrické analýzy, s údaji o jednotlivých vzorcích a vyznačením vzorků použitých pro molekulární (MOL) a morfometrické analýzy (MOR).

FerDA #	interní #	rod	druh	var./subsp.	sběratel	datum sběru	země	souřadnice GPS	nadm. výška	pozn.
237	14-200	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.	2014-09-10	Velká Británie	55°25'44.225"N, 3°18'19.406"W	510	
284-1	15-366 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2015-08-23	Švédsko	58°24'9.400"N, 13°45'37.700"E	300	
284-2	15-366 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>		Ekrt, L.	2015-08-23	Švédsko	58°24'9.400"N, 13°45'37.700"E	300	
308	15-392	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>		Ekrt, L.	2015-08-28	Norsko	68°27'11.700"N, 15°5'54.300"E	120	MOR
311	15-401	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2015-09-01	Norsko	67°26'48.500"N, 15°48'26.700"E	55	
319	15-411	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2015-09-04	Norsko	58°58'25.700"N, 9°31'23.400"E	100	
320	15-411	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.	2015-09-04	Norsko	58°58'25.700"N, 9°31'23.400"E	100	
414	LE 6803	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2017-08-24	Rakousko	47°39'5.000"N, 13°47'41.000"E	725	
447	18-88	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2018-09-07	Švédsko	60°7'18.000"N, 17°28'36.000"E	80	MOR
452	18-94	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.	2018-09-09	Švédsko	65°40'53.000"N, 20°47'50.000"E	90	MOL
454	18-94	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2018-09-09	Švédsko	65°40'53.000"N, 20°47'50.000"E	90	
455	18-96	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-10	Finsko	68°2'53.000"N, 24°3'22.000"E	450	MOR
456	18-97	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2018-09-10	Finsko	68°3'6.000"N, 24°2'59.000"E	535	MOR
457	18-97	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-10	Finsko	68°3'6.000"N, 24°2'59.000"E	535	MOL, MOR

458-1	18-100 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-11	Norsko	68°54'48.000"N, 23°6'45.000"E	325	MOL, MOR
458-2	18-100 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-11	Norsko	68°54'48.000"N, 23°6'45.000"E	325	
460	18-100	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2018-09-11	Norsko	68°54'48.000"N, 23°6'45.000"E	325	MOL
461-1	18-102 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>		Ekrt, L.	2018-09-11	Norsko	69°26'40.000"N, 25°13'41.000"E	120	
461-2	18-102 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2018-09-11	Norsko	69°26'40.000"N, 25°13'41.000"E	120	
462	18-102	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2018-09-11	Norsko	69°26'40.000"N, 25°13'41.000"E	120	MOR
463-1	18-103 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-12	Norsko	70°10'21.000"N, 30°18'14.000"E	30	
463-2	18-103 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-12	Norsko	70°10'21.000"N, 30°18'14.000"E	30	MOR
466	18-110	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-14	Norsko	70°15'22.000"N, 24°5'36.000"E	250	
467	18-112	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-14	Švédsko	67°54'42.000"N, 21°35'52.000"E	380	
468-1	18-112 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2018-09-14	Švédsko	67°54'42.000"N, 21°35'52.000"E	380	MOL, MOR
468-2	18-112 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2018-09-14	Švédsko	67°54'42.000"N, 21°35'52.000"E	380	
469	18-113	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2018-09-15	Švédsko	68°21'40.100"N, 18°43'13.400"E	915	MOR
470	18-113	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-15	Švédsko	68°21'40.100"N, 18°43'13.400"E	915	
471-1	18-116 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-15	Švédsko	68°21'20.800"N, 18°35'21.500"E	1210	MOL
471-2	18-116 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-15	Švédsko	68°21'20.800"N, 18°35'21.500"E	1210	
472-1	18-117 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2018-09-15	Švédsko	68°20'58.000"N, 18°45'50.000"E	380	MOL
472-2	18-117 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2018-09-15	Švédsko	68°20'58.000"N, 18°45'50.000"E	380	
473-1	18-118 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-16	Švédsko	67°5'56.000"N, 20°34'48.700"E	720	MOL, MOR

473-2	18-118 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-16	Švédsko	67°5'56.000"N, 20°34'48.700"E	720	
474	18-119	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>		Ekrt, L.	2018-09-16	Švédsko	65°43'22.800"N, 19°20'56.700"E	440	MOR
475	18-119	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2018-09-16	Švédsko	65°43'22.800"N, 19°20'56.700"E	440	MOR
476	18-120	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2018-09-17	Švédsko	65°5'10.900"N, 14°27'38.700"E	830	
477	18-120	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-17	Švédsko	65°5'10.900"N, 14°27'38.700"E	830	MOR
479	18-126	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-18	Švédsko	62°35'59.000"N, 12°38'51.000"E	1050	
480	18-128	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>		Ekrt, L.	2018-09-18	Švédsko	62°36'5.000"N, 12°38'26.000"E	950	
481	18-130	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2018-09-18	Švédsko	62°36'2.000"N, 12°37'24.000"E	805	
482	18-132	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2018-09-19	Švédsko	61°57'36.000"N, 12°50'47.000"E	990	MOR
483	18-135	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-19	Švédsko	61°58'32.000"N, 12°51'40.000"E	1035	MOR
484	18-136	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2018-09-19	Švédsko	61°57'52.000"N, 12°47'54.000"E	830	
485	18-139	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.	2018-09-20	Švédsko	61°9'44.000"N, 13°4'48.000"E	815	MOR
486	18-142	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2018-09-21	Švédsko	59°2'32.000"N, 11°49'20.000"E	145	
525	Totes Geb. 5	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2019-08-15	Rakousko	47°43'41.000"N, 13°47'44.000"E	1240	MOR
540	19-66	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>		Ekrt, L.	2019-09-13	Francie	45°39'15.100"N, 6°51'38.800"E	2070	MOR
545	LE 7093	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.	2019-10-19	Česká republika	48°37'46.000"N, 14°32'10.000"E	710	
546	LE 7094	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2019-10-19	Česká republika	48°37'46.000"N, 14°32'10.000"E	710	MOL
1150	Březník 4	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Vejvodová, K.	2020-09-16	Česká republika	48°58'3.648"N, 13°29'0.024"E	1145	MOR
1151	20-018	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.	2020-05-09	Česká republika	48°59'51.700"N, 15°25'38.600"E	520	

1152	Sumrakov	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.	2021-04-28	Česká republika	49°10'54.7"N, 15°20'4.4"E	610	
1153	15-376	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2015-08-25	Norsko	65°17'4.500"N, 13°19'50.900"E	230	
1157-3	PYT 1-3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8511022N, 15.2769975E	875	
1157-4	PYT 1-4	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8511022N, 15.2769975E	875	
1158-6	PYT 2-6	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8594303N, 15.2987314E	880	
1158-8	PYT 2-8	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8594303N, 15.2987314E	880	
1158-9	PYT 2-9	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8594303N, 15.2987314E	880	
1159-8	PYT 3-8	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8568644N, 15.3059544E	895	
1159-9	PYT 3-9	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8568644N, 15.3059544E	895	
1160-1	PYT 4-1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8399161N, 15.3418175E	965	
1160-7	PYT 4-7	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8399161N, 15.3418175E	965	
1161-3	SMR 1-3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8755106N, 15.2851194E	880	
1161-5	SMR 1-5	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8755106N, 15.2851194E	880	MOR
1162-6	JIZ 1-6	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8304764N, 15.2365983E	980	
1162-7	JIZ 1-7	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8304764N, 15.2365983E	980	
1163-1	JIZ 2-1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8237872N, 15.2747189E	905	
1163-6	JIZ 2-6	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Šternerová, L.	2020-08-19	Česká republika	50.8237872N, 15.2747189E	905	
1233	20-116	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2020-09-19	Itálie	46°52'47.800"N, 12°11'16.200"E	2090	
1238	20-119	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2020-09-19	Itálie	46°49'27.900"N, 12°4'55.600"E	1110	

1277	20-132	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2020-09-22	Itálie	46°10'15.400"N, 11°26'56.100"E	2120	MOR
1298	20-140	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2020-09-23	Rakousko	47°7'34.700"N, 12°27'47.300"E	1680	MOR
1316	20-150	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2020-09-24	Rakousko	47°16'46.800"N, 13°4'45.000"E	870	
1331	20-100	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2020-08-13	Slovakia	49°16'13.100"N, 20°13'46.800"E	1000	
1343-1	20-105 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2020-08-13	Slovakia	49°15'34.100"N, 20°13'52.400"E	1010	
1343-2	20-105 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2020-08-13	Slovakia	49°15'34.100"N, 20°13'52.400"E	1010	
1366	Kongsberg 3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Kolář, F.	2020-05-30	Norsko	59°34'49.937"N, 9°31'42.245"E	470	
1540-1	Lan 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Brožová, V.	2021-07-28	Norsko	69°18'16.283"N, 20°26'38.981"E	120	MOL
1540-2	Lan 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Brožová, V.	2021-07-28	Norsko	69°18'16.283"N, 20°26'38.981"E	120	
1541	Lal 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpeste</i>	Brožová, V.	2021-07-27	Norsko	69°14'46.351"N, 20°26'27.136"E	780	MOL, MOR
1542	Lal 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Brožová, V.	2021-07-27	Norsko	69°14'46.351"N, 20°26'27.136"E	780	MOL
1551	21-002	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.	2021-04-05	Česká republika	49°12'26.590"N, 15°34'37.866"E	640	
1575-1	MS 932-1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Vejvodová, K.; Štech, M.	2021-08-04	Česká republika	48°59'8.236"N, 13°26'59.582"E	1200	MOR
1575-2	MS 932-2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Vejvodová, K.; Štech, M.	2021-08-04	Česká republika	48°59'8.236"N, 13°26'59.582"E	1200	
1575-3	MS 932-3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Vejvodová, K.; Štech, M.	2021-08-04	Česká republika	48°59'8.236"N, 13°26'59.582"E	1200	
1593	Ovesná	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>		Vejvodová, K.	2021-10-17	Česká republika	48°55'26.722"N, 14°3'24.780"E	800	
1805	21-66	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-07-10	Rakousko	47°23'41.518"N, 13°4'44.245"E	1280	
1819	21-75	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-07-11	Rakousko	46°49'29.114"N, 12°41'20.598"E	2040	
1820	21-76	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-07-11	Rakousko	46°49'27.649"N, 12°41'29.047"E	2040	

1829-1	21-80 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-07-12	Rakousko	47°11'46.910"N, 12°6'34.006"E	1540	
1829-2	21-80 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-07-12	Rakousko	47°11'46.910"N, 12°6'34.006"E	1540	
1842	21-87	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-07-12	Rakousko	47°13'11.853"N, 12°6'46.105"E	1420	
1858	21-88	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-07-13	Rakousko	47°27'52.308"N, 13°48'36.687"E	1720	
1860	21-90	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-07-13	Rakousko	47°28'9.505"N, 13°47'43.753"E	1670	
1961	21-152	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-08-15	Rakousko	46°48'21.960"N, 14°58'7.432"E	1690	MOR
1975	21-174	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-14	Polsko	53°42'16.268"N, 22°40'28.528"E	120	
1980-1	21-178 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-15	Litva	55°32'37.057"N, 24°57'2.218"E	90	
1980-2	21-178 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-15	Litva	55°32'37.057"N, 24°57'2.218"E	90	MOR
1980-3	21-178 3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-15	Litva	55°32'37.057"N, 24°57'2.218"E	90	
1980-4	21-178 4	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-15	Litva	55°32'37.057"N, 24°57'2.218"E	90	
1981	21-178	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-15	Litva	55°32'37.057"N, 24°57'2.218"E	90	MOR
1990	21-182	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-15	Litva	55°42'54.961"N, 23°25'29.093"E	120	MOR
1993	21-184	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-15	Litva	55°42'59.036"N, 23°25'28.524"E	120	
1994	21-185	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-15	Latvia	57°14'50.546"N, 25°1'19.236"E	30	
1998	21-186	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-16	Latvia	57°15'3.672"N, 25°1'7.831"E	20	
2001	21-188	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-16	Latvia	57°14'57.815"N, 25°0'40.100"E	20	MOR
2009	21-192	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-16	Estonia	58°22'0.678"N, 25°3'45.040"E	40	
2020	21-194	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-16	Estonia	58°27'40.075"N, 25°2'14.205"E	25	

2032	21-198	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-18	Finsko	60°38'1.180"N, 27°12'14.314"E	40	
2034-1	21-199 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-18	Finsko	62°28'54.170"N, 27°5'47.828"E	110	
2034-2	21-199 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-18	Finsko	62°28'54.170"N, 27°5'47.828"E	110	
2034-3	21-199 3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-18	Finsko	62°28'54.170"N, 27°5'47.828"E	110	
2034-4	21-199 4	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-18	Finsko	62°28'54.170"N, 27°5'47.828"E	110	
2034-5	21-199 5	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-18	Finsko	62°28'54.170"N, 27°5'47.828"E	110	
2034-6	21-199 6	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-18	Finsko	62°28'54.170"N, 27°5'47.828"E	110	
2036	21-199	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-18	Finsko	62°28'54.170"N, 27°5'47.828"E	110	MOR
2050	21-205	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-19	Finsko	62°35'25.656"N, 26°42'20.819"E	110	
2051	21-206	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-19	Finsko	64°18'22.809"N, 28°1'14.412"E	140	MOR
2053	21-207	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-19	Finsko	64°56'5.946"N, 28°47'1.489"E	220	MOL
2054-1	21-207 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-19	Finsko	64°56'5.946"N, 28°47'1.489"E	220	MOL, MOR
2054-2	21-207 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-19	Finsko	64°56'5.946"N, 28°47'1.489"E	220	MOR
2055-1	21-207 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-19	Finsko	64°56'5.946"N, 28°47'1.489"E	220	
2055-2	21-207 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-19	Finsko	64°56'5.946"N, 28°47'1.489"E	220	
2055-3	21-207 3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-19	Finsko	64°56'5.946"N, 28°47'1.489"E	220	
2057-1	21-209 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-20	Finsko	66°13'11.265"N, 28°34'4.562"E	420	MOL
2057-2	21-209 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-20	Finsko	66°13'11.265"N, 28°34'4.562"E	420	
2058-1	21-209 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-20	Finsko	66°13'11.265"N, 28°34'4.562"E	420	MOL

2058-2	21-209 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-20	Finsko	66°13'11.265"N, 28°34'4.562"E	420	
2059	21-209	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-20	Finsko	66°13'11.265"N, 28°34'4.562"E	420	MOL
2074	21-217	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-21	Finsko	67°1'4.321"N, 27°14'9.121"E	235	
2075-1	21-218 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>		Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-21	Finsko	67°44'7.156"N, 26°45'27.965"E	180	
2075-2	21-218 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>		Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-21	Finsko	67°44'7.156"N, 26°45'27.965"E	180	
2076-1	21-218 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-21	Finsko	67°44'7.156"N, 26°45'27.965"E	180	MOL, MOR
2076-2	21-218 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-21	Finsko	67°44'7.156"N, 26°45'27.965"E	180	
2082-1	21-220 1	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-21	Finsko	68°20'34.339"N, 27°28'28.833"E	380	MOL, MOR
2082-2	21-220 2	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-21	Finsko	68°20'34.339"N, 27°28'28.833"E	380	
2085	21-221	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-21	Finsko	68°20'27.186"N, 27°30'15.163"E	530	
2086	21-221	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-21	Finsko	68°20'27.186"N, 27°30'15.163"E	530	MOL, MOR
2089-1	21-223 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-22	Finsko	66°50'49.402"N, 26°11'30.063"E	140	
2089-2	21-223 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-22	Finsko	66°50'49.402"N, 26°11'30.063"E	140	MOR
2091	21-224	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-22	Finsko	66°50'47.026"N, 26°11'25.073"E	140	
2092	21-225	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-22	Finsko	66°55'41.848"N, 26°13'46.006"E	150	MOL, MOR
2094	21-226	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-22	Finsko	65°21'4.205"N, 25°20'19.684"E	10	MOR
2097	21-227	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-23	Finsko	63°19'58.400"N, 23°10'9.116"E	40	MOL
2102	21-229	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-23	Finsko	63°21'38.599"N, 21°22'49.253"E	20	MOR
2110	21-232	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-24	Finsko	63°22'5.074"N, 21°24'7.578"E	10	MOR

2111-1	21-233 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-24	Finsko	63°22'1.945"N, 21°22'29.248"E	10	
2111-2	21-233 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-24	Finsko	63°22'1.945"N, 21°22'29.248"E	10	MOR
2111-3	21-233 3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-24	Finsko	63°22'1.945"N, 21°22'29.248"E	10	
2113	21-234	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-24	Finsko	62°45'29.671"N, 22°47'53.311"E	95	MOR
2121-1	21-238 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-25	Finsko	62°44'7.415"N, 22°47'17.210"E	80	
2121-2	21-238 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-25	Finsko	62°44'7.415"N, 22°47'17.210"E	80	MOR
2122	21-238	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-25	Finsko	62°44'7.415"N, 22°47'17.210"E	80	MOL, MOR
2123	21-239	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-25	Finsko	62°44'39.455"N, 22°46'48.662"E	80	
2125	21-240	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-25	Finsko	62°6'20.398"N, 22°53'53.740"E	140	MOR
2128	21-242	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-25	Finsko	62°6'30.578"N, 22°54'12.334"E	145	MOL
2130	21-243	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-25	Finsko	62°6'7.542"N, 22°52'56.557"E	140	
2141	21-248	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-26	Finsko	60°33'58.986"N, 24°0'22.727"E	110	
2145-1	21-251 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-26	Finsko	60°6'8.291"N, 23°16'46.225"E	10	
2145-2	21-251 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-26	Finsko	60°6'8.291"N, 23°16'46.225"E	10	MOR
2162	21-259	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-29	Latvia	56°57'55.647"N, 23°32'10.094"E	10	
2165-1	21-262 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-30	Polsko	53°27'8.406"N, 22°36'8.647"E	120	MOR
2165-2	21-262 2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-30	Polsko	53°27'8.406"N, 22°36'8.647"E	120	
2165-3	21-262 3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2021-09-30	Polsko	53°27'8.406"N, 22°36'8.647"E	120	
2515	22-125	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2022-08-07	Rakousko	46°53'24.216"N, 12°12'25.438"E	2020	MOL, MOR

2518	22-126	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2022-08-07	Itálie	46°53'10.579"N, 12°12'4.950"E	2080	MOL, MOR
2526	22-130	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>		Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2022-08-09	Itálie	46°54'47.837"N, 11°45'40.244"E	1840	
2528	22-132	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>		Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2022-08-09	Itálie	46°54'39.150"N, 11°45'33.350"E	1930	MOL
2533	22-137	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>		Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2022-08-10	Itálie	46°47'41.906"N, 12°6'46.422"E	1880	MOL
2537	22-139	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>		Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2022-08-11	Itálie	46°40'3.508"N, 12°21'57.672"E	1670	MOL
2705-1	K067-1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Koutecký, P.; Dolejšek, V.	2022-07-24	Švédsko	62°35'58.056"N, 12°40'39.936"E	1220	
2705-2	K067-2	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Koutecký, P.; Dolejšek, V.	2022-07-24	Švédsko	62°35'58.056"N, 12°40'39.936"E	1220	MOL, MOR
2912	10/8/3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Šternerová, L.	2022-08-09	Rakousko	47°23'31.699"N 14°11'3.911"E	1980	MOL, MOR
	23-52-1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2023-06-27	Česká republika	50°11'2.213"N, 17°4'39.536"E	990	MOL, MOR
2703	Island - Čejková	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Čejková, A.	2022-06-14	Island	66°7'41.179"N, 18°3'59.063"W	160	MOL, MOR
2731-9	Inuvik-11	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Hille, E.	2022-09-01	Canada	68°21'35.169"N, 133°42'7.102"W	50	MOL, MOR
	GRU- Kobyckati	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Novák, P.	2023	Gruzie	41°46'29.194"N, 41°51'52.131"E	200	MOL
	23-112 3	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	var. <i>borbonicum</i>	Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2023-09-15	Francie	21°4'57.756"S, 55°31'26.245"E	1820	MOL
2618-1	22-152 1	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>		Ekrt, L.; Vejvodová, K.	2022-09-05	Itálie	44°21'23.904"N, 10°6'20.956"E	1490	MOL
	CAN-2- Burkytova	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Fišer, P.	2023-09-09	Canada	51°15'16.175"N, 117°28'13.757"W	1440	MOL
374772	GRU-Mazeri	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Novák, P.	2022-08	Gruzie	43°7'11.591"N, 42°35'32.576"E	1850	MOL
2915	10/8/6b	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Šternerová, L.	2022-08-09	Rakousko	47°23'29.224"N 14°11'32.459"E	2010	MOR
	Hůrky (Úněšov)	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>clavatum</i>	Vejvodová, K.	2023	Česká republika	49°53'44.616"N, 13°11'5.904"E	550	MOR
	LE4333	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Ekrt, L.	2004-07-24	Rusko		160	MOE

	957MS	<i>Lycopodium</i>	<i>clavatum</i>	subsp. <i>monostachyon</i>	Vejvodová, K.; Štech, M.	2021-08-04	Česká republika	48°58'11.381"N, 13°27'26.896"E	1250	MOR
369262	9/8/1b	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Šternerová, L.	2022-08-09	Rakousko	47°23'42.703"N 14°11'17.56"E	1830	MOR
	LE4333	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>annotinum</i>	Ekrt, L.	2004-07-24	Rusko	69°23'50.400"N, 32°5'19.000"E	160	MOR
2707	K064	<i>Lycopodium</i>	<i>annotinum</i>	subsp. <i>alpestre</i>	Koutecký, P.; Dolejšek, V.	2022-07-24	Švédsko	62°52'50.556"N, 12°41'9.168"E	980	MOR