

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Určování říčních populací lakušníku štítnatého  
(*Ranunculus peltatus*)**

Bakalářská práce

**Vojtěch Dolejšek**

Školitel: Mgr. Petr Koutecký, Ph.D.

České Budějovice 2021

Dolejšek V. (2021): Určování říčních populací lakušniku štítnatého (*Ranunculus peltatus*). [Determination of fluvial populations of pond water-crowfoot (*Ranunculus peltatus*). Bc. Thesis, in Czech] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

In some Czech rivers hybridogenous populations of pond water-crowfoot (*Ranunculus peltatus*) were detected. These populations are morphologically similar to the parental pond water-crowfoot and it is sometimes difficult to tell them apart. Such hybridogenous populations are not detectable via flow cytometry and are only detectable via sequencing. In this thesis I was trying to find out whether the hybridogenous populations could be clearly distinguished based on their morphology from the parental species pond water-crowfoot.

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

V Českých Budějovicích 12.4.2021

.....

Vojtěch Dolejšek

## **Poděkování**

Velký dík patří mému školiteli Petru Kouteckému za skvělé vedení mé práce, za čas, který mi věnoval, a za veškerou technickou pomoc. Další poděkování patří těm, kteří mi pomohli se sběrem materiálu, jmenovitě Kateřině Šumberové a Lindě Vlčkové. Poděkování patří také těm, kteří mi poskytli herbářové položky pro potřebná měření, konkrétně Janu Prančlovi a Zdeňku Kaplanovi.

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	1
1.1 Taxonomické pojetí rodu.....	1
1.2 Rozšíření.....	2
1.3 Ekologie.....	2
1.4 Ohrožení a ochrana.....	3
1.5 Morfologie .....	3
1.5.1 List .....	4
1.5.2 Květ.....	4
1.5.3 Plod .....	5
1.6 Polyploidizace a velikost genomu .....	6
1.7 Hybridizace.....	6
1.8 Fenotypová plasticita.....	7
1.9 <i>Ranunculus peltatus</i> .....	8
1.9.1 Popis druhu .....	8
1.9.2 Rozšíření, ekologie, nomenklatura .....	9
1.9.3 Ploidie a hybridizace.....	9
1.10 Cíl práce.....	11
<b>2 Metodika</b> .....	12
2.1 Použitý materiál .....	12
2.2 Průtoková cytometrie.....	16
2.3 Sekvenování .....	17
2.3.1 Použitý materiál .....	17
2.3.2 Izolace DNA .....	17
2.3.3 PCR.....	19
2.3.4 Gelová elektroforéza.....	19
2.3.5 Příprava vzorků k sekvenování .....	19
2.4 Morfometrika.....	20
2.5 Analýza dat .....	22
2.5.1 Zpracování sekvenačních dat .....	22
2.5.2 Rozdělení populací .....	23
2.5.3 Analýza morfometrických dat .....	23
<b>3 Výsledky</b> .....	25
3.1 Průtoková cytometrie.....	25
3.2 Výsledky sekvenování.....	25

3.3 Morfometrické analýzy.....	29
3.3.1 Popisné statistiky .....	29
3.3.2 Korelační analýza .....	33
3.3.3. Analýza hlavních komponent (PCA).....	33
3.3.4 Diskriminační analýza .....	37
<b>4 Diskuze</b> .....	<b>42</b>
<b>5 Závěr</b> .....	<b>45</b>
<b>6 Literatura</b> .....	<b>46</b>

## 1 Úvod

Lakušníky (*Ranunculus* sect. *Batrachium*) jsou taxonomicky velmi komplikovaná skupina vodních rostlin. Jejich komplikovanost je daná především výraznou fenotypovou plasticitou, vysokou mírou hybridizace a polyploidizací (Prančl et al., 2018). Ve své bakalářské práci se zabývám jihočeskými říčními populacemi druhu *R. peltatus*, které v sobě kombinují všechny z uvedených faktorů. Během předchozího výzkumu školitele a kolegů (J. Prančl, Z. Kaplan, a další) byly v různých vodních tocích v jihočeském regionu nalézány populace *R. peltatus*, které se morfologicky v různé míře odlišovaly od běžných populací z tekoucích vod.

Vzhledem ke zmíněné fenotypové plasticitě nebylo jisté, zda a jaký mají tyto odchylky taxonomický význam. Až po použití molekulárně-biologických metod se ukázalo, že některé z těchto populací (ne všechny) jsou hybridogenního původu, konkrétně hybridy *R. peltatus* a *R. trichophyllus*. Nejde o F1 generace, ale o populace vzniklé zpětným křížením s *R. peltatus*, kterému se tudíž blíží morfologicky i relativním množstvím DNA v jádře (viz oddíl 1.10.3). Kvůli posunu relativního množství DNA v jádře směrem k *R. peltatus* se nedají hybridy poznat pomocí metody průtokové cytometrie (kterou se české lakušníky včetně F1 kříženců obvykle poznat dají) a je nutné získat sekvence DNA, na základě kterých se dají identifikovat (Prančl et al., 2018; Koutecký et al., 2021). Není vyloučeno, že po detailní analýze bude možné najít morfologické znaky, které umožní zpětné křížence určit, což je hlavní náplní této práce.

### 1.1 Taxonomické pojetí rodu

Lakušníky jsou skupina rostlin patřící do čeledi pryskyřníkovité (Ranunculaceae) z řádu pryskyřníkotvaré (Ranunculales) (Angiosperm Phylogeny Group, 2016).

V západoevropském pojetí byla skupina řazena do rodu pryskyřník. V dřívějším pojetí ve středoevropské a východoevropské literatuře (např. Hejný et Slavík, 1997; Kubát et al., 2002) byly lakušníky vyčleňovány do samostatného rodu *Batrachium*, v současné době jsou i zde spíše vnímány jako sekce rodu pryskyřník (*Ranunculus* sect. *Batrachium*), neboť se ukázalo, že jde opravdu jen o malou monofyletickou skupinu vnořenou uvnitř rodu *Ranunculus* (Emadzade et al., 2010; Hörandl et Emadzade, 2012). Názor na zařazení lakušníků přesto není ustálený, v nejnovější české literatuře je ovšem respektováno pojetí skupiny jako sekce rodu *Ranunculus* (Kaplan et al., 2019a, b).

## 1.2 Rozšíření

V současné době je rozlišováno asi 25–30 druhů lakušníku, nicméně skupina není stále dostatečně prostudovaná (Englmaier, 2016; Wiegleb et al. 2017). Skupina je rozšířena celosvětově, ale na severní polokouli je zastoupena výrazně hojněji, na jižní polokouli ve velkých částech území chybí. Centrum, centrum diverzity skupiny leží v západní Evropě (Englmaier, 2016), přičemž je v Evropě zastoupena podle současného poznání asi 19 druhů (Wiegleb et al. 2017). Kromě Evropy jsou lakušníky udávány ze Severní a Jižní Ameriky (např. Peru, Bolívie, oblast Patagonie), z Afriky (např. Maroko, Egypt, Etiopie), z Asie (např. Jemen, Saudská Arábie, Mongolsko, Rusko) a jeden druh z Austrálie (Cook, 1963; Cook, 1966; Wiegleb et al. 2017).

V České republice je podle posledního botanického klíče možno nalézt osm druhů:

*Ranunculus aquatilis*, *R. baudotii*, *R. circinatus*, *R. fluitans*, *R. peltatus*, *R. penicillatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* (Kaplan et al., 2019a). Nedávný výzkum českých lakušníku ale ukázal, že druhů u nás může být víc. V rámci druhu *R. trichophyllus* byly objeveny dva odlišné cytotypy, které, jak se ukázalo, se liší i morfologicky (i když ne příliš). Tyto dva cytotypy by bylo možno popsat jako dva odlišné druhy (kterými vlastně jsou, jen jsou si morfologicky dost podobné). Cytotypy jsou pracovníě označovány jako *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B. (Prančl et al. 2018; Kaplan et al., 2019b). Podobná situace je i s druhem *R. penicillatus*, kde je cytotypů možno vysledovat ještě více. Tento druh je nejspíš komplexem taxonů vzniklých hybridizacemi a následnou polyploidizací a je otázkou, jak jednotlivé cytotypy taxonomicky hodnotit (viz. Hybridizace, oddíl 1.7) (Zalewska-Gałosz, 2014; Prančl et al., 2018; Koutecký et al., 2021).

## 1.3 Ekologie

Lakušníky jsou striktně vázány na vodní prostředí, obývají jak stojaté (např. *R. aquatilis*), tak tekoucí (např. *R. fluitans*) vody. Řada druhů je vázána pouze na stojatou či tekoucí vodu, nebo alespoň dané prostředí silně preferuje. Z českých druhů roste především ve stojaté vodě *R. baudotii*, *R. aquatilis*, *R. circinatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus*. V tekoucí vodě roste *R. fluitans* a *R. penicillatus*. *Ranunculus peltatus* obývá jak vody stojaté, tak tekoucí (Kaplan et al, 2019a). Při kolísání vodní hladiny v biotopu mohou lakušníky růst na vlhkém obnaženém dně. V takovém případě vytváří tzv. terestrické formy (např. *R. trichophyllus*). Několik druhů je na vlhké substráty (jako např. obnažené dno, vlhká holá zem periodických vod) vázáno primárně (*R. hederaceus*) (Cook, 1966). Jiné druhy jsou naopak schopny růst celý život pod vodní hladinou (často např. *R. trichophyllus*, Cook 1966 uvádí poddruh *R.*

*trichophyllus* subsp. *lutulentus*, který je kleistogamický a často kvete pod vodou). Některé druhy tolerují eutrofní prostředí (např. *R. peltatus*), jiné preferují oligotrofní vody, další jsou schopné snášet i minerálně bohatá prostředí (např. brakické vody a slaniska, udává se *R. baudotii*) (Cook, 1966; Kaplan et al., 2019a).

Lakušníky osidlují prostředí od subtropů po boreální oblasti, najdeme je od nížin po vysokohorské polohy (Cook, 1966; Wiegand et al. 2017).

Lakušníky jsou rostliny hmyzosubné, ale může u nich docházet k samosprašení. Pozorovaná byla i kleistogamie (samosprašení přímo v neotevřeném květu). V případě trvale ponořených taxonů dochází ke kleistogamii obligátně (Cook, 1966; Hong, 1991).

#### **1.4 Ohrožení a ochrana**

V důsledku intenzifikace hospodaření v 2. polovině 20. století, která se nevyhnula ani vodním plochám, došlo od této doby k ústupu řady vodních makrofyt, lakušníky nevyjímaje (Englmaier, 2016). Svůj podíl na úbytku některých druhů má i regulace vodních toků a vysoušení mokřadů, které je v České republice spojeno se změnami krajiny v průběhu 70. a 80. let, nicméně negativní změny v krajině probíhají stále (Miko et Hošek, 2009). V červeném seznamu cévnatých rostlin pro Českou republiku z roku 2012 je z celkového počtu osmi druhů jeden zařazen do kategorie C1 (kriticky ohrožené, *R. baudoti*), dva do kategorie C2 (silně ohrožené, *R. penicillatus*, *R. rionii*), jeden do kategorie C3 (ohrožené, *R. circinatus*) a tři do kategorie C4 (vzácnější druhy vyžadující další pozornost, *R. aquatilis*, *R. trichophyllus*, *R. fluitans*). Nějakým způsobem ohrožených je tedy sedm z osmi našich popsáných druhů. (Grulich, 2012). Zmíněné druhy jsou všechny též zařazeny v některé z kategorií posledního červeného seznamu cévnatých rostlin ČR (Grulich, 2017).

Podle vyhlášky Ministerstva životního prostředí ČR č. 395/1992 Sb. je jako kriticky ohrožený druh (§KO) chráněn *R. baudoti* a *R. rionii*, jako silně ohrožený (§SO) a ohrožený (§O) není chráněn žádný druh. Je tedy patrné, že zákonná ochrana nepamatuje na větší část našich ohrožených druhů.

#### **1.5 Morfologie**

Lakušníky jsou jednoleté až vytrvalé byliny. Některé druhy jsou obligátně jednoleté (*Ranunculus sphaerospermus*) či vytrvalé (*R. peltatus*), některé jsou obvykle vytrvalé, a jako jednoleté rostou při změně stavu biotopu (například pokles vodní hladiny a růst na obnaženém dně může vést k tomu, že druh se chová jako jednoletý). Takovým druhem je



např. *R. fluitans* (Cook, 1966). Stonky jsou větvené i nevětvené, dosahují délky až několika metrů, jsou poměrně chabé, sympodiálně větvené. Listy jsou na lodyze umístěny střídavě. Rostliny mohou kořenit ve dně nebo volně plavat (stojaté vody), jsou schopny tvořit v uzlinách adventivní kořeny (Cook 1966; Hejný et Slavík, 1997).

### 1.5.1 List

Lakušníky vykazují listovou heterofylii. Tvoří dva typy listů – listy nitřovité a listy lupenité. Nitřovité listy jsou krátce řapíkaté, tvořené tenkými nitřovitými úkrojky. Úkrojky vznikají několikanásobným dělením listové čepele, první dvě dělení jsou trojčetná, zbylá jsou vidličnatá. Nitřovité listy jsou zpravidla ponořené pod vodní hladinou, mohou být chabé, při vyjmutí z vody zplihlé, mohou být ale i tužší a držet tvar i po vyjmutí z vody. Plovoucí listy jsou lupenité, čepel je dlanitolaločná až dlanitosečná, plochá, v obrysu ledvinitá až okrouhlá. List je nejčastěji třídílný až pětídílný, počet listových úkrojků je ale proměnlivý. Žilnatina lupenitých listů je dlanitá. (Cook 1966; Hejný et Slavík, 1997; Kaplan et al., 2019a).

Heterofylie je obecným znakem skupiny, existují ale i druhy, které nejčastěji či obligátně tvoří jen jeden typ listů. Pouze listy lupenité tvoří *R. hederaceus* a *R. omiophyllus*, pouze listy ponořené např. *R. circinatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* (Cook, 1966; Englmaier, 2016). V některých případech může dojít ke vzniku tzv. přechodného listu, který je kombinací obou zmíněných variant (Cook, 1969). U *R. peltatus* má takový list podobu mozaiky složené z nitřovitých a lupenitých částí a může být dokladem hybridizace (Cook, 1966).

Na bázi řapíku vyrůstají palisty. Mají obvejčitý, okrouhlý až trojúhelníkovitý tvar a mohou do různé míry srůst s řapíkem (Hejný et Slavík, 1997). Palisty jsou v literatuře označovány jako významný určovací znak, rozhodující je například jejich délka. Užívat tohoto znaku je ale potřeba opatrně, neboť délka palistů může být u některých druhů ovlivněna prostředím. U herbářových položek může také docházet k jejich ke změnám tvaru vlivem sesychání, proto se pro určování do druhu v praxi téměř nepoužívají (Cook, 1966; Kaplan et al., 2019).

### 1.5.2 Květ

Květy jsou nejčastěji bílé, pětičetné. Jedinou výjimkou je asijský druh *R. flavidus*, který má květy nažloutlé (Cook, 1966). Květy vyrůstají po jednom na dlouhých květních stopkách v paždí listenů. Květní obaly jsou členěny na kalich a korunu, nesrostlé. Korunní lístky jsou obvejčitého tvaru, bílé a na bázi mají žlutou skvrnu. Počet korunních plátků může být proměnlivý (byť většinou je plátků pět), stejně tak jejich rozměry (i v rámci druhu), které

jsou do určité míry dány prostředím (Cook, 1966; Hejný et Slavík, 1997). Kališní lístky jsou obvykle kratší než korunní, zpočátku zelené, později až hnědě zbarvené. Jsou většinou přitisklé, někdy před opadáním nazpět ohnuté (Cook, 1966; Englmaier, 2016). V některých případech mohou být zbarveny i namodralé, což je udáváno jako spolehlivý taxonomický znak. Podle Cooka by žádný z českých druhů namodralé kališní lístky mít neměl (Cook, 1966), ale některá česká určovací literatura tento znak uvádí. Konkrétně Hejný a Slavík (1997) píše, že *R. baudotii* má kališní lístky někdy namodralé.

Na bázi korunních lístků se nachází nektária. Rozlišují se tři typy nektárií: hruškovité, půlměsíčitě a okrouhlé. Tvar nektária je v literatuře označován jako velmi užitečný determinační znak, jeho použití má ovšem svá úskalí. Tvar nektária je potřeba určovat pouze na zcela vyvinutých korunních lístcích, neboť některá ontogenetická stádia např. hruškovitého nektária připomínají nektária jiných tvarů. Určování tvaru z herbářových položek se také jeví jako problematické, protože nektária mohou být vysušením zdeformovaná. V takovém případě je potřeba korunní lístky namočit do vody (Cook, 1966). Vzhledem k možné variabilitě nektárií (hlavně u hybridů) je lepší tento znak podle některých pramenů užívat jen v případě, že vegetativní znaky nejsou dostatečně kvalitně vyvinuty (např. u terestrických forem či málo kvalitního nasbíraného materiálu) (Englmaier, 2016).

Květní lůžko je opět uváděno jako užitečné při determinaci. Významnými znaky jsou protažení lůžka za plodu a míra jeho chlupatosti (Cook, 1966; Englmaier, 2016).

### **1.5.3 Plod**

Plodem lakušníků je nažka. Na květním lůžku může být nažek velmi proměnlivý počet v řádu jednotek až desítek (uvádí se až sto). Nažky jsou zhruba vejčité ledvinitého tvaru s výraznými příčnými žebry. *Ranunculus baudotii* je významný přítomností úzkého křídlatého lemu, který se u ostatních druhů nevyskytuje. Nažky jsou lysé či v různé míře chlupaté. Některé druhy mají nezralé nažky chlupaté, ale za zralosti nažky olysávají (Cook, 1966; Englmaier, 2016; Hejný et Slavík, 1997). Délka nažky je udávána jako další taxonomický užitečný znak, závisí ale na celkovém počtu vyvinutých nažek a podle některých autorů je jako taxonomický znak ne zcela spolehlivá (Cook, 1966). Míra chlupatosti nažek je taktéž popisována jako použitelný taxonomický znak, ovšem olysávání nažek během zrání může použití zkomplikovat (Cook, 1966).

## 1.6 Polyploidizace a velikost genomu

Základní chromosomové číslo lukušníků je 8 (např. Cook, 1966; Dahlgren, 1991), ve skupině ale běžně dochází k polyploidizaci. V přírodě byli pozorováni nejčastěji euploidní polyploidní, aneuploidní byli v přírodě zaznamenáni jen vzácně (Cook, 1966; Prančl et al., 2018). Vznik aneuploidních hybridů byl zaznamenán také jako výsledek umělého křížení (Cook, 1966). Kromě diploidních jedinců byli pozorováni triploidní, tetraploidní, pentaploidní a hexaploidní (Cook, 1966). Polyploidizace často doprovází proces hybridizace, vznikají allopolyploidní (Koutecký et al., 2021). Počet chromosomů je možno v některých případech využít k determinaci jedinců lukušníků, ale protože řada taxonů lukušníků sdílí stejný chromosomový počet, není tato metoda použitelná obecně. Spíše může v některých specifických případech posloužit k utvrzení určení nějakého taxonu (Webster, 1987).

Nedávná studie ukazuje, že středoevropské druhy lukušníků včetně různých ploidních úrovní jsou odlišitelné měřením velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie. Pouze u několika taxonů dochází ve velikosti genomu k překryvu (Prančl et al., 2018). Pomocí cytometrie je možno odhalit i některé hybridy mezi lukušníky (zejména F1 generaci). Cytometrie ale není schopna odhalit např. hybridy ze zpětných křížení, u kterých dochází k posunu směrem k jednomu z rodičovských druhů (Prančl et al. 2018; Koutecký et al., 2021).

## 1.7 Hybridizace

Hybridizace je u lukušníků poměrně častý jev. K hybridizaci může dojít i mezi taxony s odlišnými ploidními úrovněmi (např. Webster, 1987). Hybridy mají často sníženou fertilitu (v souplodí mají vyvinuto jen několik nažek) nebo jsou sterilní, ale díky vegetativnímu množení mohou vytvářet velké stabilní populace (Kaplan et al., 2019a). Cook prováděl pokusy s umělou hybridizací mezi mnoha druhy a zjistil, že řada hybridů je životaschopná. Někteří životaschopní hybridy byli plodní. Naopak někteří hybridy se ukázali jako neschopní života i přes opakované pokusy křížení (Cook, 1966). Podobné pokusy prováděl také Hong. Ten uvádí mimo jiné stručný popis F1 generace a procentuální zastoupení fertilitního pylu. Někteří z jeho hybridů byli plodní částečně (*R. peltatus* × *R. trichophyllus*), jiní zcela (*R. trichophyllus* × *R. aquatilis*) (Hong, 1991). Cook ve své pozdější práci, ve které se zabýval opět hybridy především uměle vytvořenými, píše, že diploidní hybridy byli neschopni života či byli sterilní, tetraploidní byli sterilní či fertilitní, stejně tak pentaploidní. Hexaploidní kříženci byli nejčastěji fertilitní (Cook, 1970). Cook dále uvádí, že sterilita je u hybridů dána obvykle genově (nikoliv chromozomálně) a projevuje se abortováním pohlavních orgánů (Cook, 1970). Mnoho hybridů je známo i z přírody (Cook, 1966). Zpětným křížením

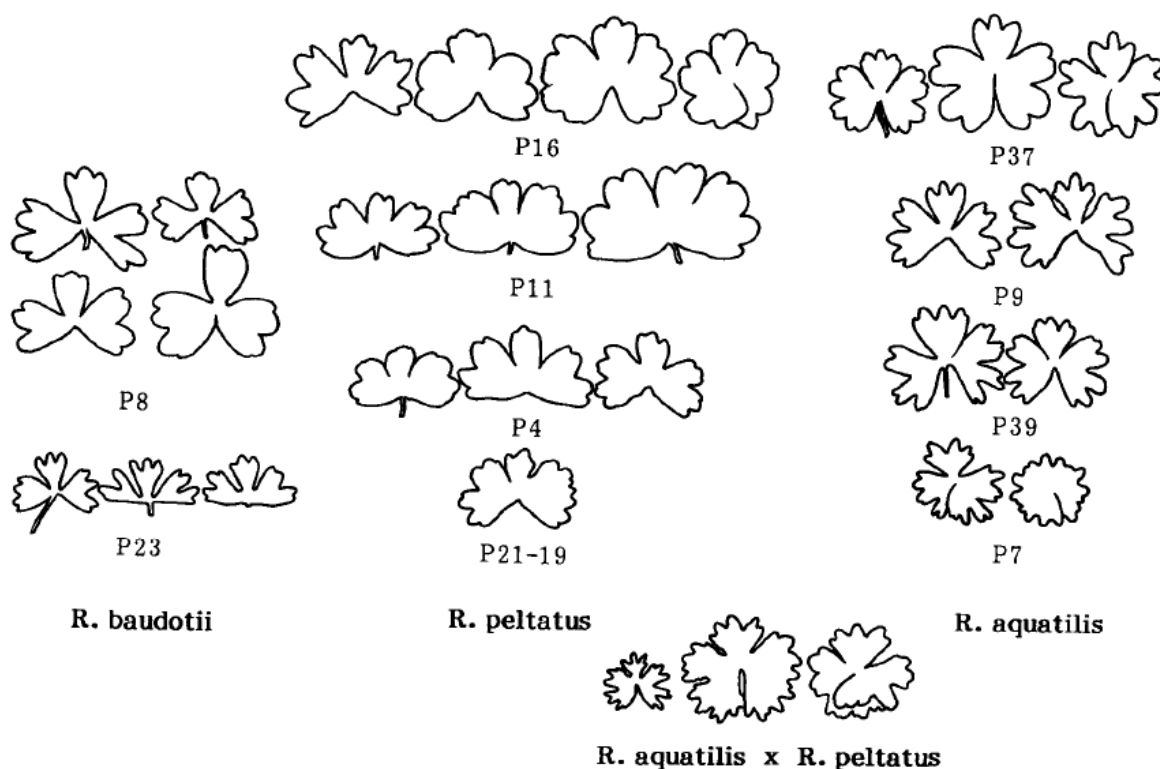
plodných hybridů může dojít ke vzniku hybridních rojů a jedinců, kteří se morfologicky blíží jednomu z rodičů a spolehlivě se odliší až s použitím sekvenování (Koutecký et al., 2021). Významnou roli v hybridizačních procesech hraje polyploidizace a vznik allopolyploidů. Příkladem je *R. penicillatus*. V rámci tohoto taxonu je rozlišováno několik variet (někdy klasifikovaných jako poddruhy až druhy) a celkově vykazuje velkou variabilitu (Cook, 1966, Webster, 1988; Wiegleb et al., 2017). Již Cook ve své práci píše, že tento taxon je komplikovaný a může mít hybridogenní původ (Cook, 1966). Následné práce ukazují, že jde skutečně o komplex vícero hybridogenních linií, u nichž polyploidizace zajistila obnovení fertility (původní hybridy byli neplodní), což vedlo ke stabilizaci taxonu a umožnilo jeho rozšíření (Webster, 1988; Zalewska-Gałosz, 2014; Wiegleb et al., 2017).

### 1.8 Fenotypová plasticita

Vodní rostliny obecně vykazují velkou míru fenotypové plasticity (Santamaria, 2002), některé taxony jsou schopny vytvářet značně nepodobné formy. Známé jsou tímto například rdesty (*Potamogeton*), kde u některých druhů jeden genotyp dokázal v závislosti na měnících se podmínkách prostředí vytvořit typy pokrývající téměř celou známou morfologickou variabilitu druhu (Kaplan, 2002). Variabilita druhu není ale podmíněna pouze vlastnostmi habitatu, může být dána i sezónně během střídání ročních období (Zanger et Wiegleb, 1987; Garbey et al., 2004). Lakušníky v rámci vodních rostlin nejsou žádnou výjimkou, vykazují též velkou míru fenotypové plasticity (např. Hong, 1991). Zanger a Wiegleb zjistili, že jarní, letní a podzimní formy jimi studovaných druhů lakušníků (např. *R. peltatus*, *R. aquatilis* či *R. penicillatus*) se od sebe lišily především způsobem větvení a délkou ponořených listů. Morfologickou variabilitu lakušníků dále demonstrují porovnáním různých letních forem, které se liší např. celkovou délkou, větvením, délkou listů a poměrem lupenitých a nit'ovitých listů (Zanger et Wiegleb, 1987). Hong ve své práci ukazuje fenotypovou plasticitu na příkladu stavby listu a palistu či rozměrů korunního plátku (Hong, 1991). Garbey et al. (2004) se zabývá lakušníkem štítnatým (*Ranunculus peltatus*). Uvádí, že tento druh vykazuje jak sezonní variabilitu, tak fenotypovou plasticitu danou konkrétními vlastnostmi stanoviště. Variabilitu v průběhu sezóny ukazuje pozorováním, kdy se v průběhu sezóny posouvalo umístění nejdelšího internodia směrem k vrcholu lodyhy a zvětšovala se do určité doby jeho celková délka. Oproti tomu např. délka nit'ovitého listu měla v rámci sezóny tendenci se zmenšovat. Dále uvádí fenotypovou plasticitu danou vlastnostmi prostředí. Korelované byly některé znaky s určitými parametry chemismu vody v prostředí, např. koncentrace  $\text{NH}_4^+$  měla vliv na délku internodií a koncentrace fosforu ovlivňovala

adventivní kořenění. Z fyzikálních vlastností prostředí, které měly částečný vliv na fenotyp, uvádí např. míru zastínění či rychlost proudění vody, korelace míry variability rostlin ale vycházely s fyzikálními vlastnostmi nižší než s chemickými (Garbey et al., 2004).

Jak ukazuje výše zmíněné, morfologická rozmanitost v rámci skupiny i v rámci jednotlivých druhů lukušníků může být značná, což komplikuje jejich rozeznávání a určování (Prančl et al., 2018).



Obr. 1: Rozmanitost morfologie plovoucího listu vybraných taxonů, převzato (Hong, 1991).

## 1.9 *Ranunculus peltatus*

### 1.9.1 Popis druhu

*Ranunculus peltatus* je vždyzelená až sezónně zelená vytrvalá vodní bylina. Vzácně může být jednoletý. Je striktně vázán na vodní prostředí, obývá stojaté i tekoucí vody. Lodyhy jsou dlouhé několik desítek centimetrů až několik metrů, v uzlinách často kořenující. Rostlina tvoří dva typy listů – ponořené nitčovitě a plovoucí lupenité listy. V tekoucích vodách vzácně nemusí tvořit lupenité listy. Listy jsou na lodyze umístěny střídavě (Cook, 1966; Hong, 1991; Englmaier 2016; Wiegleb et al., 2017; Kaplan et al., 2019a). Druhy vykazuje určitou míru fenotypové plasticity. Morfologicky se od sebe mají lišit populace z tekoucích a

stojatých vod. V tekoucích vodách mohou být rostliny výrazně protáhlé (Wiegler et al., 2017).

Květy jsou bílé, pětičetné, korunní lístky poměrně velké (nejčastěji 9–23 mm). Květy vyrůstají jednotlivě z paždí lupenitých listenů na stopkách několik centimetrů dlouhých. Nektária jsou nejčastěji hruškovitá. Nažky jsou chlupaté, za zralosti mohou olysávat, jejich počet se pohybuje v řádu desítek (Cook, 1966; Wiegler et al., 2017).

### 1.9.2 Rozšíření, ekologie, nomenklatura

Centrum rozšíření má *Ranunculus peltatus* v Evropě, roste i v severní Africe a v jihozápadní Asii. Hranice jeho východního rozšíření není přesně známa kvůli záměnám s jinými druhy. V Evropě je udáván z celého kontinentu kromě nejsevernějších oblastí. Ani zde není hranice jeho rozšíření přesně známa, může za to zaměňování s druhem *R. schmalhauseni* (Cook, 1966; Bobrov et al., 2015; Wiegler et al., 2017). V České republice roste roztroušeně až velmi hojně po celém území státu, vzácnější je v nížinách (Kaplan et al., 2019a; Kaplan et al. 2019b). Jde o nejhojnější český lakušník, o čemž svědčí i fakt, že jako jediný z našich druhů nespadá do žádné kategorie ohrožení v červeném seznamu z roku 2012 (Grulich, 2012), ani v posledním červeném seznamu (Grulich, 2017).

*Ranunculus peltatus* obývá široké spektrum vodních biotopů. Roste ve vodách jak oligotrofních, tak eutrofních. Obývá jak substráty písčité, tak i humózní, preferuje ovšem kyselé silikátové podloží. Jde stále o hojný druh, ale vlivem intenzivního rybníčního hospodaření, regulace toků a znečištění vod mírně ustupuje (Kaplan et al., 2019b).

Nomenklatura druhu je značně spleťtá, což dokládá řada synonym. Cook jich uvádí přes dvě desítky (Cook, 1966). V české literatuře je v současné době chápán jako samostatný druh, dříve byl ale uváděn třeba jako varieta druhu *Ranunculus aquatilis* (*Ranunculus aquatilis* var. *peltatus*) (Hejný et Slavík, 1997).

### 1.9.3 Ploidie a hybridizace

*Ranunculus peltatus* je znám ve třech ploidních úrovních: diploid ( $2n = 16$ ), tetraploid ( $2n = 32$ ), hexaploid ( $2n = 48$ ) (Cook, 1966). Z nedávného výzkumu plyne, že v České republice se vyskytují jen tetraploidi, vyšší ploidní úrovně se vyskytují jen zcela výjimečně, vznikají asi opakovaně prostřednictvím neredukovaných gamet a v populaci se dlouho neudrží (Prančl et al., 2018).

Podobně jako některé jiné druhy sekce se i tento poměrně často kříží (Wiegleb et al., 2017). Cook prováděl pokusy s umělou hybridizací. Ze svých pokusů s křížením druhů získal např. hybrida *R. tripartitus* × *R. peltatus*. Tento hybrid byl podle Cooka fertilní a v morfologických znacích zhruba intermediární. Dále popisuje sterilní hybridy *R. hederaceus* × *R. peltatus*, *R. baudotii* × *R. peltatus* či *R. tripartitus* × *R. peltatus* (tento hybrid byl v některých případech i fertilní, záleželo na typech, které Cook použil jako rodičovské druhy). Někteří hybridy byli morfologicky intermediární (*R. tripartitus* × *R. peltatus*), jiní připomínali jednoho z rodičů. Hybrid *R. baudotii* × *R. peltatus* vypadal jako *R. peltatus* a lišil se jen drobnými znaky (byl méně vzrůstný, měl drobnější květy). Některé ze zmíněných hybridů Cook našel i spontánně vzniklé v přírodě (např. *R. tripartitus* × *R. peltatus*). Pouze z přírody pak Cook uvádí např. hybrida *R. omiophyllus* × *R. peltatus* (Cook, 1966). V literatuře se dále uvádějí kříženci *R. peltatus* × *R. penicillatus*, *R. peltatus* × *R. aquatilis* či *R. peltatus* × *R. trichophyllus*. (Wiegleb et al., 2017). Podle Wiegleba jsou hybridy *R. peltatus* hojní obzvláště v tekoucích vodách. Wiegleb píše (s odkazem na nepublikovaná data), že hybridy tohoto druhu jsou místy tak časté, že v některých říčních tocích na severu střední Evropy tvoří možná až 50 % biomasy v populacích označovaných jako *R. peltatus* (kvůli podobnosti hybridů s čistým taxonem *R. peltatus*) (Wiegleb et al., 2017).

V České republice je nejhojnějším křížencem *R. peltatus* × *R. trichophyllus*. Tento hybrid je mnohdy podobný druhu *R. aquatilis* (Kaplan et al., 2019). Jak již bylo zmíněno (rozšíření, oddíl 1.3), vyskytuje se u nás *R. trichophyllus* (tetraploidní) ve dvou cytotypech. *R. peltatus* se kříží s oběma cytotypy. F1 hybrid *R. peltatus* × *R. trichophyllus* se zpětně kříží s *R. peltatus*, čímž vznikají populace, které morfologicky víceméně odpovídají druhu *R. peltatus*. Takové populace jsou nalézány nejčastěji v řekách a v jiné tekoucí vodě. Tito zpětní hybridy mají relativní množství DNA v jádře (2C hodnotu) v rozmezí od 2C hodnoty *R. peltatus* po F1 hybrida *R. peltatus* × *R. trichophyllus*, často blízkou 2C hodnotě *R. peltatus*, proto nejde tyto jedince spolehlivě poznat pomocí průtokové cytometrie (Prančl et al., 2018). Spolehlivě je možno tyto jedince určit až na základě sekvenačních dat. Pro tento účel lze použít dva úseky DNA. Prvním úsekem je ITS region jaderné ribozomální DNA, druhým je úsek chloroplastové DNA 3'*rps16*–5'*trnK*. Zpětní hybridy mohou mít jeden či oba tyto úseky od druhu *R. trichophyllus* (od jednoho či druhého cytotypu) (Koutecký et al., 2021).

## 1.10 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je zjistit, jestli se hybridní populace zmíněných zpětných hybridů dají jednoznačně určit podle morfologických znaků. Aby bylo možné podle morfologie zjistit, zda je konkrétní problematický jedinec hybrid, či jen čistý *R. peltatus*, který v tekoucí vodě vypadá netypicky (projev fenotypové plasticity), budou vyšetřeny i populace čistého lakušníku štítnatého ze stojaté vody. Porovnáním čistých populací *R. peltatus* ze stojatých a tekoucích vod bude možné posoudit míru vlivu tekoucí vody na morfologii druhu a „odfiltrvat“ ji od vlivu hybridizace. Morfologie bude charakterizována pomocí změřených vybraných morfologických znaků a taxonomická příslušnost populací bude určena za pomoci základních molekulárně-biologických metod (sekvenování).



## 2 Metodika

### 2.1 Použitý materiál

Pro měření byly použity herbářové položky rostlin sbíraných převážně v jižních Čechách, v menší míře v jiných částech republiky. V tabulce 1 jsou shrnuty lokality, na kterých bylo sbíráno, počet rostlin sebraných na jednotlivých lokalitách, sběratelé, kteří se sběru účastnili a datum sběru. V posledním sloupci tabulky (Voda) je uvedeno, zda šlo o populaci z vody stojaté (S) či tekoucí (T). V mapě na obrázku 2 jsou vyznačeny jednotlivé lokality. Barevně odlišené značení lokalit se vztahuje k charakteru populací a je rozvedeno v kapitole výsledky (viz výsledky, kapitola 3.2 Výsledky sekvenování). Modré body značí čistý *R. peltatus*, zelené hybridogenní populace a tyrkysové populace mírně ovlivněné hybridizací. Mapu vytvořil můj školitel Petr Koutecký v programu QGIS 3.10.3 (QGIS Development Team 2020). Jako podklad byla použita SRTM data (Jarvis et al., 2020).

Větší část rostlin byla již sesbírána a vylisována před zahájením mé bakalářské práce, osobně jsem se podílel na sběru zbylých rostlin. Během sběrů, kterých jsem se účastnil, bylo z vybraných populací odebráno nejčastěji pět rostlin, které byly označeny a vylisovány. Zvláštní důraz byl kladen na fixaci alespoň jednoho květu pomocí malé papírové obálky. Dále bylo z každé rostliny odebráno několik listů, které byly zafixovány v silikagelu pro pozdější izolaci DNA k sekvenování. Materiál sesbíraný před zahájením mé práce byl sbírán různým způsobem, z některých rostlin (hlavně starší sběry) nebyl odebrán a zafixován materiál pro izolaci DNA.

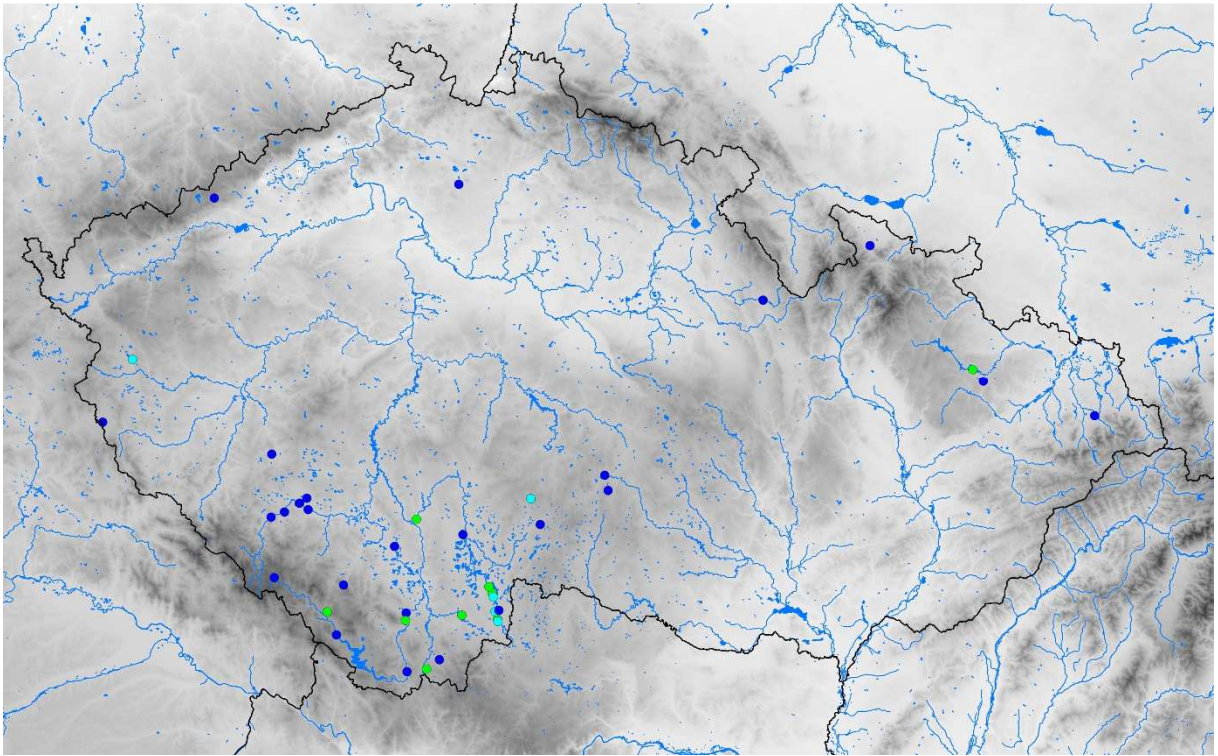
Tabulka 1: Seznam populací, lokality a jejich popis, sběratelé, datum sběru a charakter vody.

Číslo populace	Lokalita	GPS souřadnice	Počet vzorků	Sběratel	Datum	Voda
1	Majdalena, řeka Lužnice	48°57'49"N, 14°52'04"E	5	P. Koutecký, V. Dolejšek	16.7.2019	T
1	Majdalena, řeka Lužnice	48°57'54"N, 14°52'03"E	1	P. Koutecký, V. Dolejšek	16.7.2019	T
2	Veselí nad Lužnicí, Bechyňský potok	49°11'19"N, 14°41'42"E	5	P. Koutecký, V. Dolejšek	13.6.2019	T
3	Žirovnice (Vlčetín)	49°13'38"N, 15°09'08"E	4	P. Koutecký, V. Dolejšek	13.6.2019	T
4	Hlupín, Březový potok	49°19'41"N, 13°46'20"E	3	P. Koutecký, L. Vlčková	20.6.2019	T

Číslo populace	Lokalita	GPS souřadnice	Počet vzorků	Sběratel	Datum	Voda
5	Halámky, řeka Lužnice	48°51'46"N, 14°53'56"E	5	P. Koutecký	27.6.2017	T
6	Rychnov nad Malší, řeka Malše	48°40'04"N, 14°28'50"E	5	P. Koutecký	11.7.2017	T
7	Třebeč, Stropnice	48°52'37"N, 14°41'21"E	5	P. Koutecký	15.8.2019	T
8	Vítkov, řeka Moravice při osadě Zálužné	49°49'23"N, 17°42'32"E	4	P. Koutecký	9.6.2015	T
9	Suchdol nad Lužnicí, řeka Lužnice	48°53'31"N, 14°53'09"E	7	P. Koutecký	27.6.2016	T
10	Majdalena, řeka Lužnice na jezem Rozvodí	48°59'13"N, 14°50'55"E	9	P. Koutecký	27.6.2016	T
11	Záblatí, rybník Dolní Kozlovna	49°08'34"N, 14°17'27"E	3	K. Šumberová	9.6.2017	S
12	Majdalena, pískovna Cep	48°56'51"N, 14°52'32"E	4	P. Koutecký	11.6.2011	S
13	Volary, Volarský potok	48°53'24"N, 13°53'35"E	4	P. Koutecký	17.7.2012	T
14	Třísov, řeka Vltava	48°53'09"N, 14°21'34"E	4	P. Koutecký	31.8.2013	T
15	Popice u Jihlavy, rybník Horní Okrouhlík	49°21'28"N, 15°33'12"E	3	P. Koutecký	30.5.2010	S
16	Nová Pec, Lipno	48°48'04"N, 13°56'50"E	5	P. Koutecký	2.7.2015	S
17	Prachatice, malý rybník na Fefrovském potoce	48°59'38"N, 13°59'22"E	4	P. Koutecký	12.7.2012	S
18	Planá, rybník u silnice na Stříbro	49°51'42"N, 12°44'33"E	4	P. Koutecký	24.6.2012	S
19	Pravíkov, rybník na Drahoňovském potoce	49°19'35"N, 15°05'46"E	4	P. Koutecký	1.6.2014	S
20	Dvory nad Lužnicí, pískovna v nivě Lužnice	48°51'12"N, 14°54'07"E	4	P. Koutecký	24.5.2014	S
21	Vítkov, soustava rybníků Bělidla	49°46'34"N, 17°46'18"E	3	P. Koutecký	9.6.2015	S

Číslo populace	Lokalita	GPS souřadnice	Počet vzorků	Sběratel	Datum	Voda
22	Zlatá Koruna, údolí Kokotínského potoka	48°51'24"N, 14°21'18"E	2	P. Koutecký	1.8.2015	S
23	Koloděje nad Lužnicí, rybník	49°14'50"N, 14°25'12"E	2	P. Koutecký	31.5.2015	S
24	Nepomuk, malý rybník u silnice na Plzeň	49°29'49"N, 13°33'53"E	1	P. Koutecký	2.6.2013	S
25	Jilešovice, malá tůň	49°54'00"N, 18°08'00"E	5	P. Koutecký	10.6.2013	S
26	Modlešovice, tůň	49°15'28"N, 13°58'08"E	4	P. Koutecký	22.6.2011	S
27	České Budějovice, Mlýnská stoka	48°58'38"N, 14°28'09"E	2	P. Koutecký	VII. 2010	T
28	Suchdol nad Lužnicí, Malá Tušská pískovna	48°53'46"N, 14°54'27"E	1	P. Koutecký	13.6.2010	S
29	Jaroměř, rybník Malý Hodonický	48°42'17"N, 14°33'21"E	1	K. Šumberová	8.6.2017	S
30	Skalice u Frýdku Místku, u osady Záhoří	49°38'38"N, 18°25'47"E	1	P. Koutecký	4.6.2010	S
31	Horní Poříčí, řeka Otava	49°17'04"N, 13°46'48"E	1	J. Prančl, P. Koutecký	18.6.2011	T
32	Horažďovice, řeka Otava 1	49°18'32"N, 13°43'44"E	3	P. Koutecký, J. Prančl	17.6.2011	T
33	Velké Hydčice, slepé rameno řeky Otavy	49°18'20"N, 13°40'10"E	1	P. Koutecký, J. Prančl	17.6.2011	T
34	Žichovice, řeka Otava	49°16'31"N, 13°38'24"E	3	P. Koutecký, J. Prančl	17.6.2011	T
35	Čepice, řeka Otava	49°15'39"N, 13°34'54"E	1	P. Koutecký, J. Prančl	17.6.2011	T
36	Dobršín, řeka Otava	49°15'19"N, 13°33'40"E	4	P. Koutecký, J. Prančl	17.6.2011	T
37	Vyšší Brod, řeka Vltava	48°37'16"N, 14°19'38"E	1	J. Prančl	19.7.2012	T
38	Hrudkov, řeka Vltava	48°37'37"N, 14°21'20"E	1	J. Prančl	19.7.2012	T
39	Rožmberk nad Vltavou	48°39'28"N, 14°21'52"E	3	J. Prančl	20.7.2012	T

Číslo populace	Lokalita	GPS souřadnice	Počet vzorků	Sběratel	Datum	Voda
40	Čeřín, řeka Vltava	48°42'05"N, 14°21'15"E	1	J. Prančl	20.7.2012	T
41	Rájov, řeka Vltava	48°50'31"N, 14°22'24"E	1	J. Prančl	21.7.2012	T
42	Okna, Robečský potok	50°31'31"N, 14°40'15"E	3	J. Prančl	31.5.2014	T
43	Výsluní, Prunéřovský potok u osady Nové Domky	50°28'25"N, 13°13'32"E	1	Z. Kaplan	3.9.2004	T
44	Kvilda, Kvildský potok	49°01'21"N, 13°34'47"E	3	Z. Kaplan	13.8.1996	T
45	Františkovy Lázně, osada Lužná, Lesní potok	50°06'17"N, 12°16'52"E	1	Z. Kaplan	13.8.1996	T
46	Žamberk, řeka Divoká Orlice	50°05'15"N, 16°28'10"E	1	Z. Kaplan	14.8.1995	T
47	Vápenná, potok Vidnávka	50°17'39"N, 17°06'06"E	2	Z. Kaplan	17.7.2006	T
48	Horažďovice, řeka Otava 2	49°18'32"N, 13°43'44"E	1	P. Koutecký, J. Prančl	17.6.2011	T
49	Diana, Kateřinský potok	49°37'08"N, 12°33'55"E	1	J. Prančl	20.6.2014	T
50	Plandry, řeka Jihlava	49°24'58"N, 15°32'01"E	3	J. Prančl	21.5.2014	T



Obr. 2: Mapa s vyznačenými lokalitami, kde proběhl sběr materiálu. Barevné značení bodů se vztahuje k výsledkům (3.2 Výsledky sekvenování): modrá – čisté populace *R. peltatus*, tyrkysová - mírně ovlivněné populace, zelená - hybridogenní populace.

## 2.2 Průtoková cytometrie

Pomocí metody průtokové cytometrie byly sesbírané rostliny předběžně taxonomicky zhodnoceny. K měření byly použity živé rostliny. Rostliny byly pomocí průtokové cytometrie změřeny většinou již před zahájením méj bakalářské práce.

V Petriho misce bylo žiletkou nasekáno malé množství rostlinného vzorku (zhruba  $0,25 \text{ cm}^2$ ) ve  $0,4 \text{ ml}$  vychlazeného pufru Otto I ( $0,1 \text{ M}$  kys. citronová,  $5\%$  Tween 20). Společně s rostlinným vzorkem bylo nasekáno i stejné množství standartu (zde *Bellis perennis*). Vše bylo následně přefiltrováno přes filtr  $42\text{-}\mu\text{m}$  (tkanina Uhelon 130T). K filtrátu bylo přidáno  $0,8 \text{ ml}$  pufru Otto II ( $0,4 \text{ M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a 2-merkptoethanol ( $2 \mu\text{l/ml}$ )). Poté bylo přidáno fluorescenční barvivo a to buď propidium jodid (PI) společně s RNázou IIA (finální koncentrace obou  $50 \mu\text{g/ml}$ ), nebo 4,6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) s koncentrací  $4 \mu\text{g/ml}$ . Po několika minutách byly vzorky vloženy do cytometru. Vzorky barvené pomocí DAPI byly měřeny na cytometru Sysmex CyFlow Space s  $365 \text{ nm}$  UV-LED jako zdrojem světla (některé starší vzorky na přístroji Partec PAII s rtuťovou výbojkou), vzorky barvené pomocí PI byly měřeny cytometrem Partec CyFlow SL s  $532 \text{ nm}$  (zeleným) laserem o výkonu  $100 \text{ mW}$ . Výsledky měření byly zpracovány pomocí softwaru FloMax. Získané velikosti genomu

(resp. poměry intenzity fluorescence vzorek / standard) byly porovnány s rozmezím pro jednotlivé druhy publikované v práci Prančl et al., 2018.

## **2.3 Sekvenování**

### **2.3.1 Použitý materiál**

Pro izolaci DNA byl použit rostlinný materiál od jednotlivých sebraných rostlin fixovaný v silikagelu. K některým exsikátům nebyl fixovaný materiál dostupný, tudíž byla DNA izolována přímo z exsikátu. V takovém případě byla snaha vybrat vzorek pro izolaci z nepoškozené a dobře usušené části rostliny (odhadováno podle barvy, nebyly odebírány zahnědlé nebo zčernalé části), která nebyla porostlá řasami ani jinými vodními organismy.

Část rostlin byla osekvenována již před zahájením méj bakalářské práce (44 jedinců), ostatní sekvenované jedince (68) jsem zpracoval sám.

Počet osekvenovaných rostlin se odvíjel od množství jedinců sebraných z populace. Obvykle bylo z populace sebráno pět jedinců, pak byli sekvenováni ideálně tři jedinci z populace.

Z technických a finančních důvodů nebyli sekvenováni všichni měření jedinci a předpokládáno se, že pokud větší část morfologicky uniformní populace (tři jedinci z pěti) přísluší určitému taxonu, náleží k tomuto taxonu i zbytek populace. V populacích, kde byla zjištěna přítomnost hybridů nebo byly populace jinak komplikované (např. výrazná morfologická proměnlivost) bylo jedinců osekvenováno více, aby se lépe podchytila genetická podstata. Počet osekvenovaných jedinců shrnuje tabulka 4 v kapitole výsledky (viz kapitola 3.2 Výsledky sekvenování).

### **2.3.2 Izolace DNA**

Pro izolaci DNA byly zvoleny dva postupy: část vzorků byla izolována NaOH metodou, (Wang et al., 1993), zbylé CTAB metodou. (Doyle et Doyle, 1987). O tom, která metoda bude užitá, rozhodoval především stav fixovaného materiálu. Obecně byla preferována NaOH metoda, která je časově i finančně úsporná, pokud se vzorky ukázaly být problematické, byla užitá CTAB metoda. CTAB metoda byla taky použita v případě, že k sebraným rostlinám nebyl fixovaný vzorek pletiva v silikagelu a NaOH izolace přímo z exsikátu se nezdařila.

K NaOH izolaci bylo použito velmi malé množství rostlinného vzorku (asi 1 mm<sup>2</sup>). V 1,5 ml mikrozkumavce byl rostlinný vzorek rozdrcen pomocí homogenizátoru a jemného písku v 20 µl 0,5M NaOH. Pokud bylo potřeba, bylo poté přidáno dalších 20 µl 0,5M NaOH a v tření se pokračovalo. Poté byly vzorky centrifugovány 2 minuty při 13000 rpm. Poté byl připraven

PCR strip, do kterého bylo napipetováno 30  $\mu$ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 8,3) do každé zkumavky. Z centrifugovaných vzorků bylo odebráno po 3  $\mu$ l z každé mikrozukavky a přepipetováno do PCR stripu. Tím bylo dosaženo naředění DNA 1:10. Takto připravené izoláty byly připraveny k použití či skladování v mrazáku.

Na izolaci CTAB metodou bylo použito asi 0,5 cm<sup>2</sup> rostlinného vzorku. Rostlinné vzorky byly vloženy do 1,5 ml mikrozukavek. Do každé byly přidány dvě ocelové kuličky o průměru asi 3 mm. Následně byly vzorky drceny v mlýnku Retsch 400MM na plný výkon po dobu jedné minuty. Po vyjmutí vzorků z mlýnku bylo v digestoři přidáno po 700  $\mu$ l roztoku CTAB (obsahuje 2% (w/v) CTAB, 0,1M Tris, 0,02M Na<sub>2</sub>-EDTA, 1,4M NaCl, 2% (w/v) PVP-40) společně s 10  $\mu$ l 2-merkptoethanolu. Takto připravené zkumavky byly krátce ručně protřepány a následně nechány inkubovat v třepačce 30 minut při 50 °C. Po uplynutí této doby byly vzorky krátce centrifugovány na stolní centrifuze a roztoky přepipetovány do nových 1,5 ml mikrozukavek. V digestoři bylo přidáno ke každému vzorku 500  $\mu$ l roztoku chloroformu s isoamylalkoholem v poměru 24:1. Obsah zkumavek byl promíchán ručně několikerým převrácením zkumavek. Vzorky byly následně ponechány asi pět minut v klidu a poté krátce centrifugovány na centrifuze po dobu 10 minut při 10000 rpm. Po centrifugování bylo pracováno opět v digestoři. Z každého vzorku byla odebrána horní fáze (vodná fáze obsahující DNA) tak, aby nedošlo ke kontaminaci spodní fází. Vodní fáze byla odebírána pokud možno veškerá (asi 500  $\mu$ l) a přepipetována do nových 1,5 ml mikrozukavek. K vodní fáze bylo následně přidáno po 500  $\mu$ l chladného isopropanolu, vše bylo převrácením promícháno a zkumavky byly následně inkubovány půl hodiny při -20 °C. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány po dobu dvou minut při 13000 rpm. Centrifugací došlo k usazení izolované DNA do malého bílého peletu na dně mikrozukavky. V digestoři byl odpipetován supernatant ze zkumavky tak, aby na dně zůstal nepoškozený pelet DNA. K DNA bylo poté napipetováno 400  $\mu$ l 96% ethanolu (vychlazený v mrazáku), vše bylo cvrnkáním promícháno a zkumavky se nechaly inkubovat 15 minut při teplotě 37 °C v termobloku. Následně byly vzorky centrifugovány, supernatant odpipetován a bylo přidáno 200  $\mu$ l v mrazáku vychlazeného 70% ethanolu. Vzorky byly opět promíchány cvrnknutím a inkubovány pět minut při pokojové teplotě. Poté byly opět centrifugovány po dobu 5 minut při 13000 rpm. Po centrifugování byl supernatant odpipetován a zkumavky s otevřenými víčky se nechaly stát 15 minut při pokojové teplotě, čímž došlo k odpaření zbylého lihu. Následně bylo ke každému izolátu přidáno 30  $\mu$ l PCR vody a vzorky byly ponechány

v lednici, aby se DNA dostala do roztoku. Tím byly izoláty připraveny k použití či uskladnění.

### **2.3.3 PCR**

Amplifikovány byly dva úseky DNA. Prvním byl úsek ITS jaderné DNA za užití primerů ITS-F (King et al., 2001) a ITS4 (White et al., 1990). Druhým amplifikovaným úsekem byl úsek chloroplastové DNA 3'*rps16*–5'*trnK*. Tento úsek byl amplifikován pomocí primerů *rps16x2-a* a *trnKx1-a* (Shaw et al. 2007). Kombinací těchto úseků je možno určit, zda jde o hybridní taxon či čistý *R. peltatus*.

Na jednu PCR reakci byl použit roztok vzniklý smícháním 3,75 µl komerčně dodávaného PP Master Mixu (Top-Bio, Česká republika), 0,45 µl každého primeru (forward i reverse v koncentraci 5 µM), 2,35 µl PCR vody a 0,5 µl DNA izolátu. Objem jedné reakce tedy činil 7,5 µl. PCR směs (kromě DNA) byla vždy namíchána do jedné zkumavky pro potřebný počet jednotlivých reakcí (plus jedna jako kontrola) a poté rozpipetována po 7 µl do zkumavek stripu (kromě kontroly). Poté bylo do zkumavek stripu přidáno po 0,5 µl izolátu DNA, vše bylo ve stripu promícháno ručně cvrnknutím a krátce centrifugováno na stolní centrifuze. Následně byly stripy vloženy do cycleru při nastavení: počáteční denaturace 94 °C po dobu pěti minut, dále 35 cyklů po 30 sekundách při 94 °C, následně 30 sekund při 53 °C a nakonec jedna minuta při 72 °C, a finální elongace po dobu 10 minut při 72 °C.

### **2.3.4 Gelová elektroforéza**

Pomocí gelové elektroforézy bylo ověřeno, že amplifikace proběhla správně a že nedošlo ke kontaminaci PCR směsi v průběhu její přípravy. V plastové mikrotitrační destičce bylo 1,5 µl amplifikovaného vzorků smícháno s 0,5 µl nanášecího pufru obsahujícího fluorescenční barvivo GelRed. Vzniklá směs byla nanášena na 1,5% agarosový gel v pufru TBE, kromě toho byl do jedné či více jamek napipetován ladder (100bp). Elektroforéza běžela zhruba 25 minut při napětí 120 V. Gel byl poté vyhodnocen pod UV světlem.

U izolátů s výrazným jedním proužkem DNA bylo přistoupeno k dalším krokům (viz dále). Pokud reakce nevyšla (slabý nebo žádný produkt nebo nespecifické produkty), byl izolát DNA buď naředěn (poměru 1:10 či 1:100) a PCR opakována, nebo bylo v případě NaOH izolace DNA přistoupeno k izolaci pomocí CTAB metody.

### **2.3.5 Příprava vzorků k sekvenování**

Vždy 2 µl PCR produktu byly smíchány s 0,7 µl směsi Exo-AP (komerčně dodávaná směs enzymů). Vzorky takto připravené byly ručně promíchány a vloženy do cycleru. Zde se



inkubovaly 15 minut při 37 °C a poté 15 minut při 85 °C. Do nových zkumavek byla připravena sekvenační směs. Ta se skládala 5 µl 5M primeru (ITS-F či rps 16x2-a), vody (2.3 µl) a 2,7 µl ExoSAPem přečištěného PCR produktu. Zkumavky byly poté označeny kódem a odeslány firmě k osekvenování. Sekvenování provedla firma GATC Biotech (nyní součást Eurofins Genomics).

## 2.4 Morfometrika

Měřené znaky byly vybrány podle určovací literatury (Englmaier 2016; Kaplan et al., 2019; Hejný et Slavík, 1997) na základě zkušeností školitele z předchozího výzkumu lakušníků.

Měřené znaky jsou uvedeny v tabulce 2. Kromě znaků měřených byly pro analýzy použity i některé znaky z měřených znaků spočtené. Byly to znaky DSKP (DKP/SKP), PLSI (PL/SI), DZPL((PL-DZ)/PL) a DPLDI (DPL/DI). Tyto znaky jsou také uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Měřené a spočtené morfologické znaky, jejich značka a popis.

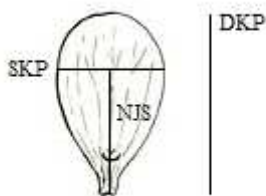
Značka znaku	Popis	Poznámka
DI	Délka internodia	
DPS	Délka plodní stopky	Měřeny 3 na lodyze
DPL	Délka ponořeného listu	
DTU	Délka terminálního úkrojku	
PZN	Počet zralých nažek	Měřeno na 3 souplodích
PL	Délka plovoucího listu	
DR	Délka řapíku plovoucího listu	
DKP	Délka korunního plátku	viz obr. 3
SKP	Maximální šířka korunního plátku	viz obr. 3
NJS	Místo maximální šířky korunního plátku	viz obr. 3
TN	Tvar nektária	
DN	Délka nažky	Měřeny 3 nažky v souplodí
CHL	Chlupatost nažky	Měřeny 3 nažky v souplodí
SI	Šířka čepele plovoucího listu	viz obr. 4

TE	Šířka báze terminálního úkrojku plovoucího listu	viz obr. 4
DZ	Délka od báze čepele k zářezu při terminálním úkrojku	viz obr. 4
UH	Úhel báze listu	viz obr. 4
PO	Počet zubů plov. listu	
DSKP	Poměr délky a šířky kor. plátku	DKP/SKP
PLSI	Poměr délky a šířky plov. listu	PL/SI
DZPL	Hloubka členění plov. listu	(PL-DZ)/PL
DPLDI	Poměr délky ponořeného listu a délky internodia	DPL/DI

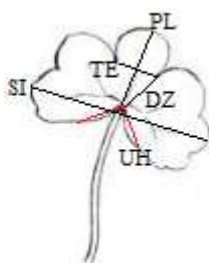
Znak DI byl měřen na internodiu nad nejvýše položeným dobře vyvinutým ponořeným listem na lodyze. Znaky PL a DR byly měřeny na nejnižše položeném dobře vyvinutém plovoucím listu na lodyze. Znak DPS byl měřen třikrát pokud možno na jedné lodyze ve třech internodiích nad sebou. Znak DN byl měřen třikrát v rámci souplodí a to na nažce zhruba na bázi, uprostřed souplodí a na vrcholu souplodí (nažky byly vyjmuty ze souplodí pomocí pinzety). Znak CHL byl měřen na stejných nažkách, na kterých byla měřena délka (DN). Třikrát měřené znaky (DPS, PZN, DN a CHL) byly zprůměrovány a pro analýzy byly použity jejich průměry.

Znaky DI, DPS, DPL, DTU, PL a DR byly měřeny přímo na exsikátu pravítkem či krejčovským metrem (ohnuté struktury jako např. plodní stopky) v milimetrech. Znaky DKP, SKP, NJS a DN byly měřeny pomocí binokulární lupy s měřítkovým okulárem. Přesnost binokulární lupy byla 0,05 mm. V některých případech musel být korunní plátek namočen v Petriho misce s vodou, aby bylo možno ho přesněji změřit. Znaky SI, TE, DZ a UH byly měřeny pomocí softwaru (QuickPHOTO) na oskenovaných listech z exsikátů. Znaky SI, TE a DE jsou udány v milimetrech, znak UH ve stupních (viz obrázek 4). Pokud se bazální laloky listu překrývaly, byl změřený úhel udáván se záporným znaménkem.

Znak TN byl určen do tří kategorií: H – hruškovité, K – kulaté, P – půlměsíčitě (Kaplan et al., 2019a). Znak CHL byl stanoven na třech úrovních: 0 – lysé, 1 – řídké chlupaté, 2 – hustě chlupaté. Znak CHL nakonec nebyl v analýzách použit, protože nažky za zralosti olýsávají.



Obr. 3: Morfologické znaky na korunním plátku, upraveno podle (Ross-Craig 1948).



Obr. 4: Morfologické znaky na čepeli lupenitého listu, upraveno podle <https://www.plant-images.de/m/info/625647693?l=de>.

## 2.5 Analýza dat

### 2.5.1 Zpracování sekvenčních dat

Data ze sekvenování byla nejprve zkontrolována v programu FinchTV. V tomto programu byl také vybrán čitelný úsek sekvence DNA ze sekvenčních dat a případně byla provedena ruční editace některých vzorků. Ruční editace byla potřebná zejména u jedinců hybridogenního původu, jejichž úsek chloroplastové DNA (viz oddíl 2.3.3) pocházel od *R. trichophyllus* (viz hybridizace *R. peltatus*, oddíl 1.10.3) a obsahuje dlouhou repetici způsobující sklouznutí polymerázy a zhoršené čtení sekvence za repeticí. U úseku ITS se ve více místech vyskytují polymorfismy (různé báze) v rámci jedince, zejména u mezidruhových kříženců v místech, kde se rodičovské druhy liší (viz Tabulka 3 v Koutecký et al. 2021). Tyto polymorfismy byly označeny podle standardních IUPAC kódů. Upravené sekvence byly dále zpracovány v programu BioEdit. V tomto programu byly sekvence seřazeny pod sebe (byl proveden alignment) a porovnány se vzorovými sekvencemi daných

úseků rodičovských druhů (*R. peltatus* a *R. trichophyllus*). Vzorové sekvence mi poskytl školitel. Sekvence chloroplastového úseku byly rozděleny na úseky od *R. peltatus* a *R. trichophyllus* přímo v programu BioEdit. Sekvence ITS byly kromě porovnání v BioEditu pro větší přesnost rozřizeny programem FaBox do skupin unikátních haplotypů. V programu SplitsTree 4.15 (Huson et Bryant, 2006) byla podle unikátních ITS sekvencí vyhotovena síť neighbor network (na základě *uncorrected P distance*, distance pro místa s nerozlišenými bázemi nastavena na *Average States*), na jejímž základě byli jedinci rozřizeni na ty s ITS sekvencí typickou pro *R. peltatus* a na jedince ovlivněné hybridizací s *R. trichophyllus*.

### 2.5.2 Rozdělení populací

Na základě výsledků sekvenování byly jednotlivé zkoumané populace *R. peltatus* rozděleny do šesti skupin: čistá populace *R. peltatus* z tekoucích vod (obsahovala pouze čisté jedince *R. peltatus*), čistá populace *R. peltatus* ze stojatých vod (obsahovala pouze čisté jedince *R. peltatus*), hybridogenní populace *R. peltatus* z tekoucích vod (v případě, že alespoň dva sekvenovaní jedinci z populace byli hybridogenní), hybridogenní populace *R. peltatus* ze stojatých vod (v případě, že alespoň dva sekvenovaní jedinci z populace byli hybridogenní), mírně ovlivněné populace *R. peltatus* z tekoucích vod (v případě, že jeden sekvenovaný jedinec z populace byl hybridogenní a populace byla mírně ovlivněná hybridizací) a mírně ovlivněné populace *R. peltatus* ze stojatých vod (v případě, že jeden sekvenovaný jedinec z populace byl hybridogenní). Vymezené skupiny shrnuje tabulka 3.

Tabulka 3: Vymezené skupiny populací *R. peltatus* na základě sekvenačních dat.

hybridogenní, stojaté vody	mírně ovlivněné, stojaté vody	čisté, stojaté vody
hybridogenní, tekoucí vody	mírně ovlivněné, tekoucí vody	čisté, tekoucí vody

### 2.5.3 Analýza morfometrických dat

Analyzovány byly pouze populace, ve kterých se podařilo osekvenovat alespoň jednoho jedince, a tak je přiřadit k výše zmíněným skupinám. Populace, ze kterých se nepodařilo osekvenovat ani jednoho jedince byly z analýz vyřazeny. Konkrétně byly vyřazeny populace 26, 27, 28, 35, 37, 38, 41, 45 (viz tabulka 3 ve výsledcích, kapitola 3.2 Výsledky sekvenování).

Znaky, které byly měřeny vícekrát na jednom jedinci (PZN, DN a CHL), byly zprůměrovány a následně bylo pracováno už jen s jejich průměry.

Analýza morfometrických dat byla provedena v programu R pomocí souboru skriptů MorphoTools (Koutecký, 2015).

V programu R byly pro data z morfometrických měření nejprve zobrazeny histogramy pro každý znak, aby bylo možno zkontrolovat, že distribuce dat se blíží normální distribuci. V případě, že rozdělení bylo pozitivně šikmé, byla data transformována přirozeným logaritmem. Konkrétně byly logaritmovány znaky DI, DPL, DTU, PZN a DPLDI.

Poté byla pro data vytvořena korelační matice (neparametrická – Spearmanova), aby se ověřila nezávislost (nekorelovanost) znaků. Znaky byly považovány za nezávislé, pokud jejich korelace patřila do intervalu  $(-0,90; 0,90)$ . Tuto podmínku splňovaly všechny znaky kromě dvojice DKP a NJS, znak NJS byl tedy z dalších analýz vyřazen.

Následně byla data zpracována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a pomocí diskriminační analýzy. Obě tyto analýzy byly provedeny dvakrát pro různé soubory znaků. Nejprve byly analýzy provedeny pro všechny znaky a poté pro všechny znaky kromě znaků na plodech (PZN, DN) a znaku DPS. Důvodem k dvojitmu provedení analýzy je skutečnost, že ne všechny měřené rostliny byly plodné (s vyvinutými plodními stopkami) a jejich morfometrická data tak byla nekompletní. Obě provedené analýzy vyloučí ze souboru nekompletní jedince, a proto pracovaly analýzy kompletního souboru znaků s menším počtem jedinců, než analýzy souboru omezeného. Pro diskriminační analýzu byly vzorky ze skupin mírně ovlivněných populací nastaveny jako pasivní. Znaky v diskriminační analýze byly testovány každý nezávisle pomocí permutačního testu (tzv. *marginal effect*).

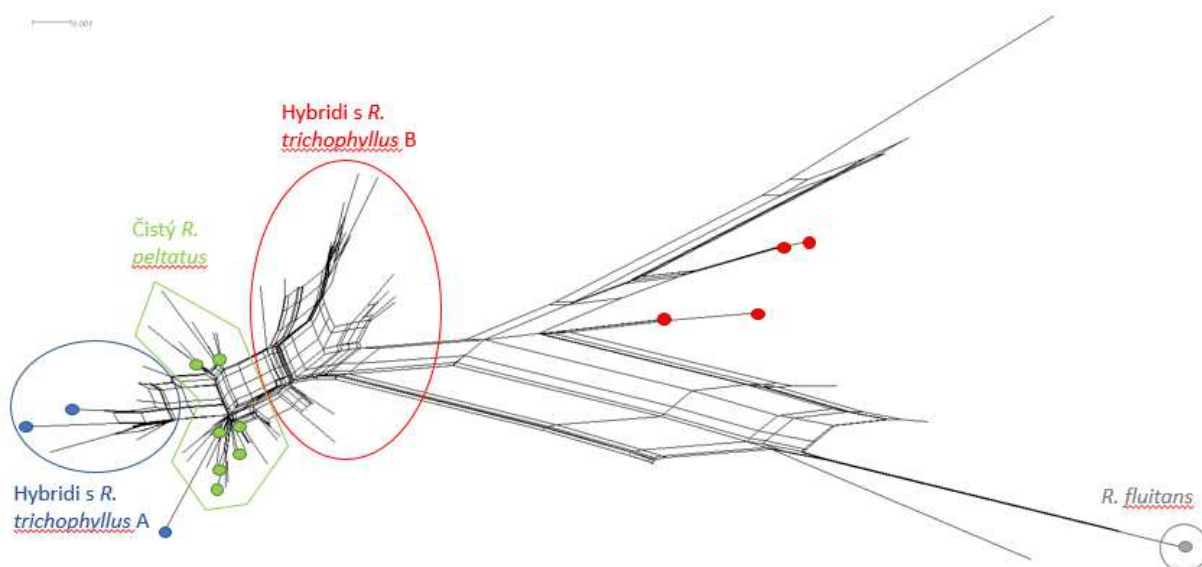
### 3 Výsledky

#### 3.1 Průtoková cytometrie

Průměrná hodnota 2C všech měřených jedinců činí 6.73 pg, maximální naměřená hodnota je 6.96 pg, minimální 6.56 pg. Na základě srovnání se vzorovými daty, která získal školitel z předchozích výzkumů (Prančl et al. 2018), byly rostliny určeny jako taxon *R. peltatus*.

#### 3.2 Výsledky sekvenování

Většina získaných ITS sekvencí pochází od *R. peltatus*. Sedm sekvencí odpovídá křížencům s *R. trichophyllus* A, dvacet sekvencí křížencům s *R. trichophyllus* B. Jeden sekvenovaný jedinec (*R. peltatus* z tekoucí vody, populace 40, jedinec 1) měl sekvenci shodnou s druhem *R. fluitans*. Tento jedinec měl ale nekompletní soubor morfologických znaků, a proto v analýzách nevystupuje. Neighbor network pro skupiny unikátních genotypů ITS je na obrázku 5.



Obr. 5: Neighbor network pro ITS úsek sekvenovaných lakušníků. Vzorové sekvence (Koutecký et al., 2021; nejčastější středoevropské genotypy) jsou označeny barevnými kolečky: zelená - čistý *R. peltatus*, modrá *R. trichophyllus* cytotyp A, červená *R. trichophyllus* cytotyp B, šedá – *R. fluitans*. Elipsami a polygony jsou označeny skupiny unikátních sekvencí. Neoznačené větve (v pravé části sítě) jsou vzorové sekvence zbylých českých druhů lakušníků.

Většina získaných chloroplastových sekvencí odpovídá *R. peltatus*, sedm jedinců mělo haplotyp odpovídající *R. trichophyllus* A, jeden odpovídající *R. trichophyllus* B. U tří jedinců odpovídal chloroplastový úsek druhu *R. fluitans* (včetně výše zmíněného jedince 1 z populace 40, který vyšel v obou úsecích jako *R. fluitans*). Kromě již zmíněného jedince (1,

populace 40) se u zbylých jedinců s chloroplastovým úsekem od *R. fluitans* nepodařilo osekvenovat úsek ITS.

Celkem se podařilo osekvenovat 112 jedinců ze 40 populací. Sekvence 44 jedinců ze 112 osekvenovaných mi poskytl školitel z předchozího výzkumu. Z devíti populací (populace 26, 27, 28, 35, 37, 38, 41 a 45) se nepodařilo osekvenovat žádného jedince. V některých hybridogenních populacích se vyskytovali hybridi jen jednoho typu. V sedmi populacích byli zaznamenáni jen hybridi s *R. trichophyllus* B, ve čtyřech jen hybridi s *R. trichophyllus* A. Ve čtyřech populacích se vyskytli hybridi s *R. trichophyllus* A i *R. trichophyllus* B. V jedné populaci byl zaznamenán jedinec shodný s *R. fluitans*. Výsledky sekvenování shrnuje tabulka 4. Počet osekvenovaných jedinců může být vyšší než počet vzorků (měřených rostlin), protože z několika populací se sekvenovali i nějaké neměřené jedinci.

Tabulka 4: Výsledky sekvenování. Sloupec Voda udává charakter vody – tekoucí (T), stojatá (S). Sloupec *R. peltatus* udává počty jedinců vyhodnocených jako čistý *R. peltatus*. Sekvenovaný jedinec z populace 40, jehož oba sekvenované úseky pocházely od *R. fluitans*, je v tomto sloupci označen F. Sloupec Hybrid (ITS + cpDNA) udává počty jedinců z dané populace vyhodnocených jako hybridogenní. U hybridogenních jedinců je uvedeno, jakého původu byly sekvenované úseky, ITS a chloroplastový spacer rps16–trnK, odděleny jsou symbolem +. Počty osekvenovaných jedinců mohou převyšovat počet vzorků (počet měřených rostlin), protože z několika populací byly osekvenovány i nějaké neměřené rostliny.

Číslo populace	Voda	Počet vzorků	Počet osekvenovaných jedinců	<i>R. peltatus</i>	Hybrid (ITS + cpDNA)
1	T	6	5	1	4 TrichB + P
2	T	5	3	2	1 TrichB + P
3	T	4	4	4	0
4	T	3	4	4	0
5	T	5	5	2	1 TrichB + P, 2 TrichA + P
6	T	5	3	0	3 TrichB + P
7	T	5	5	0	1 TrichB + P, 4 TrichA + P
8	T	4	3	0	3 P + TrichA

Číslo populace	Voda	Počet vzorků	Počet osekvenovaných jedinců	<i>R. peltatus</i>	Hybrid (ITS + cpDNA)
9	T	7	7	6	1 TrichB + P
10	T	9	9	2	4 TrichB + P, 3 TrichA + P
11	S	3	3	3	0
12	S	4	2	1	1 TrichB + P
13	T	4	3	1	2 TrichB + P
14	T	4	3	3	0
15	S	3	3	3	0
16	S	5	4	4	0
17	S	4	4	4	0
18	S	4	5	4	1 TrichA + P
19	S	4	4	3	1 P + TrichB
20	S	4	3	2	1 TrichA + P
21	S	3	2	2	0
22	S	2	2	0	2 P + TrichA
23	S	2	2	0	1 TrichA + TrichA, 1 TrichB + TrichA
24	S	1	2	2	0
25	S	5	2	2	0
26	S	4	0	0	0
27	T	2	0	0	0



Číslo populace	Voda	Počet vzorků	Počet osekvenovaných jedinců	<i>R. peltatus</i>	Hybrid (ITS + cpDNA)
28	S	1	0	0	0
29	S	1	1	1	0
30	S	1	1	1	0
31	T	1	1	1	0
32	T	3	1	1	0
33	T	1	0	0	0
34	T	3	1	1	0
35	T	1	0	0	0
36	T	4	2	2	0
37	T	1	0	0	0
38	T	1	0	0	0
39	T	3	1	1	0
40	T	1	1	F	0
41	T	1	0	0	0
42	T	3	2	2	0
43	T	1	1	1	0
44	T	3	2	2	0
45	T	1	0	0	0
46	T	1	1	1	0
47	T	2	2	2	0
48	T	1	1	1	0
49	T	1	1	1	0

Číslo populace	Voda	Počet vzorků	Počet osekvenovaných jedinců	<i>R. peltatus</i>	Hybrid (ITS + cpDNA)
50	T	3	3	3	0

Výsledky sekvenování jsou zobrazeny také v mapě na obrázku 2, kapitola 2.1 Použitý materiál. Populace jsou zde rozděleny do skupin: čistá populace *R. peltatus* z tekoucích a stojatých vod, hybridogenní populace *R. peltatus* (alespoň dva sekvenovaní jedinci z populace jsou hybridogenní) z tekoucích a stojatých vod, mírně ovlivněné populace *R. peltatus* (právě jeden sekvenovaný jedinec z populace je hybridogenní) z tekoucích a stojatých vod (viz metodika 2.5.2).

### 3.3 Morfometrické analýzy

#### 3.3.1 Popisné statistiky

V tabulce 5 jsou shrnuty základní popisné statistiky měřených znaků z analyzovaných populací. V tabulce nejsou zahrnuty znaky kategoriální (tvar nektária, chlupatost nažek), jejich četnosti jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 5: Popisné statistiky jednotlivých znaků podle skupin populací. Populace jsou rozděleny na skupiny (čistě populace *R. peltatus* z tekoucích (peltT) a stojatých (peltS) vod, hybridogenní populace *R. peltatus* (alespoň dva sekvenovaní jedinci z populace jsou hybridogenní) z tekoucích (hybrT) a stojatých (hybrS) vod, hybridizací mírně ovlivněné populace *R. peltatus* (právě jeden sekvenovaný jedinec z populace je hybridogenní) z tekoucích (peltmoT) a stojatých (peltmoS) vod, viz metodika. 2.5.2 Rozdělení populací). Zkratky ve sloupci znak viz metodika 2.4 Morfometrika. Sloupec Skupina udává charakter skupiny, sloupec N udává počet změřených vzorků v rámci skupiny, SD je směrodatná odchylka, Min je minimální naměřená hodnota znaku, Max je maximální naměřená hodnota znaku. Znaky TN (tvar nektária) a CHL (chlupatost nažky) jsou znaky kategoriální, nejsou proto v tabulce uvedeny. U znaku UH (úhel báze listu) se vyskytují i záporné hodnoty. To je dáno tím, že u některých listů se bazální listové laloky překrývaly a naměřené hodnoty byly udány se záporným znaménkem.

Znak	Skupina	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
DI	hybrS	4	3.28	2.15	0.90	3.30	5.60
	hybrT	38	6.08	2.39	1.90	6.05	14.20
	peltmoS	16	4.88	3.54	0.80	4.00	11.10
	peltmoT	12	6.37	2.87	2.20	6.45	12.40
	peltS	26	4.78	2.83	0.80	4.25	10.80
	peltT	41	4.39	2.13	1.80	4.20	10.30
DPS	hybrS	4	4.03	1.10	2.80	3.95	5.40

Znak	Skupina	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
	hybrT	30	6.38	1.30	4.40	5.95	9.00
	peltmoS	14	4.96	0.71	3.50	5.05	6.00
	peltmoT	12	8.21	3.12	4.40	7.70	13.30
	peltS	23	5.36	1.31	3.00	5.30	8.00
	peltT	32	4.79	1.37	2.70	4.65	8.00
DPL	hybrS	4	2.73	0.97	1.50	2.90	3.60
	hybrT	38	4.84	1.64	2.00	4.70	10.30
	peltmoS	16	3.43	0.74	2.10	3.40	5.20
	peltmoT	12	6.55	1.66	2.70	6.95	8.70
	peltS	26	3.51	1.05	1.90	3.45	6.30
	peltT	41	3.78	1.16	2.20	3.50	7.20
DTU	hybrS	4	0.78	0.22	0.50	0.80	1.00
	hybrT	38	1.37	0.52	0.60	1.30	2.90
	peltmoS	16	0.77	0.39	0.40	0.65	1.90
	peltmoT	12	1.51	0.53	0.60	1.60	2.50
	peltS	26	0.78	0.24	0.40	0.80	1.20
	peltT	41	0.82	0.35	0.30	0.70	1.80
PZN	hybrS	4	18.75	14.74	3.00	17.50	37.00
	hybrT	30	8.00	11.80	0.00	1.67	35.67
	peltmoS	14	21.71	15.86	0.00	14.50	46.33
	peltmoT	12	9.67	13.36	0.00	0.00	33.33
	peltS	22	12.17	13.07	0.00	6.67	43.67
	peltT	32	1.74	3.35	0.00	0.00	12.00
PL	hybrS	4	0.83	0.30	0.50	0.80	1.20
	hybrT	36	1.14	0.19	0.70	1.10	1.60
	peltmoS	16	0.94	0.21	0.50	1.00	1.20
	peltmoT	11	1.20	0.19	1.00	1.20	1.70
	peltS	26	1.05	0.21	0.70	1.00	1.60
	peltT	39	1.01	0.18	0.50	1.00	1.40
DR	hybrS	4	3.53	1.51	1.50	3.85	4.90
	hybrT	36	4.71	1.56	1.90	4.50	8.20
	peltmoS	16	5.64	2.33	2.90	4.60	10.80
	peltmoT	11	5.08	1.92	2.90	4.90	8.90
	peltS	26	5.00	1.68	3.00	4.80	8.90
	peltT	39	4.90	1.59	2.00	4.90	8.20
DKP	hybrS	4	1.12	0.06	1.06	1.13	1.18
	hybrT	31	0.90	0.22	0.51	0.91	1.29
	peltmoS	16	1.00	0.20	0.60	1.07	1.22
	peltmoT	12	0.91	0.16	0.67	0.93	1.13
	peltS	26	0.98	0.13	0.68	0.97	1.22
	peltT	28	0.96	0.14	0.62	0.94	1.24
SKP	hybrS	4	0.87	0.09	0.76	0.88	0.95
	hybrT	31	0.64	0.16	0.32	0.64	0.95
	peltmoS	16	0.83	0.24	0.45	0.84	1.28

Znak	Skupina	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
	peltmoT	12	0.68	0.21	0.46	0.61	1.12
	peltS	26	0.71	0.11	0.47	0.70	0.93
	peltT	28	0.65	0.14	0.44	0.65	0.97
NJS	hybrS	4	0.79	0.05	0.75	0.78	0.85
	hybrT	31	0.65	0.20	0.35	0.65	1.00
	peltmoS	16	0.70	0.15	0.40	0.75	0.95
	peltmoT	12	0.66	0.16	0.40	0.69	0.91
	peltS	26	0.69	0.10	0.45	0.70	0.85
	peltT	28	0.71	0.11	0.45	0.70	0.93
DN	hybrS	4	0.16	0.01	0.14	0.16	0.18
	hybrT	16	0.16	0.02	0.11	0.17	0.19
	peltmoS	12	0.16	0.02	0.13	0.16	0.20
	peltmoT	5	0.17	0.02	0.16	0.17	0.21
	peltS	18	0.16	0.01	0.14	0.16	0.19
	peltT	11	0.16	0.03	0.13	0.15	0.20
SI	hybrS	4	18.32	5.24	13.28	17.57	24.88
	hybrT	36	24.32	4.18	13.55	24.34	37.28
	peltmoS	16	21.49	3.38	15.79	22.34	26.39
	peltmoT	11	25.74	4.13	20.67	25.04	34.50
	peltS	26	23.55	4.67	14.68	22.55	35.81
	peltT	39	22.09	3.37	17.64	21.00	31.00
TE	hybrS	4	4.33	1.48	2.67	4.29	6.05
	hybrT	36	4.90	1.21	2.00	4.72	8.32
	peltmoS	16	4.80	0.74	2.83	4.85	6.24
	peltmoT	11	5.29	0.96	4.03	5.56	6.64
	peltS	26	5.70	1.33	3.72	5.67	9.47
	peltT	39	4.65	1.23	2.30	4.32	7.59
DZ	hybrS	4	5.34	1.13	4.32	5.05	6.95
	hybrT	36	4.75	1.22	2.19	4.82	7.01
	peltmoS	16	4.49	1.14	2.49	4.79	5.97
	peltmoT	11	5.65	0.97	3.83	6.11	6.75
	peltS	26	5.66	1.46	3.35	5.70	9.11
	peltT	39	4.83	1.13	2.60	4.76	7.97
PZ	hybrS	4	8.25	2.50	7.00	7.00	12.00
	hybrT	36	11.31	2.63	6.00	11.00	18.00
	peltmoS	16	9.19	3.04	5.00	9.00	15.00
	peltmoT	11	11.36	2.20	7.00	12.00	15.00
	peltS	26	9.85	2.91	5.00	11.00	15.00
	peltT	39	9.77	2.97	5.00	10.00	17.00
UH	hybrS	4	140.50	47.69	92.20	133.15	203.50
	hybrT	36	101.71	70.13	-20.60	112.40	213.90
	peltmoS	16	68.27	33.33	13.20	75.95	123.60
	peltmoT	11	133.25	32.81	62.60	151.00	172.50
	peltS	26	86.57	40.16	-2.40	88.90	185.80

Znak	Skupina	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
	peltT	39	117.65	47.64	-28.50	123.60	225.00
DSKP	hybrS	4	1.31	0.17	1.15	1.27	1.55
	hybrT	31	1.40	0.15	1.09	1.42	1.68
	peltmoS	16	1.24	0.20	0.95	1.24	1.64
	peltmoT	12	1.40	0.35	0.95	1.44	1.98
	peltS	26	1.38	0.17	1.08	1.35	1.70
	peltT	28	1.50	0.21	1.06	1.52	1.80
PLSI	hybrS	4	0.45	0.08	0.33	0.47	0.53
	hybrT	36	0.47	0.04	0.39	0.46	0.56
	peltmoS	16	0.43	0.04	0.32	0.44	0.50
	peltmoT	11	0.47	0.04	0.42	0.46	0.52
	peltS	26	0.45	0.03	0.40	0.45	0.54
	peltT	39	0.46	0.06	0.24	0.46	0.62
DZPL	hybrS	4	0.31	0.19	0.02	0.40	0.42
	hybrT	36	0.58	0.11	0.35	0.60	0.80
	peltmoS	16	0.51	0.12	0.30	0.49	0.73
	peltmoT	11	0.53	0.07	0.39	0.53	0.62
	peltS	26	0.46	0.08	0.27	0.48	0.58
	peltT	39	0.51	0.12	0.21	0.50	0.77
DPLDI	hybrS	4	1.20	0.98	0.64	0.74	2.67
	hybrT	38	0.91	0.60	0.44	0.75	3.90
	peltmoS	16	1.41	1.42	0.25	0.86	4.33
	peltmoT	12	1.20	0.54	0.45	1.07	2.39
	peltS	26	1.06	0.84	0.33	0.79	3.32
	peltT	41	1.00	0.41	0.37	0.92	2.06

Tabulka 6: Četnost hladin kategoriálních znaků. V prvních třech sloupcích znaku jsou uvedeny četnosti jedinců s různými nektárii: hruškovité (H), kulaté (K), půlměsíčitě (P). Ve zbylých třech sloupcích znaku jsou uvedeny četnosti různě chlupatých nažek: lysé (0), mírně chlupaté (1), chlupaté (2), viz metodika. Počty jedinců se znaky nepřítomnými nejsou uvedeny.

Skupina	Znak					
	H	K	P	0	1	2
hybrS	4	0	0	0	0	12
hybrT	26	1	3	13	8	26
peltmoS	15	1	0	0	0	36
peltmoT	11	1	0	7	3	5
peltS	31	0	1	5	11	53
peltT	24	5	1	4	5	26

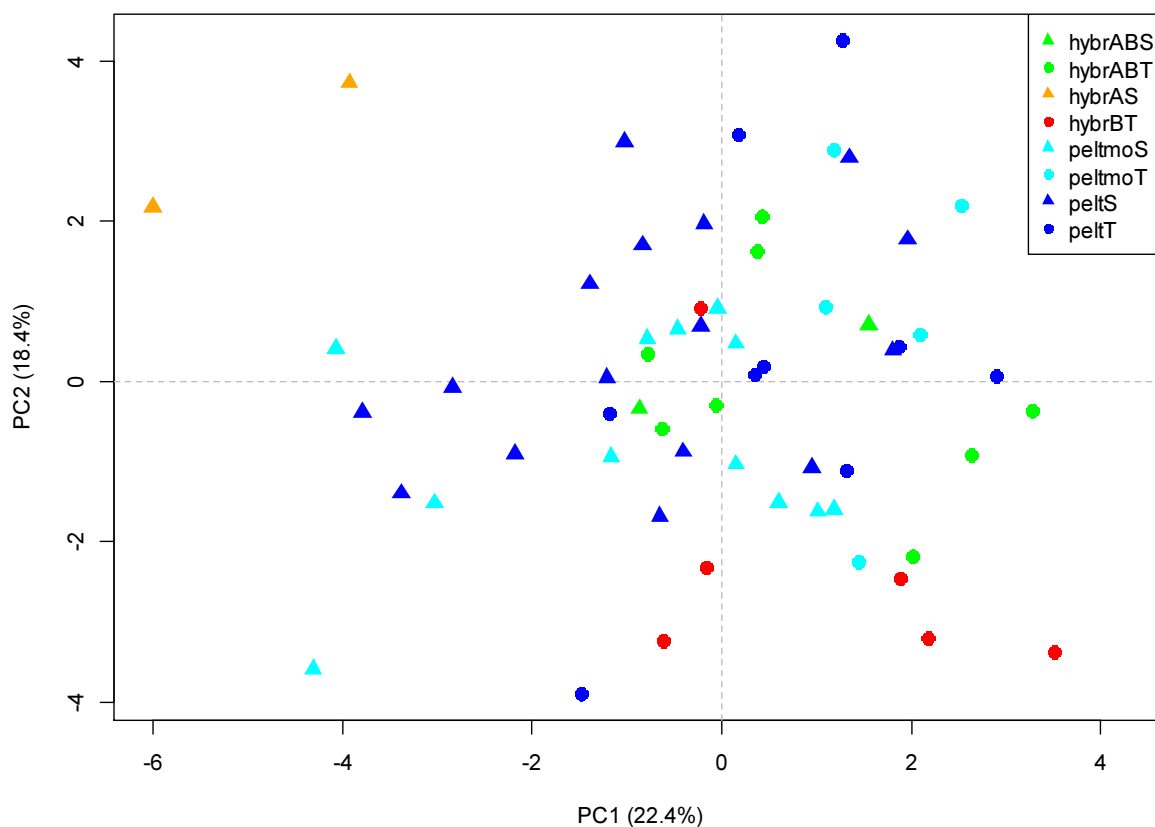
### 3.3.2 Korelační analýza

Korelovanost jednotlivých znaků byla ověřena pomocí korelační matice (Spearmanovy). Vysoká korelace (větší než  $|0.9|$ ) byla zaznamenána u dvojice znaků DKP a NJS, znak NJS byl tedy z dalších analýz vyřazen.

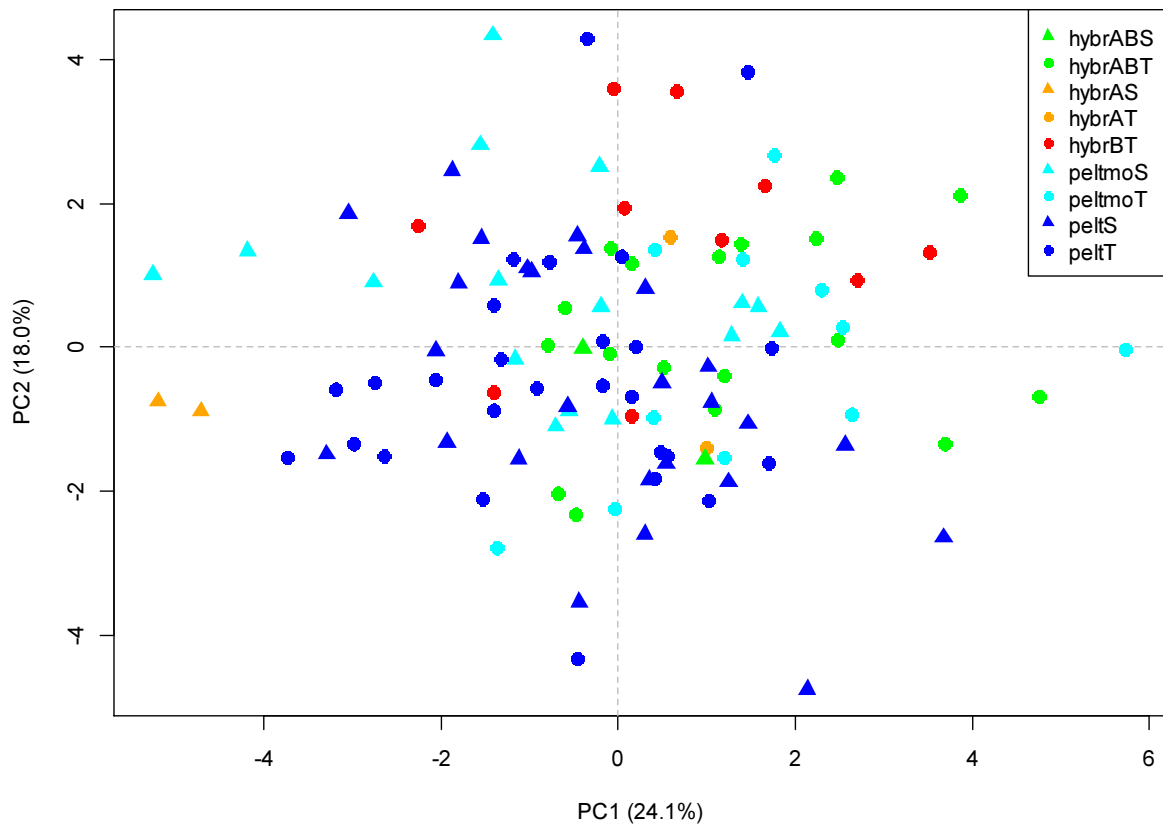
### 3.3.3. Analýza hlavních komponent (PCA)

Obrázek 6 a 8 ukazuje výsledek PCA souboru všech znaků, obrázek 7 a 9 ukazuje výsledek PCA souboru všech znaků kromě znaků na plodech (PZN, DN, CHL, DPS).

Hybridogenní populace, čisté populace *R. peltatus* a populace mírně ovlivněné hybridizací se v rozmezích měřených morfologických znaků dost překrývají. Jak ukazují obrázky 6 a 7, k překryvu dochází jak v souboru všech znaků (analyzováni všichni jedinci), tak v souboru redukovaném (který zahrnuje více jedinců). Vypuštění znaků na plodech nemá nijak zásadní vliv na výsledek analýzy. Z analýzy souboru všech znaků vyšly s první osou nejkorelovanější znaky PL (délka plovoucího listu), SI (šířka plovoucího listu) a TE šířka báze terminálního úkrojku plovoucího listu). V analýze redukovaného souboru znaků to pak byly znaky SI (šířka plovoucího listu), PL (délka plovoucího listu) a DI (délka internodia).

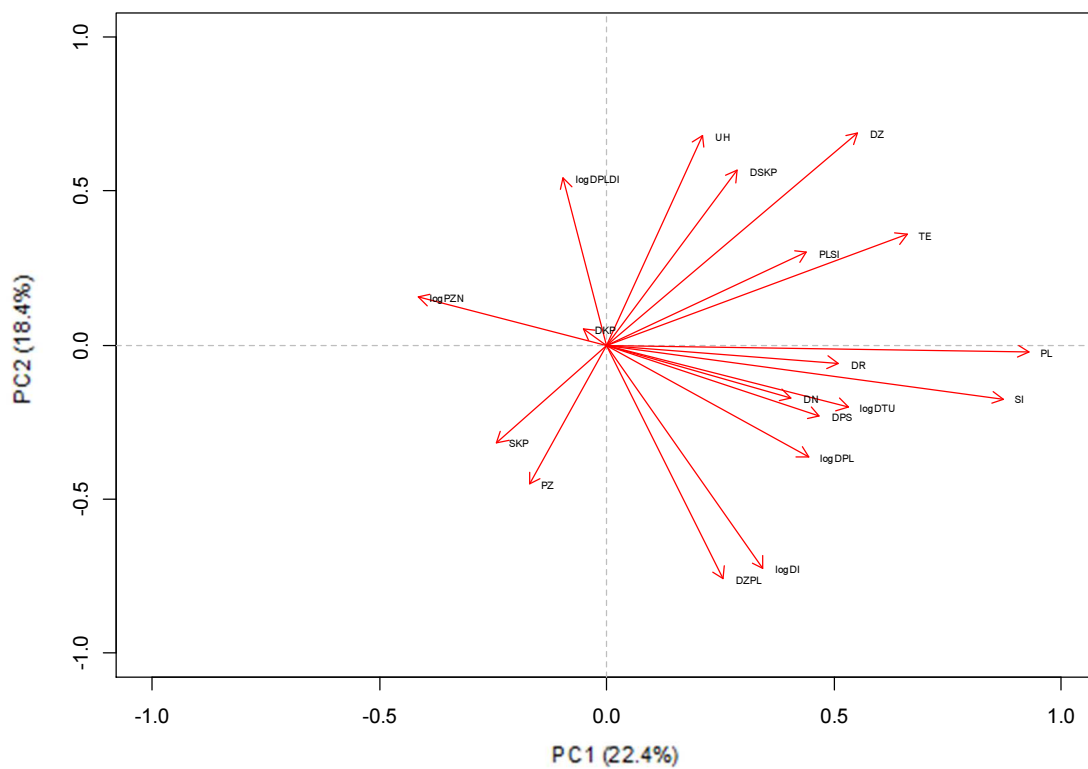


Obr. 6: Analýza hlavních komponent pro všechny znaky. První osa (PC1) vysvětluje 22.4 % variability, druhá osa (PC2) vysvětluje 18.4 % variability. Tvarem symbolu jsou odlišeny populace ze stojatých vod (trojúhelník, značení S v legendě) a populace z tekoucích vod (kruh, značení T v legendě). Skupiny populací jsou odlišeny barevně: modrá - čistý *R. pelatus* (v legendě pelt), tyrkysová - populace mírně ovlivněné (peltmo), zelená - hybridogenní populace s kříženci obou cytotypů *R. trichophyllus* (hybrAB), oranžová - hybridogenní populace s kříženci *R. trichophyllus* cytotyp A (hybrA), červená - hybridogenní populace s kříženci *R. trichophyllus* cytotyp B.

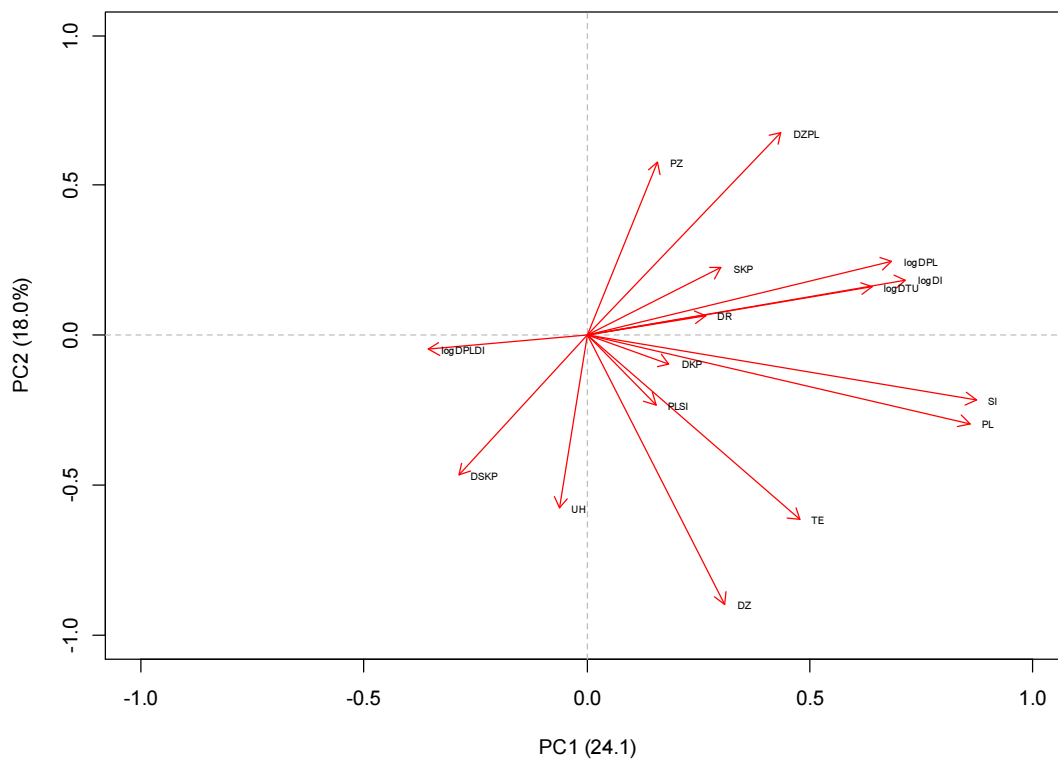


Obr. 7: Analýza hlavních komponent pro redukovaný soubor znaků. První osa (PC1) vysvětluje 24.1 % variability, druhá osa (PC2) vysvětluje 18.0 % variability. Značení viz obr. 6.





Obr. 8: PCA pro všechny znaky, korelace znaků s osami.

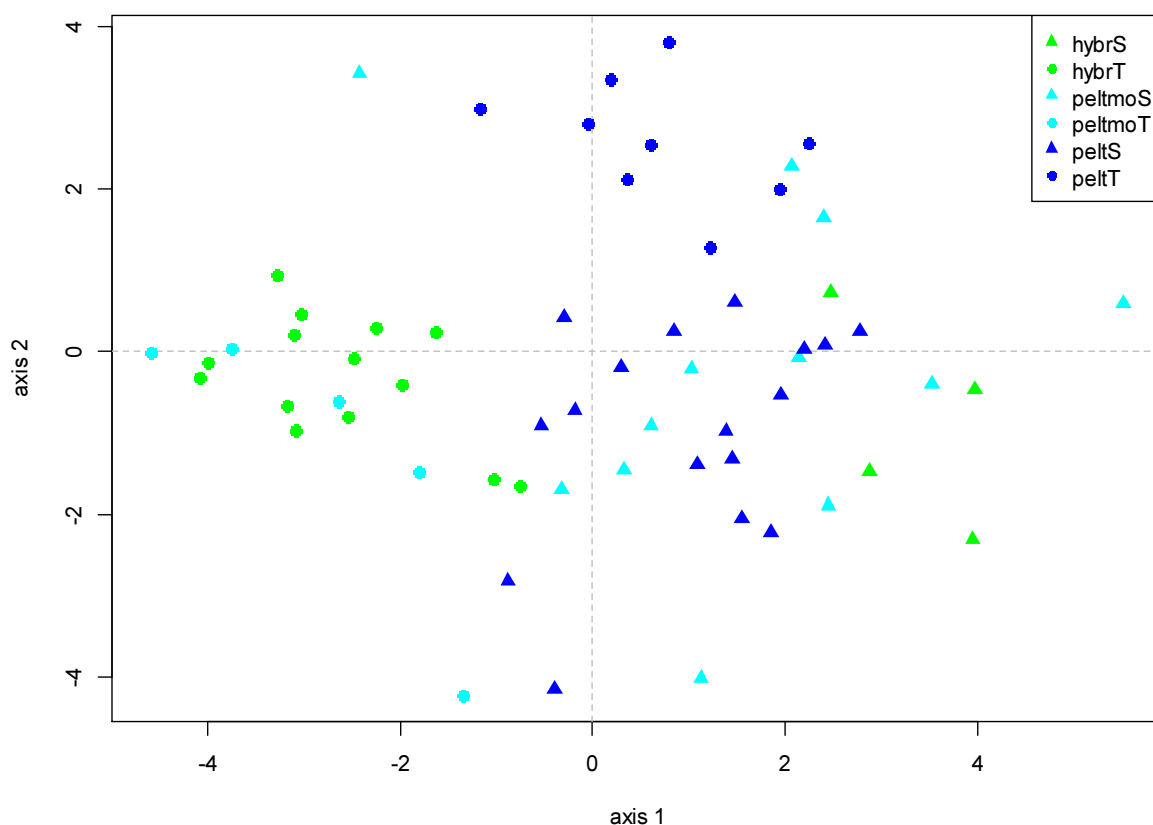


Obr. 9: PCA pro redukovaný soubor znaků, korelace znaků s osami.

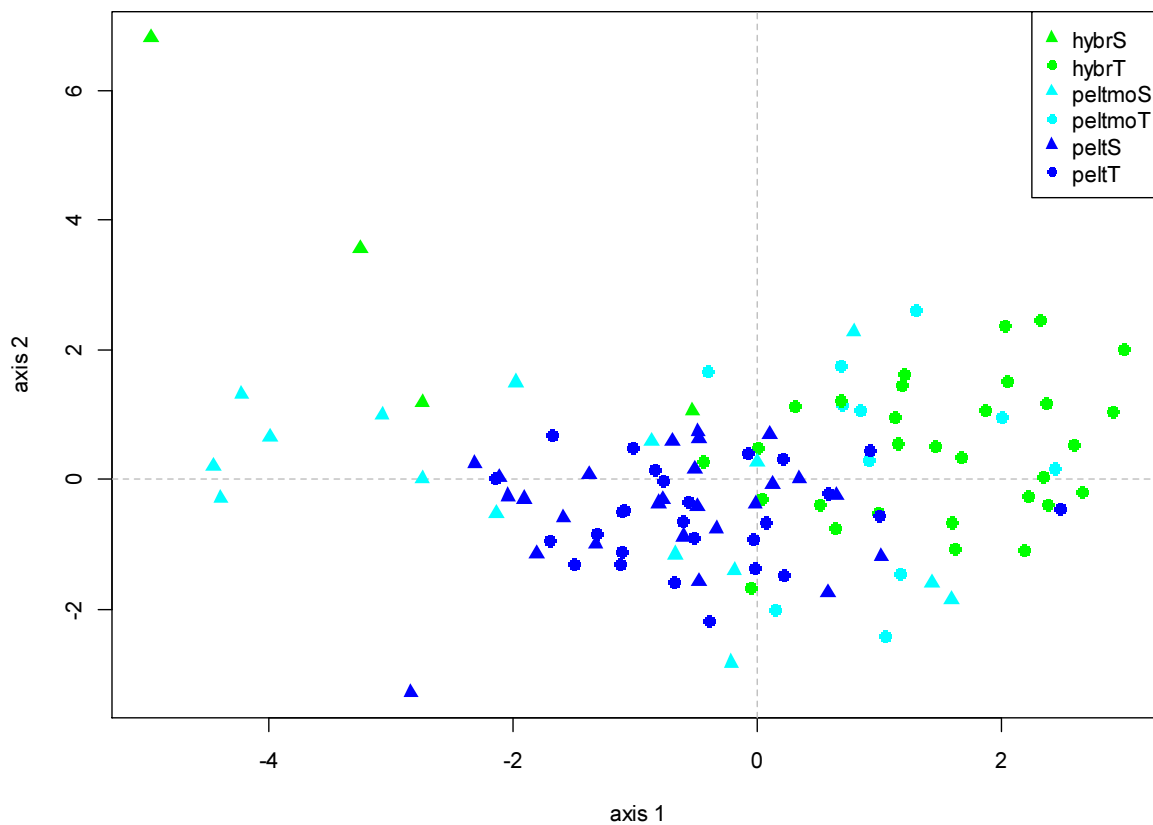
### 3.3.4 Diskriminační analýza

Obrázky 10 a 12 ukazují výsledek diskriminační analýzy souboru všech znaků, obrázky 11 a 13 ukazují výsledky diskriminační analýzy bez znaků PZN, DN, CHL, DPS.

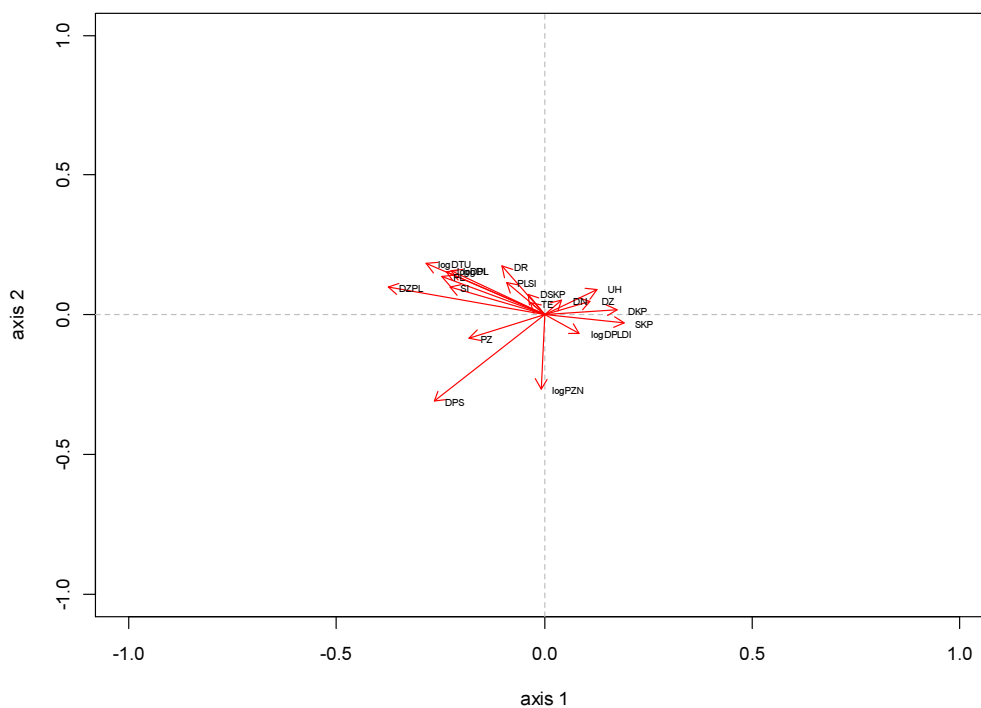
Z výsledků diskriminační analýzy (obrázek 10 a 11) plyne, že hybridogenní populace (obecně) a čisté populace *R. peltatus* se v některých znacích do určité míry liší, ale dochází u nich k částečnému překryvu. Populace mírně ovlivněné hybridizací vykazují velký překryv se zbylými dvěma skupinami. Vliv charakteru vody na morfologii čistých populací *R. peltatus* není příliš významný, což opět ukazují obrázky 10 a 11. Na obrázku 10 se sice skupiny z tekoucích a stojatých vod částečně oddělují, ale rozdíl byl testován diskriminační analýzou, která zahrnovala jen skupiny peltS a peltT, a vyšel neprůkazný.



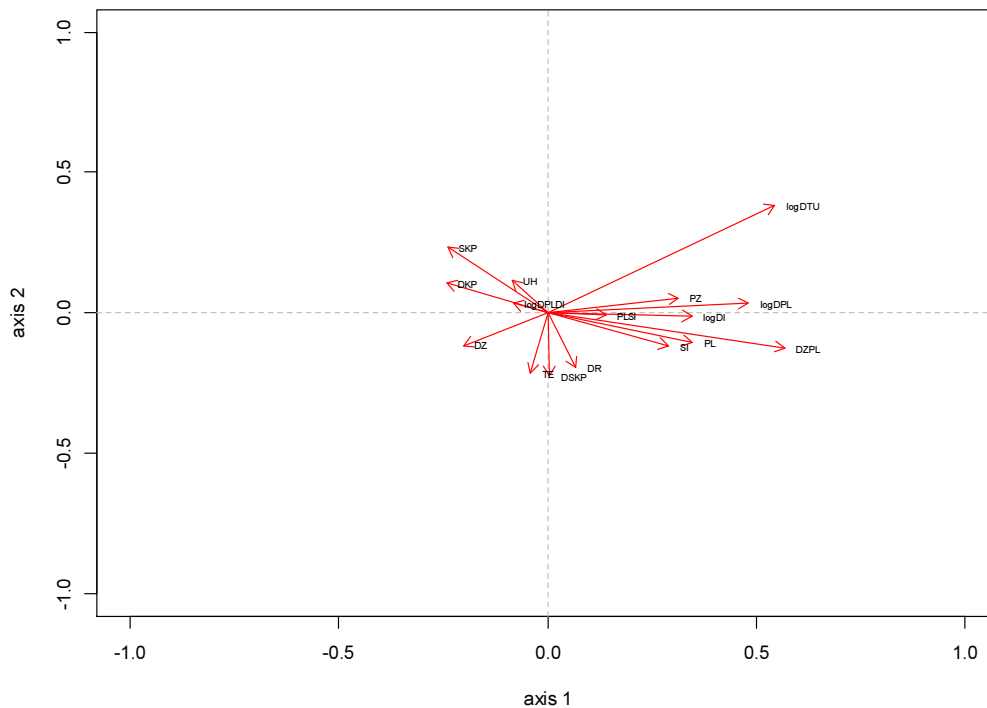
Obr. 10: Diskriminační analýza pro soubor všech znaků. Tvar symbolu určuje vodu tekoucí (kruh) či stojatou (trojúhelník). Populace jsou barevně rozlišeny: zelená – hybridní populace, modrá - čisté populace *R. peltatus*, tyrkysová – mírně ovlivněné populace.



Obr. 11: Diskriminační analýza pro redukovaný soubor znaků. Značení viz obr. 10.



Obr. 12: Diskriminační analýza pro soubor všech znaků, korelace znaků s osami.



Obr. 13: Diskriminační analýza pro redukovaný soubor znaků, korelace znaků s osami.

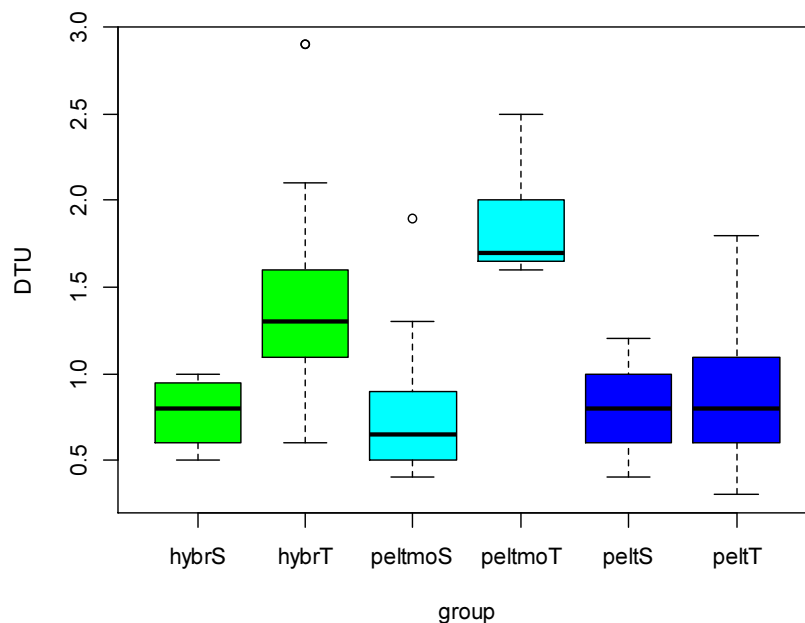
Tabulka 7 ukazuje hodnoty pseudo-F-statistiky a hladinu signifikance pro jednotlivé znaky (testovány každý zvlášť bez ohledu na znaky ostatní, tzv. *marginal effects*) v rámci souboru všech znaků a v rámci redukovaného souboru znaků bez znaků na plodech. Znaky na hladině signifikance  $\leq 0.05$  (znaky s průkazným vlivem) jsou uvedeny tučně.

Tabulka 7: Hodnoty pseudo-F-statistiky a hladiny signifikance pro oba soubory znaků.

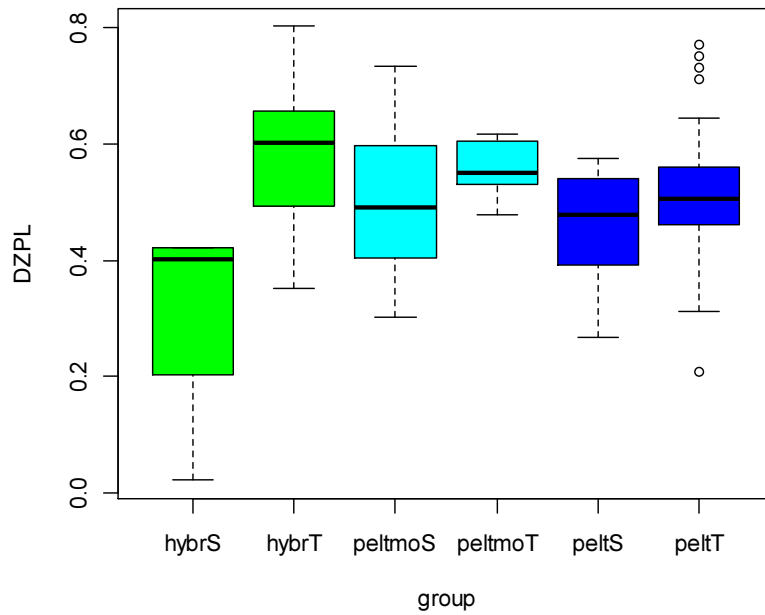
Znak	Všechny znaky		Redukovaný soubor znaků	
	F	p	F	p
logDI	2.15	0.08	4,26	<b>0.005</b>
DPS	3.86	<b>0.005</b>		
logDPL	3.12	<b>0.025</b>	7,53	<b>0.005</b>
logDTU	3.01	<b>0.005</b>	11,06	<b>0.005</b>
logPZN	2.92	<b>0.02</b>		
PL	2.75	<b>0.04</b>	4,63	<b>0.005</b>
DR	1.35	0.24	0,99	0.34
DKP	1.98	<b>0.075</b>	2,40	0.09
SKP	4.57	<b>0.005</b>	3,50	<b>0.015</b>

<b>DN</b>	0.58	0.695		
<b>SI</b>	2.16	0.08	4,00	<b>0.01</b>
<b>TE</b>	0.88	0.485	2,63	0.08
<b>DZ</b>	0.98	0.47	2,39	0.06
<b>PZ</b>	1.72	0.145	3,69	<b>0.015</b>
<b>UH</b>	1.58	0.16	2,15	0.075
<b>DSKP</b>	3.97	<b>0.01</b>	2,29	0.075
<b>PLSI</b>	1.36	0.25	1,47	0.21
<b>DZPL</b>	3.77	<b>0.005</b>	10,03	<b>0.005</b>
<b>logDPLDI</b>	1.24	0.275	0,29	0.835

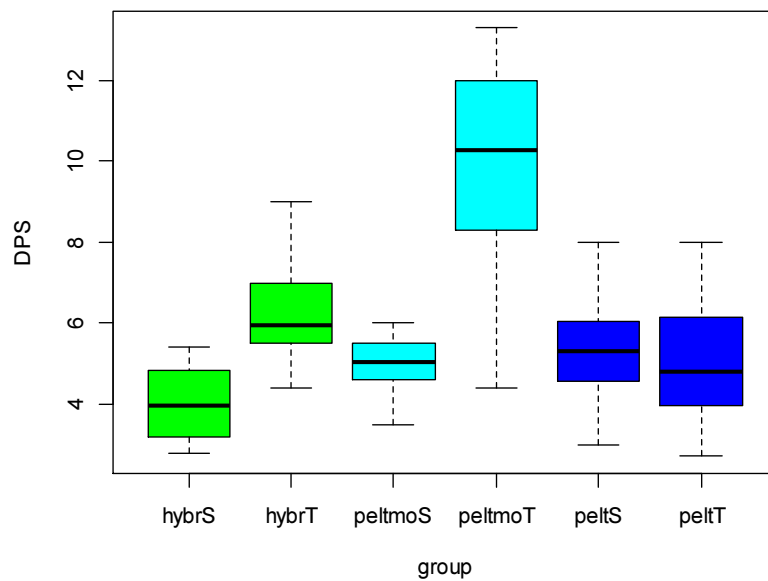
Největší míru variability (testováno pro soubor všech znaků) vysvětlují znaky SKP (šířka korunního plátku), DTU (délka terminálního úkrojku ponořeného listu), DZPL (poměr délky zářezu plovoucího listu při terminálním laloku ku délce čepele) a DPS (délka plodní stopky). Pro některé tyto znaky byly vytvořeny boxploty (obrázky 14 až 16, barevné značení odpovídá značení v diskriminační analýze, viz kapitola 3.3.4 Diskriminační analýza). Na obrázcích je vidět, že každý ze znaků sám o sobě není schopný odlišit od sebe všechny skupiny populací, ale odliší pouze některé.



Obr. 14: Boxplot pro znak DTU (délka terminálního úkrojku ponořeného listu). Znak je udáván v centimetrech. Barevné značení a popisy skupin viz kapitola 3.3.4 Diskriminační analýza.



Obr. 15: Boxplot pro znak DZPL (poměr délky zářezu plovoucího listu při terminálním laloku ku délce čepele). Znak je bezrozměrný. Barevné značení a popisy skupin viz kapitola 3.3.4 Diskriminační analýza.



Obr. 26: Boxplot pro znak DPS (délka plodní stopky). Znak je udáván v centimetrech. Barevné značení a popisy skupin viz kapitola 3.3.4 Diskriminační analýza.

#### 4 Diskuze

Během morfometrických měření jsem narazil na několik problematictějších znaků. Měření počtu zralých nažek (PZN) mohlo být ovlivněno tím, že souplodí nažek byla vlivem fixace a manipulace s položkami částečně rozpadlá, čímž mohl být znak ve výsledku zkreslen. U některých nažek nebylo snadné poznat, zda je nažka již zcela zralá či nikoliv. Během dozrávání nažka mění svoji délku, proto i znak DN může být touto nepřesností mírně zkreslený.

Vlivem vysokého stavu vody v řece Vltavě a Otavě na jaře a začátkem léta roku 2020 nebylo možné sesbírat materiál z populací *R. peltatus* z tekoucích vod, jak bylo naplánováno, a bylo nutné použít již existující herbářové položky rostlin z tekoucí vody (populace 32-50, viz metodika, kapitola 2.1 Použitý materiál, tabulka 1). K těmto herbářovým položkám nebyl dostupný fixovaný materiál v silikagelu pro genetické analýzy a DNA se tudíž musela izolovat přímo z exsikátu. Izolace přímo z exsikátů se ukázala jako problematická. NaOH izolací nebyly získány kvalitní izoláty, což se ukázalo po PCR při vyhodnocení gelové elektroforézy. Proto byla DNA z položek izolovaná i pomocí CTAB metody. I přes použití této metody byly s populacemi stále potíže. Jen u části rostlin se podařila PCR, ze zbylých jedinců se ani po použití CTAB metody nepodařilo dostatečné množství kvalitní DNA vyizolovat. PCR byla u těchto populací opakována několikrát. I přes vyvinuté úsilí a nemalé množství času se nakonec nepodařilo z některých populací osekvenovat žádného jedince a z několika jen jednoho. U některých jedinců se podařilo osekvenovat jen jeden ze dvou potřebných úseků (problematický byl hlavně ITS), takoví jedinci nebyli pro genetické vyhodnocení použiti.

U populací, ze kterých se podařilo osekvenovat pouze jednoho jedince, mohlo potenciálně dojít k chybnému zařazení do skupiny populací, protože nebyli odhaleni hybridní jedinci. Vzhledem k tomu, že jde o málo populací (32, 34, 39), které se morfologicky nezdají být problematické, je ale nepravděpodobné, že by toto nějak zásadně ovlivnilo výsledky.

Jak ukázalo sekvenování, i v populacích ze stojatých vod, které byly podle morfologie považovány za čisté *R. peltatus*, byli nalézáni hybridní. Zpětní hybridní *R. peltatus* s *R. trichophyllus* jsou známi i ze stojaté vody, ale jejich výskyt zde je řidší (Prančl et al. 2018; Koutecký et al., 2021). V tekoucích vodách se možná díky vegetativnímu šíření vyskytují hojněji a vytváří stabilnější klonální populace. Naopak některé populace, které byly před sekvenováním považovány na základě výrazně odlišné morfologie spíše za hybridogenní, se po osekvenování více jedinců ukázaly jako čisté populace *R. peltatus*. Příkladem je populace

3, Žirovnice, Vlčetín, kterou jsem se školitelem navštívil právě kvůli morfologicky zvláštním jedincům, o kterých se školitel dozvěděl od jiného botanika.

Dále stojí za pozornost skutečnost, že v hybridogenních jedincích převažovaly úseky od rodiče *R. trichophyllus* cytotyp B. Tento cytotyp se ale v oblasti jižních Čech téměř nevyskytuje (preferuje bazické podloží, zaznamenán byl třeba u Strakonic), dominuje zde cytotyp A (Pančl et al., 2018, Kaplan et al., 2019b). Vzhledem k tomu, že jižní Čechy nejsou bohaté na vhodná stanoviště pro cytotyp B (většina podloží je kyselá), není příliš pravděpodobné, že byl dříve v jižních Čechách rozšířen hojněji, posléze ustoupil a jeho hybridní populace s *R. peltatus* zůstaly v oblasti jako pozůstatky dřívějšího výskytu. Pravděpodobnější by mohlo být vysvětlení, že hybridi (jejichž ekologie se blíží *R. peltatus*) se rozšířili z míst společného výskytu *R. trichophyllus* B a *R. peltatus*. Místa společného výskytu *R. trichophyllus* B a *R. peltatus* jsou v jižních Čechách vzácná (Kaplan et al., 2019b), je možné, že se hybridi do jižních Čech rozšířili z jiných oblastí Česka či ze zahraničí.

Pozoruhodný je nález *R. peltatus* z tekoucí vody (populace 40, jedinec 1), jehož oba sekvenované úseky vykazují shodu s druhem *R. fluitans*. Tento jedinec byl jako všichni ostatní vyšetřen průtokovou cytometrií, která umožňuje odlišit všechny české druhy lakušníků (Prančl et al., 2018). Podle průtokové cytometrie byl zařazen k druhu *R. peltatus*, který je od *R. fluitans* dobře odlišitelný (*R. peltatus*, tetraploid,  $2C = 6.76$  vs. *R. fluitans*, diploid,  $2C = 3.85$ ). Druhu *R. peltatus* jedinec celkem odpovídá i morfologicky, není příliš podobný *R. fluitans*. *Ranunculus fluitans* není z této části Vltavy (5 km po proudu od Rožmberku nad Vltavou) vůbec udáván, první jeho doložené výskyty jsou až daleko po proudu v Českých Budějovicích (Kaplan et al., 2019b). Je možné, že tento jedinec je zpětný hybrid *R. peltatus* s *R. fluitans*, který nese oba sekvenované úseky od *R. fluitans*. Hybridní *R. peltatus* s *R. fluitans* jsou známi, např. komplex *R. penicillatus* tvoří stabilizované allopolyploidy z křížení *R. peltatus* s *R. fluitans* (Webster, 1988; Zalewska-Gałosz, 2014; Wiegleb et al., 2017). *Ranunculus penicillatus* se ale od *R. peltatus* (a tím i diskutovaného potenciálního hybridu) pozná pomocí průtokové cytometrie ( $2C = 7.28 - 10.86$ , pro různé cytotypy *R. penicillatus*) (Prančl et al., 2018). Hybridní rostliny *R. peltatus* × *R. fluitans* byly nalezeny např. v řece Große Mühl na Šumavě. Tito jedinci také vycházeli metodou průtokové cytometrie jako *R. peltatus* a po osekvenování vyšli jako hybridi, na rozdíl od mojí rostliny ale vykazovali zřetelně hybridní morfologii (nápadně zubaté listy, dlouhé úkrojky ponořených listů) a měli velmi velké květy (Koutecký et al., 2021). Pokud je můj



jedinec skutečně nějaký hybrid *R. peltatus* x *R. fluitans*, pak není jasné, jak by se mohl vyskytovat tak daleko proti proudu řeky od prvních doložených výskytů rodičovského *R. fluitans* v řece Vltavě. Úsek chloroplastové dna pocházející od *R. fluitans* byl zaznamenán ještě u dvou dalších jedinců z dvou populací (38 a 41, Hrudkov a Rájov, oboje řeka Vltava). Jelikož se ale u těchto jedinců nepodařilo osekvenovat úsek ITS a z populace nebyl úspěšně osekvenován ani jeden celý jedinec, nebyla žádná z těchto populací zařazena do morfometrických analýz a nefiguruje ani v neighbor network pro ITS. Nález více jedinců *R. peltatus* s chloroplastovým úsekem od *R. fluitans* ukazuje, že je možné, že tento potenciální hybrid není v řece Vltavě úplně vzácný.

## 5 Závěr

Zkoumané hybridogenní populace *R. peltatus*, populace hybridizací mírně ovlivněné a čisté populace *R. pelatus* se v rozmezí měřených morfologických znaků značně překrývají.

Některé měřené znaky mají určitý potenciál pro odlišení populací, ale žádný z měřených znaků spolehlivě všechny křížence neodliší. Spolehlivé určování hybridogenních populací *R. pelatus* pomocí morfologických znaků vyšetřených v této práci není možné, jedinci se dají bezpečně určit pouze na základě sekvenování DNA.

## 6 Literatura

- Angiosperm Phylogeny Group (2016): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1–20.
- Bobrov A. A., Talewska–Galosz J., Jopek M., Movergoz E. A. (2015): *Ranunculus schmalhauseni* (section *Batrachium*, Ranunculaceae), a neglected water crowfoot endemic to Fennoscandia – a case of rapid hybrid speciation in postglacial environment of North Europe. – *Phytotaxa* 233(2): 101–138.
- Cook C. D. K. (1963): Studies in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. II. General morphological considerations in the taxonomy of the subgenus. – *Watsonia* 5: 294–303.
- Cook C. D. K. (1966): A monographic study of *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. – *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 6: 47–237.
- Cook C. D. K. (1969): On the determination of leaf form in *Ranunculus aquatilis*. – *New Phytologist* 68: 469–480.
- Cook C. D. K. (1970): Hybridization in the evolution of *Batrachium*. – *Taxon* 19: 161–166.
- Dahlgren G. (1991): Karyological investigations in *Ranunculus* subg. *Batrachium* (Ranunculaceae) on the Aegean islands. – *Plant Systematics and Evolution* 177: 193–211.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Emadzade K., Lehnebach C., Lockhart P., Hörandl E. (2010): A molecular phylogeny, morphology and classification of genera of Ranunculeae (Ranunculaceae). – *Taxon* 59: 809–828.
- Englmaier P. (2016): *Ranunculus* sect. *Batrachium* (Ranunculaceae): Contribution to an excursion flora of Austria and the Eastern Alps. – *Neilreichia* 8: 97–125.
- Garbey C., Thiébaud G., Muller S. (2004): Morphological plasticity of a spreading aquatic macrophyte, *Ranunculus peltatus*, in response to environmental variables. – *Plant Ecology* 173: 125–137.

- Grulich, V. (2012): Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. – *Preslia* 84, 631–645.
- Grulich, V. (2017): Červený seznam cévnatých rostlin ČR. – *Příroda* 35: 75–132.
- Hejný S. & Slavík B. (1997): Květena České republiky 1. Ed. 2. – Academia, Praha.
- Hong D. Y. (1991): A biosystematic study on *Ranunculus* subgenus *Batrachium* in S Sweden. – *Nordic Journal of Botany* 11: 41–59.
- Hörandl E, Emadzade K (2012): Evolutionary classification: A case study on the diverse plant genus *Ranunculus* L. (Ranunculaceae). – *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14: 310–324.
- Huson D.H., Bryant D. (2006): Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. – *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267.
- Jarvis A., Reuter H. I., Nelson A., Guevara E. (2020): Hole-filled seamless SRTM data V4. International Centre for Tropical Agriculture (CIAT), <http://srtm.csi.cgiar.org>.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M., Štěpánek J. (eds) (2019a): Klíč ke květeně České republiky, Ed. 2 – Academia, Praha.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. Jr., Zázvorka J., Koutecký P., Ekrt L., Řepka R., Štěpánková J., Jelínek B., Grulich V., Prančl J. & Wild J. (2019b): Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 8. – *Preslia* 91: 257–368.
- Kaplan Z. (2002): Phenotypic Plasticity in *Potamogeton* (*Potamogetonaceae*), – *Folia Geobotanica* 37: 141–170.
- Koutecký P. (2015): MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. – *Plant Systematics and Evolution* 301: 1115–1121.
- Koutecký P., Prančl J., Košnar J., Koutecká E., Hanzlíčková J., Lučanová M., Nejedlá M., Kaplan Z. (2021): Waking up from a taxonomist's nightmare: emerging structure of *Ranunculus* section *Batrachium* (Ranunculaceae) in central Europe based on molecular data and genome sizes – *Botanical Journal of the Linnean Society* (in press).

- Miko L., Hošek M. (eds.) (2009): Příroda a krajina České republiky. Zpráva o stavu 2009. 1. vydání. – Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha. ISBN 978–80–87051–70–2
- QGIS Development Team (2020): QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. URL <http://qgis.osgeo.org>.
- Ross–Craig S. (1948): Drawings of British plants. Part I. Ranunculaceae. – G. Bell & Sons, London.
- Santamaria L. (2002): Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small–scale heterogeneity in a stressful environment. – *Acta Oecologica* 23: 137–154.
- Wang H., Qi M., Cutler AJ. (1993): A simple method of preparing plant samples for PCR. – *Nucleic Acids Research* 21: 4153–4154.
- Webster S. D. (1986): Two natural hybrids in *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. – *Watsonia* 16: 25–30.
- Webster S. D. (1988): *Ranunculus penicillatus* (Dumort.) Bab. in Great Britain and Ireland. – *Watsonia* 17: 1–22.
- Wiegleb G., Bobrov A. A. & Zalewska–Gałosz J. (2017): A taxonomic account of *Ranunculus* section *Batrachium* (Ranunculaceae). – *Phytotaxa* 319: 1–55.
- Zanger B., Wiegleb G. (1987): Biosystematische Untersuchung an Populationen von *Ranunculus* subgen. *Batrachium* in Nordwest–Deutschland. – *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzgeschichte und Pflanzengeographie* 109: 81–130.
- Zalewska–Gałosz J., Jopek M. & Ilnicki T. (2014): Hybridization in *Batrachium* group: Controversial delimitation between heterophyllous *Ranunculus penicillatus* and the hybrid *Ranunculus fluitans* × *R. peltatus*. – *Aquatic Botany* 120: 160–168.