

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Bc. Kristýna Dvořáková**

**Hybridizace a mikroevoluční vztahy u střeoevropských zástupců rodu**

***Diphasiastrum* Holub**

Hybridization and microevolutionary relationships among Central European

*Diphasiastrum* species

**Diplomová práce**

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Praha, 2012



**Prohlášení:**

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

V Praze, 07.05.2012

Kristýna Dvořáková

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem lidem, kteří mi pomohli s vypracování této práce.

V první řadě patří obrovský dík mému školiteli Tomáši Urfusovi za jeho obrovské nadšení a veliký zájem o jakékoli téma, o plavunících ani nemluvě. Tomíkovi bych chtěla dále poděkovat za jeho obrovskou vstřícnost, trpělivost a obětavost, za množství cenných rad a připomínek a za vynaložení velikého úsilí, zejména při dokončování práce. Díky za jeho věčný optimismus, bez kterého bych opravdu nevěděla, co si s výsledky počít. Tomíkovi a také Petru Vítovi moc děkuji za pomoc v terénu, při cytometrických analýzách a také za leckteré užitečné připomínky a rady. Veliký dík patří také Liboru Ekrtovi, bez kterého by zůstala zejména Šumava téměř „neprozkoumaná“ a „nevysbíraná“. Filipu Kolářovi bych chtěla poděkovat za pomoc při hlubších statistických analýzách, ve kterých bych se dočista ztratila a také za „laické“ vysvětlení leckterých pojmů a interpretace výsledků. Filipovi, Jirkovi Malíčkoví a Hance Chudáčkové děkuji také za dovezení materiálu ze zahraničí. Hance děkuji i za její znalost angličtiny a obětavou pomoc. Nemohu opomenout ani ostatní botaniky a pracovníky ochrany přírody, kteří mi poradili, kde hledat či mi rostliny přímo „dodali“. Můj dík tak patří Rudolfu Hlaváčkoví z Příbramského muzea, bez kterého bych tu jedinou rostlinku *D. tristachyum* v Brdech opravdu nenašla. Dále Lojzovi Pavlíčkoví, Richardu Štenclovi, Marii Popelářové tímto děkuji za dodání množství materiálu, nejen z Beskyd a Jeseníků.

Obrovský dík patří také mé rodině a přátelům za podporu, ale také za nejjeden doprovod na cestách. Honzíkovi moc děkuji za snahu sdílet mé nadšení pro tyto rostlinky, zejména při šplhání po černých sjezdovkách a také za jeho trpělivost, zejména při závěrečných úpravách práce. Tatínkovi děkuji za časté poskytnutí dopravního prostředku a částečné financování výprav. Svému věrnému pátku, mamince, moc a moc děkuji za pomoc s čímkoli a za ochotu lézt se mnou po svazích a sjezdovkách Krkonoš i Jeseníků a také za její obrovské nadšení pro jakýkoli výlet na neznámá místa.

Práce byla financována z prostředků GAUK č. 90809.

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Charakteristika rodu <i>Diphasiastrum</i> Holub.....	3
2.1 Stručná charakteristika rodu.....	3
2.2 Charakteristika jednotlivých středoevropských zástupců.....	8
2.2.1 Základní druhy.....	8
2.2.1.1 <i>Diphasiastrum alpinum</i> (L.) Holub – plavuník alpínský.....	8
2.2.1.2 <i>Diphasiastrum complanatum</i> (L.) Holub – plavuník zploštělý.....	10
2.2.1.3 <i>Diphasiastrum tristachyum</i> (Pursh) Holub – plavuník cypřiškovitý.....	12
2.2.2 Vedlejší druhy.....	14
2.2.2.1 <i>Diphasiastrum issleri</i> (Rouy) Holub – plavuník Isslerův.....	14
2.2.2.2 <i>Diphasiastrum oellgaardii</i> Stoor et al. – plavuník Oellgaardův.....	16
2.2.2.3 <i>Diphasiastrum zeilleri</i> (Rouy) Holub – plavuník Zeillerův.....	18
2.4 Situace v jiných oblastech.....	20
2.4.1 Skandinávie.....	20
2.4.2 Severní Amerika.....	20
2.4.3 Jižní Amerika.....	22
2.4.4 Jihovýchodní Asie aj.....	22
2.4.5 Afrika.....	23
3. Hybridizace a polyploidie.....	24
4. Metodika.....	28
4.1 Sběr rostlinného materiálu.....	28
Tab.č. 1: Seznam lokalit v České republice i v zahraničí.....	30
4.2 Průtoková cytometrie.....	33
4.3 Klasická morfometrická analýza.....	35
4.3.1 Klasická morfometrika prýtů.....	35
4.3.2 Klasická morfometrika sporofylů.....	37
4.4 Geometrická morfometrická analýza.....	38
4.4.1 Geometrická morfometrika prýtů.....	38
4.4.2 Geometrická morfometrika sporofylů.....	41
5. Výsledky.....	42
5.1 Průtoková cytometrie.....	42
5.2 Klasická morfometrická analýza.....	44
5.2.1 Klasická morfometrika prýtů.....	44
5.2.2 Klasická morfometrika sporofylů.....	49
5.3 Geometrická morfometrická analýza.....	51
5.3.1 Geometrická morfometrika prýtů.....	51
5.3.2 Geometrická morfometrika sporofylů.....	56
6. Ochrana.....	59
7. Diskuze.....	62
8. Závěr.....	69
9. Seznam obrázků.....	70
10. Seznam použité literatury.....	72

# 1. Úvod

Jedním ze stěžejních mechanismů evoluce je bezesporu proces hybridizace<sup>1)</sup>, tedy křížení mezi dvěma odlišnými druhy. Hybridizace zásadním způsobem ovlivňuje generování genetické variability, resp. často vznik případně zánik taxonů (např. Anderson & Stebbins 1954, Riesberg & Wendel 1993, Rieseberg 1997, Briggs & Walters 2001, Wissemann 2007). V dnešní době známe mnoho případů náhlého vzniku druhu prostřednictvím tzv. saltační (skokové) speciace, kdy dochází ke změnám v uspořádání a počtu chromozomů. Typickým příkladem takového evolučního mechanismu je již zmíněná hybridizace či polyploidizace (Briggs & Walters 2001). Nové druhy či vzniklé hybridy mohou být izolováni ekologicky, ale ne vždy vzniká izolace reprodukční. Na místech setkávání rodičovských druhů s následným procesem hybridizace a zpětného křížení může docházet ke vzniku hybridních rojů. Ty jsou známy u mnoha skupin krytosemenných rostlin (Grant 1981), ale jsou velmi neobvyklé u rostlin výtrusných, kde jsou hybridy převážně sterilní (Mayr 1942, Wagner 1992, Haufer 1996). Na rozdíl od kapradin však byla allohomoploidní speciace (produkce fertálních sporofytů beze změny ploidie) i velká míra mezidruhově hybridizace zaznamenána u blízké příbuzných plavuní (Wagner et al. 1985, Øllgaard 1987, Wagner 1992, Haufler 2008).

Specifickým příkladem hybridizace je tzv. introgresivní hybridizace způsobující postupné mizení mezidruhově rozdílných. Dosud byl tento proces zpětných křížení jen málo studován u krytosemenných rostlin, tím méně pak u rostlin výtrusných (Wagner 1992, Haufer 1996).

A i když doba největšího rozkvětu a dominance plavuní, které jsou dnes považovány spíše za „živé fosilie“ už dávno pominula, jistě si zaslouží naši pozornost. Ve své diplomové práci se proto věnuji mikroevolučním vztahům u jednoho ze zástupců nevelké čeledi *Lycopodiaceae*, rodu *Diphasiastrum* Holub – plavuník (syn. *Lycopodium* sect. *Complanata* Victorin). Tento rod zahrnuje vytrvalé byliny s plazivými, často kořenujícími, lodyhami a vzpřímenými větvemi (prýty) nesoucími přisedlé či stopkaté výtrusnice. Celosvětově sem bývá řazeno přibližně 20 až 30 druhů. Hlavním místem výskytu plavuníků jsou temperátní a subarktické oblasti severní polokoule. Některé druhy je možné najít i v tropech a to především v montánním až alpínském pásmu (Hultén 1958, Meusel et al. 1965, Wilce 1965, Dostál 1984, Kubitzki 1990, Jermy 1993, Procházka et al. 1998, Jäger & Werner 2005, Bennert et al. 2007). Bylo popsáno také množství endemických druhů z Atlantských a Pacifických ostrovů (Wilce 1961, 1965, Bennert et al. 2007).

Na území střední Evropy bývá rozlišováno druhů šest s množstvím poddruhů a variet. Tři tradičně rozlišované: *D. alpinum* (L.) Holub - plavuník alpínský, *D. complanatum* (L.) Holub - p. zploštělý a *D. tristachyum* (Pursh) Holub - p. cypřiškový jsou dnes považovány za druhy základní

---

<sup>1)</sup> Hybridizací je v tomto kontextu myšlena mezidruhově hybridizace.

a tři za hybridogenní druhy: *D. oellgaardii* Stoor et al. - p. Oellgaardův, *D. issleri* (Rouy) Holub - p. Isslerův, *D. zeilleri* (Rouy) Holub - p. Zeillerův (Stoor et al. 1996, Procházka 1997, Kubát 1997, Vogel & Rumsey 1999, Kubát 2002). Jejich taxonomické hodnocení se však v různých regionech liší. Stále není jisté, zda jsou vedlejší druhy hybridogenní či zda se jedná o recentně vznikající hybridy. Česká Republika spolu s Německem, Rakouskem a Francií je jedním z mála míst výskytu všech šesti druhů plavuníků (Adler et al. 1994, Kubát 1997, Bennert 1999, Procházka 1999, Jäger & Werner 2005, Haeupler & Muer 2007). V rámci České republiky patří tyto rostliny mezi ohrožené, silně a kriticky (Procházka 2001). Všechny střeoevropské druhy jsou pravděpodobně diploidní s chromozomovým číslem  $2n = 46$  (44, 48, 50; Manton 1950, Wilce 1965, Dostál 1984, Wagner 1992, Marhold et al. 2007). Polyploidní druhy jsou udávány vzácně. Mimo Evropu byly nalezeny dva: *D. wightianum* (Grev. et Hook) a *D. zancophyllum* (J.H. Wilce) Holub ( $2n = 4x = 96$ ; Ninan 1958, Wilce 1961, 1965). Ve střední Evropě, resp. Německu byly nedávno nalezeny také triploidní hybridní rostliny (Bennert et al. 2011).

Potvrzení hybridizace v rámci rodu *Diphasiastrum* komplikuje mnoho faktorů. Mají poměrně jednoduchou morfologii s několika diskrétními morfologickými znaky (Wilce 1961, 1965; Vogel & Rumsey 1999) a velmi málo je známo o jejich reprodukční biologii. Díky závislosti gametofytu na mykorrhize jsou laboratorní pokusy klíčení spor velmi komplikované a křížící experimenty jsou prakticky nemožné (Wilce 1965, Aagard 2009). Jeden z pokusů vyřešit problematiku původu vedlejších (hybridogenních) druhů byl proveden pomocí allozymových analýz na konci 20. století (Stoor et al. 1996). Vysoká míra hybridizace byla potvrzena také mezi základními druhy (Kukkonen 1994). Vysvětlením morfologické variability řady popsaných drobných taxonů s intermediárním charakterem mezi základními a vedlejšími druhy by mohla být introgrese. Jedním takovým je např. *D. alpinum* susp. *kablikianum* Domin, syn. *D. kablikianum* (Domin) Dostál, nalezené v Krkonoších (Kubát 1997, Dostál 1984, 1989). Také fakt, že vedlejší (hybridní) druhy vykazují zřejmě plnou fertilitu (Kukkonen 1994), ukazuje na možnost zpětného křížení.

Pro ověření mikroevolučních vztahů v rámci skupiny i pro přesné taxonomické zhodnocení vedlejších druhů byly použity cytologické (průtoková cytometrie) a morfometrické (geometrická a klasická morfometrika) postupy.

### **Cíle diplomové práce:**

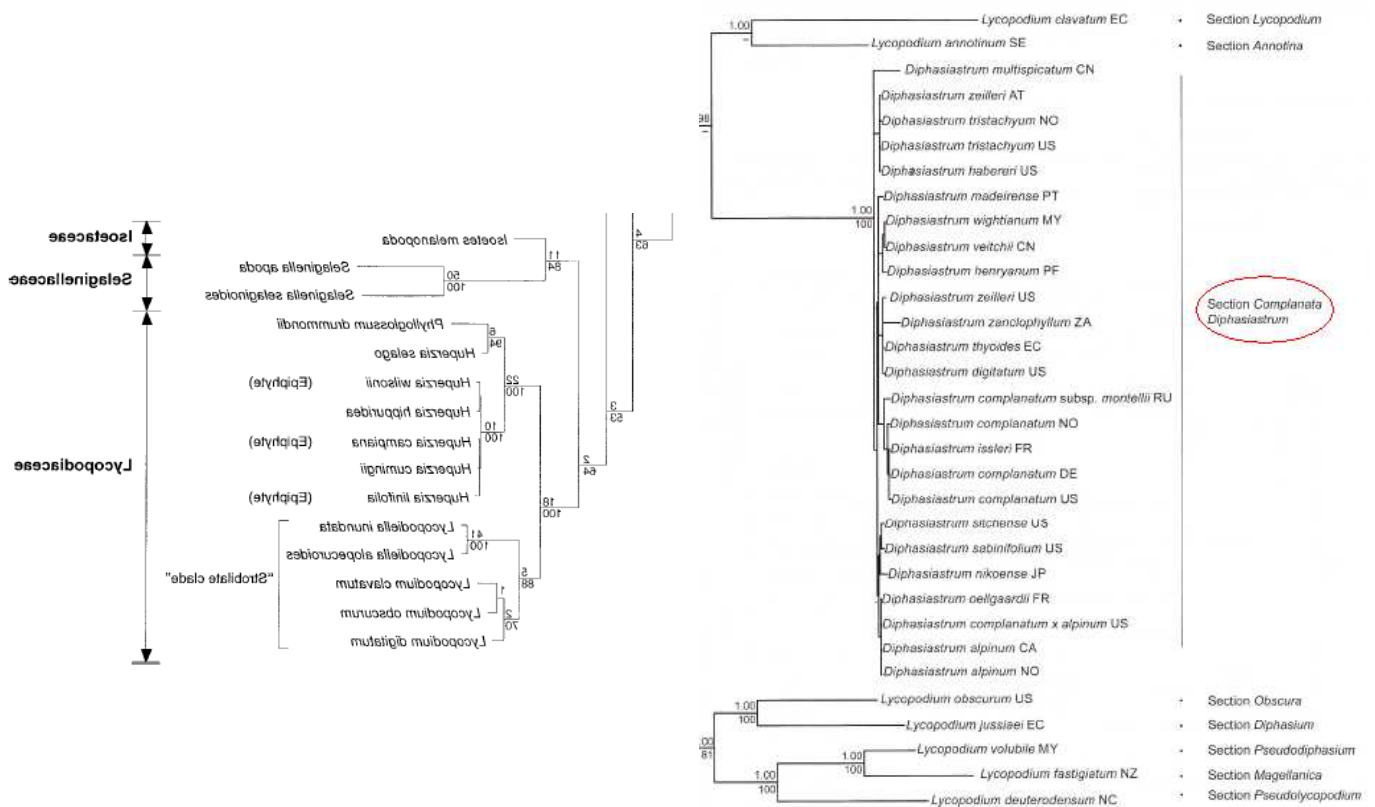
1. Diferenciace taxonů na úrovni absolutní velikosti genomu spolu s morfometrickým zhodnocením
2. Určení míry četnosti introgresivní hybridizace
3. Aplikace získaných poznatků na efektivní ochranu studovaných taxonů.

## 2. Charakteristika rodu *Diphasiastrum* Holub

### 2.1 Stručná charakteristika rodu

Plavuně jsou starobylou skupinou zahrnující jedny z nejčasnějších suchozemských rostlin. Zejména v karbonu byly vegetačními dominantami a tvořily celé pralesy. Naproti tomu v dnešní době se jedná o malé, často přehlížené rostliny s několika málo rody. Když už ne velikost, tak alespoň morfologie jim z větší části zůstala. Často jsou proto nazývány živými fosiliemi (Heuber 1992). V dnešní době patří do Lycopodiophyt 3 čeledi: *Lycopodiaceae* (plavuňovitě), *Selaginellaceae* (vranečkovité) a *Isoetaceae* (šídlatkovité). Někdy bývá uváděna ještě samostatná čeleď *Huperziaceae* (vrancovitě; Kubát 1997), která je jindy řazena v rámci čeledi *Lycopodiaceae*. Největší z Lycopodiophyt je právě čeleď *Lycopodiaceae*, do které spadá mimo jiné i rod *Diphasiastrum*. Dále je dnes mezi plavuňovitě řazeno 5 až 7 rodů s přibližně stovkou druhů. U nás jsou známé rody *Huperzia* Bernh. (vranec), *Lycopodiella* Holub (plavuňka), *Lycopodium* L. (plavuň) a *Diphasiastrum* (plavuník).

Samotný rod *Diphasiastrum* (syn.: *Lycopodium* L. Sect. *Complanata* Victorin, *Diphasium* C. Presl, *Stachygynandrum* C. Presl) byl dlouhá léta zahrnovaný pod rod *Lycopodium* (plavuň) v němž byl posléze řazen do samostatné sekce *Complanata* (Wilce 1965, Øllgaard 1987, 1989, 1990). V letech 1944 až 1975 byly plavuníky často přiřazovány k rodu či sekci *Diphasium* (Rothmaler 1944), který ovšem v dnešním pojetí zahrnuje malou skupinu tropických a na jižní polokouli se vyskytujících rostlin (Øllgaard 1987). Až Holub v roce 1975 označil *Diphasiastrum* za samostatný rod. Také fylogenetické analýzy chloroplastové DNA potvrdily monofyletický původ této skupiny (Aagard 2009; obr.č. 1 na str. 4). Od plavuní se plavuníky liší šupinovitými listy uspořádanými ve čtyřech řadách a jejich sterilní větve bývají zploštělé (např. Holub 1975, Kubát 1997). Rod *Diphasiastrum* zahrnuje vytrvalé rostliny s dlouze plazivými kořenujícími pod- či nadzemními lodyhami, resp. oddenky. Vzpřímené vidličnatě větvené prýty pokryté čtyřmi řadami šupinovitých listů nesou přisedlé nebo stopkaté výtrusnicové klasy. Lodyhy i sterilní větve bývají zřetelně dorziventrálně zploštělé. Listy jsou většinou zřetelně tvarově rozlišené na hřbetní, břišní a postranní. Výtrusy uzavřené v ledvinovitých výtrusnicích dozrávají v červenci až září (Holub 1975, Dostál 1989, Wagner & Beitel 1993, Adler et al. 1994, Stoor et al. 1996, Kubát 1997, 2002, Jäger & Werner 2005, Frey et al. 2006).



**Obr. č. 1:** Dva fylogenetické stromy ukazující evoluční vztahy v čeledi *Lycopodiaceae* založené na *rbcL* sekvencích.

**Vlevo:** strom ze studie Wikström & Kenrick (1997), který ukazuje na monofyletický původ rodů *Lycopodium* a *Lycopodiella*, zatímco rod *Huperzia* je k nim sesterskou větví. Rod *Diphasiastrum* zde zatím není odlišený.

**Vpravo:** fylogenetický strom z novější studie Aagard (2009). Rod *Diphasiastrum* je zde již v rámci čeledi odlišený a je označen oběma způsoby – jako sekce *Complanata* v rámci rodu *Lycopodium* a také, dnes používaným názvem *Diphasiastrum*.

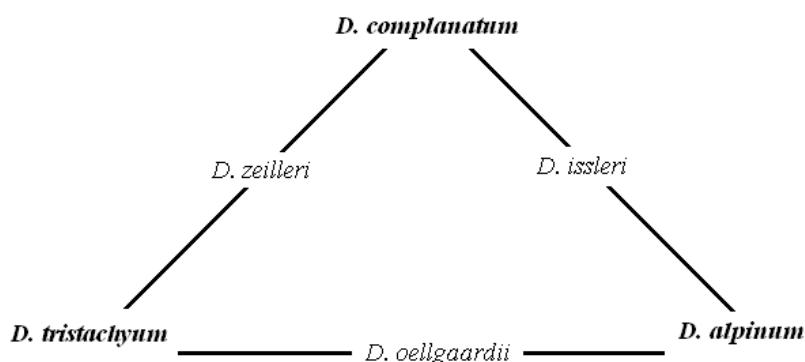
Prokel plavuníků je podzemní, paprscitě souměrný, řepovitého tvaru a živící se saprofytycky (resp. mykotroficky). Gametofyty jsou velmi málo známé a prozkoumané. Předpokládá se, že přežívají déle než nadzemní sporofyty a pomáhají rostlinám překonávat nepříznivé podmínky prostředí. Navíc se zřejmě často vyskytují ve větším množství než sporofyty a pohlavně dospívají až po 12–15 letech (Buchmann 1908, Bruce 1979, Whittier 1981, Procházka & Harčarik 1999). Zástupci rodu *Diphasiastrum* jsou stejně jako ostatní z čeledi *Lycopodiaceae* rostliny mykorhitické v obou fázích životního cyklu.

Celosvětově bývá mezi plavuníky řazeno 25 až 30 druhů. Jsou známy ze všech kontinentů s výjimkou Austrálie a samozřejmě Antarktidy. Hlavním místem jejich výskytu jsou temperátní a subarktické oblasti severní polokoule. Některé druhy je však možné najít i v tropech (Střední Ameriky, JV Asie a také jižní Afriky) a to především v montánním až alpínském pásmu (Hultén 1958, Meusel et al. 1965, Wilce 1965, Kubitzki 1990, Procházka et al. 1998, Bennert et al. 2007).

Ve střední Evropě bývá rozlišováno šest druhů plavuníků (obr.č. 2). Tři z nich, tradičně rozlišované, jsou dnes považovány za druhy základní. Patří mezi ně: *D. alpinum* (L.) Holub –



plavuník alpský, *D. complanatum* (L.) Holub – plavuník zploštělý a *D. tristachyum* (Pursh) Holub – plavuník cypřiškovitý (trojklasý). V průběhu 20. století byly odlišeny další tři druhy (druhy vedlejší), u nichž se předpokládá hybridní původ z druhů základních. Jedná se o: *D. issleri*<sup>2)</sup> (Rouy) Holub – plavuník Isslerův (*D. alpinum* × *D. complanatum*), *D. zeilleri* (Rouy) Holub – plavuník Zeillerův (*D. complanatum* × *D. tristachyum*) a nejpozději rozlišený *D. oellgaardii* Stoor et al. – plavuník Oellgaardův (*D. alpinum* × *D. tristachyum*). Taxonomické hodnocení těchto intermediárních taxonů se však v různých regionech liší.

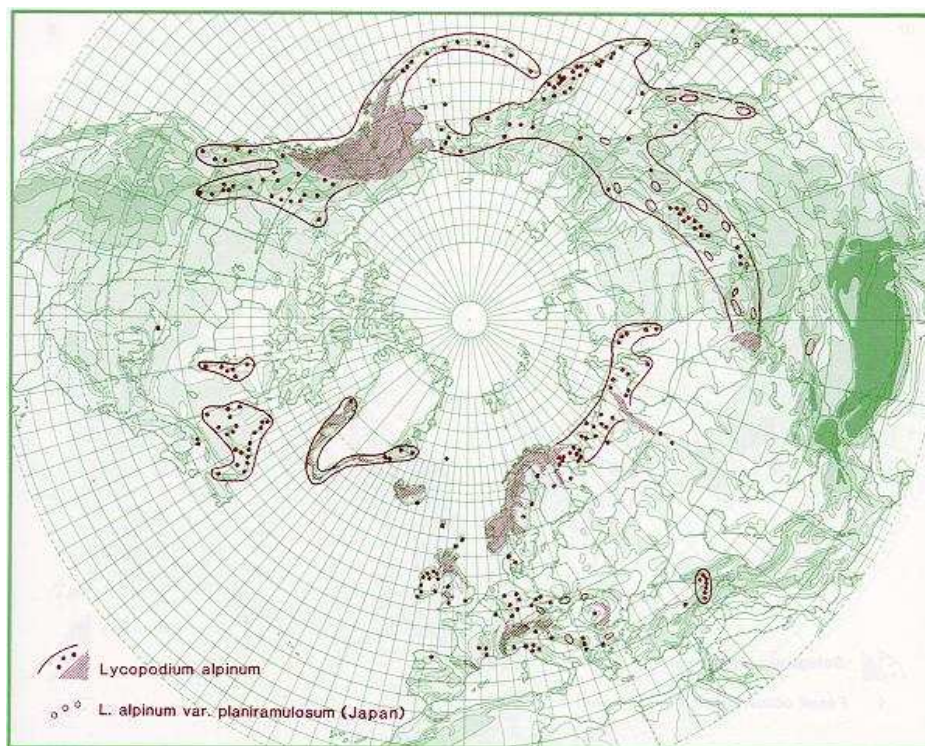


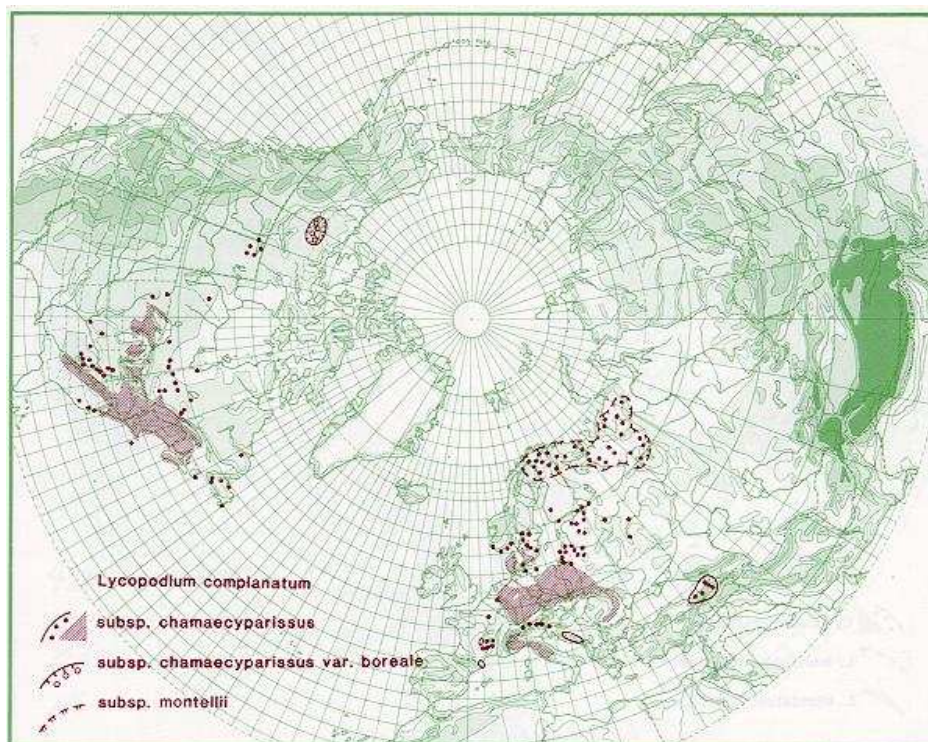
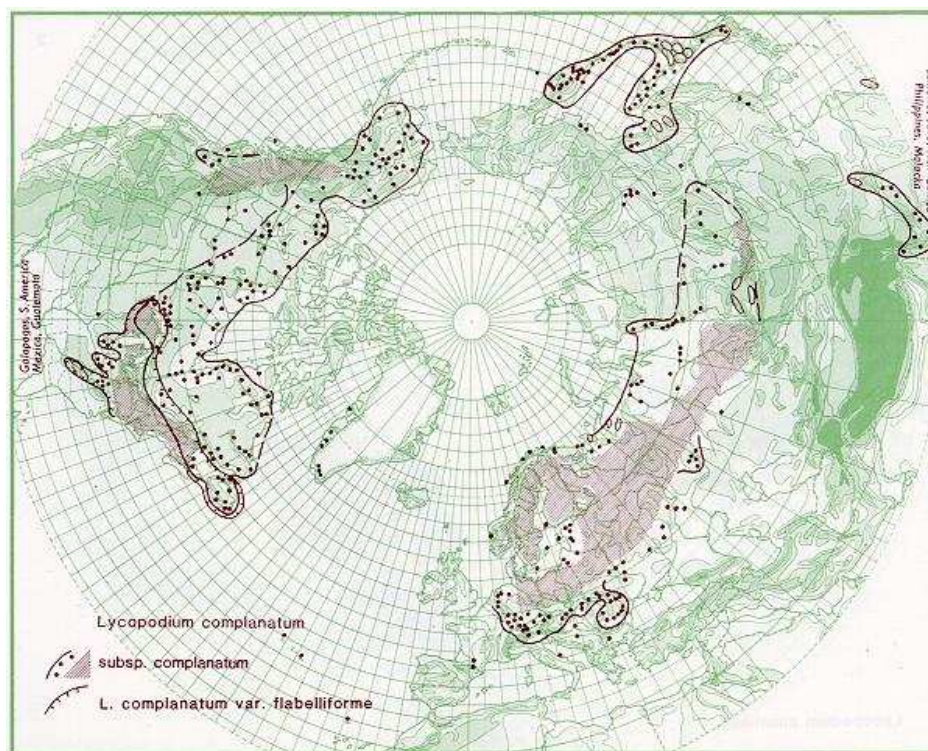
**Obr. č. 2:** Schéma vzájemných mikroevolučních vztahů u středoevropských zástupců rodu *Diphasiastrum*. Základní druhy (tučně) dávají prostřednictvím hybridizace vzniknout vedlejším druhům (Stoor et al. 1996).

Jelikož se jedná o rostliny konkurenčně velmi slabé, bývají hlavními místy jejich výskytu biotopy s nezapojeným porostem a stanoviště disturbovaná a sekundární. Plavuníky jsou typickými druhy iniciálních fází sukcese (Kukkonen 1994, Procházka & Harčarik 1999). V rámci České republiky patří všichni zástupci rodu mezi ohrožené rostliny (kategorie C1 - C3; Procházka 2001). Jednotlivé základní druhy mají těžiště výskytu spíše v odlišných typech biotopů v různých nadmořských výškách (*D. alpinum* preferuje horská bezlesá stanoviště v nadmořských výškách min. 800 – max. 1500 m; *D. tristachyum* se vyskytuje především na vřesovištích a v kyselých borech ve výšce min. 400 – max. 900 m.n.m. a *D. complanatum* upřednostňuje smrčiny a kyselé bory v min. 270 – max. 1300 m.n.m.; Dostál 1984, 1989, Adler et al. 1994, Futák et al. 1996, Bennert et al. 1999, Procházka 1999). Druhy vedlejší jsou známy z lokalit intermediárních charakterů. Tyto druhy se mohou stýkat na specificky disturbovaných místech (např. ve společenstvech třídy *Piceetalia excelsae*; Dostál 1989, Kubát 1997). Často to jsou stanoviště vzniklá sekundárně, silně ovlivněná lidskou činností. Příkladem jsou horské pastviny a jiná pravidelně disturbovaná místa, např. okraje lesních cest, pláně pravidelně procházející požárem, opuštěné lomy, průseky podél železničních tratí

<sup>2)</sup> Vedlejší druhy se rovněž často zapisují hybridní formulí – se znaménkem × (např. *D. × issleri*).

či pod elektrickým vedením aj. (Horn 1997, Bennert 1999, Muller et al. 2003). Na takových místech může docházet až ke vzniku hybridních rojů (Krahulcová & Krahulec 1999, Krahulec et al. 2004). Vzhledem k ústupu těchto biotopů kvůli zvyšující se intenzitě hospodaření, jsou dnes nejvýznamnějšími druhotnými, pravidelně disturbovanými stanovišti, sjezdovky (Stoor et al. 1996, Procházka et al. 1998, Muller et al. 2003, Fousek & Harčarik 2009). Rozdílné rozšíření vykazují všechny tři tzv. základní druhy také v rámci Evropy. V případě *Diphasiastrum alpinum* se jedná o arкто - alpinské rozšíření ve společenstvech typu tundry, pro *Diphasiastrum complanatum* je typické rozšíření boreálně – kontinentální sub-atlantské typu tajgy a *Diphasiastrum tristachyum* se nachází spíše v sub - atlantické (středoevropské) oblasti (Jalas & Suominen 1972, Dostál 1984, Øellgaard & Tind 1993, Kukkonen 2000; obr.č. 3 na str. 6 - 7). Česká republika spolu s Německem, Rakouskem a Francií je jednou z mála zemí s prokázaným výskytem všech šesti středoevropských druhů plavuníků (Adler et al. 1994, Kubát 1997, Bennert 1999, Procházka 1999, Jäger & Werner 2005, Haeupler & Muer 2007).





**Obr. č. 3:** Znázornění geografického celosvětového rozšíření 2 druhů plavuněk - *D. alpinum* a *D. complanatum* (Meusel 1965). Mapa ukazuje na arкто – alpské rozšíření *D. alpinum*, zatímco pro *D. complanatum* je typické rozšíření spíše boreálně – kontinentální. Na třetím obrázku je zobrazeno rozšíření druhu nazvaného *D. complanatum* subsp. *chamaecyparissus* – zřejmě se jedná o druh *D. tristachyum*, jehož rozšíření je omezené na střední Evropu a část severní Ameriky.

Po biosystematické stránce není skupina rodu *Diphasiastrum* zatím dostatečně probádána. U všech 6 středoevropských druhů byla prokázána stejná ploidie se základním chromosomovým číslem  $x = 23$  (22, 24, 25; Manton 1950; Löve & Löve 1961, Wilce 1965, Wagner 1992, Futák et al. 1996, Marhold et al. 2007).

Všechny druhy rodu *Diphasiastrum* se stejně jako ostatní z čeledi *Lycopodiaceae* rozmnožují jak generativně, tak vegetativně – klonálně, pomocí kořenujících lodyh, resp. oddenků. Plavuníky produkují velké množství snadno se šířitelných spor, které dozrávají od července do září. Stále však není zcela jasné, jak intenzivní je jejich pohlavní rozmnožování a do jaké míry se šíří vegetativně. Celý životní cyklus rostlin pravděpodobně trvá až několik desítek i stovek let (Oinonen 1968, Kukkonen 1994, Procházka et al. 1998). Bylo také dokázáno, že druhy rodu *Diphasiastrum* nejlépe regenerují po disturbancích lesních porostů (Kukkonen 1994). Většina zástupců rodu je v téměř celé Evropě označována za ohrožené a zákonem chráněné druhy (Danton & Baffray 1995, Olivier et al. 1995, Mennema et al. 1980, Procházka 2001).

## 2.2 Charakteristika jednotlivých středoevropských zástupců

### 2.2.1 Základní druhy

#### 2.2.1.1 *Diphasiastrum alpinum* (L.) Holub – plavuník alpský

##### a) Synonyma

*Lycopodium alpinum* L.,  
*Lycopodium cupressifolium* Opiz,  
*Stachygynandrum alpinum* (L.) C. Presl,  
*Lycopodium alpinum* subsp. *eualpinum* Domin,  
*Diphasium alpinum* (L.) Rothm.,  
*Lycopodium alpinum* subsp. *cupressifolium* (Opiz) Dostál,  
*Diphasium alpinum* (L.) Rothm. subsp. *cupressifolium* (Opiz) Dostál.

##### b) Morfologická charakteristika

Plavuník alpský má plazivé, zpravidla nadzemní lodyhy až přes 50 cm dlouhé a roztroušeně kořenující. Jeho čtyřhranné sterilní větve jsou jen velmi nepatrně zploštělé, už od báze vícenásobně vidličnatě svazčité větvené s výraznou anizofylií. Jsou vzpřímené či vystoupavé, do 60 cm dlouhé a 5 – 10 cm vysoké. Celkovým habitem se jedná se o kompaktní a robustní, „trojrozměrnou“ rostlinu



**Obr. č. 4:** Typický vzhled druhu *D. alpinum*.

(Urfus & Vít 2009). Modrozelené matné listy jsou přibližně stejnotvaré, 2 - 3 mm dlouhé a zašpičatělé. Na lodyze jsou odstálé či jen volně přilehlé, křížmostojně uspořádané. Hřbetní listy mají kopinatý tvar a jsou širší než listy postranní. Břišní listy mají kratičký, téměř kolmo odstálý řapík a vzpřímenou vejčité kopinatou čepel. Bazální část břišních listů je řapíkatě zúžená a téměř kolmá k větví. Apikální část je rozšířená do plochy a šikmo vzhůru ohnutá. Srpovitě zahnuté postranní listy mají zřetelný téměř kolmo odstálý řapík a vzpřímenou vejčité kopinatou čepel. Výtrusnicové klasy jsou přisedlé či velmi krátce stopkaté, 10 – 20 mm dlouhé, uspořádané jednotlivě na koncích většiny větví. Vejčité kopinaté sporofyly bývají více než 2x delší než výtrusnice a mají dlouhou odstálou tupou špičku (Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Wagner & Beitel 1993, Adler et al. 1994, Kubát 1997, 2002, Jäger & Werner 2005, Frey et al. 2006, Haeupler & Muer 2007; obr.č. 4 na str. 8).

#### c) Rozšíření, ekologie a ochrana

Tento druh plavuníku se nachází jak v severní Evropě (na Islandu, ve Velké Británii, Skotsku, severní části Finska a evropské části zemí bývalého Sovětského Svazu), ve střední Evropě i v horských oblastech jižní Evropy (Sudety, Karpaty, Alpy, Pyreneje, Apeniny), tak je také znám ze severozápadní Asie a Dálného Východu. Izolované areály byly zaznamenány i na Kavkaze a ve Střední Asii. V Severní Americe se vyskytuje vzácně (např. Wilce 1965, Szafer et al. 1967, Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Jermy 1993, Wagner & Beitel 1993, Jäger & Werner 2005).

*Diphasiastrum alpinum* se primárně nachází v horských bezlesích hlavně alpínského až subalpínského, vzácně horského pásma v nadmořských výškách 800 – 1500 m.n.m. Vyskytuje se na kyselých, humózních, živinami chudých, písčitých nebo kamenitých půdách. Typickým místem jeho výskytu jsou alpínské hole a křoviny, zvláště v kosodřevinách a na subalpínských smilkových loukách (Bentham 1924, Dostál 1984, 1989, Jermy 1993, Kubát 1997, Procházka 1999 aj.), kde je diagnostickým druhem svazů *Juncion trifidi* a *Genistion* (Chytrý et al. 2001, 2007). Vzácněji se vyskytuje na specificky disturbovaných místech ve společenstvech řádu *Piceetalia excelsae* (Kubát 1997, Dostál 1989).

Plavuník alpínský patří v rámci České Republiky mezi ohrožené druhy rostlin kategorie C3 v Černém a Červeném seznamu cévnatých rostlin (Procházka 2001).

#### d) Taxonomická variabilita

*Lycopodium alpinum* subsp. *kablikianum*, popsané koncem 90. let 20. století z Krkonoš, má sporofyly podobného tvaru jako plavuník alpínský. Ve vegetativních částech se shoduje s *D. issleri*, ke kterému jej také většina autorů přiřazuje. Jeho sterilní prýty jsou silně zploštělé a břišní listy jsou

velmi malé, široké asi jako 1/6 prýtu (Dostál 1989). Vzhledem k jeho morfologické charakteristice je dosti pravděpodobné, že se jedná o introgresivního křížence *D. alpinum* a *D. issleri*.

Ve Skotsku nalezené druhy plavuníku alpského připomínají spíše hybridogenní druh *D. issleri*, a byly popsány jako *L. alpinum* var. *decipiens* (Syme & Druce 1892). Nejspíše se však jedná o zastíněné formy *D. alpinum* (Jermy 1978). Obdobný velmi rozvolněný morfotyp tohoto plavuníku byl nalezen na mnoha lokalitách také v České republice.

### 2.2.1.2 *Diphasiastrum complanatum* (L.) Holub – plavuník zploštělý

#### a) Synonyma

*Lycopodium complanatum* L. em. Pursch non H. P. Fuchs,  
*Lycopodium anceps* Wallr.,  
*Stachygynandrum complanatum* (L.) C. Presl,  
*Lycopodium complanatum* var. *anceps* (Wallr.) A. et. Gr.,  
*Lycopodium complanatum* subsp. *genuinum* Čelak.,  
*Diphasium complanatum* (L.) Rothm.,  
*Diphasium complanatum* (L.) Rothm. subsp. *anceps* (Wallr.) Dostál.



Obr. č. 5: Typický vzhled druhu *D. complanatum*.

#### b) Morfologická charakteristika<sup>3)</sup>

Plavuník zploštělý je asi největším ze všech 6 středoevropských druhů. Jeho lodyhy jsou dlouze plazivé nadzemní nebo jako oddenek uložený mělce pod povrchem.

*Diphasiastrum complanatum* a v severní Americe se vyskytující *Diphasiastrum digitatum* (Dill. ex A. Braun) Holub jsou na rozdíl od ostatních druhů rodu charakteristické zřetelně rozšířenými a zploštělými větvemi (2,5 – 4 mm v průměru; Wagner & Beitel 1993, Boughton et al. 2005). Vzpřímené sterilní prýty jsou



Obr.č. 5b: Zřetelné konstriktce v místě přírůstku nových větví u *D. complanatum*.

10 – 40 cm dlouhé a mývají zřetelné zaškrcení v místě přírůstku nových větví (obr. č. 5b). Nepravidelně rozestálé, větvené prýty jsou na líci sytě zelené a na rubu mají žlutozelenou barvu. Lodyžní listy jsou asi 4 mm dlouhé a mají kopinatý zašpičatělý tvar. Břišní listy jsou malé (0,5 – 1,5 mm), většinou přitisklé. Hřbetní listy jsou čárkovitě kopinaté. Postranní listy jsou zřetelně širší než listy hřbetní. Jsou odstálé, na spodní straně ploché a nanejvýš okrajem dolů ohnuté. Výtrusnicové klasy jsou většinou po 2 - 6 či vzácně jednotlivě. Rostou na stopkách dlouhých 2 – 10 cm, velmi

<sup>3)</sup> Je zajímavé, že typová položka původního taxonu *L. complanatum* nalezená a určena Linneem ve Švédsku ve skutečnosti označuje dnešní druh *L. tristachyum* (*D. tristachyum*; Thulin et al. 2009). Dnes je lektotypová položka *D. complanatum* spolu s epitypem uložena v Celsiově herbáři v Uppsale

řídce olistěných čárkovitými listeny. Sporofyly mají široce až okrouhle vejčitý tvar s náhlým zúžením v krátkou špičku a jsou jen o málo delší než výtrusnice (Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Wagner & Beitel 1993, Adler et al. 1994, Kubát 1997, Bennert et al. 1999, Kubát 2002, Jäger & Werner 2005, Frey et al. 2006, Haeupler & Muer 2007; obr.č. 5 na str. 10).

#### c) Rozšíření, ekologie a ochrana

*D. complanatum* je nejrozšířenějším a nejčastěji se vyskytujícím druhem plavuníků. Je znám ze střední, severní a východní Evropy, východní Asie (až z Papuy - Nové Guiney) a také ze Severní Ameriky (Wilce 1965, Szafer et al. 1967, Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Jermy 1993, Wagner & Beitel 1993, Czerepanov 1995, Jäger & Werner 2005, Johns et al. 2006). Primárními stanovišti plavuníku zploštělého jsou světlé jehličnaté i borové lesy a vřesoviště podhorského, vzácně pahorkatinného stupně v nadmořských výškách mezi 270 a 1300 m.n.m.. Tento druh se vyskytuje na kyselých půdách a na surovém humusu (Bentham 1924, Dostál 1984, 1989, Jermy 1993, Kubát 1997, Procházka 1999 aj.) *D. complanatum* je někdy uváděn jako diagnostický druh svazu *Dicrano - Pinion* (Dostál 1984) a vyskytuje se také ve společenstvech řádu *Piceetalia excelsae* (Kubát 1997, Dostál 1989).

Plavuník zploštělý je v rámci České republiky řazen, stejně jako *D. alpinum*, mezi ohrožené rostliny kategorie C3 (Procházka 2001).

#### d) Taxonomická variabilita

V roce 1967 Kukkonen popsal v Rusku mezidruhový taxon *D. tristachyum* × *D. zeilleri* jako var. *montellii*. V roce 1970 byl určen za poddruh subsp. *montellii* (Kukkonen 1967, 1970). Jeho taxonomická pozice však není dosud jasná. Pod *D. complanatum* sensu stricto nemůže být zahrnut kvůli tvaru svých břišních lístků. Dnešní autoři uvádějí „*montellii*“ jako subarktickou rodovou linii *D. zeilleri*. Sám Kukkonen (1967) předpokládal jeho hybridogenní původ z druhů *D. complanatum* a *D. tristachyum*, což je podpořeno některými jeho význačnými charakteristikami. Kalio a kol. (1969) ho zahrnul k rodové linii s *D. complanatum* var. *polystachyum*. Blízký vztah „*montellii*“ k *Lycopodium complanatum* var. *canadense* (M. Vict.), var. *pseudo-alpinum* sensu M. Vict. a *Lycopodium tristachyum* var. *boreale* může reprezentovat pouze odlišné morfotypy (Holub 1975).

Vzácně se vyskytují také rostliny s výtrusnicovými klasy přisedlými a okrajem listů více podvinutým. Tím připomínají *Diphasiastrum issleri*, ale liší se od něj také malými břišními listy a úzkou adaxiální plochou nesbíhavé části listů (Dostál 1984).

### 2.2.1.3 *Diphasiastrum tristachyum* (Pursh) Holub – plavuník cypřiškovitý

#### a) Synonyma

*Lycopodium tristachyum* Pursh non Nutt,  
*L. chamaecyparissus* A. Braun in Mutel,  
*L. complanatum* var. *chamaecyparissus* (A. Braun) Döll,  
*L. complanatum* L. subsp. *chamaecyparissus* (A. Braun) Čelak.,  
*L. complanatum* var. *tristachyum* (Pursh) Domin,  
*Diphasium tristachyum* (Pursh) Rothm.,  
*L. complanatum* subsp. *tristachyum* (Pursh) Dostál,  
*Diphasium complanatum* subsp. *chamaecyparissus* (A. Braun) Dostál.

#### b) Morfologická charakteristika

Tento vždyzelený chamaefyt bývá někdy také nazýván plavuník trojklasý a je asi nejmenější ze všech středoevropských zástupců rodu. Má plazivé, až 1 m dlouhé, nezelené lodyhy (oddenky) uložené hluboko pod zemí (3 – 10 cm). Právě povaha jeho oddenku je jedním z hlavních determinačních znaků. Nadzemní vzpřímené větve jsou 10 – 20 cm vysoké, slabě zploštělé. Na průřezu mají trojúhelníkovitý tvar, 1,5 – 2 mm v průměru a jsou úzce křídlaté. Jejich barva je šedozelená, na spodu jsou ožíněné. Tyto sterilní větve jsou hustě svazčité větvené a připomínají svým vzhledem trychtýř (Urfus & Vít 2009). Listy plavuníku cypřiškovitého jsou téměř stejného tvaru a velikosti. Postranní listy jsou přitisklé k větvi a často pod ni mírně ohnuté, takže jejich vrchol nebývá shora viditelný. Hřbetní listy mají kopinatý tvar a jsou o trochu širší než listy postranní. Břišní listy jsou velikostně téměř shodné s hřbetními. Jsou přisedlé a sbíhavé. Svým vrcholem nedosahují k bázi následujícího listu. Výtrusnicové klasy bývají ve svazečcích po 2 - 7 na řídce olistěných 1,4 – 3 cm dlouhých stopkách. Jen na prostředních prýtech jsou na dlouhé, 1 - 3x vidličnatě větvené stopce. Sporofyly jsou na bázi široce vejčité náhle se zužující v dlouhou kopinatou špičku (Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Wagner & Beitel 1993, Adler et al. 1994, Kubát 1997, Bennert et al. 1999, Kubát 2002, Jäger & Werner 2005, Frey et al. 2006, Haeupler & Muer 2007; obr. č. 6).



Obr.č. 6: Typický vzhled druhu *D. tristachyum*.

#### c) Rozšíření, ekologie a ochrana

*Diphasiastrum tristachyum* se nalézá jak v severní (velmi vzácně v jižní části), tak i ve střední Evropě; od jižní Skandinávie a Finska po střední Francii a severní Itálii. Nalezeny byly také jeho izolované lokality v rumunských Karpatech a v západní Číně (Wilce 1965, Szafer et al.



1967, Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Wagner & Beitel 1993, Jäger & Werner 2005). Běžně se vykytuje i ve východní části Severní Ameriky. V minulosti byl zřejmě na severní polokouli mnohem rozšířenější. Na rozdíl od dalších dvou „základních“ druhů plavuníků, *D. alpinum* a *D. complanatum*, má tento poněkud nevyhraněnou ekologii. V současné době pravděpodobně neexistuje ve střední Evropě lokalita, kde by se vyskytoval samostatně bez přítomnosti dalších plavuníků. Snad mohl vzniknout hybridizačními procesy mezi ostatními taxony (Muller et al. 2002).

Primárními stanovišti tohoto druhu plavuníku jsou vřesoviště a kyselé bory ve 400 – 900 m.n.m. Jedná se o kyselé, živinami chudé půdy, většinou vlhčího rázu (Dostál 1989). *D. tristachyum* je někdy uváděn za diagnostický druh svazu *Genistion* (Dostál 1984, Procházka 1999) a občas jej lze nalézt také ve společenstvech řádu *Piceetalia excelsae* (Kubát 1997, Dostál 1989, Oberdorfer 2001). Jeho typickými lokalitami jsou i ne příliš zapojené borové lesy (Scheuerer et al. 1991, Øllgaard & Tind 1993, Tolmachev et al. 1995, Horn 1997, Kukkonen 2000).

Z několika oblastí (Skandinávie, belgických Arden, Lüneburger Heidenu v Sasku) je popsán hojný výskyt *D. tristachyum* na pustinách prošlých ohněm (Hansen 1964, Schumacker 1978, Horn 1997, Müller et al. 1997). Umožňují to jeho podzemní oddenky, díky kterým tato rostlina přežívá oheň. Dokonce dochází k větším nárůstům několik let po požáru (Muller et al. 2003).

V České Republice patří tento druh ochranně do kategorie C1 (kriticky ohrožený) v Černém a Červeném seznamu cévnatých rostlin (Procházka 2001).

#### d) Taxonomická variabilita

Dříve byl tento druh, i přes dokonalou znalost morfologie, často spojován s *Diphasiastrum complanatum* a českými autory považován za jeho varietu (Domin 1938) či poddruh (Dostál 1984). Většina dnešních autorů jej uznává jako samostatný druh (Rothmaler 1930, Wilce 1965, Rauschert 1967, Kubát 1997).

*Lycopodium tristachyum* var. *boreale* popsané ze severní Kanady (Victorin 1932) je pokládán za příbuzný taxon se severní odrůdou *D. zeilleri*, ale liší se od něj podzemním oddenkem – tím se přibližuje k *D. tristachyum*. Protože *D. tristachyum* bylo již ze Severní Ameriky popsáno, Á. et D. Löve (Löve & Löve 1961) považovali evropské rostliny za specificky odlišné a použili tak pojmenování *Lycopodium chamaecyparissus*. Tento taxon se však odlišuje od *D. tristachyum* množstvím charakteristik. Ve Skandinávii je v dnešní době uváděn druh *D. complanatum* subsp. *chamaecyparissus*, jež je zřejmě obdobou *D. tristachyum* (např. Bentham 1924, Szafer et al. 1967, Mossberg et al. 1992, Czerepanov 1995).

## 2.2.2 Vedlejší druhy

### 2.2.2.1 *Diphasiastrum issleri* (Rouy) Holub – plavuník Isslerův

#### a) Synonyma

*Diphasiastrum alpinum* × *complanatum* (L.) Holub,  
*Lycopodium alpinum* L. race *issleri* Rouy,  
*Lycopodium complanatum* L. subsp. *genuinum* var. *fallax* Čelak.,  
*Lycopodium issleri* (Rouy) Domin,  
*Lycopodium complanatum* subsp. *issleri* (Rouy) Domin,  
*Lycopodium alpinum* L. subsp. *kablikianum* (Domin) Dostál,  
*Diphasium complanatum* (L.) Rothm. subsp. *issleri* (Rouy) Dostál,  
*D. alpinum* subsp. *kablikianum* (Domin) Dostál,  
*Diphasium issleri* (Rouy) Holub,  
*Diphasiastrum kablikianum* (Domin) Dostál,  
*Lycopodium alpinum* L. var. *decepiens* Syme ex Druce,  
*Diphasium hastulatum* Siplivinskij.



Obr.č. 7: Habitus hybridního druhu *D. issleri*.

#### b) Morfologická charakteristika

Jedná se o druh, jehož pravděpodobnými rodiči jsou druhy *Diphasiastrum alpinum* a *Diphasiastrum complanatum* (Issler 1909, Domin 1938, Lawalrée 1957, Rauschert 1967, Futák 1963, Damboldt 1962, Pacyna 1972, Kubát 1997). Tomu odpovídá i jeho morfologická stavba. Tento vždyzelený chamaefyt má plazivé až 1 m dlouhé, tuhé, nadzemní či zřídka mělce v podzemí uložené lodyhy. Ty jsou na koncích zřetelně zploštělé a zpravidla přilehlé k povrchu půdy. Bohatě větvené nadzemní vzpřímené prýty jsou jen málo vystoupavé, 10 – 20 cm vysoké, ve volných svazečcích. Sterilní větve jsou 2 - 3 mm široké, mají šedozelenou barvu a jsou jen slabě zploštělé s téměř trojúhelníkovitým průřezem. Jejich břišní strana je plochá, zatímco strana hřbetní je zřetelně konvexní. Postranní listy jsou odstálé, srpovitě zakřivené, po celé délce jsou okrajem skloněné pod větve. Úzce kopinaté hřbetní listy jsou užší či stejně široké jako listy postranní. Vejčité břišní listy jsou poměrně velké - téměř stejné velikosti jako hřbetní. Mají úzce čárkovitý tvar a v apikální části jsou rozšířené. K větvi jsou přitisklé nebo poněkud odstávají, ale nikdy nejsou při bázi řapíkatě zúžené. Na mladších větvích dosahují báze následujících listů. Výtrusnicové klasy rostou jednotlivě či vzácně po 2 na vrcholu hustě olistěných větví. Jsou 2 – 3 cm dlouhé, přisedlé nebo na krátkých stopkách. Podlouhle zašpičatělé, eliptické sporofyly jsou na bázi klasu řidčeji umístěné a většinou jsou 1,5 (– 3) x delší než výtrusnice (Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Wagner & Beitel 1993, Adler et al. 1994, Kubát 1997, Bennert et al. 1999, Kubát 2002, Jäger & Werner 2005, Frey et al. 2006, Haeupler & Muer 2007; obr.č. 7 na str. 14).

#### c) Rozšíření, ekologie a ochrana

Plavuník Isslerův se v rámci střední Evropy vyskytuje zejména v její jižní části, v Alpách a ve Skandinávii (zejména v Norsku). Jeho typová lokalita leží ve francouzských Vogézách (Le Tanet a Champ du Feu). Dále byl nalezen ve střední Sibiři a severovýchodní části Severní Ameriky. U nás se vyskytuje vzácně ve vyšších až horských polohách příhraničních hor. Na Slovensku nebyl nalezen vůbec (např. Wilce 1965, Szafer et al. 1967, Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Jermy 1993, Wagner & Beitel 1993, Jerome 2002, Jäger & Werner 2005).

Stejně jako ostatní druhy plavuníků i tento preferuje kyselé, živinami chudé půdy. Vyskytuje se ve světlých jehličnatých, zvláště borových lesích, na vřesovištích a pastvinách či zarůstajících loukách (Dostál 1984, 1989). Nejčastěji se vyskytuje ve společenstvech svazu *Genistion* a řádu *Piceetalia excelsae* (Kubát 1997, Dostál 1989). Výškové rozpětí jeho rozšíření není dostatečně známo, avšak je předpokládáno mezi 690 – 1200 m.n.m. Podle údajů od Damboldta (1962) *D. issleri* zasahuje až do výšek 2 300 m.n.m. V rámci České republiky je znám hlavně z podhůří až do hor. Jedná se o jediný hybridogenní druh jenž byl na našem území nalezen samostatně bez doprovodu alespoň jednoho z rodičovských druhů (např. v Krušných horách poblíž železniční zastávky Horní Blatná, na Šumavě ve smrkovém lese nedaleko obce Srní; Dvořáková et al. unpubl).

V České republice patří do kategorie C2 - silně ohrožených rostlin (Procházka 2001).

#### d) Taxonomická variabilita

Issler (1909, 1910) pojmenoval tuto rostlinu jako *D. complanatum* subsp. *anceps*. Ve své první práci (1909) ji odlišil od *D. alpinum* díky zelené barvě, zploštělým a širokým větévkám a malým břišním listům. Domin (1938) považoval Isslerovu původní rostlinu za „complanatoidní“ typ a pojmenoval ji var. *vittiforme*. Toto označení ale zahrnuje i jinou complanatoidní rostlinu druhu *D. issleri* popsanou z ČSR. Dominem popsané *Lycopodium issleri* také zahrnuje rostliny vykazující morfoložickou příbuznost s *D. tristachyum* – toto je předpokládáno jako var. *subquadrangulum*. Wilce (1965) díky svým pozorováním založeným na hodnocení šíře větévek a poměru celkové délky postranních listů k délce jejich volné části, zjistila, že se rodičovská rostlina blíží spíše *D. tristachyum* než *D. complanatum*. Svůj názor podpořila i faktem, že areál rozšíření *D. issleri* se překrývá s areálem *D. alpinum* a *D. tristachyum*, a že *D. tristachyum* se také účastní na původu hybridní kombinace. Avšak Wilce nepřipouštěla možnost kombinace *D. alpinum* – *D. complanatum*, protože podle jejího názoru se tyto dva druhy vyskytují sympatricky, a proto, že mezi nimi existuje izolační mechanismus zabraňující vzájemné hybridogenezi. Zastáncem hypotézy Wilce o původu *D. issleri* byl zřejmě také Siplivinskij (1973), který popsal rostliny příslušející rodičovské kombinaci

*D. alpinum* – *D. complanatum* jako *Diphasium hastulatum*. Pozdější studium materiálu *D. issleri* z ČSR ukázalo, že tyto rostliny odpovídají kombinaci *D. alpinum* – *D. complanatum*. Na druhou stranu v Severní Americe je *D. issleri* uváděno jako hybridní kříženec mezi *D. alpinum* a *D. tristachyum*.

Ve Velké Británii byly nalezeny rostliny podobné *D. issleri*, které Syme a Druce (1892) popsali jako *L. alpinum* var. *decipiens*. Pozdější botanici toto označení používali pro rostliny připomínající atypické rostliny *D. alpinum* pocházející ze Skotska. Pravděpodobně jsou to ale růstové formy zastíněného plavuníku alpínského.

### 2.2.2.2 *Diphasiastrum oellgaardii* Stoor et al. – plavuník Oellgaardův

#### a) Synonyma

*Diphasiastrum alpinum* × *tristachyum*

*Diphasium pseudo-issleri* Holub.

#### b) Morfologická charakteristika

Jedná se pravděpodobně o hybridogenní druh mezi *Diphasiastrum alpinum* a *Diphasiastrum tristachyum*. Tento vždyzelený, výrazně heliofilní chamaefyt má dlouze plazivé oddenky uložené nad zemí či mělce pod povrchem. Jeho téměř vzpřímené, 4 – 18 cm dlouhé sterilní větve jsou poměrně hustě nahloučené, čímž připomíná *D. tristachyum*. Větve jsou zploštělé, ale někdy téměř čtyřhranné, asi 2 mm široké. Na rubu jsou modře ožíněné. Všechny listy mají téměř stejnou velikost. Postranní jsou srpovitěho tvaru se špičkou zahnutou zpět k ose, odpovídají tedy tvarem i délkou *D. alpinum*. Hřbetní, k větvi přitisklé listy mají úzce kopinatý tvar a jsou přibližně stejně dlouhé jako listy boční. Břišní listy jsou vejčité kopinaté, dosahují asi 1/3 šířky větve a o málo přesahují bázi následujících postranních listů, které se střechovitě překrývají. Fertilní větve jsou čtyřhranné a nesou stejnotvaré listy. Přisedlé nebo krátce stopkaté výtrusnicové klasy jsou většinou jednotlivé či vzácně po 2 – 3 (Holub 1960, Procházka 1965, 1966, Stoor et al. 1996, Kubát 1997, Procházka 1997, 1998, Bennert et al. 1999; obr.č. 8).



**Obr.č. 8:** Vzhled hybridního druhu *D. oellgaardii*.

#### c) Rozšíření, ekologie a ochrana

Rozšíření tohoto nejpozději popsaného druhu plavuníku není zatím dostatečně známo. Jeho typové naleziště leží v Centrálním masivu ve Francii (Le Tanet a Champ du Feu; Stoor et al. 1996, Procházka 1997, 1998, Bennert et al. 1999, Horn et Bennert 2002). Další naleziště jsou známa už jen z Krkonoš (Špindlerův mlýn) a z rakouské strany Šumavy, která tvoří východní hranici dosud známého celosvětového rozšíření tohoto druhu (Procházka et al. 1998). V roce 2010 byl nalezen také v Českém lese na území tábora bývalé roty, a sice v doprovodu obou svých rodičovských druhů - *D. alpinum* a *D. tristachyum* (Dvořáková & Urfus 2010).

Tento plavuník roste v nadmořských výškách od 760 do 1300 m.n.m. Vyskytuje se na vřesovištích, v řídkých lesích (často s příměsí borovice) i na obnažených místech bez vegetace na chudých kyselých půdách; a také na surovém humusu v ne zcela zapojených společenstvech s dominantními drobnými keříky vřesu a borůvky (Procházka 1997, 1998). Vždy se však jedná o místa vzniklá sekundárně, zejména lidskou činností. *D. oellgaardii* nebyl zatím nikde nalezen samostatně bez přítomnosti rodičů. Nejčastějšími místy jeho výskytu jsou sjezdovky (Procházka et al. 1998, Bennert et al. 1999, Dvořáková 2009, Urfus & Vít 2009).

V Černém a Červeném seznamu cévnatých rostlin patří tento druh, spolu s *D. tristachyum*, k druhům kriticky ohroženým (C1; Procházka 2001).

#### d) Taxonomická variabilita

Na základě molekulárně-biochemických metod byl prokázán hybridní původ tohoto druhu (*Diphasiastrum alpinum* × *Diphasiastrum tristachyum*). Jeho popis se zveřejněním platného jména byl publikován až v roce 1996 skupinou francouzských a německých botaniků (Stoor et al. 1996), i když již počátkem 60. let 20. století jej od ostatních druhů plavuníků odlišil J. Holub (Holub 1960), později F. Procházka (1965, 1966), opět Holub (1975) a posléze Kubát (1997).

Holub objevil v Procházkově herbářové sbírce plavuníků ze Šumavy rostliny blízké příbuzné s *D. issleri*, kombinující charakteristiky *D. alpinum* a *D. tristachyum*. Tyto rostliny byly výrazně modrozelené. Větévky měly rovné, pouze mírně zploštělé. Břišní listy se jemně zužovaly k bázi, byly trochu odkloněné od stonku ke své nižší části, ale přikláněly se k němu špičkou a byly těžko odlišitelné od postranních listů, jejichž špička dosahovala následujících břišních listů. Holub jej provizorně označil jako „*Diphasium pseudo-issleri*“ (Procházka 1997).

### 2.2.2.3 *Diphasiastrum zeilleri* (Rouy) Holub – plavuník Zeillerův

#### a) Synonyma

*Diphasiastrum complanatum* × *tristachyum*,  
*Lycopodium complanatum* L. race *zeilleri* Rouy,  
*Lycopodium complanatum* subsp. *eucomplanatum* Domin,  
*Diphasium zeilleri* (Rouy) Damboldt,  
*Diphasium complanatum* (L.) Rothm. subsp. *montellii* Kukkonen.

#### b) Morfologická charakteristika

Plavuník zeillerův vznikl pravděpodobně vzájemnou hybridizací *Diphasiastrum complanatum* s *Diphasiastrum tristachyum*. Také jeho morfologie odpovídá této rodičovské kombinaci. Má plazivý, nezelený oddenek uložený 1 – 10 cm pod zemí. Nadzemní vzpřímené větve jsou volně svazčité větvené (hustěji než u *D. complanatum*). Tyto sterilní prýty jsou zploštělé, mají 1,8 – 2,5 mm v průměru a na rubu jsou žlutavě zelené až šedozelené barvy. Listy na břišní straně jsou odlišné od listů hřbetních. Krátce sbíhavé, ostře kýlnaté postranní listy volně přiléhají k větví nebo špičkou od ní mírně odstávají. Obvykle jsou srpovitě zahnuté a nepatrně skloněné pod větev. Špičkami se dotýkají báze dalších listů. Hřbetní listy jsou čárkovitě kopinatého tvaru a přibližně stejné velikosti jako listy postranní. Břišní listy jsou delší než postranní, k větví volně přiléhají a jsou krátce sbíhavé. U nejmladších částí větví dosahují vrcholem k bázi následujících listů. Přisedlé výtrusnicové klasy jsou 1,8 – 3,0 cm dlouhé. Rostou po 2 – 4 na 1 – 2x vidličnatě větvených, řídko olistěných stopkách pouze na středních prýtech. Sporofyly se náhle zužují v dlouhou špičku (Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Wagner & Beitel 1993, Adler et al. 1994, Kubát 1997, Bennert et al. 1999, Kubát 2002, Jäger & Werner 2005, Frey et al. 2006, Haeupler & Muer 2007; obr.č. 9).



Obr.č. 9: Habitus hybridního druhu *D. zeilleri*.

#### c) Rozšíření, ekologie a ochrana

Zatím je celkové geografické rozšíření tohoto druhu jen málo známo. Byl nalezen ve střední Evropě, Skandinávii a v Severní Americe (Wilce 1965, Szafer et al. 1967, Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Mossberg et al. 1992, Jermy 1993, Wagner & Beitel 1993, Kubát 1997, Jäger & Werner 2005).

*Diphasiastrum zeilleri* roste na kyselých půdách světlých borových lesů a pastvin, nejčastěji ve společenstvech řádu *Piceetalia excelsae*, zvláště svazu *Dicrano-Pinion* (Dostál 1984, Dostál 1989, Kubát 1997). Jedná se hlavně o lokality s přibližně intermediárním charakterem míst výskytu

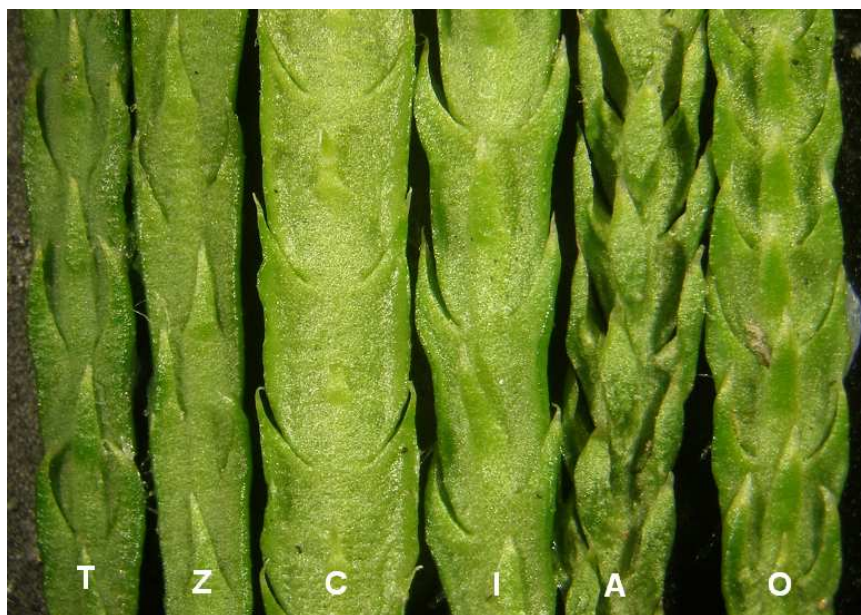
rodičovských druhů. Tento druh plavuníku byl nalezen samostatně pouze na několika lokalitách v jižním Finsku (Dvořáková et al. unpubl). Na území České republiky je znám pouze z míst výskytu alespoň jednoho z rodičů (například pod vrchem Polom v Orlických horách, kde se vyskytuje spolu s druhem *D. tristachyum*). Nejčastějšími místy jeho výskytu jsou sjezdovky (Procházka et al. 1998, Bennert et al. 1999, Dvořáková 2009, Urfus & Vít 2009).

V České republice je tento druh označován za druh silně ohrožený a je zařazen do kategorie C2 Černého a Červeného seznamu cévnatých rostlin (Procházka 2001).

#### d) Taxonomická variabilita

V subarktických oblastech byla zjištěna jistá rozdílnost mezi odrůdami plavuníků. Rostou zde rostliny mající 1 nebo 2 šištice na zkrácené stopce a nahuštěné krátké větévky postranních stonků. Ty byly popsány jako odrůda „*montellii*“. Porsild (1935) přiřadil rostliny popsané z Grónska původně jako *D. tristachyum* také ke druhu *D. zeilleri*.

Typičtí jedinci vedlejších druhů nesou intermediární znaky mezi svými rodiči (viz. obr.č. 10):



**Obr.č. 10:** Schéma břišních stran prýtů jednotlivých středoevropských zástupců rodu *Diphasiastrum*. T = *D. tristachyum*, Z = *D. zeilleri*, C = *D. complanatum*, I = *D. issleri*, A = *D. alpinum*, O = *D. oellgaardii*.

## 2.4 Situace v jiných oblastech

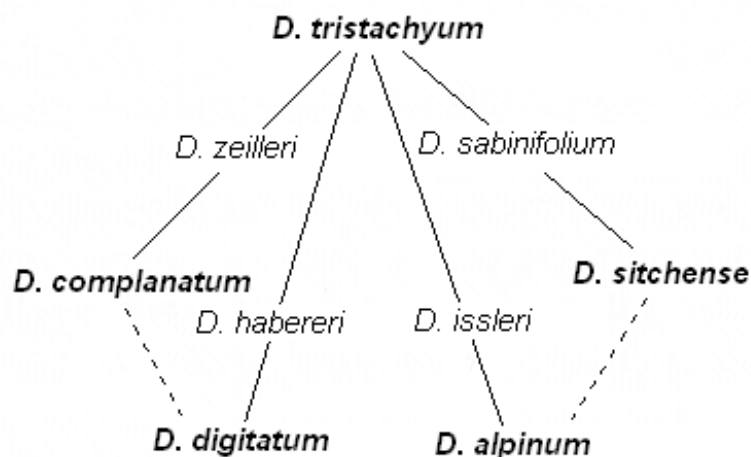
### 2.4.1 Skandinávie

Ze Skandinávie jsou známy pouze čtyři druhy plavuníků – všechny tři druhy rodičovské a jeden hybridní. *D. alpinum* je znám především ze severských, resp. horských oblastí, tundry. Nachází se v severním Finsku a v Laponsku. Dále pak ve Švédsku a Norsku. Je znám také z Laponské oblasti Ruska (Meusel et al. 1965, Czerepanov 1995, Mossberg et al. 1992). *D. tristachyum* je v severských oblastech Evropy velmi vzácný (ve Finsku je jediná známá lokalita čistého druhu – oblast letiště Jämijärvi; ústní sdělení Veli-Pekka Rautiainen 2010). V Dánsku je tento druh poněkud častější. Často se vyskytuje s hybridním taxonem *D. zeilleri*, který je celkem běžný. Vyskytuje se na písčných svazích a náspech. Z Norska a Švédska však není znám. Nejhojnějším druhem je *D. complanatum*, jehož lokality běžně tvoří suché borové lesy. Ve Finsku je tento druh znám převážně z jižní oblasti, kde se na podlouhlých nánosech štěrku a písku řek z ledovce porostlých borovicemi plavuníky vyskytují velmi často. Ze Skandinávie jsou udávány dva poddruhy – subsp. *D. complanatum* a subsp. *chamaecyparissus* (A. Br. ex Mutel) Dostál. Druhý zmíněný je zřejmě obdobou *D. tristachyum*.

### 2.4.2 Severní Amerika

V Severní Americe je situace zřetelně složitější než ve střední Evropě (obr č. 11 na str. 21). Vyskytuje se zde 5 „rodičovských“ (základních) druhů: *D. tristachyum*, *D. complanatum*, *D. digitatum* (Dill. ex A. Braun) Holub, *D. alpinum* a *D. sitchense* (Rupr.) Holub. *D. tristachyum* dává prostřednictvím hybridizace se všemi ostatními základními druhy vzniknout 4 druhům vedlejším. Jedná se o *D. zeilleri* (*D. tristachyum* × *D. complanatum*), *D. habereri* (House) Holub (*D. tristachyum* × *D. digitatum*), *D. issleri* (*D. tristachyum* × *D. alpinum*) a *D. sabinifolium* (Willd.) Holub (*D. tristachyum* × *D. sitchense*; Wagner & Beitel 1993, Boughton et al. 2005, Aagard 2009). Už Wilce v roce 1965 upozornila na rozdíl mezi evropským a severoamerickým druhem *D. issleri*, nesoucím stejné jméno, avšak vzniklým hybridizací jiné rodičovské kombinace. Této kombinaci odpovídá ve Střední Evropě nalezené *D. oellgaardii*.





**Obr.č. 11:** Schéma vzájemných mikroevolučních vztahů u severoamerických zástupců rodu *Diphasiastrum*. Hybridizací základních druhů (tučně) vznikají druhy vedlejší (Wagner & Beitel 1993). Přerušovaná linka značí vzácně nalézané hybridy. Hybridní druh mezi *D. sitchense* a *D. alpinum* nese označení *D. alpinum* var. *planiramulosum* (Takeda 1909).

*D. alpinum* se nachází v suchých jehličnatých či smíšených lesích a na travnatých horských svazích západního pobřeží Severní Ameriky (od Aljašky po Washington) a ve východní části Kanady, včetně jižního Grónska. V severní části USA a na jihu Kanady hojně rozšířené *D. complanatum* se vyskytuje v otevřených suchých jehličnatých či smíšených lesích až do alpínského pásma. Druh *D. tristachyum* je rozšířen v jihovýchodní části Kanady a severovýchodní části USA v otevřených jehličnatých a dubových lesích na kyselých půdách v nadmořských výškách 50 – 1800 m. *D. sitchense* je druhem boreálním, vyskytujícím se od Labradoru po Aljašku a Aleutské ostrovy a také na Kamčatce a v Japonsku (Wilce 1965, Wagner & Beitel 1993, Ivanenko 2001, Boughton et al. 2005). Je charakteristický nesmáčknutými listy v 5 řadách a válcovitými větvemi se zašpičatělými konci. Díky tomu je považován za primitivní druh v rámci rodu (Victorin 1925, Wilce 1965). V alpínském pásu může být zaměněn za velmi podobné *Lycopodium annotinum* L. var. *pungens* (LaPylaei) Desv. Naproti tomu má jeho kříženec *D. sabinifolium* (Willd.) Holub listy ve 4 řadách a větve zploštělé. *D. digitatum* (syn. *Lycopodium complanatum* var. *flabelliforme* Fern) je druh velmi podobný *D. complanatum* díky svým zřetelně rozšířeným a zploštělým větvím. Ty jsou tmavě zelené a vějířovitě rozložené s nenápadnými konstrikcemi na místě ročních přírůstků. Jeho břišní listy jsou trojúhelníkovité a mnohem menší než listy ostatní. Tento druh je endemitem severovýchodní Ameriky a východní Kanady. Jedná se o nejhojnější plavuník Severní Ameriky nacházející se v jehličnatých a tvrdolistých lesích a také na sekundárních stanovištích, jakými jsou například křovinatá či otevřená pole (Wilce 1965, Wagner & Beitel 1993, Boughton et al. 2005). Hybridní druhy se vyskytují na lokalitách, kde se překrývají rodičovské druhy. *D. zeilleri* je častým druhem na severu a západě Minnesoty. *D. habereri* byl nalezen i na lokalitách bez přítomnosti

rodičovských druhů. Poměrně vzácným hybridním druhem je *D. issleri*, který se vyskytuje pouze ve státě Maine. Ve východní Kanadě je častým a široce rozšířeným druhem *D. sabinifolium*, jehož areál sahá pouze do severní části Spojených států. To odpovídá lokalitám, kde dochází k překryvu areálů druhů *D. tristachyum* a *D. sitchense*, za který je tento hybrid snadno zaměnitelný (Wilce 1965, Wagner & Beitel 1993, Boughton et al. 2005).

V Severní Americe byly velmi vzácně nalezeny také hybridní druhy mezi *D. complanatum* a *D. digitatum* a mezi *D. alpinum* a *D. sitchense*. Hybrid poslední dvojice byl popsán jako *D. alpinum* var. *planiramulosum* (Takeda 1909) a je v mnoha ohledech podobný druhu *D. issleri*.

### 2.4.3 Jižní Amerika

Další druhy plavuníků jsou známy také z vyšších nadmořských výšek střední a jižní Ameriky a také z Karibských ostrovů. Patří mezi ně například *D. thyoides* (Humb. et Bonpl. ex Willd.) Holub jehož areál se táhne od jižního Mexika až po severozápadní Argentinu, především po řetězci And. Tento druh se nachází především ve vegetaci párama nad horní hranicí lesa (Wilce 1965, Aagard 2009). Občas se vyskytuje i níže na otevřených místech v lesním stupni, a sice často na sekundárních lokalitách, jakými jsou cesty, paseky apod. (Øllgaard 1988, 1995). Vyskytuje se v nadmořských výškách 1800 – 3800 m. V otevřených porostech venezuelských tepuis v nadmořských výškách 2100 – 2600 m se nachází druh *D. jussiaei* (Desv. ex Poir.) C. Presl ex Rothm. mající zploštělé prýty s dimorfními listy – 2 řady širokých dorzolaterálních listů a 3 nezřetelné řady rovných břišních listů (Wilce 1965, Steyermark et al. 1999). Některé druhy jsou ostrovní endemité. Druhem karibských ostrovů Jamaiky a Haity je *D. fawcettii* (F.Lloyd & L.Underw.) Holub (Wilce 1965, Aagard 2009). V nižších nadmořských výškách je často nalézán na otevřených lokalitách jakými jsou např. paseky, slunné násypy či otevřené svahy (Proctor 1985). Ve Francouzské polynésii se na ostrovech Markézy nachází *D. henryanum* (Brown) Holub. *D. madeirense* (Wilce) Holub je endemitem Azorských ostrovů a Madeiry (Wilce 1965, Aagard 2009).

### 2.4.4 Jihovýchodní Asie aj.

Množství druhů je známo také z jihovýchodní a východní Asie. Patří mezi ně například *D. angustiramosum* (Alderw.) Holub a *D. platyrhizoma* (Wilce) Holub známé z ostrovů Borneo a Sumatra. Z Číny je znám druh *D. veitchii* (Christ) Holub nacházející se od východního Himaláje východně po Taiwan. *D. multispicatum* (Wilce) Holub se vyskytuje v submontánním až montánním stupni v severní části Číny, na Filipínách, Taiwanu a ve Vietnamu. Nově byl nalezen také na 2 nejvyšších horách Thajska (Wilce 1965, Bennert et al. 2007, Aagard 2009), kde byl dříve

považován za *D. complanatum* (liší se však barvou větví a větším množstvím výtrusnicových klasů). Ve flóře Číny (Xianchun & Libing 2004) není dokonce uznáván jako samostatný druh, ale je zahrnut pod *D. complanatum*, které je zde děleno na 2 variety – var. *complanatum* a var. *glaucum* (zřejmě *D. multispicatum*). Kuo (1985) popsal nový endemický druh pro Taiwan - *D. yueshanense*. Jedná se zřejmě o první homoploidní hybridní druh v tropech, vykazující intermediární charakteristiky mezi druhy *D. veitchii* a *D. multispicatum*. V Indii, Malajsii a na Nové Guiney je znám druh *D. wightianum* (Wall. ex Hook. & Grev.) Holub, který byl prvním dokázaným tetraploidem v rámci rodu ( $2n = 96$ ; Ninan 1958, Wilce 1965). Jedním z jeho rodičů by mohl být druh s nezploštělými větvemi a všemi listy stejnými, například *D. sitchense* nebo *D. veitchii* (Wilce 1965) hybridizující s *D. tristachyum*. Jinou možnou rodičovskou kombinací, založenou na morfologii a biogeografii, je *D. veitchii* × *D. alpinum*, *D. sitchense* × *D. multispicatum* či *D. sitchense* × nepopsaný „čínský druh“ (Wilce 1965), zřejmě *D. yueshanense* (Kuo 1985). Podle jiné hypotézy je *D. wightianum* je polyploidem hybridního druhu *D. sabinifolium*. V Japonsku je znám druh *D. nikoense* (Franch. et Savat.) Holub (syn. *D. sitchense* var. *nikoense*). Tento taxon je popsán také z Ruska (Ivanenko 2001). Na Nové Guiney byl v roce 2003 popsán nový druh *D. wilceae* Ivanenko (Ivanenko 2003). Dále je odsud znám druh *D. angustiramosum* (Alderw.) Holub (Wilce 1965, Bennert et al. 2007, Aagard 2009).

#### 2.4.5 Afrika

*D. zancophyllum* je jediným druhem dokumentovaným z vyšších nadmořských výšek (700 – 2000 m.n.m.) jižní Afriky a Madagaskaru. Díky znatelně větším sporám, než mají druhy diploidní, je pokládáno za polyploida. Předpokládanými rodiči jsou *D. tristachyum* či *D. digitatum* (Wilce 1961, 1965, Aagard 2009).

### 3. Hybridizace a polyploidie

Hybridizace, tedy křížení různých organismů, byla po dlouhou dobu považována za zřídka se vyskytující jev. Nebyl jí proto přikládán žádný evoluční význam, ba naopak, byla považována za jakousi evoluční chybu (Arnold 1997). Toto tvrzení odpovídalo tehdejšímu pojetí biologického druhu (druh = populace, jejíž jedinci se mohou mezi sebou volně křížit a jejich potomstvo bývá plodné) a pokládalo tak jakékoli křížení mezi druhy za velmi vzácné a vedoucí k neplodnému potomstvu (Mayr 1942). Novější studie naopak ukazují, že hybridizace je u mnoha skupin organismů velmi častá a pro evoluci dosti důležitá (Mallet 2005, 2007, Riesberg & Willis 2007). Byly prokázány dva typy hybridizace. První, probíhající na úrovni křížení mezi konkrétními jedinci různých druhů, se vyskytuje opravdu minimálně (0,1 % jedinců za generaci v populaci). Větší význam má hybridizace při křížení jednotlivých druhů mezi sebou, protože i málo hybridních jedinců je schopno udržet mezidruhový genový tok (Riesberg 1997, Seehausen 2004, Mallet 2007). Toto tvrzení spíše odpovídá pojetí fylogenetického druhu, kdy je druhem populace odlišující se jedním nebo více fixovanými znaky (či nejmenší fylogenetická skupina definovaná společnými odvozenými znaky) a vnitrodruhový genový tok je tak jejím předpokladem (Mallet 2005). Mezidruhová hybridizace je tak pravděpodobně hlavním mikroevolučním procesem vedoucím ke speciaci a až po vznik nových druhů (Anderson & Stebbins 1954). Existují dva typy hybridních druhů – homoploidní hybridy, mající stejný počet chromosomů jako rodičovské druhy a allopolyploidní hybridy vzniklé zdvojením chromosomové sádky (Mallet 2007, Riesberg & Willis 2007). Právě homoploidní hybridizace je důležitým evolučním dějem známým u mnoha rostlin (Grant 1981, Haufler 2008). Také u živočichů byla hybridizace dříve považována za velice vzácnou, nicméně už byla prokázána minimálně u 10 % z nich (Ellstrand et al. 1996, Mallet 2005). Skutečné množství hybridů ale může být ještě daleko vyšší. Doposud není jasné, do jaké míry nesou hybridy intermediární znaky vůči rodičovským druhům, a tak mnoho z nich nelze morfologicky odlišit. Teprve v dnešní době hojně používané cytologické a molekulární metody mohou pomoci k jejich odhalení (Mallet 2008).

Hybridní druhy bývají často částečně či zcela sterilní. A právě snížená plodnost kříženců byla považována za problém uplatnění těchto druhů v evoluci (Grant 1963). V dnešní době je ale známo, že i když hybridy vykazují malou fertilitu, možnost jejich vzniku se opakuje, takže mohou produkovat poměrně často další generace (např. studie slunečnic *Helianthus annuus* a *H. petiolaris*; Heiser 1947, Heiser et al. 1969). Hlavním důvodem snížené fertility hybridů je jedna z prvních postzygotických bariér - inkompatibilita na chromozomální úrovni (díky množství mutací a přestaveb genomu). Dále pak může existovat inkompatibilita genová, která se nemusí projevit okamžitě, ale až po několika generacích (Flegr 2007). Homoploidní hybridní speciace je tedy závislá na rychlém

vytvoření reprodukčních bariér zabraňujícím zpětnému křížení s rodičovskými druhy (Riesberg 1997, Lexer et al. 2003, Buerkle et al. 2007). Pokud jsou ale hybridy fertily a bez těchto reprodukčních zábran, mohou se dále zpětně křížit s rodičovskými druhy – jedná se o tzv. introgresivní (zpětnou) hybridizaci neboli introgresi. Introgresí dochází k postupnému vnášení genů jednoho druhu do genomu druhu jiného (Grant & Grant 1992). A tak se díky sérii zpětných křížení hybridu s rodičovským druhem postupně ztrácejí mezidruhové rozdíly. Introgrese může vést k nárůstu genetické variability, k novým či přeneseným adaptacím, ke vzniku ekotypů nebo nových druhů či k rozpadu nebo zesílení isolačních bariér apod. (Anderson 1949; Anderson & Stebbins 1954, Stebbins 1959, Riesberg & Wendel 1993). Toto zpětné křížení může probíhat dvěma způsoby – směrem k jednomu z rodičů nebo zpětně mezi oběma rodičovskými druhy. V prvním případě může dojít k „zaplavení“ genetického materiálu příjemce geny introgresanta vedoucím až k vymizení původního druhu. Pokud probíhá zpětné křížení ve velké míře oběma směry, může dojít ke vzniku až hybridních rojů. Ty vznikají především na disturbovaných stanovištích či na místech nevhodných pro rodičovské druhy (Schierenbeck & Ellstrand 2009). Extrémním případem introgrese je jev nazývaný „chloroplast capture“, kdy pozůstatkem jednoho z druhů může být prakticky pouze matroklinně děděný chloroplast (Tsitrone et al. 2003). Bylo prokázáno, že také introgrese je dějem u rostlin velmi častým (např. již u výše zmíněného rodu *Helianthus* či mezi lousiánskými kosatci *Iris fulva* a *I. hexagona*; Arnold et al. 1990, Arnold 1993, Riesberg & Wendel 1993). Také u živočichů je známo mnoho příkladů introgrese (např. mezi neotropickými motýli rodu *Heliconius* či mezi americkými rybami – slunečnicemi rodu *Lepomis*; Avise et al. 1984, Rhymer & Simberloff 1996, Seehausen 2004, Mavárez et al. 2006).

Na místech styku areálů dvou allopatrických druhů vznikají tzv. kontaktní zóny druhů. Pokud na těchto místech dochází také k hybridizaci, vznikají tzv. hybridní zóny. Ty mohou mimo jiné umožňovat tok genů mezi druhy jinak geograficky oddělenými. Dále se zde mohou křížit hybridy mezi sebou či zpětně s rodičovskými druhy a může tak vzniknout různorodá hybridní populace, složená z hybridních druhů s různou evoluční historií (Seehausen 2004). Většina hybridních zón je dlouhodobě stabilní. Jedním z možných odůvodnění je tzv. model tlaku (tension model), kdy jsou rodičovské druhy v převaze (díky vyšší fitness nebo díky větší početnosti na lokalitě) a působí tak na hybridy vysokým selekčním tlakem (Barton & Hewitt 1985, Genovart 2009). Na okrajích areálů hybridních zón je tato selekce nízká a tudíž větší frekvence hybridů (Rieseberg 1997). Dalším možným vysvětlením stability hybridních zón je tzv. teorie „bounded hybrid superiority“, která předpokládá lepší přizpůsobení hybridů podmínkám hybridních zón (Moore 1977). Díky výskytu různých příbuzných genotypů může na těchto místech probíhat rychlejší specializace a také speciace. Hybridní zóny jsou tak součástí modelu tzv. klinální variability, který vysvětluje plynulé fenotypové

změny druhu od jednoho okraje areálu k okraji druhému způsobené adaptacemi na gradient abiotických podmínek. Variabilita druhu způsobená takovou adaptací je podporována právě hybridizací a introgresí spojenou s hybridními zónami (Flegr 2006). Druhy více si příbuzné pak mohou být díky hybridním zónám propojené a vytvářet fenotypové kontinuum (Zimmermann 1964).

Tok genů prostřednictvím hybridizace může rodičovským druhům napomáhat (zvyšováním jejich adaptability k přírodním podmínkám díky obohacování jejich genetické informace) či naopak, může vést k potlačování genů jednoho druhu geny jiného (Seehausen 2004) a tím ke snížení jejich četnosti až k úplnému vymizení (Wolf et al. 2000). Rodičovské druhy mohou být ohroženy také introgresí, kdy intenzivní genový tok může vést k narušení jejich genotypů a postupně až k potlačení genotypu jednoho druhu a převládnutí genotypu druhu druhého (Seehausen et al. 1997). V dnešní době je mezidruhová hybridizace v přírodních podmínkách často spojena s tvorbou disturbovaných ploch se sníženou konkurencí. Děje se tak často vlivem člověka. V době holocénu podporuje člověk hybridizaci mnoha rostlin zcela zásadním způsobem, a sice udržováním bezlesého prostředí a narušováním klimaxových společenstev. Tím je usnadněno šíření celé řady na bezlesí vázaných rostlin i jejich kontakt vedoucí často k hybridizaci. Příkladem jsou horské pastviny a louky, kde se díky vykácení původních lesů dostaly do kontaktu druhy alpského pásma s druhy nižších poloh a vznikají zde často rozsáhlé hybridní roje rostlin (např. Krahulcová & Krahulec 1999, Krahulec et al. 2004). Dnes jsou na území střední Evropy obdobnými lokalitami například sjezdovky, kde se díky pravidelným disturbancím a udržovanému bezlesí často setkávají různé taxony z různých nadmořských výšek. Dalším negativním vlivem lidské činnosti na některé druhy je zvyšování vlivu hybridizace díky antropogennímu přenosu jiných druhů (Anderson 1948). Nově tak probíhá v Evropě křížení např. mezi kuklíky *Geum rivale* a *G. urbanum* či v Americe mezi orobinci *Typha latifolia* a *T. angustifolia* (Graves & Taylor 1986, Kuehn et al. 1999). Problémem invazních druhů je jejich časté křížení s druhy původními, způsobené slabými reprodukčními bariérami díky jejich izolovanému vývoji. Hybridizace má tak velký význam pro ochranu, ať už vzácných druhů ohrožených hybridizací, druhů ohrožených hybridizací díky vlivu člověka či populací geneticky vzdálených, u nichž k hybridizaci dochází (Rhymer & Simberloff 1996, Genovart 2008).

Klíčovou roli hraje mezidruhová hybridizace také ve variabilitě rodu *Diphasiastrum*. Jedná se zejména o hybridizaci na homoploidní úrovni. Allopolyploidní druhy jsou v rámci čeledi *Lycopodiaceae* hojně známy u rodů *Huperzia* a *Lycopodiella* (Wagner et al. 1985). Naopak v rámci rodu *Diphasiastrum* je záznamů o polyploidech velmi málo. Mimo Evropu jsou zaznamenány 2 polyploidní druhy, a sice z Malajsie známé *D. wightianum* a *D. zancophyllum* obývajících jižní Afriku a Madagaskar. Ve střední Evropě byly teprve nedávno objeveny triploidní jedinci (Bennert et al. 2011).

Existence plavuníků s intermediárním charakterem habitu byla částečně prokázána až v průběhu 20. století. V dnešní době je minimálně 5 těchto taxonů považováno za homoploidní hybridy (Wilce 1965, Holub 1975, Wagner & Beitel 1993, Stoor et al. 1996). V Evropě jsou to *D. issleri* (Rouy) Holub (*D. complanatum* × *D. alpinum*), *D. zeilleri* (Rouy) Holub (*D. complanatum* × *D. tristachyum*) a *D. oellgaardii* Stoor et al. (*D. alpinum* × *D. tristachyum*). Zbylé dva druhy jsou popsány ze Severní Ameriky, jedná se o *D. habereri* (House) Holub (*D. tristachyum* × *D. digitatum*) a *D. sabinifolium* (Willd.) Holub (*D. tristachyum* × *D. sitchense*; viz. kap. 2 - obr.č. 2 a 11). Mnoho autorů popisovalo tyto hybridy jako neohybridy či variety jednoho z rodičů (Issler 1910, Victorin 1925). Dnes jsou ve florách Severní Ameriky (Wagner & Beitel 1993) a Evropy (Jermy 1993, Frey et al. 2006) i v ostatních ochránářsky zaměřených publikacích (Holub & Procházka 2000, Horn et al. 2001) označovány za samostatné druhy. Hybridní původ těchto „druhů“ se snažil prokázat pomocí molekulární metody allozymové elektroforézy Stoor et al. (1996). Mnozí autoři však tuto studii i uznávanou taxonomii zpochybňují (Vogel & Rumsey 1999). Homoploidní hybridizaci plavuníků dokazuje nalezení stejného počtu chromozomů ( $2n = 46$ ) u všech základních střeoevropských druhů (Wilce 1965, Dostál 1984, Futák et al. 1996), stejně jako u hybridních, vedlejších druhů *D. issleri* a *D. zeilleri* (Wagner 1992)<sup>4)</sup>. Stále není jisté, zda jsou vedlejší druhy skutečně hybridogenní či zda se jedná i o recentně vznikající hybridy. Proti koncepci ustálených hybridů svědčí neustále potvrzovaná vysoká míra hybridizace mezi základními druhy (Kukkonen 1994) a nalezení trihybridů (Gilman 1994). Dnes jsou ideálními místy sympatrického výskytu plavuníků sjezdovky, které představují dokonalý vertikální biokoridor pro všechny střeoevropské druhy (Stoor et al. 1996, Procházka 1997, Procházka & Harčarik 1999, Muller et al. 2003, Fousek & Harčarik 2009, Urfus & Vít 2009). Před rokem 1989 byly v ČSSR specifickým místem pro styk plavuníků lesní průseky vzniklé v rámci hraničních zátarasů železné opony na Šumavě. Zde se tyto rostliny vyskytovaly ve velkém množství. Avšak po ústupu managementu pohraniční stráže na většině míst již vymizely (Procházka et al. 1998, Urfus & Vít 2009). Na takových lokalitách často dochází ke vzniku hybridních rojů. A jelikož jsou vedlejší druhy plně či částečně fertillní (Kukkonen 1994), lze na těchto místech očekávat rozsáhlou introgresi. Příkladem zdokumentovaného pravděpodobného produktu introgrese plavuníků může být *Diphysastrum alpinum* subsp. *kablikianum* popsané z Krkonoš na konci 90. let 20. století. Tato rostlina svými morfologickými charakteristikami představuje přechodný typ mezi *D. alpinum* a *D. issleri* (Kubát 1997, Dostál 1984, 1989) a lze ji tedy považovat za možný ustálený introgresní typ.

---

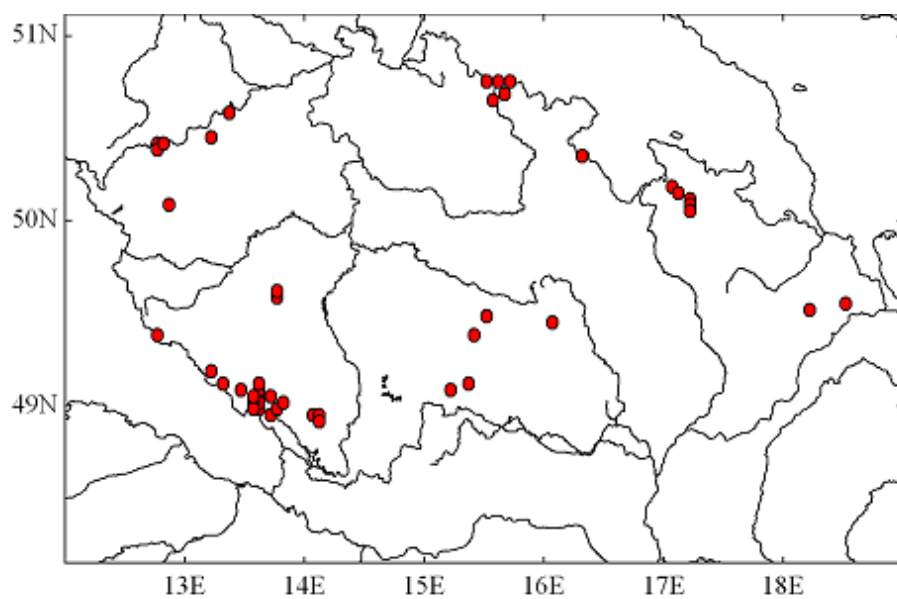
<sup>4)</sup> Je zajímavé, že v některých publikacích (Löve & Löve 1948) je uváděn počet chromosomů poloviční ( $2n = 22$ ). I když to metodiky studia neuvádějí, jedná se pravděpodobně o počty chromosomů z haploidních spor.

## 4. Metodika

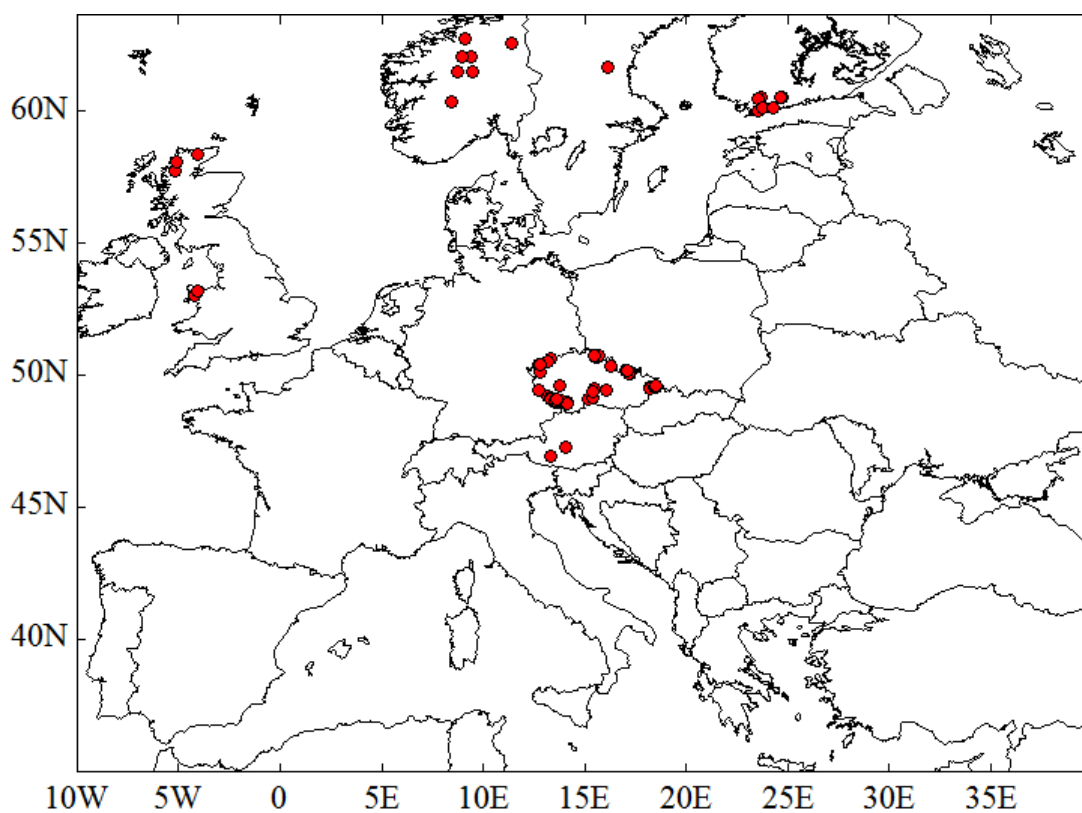
### 4.1 Sběr rostlinného materiálu

Rostlinný materiál použitý pro cytometrické a morfometrické analýzy plavuníků byl sbírán především v letech 2009 až 2011. Lokality sběru byly vytipovány podle získaných poznatků o rozšíření jednotlivých druhů, a sice z literárních údajů, databáze Floristické dokumentace (FLDOK), České národní fytoecologické databáze (ČNFD) a údajů od zkušených floristů. Na velkém množství dříve udávaných lokalit se však dnes už plavuníky nevyskytují. Rostliny byly sbírány především na území České republiky (obr. č. 12a na str. 29). Pro srovnání byly vybrány také populace z lokalit na území střední a severní Evropy – v Rakouských Alpách, Velké Británii a ve Skandinávii (obr. č. 12b na str. 29), navíc také z Ruska. Celkem bylo sebráno 584 rostlin z 83 lokalit (z toho 53 lokalit na území ČR; tab. č. 1 na str. 30 - 32). Mě sběry konkrétně obsáhly 26 populací; ostatní byly pořízeny za pomoci ostatních botaniků. Odebrány byly vždy jen menší části sterilních, příp. i fertálních, větví z několika jedinců izolovaných populací stejného druhu a z většího množství jedinců sympatricky se vyskytujících populací smíšených s výskytem vedlejších druhů. U vyvinutých jedinců (kde nehrozilo jejich poškození) byly sbírány větší položky pro herbářování (i tak se jednalo o malé části, které nemohly dané jedince oslabit). Všechny lokality výskytu byly zaměřeny pomocí GPS (Garmin Etrex Legend). Pro sběr na území národních parků a chráněných území byly uděleny výjimky č. 62/2010 pro NP Krkonoše a zn. SZ NPS 07813/2011/6 – NPS 09736/2011 pro NP a CHKO Šumava. Dále se jednalo o přímou spolupráci s institucemi ochrany přírody (CHKO Jeseníky, CHKO Beskydy, CHKO Český les, Muzeum v Příbrami apod.) a jejich pracovníky (Liborem Ekrtem, Rudolfem Hlaváčkem, Aloisem Pavlíčkem, Richardem Štenclem, Marií Popelářovou aj.).





Obr.č. 12a: Mapa sběrů v České Republice.



Obr.č. 12b: Mapa Evropy se zaznamenanými veškerými lokalitami sběrů.

Tab.č. 1: Seznam lokalit v České republice i v zahraničí.

Česká Republika						
	název lokality	datum	souřadnice	nadmořská výška	kolektor	herb.
1	Javořická hornatina, Kaproun, les Červenka, 1,5Km VOd VsiK Terezínu	9.10.2009	N49°04'45.0" E15°12'13.0"	680	TU, PV	
2	Javořická hornatina, Terezín, les Červenka, 1.5Km JZOd Vesnice Směrem Ke Kaprounu	9.10.2009	N49°04'38.0" E15°13'50.0"	680	TU, PV	
3	Javořická hornatina, Terezín, les Červenka, 0.5Km JZOd Vesnice Směrem Ke Kaprounu	9.10.2009	N49°04'45.0" E15°14'14.0"	680	TU, PV	
4	Krkonoše, Medvědí, Černá Sjezdovka, u 1. Zasněžovače	27.8.2009, 28.6.2011	N50°44'11.3" E15°36'13.0"	806 - 817	TU, PV, KD	
5	Krkonoše, Herlíkovice, Černá Sjezdovka	27.8.2009	N50°39'30.9" E15°35'00.3"	832	TU, PV	
6	Krkonoše, Herlíkovice, Červená Sjezdovka (nad Odvodňovacím příkopem)	27.8.2009	N50°39'30.1" E15°34'49.2"	921	TU, PV	
7	Krkonoše, mezi Husími Boudami a Předními Rennerovkami	27.8.2009	N50°41'08.2" E15°39'30.9"	1033	TU, PV	
8	Šumava, Špičák, Černá Sjezdovka	7.10.2009	49° 10' 16,1" 13° 12' 45,0"	1122 - 1151	TU, PV, KD	+
9	Šumava, Zadov, nad Sjezdovkami	7.10.2009	N49° 03' 39.1" E13° 37' 33.3"	1111	TU, PV, KD	
10	Jeseníky, Ramzová, Červená Sjezdovka Ramzová - Černava	7.10.2009	N50°11'02.9" E17°04'38.3"	985 - 1038	KD	+
11	Vysočina, příkop a násep Sjezdu Č. 104 z dálnice D1 na Silnici Větr. Jeníkov - Štoky	25.10.2009	N49°29'14.0" E15°30'25.0"	620	KD	+
12	Vysočina, Sklené nad Oslavou, mechatý příkop u Křižovatky lesních cest	25.10.2009	N49°26'50.0" E16°04'17.0"	585	KD	
13	Brdy, Hutě pod Třemšínem, poblíž Kobylí hlavy, násyp u lesní Štěrkaté cesty mezi mladými Smrkami	7.5.2010	N49°34'34.0" E13°46'52.0"	700	KD	
14	Brdy, Věšín, travnatá mýtinka ve Smrkovém lese poblíž cesty z Třemšína	29.6.2010	N49°36'28.5" E13°45'42.8"	700 - 710	KD	
15	Krušné hory, Boží Dar, Odvaly podél Silnice ca 1Km JVOd Obce	2.7.2010	N50°24'21.0" E12°46'13.3"	1038	TU, KD	
16	Krušné hory, Horní Blatná, 0.5Km JVOd železniční zastávky podél trati	2.7.2010	N50°23'8.2" E12°46'12.0"	891	TU, KD	
17	Český les, JZ Svah Malinové hory, poblíž Čerchova (areál Bývalé roty)	8.7.2010	N49°23'24.3" E12°46'17.0"	907 - 909	KD	+
18	Orlické hory, Sedloňov, JSvah Vrchu Polom, Křižovatka turistické cesty a cyklotrasy	9.2010	N50°20'55.4" E16°20'00.4"	825	KD	+
19	Slavkovský les, Bečov nad Teplou, u lesní turistické Stezky K Bečovským rybníkům	9.2010	N50°5'7.8" E12°51'56.2"	665	KD	+
20	Krkonoše, Luční Bouda, Val po technických úpravách podél cesty Od Bývalé Obří Boudy Směrem K Luční Boudě	29.6.2011	N50°44'10.9" E15°42'16.4"	1400	KD	
21	Krkonoše, Kotelní Jáma, Skalní Výchozy	14.7.2011	N50°45'12.6" E15°31'49.8"	1412	FK, KD	
22	Krušné hory, Kalek (Gabriela hut), VOd Vesnice poblíž Vodárenského rybníka	6.8.2011	N50°34'54.5" E13°21'50.0"	811	KD	
23	Krušné hory, Výsluní, ZO Obce	6.8.2011	50°27'56,3" 13°13'34,7"	796	KD	
24	Krušné hory, Ryžovna, Vřesoviště na Okraji lesa	2.9.2011	N50°24'5.2" E12°49'29.1"	1009	KD	
25	Šumava, SV Svah Žlíbského Vrchu, Vřesoviště v místě Bývalého lesního průseku	21.5.2010	N48°56'10.9" E13°43'51.8"	1110	LE	+
26	Šumava, Kubova hut, Smilkový porost místy přecházející do Vřesoviště na Sjezdovce	21.5.2010	N48°58'56.9" E13°45'53.9"	1060	LE	+

27	Šumava, Český Rudolec, Světlna v podrostu Smrko-borového lesa	15.6.2010	N49°07'17.1" E15°23'17.9"	550	LE	+
28	Šumava, Klášterec, Vřesoviště nad železniční tratí	1.7.2010, 12.10.2011	N49°02'04.4" E13°43'29.2"	845	LE, TU, PV, KD	+
29	Šumava, Churáňov, zimní areál na Běžecké závody	1.7.2010, 12.10.2011	N49°04'04.2" E13°37'09.7"	1115	LE, TU, PV, KD	
30	Šumava, Knižecí pláně (bývalá Osada), Vřesoviště zarůstající Smrkem při Okraji lesní cesty	1.7.2010	N48°58'08.4" E13°38'51.2"	975	LE	+
31	Šumava, VSvah Ostré hory, mladý rozvolněný Bukový les (dříve paseka)	1.7.2010	N48°56'04.6" E14°05'18.7"	755	LE	
32	Šumava, Příslop, podrost Smrko-borového lesa	1.7.2010	N48°56'42.0" E14°08'43.6"	725	LE	
33	Šumava, Včelná pod Boubínem, Světlny v místě Bývalého lesního průseku	1.7.2010, 12.10.2011	N49°00'36.1" E13°50'53.7"	965	LE, TU, PV, KD	
34	Šumava, Zadov, Smilkový trávník při Okraji lesa nad a pod Bývalým Skokanským můstkem	1.7.2010	N49°03'39.6" E13°37'32.5"	1115	LE, TU, PV, KD	
35	Šumava, Ktiš, zarůstající Vřesoviště	1.7.2010	N48°55'18.7" E14°08'32.5"	750	LE	
36	Šumava, Nové Hutě, Smrk zarůstající Stráň nad lesní cestou mezi Novými Hutěmi a Vrchem Píliba	1.7.2010, 12.10.2011	N49°00'52.8" E13°38'58.2"	1030	LE, TU, PV, KD	+
37	Šumava, Bývalá Osada Hůrka	1.9.2010	N49°07'28.6" E13°19'34.3"	1030	LE	+
38	Šumava, Smí, podrost Smrkového rozvolněného lesa	1.9.2010, 13.10.2011	N49°05'15.7" E13°29'15.0"	895	LE, TU, PV, KD	
39	Šumava, Kvilda, JSvah Vrchu Tetřev, Bývalý povrchový zemník na písek	1.9.2010, 13.10.2011	N49°00'28.1" E13°33'24.9"	1115	LE, TU, PV, KD	
40	Šumava, Bučina, Vřesoviště v místě lesního průseku	1.9.2010, 12.10.2011	N48°58'05.7" E13°35'32.1"	1180	LE, TU, PV, KD	
41	Šumava, Vysočina - Čeřínek, Sjezdovka	6.9.2010	N49°22'25.2" E15°25'53.2"	710	LE	+
42	Šumava, nad Jezerem Laka, Smilkový trávník a Vřesoviště v místě lesního průseku	1.9.2010	N49°06'05.4" E13°19'57.8"	1235	LE	
43	Šumava, prameny Vltavy, Bývalý povrchový zemník na písek	1.9.2010	N48°58'47.2" E13°33'42.8"	1170	LE	+
44	Šumava, Kvilda - Olšinka, při Okraji Bývalého lomu	1.9.2010	N49°02'05.4" E13°35'59.8"	1135	LE	+
45	Jeseníky, ZSvah Kamzičího Vrchu	9.2010	N50°06'15.37" E17°14'38.91"	1030	R. Štencel	
46	Jeseníky, Praděd, Tabulové Kameny	9.2010	N50°05'12.14" E17°13'50.08"	1400	R. Štencel	
47	Jeseníky, Praděd, Petrovy Kameny	9.2010	N50°04'4.43" E17°13'55.98"	1430	R. Štencel	+
48	Jeseníky, Praděd, mezi Petrovými Kameny a Vrchem Vysoká hole	9.2010	N50°03'54.39" E17°13'58.30"	1442	R. Štencel	
49	Jeseníky, Vrch Vysoká hole	9.2010	N50°03'34.74" E17°13'45.35"	1460	R. Štencel	
50	Jeseníky, Sněžná Kotlina	9.2010	N50°08'40.41" E17°08'21.86"	1215	R. Štencel	
51	Beskydy, Vrch Kladnatá	12.11.2010	N49°29'42.2" E18°12'03.3"	775-777	A. Pavlíčko	
52	Českomoravská Vysočina, Dolní Cerekev, VSvah Lysé hory	12.11.2010	N49°32'28.9" E18°27'48.5"	1122	A. Pavlíčko	
53	Šumava, Stachy, přírodní rezervace Pod Popelní horou hill, Bývalá pastvina	2.8.2011	N49°06'16.0" E13°37'12.0"	850	A. Pavlíčko	
54	Radhošťské Besky, Krásná, Vrch Travný	17.11.2010	N49°33'39.3" E18°30'08.2"	1146	M. Popelářová	

## Zahraničí

1	Rakousko, Kärnten, Oberkornitz, Reisseck-gruppe, poblíž 4. Železniční Stanice do Reissecku, JZ Svah	9.9.2009	N46° 55' 2.5" E13° 21' 46.6"	2254	J. Zahradníček, J. Chrtěk, H. Chudáčková
2	Rusko, Sibiř, Suzun, Suzunský les	19.9.2009	N53° 55' 08.6" E82° 34' 09.5"	210	TU
10	Norsko, poblíž NP Rondane	6.9.2008	N61° 56' 17.2" E10° 0' 29.3"	1020	FK
11	Norsko, u Jezera Torsefeatn u Silnice Č. 40 (mezi Nore Og Uvdal a Dagali)	26.6.2009	N60° 20' 28.4" E8° 29' 78.9"	1200	TU, PV
12	Norway, Vik, lake By the road No13 from Vik	26.6.2009	N60° 56' 19.2" E06° 26' 34.6"	995	TU, PV
13	Norway, near to lake Alnesvatnet By the road No63 from Soggemoen	26.6.2009	N62° 25' 57.7" E07° 39' 29.0"	873	TU, PV
14	Norsko, mezi Dovre a Follidal	27.6.2009	N62° 01' 48.7" E9° 24' 49.8"	1206	TU, PV
15	Norsko, podél Silnice Dalsvelven z města Røros	27.6.2009	N62° 32' 56.6" E11° 26' 08.0"	638	TU, PV
16	Norsko, město Linnset, JBřeh Jezera Rengen	28.6.2009	N64° 03' 40.4" E14° 03' 15.9"	339	TU, PV
17	Norsko, mezi městy Formofoss a Sandmoen	28.6.2009	N64° 29' 16.7" E13° 04' 26.5"	457	TU, PV
18	Norsko, mezi městy Lesja a Skogbygde	28.6.2009	N62° 02' 18.0" E8° 58' 03.6"	1188	TU, PV
19	Norsko, mezi Jezery Breidsjøen a Fofervatnet	30.6.2009	N61° 29' 10.1" E9° 29' 17.3"	1031	TU, PV
20	Norsko, mezi Jezerem Kalkovo a Orameny řek Leybusha a Voloshka, nedaleko železniční tratě	30.6.2009	N61° 13' 39.4" E10° 37' 25.3"	958	TU, PV
38	Finsko, Uusimaa, Tammisaari, J Od Silnice Č. 53 z Lohja do Tammisaari, na Křižovatce Se Silnicí Č. 1050 do Snappertuna, Otevřený Borový les na písku	2.7.2011	N60° 01' 00.8" E23° 34' 01.9"	39	KD
39	Finsko, Varsinais-Suomi, Kiikala, Lasikylä, ZBřeh Jezera Tervakas, Suchá Borová pláň na písku	3.7.2011	N60° 29' 25.1" E23° 42' 21.0"	122	KD
40	Finsko, Uusimaa, Nummijärvi, Kiljava, Borový les za autobusovou zastávkou Kiljavaarantie	3.7.2011	N60° 30' 44.6" E24° 42' 05.2"	85	KD
41	Finsko, Uusimaa, Nummijärvi, před Kiljava, Borový les za autobusovou zastávkou Kotolahdentie	7.7.2011	N60° 29' 34.1" E24° 39' 25.1"	109	KD
42	Finsko, Uusimaa, Nummijärvi, Borovicový les mezi Nummenpää a Selki	7.7.2011	N60° 26' 49.4" E23° 34' 00.9"	104	KD
43	Finsko, Varsinais-Suomi, Borovicový les podél Silnice 2 Km Od Karisk Lohja (silnice Č. 25)	8.7.2011	N60° 06' 14.0" E23° 46' 30.3"	67	KD
44	Finsko, Varsinais-Suomi, Borovicový les podél Silnice 5 Km z Karisk Lohja (silnice Č. 25)	8.7.2011	N60° 06' 50.4" E23° 48' 03.4"	50	KD
45	Finsko, Borovicový les podél Silnice před Störsvik za Odbočkou Silnice Č. 51	8.7.2011	N60° 05' 10.0" E24° 18' 09.1"	12	KD
46	Skotsko	26.8.2011	N57° 41' 55.6" W04° 66' 22.1"	215	TU, PV
47	Skotsko	26.8.2011	N58° 19' 23.1" W04° 02' 54.4"	440	TU, PV
48	Skotsko	28.8.2011	N53° 00' 28.2" W04° 08' 43.3"	451	TU, PV
49	Skotsko	27.8.2011	N53° 09' 11.0" W03° 59' 45.6"	613	TU, PV
50	Skotsko, Knockhan Crag, útesy 17 Km západně Od Ullapool city	16.10.2011	N58° 02' 13.6" W5° 03' 49.2"	344	FK
51	Norsko, Trollsimon, Sedlo J Od Jezera Gjevillvatnet	11.8.2011	N62° 43' 33.9" E9° 10' 11.0"	937	FK
52	Norsko, Järvsö, příkop na Okrají Silnice	11.8.2011	N61° 39' 01.9" E16° 10' 56.4"	132	FK
53	Norsko, národní park Joturiheimen, poblíž Jezera Bessvatnet	13.8.2011	N61° 30' 32.5" E8° 48' 05.5"	1500	J. Malíček
54	Rakousko, Alpy, Oberatuern, malé Skalky 1 Km Z Od Sedla V Obertauern	18.7.2011	N47° 15' 57.2" E14° 04' 49.7"	1742	FK

## 4.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FCM, *flow cytometry*) je v současnosti metodou používanou v mnoha biologických oborech (nejen v botanice, ale i v imunologii, molekulární biologii, genetice, zoologii apod.). V botanice se používá od 80. let 20. století (Doležel et al. 2007). Mezi její aplikace patří například stanovení absolutního obsahu jaderné DNA, určení DNA ploidie (Suda et al. 2007), detekce mixoploidie či aneuploidie, analýza buněčného cyklu, určení reprodukčního způsobu, studium genové exprese apod. (Suda 2005; Greilhuber et al. 2007).

Tato metoda je založena na měření optických vlastností (fluorescence) fluorochromem obarvených izolovaných částic (jader, buněk) unášených velkou rychlostí v tenkém proudu kapaliny skrz optickou komůrku. V komůrce částice procházejí přes svazek paprsků o určité vlnové délce (UV lampa, laser). Fluorochromem vyzářené světlo je vedeno přes soubor filtrů a snímáno fotodetektozem, který jej převede na elektrický signál. Ten je dále převeden do digitální formy a zpracován počítačem.

Mezi hlavní přednosti průtokové cytometrie patří jednoduchost přípravy vzorků, velká rychlost analýz, nedestruktivnost (pro analýzy stačí velmi malá část materiálu a je tak možné studovat i vzácné, ohrožené a mizející druhy; Suda 2004), možnost analyzovat množství pletiv i nedělicí se buňky a směsné vzorky. V neposlední řadě je její předností také velká přesnost měření (detekovatelné jsou už několikaprocentní rozdíly v množství DNA způsobené např. aneuploidií nebo mezidruhovou hybridizací) a nízké náklady analýz (Doležel et al. 2007). K nevýhodám této metody patří zvláště potřeba čerstvého materiálu. U některých druhů či čeledí (např. Rosaceae) mohou problémy způsobovat také sekundární metabolity, stejně jako vysoký obsah slizovitých látek v listech (Suda 2005).

Výstupem analýz jsou histogramy zobrazující relativní fluorescenci izolovaných jader na ose x a na ose y počet těchto jader. Jedním z parametrů cytometrických analýz je jejich přesnost. Tu popisuje tzv. variační koeficient (CV), který je roven podílu směrodatné odchylky a průměrné pozice píku. Obvykle se pohybuje mezi 1 - 10 %. U kritických analýz jsou za přesné považovány hodnoty do 3 %. U druhů s vysokým obsahem sekundárních metabolitů či s velmi malým množstvím DNA jsou akceptována měření s vyšším koeficientem (5 – 7 %; Suda 2004).

Průtoková cytometrie, jakožto nedestruktivní metoda, je pro studium středoevropských zástupců rodu *Diphasiastrum*, vzhledem k jejich vzácnosti, metodou velice vhodnou. Navíc byla u všech středoevropských druhů prokázána stejná ploidie ( $2n = 46$ ; Wilce 1965, Dostál 1984, Marhold et al. 2007). Jednotlivé taxony se liší jen na úrovni absolutních velikostí genomů (Dvořáková 2009, Urfus & Vít 2009, Dvořáková et al. 2010, Bennert et al. 2011, Urfus et al. 2012, Dvořáková et al. unpubl).

Celkem bylo analyzováno 570 rostlin plavuníků z 83 populací. Sebrané části rostlin byly uchovány v plastových sáčcích v chladničce při teplotě 4°C. Měřeny byly maximálně po týdnu od sebrání. Veškeré analýzy probíhaly v laboratoři průtokové cytometrie katedry botaniky PřF.

Absolutní velikost genomu byla stanovena z živých pletiv sterilních prýtlů plavuníků na průtokovém cytometru Partec CyFlow (Partec 2002) se zeleným diodovým laserem (532 nm) jako excitačním zdrojem. Pro izolaci a barvení jader byla zvolena modifikovaná dvoustupňová metodika podle Otto (Doležel et. al. 2007). Jako interní standard byly použity listy hrachu *Pisum sativum* cv. *Ctirad* ( $2C = 9,09$  pg; Doležel et al. 1998), jenž má optimální velikost genomu pro studovaný rod. Kalibrováno bylo podle karyologicky ověřených a morfologicky typických jedinců základních druhů. Množství pletiva standardu bylo odhadnuto tak, aby bylo množství jader standardu a analyzované rostliny přibližně stejné (cca 0,3 cm<sup>2</sup> rostliny a o něco méně standardu). Pletiva vzorku a standardu byla nasekána žiletkou v 0,5 ml vychlazeného pufru Otto I (0,1 M monohydrát kyseliny citronové, 0,5% detergent Tween 20; Otto 1990, Doležel & Göhde 1995). Suspenze byla přefiltrována přes nylonový filtr o průměru oka 42 μm a při pokojové teplotě inkubována asi 10 min. Do roztoku byl poté přidán barvicí roztok obsahující 1 ml fluorescenčního barviva propidiumjodid (50 mg/ml), pufr Otto II (0,4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; Otto 1990), RNáza IIA (50 mg/ml) a β-merkapt ethanol (2 mg/ml; Suda 2004). Připravený vzorek se nechal 3-5 minut stát při pokojové teplotě a poté byl změřen na průtokovém cytometru.

Histogramy naměřené fluorescence 5000 jader každého vzorku byly analyzovány v programu Partec FloMax. Analýzou poměrů píků (G0/G1) standardu a měřené rostliny byly vypočítány velikosti genomů rostlin. K dalším analýzám byla zahrnuta především měření, kdy byl koeficient variance (CV) menší než 4 % (Doležel et al. 2007). V některých výjimečných případech přesáhla hodnota CV tuto hranici, zřejmě kvůli vyššímu stáří vzorků.

Jelikož se velikost genomu měřených rostlin ukázala být velmi stabilní (maximální odchylka u 20 různých vzorků po 3 měřeních nebyla vyšší než 2 %; Doležel et al. 2007), byla měření provedena pouze jednou.

## 4.3 Klasická morfometrická analýza

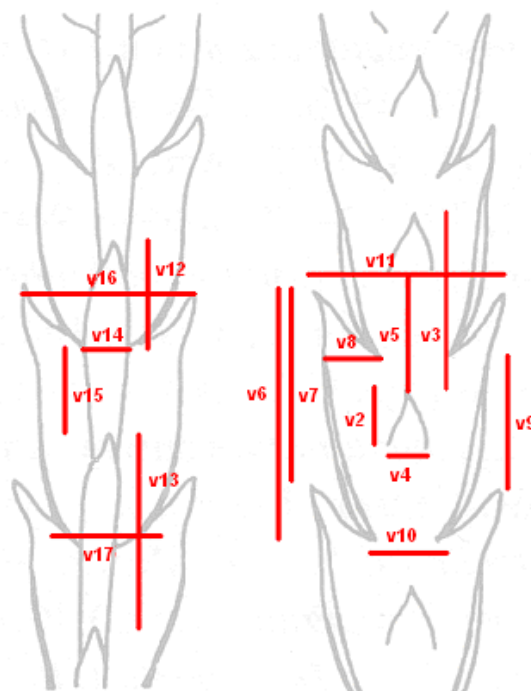
### 4.3.1 Klasická morfometrika prýtlů

Morfometrické analýzy patří k důležitým postupům v biosystematice. Důležité jsou zejména pro kritické hodnocení projevů vnitrodruhové a mezidruhové variability (odlišení jedinců, populací, ploidních úrovní apod.). Pro zpracování naměřených dat využívají mnohorozměrné statistické metody hodnotící vzdálenosti a úhly v tělech a strukturách zkoumaných organismů. Z těchto hodnot však většinou není možné zpětně odvodit celkový tvar organismu nebo orgánu. Výhodou mnohorozměrných statistických metod je ve fenetickém přístupu možnost analyzování velkého množství znaků současně. Přičemž jsou všechny znaky považovány za taxonomicky stejně hodnotné a je tak minimalizován subjektivní vliv pozorovatele (Marhold & Suda 2002).

Morfometrická analýza středoevropských zástupců rodu *Diphasiastrum* byla použita pro morfologické odlišení jedinců (druhů) a pro případné vymezení sporných hybridogenních skupin. Měření bylo provedeno na 552 rostlinách z 81 populací, předtím karyologicky změřených průtokovou cytometrií. Dobře vyvinuté čerstvé prýtlů byly měřeny termostabilním pravítkem s přesností na 1 mm pod binokulární lupou. Na základě údajů v určovacích klíčích a flórách (Kubát 1997, Jäger & Werner 2005, Kubát 2002, Frey et al. 2006) zaměřených na příslušný rod a konzultací s odborníky bylo vytipováno a posléze měřeno 16 morfologických znaků na sterilních prýtlích (tab.č. 2a obr.č. 13 na str. 36). Jednalo se o 4 znaky na listech břišních, 6 na listech postranních a 6 na listech hřbetních. Pro odstranění vlivu odlehlých hodnot byly znaky měřeny vždy na třech po sobě jdoucích řadách listů. Před dalším statistickým zpracováním byly tyto hodnoty pro každý znak a každou rostlinu zprůměrovány. Měřena byla také výška rostlin, ale kvůli velké plasticitě způsobené podmínkami prostředí, nebyla do dalších analýz zahrnuta. Bylo testováno také 8 dalších poměrových znaků (tab. č. 2b na str. 36).

**Tab. č. 2a:** Tabulka znaků měřených na sterilních prýtech. Znak v1 zde není uveden, protože představoval určení druhu.

znak	anglická zkratka	popis znaku
		<b>břišní listy</b>
v2	VL	délka od paždí
v3	VLU	vzdálenosti špiček od sebe (špička - špička)
v4	VW	šířka listu v nejširším místě
v5	VBU	špička nižšího až báze vyššího listu
		<b>postranní listy</b>
v6	LL	délka od paždí
v7	LLU	vzdálenosti špiček od sebe (špička - špička)
v8	LW	šířka listu v nejširším místě
v9	LBU	špička nižšího až báze vyššího listu
v10	LW	šířka mezi paždými
v11	LD	špičky od sebe
		<b>hřbetní listy</b>
v12	DL	délka od paždí
v13	DLU	vzdálenosti špiček od sebe (špička - špička)
v14	DW	šířka listu v nejširším místě
v15	DBU	špička nižšího až báze vyššího listu
v16	DLW	šířka prýtu v nejširším místě hřbetního listu
v17	DWL	šířka prýtu - šířka hřbetního listu



**Obr.č. 13:** Zobrazení znaků měřených klasickou morfometrikou na břišní a hřbetní straně prýtů.

**Tab. č. 2b:** Přidané poměrové znaky na sterilních prýtech.

znak		popis znaku
v18	v2/v4	délka od paždí břišního listu / jeho šířka v nejširším místě
v19	v6/v8	délka od paždí postranního listu / jeho šířka v nejširším místě
v20	v12/v14	délka od paždí hřbetního listu / jeho šířka v nejširším místě
v21	v16/v15	šířka prýtu v nejširším bodě hřbetního listu / špička nižšího až báze vyššího listu
v22	v13/v15	vzdálenosti špiček hřbetních listů od sebe / špička nižšího až báze vyššího listu
v23	v3/v10	vzdálenosti špiček břišních listů od sebe / šířka mezi paždými postranních listů
v24	v16-v4	šířka prýtu v nejširším bodě hřbetního listu - šířka břišního listu v nejširším místě
v25	v16/v15	šířka prýtu v nejširším bodě hřbetního listu / šířka břišního listu v nejširším místě

Základní statistické charakteristiky znaků, jakými jsou průměrná hodnota, minimum, maximum, horní (75 %) a dolní (25 %) kvartil, medián a směrodatná odchylka byly vypočteny procedurou UNIVARIATE. Korelace proměnných mezi znaky byla otestována pomocí procedury CORR použitím Pearsonova korelačního koeficientu a neparametrického Spearmanova korelačního koeficientu. Jelikož hodnota koeficientů nebyla vyšší než 0,95 (Marhold & Suda 2002), byly do analýz zahrnuty všechny znaky. Pro odhalení základní struktury v datovém souboru byla použita analýza hlavních komponent (PCA) pomocí procedury PRINCOM. Jejím cílem bylo nahradit původní soubor naměřených znaků souborem nových, vzájemně nekorelovaných, znaků tak, aby byla



vystihnuta největší variabilita souboru a byly zachovány eukleidovské vzdálenosti objektů. Největší variabilitu pak vystihovaly první 3 osy (hlavní komponenty; Marhold & Suda 2002).

Před analýzou hlavních komponent (PCA) bylo potřeba definovat skupiny. Proto byly k jednotlivým změřeným vzorkům přiřazeny jejich absolutní velikosti genomů a druhová jména (v podobě čísla); ta byla určena několikanásobným ověřením pomocí determinačních klíčů a zpětnou konfrontací s absolutní velikostí genomu. Pro lepší prozkoumání struktury dat byly odděleny soubory podle geografie (střední Evropa, Skandinávie a vše dohromady) a podle druhů (základní druhy, soubor jedinců *D. issleri* a *D. oellgaardii*).

Další analýzy klasické morfometrie byly dále realizovány pouze na souboru dat ze střední Evropy (jedinci ze Skandinávie, Skotska a Ruska byly vynechány).

Pro další prozkoumání dat byl pomocí programu CANOCO 4.12 (Šmilauer 1999-2003) na základě ordinačních výsledků PCA proveden model lokální regrese Loess (locally wighted regression), který je založen na lokálně vážené lineární regresi (Cleveland & Devlin 1988). Snaží se popsat očekávané hodnoty odpovědi pro jednotlivé hodnoty prediktoru (velikosti genomu). Přímou byla použita metoda Loess smoother, jenž poskytuje obecnější regresní modely, které nemají žádný předpoklad o tvaru fitované křivky (Šmilauer & Lepš 2000). Získané hodnoty mají menší variabilitu než hodnoty pozorované (proto smoother). Výsledky modelu byly zobrazeny pomocí vrstevnicových diagramů. V našem případě byla promítnuta – fitována velikost genomu na diagram PCA.

Dalším přístupem byla redundanční analýza (RDA; redundancy analysis). Jedná se o omezenou formu analýzy hlavních komponent. Byla provedena také v programu CANOCO pro otestování vlivu velikosti genomu na morfologii. Statistická významnost omezeného ordinačního modelu byla testována pomocí Monte-Carlo permutačních testů. Ty se vztahují k nulové hypotéze říkající, že primární data jsou nezávislá na vysvětlujících proměnných (Šmilauer & Lepš 2000). Na první ordinační ose byla zobrazena velikost genomu, jakožto vnější faktor. A na druhou osu byly promítnuty ostatní morfologické charakteristiky (naměřené hodnoty).

#### **4.3.2 Klasická morfometrie sporofylů**

U fertálních rostlin bylo měřeno celkem 7 znaků: 5 na výtrusnicovém klasu a 2 na sporofylech (tab.č. 3 na str. 38). Na sporofylech byly vždy měřeny tři po sobě jdoucí řady výtrusnicových listů a naměřené hodnoty byly, stejně jako u znaků na prýtech, zprůměrovány. Celkem bylo změřeno 130 výtrusnic. Další provedené analýzy byly obdobné analýzám charakteristik prýťů (základní statistické údaje, korelace proměnných, analýza hlavních komponent).

**Tab.č. 3:** Tabulka znaků měřených na výtrusnicích. Znak v1 představoval určený druh, proto není v tabulce uveden.

znak	popis znaku
v2	délka stopky (po 1. větvení)
v3	délka výtrusnice
v4	vzdálenost od 1. větvení po výtrusnici
v5	počet větvení
v6	šířka výtrusnice
v7	šířka výtrus.šupin ve středu výtrusnice
v8	délka výtrus.šupin ve středu výtrusnice

## 4.4 Geometrická morfometrická analýza

### 4.4.1 Geometrická morfometrika prýtů

Geometrická morfometrika, dříve „nová morfometrika“, se začala rozvíjet koncem 80. a začátkem 90. let 20. století. Tento metodický přístup lze uplatnit v širokém spektru studií – např. při studiu ontogeneze, pohlavního dimorfismu a v neposlední řadě také v taxonomii (Neustupa 2006, Marhold & Suda 2002).

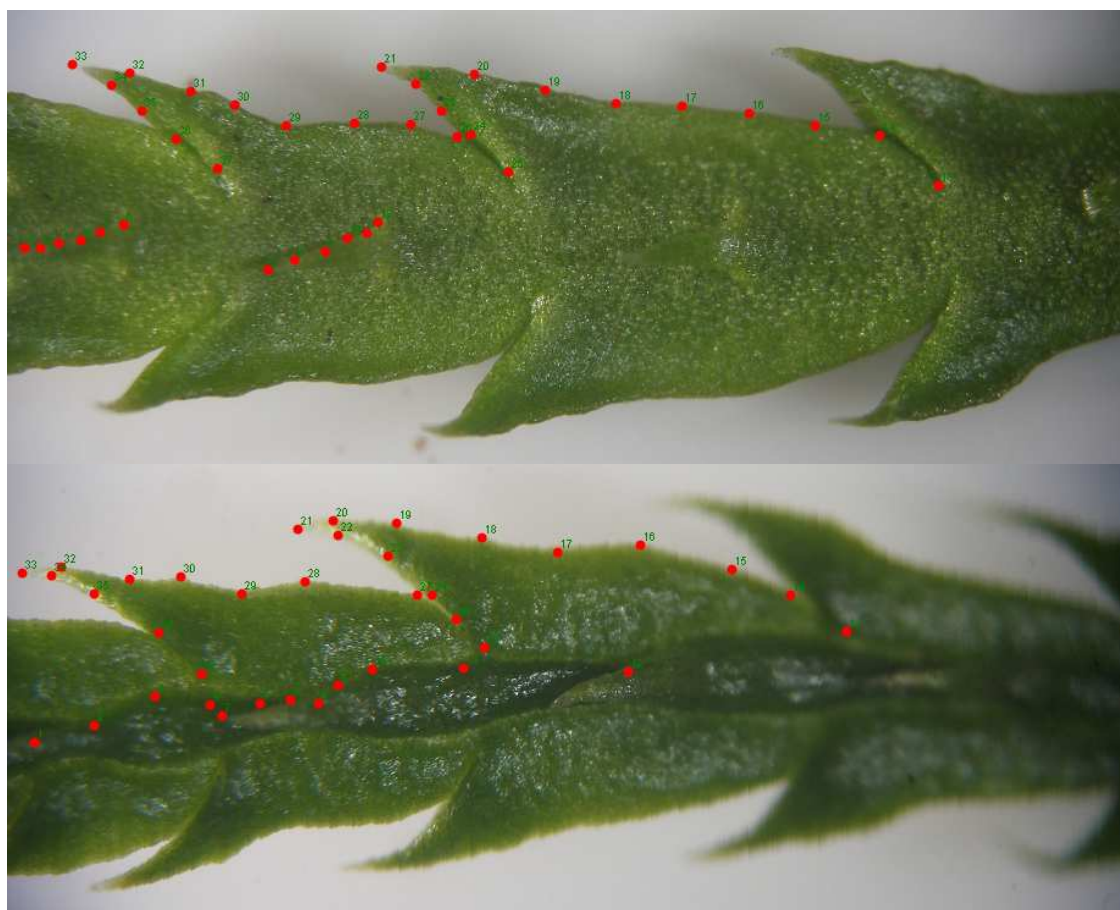
Tato metoda se snaží analyzovat a srovnávat tvar jednotlivých objektů. Nevychází ze vzdáleností mezi body, ale je založena na srovnání konfigurace (souřadnic) strukturně shodných – význačných bodů (landmarků) na souboru zkoumaných objektů. Poloha těchto bodů je zaznamenávána pomocí souřadnicové sítě (D’Arcy Thompsonových transformačních mřížek). Dalším krokem je pak prokrustovská analýza (Generalized Procrustes analysis, GPA), kde je analyzovaný soubor objektů přeložen přes sebe tak, aby mezi odpovídajícími si landmarky byly co nejmenší vzdálenosti. Po této analýze zbývá u každého objektu a pro každý landmark tzv. zbytková vzdálenost (vzdálenost od landmarku u průměrného objektu celé sady). Zbytkové vzdálenosti všech landmarků informují o charakteristice tvaru každého jednotlivého zkoumaného objektu. Díky tzv. metodě ohebných pásků (thin-plate spline) jsou získány informace o vzájemných tvarových změnách mezi zkoumanými objekty a definují tak tvaroprostor, ve kterém probíhá veškerá tvarová přeměna. V taxonomii umožňují tvaroprostory srovnávat např. podobnosti a odlišnosti různých druhů, v biogeografii lze tvaroprostorové trendy spojovat s geografickým rozšířením různých populací studovaných druhů atd. (Rohlf & Corti 2000, Bookstein et al. 2003).

Data získaná pomocí geometrické morfometricky je možné dále vyhodnocovat běžnými mnohorozměrnými metodami, jakými jsou například analýza hlavních komponent, shlukovací analýza, případně diskriminační analýza (Marhold & Suda 2002).

Geometrická morfometrika nebyla nikdy v rámci Lycopodiopsid použita. Plavuníky jsou díky výrazné morfologii s množstvím opakujících se homologních prvků a malé proměnlivosti pro použití této metody rostlinami velice vhodnými. Spolu s klasickými morfometrickými analýzami byla i geometrická morfometrika použita pro morfologické odlišení druhů a pro vymezení sporných hybridogenních skupin.

Prýty 373 karyologicky změřených rostlin byly vyfoceny digitálním fotoaparátem Olympus z břišní a hřbetní strany přes binokulární lupu Olympus SZX12. Získané barvené obrázky (\*.jpg) byly zmenšeny a převedeny do formátu \*.bmp. Dále byly zpracovány metodou ohebných pásků (thin-plate spline; Bookstein 1997, Zelditsch et al. 2004) pomocí softwaru Tps package (Rohlf 2010). Tato metoda srovnává konfiguraci význačných bodů, tzv. landmarků, pomocí souřadnicové sítě a tu posléze tvaruje tak, aby bylo dosaženo co největší shody se srovnávaným referenčním objektem. Rozdíly mezi objekty pak vystihuje deformace této sítě (Marhold & Suda 2002).

Celkem bylo vytipováno 37 landmarků (z toho 7 pevných a 30 tzv. semilandmarků) na 2 řadách listů v 1/2 prýtu na břišní i hřbetní straně (obr č. 14).



**Obr.č. 14:** Vizualizace 37 landmarků na břišní a hřbetní straně prýtu na dvou řadách listů. Pevné landmarky jsou vždy na špičce a bázi listů (č. 1, 6, 7, 12, 13, 21, 25, 33, 37) a semilandmarky jsou umístěné mezi nimi.

V programu TpsDig 2.16 byly na vyfocených prýtech landmarky digitalizovány. Poté byly v programu TpsUtil 1.46 označeny a propojeny landmarky a zvlášť semilandmarky. Nakonec byla pomocí programu TpsRelw ver. 1.49 provedena Prokrustova analýza a tzv. analýza relativních warpů (GPA, Geometric Procrustes Analysis) standardizující velikost objektů a optimalizující jejich rotaci a překlad tak, aby vzdálenosti mezi odpovídajícími si landmarky byly minimální (Bookstein 1991, Zelditch et al. 2004, Slice 2005) - obdoba analýzy hlavních komponent (PCA). Okraje morfo-prostoru zobrazené prvními třemi osami byly zobrazeny jako transformační mřížka (thin-plate spline) z průměrných (konsenzuálních) tvarů. Pro barevné označení skupin jednotlivých druhů byla skóre relativních warpů (souřadnice) převedena do programu PAST ver. 2.14 (Hammer et al. 2001). Zde byla opět počítána analýza hlavních komponent (PCA).

Po prokrustovské analýze objektů byly získány informace o vzájemné poloze všech landmarků a semilandmarků („aligned specimen“). Vizualizace překryvu těchto význačných bodů byla provedena v programu PAST.

Analýzou relativních warpů byly mimo jiné získány informace o těžištích jednotlivých objektů – tzv. centroid size (velikost centroidu). Tato velikost se mění lineárně s morfologickými vlastnostmi objektu. Pomocí programu CANOCO byla otestována její korelace s velikostí genomu.

Pro otestování souvislosti geometrických datových souborů s velikostí genomu byla provedena PLS analýza (Partial Least Squares analysis; analýza singulárních warpů) v programu tpsPLS 1.18 (Rohlf 2006). Tato metoda byla původně sestavena k porovnání souvislostí mezi morfologií a geografickými charakteristikami. Vytvořením nových lineárních kombinací (os) nezávislých a závislých proměnných redukuje tvaroprostor tak, aby byla maximalizována kovariance mezi 2 datovými soubory (Rohl & Corti 2000, Bookstein et al. 2003) – v našem případě mezi velikostí genomu a souborem souřadnic všech landmarků. První dvě osy vysvětlují největší kovarianci mezi datasety. První osa zobrazuje velikost genomu a druhá, na ní kolmá osa, zobrazuje charakteristiky týkající se tvaru rostlin. Pomocí této metody byly dále rekonstruovány vektory změn jednotlivých landmarků směrem od extrémů (jedinci s nejmenší a největší velikostí genomu) k průměru.

Dalším přístupem byla, stejně jako v klasické morfometrice, redundanční analýza (RDA; redundancy analysis) provedená v programu CANOCO pro otestování vlivu velikosti genomu na morfologii. Velikost genomu byla zobrazena na první ordinační ose a na druhé ose byly znázorněny všechny ostatní morfologické charakteristiky (souřadnice landmarků).

#### 4.4.2 Geometrická morfometrika sporofylů

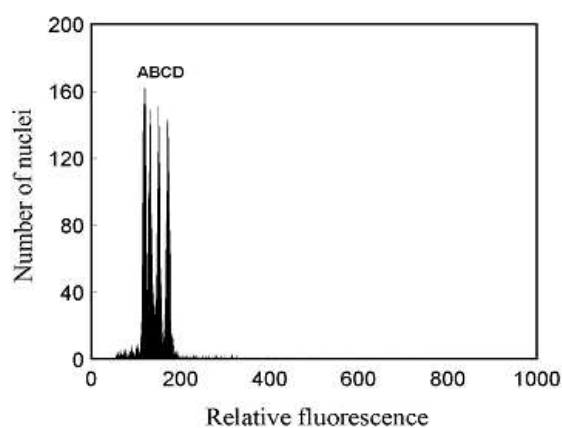
Také znaky na sporofylech (výtrusnicových listech) se, po použití klasických morfometrických analýz, ukázaly poměrně důležitými. Analýza tvaru byla použita na celkem 75 sporofylech různých zástupců rodu *Diphasiastrum*. Sporofyly byly nejprve pinzetou vyjmuty z výtrusnicového klasu, nalepeny na papír a poté nascanovány (ve formátu \*.bmp). V programu SHAPE 1.3. (Hiroyoshi 2006) byla provedena obrysová analýza tvaru a vyhodnocena multivariační analýzou hlavních komponent (PCA). Pro lepší vizualizaci a oddělení skupin jednotlivých druhů plavuníků byla skóre hlavních komponent převedena do programu PAST. Zde byly jednotlivé druhy barevně označeny a poté byly opět podrobeny analýze hlavních komponent.

Na sporofylech byla provedena také geometrická morfometrika. Bylo vytipováno celkem 15 landmarků (z toho 3 pevné a 12 klouzavých tzv. semilandmarků). Stejným způsobem jako u geometrické morfometrické analýzy prýtů byla pomocí softwaru Tps package provedena analýza hlavních komponent sporofylů. V programu PAST byly jednotlivé druhy opět barevně vizualizovány. Na základě prokrustovské analýzy byly v programu PAST také zobrazeny souřadnice landmarků a semilandmarků jednotlivých druhů (XY plot).

## 5. Výsledky

### 5.1 Průtoková cytometrie

Absolutní velikost genomu byla určena celkem u 570 rostlin rodu *Diphasiastrum*. Jednalo se o 493 jedinců z 83 populací z území České republiky a 77 rostlin z 28 populací ze zahraničí (z Norska, Švédska, Finska, Velké Británie – hlavně Skotska, Rakouských Alp a Sibíře). Všichni jedinci měli stejnou ploidii, odpovídající publikovaným počtům ( $2n = 46$ ; Dostál 1984, Wagner 1992, Stoor et al. 1996), ale jednotlivé základní druhy se lišily absolutní velikostí genomu (obr.č. 15).



**Obr.č. 15:** Histogram simultánní analýzy absolutních velikostí genomů 4 středoevropských druhů plavuníků:  
A - *D. alpinum* (CV 2,06 %),      B - *D. complanatum* (CV 1,97 %),  
C - *D. zeilleri* (CV 1,65 %),      D - *D. tristachyum* (CV 1,7 %).

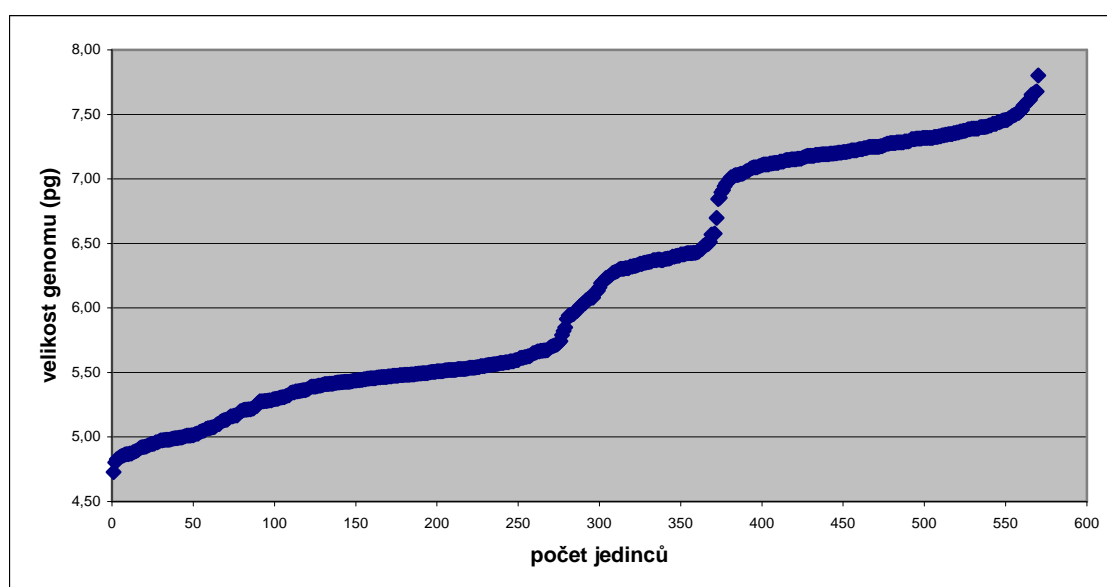
Koeficient variance (CV) všech, do analýz, zahrnutých histogramů nepřesahoval 6 % (0,91 – 5,87 %; průměrné CV = 2,89 %, směrodatná odchylka =  $\pm 0,76$ ). 2C hodnoty absolutních velikostí genomů všech vzorků se pohybovaly od 4,73 pg do 7,80 pg (viz. tab.č. 4 na str. 43). Nejmenších hodnot dosahovali jedinci druhu *D. tristachyum*, kde se hodnota absolutní velikosti genomu (2C) pohybovala v rozmezí 4,73 pg – 5,31 pg. Naopak nejvyšší absolutní velikost genomu připadla druhu *D. alpinum* s hodnotami v rozmezí 6,70 pg až 7,80 pg. U nás nejčastěji se vyskytující druh *D. complanatum* měl absolutní velikost genomu v rozmezí 5,01 pg – 5,95 pg. Avšak absolutní velikost jeho genomu se ztrácela ve škále hodnot velikostí genomů všech tří udávaných vedlejších druhů (*D. issleri*, *D. oellgaardii* a *D. zeilleri*). Výhodou rozlišení *D. complanatum* byly jeho unikátní morfologické znaky. Hodnoty jejich absolutních velikostí genomů se vždy pohybovaly mezi velikostmi svých rodičů, avšak s určitým překryvem. Nejmenších velikostí dosahoval druh *D. zeilleri* (*D. complanatum*  $\times$  *D. tristachyum*) s hodnotami mezi 5,00 pg – 5,39 pg. Absolutní velikosti genomů druhů *D. issleri* (*D. alpinum*  $\times$  *D. complanatum*; 5,91 pg – 6,57 pg) a *D. oellgaardii* (*D. alpinum*  $\times$  *D. tristachyum*; 6,02 pg– 6,58 pg) se vzájemně překrývaly. Taktéž se překrývaly hraniční hodnoty velikostí genomů druhů

základních s jejich kříženci. Vznikla tedy kontinuální škála velikostí genomů s neurčitelnými hranicemi mezi jednotlivými druhy (obr.č. 16a,b).

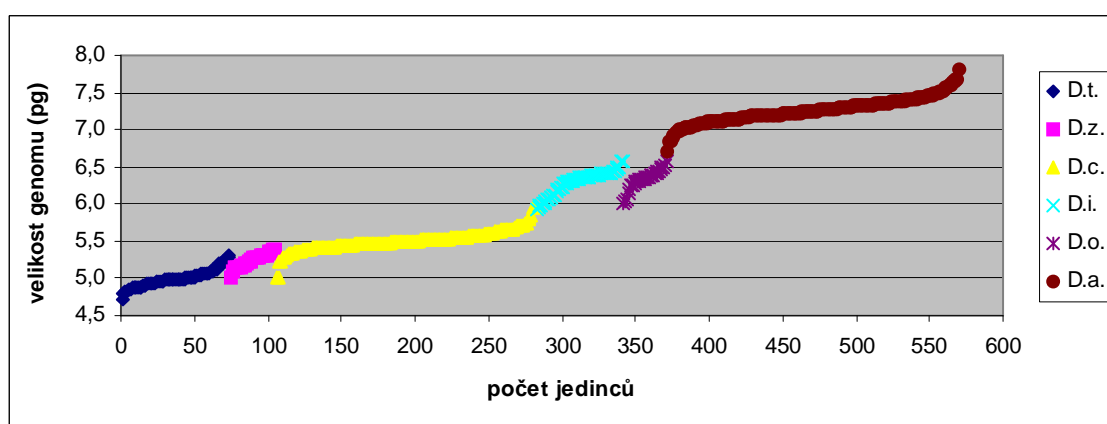
**Tab.č. 4:** Absolutní velikosti genomů pro jednotlivé druhy (s. d. - směrodatná odchylka) včetně počtu analyzovaných rostlin.

druh	počet analyzovaných rostlin	průměrná 2C hodnota (pg) ± S.D.	rozsah 2C hodnot (pg)
<i>D. tristachyum</i>	74	5,00 ± 0,12	4,73 – 5,31
<i>D. zeileri</i> <sup>*)</sup>	31	5,25 ± 0,09	5,00 – 5,39
<i>D. complanatum</i>	177	5,51 ± 0,13	5,01 – 5,95
<i>D. issleri</i>	59	6,29 ± 0,16	5,91 – 6,57
<i>D. oellgaardii</i>	30	6,33 ± 0,14	6,02 – 6,58
<i>D. alpinum</i>	199	7,26 ± 0,17	6,70 – 7,80

<sup>\*)</sup> Obzvlášť plynulý přechod byl mezi druhy *D. tristachyum* a *D. zeileri*, hranice jejich absolutních velikostí genomů byly proto stanoveny arbitrárně a také uvedený počet analyzovaných jedinců tak nemusí být pro tyto dva druhy zcela přesný.



**Obr.č. 16a:** Kontinuální škála vynesení absolutních velikostí genomů jednotlivých rostlin.



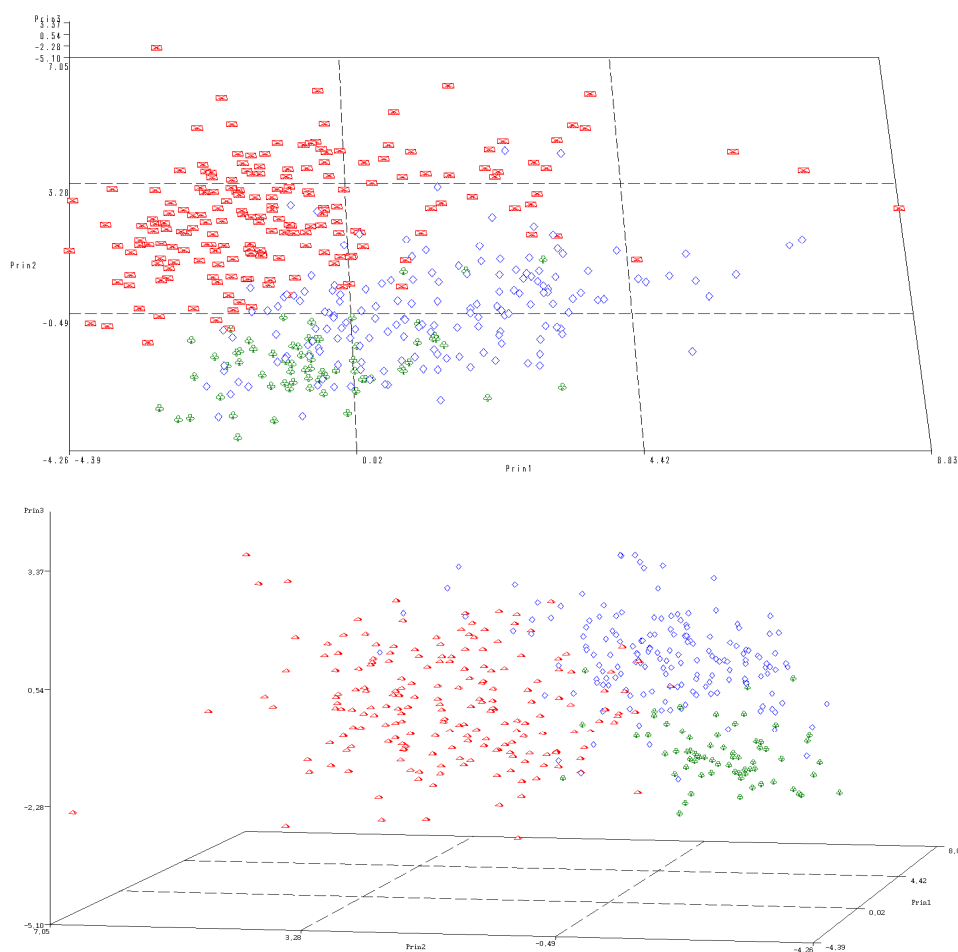
**Obr.č. 16b:** Stejná škála absolutních velikostí genomů rozdělená po jednotlivých druzích.




## 5.2 Klasická morfometrická analýza

### 5.2.1 Klasická morfometrika prýtů

Morfometrickým analýzám bylo celkem podrobena 553 rostlin, u nichž byla předtím stanovena absolutní velikost genomu. Bylo naměřeno celkem 16 znaků na sterilních prýtech. Měření probíhala vždy na třech po sobě jdoucích řadách listů za účelem odfiltrování variability v rámci jedince. Naměřené hodnoty proto byly před samotnými analýzami zprůměrovány. První analýzou bylo otestování korelace mezi všemi znaky v datovém souboru. U žádné dvojice znaků nebyly zjištěny hodnoty korelačních koeficientů vyšší než 95% (0,95). Proto nebyly žádné znaky z analýz vyloučeny.

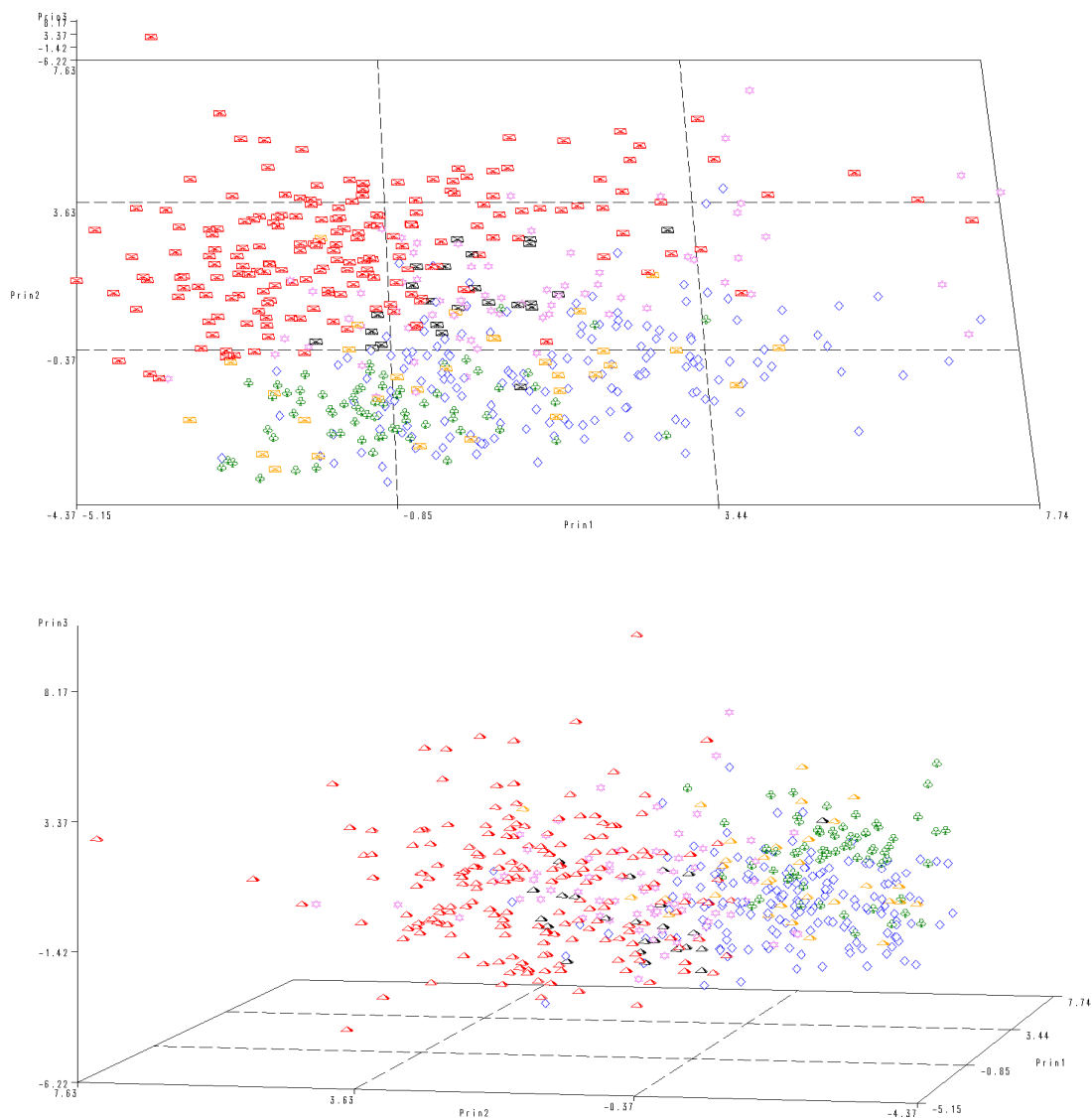
Z výsledků analýzy hlavních komponent (PCA) celého datového souboru, včetně přidáných poměrových znaků (všech měřených jedinců) byla patrná určitá struktura, ale jednotlivé skupiny se, stejně jako u průtokové cytometrie, výrazně překrývaly. Byly zde vidět určité tendence k oddělení základních druhů (zejména druhu *D. alpinum*), které se jen mírně překrývaly (obr.č. 17).









**Obr.č. 17:** Diagram analýzy PCA základních druhů. První tři osy vysvětlují 70 % celkové variability souboru (1. osa vysvětluje 30 %, 2. osa 29% a 3. osa představuje 11 %).  *D. alpinum*,  *D. complanatum*,  *D. tristachyum*.

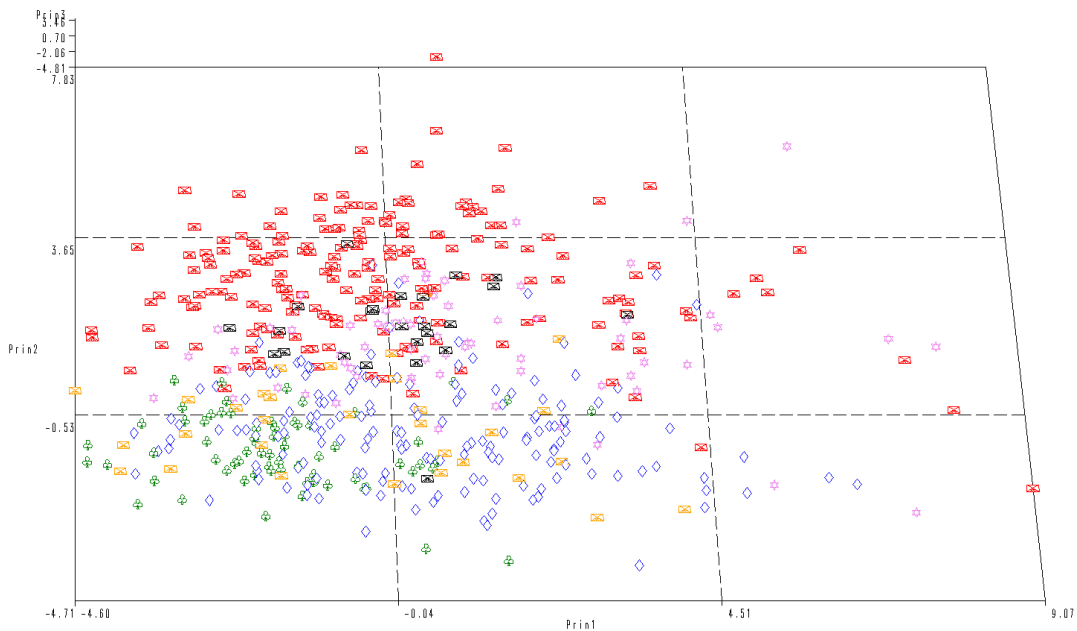


Hranice však rozmazávaly vedlejší druhy, jejichž distribuce nenesla jasné pattern (obr.č. 18a,b, 19 a 20 na str. 45 - 46). Celkově první tři komponentní osy vysvětlily 56,9 % variability (první hlavní komponenta vysvětlila 22,9 %, druhá téměř 19,8 % a třetí 14,2 %). K takto vysokému číslu pravděpodobně mohl přispět i malý počet měřených znaků.

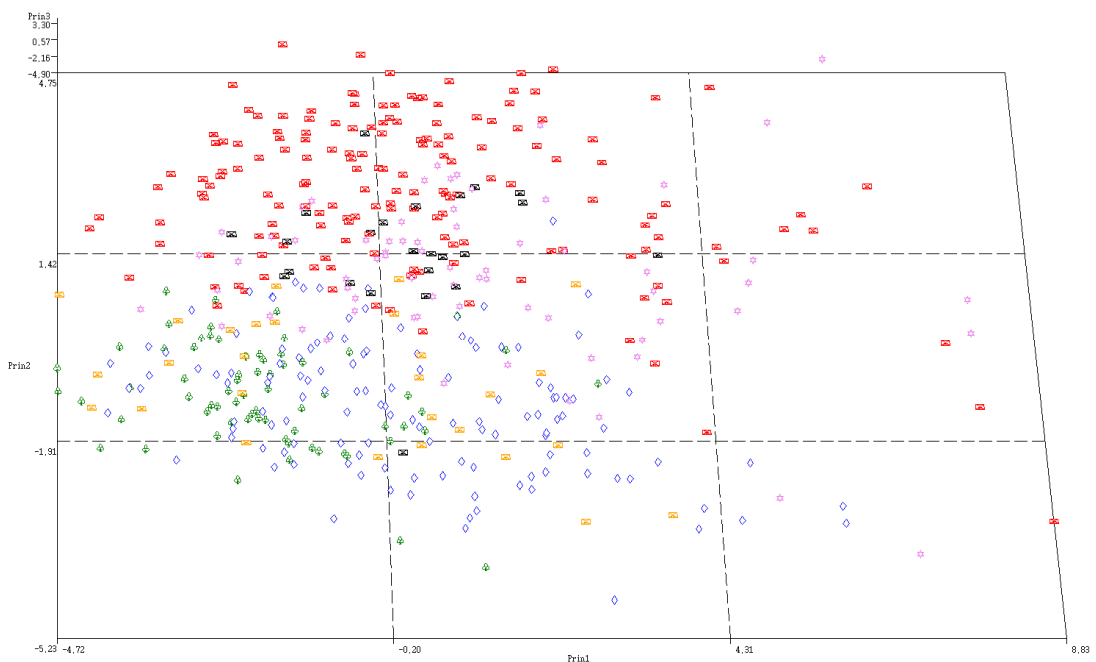


**Obr.č. 18a, b:** Diagram analýzy PCA celého datového souboru všech 25 znaků na prýtech První tři osy celkem vysvětlily 57 % variability (1. osa znázornila 23 %, 2. osa 20 % a třetí osa 14 %). Základní druhy jsou částečně oddělené, ale druhy vedlejší tyto hranice smývají.

- |   |   |   |
|---|---|---|
|  <i>D. alpinum</i> |  <i>D. complanatum</i> |  <i>D. tristachyum</i> |
|  <i>D. issleri</i> |  <i>D. oellgaardii</i> |  <i>D. zeileri</i>     |



**Obr.č. 19:** Diagram analýzy PCA celého datového souboru, ale pouze prvních 16-ti morfologických znaků. První tři kanonické osy vysvětlily téměř 69 % celkové variability (1. osa 31 %, 2. osa 27 % a 3. osa 11 %). Na obrázku je znázorněno rozložení druhů podle 1. a 2. osy.

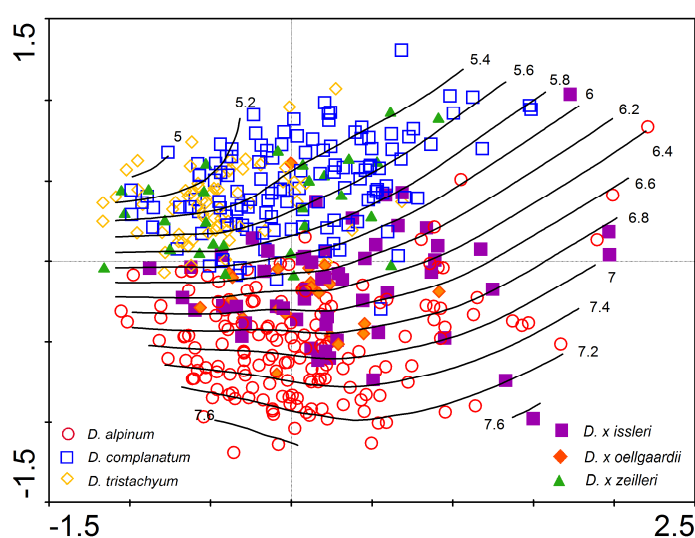


**Obr.č. 20:** Výstup analýzy PCA souboru dat jedinců ze střední Evropy. První tři osy nesly 72 % celkové variability datového souboru (1. kanonická osa vysvětlila přibližně 34 %, 2. osa 27 % a 3. osa 11 %). Diagram zobrazuje rozložení druhů na 1. a 2. ose.

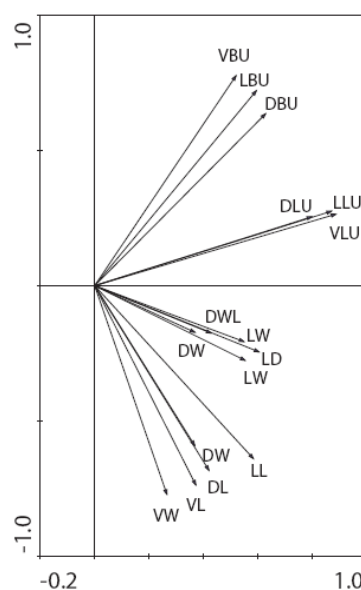
Nejdůležitějšími znaky oddělujícími druhy podle první osy byly vzdálenosti 2 pater břišních (v5) a postranních listů (v9) od sebe (tzn. špička až báze vyššího) a také vzdálenost špiček 2 pater postranních listů (v7) od sebe. Tato osa nejlépe oddělila *D. complanatum*, které má tyto vzdálenosti největší. S druhou komponentou nejvíce souvisely znaky týkající se délky listů

břišních (v2), postranních (v6) a hřbetních (v12). Tyto znaky oddělily zejména *D. alpinum* (u něj byly naměřené hodnoty převážně záporné – docházelo k překryvu listů) od ostatních druhů. Znaky nejvíce související se třetí osou byly šířka prýtu v nejširším místě hřbetního lístku (v16) a šířka prýtu bez šířky břišního listu (v24). Nejlépe oddělené těmito znaky bylo *D. tristachyum*, které má prýt nejtenčí, od druhů *D. alpinum* a *D. complanatum* s prýtem nejširším.

Dalším krokem byla aplikace lokálně regresního modelu Loess smoother na výsledky analýzy hlavních komponent souboru dat ze střední Evropy, kdy na diagram PCA byly promítnuty absolutní velikosti genomů jednotlivých druhů. Na tomto „vrstevnicovém“ výstupu bylo patrné zvyšování hodnot absolutních velikostí genomů od druhu *D. tristachyum* až k *D. alpinum*, jež má genom největší (obr.č. 21, 22) .

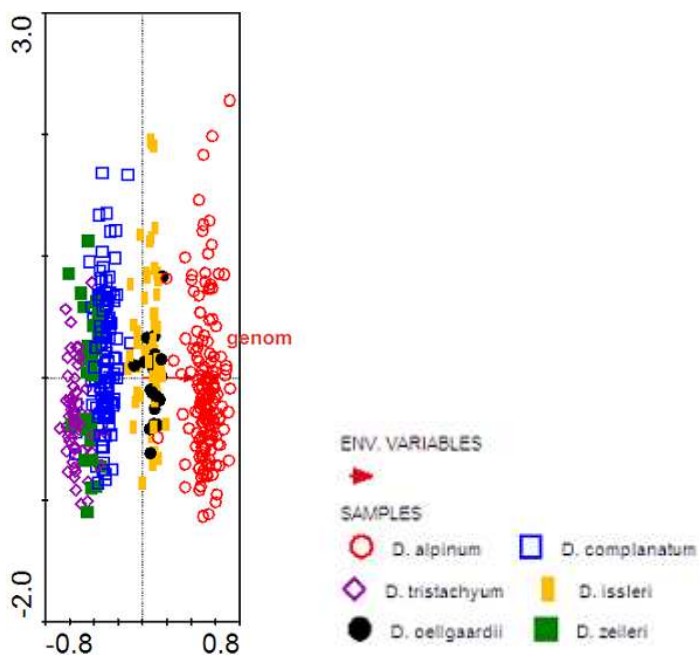


**Obr.č. 21:** Lokálně regresní model (Loess smoother) aplikovaný na výstup analýzy hlavních komponent datového souboru střední Evropy (v programu CANOCO). Na diagram analýzy PCA jsou fitovány absolutní velikosti genomů. Je zde patrná tendence k růstu velikosti genomu směrem od *D. tristachyum* až k druhu *D. alpinum*.



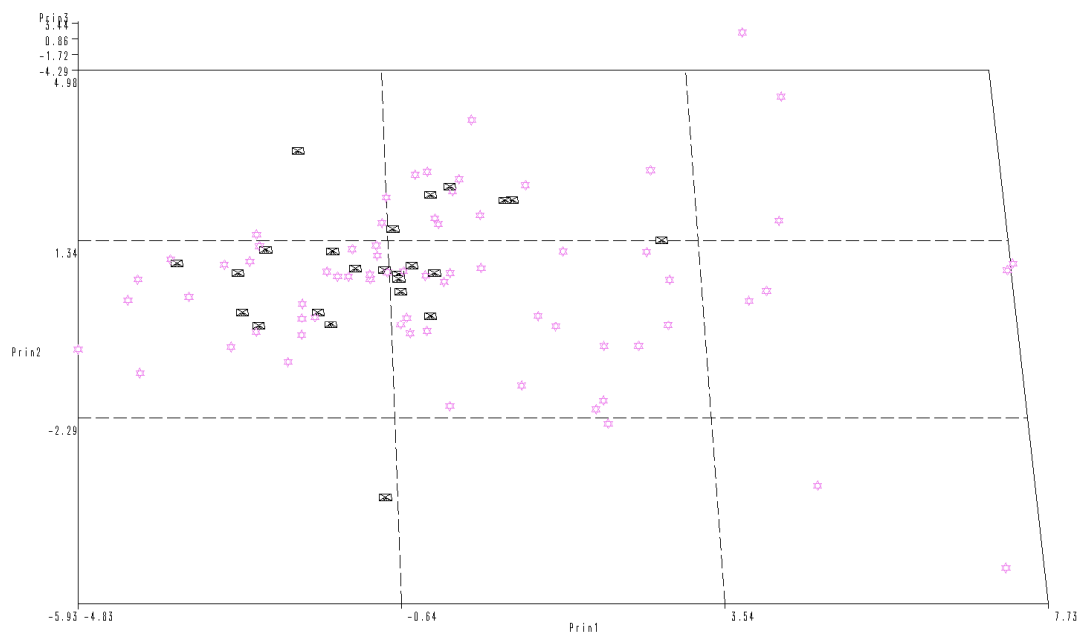
**Obr.č. 22:** Na diagram PCA souboru jedinců ze střední Evropy byly vyneseny tendence změn morfologických znaků jednotlivých druhů (popisky znaků jsou uvedeny v tab.č. 2a na str. 36).

Dalším přístupem ověřujícím vliv velikosti genomu na morfologii rostlin byla tzv. redundanční analýza (RDA) neboli analýza hlavních komponent s omezením. Na první ordinační ose byla zobrazena velikost genomu a druhá osa vyjadřovala všechny ostatní morfologické charakteristiky. Z diagramu bylo zřejmé, že morfologie jasně souvisí s velikostí genomu (**obr.č. 23 na str. 48**).



**Obr.č. 23:** Výstup omezené analýzy hlavních komponent – RDA. První ordinační osa zobrazuje velikost genomu a druhá osa nese informaci o všech morfologických charakteristikách jednotlivých druhů. Je zde vidět jasné vymezení hlavních druhů a vedlejší druhy jsou lokalizovány mezi svými rodiči, se kterými se částečně překrývají.

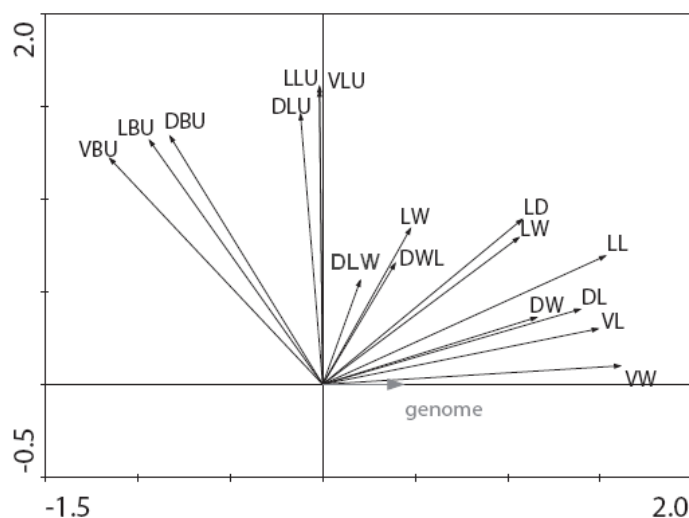
Základní druhy zde byly zřetelně oddělené a vedlejší druhy byly lokalizovány mezi svými rodiči. Problémem byly, stejně jako v analýze hlavních komponent, vzájemně se překrývající druhy *D. issleri* a *D. oellgaardii* (obr.č. 24).



**Obr.č. 24:** Výstup analýzy hlavních komponent souboru jedinců druhů *D. issleri* ☆ a *D. oellgaardii* ◼. První tři komponentní osy vysvětlily 67 % celkové variability (s 1. osou souviselo 40 % variability, s 2. osou 17 % a se 3. osou 10%). Na diagramu prvních dvou os je patrné prolínání obou hybridních druhů.

S velikostí genomu nejvíce souvisely tyto znaky: šířka břišních listů (v4, VW), celková délka všech tří typů listů (břišních v2, VL, hřbetních v12, DL i postranních v6, LL), šířka hřbetních listů v14 (DW), šířka mezi pažďmi postranních listů v10 (LW) a vzdálenost mezi špičkami postranních listů v11 (LD). Žádnou souvislost s velikostí genomu neměly vzdálenosti špiček břišních listů od báze listů o patro výše postavených v5 (VBU) a vzdálenosti špiček 2 po sobě jdoucích pater břišních v3 (VLU) a postranních v7 (LLU) listů od sebe. Tyto znaky souvisely s druhou ordinační osou vyjadřující morfologické odlišení druhů. Záporně korelované s velikostí genomu byly vzdálenosti špiček dvou po sobě jdoucích řadách listů hřbetních v13 (DLU) a vzdálenosti od špiček k bázím výše postavených listů břišních v5 (VBU), hřbetních v15 (DBU) i postranních v9 (LBU, obr.č. 25).

Z výše uvedených skutečností vyplynulo, že znaky nejvíce přispívající k vysvětlení variability na prvních 3 hlavních komponentních osách (vzdálenosti mezi lístky, šířka prýtu) téměř nesouvisí s velikostí genomu.

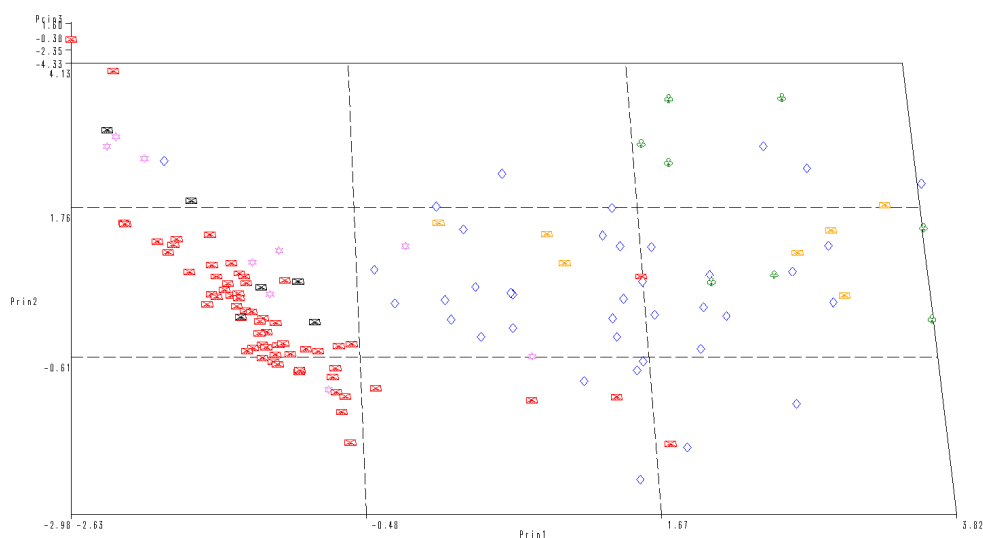


**Obr.č. 25:** RDA zobrazující velikost genomu na jedné ordinační ose a morfologii popisující znaky na ose druhé (vysvětlení zkratk jednotlivých znaků je v uvedeno v tab.č. 2a na str. 36). Nejvíce souvisí s velikostí genomu znaky týkající se délky a šířky listů.

### 5.2.2 Klasická morfometrika sporofylů

Do analýz hlavních komponent morfometrických měření sporofylů bylo zahrnuto 130 výtrusnicových klasů. Bylo měřeno 7 kvantitativních znaků, z toho 5 na samotném klasu a 2 znaky se týkaly výtrusnicových listů. Hlavní tři komponenty PCA vyjádřily téměř 76 % celkové variability datového souboru. 1. osa vyjadřovala necelých 42 % celkové variability, 2. osa 22 % a 3. osa 12 %. S první osou nejvíce souvisely znaky týkající se přisedlosti / stopkatosti výtrusnicového klasu (obr.č. 26 na str. 50). To odpovídalo také charakteristikám z determináčních klíčů. Jednalo se o znaky: délka stopky po 1. větvení (v2), vzdálenost od

1. větvení po výtrusnici (v4) a počet větvení (v5). S druhou hlavní komponentou nejvíce souvisela délka výtrusnicového klasu v3 a šířka šupin ve středu klasu v7. Se třetí osou byla nejvíce korelována šířka výtrusnicového klasu v6. První a druhá hlavní komponenta částečně oddělily všechny základní druhy, nejlépe však *D. alpinum*, jež má výtrusnicové klasy přisedlé. *D. issleri* a *D. oellgaardii* se nacházely mezi *D. complanatum* a *D. alpinum*, ale blíže k *D. alpinum*, se kterým se zejména *D. issleri* částečně prolínalo (to odpovídá také terénnímu pozorování). Jejich výtrusnicové klasy mohou být přisedlé i odstálé. *D. zeilleri*, se stopkatými výtrusnicemi, se vyskytovalo mezi *D. complanatum* a *D. tristachyum* s částečným překryvem. Z toho vyplynulo, že také znaky na sporofylech pomáhají k určení jednotlivých, alespoň základních, druhů plavuníků. Po odstranění vlivu přisedlosti vyjadřovaly hlavní tři komponenty 76 % celkové variability. První osa vyjadřovala 38 % celkové variability, 2. osa 22 % a 3. osa vyjadřovala 16 %. S první hlavní komponentou nejvíce souvisely znaky týkající se samotných výtrusnicových listů, a sice šířka (v5) a délka (v6) šupin ve středu. Znak týkající se počtu větvení (v3) nejvíce koreloval s 2. hlavní osou. Obě osy částečně oddělily základní druhy. *D. complanatum* je charakteristické široce vejčitými sporofyly ostře zúženými v krátkou špičku, *D. tristachyum* má sporofyly náhle zúžené v dlouho špičku a *D. alpinum* je charakteristické vejčitě kopinatými výtrusnicovými listy, které se pozvolna zužují v tupou špičku a jsou asi 2x delší než sporangium. Druhově charakteristický je také počet výtrusnicových klasů na stopce. U druhů *D. complanatum* a *D. tristachyum* se vyskytují 2 – 4, zatímco u druhu *D. alpinum* jsou sporangia jednotlivá. U vedlejších druhů není počet větvení vždy jednoznačný. Například u *D. issleri* a *D. oellgaardii* mohou být sporangia jak jednotlivá, tak i po 2 na stopce. Se 3. hlavní komponentou nejvíce souvisela šířka výtrusnice (v4), která však nemá pravděpodobně vůbec vliv na rozlišení jednotlivých druhů.



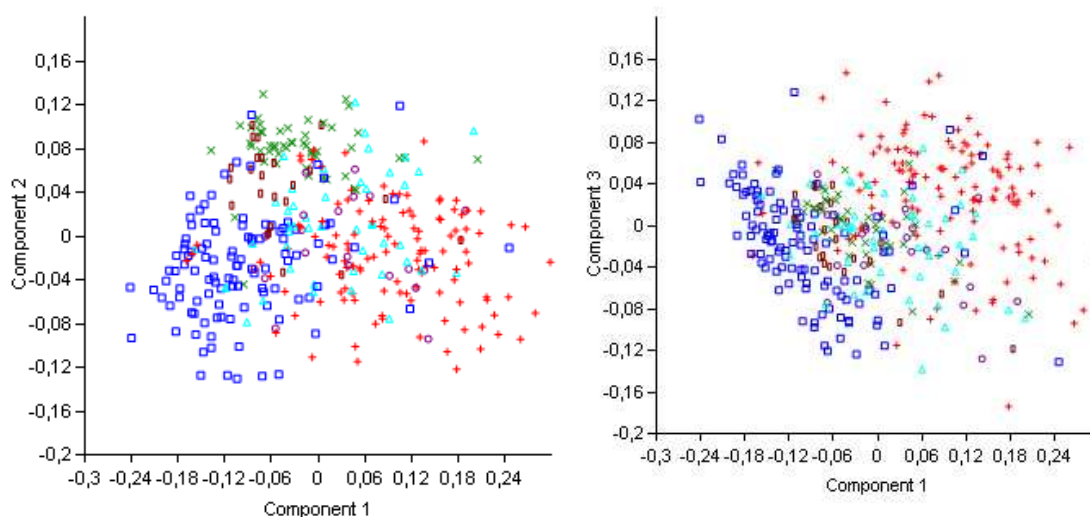
**Obr.č. 26:** Diagram analýzy hlavních komponent výtrusnicových klasů. První 3 osy vysvětlují 76 % celkové variability (z toho 1. osa téměř 42 %, 2. osa 22 % a 3. osa 12 %). Zřetelně oddělené je *D. alpinum*, které má výtrusnicové klasy přisedlé a sporofyly s dlouho tupou špičkou.

■ *D. alpinum*, 
 ◆ *D. complanatum*, 
 + *D. tristachyum*, 
 ☆ *D. issleri*, 
 ▭ *D. oellgaardii*, 
 ▭ *D. zeilleri*

## 5.3 Geometrická morfometrická analýza

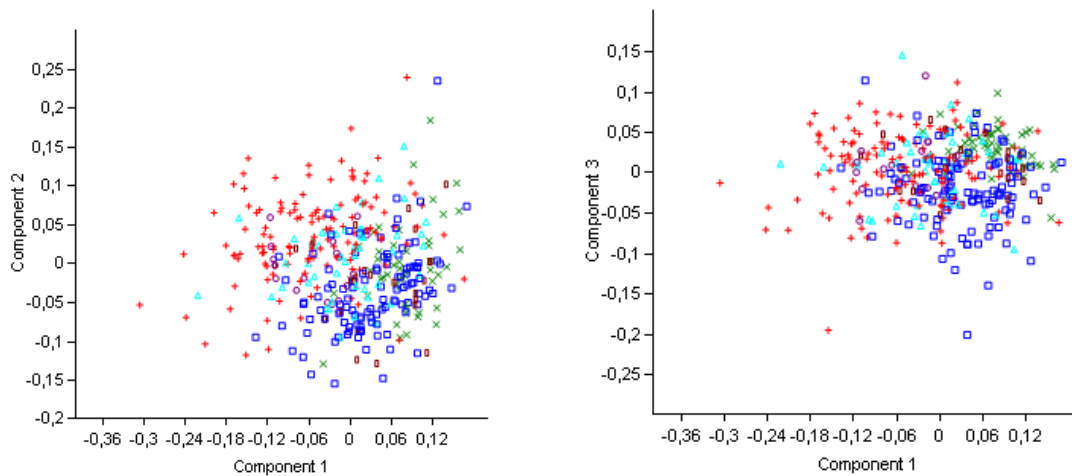
### 5.3.1 Geometrická morfometrika prýtů

Geometrická morfometrika byla provedena na 373 vyfocených sterilních prýtech. Celkem bylo vytipováno 37 landmarků (7 pevných a 30 tzv. semilandmarků), a to jak na straně břišní, tak na straně hřbetní. Po superimpozici landmarků prokrustovskou analýzou byla provedena analýza relativních warpů (RWA). Pozice získaných souřadnic jednotlivých landmarků byly dále znázorněny pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Stejně jako v klasické morfometrice nevykazovala ani tato data výraznější tendenci k separaci jednotlivých druhů (obr.č. 27a,b, 28 na str. 51 - 52). Respektive byl zde jistý náznak oddělení základních druhů, avšak přimíchání druhů vedlejších toto pattern výrazně rozmazalo. První tři osy (relativní warpy) vysvětlovaly 68 % celkové variability na břišní straně prýtu (1. osa vysvětlovala 46 %, 2. osa 12 % a 3. osa 10 %). Na hřbetní straně prýtu vysvětlovaly hlavní komponenty variability o něco méně, a sice 65 % (1. osa vysvětlovala 35 %, 2. osa 19 % a 3. osa 11 %). První komponentní osy vyjadřující nejvíce variability v obou datových souborech částečně oddělily základní druhy od sebe. Vedlejší druhy se vyskytovaly mezi svými rodičovskými kombinacemi, avšak nebyly dobře oddělené. Druhy *D. issleri* a *D. oellgaardii* byly, stejně jako v předchozích případech v klasické morfometrice i průtokové cytometrii, vzájemně zcela překrývaly.

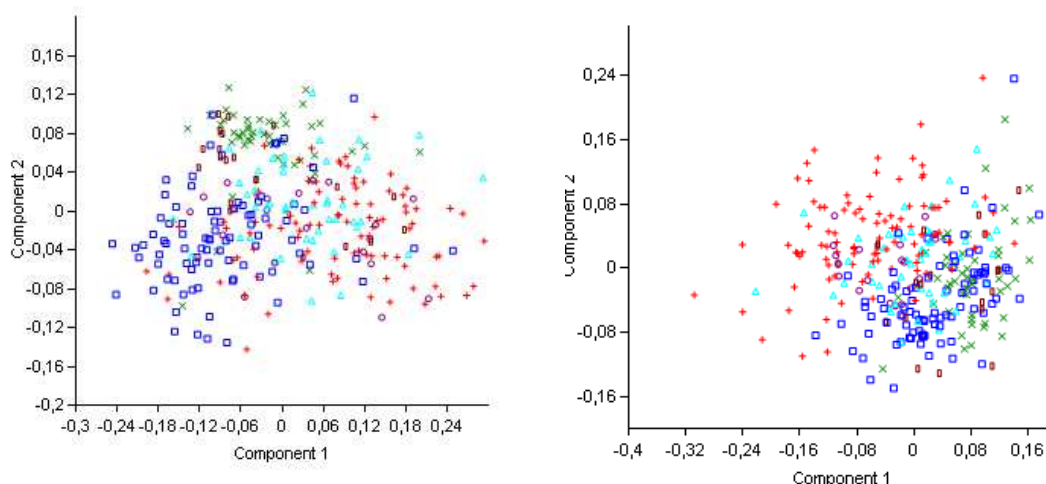


**Obr.č. 27a:** Výstup analýzy relativních warpů (RWA) celého datového souboru břišních stran prýtů. První 3 komponentní osy vysvětlily 68 % celkové variability (1. osa vysvětlila 46 %, 2. osa 12 % a 3. osa 10 %). Na pravém diagramu je zobrazeno rozložení druhů dle 1. a 2. komponentní osy a vlevo jsou druhy rozloženy podle 1. a 3. osy.

+ *D. alpinum*, □ *D. complanatum*, × *D. tristachyum*, △ *D. issleri*, ○ *D. zeilleri*, ■ *D. oellgaardii*



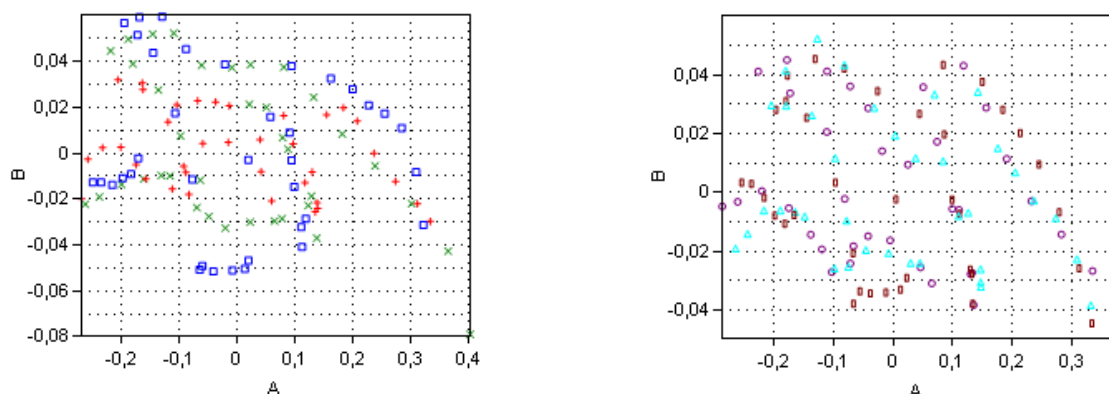
**Obr.č. 27b:** Výstup analýzy relativních warpů celého datového souboru hřbetních stran prýtů. První tři komponentní osy vysvětlily 65% variability (1. osa vysvětlila 35 %, 2. osa 19 % a 3. osa 11 %).



**Obr.č. 28:** Diagram analýzy relativních warpů souboru dat břišních (vlevo) a hřbetních (vpravo) stran prýtů jedinců ze střední Evropy. První tři komponentní osy pro břišní stranu vysvětlily 68 % variability (1. osa 46 %, 2. osa 12 % a 3. osa 10 %), pro hřbetní stranu vysvětlily první tři osy 65 % variability (1. osa vyjádřila 35 %, 2. osa 19 % a 3. osa 11 %). Z diagramu je zřejmé lepší rozlišení druhů na základě břišní strany prýtu.

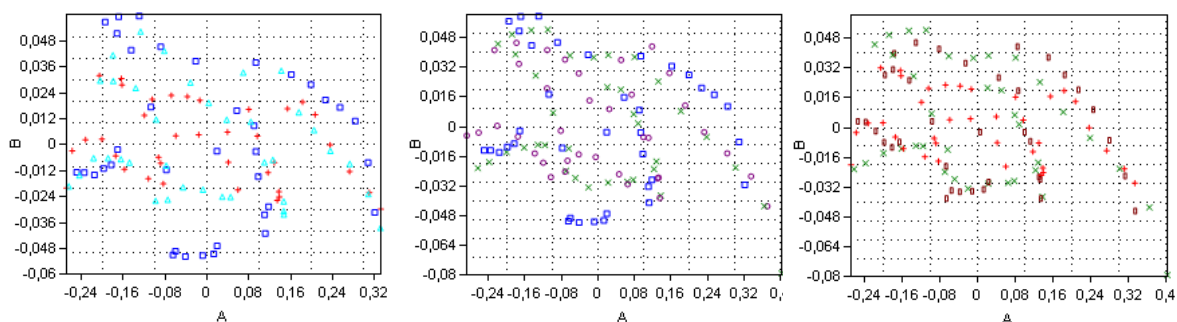
Po prokrustovské analýze objektů byly získány informace o poloze vzájemné poloze a překryvu všech landmarků a semilandmarků („aligned specimen“) pro každého jedince. Na výstupech jejich vizualizace (XY plot) byl vidět určitý posun mezi jednotlivými druhy, ale také v rámci druhů. Vznikl tak celkem nepřehledný diagram. Pro názornost byl proto vybrán pouze jeden jedinec od každého druhu (obr.č. 29a, b na str. 53). Na hřbetní straně nebyl rozdíl mezi jednotlivými druhy tak patrný, jako na straně břišní.





**Obr.č. 29a:** XY plot souřadnic landmarků a semilandmarků na 2 řadách listů břišních stran prýtlů jednotlivých druhů. Vlevo je diagram znázorňující morfologii základních druhů a vpravo diagram znázorňující vedlejší druhy.

+ *D. alpinum*, □ *D. complanatum*, × *D. tristachyum*, △ *D. issleri*, ○ *D. zeilleri*, ■ *D. oellgaardii*



**Obr.č. 29b:** XY ploty pozic landmarků a semilandmarků znázorňující tvar 2 řad listů na břišní straně prýtlů různých kombinací (rodičovských a vedlejších) druhů.

**Vlevo:** kombinace druhů *D. alpinum* (+), *D. complanatum* (□) a *D. issleri* (△)

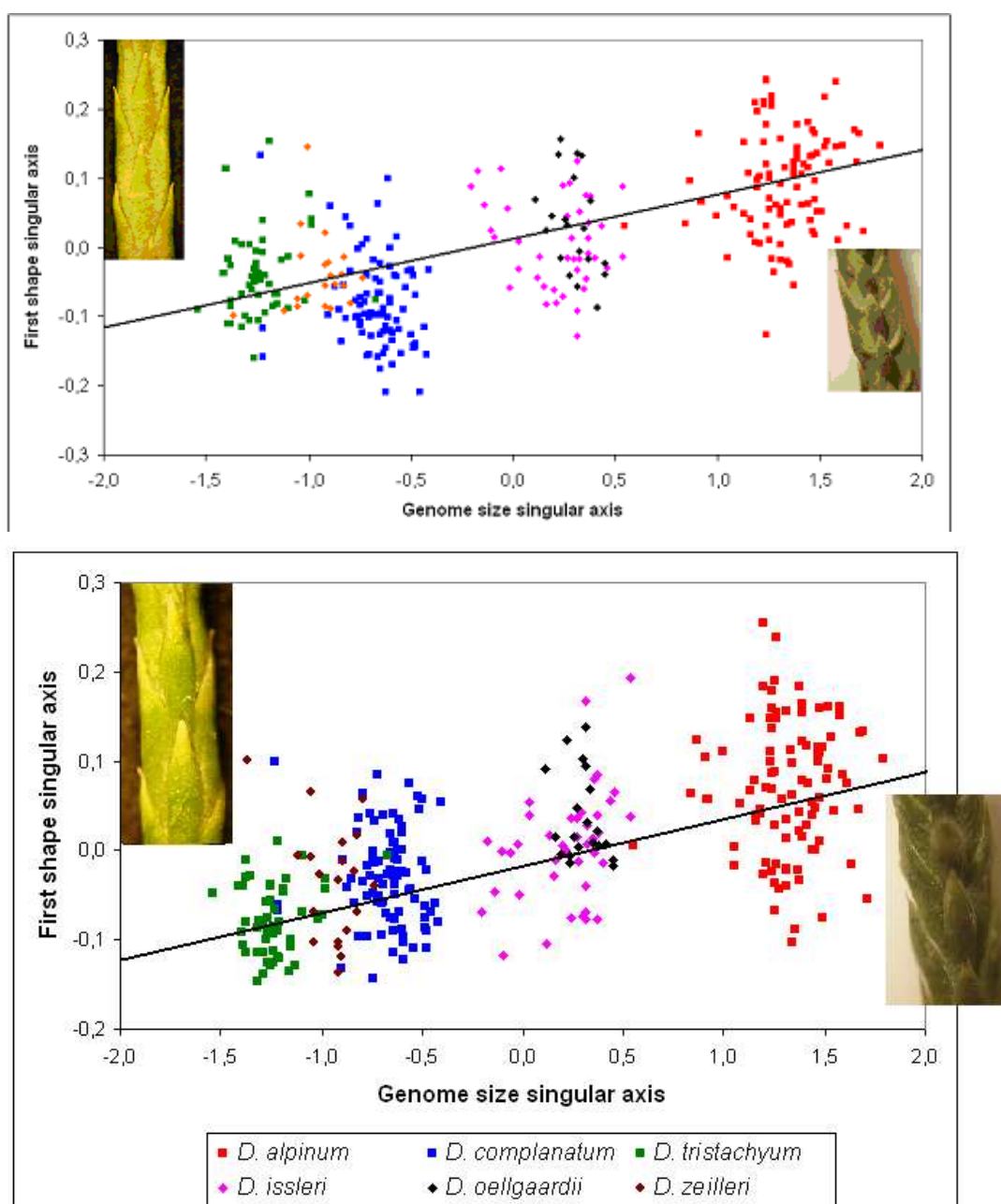
**Uprostřed:** kombinace druhů *D. complanatum* (□), *D. tristachyum* (×) a *D. zeilleri* (○)

**Vpravo:** kombinace druhů *D. alpinum* (+), *D. tristachyum* (×) a *D. oellgaardii* (■).

Analýzou relativních warpů byly získány informace o těžištích objektů, tzv. centroid size. Tyto hodnoty se mění lineárně s morfologickými charakteristikami. Po otestování závislosti mezi centroid size a absolutními velikostmi genomů vyšla slabá negativní korelace (pro břišní stranu  $r = 0.18$ ,  $p = 0.001$  a pro hřbetní stranu  $r = 0.17$ ,  $p < 0.01$ ). Z toho vyplývá, že čím větší je velikost genomu, tím menší jsou rostliny. Toto tvrzení odpovídá skutečnosti, kdy *D. alpinum* s největším genomem je rostlinou nejkompaktnější a nejdrobnější.

Pro otestování souvislosti morfologie s velikostí genomu byla provedena tzv. PLS analýza, kdy první dvě osy tvaroprostoru vysvětlily největší kovarianci mezi datovými soubory (souřadnicemi landmarků a velikostí genomů). Byla prokázána signifikantní korelace mezi první singularní osou související s morfologií a první singularní osou značící velikost genomu pro obě

strany prýtu, břišní i hřbetní (PLS,  $r = 0.67$ ;  $p = 0.01$  pro břišní a  $r = 0.65$ ;  $p = 0.01$  pro hřbetní stranu). Výsledky PLS analýzy na diagramu byly stejné, jako u RDA v klasické morfometrice (obr.č. 30 a,b). Tedy, základní druhy byly jasně oddělené a vedlejší druhy byly umístěny mezi nimi. *D. zeilleri* se částečně překrývalo s oběma rodiči. *D. issleri* a *D. oellgaardii* tvořily jeden společný shluk, avšak s rodičovskými druhy se nepřekrývaly. Dále byly rekonstruovány vektory změn jednotlivých landmarků směrem od druhu s nejmenší velikostí genomu, tedy od *D. tristachyum* ke druhu s genomem největším, tedy k *D. alpinum* (obr.č. 31 a,b na str. 55). Byla zde patrná tendence ke zmenšení všech listů a zkrácení vzdáleností mezi nimi (opět odpovídající popisu těchto taxonů a terénnímu pozorování).



**Obr. č. 30 a, b:** Výstup PLS analýzy kovariance souřadnic landmarků (tedy morfologie) s absolutní velikostí genomu v datovém souboru jedinců ze střední Evropy. Na okrajích grafů jsou znázorněni extrémní jedinci (*D. tristachyum* vlevo a *D. alpinum* vpravo). Horní graf ukazuje tendence na břišní straně prýtu a spodní tendence na straně hřbetní.



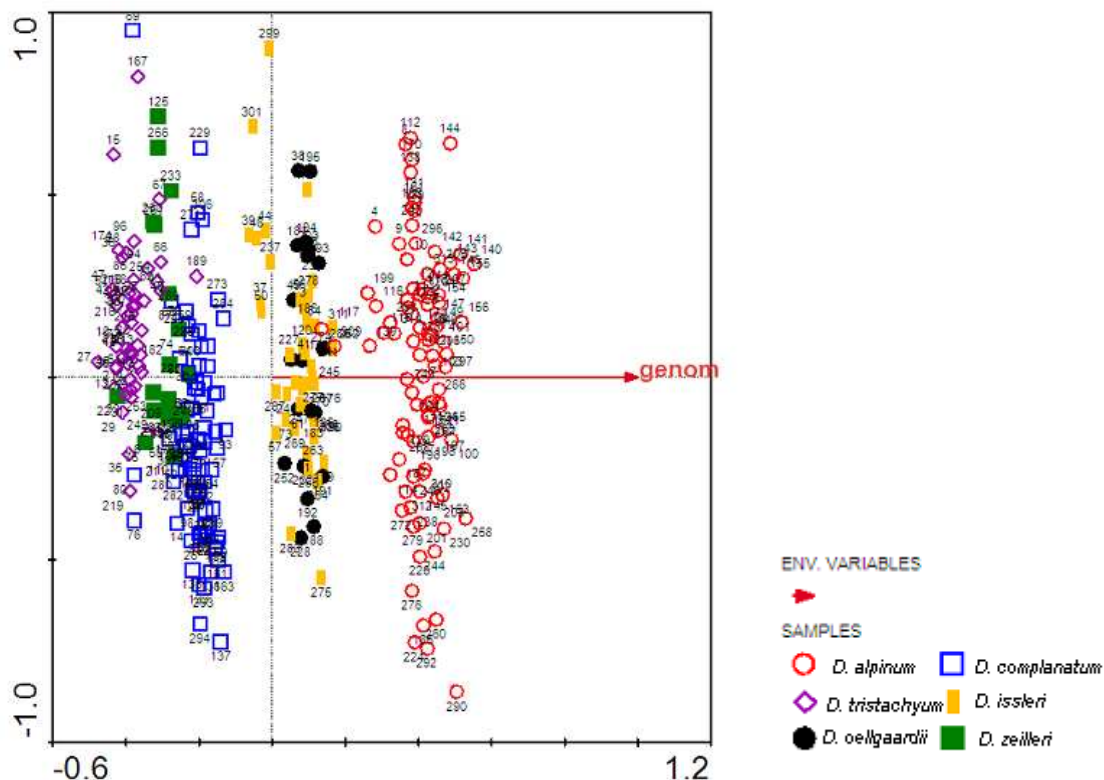
**Obr.č. 31a:** Rekonstrukce vektorů změn jednotlivých landmarků směrem od druhu s nejmenším genomem (*D. tristachyum*) k průměrnému tvaru – na břišní straně (nahore) a na straně hřbetní (dole).



**Obr.č. 31b:** Rekonstrukce vektorů změn jednotlivých landmarků směrem od druhu s největším genomem (*D. alpinum*) k průměrnému tvaru – na břišní straně (nahore) a na straně hřbetní (dole).

Dále byly testována kovariance mezi datovými soubory břišní a hřbetní strany. První tři osy vysvětlily 98,4 % kovariance mezi oběma datovými soubory (z toho 1. osa vysvětlila 82 % s korelačním koeficientem 0.73), tzn. mezi břišní a hřbetní stranou byla na všech třech osách vysoce průkazná kovariance.

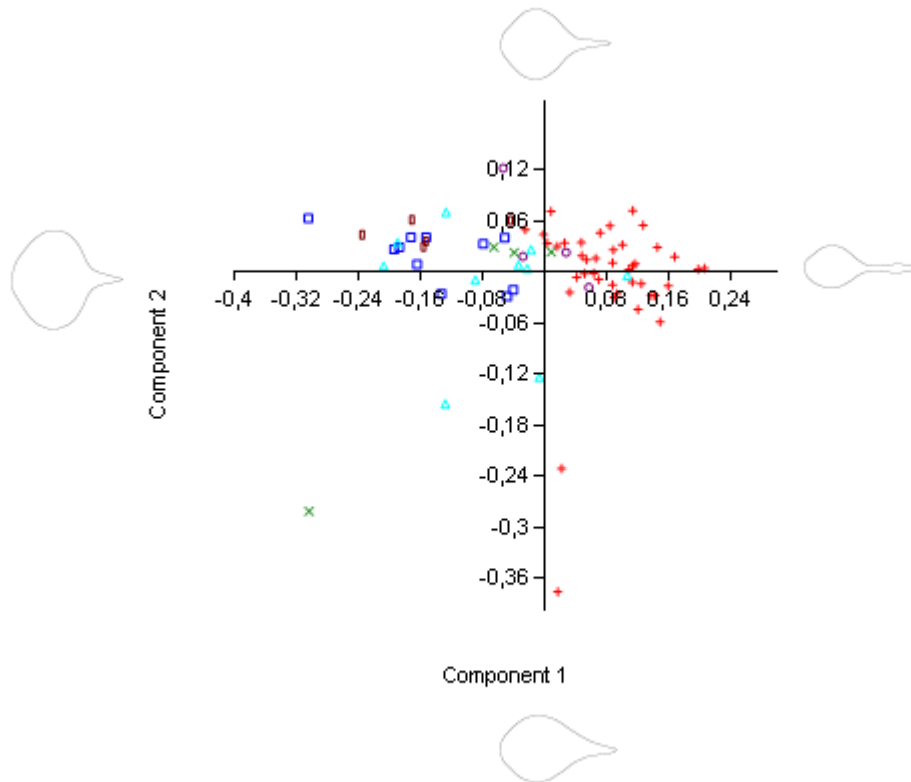
Dalším přístupem testujícím vliv velikosti genomu na morfologii byla RDA, kde první osa odpovídala velikosti genomu a na druhé ose byly znázorněny morfologické charakteristiky (obr.č. 32 na str. 56). Stejně jako v analýze klasické morfometriky, i zde byla vidět jasná souvislost velikosti genomu s morfologií rostlin. Jasně odlišené byly základní druhy. *D. zeilleri* se znovu částečně překrývalo s rodiči. Zbylé dva vedlejší druhy, *D. issleri* a *D. oellgaardii*, sice byly oddělené od rodičovských druhů, nicméně vzájemně se opět zcela překrývaly.



**Obr.č. 32:** Výstup analýzy RDA testující vliv velikosti genomu (1. osa) na morfologické charakteristiky (2. osa). Z diagramu je zřejmá souvislost morfologie jednotlivých druhů s jejich absolutní velikostí genomu.

### 5.3.2 Geometrická morfometrika sporofylů

Obrysová analýza bylo podrobena 75 výtrusnicových listů různých druhů plavuníků. Diagram analýzy hlavních komponent ukázal oddělení druhu *D. alpinum* od druhů ostatních, a to podle první komponentní osy. *D. tristachyum* se nacházelo na rozhraní mezi *D. complanatum* a *D. alpinum*. Patrná byla také tendence ve změně tvaru sporofylů (obr.č. 33 na str. 57). Od široce vejčitých s příkře zúženou krátkou špičkou u druhu *D. complanatum*, přes *D. tristachyum* s výtrusnicovým klasem vejčitým s náhle zúženou dlouhou špičkou až po *D. alpinum* s úzce eliptickými sporofyly pozvolna se zužujícími v dlouhou odstálou špičku. Sporofyly vedlejších druhů byly opět klasifikovány mezi svými rodiči s částečným či úplným překryvem. Výtrusnicové listy druhu *D. oellgaardii* se více blížily k *D. alpinum*. Sporofyly *D. zeileri* byly spíše podobné *D. complanatum*. Výtrusnicové listy druhu *D. issleri* nebyly na komponentních osách jasně vymezené a nacházely se, krom okrajových částí, téměř na celé škále. Podle druhé komponentní osy se měnil tvar od vejčitého s postupně se zužující špičkou až po široce vejčitý se špičkou ostrou a krátkou. Zde by mělo být jasně oddělené *D. complanatum* od *D. alpinum*, avšak kvůli malému množství vzorků nebyla tato tendence patrná.

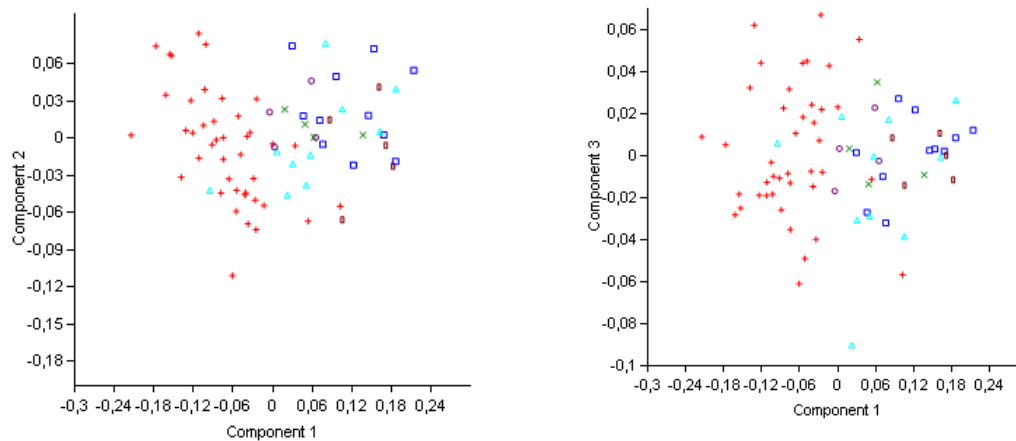


**Obr.č. 33:** Diagram analýzy hlavních komponent výtrusnic. Největší význam pro odlišení druhů měly první dvě komponenty, které jsou znázorněny na diagramu s naznačenými změnami tvarů sporofylů.

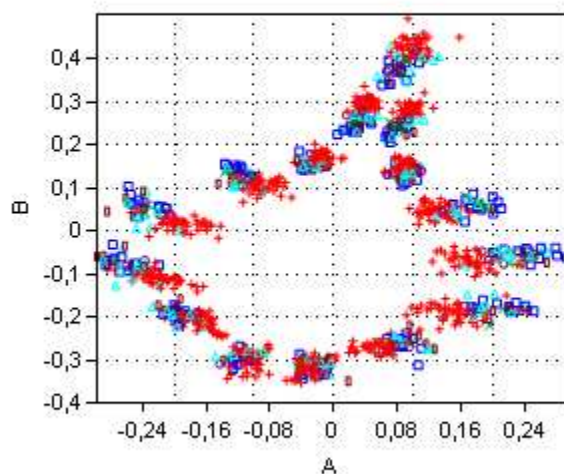
+ *D. alpinum*, ■ *D. complanatum*, × *D. tristachyum*, ▲ *D. issleri*, ○ *D. zeilleri*, ■ *D. oellgaardii*

Na výtrusnicových listech byla také provedena geometrická morfometrika. Bylo vytipováno celkem 15 landmarků, z toho 3 pevné a 12 semilandmarků. Výsledky následné analýzy hlavních komponent byly shodné s výsledky z obrysové analýzy (obr.č. 34 na str. 58). První tři osy vysvětlily necelých 86 % celkové variability, z čehož první osa vysvětlila nejvíce – 60,5 % a byla tedy nejdůležitější pro odlišení druhů. První komponenta celkem dobře vymezila *D. alpinum*, jež dosahovalo na ose záporných hodnot. Ostatní druhy, hlavně ty základní, byly na druhé straně komponenty s kladnými hodnotami. *D. tristachyum* leželo trochu blíže k druhu *D. alpinum*. Pouze *D. issleri* se občas přimíchalo k *D. alpinum*. *D. oellgaardii* se vyskytovalo mezi druhy *D. alpinum* a *D. complanatum*.

Na základě výsledků prokrustovské impozice landmarků byl opět sestaven XY plot zobrazující tendence posunu landmarků a semilandmarků mezi jednotlivými druhy. Výsledky byly shodné s obrysovou analýzou i uváděnými determinačními charakteristikami (obr.č. 35 na str. 58). *D. alpinum* má sporofyly užší s dlouhou špičkou, *D. complanatum* je má naopak široce vejčité s příkře zúženou krátkou špičkou a *D. tristachyum* je charakteristické sporofyly s náhle zúženou dlouhou špičkou.



**Obr.č. 34:** Diagram analýzy relativních warpů výtrusnic. První tři osy vysvětlily 85 % celkové variability (1. osa nesla 69 %, 2. osa 11 % a 3. osa 5%). Patrná je zde tendence k oddělení (podle první osy) *D. alpinum* od ostatních druhů.  
 \* *D. alpinum*, □ *D. complanatum*, × *D. tristachyum*, △ *D. issleri*, ○ *D. zeilleri*, ■ *D. oellgaardii*



**Obr.35:** XY plot zobrazující posuny landmarků a semilandmarků dle morfologických změn výtrusnicových listů mezi jednotlivými druhy. Nejpatrnější je posun od *D. alpinum* (\*) s pozvolnou dlouhou špičkou k *D. complanatum* (□) se široce vejčítým sporofylem.

## 6. Ochrana

Jak již bylo zmíněno, většina střeoevropských zástupců rodu *Diphasiastrum* patří mezi rostliny vzácné a zákonem chráněné (Danton & Baffray 1995, Olivier et al. 1995, Procházka 2001). V České republice je chráněno všech 6 druhů. Dle vyhlášky 395/1992Sb k zákonu č. 114/1992Sb patří do kategorie C1 druh *D. tristachyum*, do kategorie C2 *D. alpinum* a *D. issleri* a do kategorie C3 *D. zeilleri* a *D. complanatum*. *D. oellgaardii* není v této vyhlášce zahrnut, protože byl ještě v době jejího vydání určován jako *D. issleri* (Procházka 1997). Černý a Červený seznam cévnatých rostlin České republiky (Procházka 2001) se od této vyhlášky odlišuje: do kategorie C1 (kriticky ohrožené rostliny) jsou řazeny druhy *D. tristachyum* a *D. oellgaardii*, mezi silně ohrožené druhy (kategorie C2) spadají *D. issleri* a *D. zeilleri* a do kategorie ohroženým druhů (C3) spadají do kategorie *D. alpinum* a *D. complanatum*.

*D. complanatum* je u nás druhem nejrozšířenějším a jeho typickým habitatem jsou světlé jehličnaté i borové lesy a vřesoviště podhorského, vzácně pahorkatinného stupně. Jedná se o lokality poměrně ustálené a příliš se neměnicí. Druhým, u nás, velmi rozšířeným základním druhem je *D. alpinum*, který se vyskytuje v alpínském vegetačním stupni. Jedná se o typický a také diagnostický druh alpínských vyfoukávaných trávnicků a křovin a subalpínských smilkových luk (Chytrý et al. 2001, 2007). A i když je celé alpínské společenstvo celkově ohrožené, pravděpodobně se jedná o lokality dlouhodobě nejstabilnější. Třetí ze základních druhů, *D. tristachyum* je druhem nejvíce chráněným a zřejmě také nejohroženějším. Ve střední Evropě se nejspíš samostatně vůbec nevyskytuje a je tedy otázkou, zda nevznikl hybridizačními procesy mezi jinými taxony, které se v současné době na území střední Evropy možná už vůbec nevyskytují. Mezi velmi chráněné rostliny patří také hybridní taxony *D. oellgaardii* a *D. issleri*. Jak ale ukázaly všechny analýzy, nelze tyto dva druhy od sebe jednoznačně odlišit (karyologicky ani po morfologické stránce). Všechny (nebo alespoň některé) střeoevropské druhy plavuníků se často setkávají na disturbovaných, člověkem ovlivněných lokalitách, jakými jsou např. sjezdovky, lesní průseky aj. (obr.č. 36 na str. 61). Míra hybridizace a introgrese se na těchto místech ukázala v mnohem vyšší míře než bylo očekáváno (vytváří zde hybridní roje). Samostatně se vyskytující vedlejší druhy zřejmě nesou nově fixovanou genetickou variabilitu a jsou poměrně stabilní, ale zároveň se na území ČR pravděpodobně vůbec nevyskytují. Nejbližší autonomní hybridogenní linie se patrně nachází v borových lesích v Pobaltí. Na druhou stranu se místa výše zmíněných hybridních rojů ukázala zcela zásadními pro vznik nové variability.

Je tedy otázkou, zda chránit jednotlivé druhy, stabilní populace čistých linií, jednodušší a snáze interpretovatelné smíšené populace (s výskytem jednoho hybridu a rodičů) či nesmírně složité hybridní roje? S ohledem na vzácnost jednotlivých druhů je nezbytné chránit základní druhy a to zejména na místech, kde nedochází k jejich vzájemnému kontaktu, což rovněž doporučují jiné studie (Aagard 2009). Tradiční, druhově založená ochrana je vhodná v situacích,

kdy lze jednotlivé druhy snadno identifikovat (Ennos et al. 2005). Ochrannářskou praxi navíc značně komplikuje neexistence univerzálního pojetí druhu (existuje minimálně 22 druhových definicí; Claridge et al. 1997), kdy např. fylogenetický druh zahrnuje o 48 % taxonů více než biologický koncept stejného souboru jedinců (Marris 2007). Stojí tedy za ochranu samostatné jednotlivé druhy, když je mnohdy není možné od sebe ani jednoznačně rozlišit (zejména v místech hybridních rojů, kde díky introgresi vzniká plynulá škála morfotypů)? Existuje mnoho skupin organismů, ať už v živočišné či v rostlinné říši, ve kterých není možné jednoznačně vymezit a klasifikovat jednotlivé druhy. Rod *Diphasiastrum* je na území střední Evropy typickým příkladem takového jevu. Tyto tzv. taxonomické komplexy (obvykle charakterizované přítomností uniparentálních linií a retikulární evolucí díky hybridizaci) nelze snadno zahrnout do běžných druhově založených ochranných programů. Pokud se jednotlivé taxony nedají jednoznačně klasifikovat, je potom těžké sestavit jakýkoliv seznam ohrožených druhů. Existují pokusy o vytvoření ochranných programů pro tzv. taxonomicky komplexní skupiny (taxonomically complex groups, TCGs). Jednou z možností jejich aplikace je definovat množství taxonů pokrývajících celé spektrum morfologické variability. Problémem ale mohou být jedinci s intermediární morfologií, kteří by pak zůstali neklasifikovatelní. Druhým přístupem je uznání taxonomického komplexu za jeden taxon a vytvoření jednoduchého druhového ochranného plánu. Tím by se ale ochranářské zájmy obrátily ze vzácných taxonů na jediný relativně běžný druh. Navíc by bylo problematické do jediného ochranného plánu umístit organismy s různými ekologickými nároky a jistě by tím byla částečně zanedbána biodiverzita. Ani tento plán tedy není pro ochranu složitých taxonomických komplexů ideální. Celkově vzato, možná než chránit špatně definovatelné taxony, bylo by vhodnější zaměřit pozornost právě na evoluční procesy generující biodiverzitu v rámci skupin organismů (Ennos et al. 2005). Mezi ve střední Evropě se vyskytujícími druhy rodu *Diphasiastrum* jsou jimi již zmíněná hybridizace a introgrese.

Pro ochranářské instituce by tedy bylo, dle prezentovaných výsledků, vhodné zaměřit úsilí dvěma směry: na čisté izolované populace jednotlivých taxonů<sup>5)</sup> a na nejsložitější hybridní roje. Kromě druhu *D. alpinum*, které nevyžaduje zvláštní management, je pro ostatní taxony rodu mimořádně vhodné zvolit přiměřený disturbanční přístup (odstraňování náletu, narušování drnů, případně kompletní odstranění půdního horizontu apod.).

---

<sup>5)</sup> Případně i na nově objevené samostatné hybridogenní linie, které představují fixovanou unikátní genetickou variabilitu.





Obr.č.36: Sjezdovky, v současné době jedno z nejtypičtějších míst výskytu plavuníků na území střední Evropy. I když se jedná o lokality značně kontroverzní, pro plavuníky jsou co do biomasy učiněným „rájem“.

## 7. Diskuze

Cílem této práce bylo zhodnocení míry hybridizace, včetně možné introgrese u středoevropských zástupců rodu *Diphasiastrum*. S využitím biosystematických metod bylo snahou ověření mikroevolučních vztahů v rámci studované skupiny se zvláštním důrazem na potvrzení hybridního původu intermediárních taxonů. Dále s použitím mnohorozměrných statistických analýz morfometrických dat bylo cílem ověřit, do jaké míry se odrážejí mikroevoluční trendy na morfologii. Propojení všech získaných dat mělo umožnit nahlédnout do variability skupiny i do současných procesů probíhajících v jednotlivých populacích s možnou následnou aplikací poznatků v ochranné praxi.

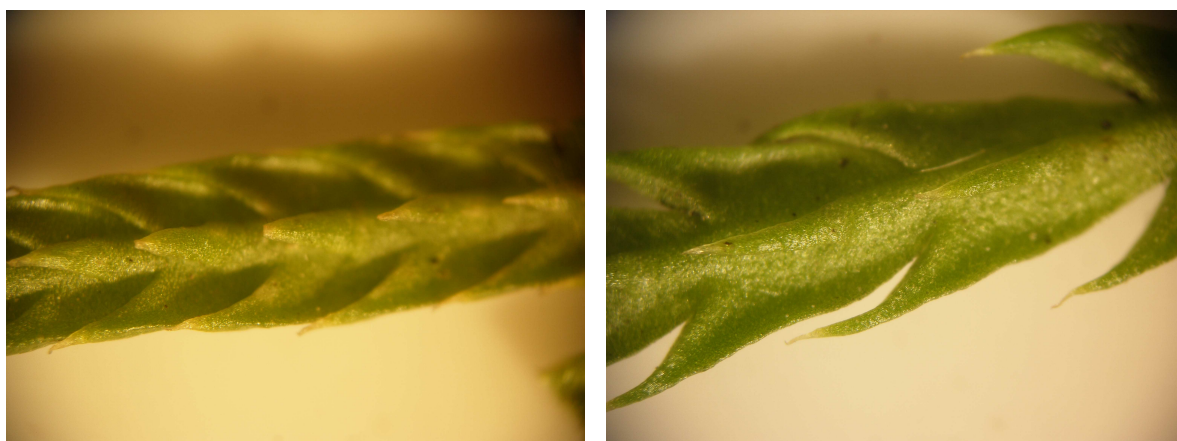
Vyřešení dané problematiky bylo závislé na sebrání dostatečného množství rostlin z co největšího počtu nalezišť, zejména z území České republiky. Během terénního průzkumu však bylo zjištěno, že množství dříve uváděných lokalit již zaniklo a některé byly naopak nalezeny nově (např. lokalita u lesní cesty nedaleko Skleného nad Oslavou či v bývalém areálu vojenské roty v Českém lese; Dvořáková & Urfus 2010). Také početnost populací se na místech značně lišila, např. ve smrkovém lese poblíž obce Srní na Šumavě či nedaleko Věšina na území Brd se jednalo o nález pouze několika sterilních prýtů. V nejhojnějším zastoupení se plavuníky vyskytovaly na sjezdovkách. Pro srovnání byly sebrány rostliny také ze zahraničních lokalit, zejména ze střední (rakouské Alpy) a severní Evropy (Skandinávie, Skotsko) a také z Ruska.

V práci byly použity biosystematické metody kombinující průtokovou cytometrii s analýzami klasické a geometrické morfometrie. Tato kombinace přístupů nebyla zatím v rámci studovaného rodu nikdy použita. U všech středoevropských zástupců plavuníků byla prokázána stejná ploidie ( $2n = 46$ ; Dostál 1984, Wagner 1992, Stoor et al. 1996), avšak jednotlivé taxony se liší na úrovni absolutní velikosti genomu (Dvořáková 2009, Urfus & Vít 2009, Bennert et al. 2011). Průtoková cytometrie je navíc metoda prakticky nedestruktivní, což je vzhledem ke vzácnosti těchto rostlin velkou výhodou. Mnohorozměrné statistické přístupy byly použity k morfologickému odlišení taxonů a pro případné vymezení sporných hybridogenních skupin. Geometrická morfometrie byla ke zhodnocení variability v rámci Lycopodiopsid využita vůbec poprvé. Díky svému relativně jednoduchému tvaru a malé morfologické proměnlivosti jsou plavuníky pro použití těchto metod rostlinami velice vhodnými. Problémem však bylo určení jednotlivých taxonů. Proto byly skupiny použité v mnohorozměrných analýzách vymezeny pouze ilustrativně. Determinace druhů probíhala vždy několikrát a za pomoci různých určovacích klíčů, popř. pomocí znalosti absolutní velikosti genomu (například rozlišení zastíněné rozvolněné formy *D. alpinum* od hybridního druhu *D. issleri*).

Průtoková cytometrie ukázala odlišnosti v obsahu jaderné DNA. Jasně byly odlišeny uváděné „čisté“ rodičovské druhy *D. tristachyum* s nejmenším genomem a *D. alpinum* s genomem největším. U nás nejrozšířenější druh *D. complanatum* měl absolutní velikost genomu také jasně definovanou, pokud se jednalo o cytometrické zhodnocení pouze základních druhů. Navíc je díky své poměrně unikátní morfologii poměrně snadno určitelný. Avšak rozpětí velikosti jeho genomu se částečně ztrácelo ve škále velikostí genomů všech tří udávaných hybridogenních, vedlejších druhů. Vznikla tedy kontinuální řada s nejasnými hranicemi mezi jednotlivými druhy.

Morfometrické analýzy byly provedeny na kvantitativních znacích sterilních prýtlů rostlin a také na výtrusnici. Znaky týkající se celkového habitu rostlin se ukázaly být velmi plastickými v závislosti na ekologických podmínkách a nebyly proto do analýz zahrnuty. Problém činilo například rozeznání rozvolněné - zastíněné formy *D. alpinum* od křížence *D. issleri*, ke kterému pomohla analýza velikosti genomu. Rozdíly mezi základními druhy byly velmi dobře patrné již při měření pod binokulární lupou. Po vyhodnocení získaných dat mnohorozměrnými statistickými metodami, se ukázaly na prýtlu nejvíce korelované s kanonickými osami pouze parametry týkající se velikosti listů a vzdáleností mezi nimi. Důležité determinační znaky byly nalezeny také na výtrusnici (počet strobilů na rostlině, přisedlost či stopkatost výtrusnice a tvar sporofylů). Základní druhy měly na diagramu PCA jen malou tendenci se překrývat. Některé odchylky na tomto výstupu mohly způsobit například velmi velké rostliny *D. complanatum* z Ruska, u kterých byly i vzdálenosti mezi lístky na prýtlu několikanásobně větší než u našich typických zástupců tohoto druhu. Na druhou stranu byly provedeny také samotné analýzy jedinců pouze ze střední Evropy, čímž byl vliv výše zmíněných ruských rostlin odfiltrován. Další odchylky mohly zapříčinit také zastíněné rozvolněné formy *D. alpinum*, které měly charakter prýtlů zcela jiný než „typické“ kompaktní rostliny tohoto druhu (obr.č. 37 na str. 64). Naopak hybridogenní, vedlejší druhy, vytvářeli mezi druhy rodičovskými na diagramu PCA velice složitou situaci. Převážně vykazovaly intermediární charakter mezi znaky udávaných rodičovských kombinací. Někdy však bylo velmi těžké od sebe druhy rodičovské a vedlejší jednoznačně odlišit - zejména netypické jedince s morfologicky přechodnými znaky. Pravděpodobně se jednalo buď o extrémní ekotypy či zpětné křížence. Na našem území se vedlejší druhy nacházejí většinou na kontaktních místech výskytu rodičů (obou či alespoň jednoho) nebo jako pozůstatky mizejících původních populací (Dvořáková et al. unpubl.) Taková místa se však v přirozené krajině vyskytují prakticky pouze z důvodu nějaké disturbance, kdy je narušen zapojený porost. V dnešní době jsou jimi nejčastěji sjezdovky, kde je vlivem lidské činnosti narušen porost napříč různými výškovými a vegetačními zónami a často se zde setkává všech 6 druhů (např. Arnold 1997, Procházka 1997, Procházka 1999, Urfus & Vít 2009). Na těchto kontaktních místech pak mohou vzniknout hybridní roje, v nichž dochází k rozsáhlé hybridizaci mezi všemi druhy a hojně také ke zpětnému křížení (Seehausen 2004). Vedlejší druhy

jsou tak na území střední Evropy spíše neohybridy v hybridních zónách než hybridogenními druhy (Arnold 1997, Aagard 2009). Pro hypotézu o introgresi svědčí také nález samostatně se vyskytujících vedlejších druhů pouze na pár lokalitách ve Francii, Sasku, Polsku a také Finsku, kde se zřejmě jedná o hybridy glaciálního stáří (Aagard 2009, Dvořáková et al. unpubl). V době ledové byly plavuníky pravděpodobně hodně rozšířené, rozhodně více než jsou na zemi střední Evropy dnes. Tomu odpovídá i jejich afinita k tajze a tundře a také k distribuovaným lokalitám, které byly pravděpodobně v té době častější ve střední Evropě než jsou dnes. Na druhou stranu nejrecentněji popsany vedlejší druh *D. oellgaardii* se pravděpodobně samostatně vůbec nevyskytuje.

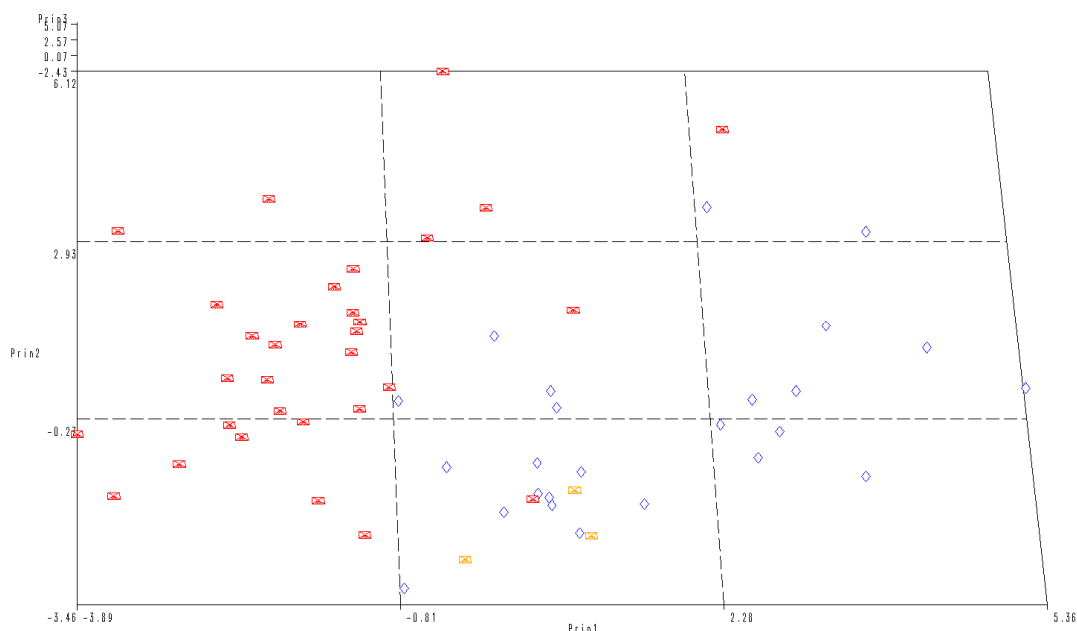


**Obr.č. 37:** Dvě odlišné formy druhu *D. alpinum*. **Vlevo:** klasický „kompaktní“ tvar, **vpravo:** zastíněná rozvolněná forma stejného jedince.

Obecným předpokladem mezidruhov $\acute{e}$  hybridizace a následn $\acute{e}$  speciace je vytvoření reprodukčních bari $\acute{e}$ ry mezi kříženci a rodičovskými druhy (Rieseberg 1997, Buerkle et al. 2000, Lexer et al. 2003, Robertson et al. 2010). U všech st $\acute{r}$ edoevropských vedlejších (hybridních) druhů však byla prokázána alespo $\acute{n}$  částečná fertilita a plná vitalita. Je tudíž otázkou, proč si doposud nevytvořili alespo $\acute{n}$  postzygotické bari $\acute{e}$ ry zabra $\acute{n}$ ující jejich zp $\acute{e}$ tnému křížení s rodičovskými druhy. Možným vysvětlením je velmi malé množství primárních vyhovujících stanovišť, kde se tyto druhy mohou a během holocénu či glaciálu mohly, setkávat. V důsledku toho neměli pot $\acute{r}$ ebu si vytvář $\acute{e}$ t jakékoli bari $\acute{e}$ ry. Proto je značná část (ne-li většina) současn $\acute{e}$  rozsáhl $\acute{e}$  hybridizace zjevn $\acute{e}$  zapříčin $\acute{e}$ ná vlivem člov $\acute{e}$ k $\acute{a}$ , díky kterému se nabízí skutečně velké množství sekundárních lokalit. Na druhou stranu je docela možné, že dokonce i bez lidských zásahů, by se v přírod $\acute{e}$  samovoln $\acute{e}$  odehrávala takto dynamická mikroevoluce. To však už není v dnešní dob $\acute{e}$  téměř možné dokázat.

Ve srovnání se střední Evropou, se ukázala ve Skandinávii situace poněkud mén $\acute{e}$  komplikovaná (obr.č. 38 na str. 65). Podmínky zdejší tundry a tajgy zřejmě vyhovují p $\acute{r}$ edevším druhům *D. alpinum* a *D. complanatum*. Nízká frekvence hybridů m $\acute{u}$ že být způsobena nedostatkem vyhovujících sekundárních stanovišť. Zajímavý je samostatný výskyt *D. zeilleri*

v jižním Finsku, přičemž jeden z rodičovských druhů - *D. tristachyum* se ve Finsku vyskytuje velice vzácně. resp. dle sdělení od Veli-Pekka Rautiainena (ústní sdělení 2010) je znám pouze z jediné lokality. Může se proto jednat o, již zmíněnou, samostatnou hybridogenní linii druhů prokřížených s *D. zeilleri*.



**Obr.č. 38:** Výstup analýzy hlavních komponent klasické morfometrie sterilních prýtů datového souboru jedinců ze Skandinávie. První tři osy vysvětlily 66 % variability (1. osa 29 %, 2. osa 24 % a třetí osa 13 %). Na diagramu je docela zřetelné odlišení druhů *D. alpinum* (☐) a *D. complanatum* (◇). Třetí základní druh *D. tristachyum* je ve Skandinávii velice vzácný. Častější je zde, i samostatně se vyskytující, hybridní druh *D. zeilleri* (◻).

Mnohorozměrné statistické metody rovněž potvrdily souvislost absolutní velikosti genomu s morfologickými charakteristikami jednotlivých taxonů. Ne všechny znaky však s genomem korelují. Na rozdíl od analýz hlavních komponent se ukázaly s genomem nejvíce související znaky týkající se celkové šířky prýtu. A naopak, proti velikosti genomu jdou znaky týkající se vzdáleností mezi lístky, které nejvíce korelují s hlavními komponentami analýz PCA.

Sporným a zvláštním případem je rodičovský druh *D. tristachyum*, který se v současné době na území střední Evropy pravděpodobně nevyskytuje samostatně. Navíc má v rámci Evropy jen velmi malý areál a je zde spíše vzácný. Další zajímavostí je jeho celosvětová distribuce, neboť je znám z podivně izolovaných a vzdálených areálů, jakými jsou východní část Severní Ameriky, rumunské Karpaty či západní Čína (Wilce 1965, Szafer et al. 1967, Holub 1975, Dostál 1984, 1989, Wagner & Beitel 1993, Jäger & Werner 2005). Podivný charakter rozšíření tohoto druhu může být vysvětlen i jinak. Ve všech třech zmíněných areálech se totiž pravděpodobně vyskytují linie různého původu (Kukkonen 1994) a do tohoto taxonu jsou řazeny mylně. Buď se může jednat o druh silně ustupující a velmi reliktní, jež je extrémně vzácný a pravděpodobně pozůstalý ještě z doby ledové. Nebo mohl vzniknout hybridizačními procesy mezi ostatními taxony a může tak jít o specifickou hybridogenní linii. Tomu nasvědčuje i fakt, že jeho kříženci

(*D. oellgaardii* a *D. zeilleri*) se vyskytují častěji než samotný druh *D. tristachyum* a byly nalezeny také samostatně. Navíc se v analýzách mezi ostatními kombinace vedlejších druhů s rodičovskými v plynulé škále vždy objevily odlehle entity, avšak mezi druhy *D. tristachyum* a *D. zeilleri* se jednalo o zcela plynulý přechod. Mezi těmito druhy tak pravděpodobně neexistuje žádná reprodukční bariéra. *D. tristachyum* také nemá pravděpodobně ve střední Evropě svůj primární habitat. Uvádí se zejména z vřesovišť a kyselých borů nižších až středních nadmořských výšek. Většina evropských vřesovišť však patří mezi polopřirozená společenstva, jejichž vznik a vývoj je podmíněn extensivním hospodařením (Gimingham 1972, Heil & Aerts 1993a). V posledních desetiletích dochází v celé Evropě k jejich velkému úbytku (Gimingham 1994), a byla tak zařazena mezi ohrožené vegetační typy (ve většině zemí jsou chráněna v přírodních rezervacích a národních parcích).

Nejsložitější situaci ve všech typech analýz představovalo odlišení hybridních druhů *D. issleri* a *D. oellgaardii*, jejichž rozsahy absolutních velikostí genomů se výrazně překrývaly a také morfologicky byly tyto dva druhy těžko rozlišitelné. Jistě to může být způsobeno nepřesným určením druhů. Avšak po mnoha konzultacích a srovnáními s nejrůznějšími klíči a publikacemi a při tak rozsáhlém samplingu je možné tuto variantu ve většině případů vyloučit. Také ve studii Aagard et al. (2009) se absolutní velikosti genomů těchto druhů překrývají. Do tohoto, z našeho pohledu, nejsložitějšího komplexu druhů *D. oellgaardii* – *D. issleri* spadají také nově nalezené triploidní hybridy (*D. alpinum* × *D. × issleri*, *D. alpinum* × *D. × oellgaardii* a *D. complanatum* × *D. × issleri*; Bennert et al. 2011). Nemůže být proto vyloučeno, že se tyto dva hybridogenní druhy mezi sebou dále kříží a vytvářejí tak trihybridy (Gilman 1994).

Z morfometrických analýz pramení také poznatek o limitovaném použití determinujících klíčů. Přesné určení druhů je možné pouze v místech, kde se taxony nevyskytují příliš často pospolu (např. Skandinávie, Britské ostrovy<sup>6)</sup>). Na druhou stranu analýzy ukázaly složitost situace v rámci střední Evropy, především na smíšených lokalitách. Je zajímavé, že stejné kontinuum nebylo nalezeno v západní Evropě (Bennert et al. 2011), i když výsledky průtokové cytometrie (absolutní velikost genomu  $2C = 5,26 - 7,49$  pg) jsou téměř shodné s výsledky této studie ( $2C = 4,73 - 7,80$  pg). Teoreticky je možné vysvětlit vzniklé kontinuum i jiným způsobem. V rámci problematiky průtokové cytometrie by mohla být kontinuita způsobena různým stářím sebraného materiálu při analýzách. Tato možnost však byla otestována v různém časovém horizontu na několika vybraných exemplářích. Ty byly měřeny po několika týdnech, několika měsících i po čtvrt roce od sebrání, ale absolutní velikost genomu se neměnila. Další příčinou kontinuity dat může být nepřesnost měření způsobená sekundárními metabolity rostlin nebo nestabilitou velikosti genomu zapříčiněnou např. aneuploidií, B-chromozomy aj. Jelikož se však

---

<sup>6)</sup> Na Britských ostrovech se sice často druhy nevyskytují na společné lokalitě, ale zjevně se zde vyskytuje alespoň jedna autonomní hybridogenní linie. To dokazuje nález přechodných typů mezi *D. alpinum* a *D. issleri* (Jermy 1978, Dvořáková et al. unpubl.).

se stejnými problémy nesetkaly ani předešlé studie (Aagard 2009, Bennert et al. 2011), byly všechny tyto možnosti vyloučeny.

V kombinaci s ostatními analýzami (klasické a geometrické morfometriky) a velkým množstvím vzorků je těžké najít jiné vysvětlení tak komplikované situace než je právě zpětné křížení smývajících mezidruhových rozdílů. Hypotéza o introgresi je podpořena také prokázanou fertilitou spor hybridních druhů (Kukkonen 1994). Proč ale nebylo v západní Evropě (Bennert et al. 2011) nalezeno stejné kontinuum jako v Evropě střední? Nabízí se hned několik možných vysvětlení. Buď zde neprobíhá tak intenzivní mezidruhová hybridizace či si jednotlivé druhy již stihly vytvořit postzygotické bariéry a nemohou se tak zpětně křížit se svými rodiči. Nejpravděpodobnějším vysvětlením zřejmě bude méně rozsáhlý sampling (35 jedinců měřených stejnou metodou průtokové cytometrie oproti 570 rostlinám analyzovaných v této studii), kdy byly pravděpodobně vybírání „typičtí“ zástupci jednotlivých druhů a jedinci morfologicky „deviantní“ (nalezení triploidi) místo plošného a náhodného samplingu.

Problémem detailnějšího výzkumu těchto rostlin, vlastně celých Pteridophyt jsou dvě, na sobě, nezávislé generace životního cyklu. Jedná se o diploidní sporofyt, vytvářející haploidní spory, ze kterých vzniká haploidní gametofyt. Ten je v celé čeledi *Lycopodiaceae* oboupohlavný. Nejvíce patrná a také nejvíce prozkoumaná je sporofytická, převážně asimilující, fáze životního cyklu rostlin. Gametofyt je často nenápadný, podzemní a paraziticky mykotrofický. Gametofyty jsou zatím velice málo prozkoumány. Předpokládá se u nich dlouhověkost (rozhodně delší než existence nadzemního sporofytu). U rodu *Diphasiastrum*, stejně jako u mnoha dalších plavuňovitých, se gametofyty pravděpodobně vyskytují ve větším množství než nadzemní sporofyty a pohlavně dospívají až po 12 – 15 letech (Kukkonen 1994, Procházka & Harčarik 1999). Minimum znalostí je také o jejich ekologii a evolučních procesech. Je docela možné, že ekologická optima gametofytů leží jinde než optima sporofytických částí. Pravděpodobně pomáhají rostlinám, díky své dlouhověkosti, překonávat nepříznivé podmínky prostředí. Krátkověký sporofyt tak nemusí být pro rostliny až tolik důležitý a jejich vývoj a výskyt záleží zejména na frekvenci výskytu gametofytů. Díky pravděpodobně častější existenci gametofytů nemusí být celá řada chráněných rostlin vůbec natolik vzácných a čekají jen, v podobě tohoto malého útvaru, až se vyskytnou příhodné podmínky pro jejich růst. Co se týká evolučních procesů na úrovni gametofytu, neexistuje zatím mnoho informací. Dodnes nejsou nalezeny vhodné podmínky pro jeho pěstování a experimentální křížení. Je ale docela možné, že hybridizace a také introgrese probíhají i na územích lidskou činností nezasazených a gametofyty jen nemají příležitost vyrůst ve sporofytické části.

Jisté je, že takto oddělené fáze životního cyklu mohou být pro rostliny velice nevýhodné a ty se musí přizpůsobovat podmínkám rovnou na dvou úrovních. Jediná chyba na úrovni gametofytu tak může znamenat zánik celé rostliny i populace.

Co se ochranné praxi týká, je zřejmé, že nestačí chránit pouze jednotlivé taxony, ale pozornost by měla být upřena také na probíhající mikroevoluční procesy. Nejsložitější z těchto procesů představuje antropohybridizace (Wójcicki 1991), jež je unikátním a specifickým příkladem vzniku nové variability a stojí proto jistě za ochranu. Se sjezdovkami srovnatelnou mírou variability, vzniklou právě díky antropohybridizaci, představují u jiných taxonů např. horské louky s množstvím hybridních rojů (ochranně nezanedbatelné), ve kterých dochází ke generování nových linií a které mají silný mikroevoluční potenciál ústící pravděpodobně ve speciaci (Krahulcová & Krahulec 1999, Krahulec et al. 2004). Management pro zachování celé variability u středoevropských zástupců rodu *Diphasiastrum* byl musel být tak náročný a drastický, že je nemožné jej provádět na všech lokalitách, kde se taxony vyskytují. Navíc jsou pro udržení populací nutné disturbance. Bylo by tedy zřejmě vhodné se méně soustředit na malé smíšené populace, ale sledovat především čisté populace základních druhů a vybrané hybridní roje.

Z ochranného (druhově specifického) hlediska je patrně nejvíce zajímavý druh *D. tristachyum*. Pravděpodobně se totiž jedná o evropskou endemickou hybridogenní linii s těžištěm výskytu právě ve střední Evropě. Oproti ostatním základním druhům, které jsou široce rozšířené a mají nejvíce primárních lokalit především ve Skandinávii, by ochranu zasloužil primárně právě tento taxon.



## 8. Závěr

Předkládaná diplomová práce řeší problematiku hybridizace a mikroevolučních vztahů a případných ochranných aplikací u střeoevropských zástupců rodu *Diphasiastrum*. K výzkumu byly použity v současnosti hojně využívané biosystematické metody – průtoková cytometrie stanovující absolutní velikost genomu, klasická a geometrická morfometrika. Tyto metody měly za cíl mapování mikroevolučních vztahů v rámci jednotlivých, základních i hybridních, taxonů.

Všechny tři metodické přístupy ukázaly výrazně kontinuální „pattern“. Skupiny základních druhů byly poměrně dobře odděleny. Druhy vedlejší sice vykazovaly převážně intermediární charakter, ale zároveň se s rodičovskými druhy výrazně překrývaly. Navíc byly nalezeny především na lokalitách smíšených s druhy rodičovskými. Také častá obtížnost determinace přechodných typů ukazuje na vzájemnou hybridizaci a pravděpodobnou introgresi. V neposlední řadě také nalezení hybridních druhů pouze na lokalitách smíšených s druhy rodičovskými ukazuje na fakt, že se všichni naši zástupci rodu *Diphasiastrum* volně kříží vzájemně mezi sebou. Na místech styku více druhů se objevuje tendence ke vzniku kontinuální škály introgresantů. Přesné hranice mezi jednotlivými taxony pak prakticky nelze vymezit a přesné určení je možné pouze na místech, kde se duhy nevyskytují pospolu.

Při determinaci je největším problémem odlišení druhů *D. issleri* a *D. oellgaardii*, jejichž velikosti genomů se výrazně překrývají a ani na základě morfometrických analýz je nelze od sebe dobře rozlišit. Na rozdíl od druhu *D. issleri* však nebyl *D. oellgaardii* nalezen nikde samostatně bez přítomnosti rodičů. Pravděpodobně se tedy nejedná o druh hybridogenní, nýbrž jde o recentně vznikajícího neohybrida.

Také jeden ze základních druhů *D. tristachyum* se pravděpodobně ve střední Evropě samostatně nevyskytuje. Navíc jeho celkový areál výskytu je dosti omezený a rozhodně nekontinuální. Tento druh snad mohl vzniknout hybridizačními procesy mezi ostatními taxony a jedná se tak o hybridogenní linii.

Z výše uvedeného vyplývá, že vedlejší druhy vznikají opakovaně a mají tendenci se zpětně křížit se svými rodiči. Mimo ochranu vlastních taxonů by měly být rovněž chráněny i pozoruhodné intenzivně probíhající mikroevoluční procesy, zejména pak na lokalitách s jejich extrémními projevy.

Závěrem lze snad jen říci, že i když tato studie přinesla množství důkazů introgrese, jedná se pouze o důkazy nepřímé. Jistě by stálo za pokus najít také přímá potvrzení tohoto jevu. Nejlépe na nějakém zjednodušeném, ne příliš komplikovaném, modelu (například dva základní a jeden vedlejší druh). K dalšímu odhalení těchto mikroevolučních procesů by mohly výrazně přispět, v dnešní době hojně využívané, molekulární analýzy (např. AFLP).

## 9. Seznam obrázků

Obr. č. 1: Fylogenetické stromy ukazující evoluční vztahy v čeledi <i>Lycopodiaceae</i> .	4
Obr. č. 2: Schéma mikroevolučních vztahů u středoevropských zástupců rodu <i>Diphasiastrum</i> .	5
Obr. č. 3: Znázornění geografického celosvětového rozšíření plavuníků (Meusel 1965).	6
Obr. č. 4: Typický vzhled druhu <i>D. alpinum</i> .	8
Obr. č. 5: Typický vzhled druhu <i>D. complanatum</i> .	10
Obr.č. 5b: Zřetelné konstriktce v místě přírůstku nových větví u <i>D. complanatum</i> .	10
Obr.č. 6: Typický vzhled druhu <i>D. tristachyum</i> .	12
Obr.č. 7: Habitus hybridního druhu <i>D. issleri</i> .	14
Obr.č. 8: Vzhled hybridního druhu <i>D. oellgaardii</i> .	16
Obr.č. 9: Habitus hybridního druhu <i>D. zeilleri</i> .	18
Obr.č. 10: Schéma břišních stran prýtlů středoevropských zástupců rodu <i>Diphasiastrum</i> .	19
Obr.č. 11: Schéma mikroevolučních vztahů u severoamerických zástupců rodu.	21
Obr.č. 12a: Mapa sběrů v České Republice.	29
Obr.č. 12b: Mapa Evropy se zaznamenanými veškerými lokalitami sběrů.	29
Obr.č. 13: Znaky měřené klasickou morfometrikou na břišní a hřbetní straně prýtlů.	36
Obr.č. 14: Vizualizace landmarků na břišní a hřbetní straně prýtlů vždy na dvou řadách listů.	39
Obr.č. 15: Histogram simultánní analýzy absolutních velikostí genomů.	42
Obr.č. 16a: Kontinuální škála vnesených absolutních velikostí genomů a jednotlivých rostlin.	43
Obr.č. 16b: Kontinuální škála absolutních velikostí genomů rozdělená po jednotlivých druzích.	43
Obr.č. 17: Diagram PCA základních druhů.	44
Obr.č. 18a, b: Diagram PCA celého datového souboru všech 25 znaků na prýtech	45
Obr.č. 19: Diagram PCA celého datového souboru, ale pouze 16-ti znaků na prýtech.	46
Obr.č. 20: Výstup PCA souboru dat jedinců ze střední Evropy.	46
Obr.č. 21: Lokálně regresní model aplikovaný na data z PCA souboru střední Evropy.	47
Obr.č. 22: Tendence změn znaků jednotlivých druhů vnesené na diagram PCA.	47
Obr.č. 23: Výstup omezené analýzy hlavních komponent – RDA.	48
Obr.č. 24: Výstup PCA souboru jedinců druhů <i>D. issleri</i> a <i>D. oellgaardii</i> .	48
Obr.č. 25: RDA zobrazující velikost genomu a morfologii.	49
Obr.č. 26: Diagram PCA výtrusnicových klasů.	50
Obr.č. 27a: Výstup RWA celého datového souboru břišních stran prýtlů.	51
Obr.č. 27b: Výstup RWA celého datového souboru hřbetních stran prýtlů.	52
Obr.č. 28: Diagram RWA souboru dat jedinců ze střední Evropy.	52
Obr.č. 29a: XY plot souřadnic landmarků na listech břišních stran prýtlů všech druhů.	53
Obr.č. 29b: XY ploty pozic landmarků pro různé kombinace druhů.	53
Obr. č. 30a, b: Výstup PLS analýzy v datovém souboru jedinců ze střední Evropy.	54
Obr.č. 31a: Rekonstrukce vektorů změn landmarků od druhu s nejmenším genomem k průměru.	55
Obr.č. 31b: Rekonstrukce vektorů změn landmarků od druhu s největším genomem k průměru.	55
Obr.č. 32: Výstup RDA testující vliv velikosti genomu na morfologické charakteristiky.	56

Obr.č. 33: Diagram PCA výtrusnic.	57
Obr.č. 34: Diagram RWA výtrusnic.	58
Obr.č. 35: XY plot posunů landmarků dle morfologických změn sporofylů mezi druhy.	58
Obr.č. 36: Sjezdovky, jedno z nejtypičtějších míst výskytu plavuníků na území střední Evropy.	61
Obr.č. 37: Dvě odlišné formy druhu <i>D. alpinum</i> .	64
Obr.č. 38: Výstup PCA prýtů z datového souboru jedinců ze Skandinávie.	65
Tab.č1: Seznam lokalit v České republice i v zahraničí	30
Tab. č. 2a: Tabulka znaků měřených na sterilních prýtech.	36
Tab. č. 2b: Přidané poměrové znaky na sterilních prýtech.	36
Tab.č. 3: Tabulka znaků měřených na sporofylech.	38
Tab.č. 4: Absolutní velikosti genomů pro jednotlivé druhy včetně počtu analyzovaných rostlin.	43

## 10. Seznam použité literatury

- Aagard S.M. (2009): Reticulate evolution in *Diphasiastrum* (Lycopodiaceae). – PhD thesis, Uppsala University, Sweden.
- Adler W., Oswald K. & Fischer R. (1994): Exkursionsflora von Österreich. - Ulmer, Stuttgart.
- Anderson E. (1949): Hybridization of the habitat. New York: Wiley.
- Anderson E. & Stebbins G.L. (1954): Hybridization as an evolutionary stimulus. – *Evolution* 8: 378-388.
- Arnold M.L. (1993): *Iris nelsonii*: Origin and genetic composition of a homoploid hybrid species. - *American Journal of Botany* 80:577–583.
- Arnold M.L. (1997): *Natural Hybridization and Evolution*. – Oxford University Press, Oxford.
- Arnold M.L., Hamrick J.L. and Bennett B.D. (1990): Allozyme variation in Louisiana irises: Atest for introgression and hybrid speciation. - *Heredity* 65:297–306.
- Avise J.C., Bermingham E., Kessler L.G., Saunders N.C. (1984): Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). - *Evolution* 38: 931–941.
- Barton N.H. & Hewitt G.M. (1985): Analysis of hybrid zones. - *Ann. ev. Ecol. Syst.* 16: 113–148.
- Bennert H.W. (1999): Die seltenen und gefährdeten Farnpflanzen Deutschlands.- Biologie, Verbreitung, Schutz. Bundesamt für Naturschutz Bonn, Bonn BadGodesberg.
- Bennert H.W., Suksathan P. & Horn K. (2007): *Diphasiastrum multispicatum* (J.H. Wilce) Holub (Lycopodiaceae) in Thailand. - *American Fern Journal* 97: 155-165.
- Bennert H.W., Horn K., Kauth M., Fuchs J., Jakobsen I.S.B., Øllgaard 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*.
- Bentham G. (1924): Handbook of the British Flora. London 1924.
- Bookstein F.L. (1991): Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. – Cambridge, University Press, Cambridge.
- Bookstein F.L. (1997): Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. - *Medical Image Analysis* 1: 225-243.
- Bookstein F.L., Gunz P., Mitteroecker P., Prossinger H., Schaefer K., Seidler H. (2003): Cranial integration in Homo: singular warps analysis of the midsagittal plane in ontogeny and evolution. *Journal of Human Evolution* 44 (2): 167–187.
- Boughton C., Farnsworth E., Lowe Ch. (2005): Peterson Field Guide to Ferns, Second Edition: Northeastern and Central North America (Peterson Field Guides): 292-301. Boston.
- Briggs D., Walters S.M.(2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého, Olomouc.
- Bruce B.J. (1979): Gametophyte of *Lycopodium digitatum*. - *Am.J.Bot.* 66: 1138-50.
- Buchmann H.B. (1908): Das Prothallium von *Lycopodium complanatum* L. *Bot. Zeitung*, 2, Abt. 66: 169-181.
- Buerkle C.A. & Riesberg L.H. (2007): The rate of genome stabilization in homoploid hybrid species. - *Evolution* 55: 684-691.
- Chytrý M., Kučera T & Kočí M. (2001): Katalog biotopů České republiky. – Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.
- Chytrý M. (ed.) (2007): Vegetace České republiky 1. díl, Travinná a keříčková vegetace, Academia Praha.
- Claridge M.F., Dawah H.A., Wilson M.R. (1997): *Species: The Units of Biodiversity*. London: Chapman & Hall.
- Cleveland W.S. & Devlin S.J. (1988): Locally-wighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. – *J. Am. Statist. Assoc.* 83: 597-610.
- Czerepanov S.K. (1995): Vascular plants of Russia and Adjacent States (the former USSR). - Cambridge University Press.

- Damboldt J. (1962): *Lycopodium issleri* in Bayern. – Ber. Bayer. Bot. Ges., München, 35: 20 – 22.
- Danton P. and Baffray M. (1995): Inventaire des plantes protégées de France. Nathan, Paris.
- Doležel J., Göhde W. (1995): *Sex determination in dioecious plants Melandrium album and M. rubrum using high-resolution flow cytometry*. Cytometry 19: 103–106.
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M.A., Nardi L., Obermayer R.. (1998): *Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison*. - Annals of Botany 82 (Suppl. A): 17–26.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007): Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Domin K. (1938): *Lycopodium issleri* Rouy v Československu a o variabilitě našich plavuní ze sekce Heterophylla Spring. – Rozpravy Čes Akad., Cl. 2, Praha, 49/19: 1 –28.
- Dostál J. (1984): *Diphasiastrum* - In Conert H. J. (ed.), Hegi, G., (1984), *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, p. 28-43, Verlag Paul Parey, Hamburg.
- Dostál J. (1989): *Nová květena ČSSR, I. díl*, Academia Praha 1989.
- Dvořáková K. (2009): Hybridizace a mikroevoluční vztahy u středoevropských zástupců rodu *Diphasiastrum*. Bakalářská práce, depon. In: Knihovna Katedry botaniky PřFUK, Praha.
- Dvořáková K. & Urfus T. (2010): Plavuníky - „pravěká“ novinka Českého lesa. Český les - Příroda a historie 7-8: 31-33.
- Dvořáková K., Urfus T., Krak K. & Vít P. (2010): Hybridization and microevolutionary relationships among Central European *Diphasiastrum* species. – 19th International Symposium „Biodiversity and Evolutionary Biology“ of the German Botanical Society, Vienna. (posterové sdělení)
- Ellstrand N.C. et al. (1996): Distribution of spontaneous plant hybrids. - *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5090-5093.
- Ennos R.A., French G.C. and Hollingsworth P.M. (2005): Conserving taxonomic complexity. - *Trends in Ecology and Evolution* 20(4): 164-168.
- Flegr J. (2006): Zamrzlá evoluceaneb je to jinak pane Darwin. Praha: Academia, p. 328.
- Flegr J. (2007): *Úvod do evoluční biologie*. Praha: Academia, p. 544.
- Frey W., Frahm J.-P., Lobin W. & Fischer E. (2006): *Liver worts, Mosses and Ferns of Europe*. Harley Books, Colchester.
- Fousek J., Harčarik J. (2009): Sjezdové lyžování a ochrana přírody. - *Péče o přírodu a krajinu* č. 6: 8-10.
- Futák J. (1963): Rod *Diphasiastrum* Presl. em. Rothm. (*Lycopodium* L. p.p.) na Slovensku. – *Biológia*, Bratislava, 18: 256-264.
- Futák J. [ed.] (1996): *Flóra Slovenska 2*. – Vydavateľstvo SAV, Bratislava, p. 352.
- Genovart M. (2008): Natural hybridization and conservation. – *Biodiversity & Conservation* 18(6): 1435-1439.
- Genovart M. (2009): Natural hybridization and conservation. - *Biodiv.Cons.* 18: 1435-1439.
- Gilman A.V. (1994): A NEW TRI-HYBRID LYCOPOD, *DIPHASIASTRUM-DIGITATUM X SABINIFOLIUM*. - *Rhodora* 96(887): 287-293.
- Gimingham C.G. (1972): *Ecology of heathlands*. Chapman and Hall, London.
- Gimingham C.G. (1994): *Lowland heaths of West Europe: Management for conservation*. *Phytocoenologia* 24: 615-626.
- Grant P.R., Grant B.R. (1992): Hybridization of bird species. – *Science* 256: 193-197.
- Grant V. (1963): *The Origin of Adaptations*. USA: Columbia University Press, p. 606.
- Grant V. (1981): *Plant speciation*. New York: Columbia Univ. Press.
- Greilhuber J., Tremesch E. M. & Loureiro J. C. M. (2007): Nuclear DNA Content Measurement. In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. [eds.]: *Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes*: 67-101, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- Graves J.D. & Taylor K. (1986): A comparative study of *Geum urbanum* L. and *G. rivale* L. to determine factors controlling their altitudinal distribution. I. Growth in controlled and natural environments. - *New Phytologist* 104: 681-691.
- Haeupler H. & Muer T. (2007): *Bildatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands*. 2. Auflage, pp. 20-64. Stuttgart (Hohenheim) : Ulmer, 2007.
- Hammer R., Harper D.A.T. & Ryan P.D. (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. - *Palaeontologia Electronica* 4 (1) (art. 4): 1-9.
- Hansen H.K. (1964): Studies on the regeneration of heath vegetation after burning-off. *Botanik Tidskrift* 60: 1-41.
- Haufler C.H. (1996): Species concept and speciation in pteridophytes. Pp. 291-305 in *Pteridology in perspective*, eds. Camus J.M., Gibby M. and Johns R.J. Kew: Royal Botanical Gardens.
- Haufler C. (2008): Species and speciation. Pp. 303-324 in Ranker T.A. & Haufler C.H. (eds.), *Biology and evolution of fern and lycophytes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Heil G.W. & Aerts R. (1993): General introduction. In: *Heathland: Patterns and processes in a changing environment*, Aerts, R., Heil, G. W. (ed.), *Geobotany* 20. Kluwer, Dordrecht, p. 1-25.
- Heiser C.B. (1947): Hybridization between the sunflower species *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. - *Evolution* 1: 249-262.
- Heiser C.B. and Smith D.M. (1969): The origin of *Helianthus multiflorus*. - *Amer. Jour. Bot.* 47(10): 860-865.
- Heuber F.M. (1992): Thoughts on the early lycopsids and zosterophylles. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 474-499.
- Hiroyoshi I. (2006) - SHAPE v.1.3., December 2006.
- Holub J. (1960): Kleine Beiträge zur Flora der ČSSR. - *Novitates bot.*, Praha, p. 4-6.
- Holub J. (1975): *Diphasiastrum*, a new genus in Lycopodiaceae. - *Preslia* 47: 97-100.
- Holub J. & Procházka F. (2000): Red list of vascular plants of the Czech Republic. - *Preslia* 72: 187-230.
- Horn K. (1997): Verbreitung, Ökologie und Gefährdung der Flachbärlappe (*Diphasiastrum* ssp., *Lycopodiaceae*, *Pteridophyta*) in Niedersachsen und Bremen. *Naturschutz und Landschaftspflege in Niedersachsen* 38: 1-83.
- Horn K., Strobel C. and Bennert H. W. (2001): Die Bestandssituation gefährdeter Farnpflanzen (Pteridophyta) in Bayern – ein erster Bericht über Planung und Durchführung von Schutz- und Pflegemaßnahmen. *Schriftenreihe des Bayerischen Landesamtes für Umweltschutz* 156 (Beiträge für Artenschutz 23) 139-174.
- Horn K., Bennert H.W. (2002): *Diphasiastrum oellgaardii* Stoor et al. (Lycopodiaceae, Pteridophyta), eine neue Flachbärlapp-Art für die Flora von Österreich. *Phyton (Austria)* 42. (1): 125-148.
- Hultén E. (1958): The amphi-Atlantic plants and their phytogeographical connections. *Kongl. Svenska Vetenskapsakad. Handl. - Fjärde Serien* 7: 1-340.
- Issler E. (1909): Die Vegetationsverhältnisse der Zentralvogesen mit besonderer Berücksichtigung des Hohneckgebietes. - *Engler Bot. Jahrb.*, Leipzig, 43, Beibl. 99: 6-62.
- Issler E. (1910): Über 3 in den Vogesen vorkommende Lycopodium-Formen aus der complanatum-Gruppe. - *Mitteil. Philomat. Ges. Elsass-Lothringen, Strasbourg*, 4: 438-442.
- Ivanenko Y.A. (2001): *Diphasiastrum nikoense* (Lycopodiaceae), a new species for the flora of Russia. - *Bot. Zhurn.* 86. (9): 125-128.
- Ivanenko Y.A. (2003): Novyj vid *Diphasiastrum* (Lycopodiaceae) iz Kitaâ i Vostočnoj Indii (A new species of *Diphasiastrum* (Lycopodiaceae) – from China and the Eastern India). *Bot. Zhurn.* 88(9): 128-134, 1 Taf.
- Jäger E.J. & Werner K. (2005): *Exkursionsflora von Deutschland*. Begr. von W. Rothmaler. Bd. 4: Kritischer Band., 10. Aufl., p. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Jalas J. & Suominen J. (eds.) (1972): *Atlas Florae Europaeae. Distribution of Vascular Plants in Europe*. - 1. Pteridophyta (Psilotaceae to Azollaceae). — The Committee for Mapping the Flora of Europe & Societas Biologica Fennica Vanamo, Helsinki.

- Jermy A.C. (1978): Atlas of Ferns of the British Isles (ed.) & Arnold H.R., Farrell L. & Perring F.H.: Botanical Society of the British Isles and British Pteridological Society. London.
- Jermy A.C. (1993): *Diphasiastrum*. J. Holub Pp. 4 – 5, in Tutin, T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M. and Webb D.A., eds. *Flora Europaea*. Vol. 1: *Psilotaceae to Platanaceae*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jerome C. (2002): Une station nouvelle de *Diphasiastrum issleri* (Rouy) Holub dans le massif vosgien. *Monde Pl.* 97 (475): 10.
- Johns R.J., Edwards P.J., Uttridge T.M.A., Hopkins H.C.F. (2006): A Guide to Alpine and Subalpine Flora of Mt Jaya.- Royal Botanical Garden, Kew.
- Kalio P., Laute U. et Mäkinen Y. (1969): Vascular flora of Inari Lapland. - 1. Introduction and Lycopodiaceae – Polypodiaceae. – *Annal. Univ. Turkuensis, Ser. A, Biol.* –Georg., Turku, 42: 1-108.
- Krahulcová A., Chrtek J., Krahulec F. (1999): Autogamy in *Hieracium* subgen. *Pilosella*. - *Folia Geobotanica* 34(3): 373-376.
- Krahulec F., Krahulcova, A., Fehrer J., Brautigam S., Plackova I., Chrtekjun J. (2004): The sudetic group of *Hieracium* subgen. *Pilosella* from the Krkonose Mts: a synthetic view. - *Preslia* 76(3): 223-243.
- Kubát K. (1997): Lycopodiaceae – In: Hejný S. & Slavík B. (eds.): *Květena České republiky 2. vyd.*, Academia, Praha 1997.
- Kubát K. (2002): Lycopodiaceae – In Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J.(eds.) (2002): *Klíč ke květeně České republiky*, Academia, Praha.
- Kubitzki K. (1990): The families and genera of vascular plants. - Springer, Berlin, p. 36-37.
- Kuehn M.M., Minor J.E., White B.N. (1999): An examination of hybridization between the cattail species *Typha latifolia* and *Typha angustifolia* using random amplified polymorphic DNA and chloroplast DNA markers.- *Mol. Ecol.* 8, 1981–1990.
- Kukkonen I.(1967): STUDIES ON VARIABILITY OF DIPHASIUM (LYCOPODIUM) COMPLANATUM COMPLEX IN FINLAND. - *Botaniska Notiser* 120(4): 500-504.
- Kukkonen I. (1970): A nomenclatural note on the Fennoscandian *Diphasium complanatum*. – *Annal. Bot. Fenn.*, Helsinki, 7: 142.
- Kukkonen I. (1994): NOTES ON THE TREATMENT OF THE FAMILY LYCOPODIACEAE FOR FLORA-NORDICA. - *Annales Botanici Fennici* 31(3): 197-202.
- Kukkonen I. (2000): Lycopodiaceae. Pp. 1–13, in Jonsell, B., ed. *Flora Nordica*. Volume 1. Lycopodiaceae to Polygonaceae. - Bergius Foundation, The Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm.
- Kuo C.-M. (1985): Taxonomy and phytogeography of Taiwanese pteridophytes. - *Taiwania* 30: 5-99.
- Lawalrée A. (1957): Une Lycopode ardennaise méconnu, *Lycopodium issleri*. – *Bull. Soc. Bot. Belg.*, Bruxelles, 90: 109-120.
- Lexer C., Lai Z. & Riesberg L.H. (2003): Candidate gene polymorphism associated with salt tolerance in wild sunflower hybrids: implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *New Phytol.* 131: 255-233.
- Löve Á. & Löve D. (1948): Chromosome numbers of northern plant species. – University Institute of Applied Sciences, Department of Agriculture Reports, Ser. B 3: 1–131, Reykjavik, p 3.
- Löve Á. & Löve D. (1961): Somme nomenclatural Changes in the european Flora. - *Bot. Not.* 114: 34-47.
- Mallet J. (2005): Hybridization as an invasion of the genome. - *Trends in Ecology and Evolution* 20: 5.
- Mallet J. (2007): Hybrid speciation. – *Nature* 446: 279-283.
- Mallet J. (2008): Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. - *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 2971-2986.
- Marhold K., Suda J. (2002): *Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii*, Karolinum, Praha.

- Marhold K., Mártonfi P., Mered'a P., Mráz P. (2007): Chromosome Number Survey of the Ferns and Flowering Plants of Slovakia, Bratislava : Veda, p 5.
- Marris M.E. (2007): The species and the specious. - *Nature* 446: 250-253.
- Manton I. (1950): Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. University Press, Cambridge.
- Mavárez J., Salazar C.A., Bermingham E., Salcedo C. & Jiggins C.D. (2006): Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. - *Nature* 441: 868 – 871.
- Mayr E. (1942): Systematics and the origin of species. New York: Columbia University Press.
- Mennema J., Quené-Boterenbroad A.J., Plate C.L. (1980): Atlas of the Netherlands Flora - extinct and very rare species. The Hague-Boston-London.
- Meusel H., Jäger E. & Weinert E. (1965): Vergleichende Chorologie der entraleuropäischen Flora 1., VEB Fischer, Jena, p. 5.
- Moore W.S. (1977): An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. - *Q. Rev. Biol.* 52: 263-277.
- Mossberg B., Stenberg L. & Erricson S. (1992): Den Nordiska Floran. Stockholm.
- Müller M.J., Vagts I. and Frese E. (1997): Pflanzliche Regenerationsstrategien und Besiedlungsdynamik in nordwestdeutschen *Calluna*-Heiden nach Brand. *NNA-Berichte* 10: 87-104.
- Muller S., Jérôme C. & Horn K. (2003): Importance of secondary habitats and need for ecological management for the conservation of *Diphasiastrum tristachyum* (Lycopodiaceae, Pteridophyta) in the Vosges Mountains (France). - *Biodiversity and Conservation* 12: 321-332.
- Neustpa J. (2006): Co je to geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně. - *Živa* 54: 54-56.
- Ninan C.A. (1958): Studies on the cytology and phylogeny of the Pteridophytes II. Observations on the genus *Lycopodium*. - *Proc. Natl. Inst. Sci. India* 24: 54-56.
- Oberdorfer E. (2001): Pflanzensoziologische Exkursionsflora für Deutschland und angrenzende Gebiete. 8th edn. Ulmer, Stuttgart, Germany
- Oinonen E. (1968): The size of *Lycopodium clavatum* L. and *L. annotinum* L. stands as compared to that of *L. complanatum* L. and *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn stands, the age of tree stands and the dates of fire on the site. - *Acta Forestalia Fennica* 87: 1-53.
- Olivier I., Galland J.-P. and Maurin H. (1995): Livre rouge de la flore menacée de France. Tome 1: Espèces prioritaires. Museum National d'histoire naturelle, Paris..
- Øllgaard B. (1987): A revised classification of the Lycopodiaceae s. lat. - *Opera Botanica* 92: 153-178.
- Øllgaard B. (1989): Index of the *Lycopodiaceae*. *Biol. Skrifter* 34: 1-135.
- Øllgaard B. (1990): Lycopodiaceae. Pp. 31 – 39, in Kramer K.U. and P.S. Green, eds. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Vol. 1. *Pteridophytes and Gymnosperms*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Øllgaard O.B. & Tind K. (1993): Scandinavian ferns. A Natural History of the Ferns, Clubmosses, Quillworts, and Horsetails of Denmark, Norway, and Sweden. Rhodos, Copenhagen, Denmark.
- Øllgaard B. (1995): *Lycopodium* L. Pp. 20 – 22, in Davidse G., M. Sousa and S. Knapp, eds. *Flora Mesoamericana*. Vol. 1: *Psilotaceae a Salviniaceae*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Mexico D.F., Missouri Botanical Garden, Missouri, The Natural History Museum, London
- Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. [eds.]: *Methods in Cell Biology*: 105-110, Academic Press, New York.
- Otto S.P. & Whitton J. (2000): Polyploid incidence and evolution. – *Annu. Rev. Genet.* 34: 401-437.
- Pacyna A. (1972): Biometrics and taxonomy of the Polish species of the genus *Diphasiastrum* Presl. – *Fragm. Flor. Geobot.*, Kraków, 18: 255-297.
- Porsild M.P. (1935): The Greenland species of *Lycopodium* sect. *Complanata* Victorin. *Meddel om Grønland* 93: 3-24.
- Proctor G.R. (1985): Ferns of Jamaica. A guide to the pteridophytes. British Museum (Natural History), London.



- Procházka F. (1965): K rozšíření Pteridophyt na Šumavě a v Předšumaví. - Sborník Jihočeského Muzea České Budějovice, Přírodní vědy 5: 37-60.
- Procházka F. (1966): K problematice chráněných druhů kaprad'orostů v Československu. - Ochrana Přírody 21: 141-144.
- Procházka F. (1997): *Diphasiastrum oellgaardii* - a new species in the flora of the Czech Republic. - *Preslia* 69: 169-173.
- Procházka F. (1998): Novinky šumavské květeny. - *Zpr. Čes. Bot. Společ.*, Praha 32(1997): 123-136.
- Procházka P. (1999): *Diphasiastrum* - In Čeřovský J., Feráková V., Holub J., Maglocký Š. & Procházka F. (eds.): Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SR. 5., Příroda, Bratislava, p. 132-33.
- Procházka F. [ed.] (2001): Černý a Červený seznam cévnatých rostlin České Republiky (stav v roce 2000). - *Příroda* 18: 1-166.
- Procházka F., Švarc J. Vaněčková L. (1998): Nová lokalita plavuníků (*Diphasiastrum*) v jihovýchodních Čechách. - *Vlastiv. Sborn. Vysočiny, Jihlava, sect. natur.* 13: 283-286.
- Procházka F. & Harčarik J. (1999): New localities of *Diphasiastrum* species in the Krkonoše Mts and elsewhere in the Czech Republic where three or more species of this genus are recorded. - *Preslia*, Praha 71: 193-215.
- Rauschert S. (1967): Taxonomie und Chorologie der *Diphasiastrum*-Arten Deutschlands (*Lycopodiaceae*). - *Hercynia*, Leipzig, 4: 439 - 481.
- Rhymer J.M.; Simberloff D. (1996): Extinction by hybridization and introgression. - *Annu. Rev. Ecol.Syst.* 27: 83-100
- Rieseberg L.H. (1997): Hybrid origins of plant species. - *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359-389.
- Rieseberg L.H. & Wendel J.F. (1993): Introgression and its consequences in plants. Pp. 70-109 in *Hybrid zones and the evolutionary process*, ed. Harrison R.G. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Rieseberg L.H. & Willis J.H. (2007): Plant speciation. - *Science* 317: 910-914.
- Robertson G., Schein J., Chiu R., Corbett R., Field M., Jackman S.D., Mungall K. (2010): De novo assembly and analysis of RNA-seq data.
- Rohlf F.J. (2006): *TpsDigVersion 2.05*. - Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf F.J. (2010): *Tps Dig*, ver.2.16, *Tps Utility program* ver. 1.46.
- Rohlf F.J., Corti M. (2000): Use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. - *Systematic Biology* 49 (4): 740-753.
- Rothmaler W. (1930): Pteridophyten-Studien I. - *Feddes Repetitorium* 54: 52-82.
- Rothmaler W. (1944): Pteridophyten - Studien I. In P. E. Fedde, *Rep. Spec. nov. reg. veg.* 54: 55-82.
- Schierenbeck K.A., Ellstrand N.C. (2009): Hybridization and the evolution of invasiveness in plants and other organisms. - *Biological Invasions* 11: 1093-1105
- Scheuerer M., Eicher M. and Herre P. (1991): Bestandssituation, Standortansprüche und Maßnahmen zur Erhaltung asugewählter stark gefährdeter Arten auf Sanden im Landkreis Kelheim, unter Einbeziehung von Standorten in der Oberpfalz. *Schriftenreihe des Bayerischen Landesamtes für Umweltschutz* 102: 47-60.
- Schumacker R. (1978): Le lycopode *Diphasiastrum tristachyum* (Pursh) Holub en Adrenne. *Commentaires chorologiques, phytosociologiques et écologiques. Description d'une station récemment découverte à Spa-Malchamps (Prov. De Liège, Belgique)*. - *Naturalistes Belges* 59: 276-285.
- Seehausen O. (2004): Hybridization and adaptive radiation. - *Trends Evol. Evol.* 19: 198-207.
- Seehausen O., van Alphen J. J. M. and Witte F. (1997): Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. - *Science* 277:1808-1811.
- Siplivinskij V.N. (1973): Zamětki o bajkal'skoj flore, 1. - *Novosti Sist. Vysšich Rast.*, Leningrad, 10/1973: 345-361.

- Slice D.E. (2005): Modern morphometrics. In: *Modern Morphometrics In Physical Anthropology*. New York: Kluwer Acad.
- Stebbins G.L. (1959): The role of hybridization in evolution. *Proceeding of the American Philosophical Society* 103: 231-251.
- Steyermark J.A., Berry P.E., Holst B.K. (1999): *Flora of the Venezuelan Guayana*. - Vol.2. Missouri Bot.Garden Press. St.Louis.
- Stoor A.M., Boudrie M., Jerome C., Horn K. & Bennert H.W. (1996): *Diphasiastrum oellgaardii* (Lycopodiaceae, Pteridophyta), a new lycopod species from Central Europe and France. *Feddes Repertorium* 107: 149-157.
- Suda J. (2004): An employment of flow cytometry into plant biosystematics. Ms. [Disert. práce, depon. in: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Suda, J. (2005): Co se skrývá za průtokovou cytometrií? - *Živa* 53: 46-48.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Rosenbaumová R., Peckert T. & Krahulec F. (2007): Genome size variation and species relationships in *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. - *Annals of Botany* 100/6: 1323-1335.
- Szafer W., Kulczyński S., Pawłowski B. (1967): *Rosliny Polskie*. - Warszawa.
- Šmilauer P. (2003): *Canoco for Windows* 1993-2003.
- Šmilauer P. & Lepš J. (2000): Mnohorozměrná analýza ekologických dat. Biologická fakulta JČU, České Budějovice.
- Takeda H. (1909): Lycopodiales Hokkaidos, nebst denen von Japanisch-Sachalin. - *Bot. Mag. Tokyo* 23: 200-243.
- Thulin M., Aagard S.M.D., Wikström N. & Jarvis C. (2009): Revised lectotypification of *Lycopodium complanatum* L. (Lycopodiaceae). - *Taxon* 58(3): 974-976.
- Tolmachev A.I., Packer J.G. and Griffiths G.C.D. (1995): *Flora of the Russian Arctic. A Critical Review of the Vascular Plants Occuring in the Arctic Region of the Former Soviet Union*. Vol.1. University of Alberta Press, Alberta, Canada.
- Tsitrona A., Kirkpatrick M., Levin D.A. (2003): A model for chloroplast capture.- *Evolution* 57(8): 1776-82.
- Urfus T. & Vít P. (2009): Plavuníky = tajemní návštěvníci z pravěku. – *Živa* 6/2009: 251-254.
- Urfus T., Ekrť L., Dvořáková K., Vít P. (2012): Biosystematic study of Central European *Diphasiastrum* species. – International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, Praha. (posterové sdělení)
- Victorin F.M. (1925): Les Lycopodiales du Quebec et leurs formes mineures. - *Contrib. Lab. Bot. Univ. Montreal* 3: 1-117.
- Victorin M. (1932): Sur quelques Ptéridophytes nord-américaines. – *Contrib. Laborat. Bot. Univ. Montréal* 21: 1-7.
- Vogel J.C. & Rumsey F.J. (1999): On the status of *Diphasiastrum oellgaardii* (Lycopodiaceae, Pteridophyta). - *Feddes Repertorium* 110: 439-445.
- Wagner F.S. (1992): CYTOLOGICAL PROBLEMS IN LYCOPODIUM SENS LAT. - *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79(3): 718-729.
- Wagner W.H., Wagner F.S. & Beitel J.M. (1985): Evidence for interspecific hybridization in pteridophytes with subterranean mycoparasitic gametophytes. Pp. 273-281 in Dyer A.F. & Page C.N. (eds.), *Biology of pteridophytes*. Proc. Roy. Soc. Edinburgh 86B.
- Wagner W.H. & Beitel J.M. (1993): Lycopodiaceae. Pp. 18 – 37 in: *Flora of North America* editorial committee (eds.), *Flora of North America: North of Mexico*, vol.2, *Pteridophytes and Gymnosperms*. Oxford University Press, Oxford.
- Whittier D.P. (1981): Gametophytes of *Lycopodium digitatum* (formerly *L. complanatum* var. *flabelliforme*) as grown in axenic culture. - *Bot. Gaz. (Crawfordsville)* 142: 519-24.
- Wikstrom N. & Kenrick P. (1997). Phylogeny of Lycopodiaceae (Lycopsidea) and the relationships of *Phylloglossum drummondii* kunze based on rbcL sequences. - *International Journal of Plant Sciences* 158(6): 862-871.

- Wilce J.H. (1961): *Lycopodium complanatum* L. and four new allied species of the Old World. - *Nova Hedwigia* 3: 93-117.
- Wilce J.H. (1965): Section *Complanata* of the genus *Lycopodium*. – *Beih. Nova Hedwigia* 19: 1-233.
- Wissemann V., Riedel M., Riederer M. (2007): Matroclinal inheritance of cuticular waxes in reciprocal hybrids of *Rosa* species, sect. *Caninae* (Rosaceae). - *Plant Systematics and Evolution* 263(3-4): 181-190.
- Wójcicki J.J. (1991): Variability of *Prunus fruticosa* Pall. and the problem of antropohybridization. In: Zarzycki K., Landolt E. & Wójcicki J. J. [eds.] (1991): Contributions to the knowledge of flora and vegetation of Poland. Vol. 1. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH 106: 257-265, Stiftung Rübel, Zürich.
- Wolf D. E. et al. (2000): Predicting the Risk of Extinction through Hybridization. - *Conserv. Biol.* 15: 1039-1053.
- Xianchun Z. and Libing Z. (2004): *Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Vol. 6, part 3. Pteridophyta. Huperziaceae, Lycopodiaceae, Selaginellaceae, Isoëtaceae, Equisetaceae, Psilotaceae, Marattiaceae. Cyathaceae.* - Science Press, Beijing.
- Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets D.H. & Fink W.L. (2004): Geometric morphometrics for biologists: a primer. – Elsevier Academic Press, London.
- Zimmermann W. (1964): Koniklece ČSSR a jejich zvláštnosti. - *Ochrana přírody* 19: 44-47.