

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Cytotypová variabilita *Huperzia selago* agg. ve
střední Evropě**

Bakalářská práce

Joel Krejčí

Školitel: RNDr. Libor Ekrt, Ph. D.

České Budějovice 2018

Krejčí J., 2018: Cytotypová variabilita *Huperzia selago* agg. ve střední Evropě [Cytotype variability in *Huperzia selago* agg. in middle Europe, Bc. Thesis, in Czech] – 49 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace: Byla studována cytotypová variabilita *Huperzia selago* agg. v Evropě. Byly porovnávány vzorky z montánních (do 1000 m n. m. včetně) a vyšších poloh. Tyto vzorky byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Byly nalezeny dva cytotypy.

Anotation: Cytotype variability of *Huperzia selago* agg. in Europe was studied. Samples from montane (lower or equal to 1000 m over sea level) and higher elevations were compared. Flow cytometry was used to analyse these samples. Two cytotypes were found.

Klíčová slova: *Huperzia selago*, vranec jedlový, cytotypová variabilita, Evropa, stanovení cytotypů

Keywords: *Huperzia selago*, Northern firmoss, cytotype variability, Europe, cytotype determination

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 15. 4. 2018

.....

Joel Krejčí

Poděkování

Děkuji svému školiteli Liboru Ekrtovi za vedení mé bakalářské práce a pomoc při prováděných analýzách. Děkuji také Milanu Štechovi, Petru Kouteckému a ostatním kolegům z katedry botaniky za cenné připomínky k obsahu práce. Rovněž děkuji všem, kteří mi pomohli se sběrem vzorků. Velký dík patří mé rodině, která mě podporovala nejen psychicky ale i fyzicky a byla mi, a stále je, velkou oporou.

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	1
2.1	Systematické zařazení.....	2
2.2	Rod <i>Huperzia</i>	2
2.3	Metody klasifikace.....	3
2.4	Rozšíření.....	4
2.4.1	<i>Huperzia</i> v Evropě.....	5
2.4.1.1	<i>Huperzia selago</i>	6
2.4.1.2	<i>Huperzia arctica</i>	9
2.4.1.3	<i>Huperzia appressa</i>	10
2.4.1.4	<i>Huperzia continentalis</i>	12
2.4.2	<i>Huperzia</i> v Asii.....	14
2.4.3	<i>Huperzia</i> v Americe.....	14
2.4.4	Cytologie.....	15
3	Metodika.....	20
3.1	Sběr vzorků.....	20
3.2	Průtoková cytometrie.....	20
3.2.1	Software.....	21
4	Výsledky.....	22
4.1	Velikost genomu <i>H. selago</i> agg. v Evropě.....	22
4.2	Porovnání vysušených a živých vzorků.....	25
4.3	Rozšíření zaznamenaných cytotypů.....	26
4.4	Výškové rozložení nálezů.....	27
5	Diskuze.....	30
5.1	Porovnání vzorků z montánních a subalpínských poloh.....	30
5.2	Porovnání živých a vysušených vzorků.....	31
5.3	Nalezené cytologické údaje.....	32

5.3.1	Základní chromozomové počty u čeledi Lycopodiaceae	32
5.3.2	Hodnocení stupně ploidie u rodu <i>Huperzia</i>	33
5.4	Pilotní porovnání vzorků z Evropy se vzorky ze Severní Ameriky	34
6	Závěr.....	35
7	Seznam použitých zdrojů.....	37
7.1	Literatura	37
7.2	Internetové zdroje	41
7.3	Software	41
8	Přílohy	42

1 Úvod

Rod *Huperzia* (vranec) obsahuje podle nového úzkého vymezení 25 druhů v boreální a temperátní zóně převážně severní a ojediněle i jižní polokoule (Field et al. 2016, PPGI 2016). Jedná se o nevysoké plavuňovité rostliny řazené do čeledi Lycopodiaceae, které namísto výtrusnicového klasu (strobilu) a plazivého prýtu, které jsou typické pro plavuně (*Lycopodium*), tvoří sporangia v paždí mikrofytlů na převážně vzpřímeném prýtu (Wagner & Beitel 1993). Většina prací popisující květeny Evropy uvádí (kromě specifické oblasti Makaronézie) pouze dva taxony v rámci rodu *Huperzia*. Ze severovýchodních oblastí (Island, severní Evropa, Sibiř...) je uváděna *H. arctica* a prakticky v celé Evropě *H. selago* (Valentine & Moore 1993, Kukkonen 2000, Blockeel 2006). Situace se však zdá být komplikovanější, neboť některé pozdější práce zabývající se rodem *Huperzia* mimo Evropu (Zhang & Iwatsuki 2013, Gilman & Testo 2015, Testo et al. 2016, Panarctic Flora 2018) uvádějí z Evropy rovněž výskyt dalších druhů: *H. appressa* a *H. continentalis*, o kterých však zatím neexistují ucelené údaje. Jedním z důvodů, proč je rod *Huperzia* obtížně studovatelný, a nebyl proto dosud v Evropě zevrubně zkoumán, je patrně vysoký počet chromozomů a jejich obtížné počítání (Manton 1950, Wagner 1992). Další komplikací je, že zjištěné chromozomové počty se od sebe výrazně liší (viz kap. 5.4) a rovněž fakt, že na cytologii neexistuje jednotný pohled (viz např. Löve & Löve 1961a, Wagner & Beitel 1993, Flora of the Canadian Arctic Archipelago 2018)

Řada severovýchodních druhů rostlin roste ve střední Evropě na horách jako glaciální relikty (Birks & Willis 2008). Hlavním důvodem pro zadání této bakalářské práce bylo zjistit, zda se rostliny vyskytující se v různých nadmořských výškách (montánní vs. subalpínské polohy) liší ve velikosti genomu. Respektive, zda se ve vysokých polohách evropských hor nedochovaly reliktní populace rostlin, které jsou cytotypově bližší rostlinám rostoucím na severu při porovnání s rostlinami rostoucími v nižších (zejména montánních) polohách střední Evropy.

2 Cíle práce

Cíle této bakalářské práce je možno stručně shrnout do následujících bodů:

- Provést literární rešerši k problematice *Huperzia selago* agg.
- Zjistit, zda existuje variabilita ve velikosti genomu u *Huperzia selago* agg. ve střední Evropě.

- Porovnat velikost genomu rostlin na gradientu nadmořské výšky (montání polohy, polohy vysokých sudet Krkonoš a Jeseníků a vysokohorské polohy Karpat a Alp).

2.1 Systematické zařazení

Rod *Huperzia* je řazen do třídy Lycopodiopsida, řádu Lycopodiales, čeledi Lycopodiaceae a podčeledi Huperzioideae (PPGI 2016). Plavuňovité (Lycopodiopsida) dominovaly terestrické flóře co do velikosti i diverzity v Devonu a Karbonu. V dalších obdobích však byly potlačeny jinými skupinami rostlin a nyní představují již pouze necelé 1 % světové flóry (Field et al. 2016). V této třídě se nalézají tři řády: Isoëtales (asi 150 druhů), Selaginellales (asi 700 druhů) a Lycopodiales (asi 200–500 druhů). Lycopodiales jsou oproti dvěma dříve zmíněným řádům homosporické a zároveň z nich zaujímají největší spektrum stanovišť. Čeleď Lycopodiaceae je kosmopolitně rozšířená avšak největší druhové bohatosti dosahuje v tropech (Zhang & Iwatsuki 2013, Judd et al. 2016). Systematika čeledi se v průběhu času měnila. Počet rodů zde osciloval mezi dvěma a šestnácti. Jednotlivé druhy byly opakovaně přerazovány do odlišných rodů. Například epifytické druhy byly přerazovány mezi rody *Lycopodium*, *Urostachys*, *Huperzia* a *Phlegmariurus*. Nejnovější molekulární fylogenetické studie silně podpořily monofyletickou podčeleď Huperzioideae, stejně jako *Huperzia* s. s. (Field et al. 2016). Podčeleď Huperzioideae obsahuje tři rody: *Huperzia*, *Phlegmariurus* a *Phylloglossum* (PPGI 2016).

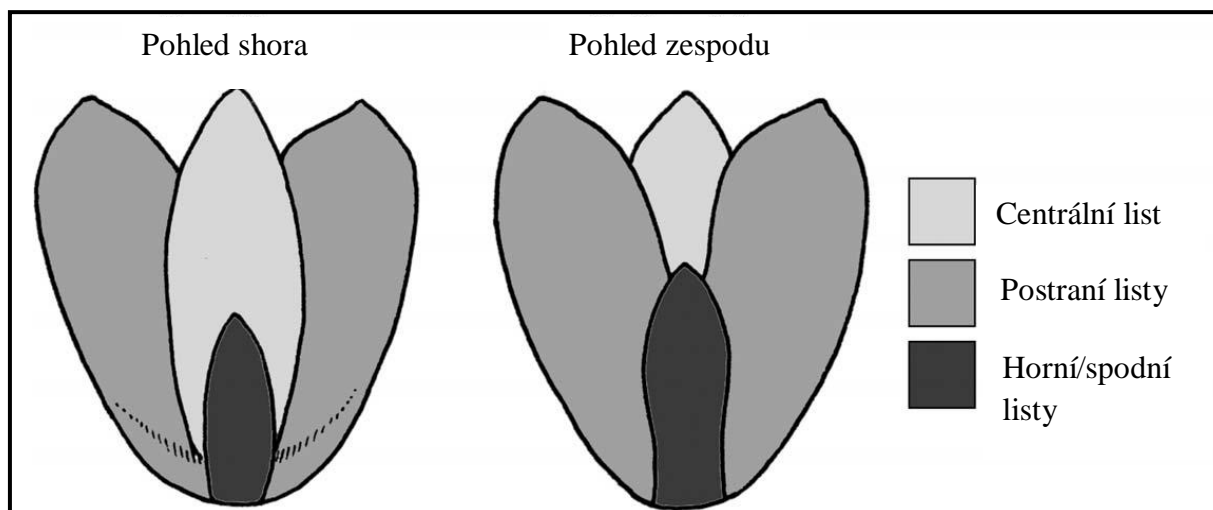
2.2 Rod *Huperzia*

Rod *Huperzia* ve svém úzkém vymezení (sensu stricto) obsahuje 25 druhů (PPGI 2016). Tento rod je silně molekulárně podpořen a odpovídá skupině *Huperzia selago* sensu Øllgaard (1987), nebo *Huperzia* podrod *Huperzia* sensu Holub. Hlavní diverzity dosahuje v temperátních a subtropických oblastech severní polokoule (Field et al. 2016). Vyznačuje se vegetativním množením pomocí pupenů (gem, bulbil) a sporami s konkávními postranními hranami a zešíkmenými (truncate) rohy (Field et al. 2016). Nevyskytují se zde horizontální prýty, jen vzpřímené či poléhavé, které se mohou dichotomicky větvit. Většinou mají kruhovitý průřez a obvykle se nacházejí shloučené do keříčků, přičemž mají většinou neukončený růst. Nejčastěji se v nich nalézají aktinostélé, či plektostélé, často se jednotlivé typy vyskytují v různých částech rostliny (Wagner & Beitel 1993, Zhang & Iwatsuki 2013). Mikrofyly mohou být různého tvaru i velikosti, obvykle jsou však mladé mikrofyly větší, než ty starší. Okraje mohou být nepravidelně zubaté, nebo hladké. V paždí listů se tvoří

sporangia přibližně ledvinitého tvaru, která se otevírají příčnou (transverzální) štěrbinou (Wagner & Beitel 1993, Judd et al. 2016). Nevyskytují se zde výtrusné šišťice (strobily). Fertilní mikrofyly mohou být na stonku organizovány do horizontálních pruhů, nebo mohou být nepravidelně roztroušené. Spory jsou mělce rýhované, či jamkovité struktury, triletní a silnostěnné. Podzemní gametofyty jsou nezelené, tvaru eliptického až lineárního. Ke svému klíčení potřebují mykorhizní vztah, což je typické pro celou čeleď Lycopodiaceae (Wagner & Beitel 1993, Fernández et al. 2011). Na spodní straně prothalií se nalézají rhizoidy (Sen & Sen 1978).

2.3 Metody klasifikace

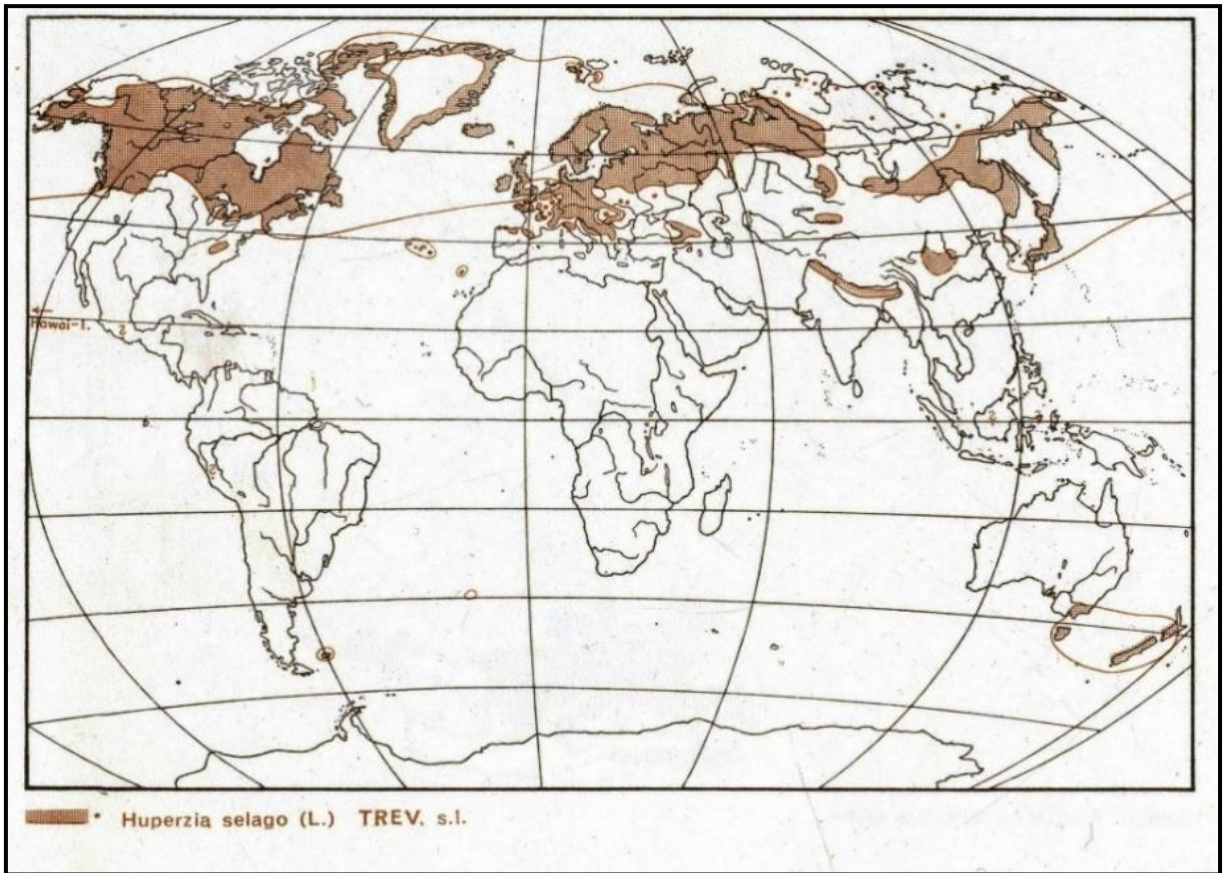
Ze systematického pohledu je *Huperzia* poměrně komplikovaný rod, který by si zasloužil důkladné morfologické, cytologické a molekulární studium. Zástupci rodu *Huperzia* se morfologicky obtížněji rozpoznávají, neboť se vyznačují poměrně značnou uniformitou prýtu a jinými vcelku nevýraznými morfologickými útvary, které by se daly použít k jednoznačnému odlišení jednotlivých taxonů. Znaky běžně používané pro determinaci jsou výška a průměr stonku, morfologie a připojení mikrofylů ke stonku, barva rostliny a sporangií, velikost spor, poloha gem na stonku a jejich morfologie (Wagner & Beitel 1993, Zhang & Iwatsuki 2013, Gilman & Testo 2015, Testo et al. 2016). Taxonomicky důležitým znakem používaným pro determinaci jednotlivých taxonů je morfologická struktura gem a jejich umístění na prýtu (Gilman & Testo 2015, Testo et al. 2016). Na gemách se měří délka podél nejdelší osy, šířka v nejširším bodě a délka horního a dolního proximálního listu (Obr. 1). Gema se tvoří uvnitř specializovaného úseku prýtu, jenž se nazývá gemifor (gemmiphore). Stejně jako gema se gemifor skládá ze šesti mikrofylů. Zralá gema je poté z gemiforu uvolněna a po dopadu do vhodného substrátu může vytvořit novou rostlinku (Gilman & Testo 2015). U arktických druhů údajně převažuje množení gemami nad pohlavním rozmnožováním (Wagner & Beitel 1993).



Obr. 1: Schematizovaný nákres gemy *Huperzia* (sensu Gilman & Testo 2015, upraveno).

2.4 Rozšíření

Přesné rozšíření řady druhů je dosud nedokonale známo (Gilman & Testo 2015). Současné vymezení rodu *Huperzia* odpovídá prakticky vymezení dřívějšího široce pojatého *Huperzia selago* agg. (Field et al. 2016), čemuž patrně odpovídá i níže uvedená mapa *Huperzia selago* s. l. dle Meusel et al. (1965) viz Obr. 2. Zástupci rodu *Huperzia* se vyskytují na Aljašce, v Kanadě, na severu USA, Havaji, v Grónsku, na Islandu, na Špicberkách, na Madeiře i Azorách, v Evropě, na velké části území Ruska, přičemž v severovýchodním a severním Rusku disjunktně a dále v severní Číně, v Tasmánii, na Novém Zélandu a v jihovýchodní Austrálii (Meusel et al. 1965). Současné údaje uvádějí z tohoto prostoru přibližně 25 druhů (PPGI 2016), přičemž některé taxony mají širší rozšíření na více kontinentech, některé jsou geograficky omezené a některé endemické, například v Makaronézii se vyskytují 2 druhy (1 endemický, Blockeel 2006, Prieto et al. 2008), na Havajských ostrovech 4 druhy (2 endemické, Testo et al. 2016, Explorer 2018, Hawaiian Native Plant Genera 2018) a v Číně 14 druhů (9 endemických, Zhang & Iwatsuki 2013).



Obr. 2: Rozšíření druhu *Huperzia selago* s. l. dle Meusel et al. (1965), které odpovídá současnému vymezení rodu *Huperzia* (s. str.).

2.4.1 *Huperzia* v Evropě

Mnohé starší publikace udávají taxony, dnes uznávané jako samostatné druhy, jako poddruhy *H. selago*, tedy jako součást komplexu *Huperzia selago* s. l. (viz např. Löve & Löve 1961a, Valentine & Moore 1993, Kukkonen 2000, Blockeel 2006). Tato skupina se však postupem času s přibývajícím znalostmi rozpadla na jednotlivé druhy, například v Americe rozdělili Wagner & Beitel (1993) původní tři taxony na sedm druhů, které jsou dodnes uznávány. V Evropě donedávna převažoval koncept více poddruhů v rámci jednoho druhu *H. selago* (Valentine & Moore 1993, Kukkonen 2000, Blockeel 2006). V současnosti jsou tyto taxony hodnoceny spíše na druhové úrovni (Prieto et al. 2008, Fernández et al. 2011). V kontinentální části Evropy byly donedávna rozlišovány především dva taxony. Druhy *H. selago* s. s. a *H. arctica* (podrobnější informace v kapitolách 2.4.1.1 a 2.4.1.2) jsou zmiňovány mnohými autory (Löve & Löve 1961a, Krasnoborov 1988, Valentine & Moore 1993, Kukkonen 2000, Blockeel 2006, Field et al. 2016). *Huperzia selago* se vyskytuje na

většině území Evropy, zatímco *H. arctica* je omezena pouze na severské končiny (Valentine & Moore 1993, Kukkonen 2000, Blockeel 2006). Další taxon – *H. appressa* – byl donedávna systematicky nevyjasněn a byl často synonymizován s *H. arctica*, nebo uváděn jako její poddruh. V současnosti je s ním však obvykle jednáno jako se samostatným druhem (Löve & Löve 1961a, Gilman & Testo 2015, Field et al. 2016, Testo et al. 2016). Pro více informací o tomto druhu viz kapitola 1.4.1.3. V roce 2016 byl v USA popsán nový druh *H. continentalis*, jenž by se měl rovněž vyskytovat v Evropě (Testo et al. 2016), viz kapitola 1.4.1.4. Pro úplnost je třeba dodat, že kromě kontinentální části Evropy se další dva druhy (*H. dentata* a *H. suberecta*) vyskytují na Azorách a Madeiře (Valentine & Moore 1993, Blockeel 2006).

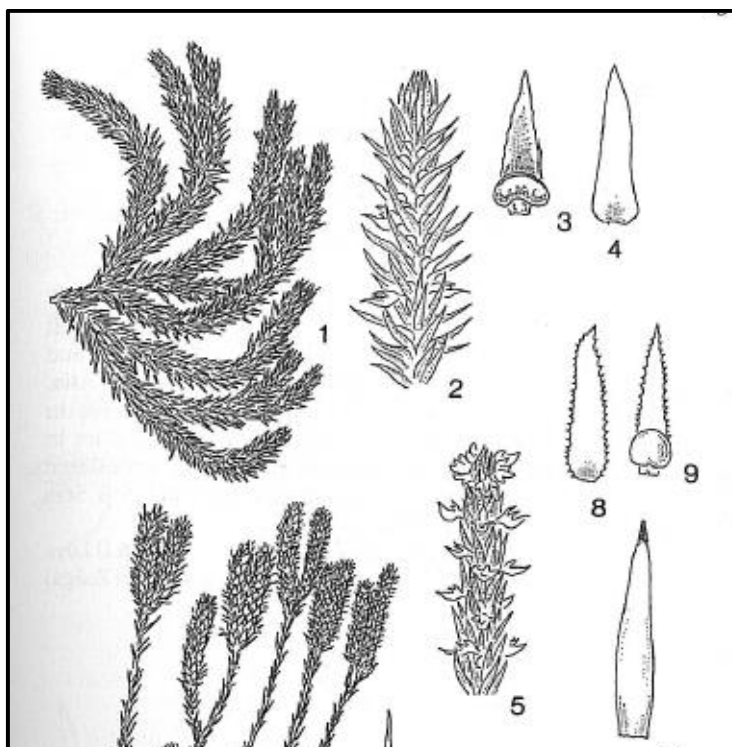
2.4.1.1 *Huperzia selago*

Huperzia selago (Linnaeus) Bernhadi ex Schrank & Martius.

Tento druh je typovým druhem celého rodu (Wagner & Beitel 1993). Dříve se nejčastěji používalo synonymum *Lycopodium selago* L.

Jedná se o terestrické rostliny se vzpřímeným nebo vystoupavým stonkem, který dorůstá délky obvykle 8–12 cm (Wagner & Beitel 1993), nebo 16–25 cm (Sen & Sen 1978, Zhang & Iwatsuki 2013) v závislosti na prostředí. Průměr stonku je okolo 11–16 mm vč. listů, přičemž může být třikrát i čtyřikrát dichotomicky větvený. Tyto stálezelené stonky jsou velmi často sdruženy do podoby keříčků, které mají pouze vláknité kořeny světlehnědé barvy (Hoshizaki & Moran 2001, Flora of the Canadian Arctic Archipelago 2007). V bazální a distální části stonku lze nalézt aktinostélé, zatímco ve střední části se vyskytuje povětšinou plektostélé (Sen & Sen 1978). Mikrofyly jsou lysé, kopinaté, celokrajné a ostře špičaté, nebo nepatrně zubaté. Jejich velikost se pohybuje mezi 3,5 a 7,5 milimetry. Hustě porůstají stonkem a mohou být připojeny v pravém úhlu, nebo natočené vzhůru (Zhang & Iwatsuki 2013). Nalézají-li se rostlina na exponovaném stanovišti, mohou být listy přitisknuté a naopak v zástínu budou odstáté. Stejnou variabilitu vykazuje i zbarvení: ve stínu zelené, na slunci žlutozelené (Sen & Sen 1978, Wagner & Beitel 1993, Hoshizaki & Moran 2001, Flora of the Canadian Arctic Archipelago 2007, Zhang & Iwatsuki 2013). Morfologické struktury uvádí Obr. 3. Na obou stranách listu je patrná střední žíla a rovněž početná stomata. Slizové kanálky se na listech nevyskytují (Wagner & Beitel 1992, Field et al. 2016). Fertilní a sterilní mikrofyly jsou si podobné a rovněž stonkem nemá jasně rozlišeny fertilní a sterilní zóny, kromě báze, která je většinou sterilní (Sen & Sen 1978, Kukkonen 2000, Hoshizaki & Moran 2001). Trofosporofyly se většinou vytvářejí na začátku vegetační sezony a na jejím

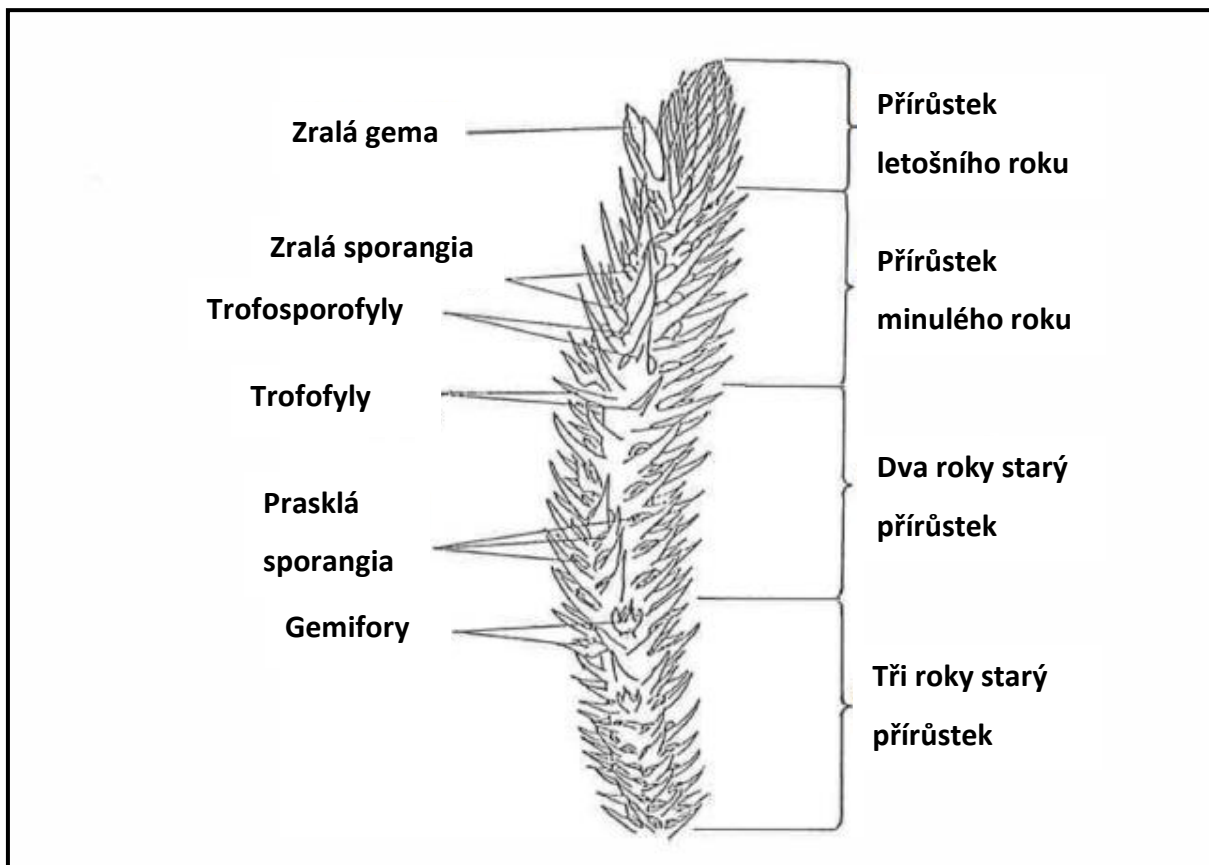
konci se tvoří zase trofofyly (Headley & Callaghan 1990). Sporangia mají dvě stejnocenné chlopně, ve kterých se ukrývají spory o velikosti asi 29–37 μm , které jsou triletní, žlutavé a dírkové (Sen & Sen 1978, Wagner & Beitel 1993, Kukkonen 2000). Sporangia, stejně jako u celého rodu, nejsou nikdy sdružena do šištice (Manton 1950). Gemy mají rozměry 4,0–4,4 x 3,0–3,6 mm, mají obdélníkový až obvejčitý tvar a barvu světle až tmavě zelenou. Jsou produkovány v jedné či dvou pseudorůžicích na konci ročního přírůstku (Wagner & Beitel 1993, Gilman & Testo 2015). Právě produkce gem zajišťuje úspěšné šíření této rostliny v nesourodém prostředí. Jejich klíčivost je běžně 100 %. Gemy v sobě zároveň nesou velké množství živin potřebné pro úspěšný růst nové rostlinky (Headley & Callaghan 1990). Tento způsob vegetativního množení je zároveň jediný, pomíneme-li občasnou fragmentaci velkých klonů, neboť u *H. selago* se nevyskytují horizontální plazivé stonky. Gametofyt je podzemní, nezelený, válcovitý a dlouhý asi 3–10 mm (Kukkonen 2000). Tvoří se v odpověď na lokálně příznivé podmínky (Manton 1950). Whittier (1998) uvádí, že klíčení druhů Lycopodiaceae, zvláště s podzemními mykorrhizními gametofyty, je pomalé, druhu *H. selago* v půdě to trvá asi 3–5 let.



Obr. 3: Ukázka morfologických struktur druhů *H. selago* a *H. arctica*. 1. stonek, 2. prýt, 3. trofosporofyl, 4. trofofyl druhu *H. selago*, 5. prýt *H. arctica* (sensu Blockeel 2006).

Prýt vykazuje modulární růst, což znamená, že se skládá z množství každoročně přirůstajících segmentů (Obr. 4), které mohou být letité (Headley & Callaghan 1990). Jeho velmi nízká růstová rychlost je zřejmě adaptací na neúživné substráty. Růstu rostliny nejlépe vyhovuje střední intenzita světla (Headley & Callaghan 1990, Hoshizaki & Moran 2001). Jeho vysoký vzrůst je mimo jiné jedním ze znaků, které ho odlišují od *H. appressa*. Vyskytuje se na alpínských loukách, ve skalních štěrbinách a výchozech, v lesích, na krajích potoků, v příkopech a mokřadech ve výškách 1900–2300 m (Zhang & Kung 1998, Zhang & Iwatsuki 2013, Gilman & Testo 2015). Wagner a Beitel (1993) oproti tomu udávají výškové rozmezí jeho výskytu jako 0–700, vzácně do 1600 m n. m. Vyskytuje se v severovýchodní a severozápadní Číně, je rozšířen v Evropě, Americe a Austrálii, na tichomořských ostrovech (Zhang & Kung 1998, Zhang & Iwatsuki 2013, Gilman & Testo 2015), rovněž na Kavkaze, Himálaji a v Japonsku (Kukkonen 2000). Některé lokalizace (jako Austrálie, tichomoří, Himálaj) však mohou být udány pro *Huperzia selago* s. l., tudíž zde mohou být zahrnuty i druhy dnes již od *H. selago* s. s. oddělené.

Jednou ze zajímavostí je, že Inuité této rostlině říkají Siqpiijautit, což znamená „to, co léčí siqpik“ (výtok z vnitřního koutku oka). Bylo zjištěno, že po vypití černé tekutiny z vařeného Siqpiijautitu je osoba neschopná pohybu a jen leží na zemi v závrati. V minulosti před příchodem Evropanů údajně používali lidé tento nápoj, aby se opili. Čaj prý dělali lidé z mnoha různých rostlin, avšak pouze tato přiváděla opilost (Flora of the Canadian Arctic Archipelago 2007).



Obr. 4: Morfologie prýtu *H. selago* (sensu Headley & Callaghan 1990, upraveno).

2.4.1.2 *Huperzia arctica*

Huperzia arctica (Grossh. ex Tolm.) Sipliv.

Jedná se o solitérní terestrickou rostlinu. Prýty jsou dlouhé od tří do osmi centimetrů, někdy až do patnácti, široké 4–8 mm a sdružené do trsů. Mikrofyly jsou 3,5–5,5 x 0,8–1,2 mm velké, úzce trojúhelníkovité a celokrajné, občas však s několika nezřetelnými zuby, přitisknuté k prýtu, občas volné, na prýtu v osmi až deseti hustých řadách. Jejich barva (jako celé rostliny) je žlutavě zelená (Obr. 6). Sporangia se otevírají příčnou puklinou a na stonku jsou patrná ještě dlouho po vypuštění spor. Spor je velké množství a barvou odpovídají celkovému vzhledu rostliny. Zrají na podzim, někdy až do příštího léta (Kukkonen 2000, Flora of Svalbard 2018). Gemy mají rozměry 2,4–2,7 x 2,1–2,3 mm, jsou kulatého tvaru, žlutavé barvy a lesklé. Obdobně jako u *H. appressa* jsou gemy produkovány po celé délce ročního přírůstku prýtu a to v někdy i v neobvykle hojném počtu (Gilman & Testo 2015). Ačkoli odpadnou první rok, listy, které jimi byly odtačeny do stran, zůstávají v této poloze po řadu let, čímž dávají rostlině charakteristický vzhled. Oproti sporám, které jsou běžně

větrům roznášeny, jsou gemy balisticky odstřelovány při mechanickém podráždění. Není ovšem vyloučeno, že velmi silný vítr je rovněž schopen gemy roznášet (Flora of Svalbard 2018). Obvykle roste v tundře, ve vřesovištích chráněných před sněhem, suchými sněhovými pánvemi, v sutích a mezi balvany, nebo na skalních svazích, na hranici lesa v exponovaných, vlhkých stanovištích, nebo naopak na sušších místech v kamenných puklinách a na holé rašelině (Kukkonen 2000, Gilman & Testo 2015, Flora of Svalbard 2018). Druh vyhledává častěji acidofilní a cirkumneutrální stanoviště, než bazické. Je-li ale podloží bazické, pak je od něj obvykle izolován vrstvou detritu (Flora of Svalbard 2018). Vyskytuje se téměř cirkumpolárně, v Evropě v severním Norsku, dále v Mongolsku, Japonsku, Číně, a na Sibíři (Mondal & Ghosh 1995, Flora of Svalbard 2018). Byl popsán z Jakutska (Krasnoborov 1988).

Někteří autoři (jako Mondal & Ghosh 1995) se domnívají, že by se mohlo jednat o arktický ekotyp *H. selago* o nejisté ekologické stabilitě.

2.4.1.3 *Huperzia appressa*

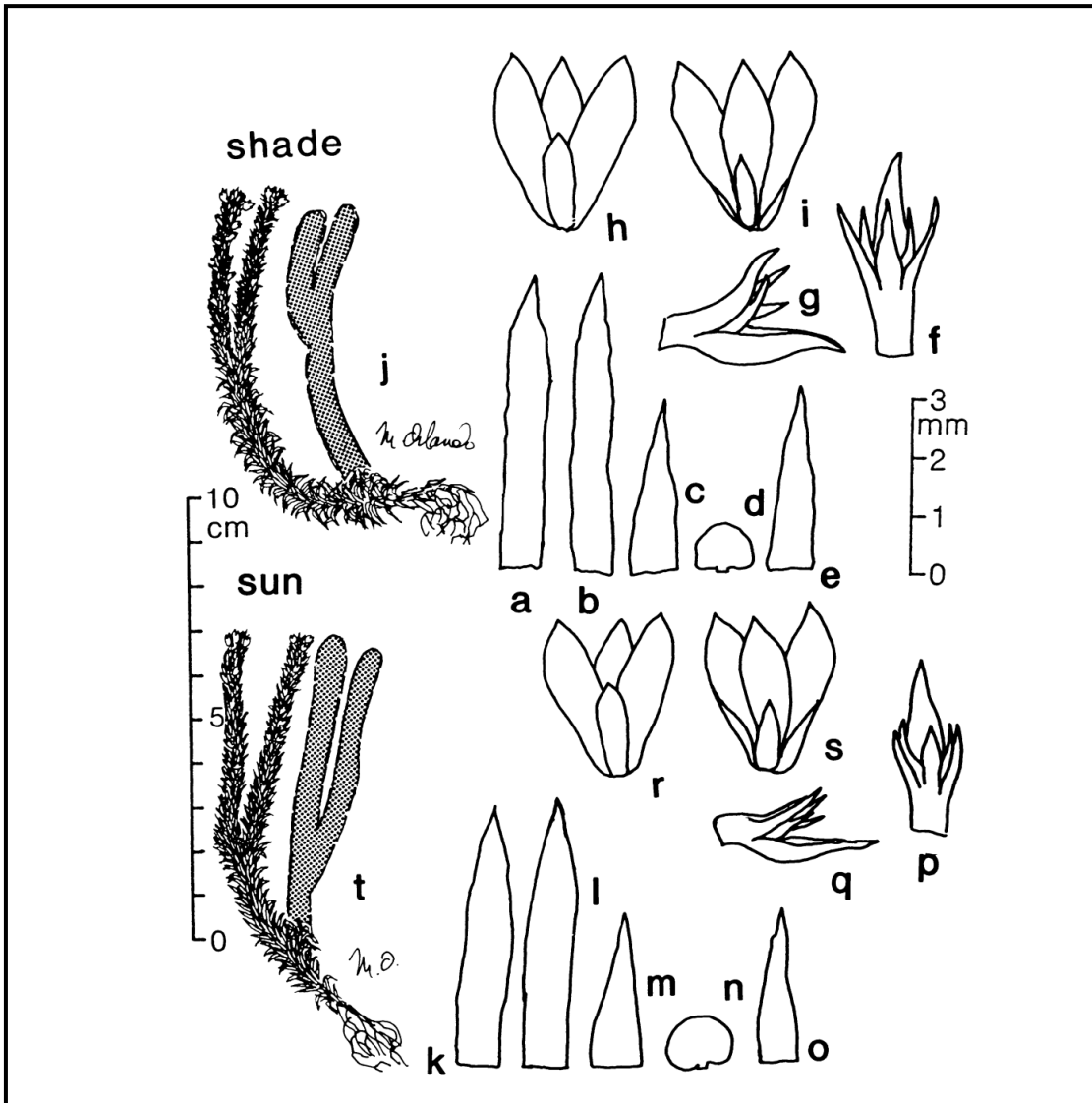
Huperzia appressa (Desvaux) Á. Löve & D. Löve.

Tento druh není akceptován všemi autory, protože je někdy popisován jako poddruh nebo synonymum k *H. arctica* (Kukkonen 2000, Flora of the Canadian Arctic Archipelago 2007). Někdy je považován pouze za přechodný článek mezi *H. selago* a *H. arctica* (Flora of the Canadian Arctic Archipelago 2007). Někteří badatelé (Zhang & Kung 1998) se však domnívají, že by se s ním mělo zacházet jako se samostatným druhem.

Jedná se o terestrickou rostlinu se vzpřímeným nebo vystoupavým stonkem vysokým 6–10 mm a o průměru 5–9 mm, vzácně krátce (do 1 cm) poléhavým. Mikrofyty mají rozměry ca. 2–5 x 0,8–1,3 mm. Jejich barva je žlutá až žlutozelená. Na stonku jsou hustě uspořádané, vzhůru natočené, nebo připojené v pravém úhlu. Mladé listy jsou znatelně větší, než staré. Obě strany listu jsou lysé a okraje jsou hladké, na okraji ojedinele papilnaté. Jsou-li přítomna sporangia, pak mají žlutavou barvu. Spory jsou 29–35 µm velké (Beitel & Mickel 1992, Wagner & Beitel 1993, Zhang & Iwatsuki 2013). Gemy mají rozměry 3–3,4 x 2–2,3 mm, jejich barva je středně až tmavě zelená a tvar čočkovitý. Vyvíjejí se v průběhu celé vegetační sezony oproti například *H. selago*, *H. lucidula* a *H. occidentalis*, kde jsou nahlučené na konci ročního přírůstku (Gilman & Testo 2015). Vyobrazení morfologických struktur *H. appressa* ukazuje Obr. 6. Roste na alpínských loukách a v kamenných štěrbinách, v otevřených oblastech s kyselými vyvěřelinami v nadmořských výškách od 2300 do 5000 m

na severu Severní Ameriky, v Kanadě, Grónsku, na Islandu, v Evropě, Rusku, na Sibiři a v Asii (Beitel & Mickel 1992, Zhang & Iwatsuki 2013, Panarctic Flora 2018). Oproti *H. selago* je menšího vzrůstu, má menší průměr stonku, menší gemifory a gemy a úžeji kopinaté listy. Porovnání s dalšími druhy *Huperzia* ukazuje Tab. 1. Další odlišností od *H. selago*, *H. continentalis* i *H. arctica* je ukončený růst prýtů, které žijí jen asi 12 – 15 let, kdy produkují spory a poté odumřou (Beitel & Mickel 1992).

Beitel & Mickel (1992) popsali v Americe nový druh *H. appalachiana*. Pozdější autoři (Kukkonen 2000, Gilman & Testo 2015, Panarctic Flora 2018) však uvádějí, že druh popsáný jako *H. appalachiana* byl již dříve popsán jako *H. appressa*, protože má toto jméno prioritu. Dle názoru Gilman & Testo (2015) a Panarctic Flora (2018) si Wagner & Beitel buď nebyli vědomi, že popisují již popsáný druh, nebo se domnívali, že jméno *H. appressa* náleží jednomu ze sterilních hybridů, a tudíž ho ignorovali. Druh byl poprvé popsán z Newfoundlandu (Kanada) a jižního Grónska (Panarctic Flora 2018).



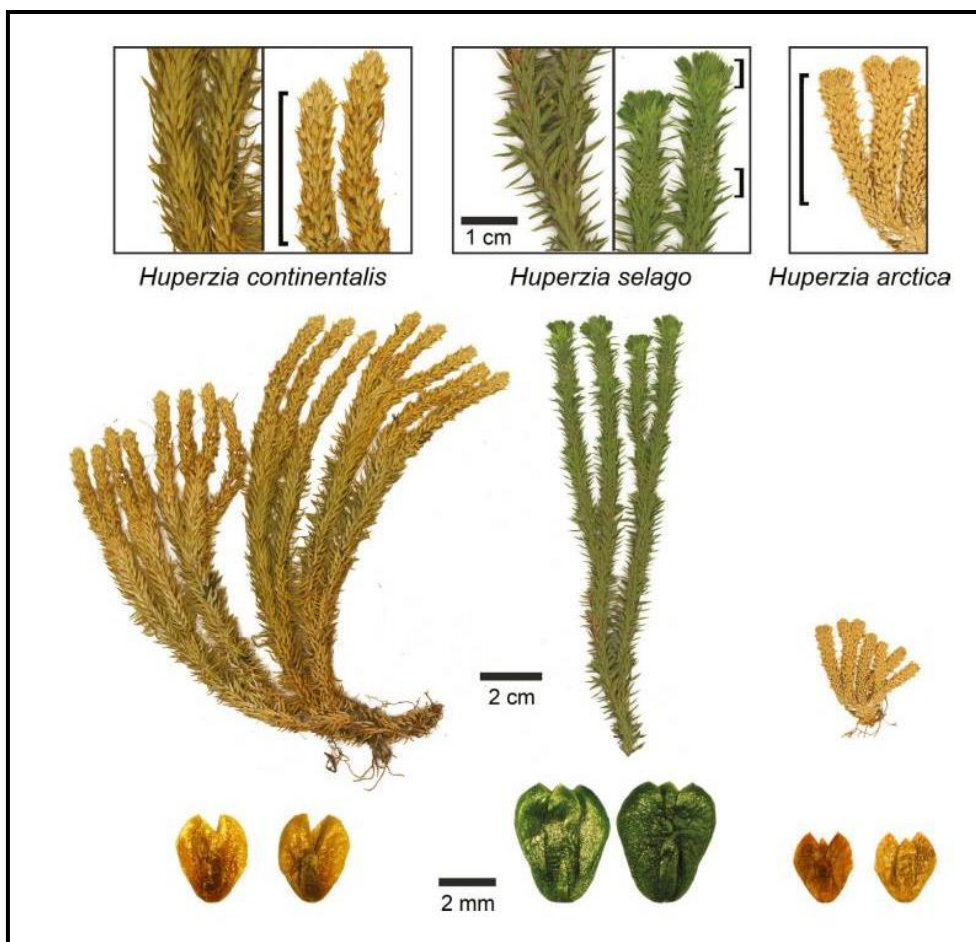
Obr. 5: Morfologické struktury *H. appressa*: **a, b**: listy z mladé (juvenilní) části stonku, **c, e**: mikrofyly ze starší části stonku, kde jsou produkována sporangia, **d**: sporangium, **f**: gemifor seshora, **g**: gemifor z boku, **h**: gema zespodu, **i**: gema seshora, **j**: vzhled rostliny rostoucí ve stínu; **k, l**: mikrofyly z mladé části stonku, **m, o**: mikrofyly ze starší části stonku, kde se produkují sporangia, **n**: sporangium, **p**: gemifor seshora, **q**: gemifor z boku, **r**: gema zespodu, **s**: gema svrchu, **t**: vzhled rostliny rostoucí na slunci (sensu Beitel & Mickel 1992).

2.4.1.4 *Huperzia continentalis*

Huperzia continentalis Testo, A. Haines & A. V. Gilman.

Terestrické rostliny se vzpřímenými, 8–15 (–24) cm dlouhými a 0,8–1,0 mm širokými prýty. Mikrofyly jsou na proximální části stonku 5–7 (10) mm dlouhé a na distální části 2,5–5 mm. Barva mikrofylů je žlutozelená až zlatohnědá. Od ostatních kontinentálních druhů *Huperzia*

(např. *H. selago*, *H. appressa*, *H. lucidula*...) se liší svými postupně dimorfickými listy, které jsou na proximální části stonku kopinaté a na distální široce kopinaté, barvou i lesklostí svých listů. Oproti *H. arctica* je vyšší, má delší a užší listy a větší gemy. Od *H. selago* se liší barvou a umístěním gem, kdy u *H. selago* jsou v pseudorůžicích ročního přírůstku, zatímco u *H. continentalis* podél celé horní části prýtu. Ze všech severoamerických druhů *Huperzia* má nejužší gemy (Gilman & Testo 2015, Testo et al. 2016). Souhrn rozdílných znaků ukazuje Tab. 1 a Obr. 6. Typicky se vyskytuje v subalpínských a alpínských loukách, v tundře a na kamenitých svazích. Preferuje nadmořské výšky mezi 1200–2400 m, ale lze ji nalézt i níže. Výskyt *H. continentalis* zahrnuje severozápad a sever Severní Ameriky, Grónsko, západní a severní Evropu a severovýchodní Rusko (Testo et al. 2016). Testo et al. (2016) oddělil tento druh od *H. haleakalae*, který se tedy vyskytuje již jen endemicky na Havaji.



Obr. 6: Porovnání důležitých morfologických znaků (mikrofyly, prýty a gemy) druhů *H. continentalis*, *H. selago* a *H. arctica* (sensu Testo et al. 2016).

Tab. 1: Porovnání morfologických znaků *H. continentalis*, *H. selago*, *H. arctica* a *H. appressa*. Nebylo možno dohledat všechny uváděné znaky od jednoho autora, nebo se jednotlivé znaky u různých autorů liší, proto jsou znaky uváděné i s označením autora: Wagner & Beitel (1993)¹, Kukkonen (2000)², Zhang & Iwatsuki (2013)³, Gilman & Testo (2015)⁴ a Testo et al. (2016)⁵.

druh	výška (cm)	barva	umístění gem	Velikost spor (μm)	Velikost gem (mm)
<i>H. continentalis</i>	8–15 (-24) ⁵	žlutozelená až zlatohnědá ⁵	podél celého prýtu ⁵	33–40 ⁵	3,0–3,5 × 2,9–3,4 ⁵
<i>H. selago</i>	8–12 ¹ nebo 16–25 ³	tmavě zelená ⁵	pseudorůžice ročního přírůstku ⁵	29–37 ¹	4,0–4,4 × 3,0–3,6 ^{4,5}
<i>H. arctica</i>	3–8 (-15) ²	žlutavě zelená ⁴	podél celého prýtu ⁴	-	2,4–2,7 × 2,1–2,3 ⁴
<i>H. appressa</i>	6–10 ¹	žlutá až žlutozelená ¹	podél celého prýtu ⁴	29–35 ¹	3,0–3,4 × 2,0–2,3 ⁴

2.4.2 Huperzia v Asii

V severovýchodní Asii se nalézají tři druhy *Huperzia*: *H. lucidula*, *H. miyoshiana* a *H. serrata* (Kolbek et al. 2003). V Číně se vyskytuje 14 druhů (*H. bucahwangensis*, *H. nanchuanensis*, *H. chinesis*, *H. miyoshiana*, *H. muscicola*, *H. tibetica*, *H. rubicaulis*, *H. appressa*, *H. somae*, *H. selago*, *H. laipoensis*, *H. emeiensis*, *H. quasipolytrichoides* a *H. medogensis*), z nichž 9 je zde endemických. Celkově se v Asii vyskytují všechny čtyři taxony, které jsou rovněž uváděné z Evropy, tj. *H. selago*, *H. appressa*, *H. continentalis* a *H. arctica* (Wagner & Beitel 1993, Zhang & Iwatsuki 2013, Testo et al. 2016).

2.4.3 Huperzia v Americe

V Severní Americe se celkově vyskytuje 11 druhů *Huperzia*: *H. lucidula*, *H. occidentalis*, *H. porophila*, *H. miyoshiana*, *H. haleakalae*, *H. selago*, *H. appressa* a *H. continentalis*, *H. serrata*, *H. mannii* a *H. erubescens* (Wagner & Beitel 1993, Testo et al. 2016). *H. lucidula* je endemitem východu Severní Ameriky, kde se vyskytuje ve vlhkých jehličnatých, či opadavých lesích do 1800 m výšky a *H. haleakalae* a *H. mannii* se endemiticky vyskytují na Havajských ostrovech (Beitel & Mickel 1992, Testo et al. 2016, Hawaiian Native Plant

Genera 2018). *H. occidentalis* obývá stejné habitaty, jako *H. lucidula* a je jí i morfologicky podobná. *H. miyoshiana* se kromě Ameriky vyskytuje i v Japonsku, Koreji a na Sibiři (Wagner & Beitel 1993). *H. serrata* se v Americe vyskytuje pouze na ostrovech (např. Kuba, nebo Havaj, GBIF 2018). Rod *Huperzia* vykazuje interspecifickou hybridizaci, díky které jsou jeho vnitřní vztahy ještě nedokonale prozkoumány (Judd et al. 2016). V Severní Americe by se tyto hybridní rostliny měly vyskytovat údajně „extrémně běžně“ a měly by být morfologicky intermediární mezi rodiči. Jejich počet v Severní Americe je asi šest. Spory mají abortované, avšak zdá se, že se dokážou efektivně množit vegetativně pomocí gem a to i na větší vzdálenosti (Wagner & Beitel 1993). Dokonce prý tyto klony mohou přetrvávat i stovky let, kdy mohou omezovat i své rodičovské druhy (Beitel & Mickel 1992). Zde se vyskytují tři druhy, jejichž výskyt je uváděn i z Evropy, tedy *H. selago*, *H. appressa* a *H. continentalis* (Wagner & Beitel 1993, Gilman & Testo 2015, Testo et al. 2016).

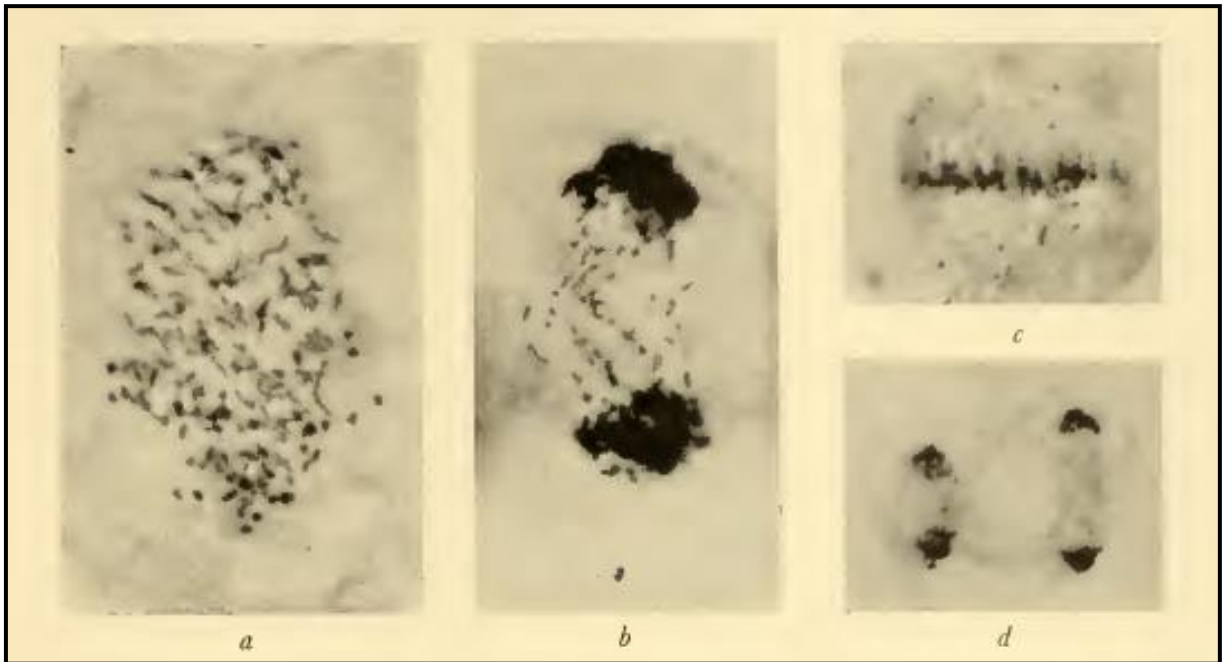
2.4.4 Cytologie

Čeď Lycopodiaceae se vyznačuje vysokými chromozomovými počty. Wagner (1992) udává pro *Lycopodium* s. l. (vymezené tehdy rody *Huperzia*, *Phlegmariurus*, *Lycopodium*, *Diphasiastrum*, *Lycopodiella*, *Pseudolycopodiella* a *Palhinhaea*) průměrný sporofytní chromosomový počet přibližně 80 párů. Základní chromosomové počty u Lycopodiaceae jsou rovněž vysoké, pro *Lycopodium* s. l. je nejnižší zjištěný $x = 23$ (Takamiya & Kurita 1983, Wagner 1992). Tyto počty v *Lycopodium* s. l. mohou být založeny na několika hypotetických základních číslech: $x = 8$ (Löve & Löve 1958), $x = 11$ (Löve & Löve 1958, Wagner 1992, Field et al. 2016), nebo $x = 11 + 1$ (Wagner 1992), $x = 13$ a $x = 17$ (Löve & Löve 1958). Tato čísla mají být specifická pro různé rody, druhy nebo skupiny druhů v rámci Lycopodiaceae. Samotný rod *Huperzia* je údajně založen na čísle $x = 11$ (Field et al. 2016).

Počítat chromozomy u *Huperzia* lze buď z kořenových špiček, z mateřských buněk výtrusů (spore mother cells), nebo ze špiček prýtů. Všechny tyto postupy se však setkávají s mnohými překážkami, proto pro tento rod existuje pouze nemnoho zjištěných chromosomových počtů (Manton 1950, Beitel & Wagner 1982, Wagner 1992). Většina kultur sporofytů Lycopodiaceae se obtížně uměle pěstuje, téměř tak obtížně, jako kultury spor a prothalií. To však není případ *H. selago*, jenž v kultuře roste poměrně snadno, i když dlouho (Manton 1950, Whittier 1998). Jednoduchost jeho kultivace je však vyvážena nesnadností jeho cytologického zkoumání. Například ze zkušenosti špičkové specialistky na

počítání chromozomů kapradin a plavuní I. Mantonové se v případě *H. selago* jedná o nejhůrší cytologický objekt, se kterým se kdy setkala (Manton 1950). Důvodů, které způsobují tyto obtíže, je hned několik. Manton (1950) uvádí, že fixace kořenů pro analýzu je prakticky nemožná všemi v té době staršími metodami a i při použití „moderních“ metod je situace při meióze nanejvýš složitá, neboť párování je vysoce nepravidelné a počet chromozomů je vysoký. Takamiya & Kurita (1983) a Wagner (1992) navíc poukazují na velmi tlusté buněčné stěny mateřských buněk spor, které se těžko prorážejí za účelem získání dobře vyvinutých chromozomů. Rovněž se v nich nalézají mnoho cytoplazmatických granulí a olejových kapek, což také znesnadňuje správné určení počtu chromozomů (viz Obr. 7, 8 a 9). Navíc mnohdy dochází k předčasnému oddělení jednotlivých chromozomů a chromozomy (oproti např. většině kapradin) mají různé velikosti, nejednotný tvar a mají tendenci se shlukovat (Löve & Löve 1958, Takamiya & Kurita 1983, Wagner 1992). Obvykle prosté spočtení chromozomů se tak stává velmi obtížným. Bez přesných znalostí chromozomových počtů pak nemůže být provedena ani jejich detailní analýza. Je proto potřeba dalšího specializovaného studia a možná aplikace nových metod, které by mohly vyvést studium chromozomů u rodu *Huperzia* z této slepé uličky. Z tohoto důvodu uvádí Manton (1950) pouze přibližný výsledek u rostliny z Velké Británie: roztlakový preparát ukazuje přibližně 113 párů a 37 univalentů. Sporofytní chromozomový počet tudíž nemůže být nižší, než 260 (Manton 1950). Další zjištěné chromozomové počty pro *Huperzia* s. s. ukazuje Tab. 2. Podle slov I. Mantonové se *H. selago* chová jako hybrid, jemuž se daří skrývat nefunkční meiotický mechanismus díky již zmíněnému vysoce účinnému rozmnožování gemami. Aby se tato domněnka potvrdila, je třeba výzkum v celém areálu druhu, nikoliv jen ve Velké Británii, kde měla I. Mantonová během 2. Světové války možnost provádět výzkum.

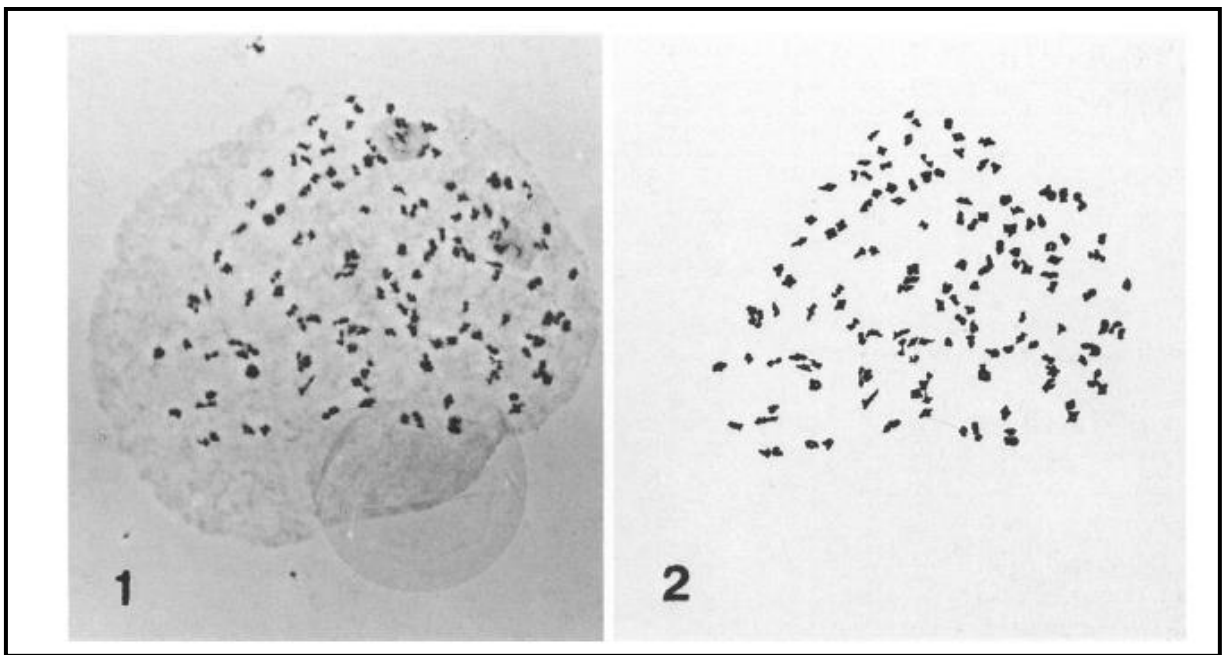
Proces polyploidizace v rostlinách sestává ze dvou kroků: prvním je zkřížení rostlin o nepárujících se genomech za vzniku sterilního jedince se dvěma různými genomey. Jelikož se však jeho genomey nepárují, nastává krok druhý a to polyploidizace. Tím je ke každému genomu vytvořen duplikát, se kterým se už lze párovat a tím pádem i pohlavně vytvořit potomstvo (Wagner 1992). Beitel & Mickel (1992) popisují takovéto hybridy jako rostliny takové morfologie, jež je průměrem rodičovských rostlin, s abortovanými spory, fragmenty spor a nerozdělenými mateřskými buňkami spor.



Obr. 7: Mikrofotografie meiózy *H. selago*, permanentní acetokarmin, **a.** polární pohled na první metafázi (zvětšení x1000), **b.** boční pohled na první anafázi s mnoha izolovanými univalenty (x1000), **c.** boční pohled na první metafázi s chromozomovými páry i univalenty (x500), **d.** boční pohled na druhou anafázi s izolovanými polovinami chromozomů vzniklými rozdělením univalentů (x500) (sensu Manton 1950).



Obr. 8: Kresba meiózy *H. selago*, permanentní acetokarmin, polární pohled na první metafázi (zvětšení x2000). Spárované chromozomy jsou černé, univalenty nevybarvené (sensu Manton 1950).



Obr. 9: Mikrofotografie meiotické diakineze *H. selago* (1) se 134 páry chromozomů, a její názornější (2) překreslení (sensu Wagner 1992).

Tab. 2: Souhrn nalezených chromozomových počtů pro *Huperzia* s. s.

popis	počet chromosomů	lokalizace	reference	poznámka
<i>H. miyoshiana</i>	2n = 134	-	Soltis & Soltis 1988	-
<i>H. occidentalis</i>	2n = 134	-	Soltis & Soltis 1988	-
<i>H. serrata</i>	2n = 136	Japonsko	Takamiya & Kurita 1983	udáno jako n = 68
<i>H. serrata</i>	2n = 272	Japonsko	Takamiya & Kurita 1983	udáno jako n = 136
<i>H. serrata</i>	2n = 528	Indie	Ghatak 1965	udáno jako n = 264
<i>H. lucidula</i>	2n = 132, 134, 136, 138	USA	Beitel & Wagner 1982	udáno jako n = 66, 67, 68, 69 ²
<i>H. lucidula</i>	2n = 134	Severní Amerika, Kanada	Wagner & Beitel 1993	základní počty: x = 67 a 68

<i>H. lucidula</i>	2n = 264	Kanada	Löve & Löve 1958	-
<i>H. appressa</i>	2n = 264	Island	Löve & Löve 1958	-
<i>H. arctica</i>	2n = 90	Severní Evropa	Blockeel 2006 ¹	-
<i>H. arctica</i>	2n = 90	Evropa	Valentine & Moore 1993 ¹	-
<i>H. selago</i>	2n = ca. 68	Island	Löve & Löve 1961a ¹	-
<i>H. selago</i>	2n = ca. 68	Západní Evropa	Hagerup & Petersson 1960	-
<i>H. selago</i>	2n = ca. 88	Grónsko	Harmsen in Löve & Löve 1948 ³	-
<i>H. selago</i>	2n = ca. 90	Finsko	Sorsa 1963	-
<i>H. selago</i>	2n = 90	Sibiř	Krasnoborov 1988 ¹	-
<i>H. selago</i>	2n = ca. 90	Laponsko (Nor, Švéd, Fin, Rus)	Sorsa 1963	udáno jako n = ca. 45
<i>H. selago</i>	2n = ca. 88, 90	Finsko	Kukkonen 2000 ¹	-
<i>H. selago</i>	2n = 134	? USA	Wagner 1992	-
<i>H. selago</i>	2n = nejméně 260, 264	Švédsko	Kukkonen 2000 ¹	-
<i>H. selago</i>	2n = více než 260	Velká Británie	Manton 1950	ca. 113 párů a 37 univalentů
<i>H. selago</i>	2n = ca. 264	Severovýchodní USA	Löve & Löve 1966	-
<i>H. selago</i>	2n = 264	Quebec (Kanada)	Löve & Löve 1958	-
<i>H. selago</i>	2n = 264	Evropa	Valentine & Moore 1993 ¹	-
<i>H. selago</i>	2n = ca. 264	Island	Löve 1970	-
<i>H. selago</i>	2n = 264	USA	Löve & Löve 1966	-
<i>H. selago</i>	2n = 264	Sibiř	Krasnoborov 1988 ¹	-
<i>H. selago</i>	2n = 268	? USA	Wagner 1992	základní počty: x = 67 a 68
<i>H. selago</i>	2n = 268	Severní Amerika	Wagner & Beitel 1993	-
<i>H. selago</i>	2n = ca. 272	Evropa	Valentine & Moore 1993 ¹	-
<i>H. selago</i>	2n = 272	Island	Löve & Löve 1961b	-

¹Jedná se o soubornou publikaci, tedy pravděpodobně ne o primární zdroj.

²Publikováno s dovětkem, že přesný počet nešel určit, nalezeny 2 vzorky: $n = 66-68$ a $n = 66-69$ v Michiganu. Nemohlo se prý jednat o hybridy kvůli dobře vyvinutým sporám (Beitel & Wagner 1982).

³Údaje převzaty od autora Harmsen, který svá data nepublikoval, jedná se o údaj z Grónska (viz Löve & Löve 1958), Löve & Löve tato data převzali ve své práci z roku 1948.

3 Metodika

3.1 Sběr vzorků

V rámci mé bakalářské práce bylo sebráno 189 vzorků z 29 lokalit na území České Republiky a Slovenska. Tento soubor dat byl doplněn o další sběry provedené školitelem a dalšími kolegy z geograficky vzdálenějších lokalit, díky nimž mohlo dojít k širším porovnáním v rámci datové sady. Celkem tedy bylo k dispozici 283 vzorků pocházejících z 50 lokalit, a to z: České Republiky (24 lokalit), Slovenska (5), Rakouska (5), Německa (1), Velké Británie (2), Ukrajiny (3), Švédska (6) a Norska (4). Osobně jsem se účastnil sběrů ve střední Evropě, ostatní vzorky byly získány od školitele, kolegů z katedry a dalších osob. Hlavní sběr byl proveden mezi koncem června 2017 a srpnem téhož roku.

Bylo-li to možné, byly z každé populace sebrány vzorky asi 5–10 prýtů. U lokalit, ze kterých byly dodány vzorky dalšími sběrateli, se však může jednat i o jediný vzorek na populaci. Kompletní seznam lokalit ukazuje Příloha 1. Vzorky byly analyzovány buď živé, nebo když to nebylo možné, tak vysušené v silikagelu, a to pomocí dvou typů průtokových cytometrů. Po skončení měření byly živé vzorky založeny do herbáře (a budou výhledově uloženy v CBFS – herbáři katedry botaniky, PŘF JU v Českých Budějovicích) a část rostlin z každé populace byla uložena do silikagelu.

3.2 Průtoková cytometrie

Jedná se o metodu, která pomocí paprsku záření zjišťuje optickou odpověď částic zkoumané tkáně, takže se používá například v lékařství, nebo biologii. Tato metoda byla použita pro určení ploidních úrovní zkoumaných vzorků *Huperzia*. Roztok vzorku obarveného fluorescenčním barvivem prochází velmi tenkou kapilárou skrze úsek ozářený laserovým paprskem, nebo rtuťovou výbojkou. Tento paprsek prochází sadou optických filtrů před

průchodem zkoumanou tkání a rovněž za ní. Tyto filtry umožňují modifikovat signál, který chceme zjistit. Takovým signálem je nejčastěji intenzita fluorescence. K měření tkání je třeba přidat standard o známé velikosti genomu. V tomto případě se jednalo o *Chlorophytum comosum* 24,14 pg, (Koutecký, nepublikováno). Porovnáním fluorescence vzorku a standardu je možné určit ploidní úroveň zkoumané tkáně. Bylo použito fluorescenční barvivo DAPI. Do plastové petriho misky bylo vloženo asi 6 středně velkých mikrofytlů vzorku a asi o polovinu více standardu. Obvykle byly dohromady analyzovány asi tři rostliny (z každé tedy dva mikrofyty). Dále bylo do misky přidáno 400 µl v ledu vychlazeného pufru Otto I (0,1M kyselina citronová, 0,5% Tween-20; Otto 1990) a celá směs byla nadrobno nasekána žiletkou. Následně byl takto připravený roztok zfiltrován přes 42µm filtr do mikroskopu. Velmi důležité bylo, aby filtrát neobsahoval žádné viditelné nečistoty, aby se neucpaly kapiláry v přístroji. Takto připravená tekutina se nechala 10 minut odstát a následně bylo přidáno 800 µl pufru Otto II (0,4M Na₂HPO₄·12H₂O, 2-merkapt ethanol o koncentraci 2 µl/ml a DAPI o koncentraci 4 µg/ml). Tento roztok se nechal 5 minut barvit, načež byl analyzován průtokovým cytometrem Partec PA II (Partec GmbH, Münster, Německo) se rtuťovou výbojkou jako zdrojem záření. Přístroj byl nastaven tak, aby standard vyšel na kanálu 400 na 1024 kanálové škále a bylo nastaveno zaznamenání 3000 částic. Pokud bylo zjištěno více ploidních úrovní ve vzorku, byl vzorek zanalyzován znovu po jednotlivých rostlinách.

Pro zjištění velikosti genomu bylo několik vzorků analyzováno na jiném přístroji. Postup je stejný, jen barvivo DAPI je nahrazeno propidium jodidem (50 µg/ml) a RNázou IIa (50 µg/ml). K analýze byl použit přístroj Partec CyFlow SL používající jako zdroj záření zelený laser (532 nm) o výkonu 100 mW. Rostliny byly analyzovány jednotlivě a záznam byl nastaven na 5000 částic. Každý vzorek byl analyzován třikrát a výsledek byl zprůměrován, aby se minimalizovala možnost vzniku chyby. Postup provedení analýzy byl proveden podle Doležel et al. (2007) a Koutecký et al. (2012).

3.2.1 Software

Cytometrická data byla hodnocena v programu FloMax verze 2.60 (Partec GmbH, Münster, Německo) a Statistica verze 13.2 (StatSoft 2018).

4 Výsledky

4.1 Velikost genomu *H. selago* agg. v Evropě

Vzorky *H. selago* se dají snadno analyzovat průtokovým cytometrem. Kvůli značné velikosti jejich genomu byl použit standard rovněž s velkým genomem – *Chlorophytum comosum* 24,14 pg (Koutecký, nepublikováno). Celkem bylo analyzováno 283 vzorků z 50 lokalit. Průtokovou cytometrií se podařilo nalézt dva cytotypy. Jelikož zatím nemáme přesnou kalibraci, abychom zjistili, o jaké ploidní úrovni se jedná (viz Diskuze, kap. 5) byly tyto cytotypy pracovním názvem nazvány typ B (běžný) a typ A (alpínský). Ve Švédsku byla navíc zaznamenána směsná populace rostlin běžného typu (B) s rostlinami o mírně menší velikosti genomu (viz Obr. 10), než bylo zaznamenáno v ostatních částech Evropy. Pracovním názvem byl tento typ nazván typ S (skandinávský). Nejedná se však o reprezentativní vzorek, neboť tohoto typu byly nalezeny pouze čtyři rostliny.

Data získaná průtokovou cytometrií pro přístroj používající barvení DAPI jsou vynesena v Tab. 3, poměr intenzity fluorescence jader vzorku *Huperzia selago* a standardu (*Ch. comosum*) se u typu B pohyboval v rozmezí 0,78–0,83 (průměr 0,80) a u typu A v rozmezí 0,54–0,60 (průměr 0,59). Data získaná přístrojem využívajícím barvení propidium jodidem jsou vynesena v Tab. 4. Tento přístroj zaznamenal poměr intenzity fluorescence jader vzorku a standardu u typu B v rozmezí 0,74–0,78 (průměr 0,76) a u typu A v rozmezí 0,54–0,57 (průměr 0,55).

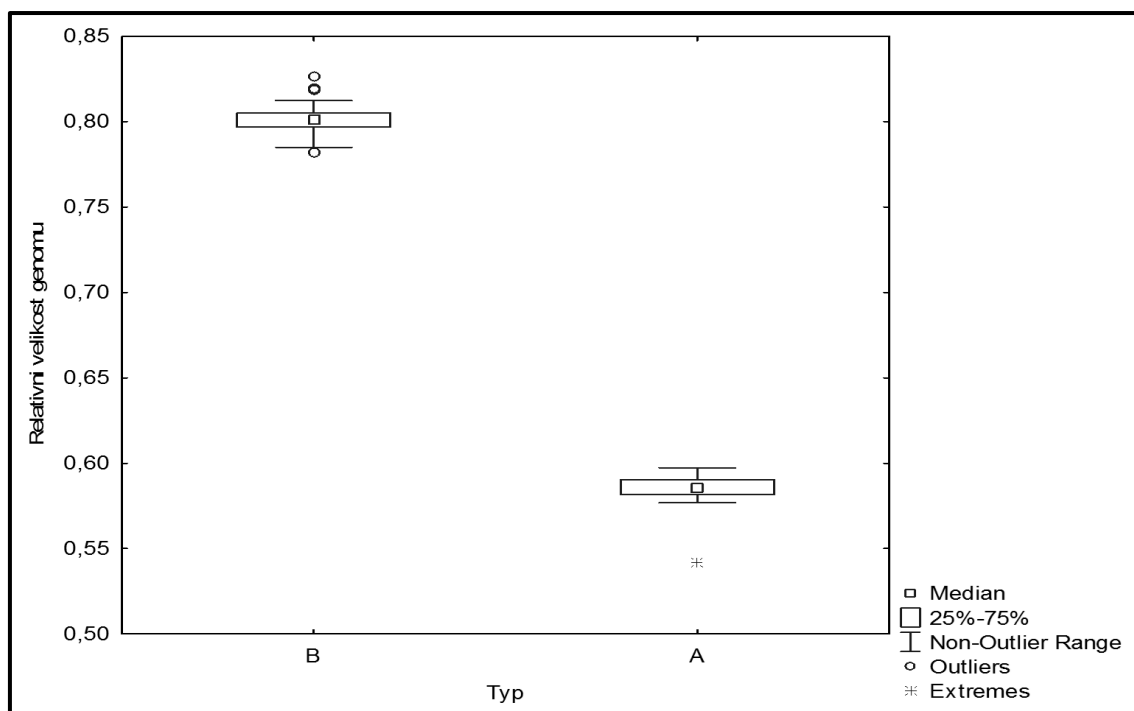
Tab. 3: Výsledky průtokové cytometrie (přístroj využívající barvení DAPI).

Typ	Vzorek CV - průměr	Standard CV - průměr	Poměr vz/std - min	Poměr vz/std - max	Poměr vz/std - průměr	Směrodatná odchylka vz/std	Počet měření
B	1,35	1,32	0,78	0,83	0,80	0,01	57
A	1,73	1,25	0,54	0,60	0,59	0,01	37

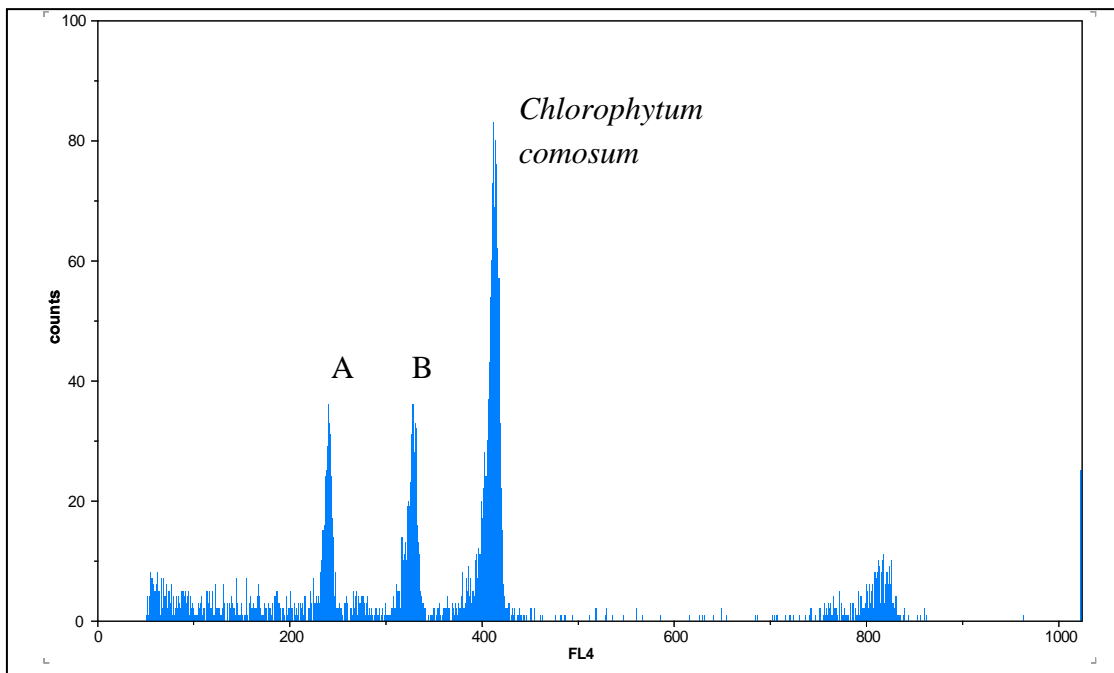
Tab. 4: Výsledky průtokové cytometrie (přístroj využívající barvení propidium jodidem).

<i>Typ</i>	<i>Vzorek CV - průměr</i>	<i>Standard CV - průměr</i>	<i>Poměr vz/std - min</i>	<i>Poměr vz/std - max</i>	<i>Poměr vz/std - průměr</i>	<i>Směrodatná odchylka vz/std</i>	<i>Velikost genomu - průměr</i>	<i>Počet měření</i>
<i>B</i>	2,46	1,96	0,74	0,78	0,76	0,01	18,34	15
<i>A</i>	2,61	1,99	0,54	0,57	0,55	0,01	13,39	15

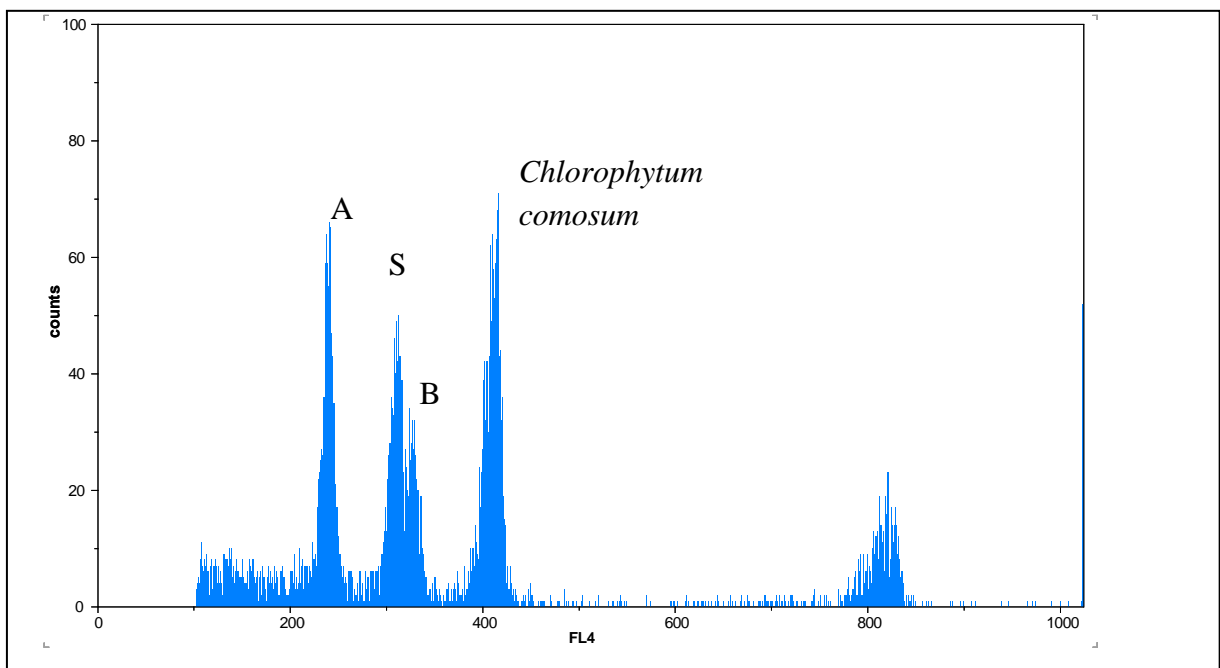
Velikost genomu typů B a A zjištěná pomocí průtokové cytometrie se od sebe liší o 4,90 pg ($t = -1,55$, $F = 1,23$, $p < 0,01$, $df = 113$). Rozsah relativních velikostí jejich genomů ukazuje Obr. 9. Výstupy z DAPI průtokového cytometru se zobrazením typů B, A (a pro zajímavost i typu S) uvádí Obr. 10 a Obr. 11.



Obr. 9: Relativní velikost genomu typů B a A zjištěná průtokovým cytometrem (barvení DAPI).



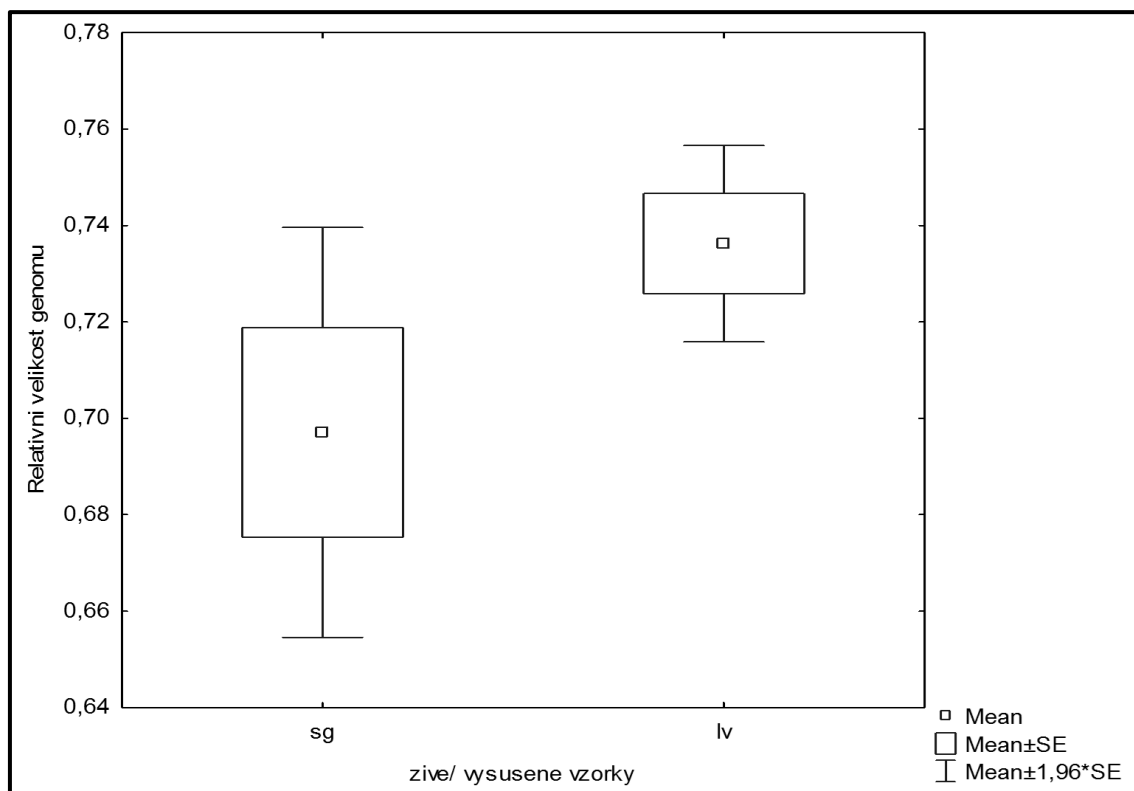
Obr 10: Histogram relativní velikosti genomu měřené průtokovým cytometrem (barvení DAPI), směsný vzorek dvou cytotypů (B, A) nalezených na společné lokalitě č. 25 nebo 26 (Nízké Tatry, Slovensko).



Obr. 11: Histogram relativní velikosti genomu měřené průtokovým cytometrem (barvení DAPI), směsný vzorek typů B, A, S.

4.2 Porovnání vysušených a živých vzorků

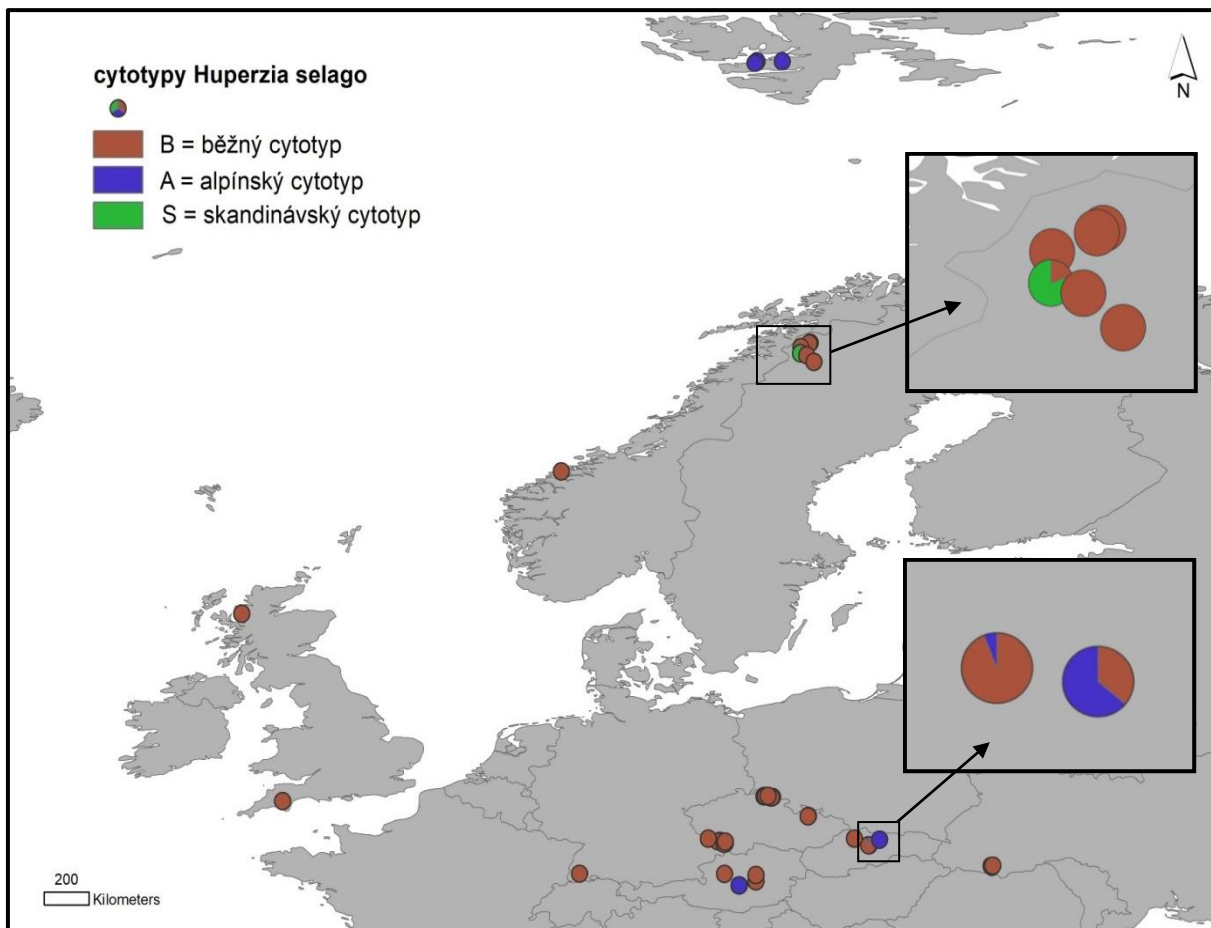
Prýty *Huperzia selago* vydrží velmi dlouho (ca. 1–1,5 měsíce) čerstvé a analyzovatelné průtokovou cytometrií, jsou-li uloženy v neprodyšném obalu v lednici. Vždy však není možné analyzovat ještě živé vzorky. Obzvláště při delších exkurzích, nebo při sběru ve vzdálených oblastech, je často nutné je vysušit pomocí silikagelu. Aby takovéto uchovávání mělo smysl, je třeba vyzkoušet, zda jsou takto vysušené rostliny vůbec analyzovatelné metodou průtokové cytometrie a pokud ano, jestli jsou získané výsledky porovnatelné s daty získanými ze živých rostlin. Bylo tedy testováno, zda či jak moc se liší vysušené a živé vzorky, k čemuž bylo použito dvouvýběrového t- testu, který vyšel neprůkazný ($t = -1,728$, $F = 1,236$, $p = 0,086$, $df = 116$), tj. čerstvé a vysušené analyzované vzorky se signifikantně neliší (Obr. 12). Je však třeba dodat, že počty vzorků v obou kategoriích nebyly vyvážené (25 vzorků ze silikagelu vs. 91 živých vzorků; viz Diskuze, kap. 5.2). Hodnocené rostliny pro obě kategorie byly různé.



Obr. 12: Relativní velikost genomu živých a vysušených analyzovaných vzorků ($t = -1,728$, $F = 1,236$, $p = 0,086$, $df = 116$), sg = silikagel, lv = živé vzorky. Data z průtokového cytometru (barvení DAPI).

4.3 Rozšíření zaznamenaných cytotypů

Pomocí průtokové cytometrie byly nalezeny dva základní cytotypy, které byly pracovním názvem nazvány typ B (běžný) a typ A (alpínský). Vzorků typu B bylo zaznamenáno 191 a vzorků typu A pak 88. Kromě těchto základních typů bylo v populaci běžného typu (č. 36) ze Švédska (sběratel J. Kučera) zaznamenáno několik rostlin s velikostí genomu, jenž byla o něco menší než velikost genomu běžného typu nalezená v ostatních částech Evropy (viz Obr. 11 a Obr. 13). Tento typ byl pracovním názvem nazván skandinávský (S). Typ B byl nalezen ve všech zemích, ve kterých byl prováděn průzkum, kromě norských Špicberků. Typ A byl nalezen v rakouských Alpách, na slovenských Karpatech a na Špicberkách. V Nízkých Tatrách byly nalezeny dvě směsné populace typů B a A (Obr. 13).



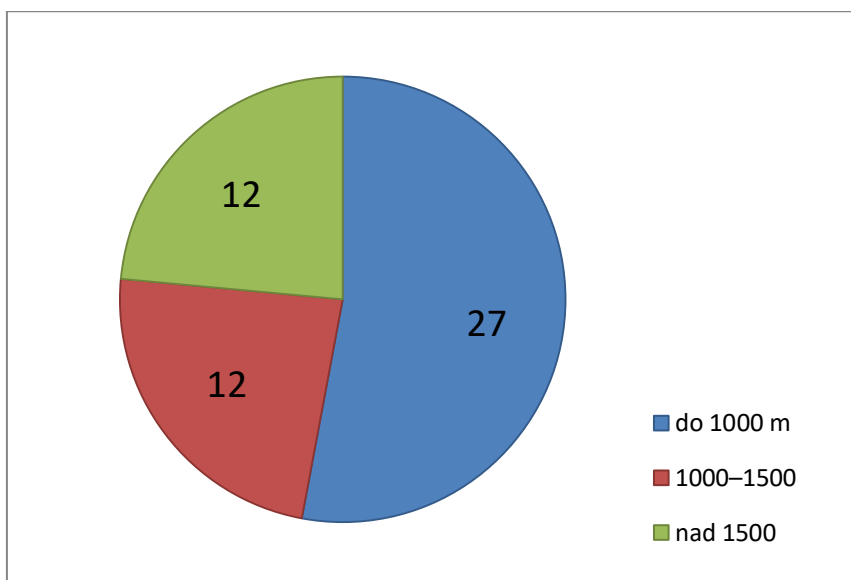
Obr. 13: Distribuce nalezených typů v Evropě (B, A, S). Směsné populace typů B a A se nacházejí na Slovensku v Nízkých Tatrách a typů B a S ve Švédsku, šipky ukazují detail směsných populací.

4.4 Výškové rozložení nálezů

Jedním z cílů práce bylo porovnat velikost genomu rostlin z montánních poloh (do ca. 1000 m n. m.) s těmi z větších nadmořských výšek v Sudetských pohořích (Krkonoše, Jeseníky) v rozmezí ca. 1000–1500 m n. m. a z území Alp a Karpat ve výškách nad 1500 m n. m. Ve výšce do 1000 m byly sebrány vzorky z 27 lokalit Šumavy, Krkonoš, rakouských Alp, Švédska a Velké Británie, od 1000 do 1500 m vzorky z 12 lokalit ze Šumavy, Jeseníků, Krkonoš, Rakouských Alp, ukrajinského pohoří Čornohora a Schwarzwald, a nad 1500 m vzorky z 12 lokalit z Krkonoš, Nízkých a Vysokých Tater, Malé Fatry, pohoří Čornohora a rakouských Alp (Obr. 14).

Ve vysokých polohách Sudet (nad 1000 m) bylo nalezeno 13 populací (Krkonoše, Šumava, Hrubý Jeseník). Sběr ve střední Evropě byl proveden v rozmezí 480–2390 m n. m. Vzorky

za severní Evropy nejsou porovnatelné se střední Evropou kvůli odlišným ekologickým podmínkám. V severní Evropě sebrané vzorky se nalézaly níže, v nadmořské výšce 10 (Špicberky) až 890 (Švédsko) m.

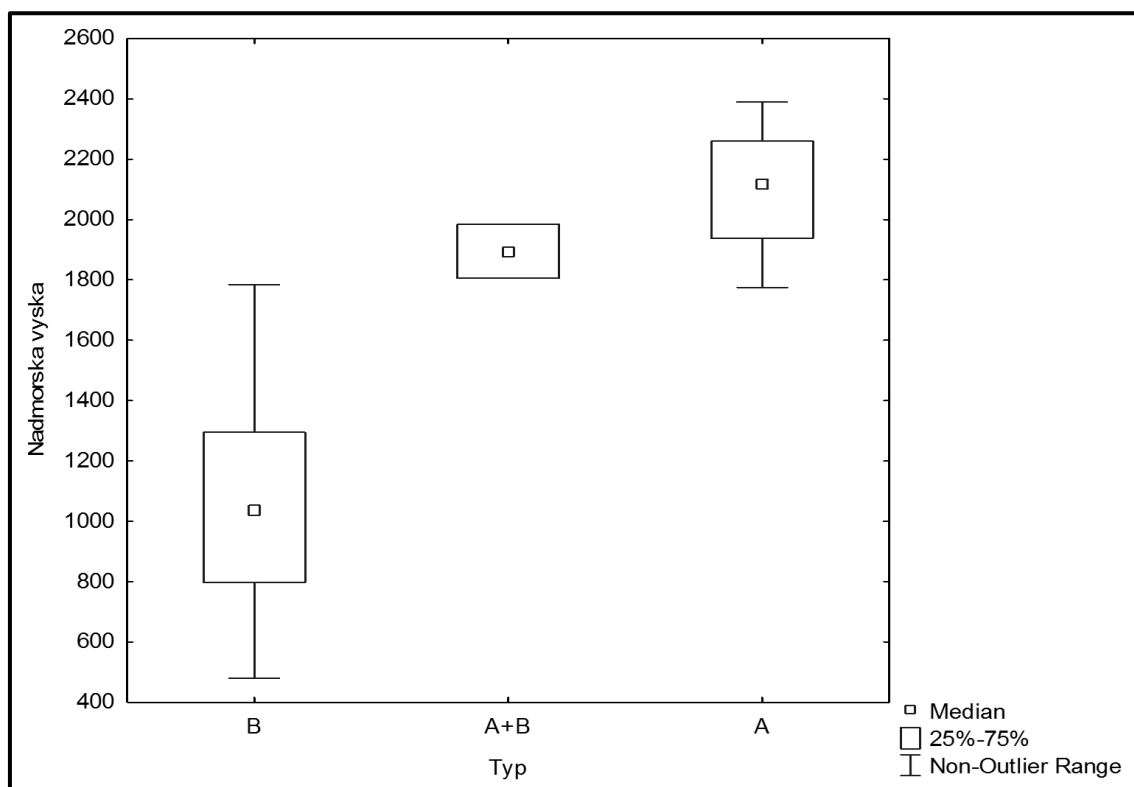


Obr. 14: Výškové rozložení lokalit, kde byly sbírány vzorky.

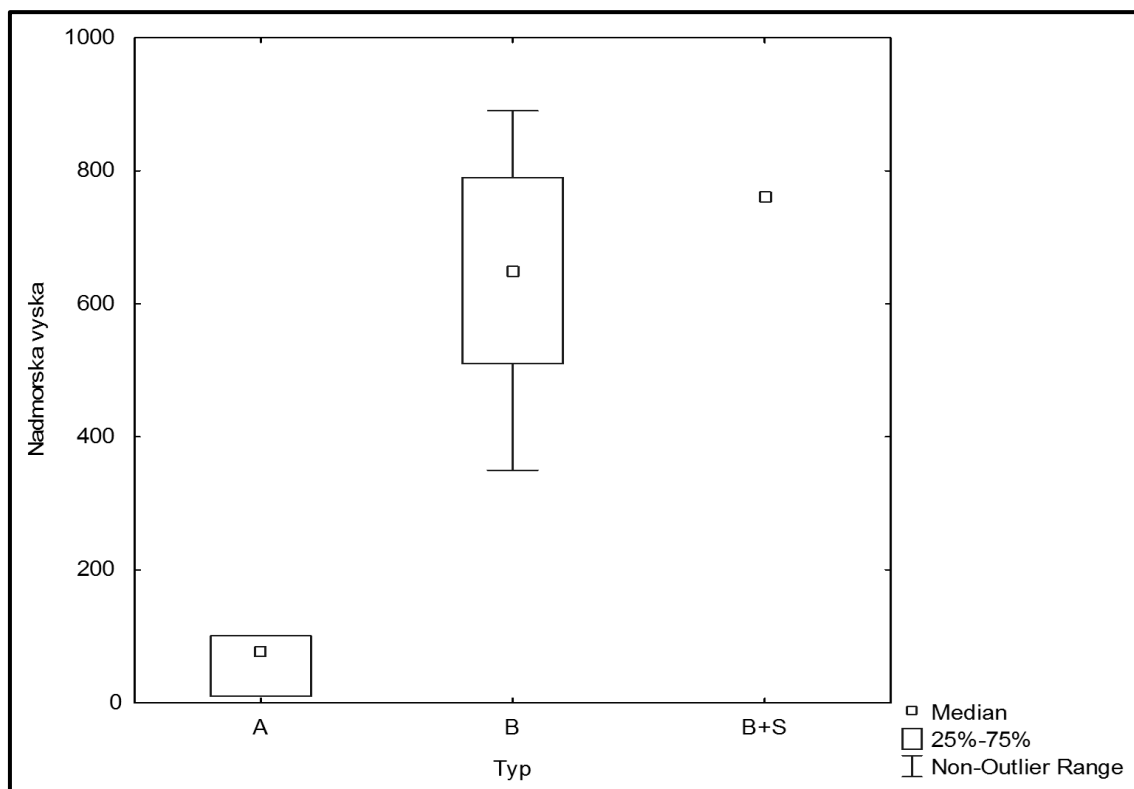
Z pohledu gradientu nadmořské výšky je ve výskytu rostlin patrný výrazný trend (Obr. 15). Ve střední Evropě se rostliny typu B a typu A průkazně liší svým výskytem na nadmořské výšce (dvouvýběrový t- test, $t = -6,326$, $df = 30$, $p < 0,001$). Rostliny běžného typu B se ve střední Evropě v homogenních populacích vyskytují nejnižší ve výšce 480 m (Rakousko) a nejvyšší 1748 m n. m. (Ukrajina, pohoří Čornohora). Alpínský typ A byl nalezen nejnižší ve slovenských Vysokých Tatrách ve výšce 1775 m a nejvyšší v rakouských Alpách ve výšce 2390 m n. m. Ojediněle zaznamenané směsné populace typů B a A byly nalezeny na dvou lokalitách v nadmořských výškách 1805 m a 1985 m ve Vysokých Tatrách na Slovensku. V montánních polohách (do 1000 m n. m.) ani v sudetských pohořích (1000–1500 m n. m.) tedy nebyly nalezeny žádné rostliny typu A.

Při čistě ilustrativním porovnání vzorků v severní Evropě je třeba si uvědomit, že je porovnáváno výškové rozpětí rostlin sbíraných na Špicberkách (typ A) a rostlin ze středních nadmořských výšek střední Skandinávie (typ B). Dále je třeba si uvědomit, že vzorky ve Skandinávii nebyly sbírány systematicky (nebyly cílem této bakalářské práce), že rozložení

jejich sběru a počet je tudíž nekonzistentní a byly získány dodatečně od příležitostných sběratelů. Z Obr. 16 je však zřejmé, že typ A, který se ve střední Evropě vyskytuje v nadmořských výškách od 1775 m výše, se na Špicberkách již vyskytuje u moře.



Obr. 15: Výškové rozložení výskytu typů B a A na nadmořské výšce ve střední Evropě.



Obr 16: Porovnání rozložení základních typů (A = alpínský, B = běžný) nalezených v Severní Evropě na nadmořské výšce, pro úplnost zaneseny hodnoty i pro tzv. skandinávský cytotyp (S) ve směsné populaci s běžným typem. Jedná se o porovnání čistě ilustrativní založené na nesystematicky sbíraných vzorcích dodaných dalšími sběrateli. Rostliny typu A pocházejí všechny ze Špicberských ostrovů a ostatní vzorky ze středních poloh Norska a Švédska.

5 Diskuze

5.1 Porovnání vzorků z montánních a subalpínských poloh

Pomocí průtokové cytometrie byly stanoveny velikosti genomu jednotlivých vzorků, které pak byly porovnávány na gradientu nadmořské výšky, a to z montánních a subalpínských poloh vysokých Sudet, Karpat, Alp a dalších pohoří. Jelikož se podařilo ke vzorkům sebraným v rámci této bakalářské práce sehnat od dalších sběratelů jednotlivé vzorky i z dalších regionů mimo střední Evropu, bylo možno (alespoň rámcově) porovnat rostliny ze střední Evropy s rostlinami z Evropy severní. I přesto, že dosud neexistoval jediný údaj o tom, že by se ve střední Evropě vyskytovaly různé cytotypy *H. selago* agg., byl potvrzen

teoretický předpoklad, že rostliny, které se ve střední Evropě vyskytují na vysokých horách (typ A) se velikostí genomu liší od rostlin nalézajících se zde v nižších polohách (typ B). Navíc při porovnání s rostlinami ze severní Evropy vyplynulo, že rostliny typu A ze střední Evropy jsou velikostí genomu totožné s rostlinami ze Špicberků. Toto geografické rozložení by tedy odpovídalo skutečnosti, že severské rostliny, pokud se vyskytnou více na jihu, se nalézají ve vysokých horských polohách, neboť jsou zde podobné ekologické podmínky. Pro tvorbu širě komentovaných konkrétních závěrů však máme příliš málo vzorků především ze severní Evropy ale i z vysokých oblastí střední Evropy.

Porovnání jednotlivých nalezených cytotypů (B, A) v závislosti na nadmořské výšce ukázalo, že typ B se ve střední Evropě vyskytuje v nižších polohách (480–1748 m n. m.), než typ A (1775–2390 m n. m.). Provedený statistický test by byl robustnější, kdyby byly vyvážené počty vzorků pro obě kategorie, žel vzorků typu A bylo ve střední Evropě zatím nalezeno jen malé množství. Směsné populace obou typů byly nalezeny ve výškách 1805 a 1985 m n. m., které zřejmě představují kontaktní zónu výskytu obou těchto cytotypů.

5.2 Porovnání živých a vysušených vzorků

Pilotní porovnání, zda se neliší velikost genomu živých a vysušených vzorků ukázalo, že se vzorky obou kategorií signifikantně neliší. K tomuto testu byly použity vzorky různých rostlin v obou kategoriích. Ideální by bylo, aby byly zhodnoceny nejprve živé rostliny a poté po nějaké době tytéž rostliny vysušené silikagelem, což však zatím nebylo provedeno. Nicméně na základě stávajících výsledků je velmi pravděpodobné, že výsledek by byl obdobný. Opětná analýza vzorků sebraných v roce 2017 po jednom či dvou letech je však uskutečnitelná (vzorky jsou vysušeny v silikagelu) a toto porovnání je výhledově možné. Nejstarší analyzované vzorky vysušené silikagelem jsou z roku 2014 (Skotsko) a 2015 (Norsko). Obě tyto rostliny byly dobře analyzovatelné (vzorek ze Skotska: CV = 1,34 %, vzorek z Norska: CV = 1,53 %). Lze předpokládat použitelnost i starších vzorků, což je však třeba ještě experimentálně ověřit. Velikost genomu u rostlin *H. selago* agg., které nebyly vysušeny silikagelem, ale byly vysušeny v sušárně pro potřeby herbářových dokladů, žel nebyly s to poskytnout informaci o velikosti genomu, pročež nebyly pro tyto potřeby použitelné. Reakce vysušených rostlin (coby herbářových položek) a jejich analyzovatelnost pomocí průtokové cytometrie byla již experimentálně zjišťována (Suda & Trávníček 2006). Tito autoři analyzovali rostliny, které byly lisovány nebo ponechány volně a vysušeny při různých teplotách, nebo vysušeny silikagelem. Analýza probíhala po době 9 nebo 20

měsíců od vysušení. Většina z 60 zkoumaných druhů (v 58 rodech) byla schopna vytvořit histogramy, které se daly použít pro vyhodnocení. Ovšem za předpokladu, že byly okamžitě a řádně vysušeny a to buď teplem, nebo silikagelem. Maximální doba uložení vysušené položky, po které je ještě možné ji analyzovat, se zdá být vysoce druhově specifická, obvykle se však tento čas pohybuje mezi 1 a 4 lety při uložení v pokojové teplotě. Nejdlejší zaznamenaná doba uložení, po které byla možná analýza, byla 6 let (pro *Empetrum nigrum*). Tuto dobu významně ovlivňuje ploidní úroveň vzorku a podmínky jeho skladování. Rostliny bohaté na sekundární metabolity obvykle při analýze vytvářejí špatný signál (Suda & Trávníček 2006). U kapradin lze úspěšně analyzovat vzorky vysušené v silikagele pouze v některých případech (např. rod *Cystopteris*, nebo *Pteridium*), avšak u řady rodů to není možné např. *Dryopteris*, *Polystichum* (Ekrt L. nepublikováno). Oproti tomu velmi dobrá analyzovatelnost vzorků *H. selago* může do budoucna ulehčit analýzu vzorků ze vzdálených destinací anebo zkoumání již starších vysušených vzorků v silikagele.

5.3 Nalezené cytologické údaje

5.3.1 Základní chromozomové počty u čeledi Lycopodiaceae

Existuje několik hypotetických čísel, na kterých by mohly být založeny chromozomové počty v čeledi Lycopodiaceae: $x = 8$ (Löve & Löve 1958), $x = 11$ (Löve & Löve 1958, Wagner 1992, Field et al. 2016), nebo $x = 11 + 1$ (Wagner 1992), $x = 13$ a $x = 17$ (Löve & Löve 1958). Rod *Huperzia* by měl být založen na čísle $x = 11$ (Field et al. 2016). Wagner (1992) navíc udává, že na teoretických základních číslech $x = 7-13$ jsou nejspíše založeny chromozomové počty všech cévnatých rostlin. Když pomineme teoretická čísla, pak nalezené základní chromozomové počty u Lycopodiaceae jsou vysoké (nejnižší nalezené pro *Lycopodium* s. l. je $x = 23$, Takamiya & Kurita 1983, Wagner 1992), což může mít dvě příčiny: buď opakované vzniky autoploidie následované částečnou genovou redukcí (gene silencing), nebo vysoký počet chromozomů již od počátku (Soltis & Soltis 1988, Judd et al. 2016). Názory na správnost teorií se různí, např. Flora of Svalbard (2018) se přiklání k prvně zmiňované s odůvodněním, že by kříženci různých ploidních úrovní byli právě oni sterilní hybridy, které zmiňují Wagner & Beitel (1993), kdežto Soltis & Soltis (1988) podporují druhou teorii.

S vysokými základními chromozomovými počty v Lycopodiaceae jsou provázány i vysoké chromozomové počty, jak ukazují údaje nalezené v Asii pro různé druhy z této čeledi, které

se pohybují od čísla $2n = 46$ až po $2n = \text{ca. } 550$ (Takamiya & Kurita 1983). V Evropě pak byla nalezena čísla od $2n = 46$ až po $2n = 272$ (Löve & Löve 1958, Takamiya & Kurita 1983, CCDB 2018).

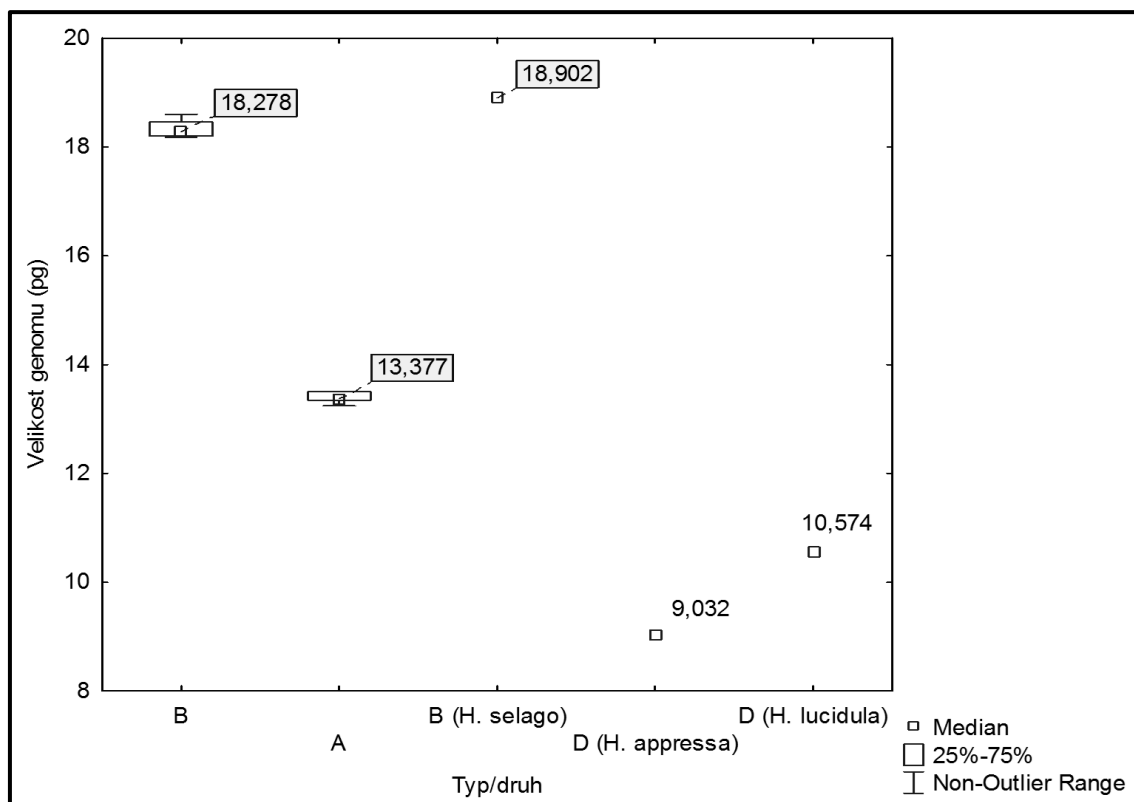
5.3.2 Hodnocení stupně ploidie u rodu *Huperzia*

V literatuře nalezené chromozomové počty pro rod *Huperzia* s. s. (který zhruba odpovídá *Huperzia selago* agg.) se od sebe výrazně liší. Rostliny s nejmenším somatickým počtem chromozomů ($2n = \text{ca. } 68\text{--}90$) byly zaznamenány pouze v Evropě, kdežto vyšší chromozomové počty ($2n = 134\text{--}272$) jsou známy jak v Evropě, tak v Americe i Asii (viz Tab. 2). Panarctic Flora (2018) udává, že rostliny o nízkých chromozomových počtech nalezených ve Finsku morfologicky odpovídají *H. appressa* a nikoliv *H. selago* (dle Sorsa 1963) z čehož vyvozuje, že by se s tímto druhem mělo jednat jako s potenciálně diploidním. Toto však kontrastuje se skutečností, že někteří autoři (viz Flora of the Canadian Arctic Archipelago 2007) tento druh ani neuznávají jako samostatný, ale jako přechodný článek mezi *H. arctica* a *H. selago*. Některé evropské práce zase tento taxon synonymizují s *H. arctica* (Valentine & Moore 1993, Kukkonen 2000). Wagner & Beitel (1993) zaznamenali základní chromozomové počty jako $x = 67, 68$ pro rod *Huperzia*. Přesné chromozomové počty však uvádějí pouze pro dva druhy a to pro *H. lucidula*: $2n = 134$ a *H. selago*: $2n = 4x = 134$ a $2n = 268$ (Wagner 1992, Wagner & Beitel 1993). Autoři Flora of the Canadian Arctic Archipelago (2007) tyto počty interpretovali jako $2n = 2x = 134$ a $2n = 6x = 268$ a rovněž Kukkonen (2000) $2n = >260$ uvádějí jako hexaploidní počet. Zde se však interpretace opět rozcházejí. Wagner (1992) udává jím zjištěný počet $2n = 134$ pro *H. selago* jako počet pro tetraploida, nikoli diploida (dle Flora of the Canadian Arctic Archipelago 2007). Zároveň udává základní čísla pro rod *Huperzia* jako $x = 67, 68$. Tato čísla však nemohou být základní, neboť na Islandu byly nalezeny rostliny o počtu $2n = \text{asi } 68$ (Hagerup & Petersson 1960, Löve & Löve 1961a), který je stejně velký, jako základní chromozomový počet, který udává Wagner (1992). Kromě toho, číslo $2n = 268$ je dvojnásobkem čísla $2n = 134$. Za předpokladu, že by $2n = 134$ náleželo tetraploidnímu jedinci, tak by $2n = 268$ nemohlo být počtem pro hexaploidního (jak navrhuji autoři Flora of the Canadian Arctic Archipelago 2007), nýbrž oktoploidního jedince. Bainard et al. (2011) pak, stejně jako Wagner & Beitel (1993) udává pro druh *H. lucidula* (jenž je blízce příbuzný druhu *H. selago*) počet $2n = 134$, avšak tento počet vydává za diploidní. Je tedy zcela zřejmé, že dosud neexistuje ustálený konsenzus o vztahu počtu chromozomů k ploidním úrovním. Vzhledem k obtížnosti získávání údajů o počtu chromozomů je zřejmé, že o ploidii se toho zatím ví velmi málo a

různí autoři udávají různé ploidie pro stejné chromozomové počty. Pro objasnění této situace je nezbytné spočítat chromozomy všech typů, změřit jejich velikost genomu a tato data vzájemně porovnat. Nicméně pokud budeme vycházet ze současných znalostí a předpokládat, že nejnižší známé počty (tj. $2n = \text{ca. } 68$) jsou diploidní, pak teoreticky odvozené přibližné ploidní úrovně by mohly být následující: $2x = 68$, $3x \sim 88\text{--}90$, $4x \sim 134$, $8x \sim 260\text{--}268$. Tato problematika však do budoucna vyžaduje ještě zevrubné studium.

5.4 Pilotní porovnání vzorků z Evropy se vzorky ze Severní Ameriky

Pro účely porovnání dat získaných v Evropě se dodatečně podařilo získat tři vzorky pro tři různé druhy *Huperzia* ze Severní Ameriky (zaslal W. Testo). Jedná se o druhy *H. selago*, *H. appressa* a *H. lucidula* (lokalizace od sběratele dosud nspecifikována, vzorky proto nejsou zahrnuty do celkového počtu lokalit ani do souhrnné tabulky, viz Příloha 1). Čistě orientační porovnání s již získanými daty v Evropě se třemi americkými se ukázalo jako velmi cenné (viz Obr. 17). Vzorek *Huperzia selago* z Ameriky má přibližně stejnou velikost genomu (18,9 pg), jako je námi zjištěná velikost genomu typu B (v průměru 18,3 pg). Naopak *Huperzia lucidula* i *H. appressa* mají velikost genomu výrazně nižší, než jakýkoli námi zjištěný typ. Toto porovnání bylo provedeno proto, že američtí autoři (Wagner & Beitel 1993, Bainard et al. 2011) udávají, že druhy *H. selago* a *H. lucidula* jsou diploidní, což však kontrastuje s daty jiných autorů (viz Tab. 2), kteří udávají mnohem nižší nalezené sporofytní chromozomové počty, které by tedy spíše měly být diploidní. Jediná publikovaná velikost genomu pro *Huperzia* s. s. je udána pro druh *H. lucidula*: 11, 27 pg (Bainard et al. 2011). Tato hodnota je podobná námi zjištěné velikosti genomu pro tento druh (10,57 pg). Nepatrný rozdíl může být způsoben například použitím rozdílného standardu.



Obr. 17: Orientační porovnání velikosti genomu vzorků získaných ze Severní Ameriky (*H. selago*, *H. lucidula* a *H. appressa*, zaslal W. Testo) s daty, která byla zjištěna v rámci této bakalářské práce. Byl použit přístroj využívající barvení propidium jodidem.

6 Závěr

Závěry bakalářské práce lze stručně shrnout do následujících bodů:

1. Analýza evropských populací *Huperzia selago* agg. (50 lokalit, 283 vzorků) ukázala dva odlišné cytotypy, které byly pracovníě nazvány B (běžný) a A (alpínský). Běžný typ se vyskytoval téměř v celém zkoumaném území, kromě Špicberských ostrovů. Alpínský typ se vyskytoval samostatně pouze na Špicberkách a v nejvyšších polohách rakouských Alp a Slovenských Karpat. Směsné populace obou typů byly zaznamenány ojedinele v Nízkých Tatrách na Slovensku. Zřejmě se jedná o první nález různých cytotypů *H. selago* agg. ve střední Evropě.

2. Oba zaznamenané typy se výrazně liší na gradientu nadmořské výšky. Typ A se ve střední Evropě nalézá pouze v horách od nadmořské výšky 1775 m výše a pak byl zaznamenan již jen na severu na Špicberských ostrovech v nadmořských výškách 10–101 m n. m. Běžný typ (B) se vyskytoval v nadmořských výškách 480–1748 m v sudetských pohořích, na Šumavě, slovenských Karpatech, v ukrajinském pohoří Čornohora, v jižním Německu, Velké Británii, Norsku a Švédsku. Dvě směsné populace běžného a alpínského typu byly ojediněle nalezeny v nadmořských výškách 1805 m a 1985 m ve slovenských Vysokých Tatrách, kde je zřejmě kontaktní zóna obou těchto cytotypů.

7 Seznam použitých zdrojů

7.1 Literatura

- Beitel J. M. & Mickel J. T. (1992): The Appalachian Firmoss, a new species in the *Huperzia selago* (Lycopodiaceae) complex in eastern North America, with a new combination for the Western Firmoss. – American Fern Journal 82: 41–46.
- Beitel J. M. & Wagner F. S. (1982): The chromosomes of *Lycopodium lucidulum*. – American Fern Journal 72: 33–35.
- Birks J. H. B. & Willis J. K. (2008): Alpines, trees, and refugia in Europe. – Plant Ecology & Diversity 1: 147–160.
- Blockeel T. L. (2006): The liverworts, mosses and ferns of Europe. – Harley Books, Colchester.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – Nature Protocols 2: 2233–2244.
- Fernández H., Kumar A. & Revilla M. A. [eds.] (2011): Working with Ferns. – Springer, New York.
- Field A. R., Testo W., Bostock P. D., Holtum J. A. M. & Waycott M. (2016): Molecular phylogenetics and the morphology of the Lycopodiaceae subfamily Huperzioideae supports three genera: *Huperzia*, *Phlegmariurus* and *Phylloglossum*. – Molecular Phylogenetics and Evolution 94: 635–657.
- Ghatak J. (1965): Some evidences of cytological evolution in *Lycopodium* L. s. l. – Nucleus 8: 45–58. [non vidi]
- Gilman A. V. & Testo W. L. (2015): Use of gemma characters to identify North American *Huperzia* (Lycopodiaceae). – American Fern Journal 105: 145–161.
- Hagerup O. & Petersson V. (1960): A Botanical atlas: Mosses, ferns, conifers, horsetails, lycopods, phylogeny, Svazek 2. – Ejnar Munksgaard, Kobenhavn. [non vidi]

- Headley A. D. & Callaghan T. V. (1990): Modular growth of *Huperzia selago* (Lycopodiaceae: Pteridophyta). – Fern Gazette 13: 361–373.
- Hoshizaki B. J. & Moran R. C. (2001): Fern grower's manual. – Timber Press, Inc., Portland.
- Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P. F. & Donoghue M. J. (2016): Plant systematics: a phylogenetic approach, fourth edition. – Sinauer Associates, Inc., Sutherland.
- Klekowski E. J., Jr. & Baker H. G. (1966): Evolutionary significance of polyploidy in the Pteridophyta. – Science 153: 305–307.
- Kolbek J., Srutek M. & Box E. O. (2003): Forest vegetation of Northeast Asia. – Springer Science & Business Media, Dordrecht.
- Koutecký P., Štěpánek J. & Baďurová T. (2012): Differentiation between diploid and tetraploid *Centaurea phrygia*: mating barriers, morphology and geographic distribution. – Preslia 84: 1–32.
- Krasnoborov I. M. [ed.] (1988): Flora Sibirae, Lycopodiaceae – Hydrocharitaceae. – Divisio Sibirica, Novosibirsk.
- Kukkonen I. (2000): Lycopodiaceae. – In Jonsell B. (ed.), Flora Nordica, volume 1, Lycopodiaceae to Polygonaceae, p. 1–13, The Bergius Foundation, Stockholm.
- Löve Á. & Löve D. (1948): Chromosome numbers of northern plant species. – Ingólfsprent, Reykjavík.
- Löve Á. & Löve D. (1958): Cytotaxonomy and classification of Lycopods. – Nucleus 1: 1–10.
- Löve Á. & Löve D. (1961a): Chromosome numbers of central and northwest European plant species. – Opera Botanica vol. 5. – Almqvist & Wiksell, Stockholm.
- Löve Á. & Löve D. (1961b): Some chromosome numbers of Icelandic ferns and fern allies. – American Fern Journal 51: 127–128. [*non vidi*]

- Löve. Á. & Löve. D. (1966): Cytotaxonomy of the alpine vascular plants of Mount Washington. University of Colorado Studies. Series of Biology No. 24. – University of Colorado, Colorado. [non vidi]
- Löve Á. (1970): Íslensk Ferdaflóra [Icelandic excursionflora]. – Almenna Bókafélagid, Reykjavík. [non vidi]
- Manton I. (1950): Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. – The Syndics of the Cambridge University Press, London.
- Mehlreter K., Walker L. R & Sharp J. M. [eds.] (2010): Fern ecology. – Cambridge University Press, New York.
- Meusel H., Jäger E. & Weinert E. (1965): Vergleichende chorologie der zentraleuropäischen Flora. Vol. 1. – Gustav Fischer, Jena.
- Mondal P. & Ghosh R. K. (1995): A new species of *Huperzia* (Lycopodiaceae: Pteridophyta) from India. – Fern Gazette 15: 71–75.
- Øllgaard B. (1987): A revised classification of the Lycopodiaceae s. l. – Opera Botanica 92: 153–178. [non vidi]
- 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, Vol. 33, p. 105–110, Academic Press, New York.
- PPG I. (2016): A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. – Journal of Systematics and Evolution 9999: 1–40 .
- Prieto J. A. F., Aguiar C., Dias E., Casado M. A. F & Homet J. (2008): The genus *Huperzia* (Lycopodiaceae) in the Azores and Madeira. – Botanical Journal of the Linnean Society 158: 522–533.
- Sen T. & Sen U. (1978): Morphology, anatomy and taxonomy of Lycopodiaceae of the Darjeeling Himalayas. – Fern Gazette 11: 414–428.
- Soltis D. E. & Soltis P. S. (1988): Are Lycopods with high chromosome numbers ancient polyploids? – American Journal of Botany 75: 238–247.

- Sorsa V. (1963): Chromosome studies on Finnish Pteridophyta III. – *Hereditas* 49: 337–344.
- Suda J. & Trávníček P. (2006): Reliable DNA Ploidy determination in dehydrated tissues of vascular Plants by DAPI flow cytometry – new prospects for plant research. – *Cytometry Part A* 69A: 273–280.
- Takamiya M. & Kurita S. (1983): Cytotaxonomic studies on Japanese species of the genus *Lycopodium* sensu lato. – *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 34: 66–79.
- Testo W., Haines A. & Gilman A. V. (2016): *Huperzia continentalis* (Lycopodiaceae), a new species of gemmiferous firmoss separated from *Huperzia haleakalae*. – *Systematic Botany* 41: 894–901.
- Valentine D. H. & Moore D. M. (1993): *Huperzia*. – 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. & Webb D. A. (eds.), *Flora Europaea*, Vol. 1, 2nd Ed., p. 3, Cambridge University Press, Cambridge.
- Wagner F. S. (1992): Cytological problems in *Lycopodium* s. l. – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79: 718–729.
- Wagner W. H., Jr. & Beitel J. M. (1992): Generic classification of modern North American Lycopodiaceae. – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79: 676–686.
- Wagner W. H., Jr. & Beitel J. M. in: *Flora of North America* editorial comitee [eds.] (1993): Lycopodiaceae Mirbel. Club-moss family. – *Flora of North America: North of Mexico* 2: 18–37.
- Wang W., Tanurdžić M., Luo M., Sisneros N., Kim H. R. et al. (2005): Construction of a bacterial artificial chromosome library from the spikemoss *Selaginella moellendorffii*: A new resource for plant comparative genomics. – *BMC plant biology* 5: 1–9.
- Whittier P. (1998): Germination of spores of the Lycopodiaceae in axenic culture. – *American Fern Journal* 88: 106–113.
- Zhang L. B. & Iwatsuki K. (2013): Lycopodiaceae. – *Flora of China* 2–3: 13–34.

Zhang L. B. & Kung H. S. (1998): A taxonomic study of *Huperzia* Bernh. (s. s.) sect. *Huperzia* in China. – Acta Phytotaxonomica Sinica 36: 521–529.

7.2 Internetové zdroje

CCDB (2018): *Huperzia*. – <http://ccdb.tau.ac.il/search/> (accessed 23 March 2018).

Explorer (2018): *Huperzia mannii* - (Hbd.) Kartesz & Gandhi. – <http://explorer.natureserve.org/servlet/NatureServe?searchName=Huperzia+mannii> (accessed 11 April 2018).

Flora of Svalbard (2018): *Huperzia arctica* (Grossh. ex Tolm.) Sipliv. – <http://svalbardflora.no/index.php?id=464> (accessed 7 Feb 2018).

Flora of the Canadian Arctic Archipelago (2007): *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex. Schrank and Mart. – <https://nature.ca/aafloara/data/www/ptlyhu.htm> (accessed 13 Feb 2018).

GBIF (2018): *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis. – <https://www.gbif.org/species/2688470> (accessed 11 April 2018).

Hawaiian Native Plant Genera (2018): *Huperzia*. – <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/huperzia.htm> (accessed 11 April 2018).

Panarctic Flora (2018): 0103 *Huperzia* Bernh. – <http://nhm2.uio.no/paf/0103#paf-0103> (accessed 13 Feb 2018).

7.3 Software

StatSoft, Inc. (2018): STATISTICA (data analysis software system), version 13.2, www.statsoft.com.

8 Přílohy

Příloha 1: Souhrnná tabulka lokalit, ze kterých byly sebrány vzorky.

Číslo lokality	Zkratka	Země	lokalizace	Sběratel	Datum	Počet vzorků	Typ	Nadm. Výška	GPS (WGS-84)
1	CZ-VcelpBoub	Česká republika	Včelná pod Boubínem, lesní průsek ve smrkovém lese, ca 600 m J od autobusové zastávky Buk, Včelná pod Boubínem- Na Pile, nebo ca 1,7 km JJZ od Muzea žehliček ve Včelné pod Boubínem	L. Ekrť, J. Krejčí	23.5.2017	10	B	930	49°0'35.930"N, 13°50'53.395"E
2	CZ-Sibir	Česká republika	Stachy, na lesní cestě ca 480 m JZ od rozcestníku v obci Krousov, nebo ca 1040 m JJV od kapličky v obci Studenec (patří pod obec Nicov), Okres Prachatice	L. Ekrť, J. Krejčí	23.5.2017	3	B	970	49°6'15.772"N, 13°37'31.563"E
3	CZ-Zhu	Česká republika	Šumava, Horská Kvilda, bývalá obec Zhůří: kamenice v prostoru bezlesí bývalé obce ca 1 km JV od vrcholu Huťská hora (k. 1187) a ca 2,8 km SSV od centra obce Horská Kvilda	L. Ekrť, J. Krejčí	23.5.2017	8	B	1150	49°5'0.190"N, 13°33'38.854"E
4	CZ-Boub	Česká republika	Boubín, ca 260 m JZ od rozcestníku Boubínská cesta-sever (nebo ca 270 m po modré cestě na levé straně), nebo ca 610 m SZ od Boubínské rozhledny, nebo ca 3 km VSV od obecního úřadu v obci Kubova Huť, okres Prachatice	O. Horných	6.10.2017	4	B	1295	48°59'40.490"N, 13°48'39.244"E
5	CZ-Jes-Bridl	Česká republika	Hrubý Jeseník; Vernířovice: horní hrana sutí nad souvislou hranicí lesa ve vrcholové části Břidličné (k. 1358), S od vrcholu, asi 4,1 km V od kostela v obci Vernířovice; ruly (s vložkami křemene, kyselá), nebo ca 8 km JV od obecního úřadu v obci Loučná nad Desnou, okres Šumperk	P. Koutecký	29.8.2017	5	B	1350	50°02'03"N, 17°11'13"E

6	CZ-Jes-PecL	Česká republika	Hrubý Jeseník; Vernířovice, sutě v pásmu horských smrčín na Z svahu hory Pecný (k. 1330), asi 0,4-0,5 km JZ od vrcholu, asi 3,6 km VJV od kostela v obci Vernířovice, nebo ca 6,2 km VSV od kostela Sv. Vavřince v obci Sobotín, ruly (s vložkami křemene, kyselé), okres Šumperk	P. Koutecký	29.8.2017	5	B	1250	50°01'10"N, 17°10'38"E
7	CZ-KrkH1	Česká republika	Pec pod Sněžkou, Malá Studniční jáma, ca 840 m VJV od vrchu Studniční hora (k. 1554), nebo ca 3,4 km SSZ od kaple Panny Marie v obci Pec pod Sněžkou; suť mezi klečovými poli, Královéhradecký kraj	J. Kučera	29.8.2017	3	B	1266	50°43'34.097"N, 15°43'4.429"E
8	CZ-KrkH2	Česká republika	Pec pod Sněžkou, ca 1,34 km V od vrchu Studniční hora (k. 1554), nebo ca 3,44 km SSZ od kaple Panny Marie v obci Pec pod Sněžkou, v úpatí Studniční hory; suť pod Čertovou roklí, Královéhradecký kraj	J. Kučera	31.8.2017	2	B	1000	50°43'40.789"N, 15°43'29.957"E
9	CZ-KrkH3	Česká republika	Pec pod Sněžkou, ca 1,33 km V od vrchu Studniční hory (k. 1554), nebo ca 3,36 km SSZ od kaple Panny Marie v obci Pec pod Sněžkou, v úpatí Studniční hory, suť pod Čertovou zahrádkou, Královéhradecký kraj	J. Kučera	6.9.2017	4	B	996	50°43'38.14"N, 15°43'29.759"E
10	CZ-Sum, BStrz	Česká republika	Šumava, Železná ruda, ca 870 m JV od rozcestníku (č. a ž. cesty) Bílá strž, nebo 3,06 km JJV od kapličky ve městě Hamry, okres Klatovy	D. Půbal	2017	1	B	1074	49°11'15.568"N, 13°9'57.946"E
11	CZ-Jkam+Boub	Česká republika	Šumava, Horní Vltavice, Jóhnuv kámen, ca 960 m ZJZ od Boubínské rozhledny, na Srním vrchu, ca 2,4 km VSV od obecního úřadu v obci Kubova Huť, okres Prachatice	D. Půbal	28.7.2017	1	B	1294	48° 59' 23.282"N, 13° 48' 16.329"E

12	CZ-Jkam+Boub	Česká republika	Šumava, Boubín, ca 530 m JJZ od Srního vrchu, v sousedství pramenů Kaplického potoka, ca 2,01 km VSV od obecního úřadu v obci Kubova Huť, okres Prachatice	D. Půbal	28.7.2017	1	B	1167	48° 59' 7.109"N, 13° 48' 8.064"E
13	CZ-JizDul	Česká republika	Janov, mezi Jeleními prameny a U Orlí skály, ca 110 m JV od vrcholu Nad Mýtem, vedle cesty, ca 1,9 km JZ od městského úřadu v obci Harrachov, okres Semily	A. Čejková	17.7.2017	2	B	730	50°45'55.121"N, 15°24'16.596"E
14	CZ-Har, HPot	Česká republika	Harrachov, ca 1,12 km VSV od kostela sv. Alžběty v Harrachově, nebo ca 1,5 km J od Bílého vrchu, kraj Liberecký	A. Čejková	5.9.2010	10	B	773	50°47'2.352"N, 15°26'4.911"E
15	CZ-Har, Kam	Česká republika	Harrachov, ca 1,66 km VSV od kostela sv. Alžběty v Harrachově, nebo ca 1,5 km JZ od vrchu Jakšín, Kraj Liberecký	A. Čejková	5.9.2017	8	B	860	50°47'11.535"N, 15°26'29.538"E
16	CZ-Har, NJCes	Česká republika	Harrachov, ca 1,57 km JJZ od kostela sv. Alžběty v Harrachově, ca 540 m SSV od vrchu Nad Mýtem, mezi cestou a potokem, Kraj Liberecký	A. Čejková	15.8.2017	5	B	693	N50°46'8.529"N, E15°24'31.325"E
17	CZ-Har, PJCes	Česká republika	Harrachov, ca 1,52 km J od kostela sv. Alžběty v Harrachově, nebo ca 890 m SV od vrchu Nad Mýtem; v lese, Kraj Liberecký	A. Čejková	15.8.2017	7	B	740	50°46'4.161"N, 15°25'1.886"E
18	CZ-Har, Sstruha	Česká republika	Harrachov, ca 500 m VJV od Plaveckého bazénu v obci Ryžoviště, nebo ca 780 m JJZ od vrchu Ptáčinec, Kraj Liberecký	A. Čejková	10.8.2017	7	B	793	50°45'31.034"N, 15°27'10.759"E
19	CZ-Mum	Česká republika	Krkonoše, Harrachov: údolí říčky Mumlava ca 300 m V od Mumlavského vodopádu, ca 1,9 km V od kostela v obci Harrachov	A. Čejková	22.6.2017	2	B	800	50°46'14.237"N, 15°27'28.857"E
20	CZ-MarV	Česká republika	Obec Svatá Maří- Brdo, ca 340 m JV od domu čp. 19, PP Mařský vrch, nebo ca 20 m pod rozhlednou (k. 907), Okres Prachatice	M. Konečná	2017	1	B	895	49°4'23.009"N, 13°50'51.481"E

21	CZ-KrkLH	Česká republika	Luční hora (1555), ca 5 km V od kostela sv. Petra ve Špindlerově Mlýně, nebo ca 5 km SZ od kaple Panny Marie v obci Pec pod Sněžkou, Královéhradecký kraj	J. Harčárik	2017	10	B	1550	50°43'39.326"N, 15°40'55.031"E
22	CZ-KrkSnez	Česká republika	Sněžka (1603), ca 4,3 km S od kaple Panny Marie v obci Pec pod Sněžkou, nebo ca 5,4 km ZSZ od kostela sv. Petra a sv. Pavla v obci Malá Úpa, Královéhradecký kraj	J. Harčárik	2017	11	B	1600	50°44'9.477"N, 15°44'22.779"E
23	CZ-KrkStH	Česká republika	Studniční hora (1554), ca 3,9 km SSZ od kaple Panny Marie v obci Pec pod Sněžkou, nebo ca 6,7 km V od kostela sv. Petra ve Špindlerově Mlýně, Královéhradecký kraj	J. Harčárik	2017	10	B	1550	50°43'36.853"N, 15°42'21.96"E
24	CZ-KrkVKolo	Česká republika	Vysoké kolo (1509), ca 6,3 km SSZ od kostela sv. Petra ve Špindlerově Mlýně, nebo ca 9,9 km SV od Kostela sv. Michala v obci Rokytnice nad Jizerou, Liberecký kraj	J. Harčárik	2017	10	B	1500	50°46'35.955"N, 15°34'1.836"E
25	Sk-Dumb	Slovensko	Nízké Tatry, Ďumbier, na červené turist. cestě ca 1,33 km ZSZ od vrcholu Ďumbier (k. 2046), nebo ca 1,76 VSV od chaty Kosodrevina v obci Kosodrevina	J. Krejčí, L. Ekrť, O. Horných	16.8.2017	5+4	A+B	1805	48°56'16.700"N, 19°37'19.800"E
26	Sk-Chop	Slovensko	Nízké Tatry, Chopok, ca 90 m JJV od vrcholu Chopok (k. 2024), na červené turist. cestě, nebo ca 1,090 km SSZ od chaty Kosodrevina v obci Kosodrevina	J. Krejčí, L. Ekrť, O. Horných	16.8.2017	15+1	A+B	1985	48°56'30.552"N, 19°35'36.346"E
27	Sk-Vkriv	Slovensko	Malá Fatra, Terchová, okres Žilina, ca 10 m nad červ. turist. cestou a ca 80 m SZ od rozcestníku Vel'ký Kriváň- hrana, nebo ca 320 m SZ od vrcholu Vel'ký Kriváň (k. 1709), nebo ca 8,31 km JV od kostela v obci Belá, okres Žilina	J. Krejčí, L. Ekrť, O. Horných	15.8.2017	8	B	1620	49°11'25.500"N, 19°1'40.600"E

28	Sk-PodSol	Slovensko	Vysoké Tatry, Predné Solisko, na modré turist. cestě, ca 260 m V od rozcestníku Škutnastná pol'ana, nebo ca 510 m JJZ od vrcholu Predné Solisko (k. 2117), nebo ca 10,5 km SSV od Muzea ľudových tradícií v obci Važec, okres Poprad	J. Krejčí, L. Ekrť, O. Horných	17.8.2017	11	A	1775	49°8'45.800"N, 20°2'6.000"E
29	Sk-PreSol	Slovensko	Vysoké Tatry, Predné Solisko, na modré turist. cestě, ca 60 m JV od vrcholu Predné Solisko (k. 2117), nad červ. turist. cestou, nebo ca 11 km SSV od muzea ľudových tradícií v obci Važec, okres Poprad	J. Krejčí, L. Ekrť, O. Horných	17.8.2017	15	A	2100	49°8'59.800"N, 20°2'17.700"E
30	Ukr-Hov, sest	Ukrajina	Ivano-Frankivská oblast; pohoří Čornohora [Chornohora, Чорногора]; Vorochta [Vorokhta, Ворохта]: asi 17 km J od středu obce, prameniště na horní hranici lesa v závěru údolí potoka Dancežyk [Dantsezhyk; Данцежик], asi 1,5 km SV od vrcholu Turkul (1933) [Туркул]; asi rula	P. Koutecký	25.6.2017	5	B	1510	48°07'58"N, 24°32'46"E
31	Ukr-Hov, vrch	Ukrajina	Ivano-Frankivská oblast; pohoří Čornohora [Chornohora, Чорногора]; Vorochta [Vorokhta, Ворохта]: asi 14 km JJZ od středu obce, Hoverla (2061) [Говерла], subalpínské trávníky na SV hřebeni, 0,25-1,25 km SV od vrcholu; asi rula	P. Koutecký	25.6.2017	5	B	1784	48°09'56"N, 24°30'17"E
32	Ukr-Vor	Ukrajina	Ivano-Frankivská oblast; pohoří Čornohora [Chornohora, Чорногора]; Vorochta [Vorokhta, Ворохта]: asi 12,5 km JJV od středu obce, smrčina (pravděpodobně sekundární) v údolí pravostranného přítoku řeky Prut [Прут], asi 1,8 km SZ od vrcholu Maryš (1341) [Marysh; Мариш]	P. Koutecký	26.6.2017	5	B	1080	48°10'18"N, 24°35'09"E

33	Sve-H1	Švédsko	Lule Lappmark, Vaisauokta: u vodopádu na pravém břehu řeky Guossjájáhkå, ca. 430m před ústím do jezera Akkajaure, ca 90,8 km SV od čerpací stanice LPG Fauske v obci Fauske v Norsku	J. Kučera	28.7.2017	1	B	540	67° 40' 27.512"N, 17° 15' 37.818"E
34	Sve-H2S2	Švédsko	Lule Lappmark, Nordkalottenleden trail, údolí Guossjájáhkå na SZ svahu hory Boalnotjáhkkå ca. 4.2km JZ od Vaisaluokta, ca 87,4 km SV od benzínky LPG Fauske v obci Fauske v Norsku	J. Kučera	28.7.2017	3	B	790	67° 38' 43.177"N, 17° 12' 42.412"E
35	Sve-H3	Švédsko	Lule Lappmark, Padjelanta Nationalpark, Padjelantaleden trail, Z svah hory Loadásj ca. 5 km SSZ od chaty Láddejáhkå, ca 68,1 km SV od čerpací stanice LPG Fauske v obci Fauske Norsku	J. Kučera	29.7.2017	5	B	755	67° 30' 23.299"N, 16° 52' 51.726"E
36	Sve-H4	Švédsko	Lule Lappmark, Padjelanta Nationalpark, Padjelantaleden trail, Szsvah hory Ieltivárre 4.5 km Szod vrcholu, SZ od jezera Ieltijávrásj, ca 62,4 km V od čerpací sanice LPG Fauske v obci Fauske v Norsku	J. Kučera	1.8.2017	1+4	B+S	760	67° 17' 1.979"N, 16° 52' 19.711"E
37	Sve-H5	Švédsko	Lule Lappmark, Padjelanta Nationalpark, Padjelantaleden trail, V svah kopce ca. 2.1 km SSZ od chaty Tarraluoppal, ca 73 km V od čerpací stanice LPG Fauske v obci Fauske v Norsku	J. Kučera	3.8.2017	4	B	890	67° 12' 37.84"N, 17° 06' 046.285"E
38	Sve-195bs	Švédsko	Norrbottn county, provincie Lule Lappmark, Mt. Njunjesvárre, J úpatí 370 m SSZ od chaty Njunjes STF, [SWEREF 99], ca 13,8 km Z od kostela Kvikkjokks kirka, Kvikkjokk, Norrbotten, region Norrland, Švédsko	J. Kučera	5.8.2017	4	B	510	66°57'48.06"N, 17°24'26.964"E

39	A-Hoch	Rakousko	Hochschwab, Wanderweg 840, cca 600 m od Häuslalm Hütte, nebo ca 390 m JJZ od vrcholu Buchbergkogel (k. 1700), Thörl, nebo ca 6,05 km S od kostela Pfarrkirche hl. Magdalena, v obci Tragöß-Oberort, okres Bruck- Mürzzuschlag, Štýrsko	L. Ekrt	16.9.2016	1	B	1380	47°35'15.317"N, 15°4'56.229"E
40	A-L-Mitte	Rakousko	Lunz am See, balvany jižně od jezera Mittersee, asi 5,3 km JV od středu obce Lunz am See	M. Štech	14.7.2017	1	B	780	47°49'32.466"N, 15°4'31.365"E
41	A-Traun	Rakousko	Oberösterreich (Horní Rakousko); Gmunden: V úpatí hory Traunstein, les (bučina) v sousedství hlavní lesní cesty, asi 4,8 km JJV od náměstí, nebo ca 4,7 km JV od muzea Radmuseum v obci Ebenzweiter, okres Gmunden; vápenec	P. Koutecký	17.7.2017	2	B	480	47°52'34"N, 13°48'56"E
42	A-Bös, úp	Rakousko	Ca 270 m VSV od jezera Grüne Lacke vedle cesty po pravé straně, nebo ca 800 m JV od vrcholu Größer Bösenstein (k. 2448), ca 4,3 km ZSZ od restaurace Keltentube v obci Pfahlbaudorf, Hohentauern, okres Muratal, Štýrsko, nebo ca 5,4 km ZSZ od kostela v obci Hohentauern, okres Gmunden	L. Ekrt	22.8.2017	9	A	2130	47°26'22.419"N, 14°24'45.807"E
43	A-Bös, v	Rakousko	Alpy, Hohentauern, ca 70 m V od vrcholu Großer Bösenstein (k. 2448), vedle cesty po pravé straně, ca 6,01 km ZSZ od kostela v obci Hohentauern, okres Muratal, Štýrsko	L. Ekrt	22.8.2017	9	A	2390	47°26'35.902"N, 14°24'17.732"E
44	N-Sva1	Norsko	Dventdalen, ca 13,4 km JV od Longyearbyen	J. Dvořák	31.7.2017	8	A	77	78°09'54.0"N, 16°08'00.6"E
45	N-Sva3	Norsko	Collesdallen, ca 11,7 km JZ od vrcholu Nordenskiöld Fjellet a ca 600 m od pobřeží, ca 18,7 km JZ od čerpací stanice Svalbard Auto v obci Longyearbyen	J. Harčárik	2017	9	A	10	78°6'28.8"N, 15°2'34"E

46	N-Sva4	Norsko	Grumantbyen, ca 6,9 km ZJZ od vrcholu Nordenskiöld Fjellet a ca 800 m od pobřeží, ca 13 km ZJZ od pumpy Svalbard Auto v obci Longyearbyen	A. Čejková	3.8.2017	7	A	101	78°10'14.5"N, 15°7'30"E
47	Nor-Troll	Norsko	Obec Fræna, cesta na Trollkirke na hřebeni, ca 1080 m JJV od vrcholu Troltindam (k. 887), nebo ca 390 m JJV od nejjižnější jeskyně Trollkyrkja, nebo 6,51 km SV od motelu Bamsekroa v obci Elnesvågen	L. Ekrt	2015	1	B	350	62°53'7.585"N, 7°16'12.495"E
48	VB-Dev	Velká Británie	Rezervace Dartmoor Forest, ca 1,26 km JJV od pošty v obci Postbridge, nebo ca 7,34 km SV od muzea Dartmoor Prison museum v obci Pricetown, Západní Devon	F. Rumsey	2017	1	B	380	50°34'59.168"N, 3°54'34.619"W
49	GB-Torr	Velká Británie	Skotsko, Torridon, ca 50 m po cestě (SSZ) od mostu přes říčku Allta'Bhealaich, nebo ca 3,6 km SSZ od S rohu fotbalového hřiště/stadionu v Torridonu	L. Ekrt	8.9.2014	1	B	265	57°34'39.800"N, 5°32'38.800"W
50	D-Schw	Německo	Schwarzwald, Feldberg-Ort: skála u turistické cesty protínající potok Zastlerbach ca 500 m SV od vrcholu hory Feldberg (k. 1493), ca 2,9 km SZ od kostela v centru obce Feldberg-Ort	L. Ekrt , O. Hornych	26.6.2017	8	B	1320	47°52'39.400"N, 8°0'31.000"E