

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

Rozšíření a morfologická variabilita cytotypů druhu
Caltha palustris L.

Jana Zavadilová

Školitel: Ing. Milan Štech, Ph.D.

České Budějovice, 2022

Zavadilová J. (2022): Rozšíření a morfologická variabilita cytotypů druhu *Caltha palustris* L. [Distribution and morphological variability of cytotypes of the species *Caltha palustris* L. Bc. Thesis, in Czech] – 45 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

A literature review dealing with cytological and morphological variability in the genus *Caltha* was prepared. This survey focuses on the species *C. palustris* and its subspecies. 363 populations from selected area were collected and analysed by flow cytometry and morphologically evaluated. Three cytotypes with different distribution in the studied area were distinguished. One of them is probably tetraploid with 32 chromosomes. The rest two are considered to be octoploids. The first octoploid was similar to tetraploid and the second one was morphologically differentiated by rooting of the nodes. A pilot morphological study shows a potential difference in follicles between cytotypes.

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

V Českých Budějovicích 8. 12. 2022

.....

Jana Zavadilová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Milanovi Štechovi za užitečné rady a za pomoc při sběru a zpracování. Dále bych chtěla poděkovat lidem, kteří se podíleli na sběru vzorků, a to zejména Romaně Roučkové, Kateřině Zemanové, Evě Holé, Jiřímu Brabci, Pavlovi Kúrovi, Petrovi Kouteckému, Liboru Ekrtovi, Bety Manukjanové, Adamovi Jechovi, Metoději Sejchertovi, Kateřině Vejvodové, Wolfgangovi Diwaldovi, Julii Vrtkové a dalším. Kateřině Vejvodové, Evě Holé a Bety Manukjanové za ochotu a pomoc při analyzování vzorků. A v neposlední řadě patří velké dík své rodině za podporu a trpělivost.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Cíle práce	2
2. Literární přehled	3
2.1 Rod <i>Caltha</i> L.	3
2.2 Taxony a vnitrodruhová variabilita	4
2.3 Sekce <i>Caltha</i>	7
2.3.1 <i>Caltha palustris</i> L.	7
2.3.2 <i>Caltha scaposa</i> Hook. f. et Thomson	14
2.4 Sekce <i>Psychrophila</i>	15
2.4.1 <i>Caltha leptosepala</i> DC.	15
2.5 Sekce <i>Natans</i>	16
2.5.1 <i>Caltha natans</i> Pallas	16
2.6 Dosavadní experimenty <i>C. palustris</i>	17
2.6.1 Nehybridizační experimenty	17
2.6.2 Hybridizace	17
2.6.3 Aneuploidie a B-chromozómy	21
2.6.4 Mikrosporogeneze a makrosporogeneze	21
3. Metodika	23
3.1 Sběr materiálu	23
3.2 Stanovení ploidní úrovně	23
3.3 Morfometrická analýza	24
4. Výsledky	26
4.1 Průtoková cytometrie	26
4.1.1 Analýza semen	31
4.2 Morfometrická analýza	33
4.2.1 Box-plots	33
4.2.2 Kanonická diskriminační analýza	34
4.3 Rozšíření cytotypů	36
5. Diskuze	37
5.1 Cytotypy a jejich rozšíření	37
5.2 Analýza semen	38
5.3 Morfometrická analýza	38

6. Závěr	40
7. Citovaná literatura	41

Přílohy:

Příloha 1: Seznam lokalit

Příloha 2: Pearsonovy korelační koeficienty měřených znaků

Příloha 3: Fotografická příloha

1. Úvod

Caltha je rod vytrvalých bylin z čeledi *Ranunculaceae*, která je rozšířena jak na jižní, tak i severní polokouli. Do tohoto rodu patří od 12 do 40 druhů (Tamura 1993, Chrtková et Jarolímová 1999).

Caltha palustris L. je nejrozšířenějším druhem rodu a spolu s *C. natans* jsou jedinými zástupci rodu v Evropě (Euro+Med 2006–). Kromě Evropy roste také v Asii a Severní Americe (Smit 1973). Jedná se o typickou, mírně toxickou rostlinu z bažin, slatinišť a podmáčených luk. Mimo to se některé formy pěstují v zahrádkách jako okrasné rostliny. Řadí se mezi hemikryptofyty s jednoduchými listy a aktinomorfními květy (Chrtková 1988).

C. palustris vykazuje velkou vnitropopulační a mezipopulační variabilitu. Kromě výrazné fenotypové plasticity díky široké ekologické amplitudě je zde také i velká variabilita v počtu chromozomů včetně polyploidie a aneuploidie. Počet chromozomů se u *C. palustris* pohybuje od 16 do 120. Mezi její nejběžnější cytotypy patří $2n=32$ a $2n=56$ (Wcisło 1968). Tato velká variabilita je příčinou toho, že se názory na vnitrodruhové členění různí.

První členění druhu *C. palustris* provedli Schott, Nyman et Kotschy (1854), kteří hodnotili nejnápadnější taxony na druhové úrovni. Další taxony rozlišili Beck (1886) a Hegi (1912). Ti je však hodnotili na nižší taxonomické úrovni. Nejvíce se studiem tohoto druhu zabývali Wcisło (1964, 1968) z Polska, Smit (1967, 1968, 1973) z Nizozemska a Kootin-Sanwu et Woodell (1971) z Velké Británie, a to především ekologií druhu, jeho popisem, počtem chromozomů a také provedli hybridizační pokusy za účelem pochopení vztahů mezi jednotlivými poddruhy.

Pilotní studii o rozšíření druhu *C. palustris* v Československu zpracoval Patočka (1963). Z jeho práce vycházeli Chrtková et Křísa (1967), kteří se zabývali rozšířením *C. palustris* subsp. *procumbens* (Beck) Neumayer na území Východních Sudet. První pokus o klasifikaci a vymezení vnitrodruhových taxonů u nás provedla Chrtková (1988). V Květeně ČR uvádí čtyři poddruhy: subsp. *palustris*, subsp. *procumbens* (Beck) Neumayer, subsp. *laeta* (Shott, Nyman et Kotschy) Hegi, subsp. *cornuta* (Shott, Nyman et Kotschy) Hegi. Za diagnostické znaky považuje tvar měchýřků, typ lodyhy a počet chromozomů. Později spolupracovala s Jarolímovou (Chrtková et Jarolímová 1999) a rozšířila své poznatky.

Je patrné, že vymezení a rozlišování vnitrodruhových taxonů *C. palustris* není jednoznačné. Zatímco v okolních zemích (Rakousko, Německo) není členění nijak akceptováno

(Fischer et al. 2008, Müller et al. 2021), u nás je přijímáno podle Květeny ČR (Chrtková 1988). Nicméně ani naše členění není jednoznačné. V Klíči ke květeně České republiky je sice přijato, ale subsp. *laeta* a subsp. *palustris* jsou uvedeny jako nejasné (Štech in Kaplan et al. 2019). Z tohoto důvodu byla vypracována tato práce s cílem popsat vnitrodruhovou a cytologickou variabilitu rodu *Caltha*. Výzkum se soustředil zejména v oblasti Šumavy a Předšumaví kvůli projektu Květena Šumavy.

1.1 Cíle práce

- zpracování literární rešerše cytologické a morfologické variability rodu *Caltha* v Evropě
- zjištění rozšíření cytotypů v daném území
- pilotní studie uváděných morfologických rozdílů mezi některými poddruhy

2. Literární přehled

2.1 Rod *Caltha* L.

Rod *Caltha* L. patří do čeledi *Ranunculaceae*, která zahrnuje kolem 2 500 druhů a centrum jeho rozšíření leží v temperátu (Stevens 2022). Názory na vnitročeleďové členění se různí. Podle morfologických znaků byly rozlišeny 2 podčeledi, a to *Helleboroideae*, kam se řadí rody s měchýřky, a *Ranunculoideae*, kam patří rody s nažkami (Smit 1973). Toto rozdělení je mnohými autory přijímáno a dodržováno dodnes a bylo dokonce na čeleďové úrovni přijato v prvním díle Květeny ČR (Chrtková 1988). Na základě molekulárních dat je v dnešní době rozlišováno 5 podčeledí: *Glaucidoideae*, *Hydrastidoideae*, *Coptidoideae*, *Thalictroideae* a *Ranunculoideae* (Stevens 2022). Podčeď *Ranunculoideae* se dále dělí na několik tribů. (Tamura 1993, Jensen et al. 1995, Stevens 2022, He et al. 2022). Současné fylogenetické vztahy podčeledí a tribů zatím zůstávají nedořešené, neboť výsledky studií jsou rozporuplné. Rod *Caltha* byl donedávna řazen do tribu *Helleboreae* (Tamura 1993, 1997), avšak v nové studii tvoří samostatný tribus *Caltheae* (He et al. 2022).

Díky obrovské variabilitě se v rodě *Caltha* velmi liší názory na druhové vymezení a počet druhů. Nejčastěji je udáváno od 12 do 40 druhů (Chrtková a Jarolímová 1999, Smit 1968).

První pokus o členění rodu učinil na počátku 19. století de Candolle (1818). Druhy ze severní polokoule zařadil do sekce *Populago*, která je charakteristická opadávajícím vnějším okvětím,olistěnými stonky, listy srdcovitého či ledvinovitého tvaru a nevytváří přívěsky na bázi čepele. Druhou sekci rozšířenou na jižní polokouli pojmenoval *Psychrophila*. Jejím typickým znakem je neopadávající vnější okvětí, bezlisté lodyhy, kopinaté listy a výrazně ohnuté přívěsky na bázi čepele. Smit (1973) později uvedla správné jméno nominátní sekce *Caltha*, upřesnila determinační znaky a upravila zařazení druhů. Ale ani toto členění nebylo ponecháno. V novějších molekulárních studiích bylo zjištěno, že pouze sekce *Psychrophila* je monofyletická. Druhy ze sekce *Caltha* tvoří parafyletický taxon. Z tohoto důvodu došlo k revizi předchozí klasifikace rodu. Byly navrženy tři taxony, a to sekce *Caltha*, *Psychrophila* a *Natans* (Schuettpelez et Hoot 2004, Cheng et Xie 2014).

Všichni zástupci rodu *Caltha* jsou vytrvalé byliny, které mají oblé, silné a křehké stonky. Listy jsou střídavé, celistvé s palisty, přičemž dolní bývají dlouze řapíkaté, horní až přisedlé. Okraj listů může být celokrajný, většinou však zubatý či vroubkovaný. Žilnatina je dlanitá.

Pravidelné květy mají různý počet okvětních lístků, nejčastěji v rozmezí 4–9. Většina druhů má žluté či bílé okvětní lístky, vzácně i rudé. Nektaria chybějí. Má velký počet tyčinek. Pestíků bývá 5 až 10 a jsou volné na bázi se žláznatými chlupy. Plodem jsou měchýřky, uspořádané do souplodí, každý z nich se dvěma řadami podlouhlých, vejcovitých až elipsoidních semen. Měchýřky jsou volné, přisedlé nebo krátce stopkaté. (Smit 1973, Chrtková 1988, Chrtková et Jarolímová 1999).

Rostliny rodu *Caltha* se převážně vyskytují na vlhkých, bažinatých stanovištích v arktických a severních i jižních temperátních oblastech (Dahl et Rowley 1956). Na jižní polokouli je rozšíření rodu dosti omezené, pravděpodobně kvůli nedostatku vhodných biotopů. V nížinách roste spíše v bažinách, mokřadech a slatinách. V nejvyšších nadmořských výškách vyhledává sněhová výležiska (Schuettzel et Hoot 2004).

Caltha obsahuje mnoho biologicky aktivních látek jako jsou třísloviny, glykosidy (γ -laktony protoanemoninu a anemoninu), saponiny, berberin, hořčiny, vitamin C, cholin, karoten, flavonoidy a alkaloidy, např. isochinolinový alkaloid magnoflorin. Díky tomuto obsahu látek se blatouch stal velmi cennou surovinou. Již dlouhou dobu se používá v různých zemích v lidovém léčitelství a získává se z něj široká škála léčiv (Liakh et al. 2020). Má především protizánětlivé účinky. Používá se jako analgetikum na popáleniny, rány, pohmožděniny, revma, neurodermatitidu a ekzémy. Extrakt z kořene a výhonků je močopudný a používá se také při kašli. Kořeny se využívají při infekcích močových cest a květový sirup se užívá proti zánětům (Kumar et al. 2006, Liakh et al. 2020).

2.2 Taxony a vnitrodruhová variabilita

Jak bylo uvedeno, jednotlivé druhy či vnitrodruhové taxony se vyznačují obrovskou morfologickou variabilitou. Situaci ztěžuje i značná cytologická proměnlivost. To vede k nejasnému vymezení druhů i rozlišovaných vnitrodruhových taxonů. Důsledkem jsou časté změny ve vymezení taxonů, časté přezarování, rozdílné počty druhů/poddruhů a neshody v diagnostických znacích mezi jednotlivými autory.

Jako nejvýznamnější znaky, které většina autorů považuje za podstatné pro odlišení druhů a poddruhů, jsou uváděny tvar zralých měchýřků, kořenění z uzlin a počet chromozomů.

Starší studie např. Boreau (1854), Schott, Nyman et Kotschy (1854) a Beck (1886) využívají k rozlišení vnitrodruhových taxonů tvar zralého měchýřku, především délku a

zakřivení jeho zobánku. Chrtková et Jarolímová (1999) považují tvar a postavení zralých měchýřků za nejdůležitější k rozpoznání poddruhů. Wcisło (1967) udává, že znaky ve zralých měchýřcích přetrvávají v kultivaci. Oproti tomu Woodell et Kootin-Sanwu (1971) a Smit (1968) uvádějí, že mnoho populací vykazuje značnou proměnlivost ve tvaru měchýřků. Jsou konstantní u jednoho jedince, ale variabilní mezi jedinci. Považují tento znak za nevhodný k vymezení poddruhů a podle nich by se neměl používat.

Foster (1805) rozlišuje druhy podle typu lodyhy a uvádí dva typy. Některé taxony mají vystoupavé či poléhavé stonky, jiné koření z uzlin a tvoří plazivou lodyhu. Většina autorů (Wcisło 1968, Woodell et Kootin-Sanwu 1971, Smit 1973) se shoduje, že plazivá lodyha je důležitá pro určení druhu. Avšak Chrtková et Jarolímová (1999) uvádějí, že rostliny nemusí kořenit každý rok. Dále ve svých experimentech zjistili, že vzácně mohou kořenit i taxony, které se normálně vyznačují vystoupavou či poléhavou lodyhou (*subsp. palustris*). Navíc někdy zřejmě dochází ke křížení mezi jednotlivými taxony a vznikají hybridy (Smit 1973).

Někteří autoři (Praeger 1935) při určování taxonů přihlížejí ke tvaru listu, jiní to však zásadně odmítají. Význam znaků na listech zpochybnil Marshall (1905), který tvrdí, že i v rámci jedné rostliny je tvar listové čepele velmi variabilní. Wcisło (1967) použila k rozlišení poddruhů velikost úhlu bazálního výkroje čepele u listů, které vyrůstají z kořenicích lodyh. Smit (1973) ale uvádí, že i tento znak je velice proměnlivý, jak v jedné populaci, tak i na jedné rostlině. I okraj listu se jeví jako velice variabilní. U některých typů převládá hrubě zubatý či zubatě-vroubkovitý, u jiných je zase zcela celokrajný. Výzkum kořenicích stonků po období kvetení ukázal, že staré listy jsou častěji celokrajné než ty, které se vyvinuly později (Smit 1973).

Taxony rodu *Caltha* a jejich variabilitou se zabývala celá řada dalších autorů. Jejich koncepce se liší jak počtem rozlišovaných taxonů, tak jejich hierarchickou úrovní. Zatímco Tutin ve *Flora Europaea* (1964) řadí všechny rozlišované taxony do druhové úrovně, v determinační literatuře z okolních zemí nejsou v poslední době žádné vnitrodruhové taxony uváděny. V ČR na základě zpracování v Květeně jsou hodnoceny na úrovni poddruhu. Členění použité různými autory a vztahy k taxonům alespoň částečně akceptovaným v současnosti uvádí Tabulka 1.

Tab 1: Taxony *C. palustris* rozlišované různými autory

	Miller (1763)	Forster (1805)	Schott, Nyman a Kotschy (1854)	Beck (1886)	Maugini (1957)	Tutin et al. (1964)
<i>C. p. subsp. palustris</i>	<i>C. major</i>	<i>C. palustris</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>C. palustris</i>	<i>C. palustris</i>	<i>C. palustris</i>
<i>C. p. subsp. procumbens</i>	<i>C. minor</i>	<i>C. radicans</i>				<i>C. minor</i>
<i>C. p. subsp. laeta</i>			<i>C. laeta</i>	<i>C. laeta</i>	<i>C. laeta</i>	<i>C. laeta</i>
<i>C. p. subsp. cornuta</i>			<i>C. cornuta</i>	<i>C. cornuta</i>	<i>C. cornuta</i>	<i>C. cornuta</i>
další mimoevropské taxony nebo taxony neztotožnitelné s dnešním pojetím			<i>C. latifora</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>C. alpestris</i>	<i>C. longirostris</i> , <i>C. alba</i>		<i>C. longirostris</i> , <i>C. polypetala</i>

	Hegi (1912)	Hultén (1968)	Wcisło (1967)	Smit (1973)	Cieślak (2004)
<i>C. p. subsp. palustris</i>	<i>C. p. subsp. palustris</i>		<i>C. p. subsp. genuina</i>	<i>C. p. var. palustris</i>	<i>C. p. subsp. palustris</i>
<i>C. p. subsp. procumbens</i>		<i>C. p. subsp. arctica</i>	<i>C. p. f. radicans</i>	<i>C. p. var. radicans</i>	<i>C. p. subsp. radicans</i>
<i>C. p. subsp. laeta</i>	<i>C. p. subsp. laeta</i>		<i>C. p. subsp. laeta</i>		<i>C. laeta</i>
<i>C. p. subsp. cornuta</i>	<i>C. p. subsp. cornuta</i>		<i>C. p. subsp. cornuta</i>		<i>C. p. subsp. cornuta</i>
další mimoevropské taxony nebo taxony neztotožnitelné s dnešním pojetím		<i>C. p. subsp. asarifolia</i>		<i>C. p. var. alba</i> , <i>C. p. var. purpurea</i>	

2.3 Sekce *Caltha*

Do této sekce se řadí dva druhy, a to *C. palustris* a *C. scaposa*. Vyznačují se zpravidla vzpřímenými lodyhami a většími květy (průměrně větší než 2 cm) s obvejčitými sepaly (Schuettepelz et Hoot 2004, Cheng et Xie 2014).

2.3.1 *Caltha palustris* L.

2.3.1.1 Morfologie, ekologie a rozšíření

Caltha palustris L. je vytrvalá bylina a jedná se o velice proměnlivý druh. Vyznačuje se obvykle vzpřímenou, poléhavou či plazivou lodyhou 10 až 80 cm dlouhou (Smit 1973, Chrtková a Jarolímová 1999). Stonek se v horní části může i nemusí větvit. Lodyha je silná, dutá, lysá, zelená, ale v dolní části často načervenalá (Futák 1982). Oddenek bývá krátký, silný s masitými svazčitými kořeny. Sytě až tmavě zelené listy jsou často lesklé, lysé, přízemní dlouze řapíkaté, na bázi rozšířené v pochvu (Chrtková 1988). Čepel může být okrouhlá, ledvinitá, srdčité ledvinitá, srdčitá nebo střelovitá, a její okraje celokrajné, zubaté, pilovité, pilovitě zubaté nebo vroubkované, vzácně až laločnaté. Dolní lodyžní listy jsou krátce řapíkaté, horní až přisedlé, menší než listy přízemní. Palisty jsou blanité, světle hnědé, srostlé (Chrtková 1988, Smit 1973). Květy mohou být jednotlivé, ale nejčastěji po 2 až více. Okvětní lístky podlouhlé, vejčité, široce vejčité, někdy až téměř okrouhlé. Rozkvetlé květy mají obvykle jasnou, až žloutkově žlutou barvu, vzácně mohou být oranžové. Tyčinek je mnoho (mezi 50 až 120) a jsou nápadné (Smit 1973). Pestíky jsou lysé s krátkou bliznou (Futák 1982, Chrtková 1988). Pylová zrna jsou trikolpátní a měří průměrně 28 mikrometrů. Vnější vrstva je mírně papilnato-bradavičnatá s relativně nápadnými zárodečnými rýhami (Dahl et Rowley 1956). Měchýřky jsou nafouklé, v době zralosti zelenohnědé až hnědé. Jejich tvar se mezi poddruhy liší. Hnědozelená až tmavě zelená hladká semena bývají úzce vejcovitá až elipsoidní, asymetrická a za zralosti obsahují malé, nedostatečně vyvinuté embryo. Ke klíčení semen dochází výhradně pod vodou (Smit 1973, Forbis et Diggle 2001).

Rozšíření druhu je cirkumpolární. Roste na značné části Evropy (na jihu však vzácně) v Severní Americe a Asii. Vyhledává vlhká až mokrá místa (Forster 1805). Nejčastěji ho lze najít v lučních, bažinných i lesních fytocenózách. V nížinách je druh omezen pouze na mokré louky, mokré stinné lesy, mokřady, bažiny a rašeliniště. V horských oblastech je výrazně hojnější a

roste na subalpínských a alpínských loukách s půdou bohatou na živiny, podél horských potoků, na prameništích a v bažinách bohatých na živiny (Chrtěk et Křísa 1967, Woodell et Kootin-Sanwu 1971).

V ČR je rozšířen po celém území, v různých ekologických podmínkách a výškových stupních (Chrtková et Jarolímová 1999). Roste v termofytiku až oreofytiku, v planárním až subalpínském stupni roztroušeně. Rozšíření jednotlivých podruhů není u nás dostatečně známé (Chrtková 1988).

2.3.1.2 Fenotypová plasticita

Modifikace prostředím je u *C. palustris* velmi vysoká. Rostliny jsou schopné se přizpůsobit mnoha prostředím bez genetických změn. Z dosavadních studií bylo zjištěno, že velikost rostlin je velice proměnlivá. V nížinách převládají velké typy s větším počtem květů a silnými lodyhami. Také jedinci ze stinných míst mají mohutný vzhled. Naopak v horských a polárních oblastech se vyskytují spíše menší rostliny s malým počtem květů (Woodell et Kootin-Sanwu 1971). Tito morfologicky odlišní jedinci se po vysazení do experimentální zahrady přestanou lišit od ostatních populací (Smit 1973).

Prostředí také ovlivňuje barvu okvěti, která se pohybuje od světle žluté, zlatě žluté až po sytě žlutou s nádechem do oranžova. Květy ze stinných míst jsou světlé, zatímco ze světlých míst mají zlatavě žlutou barvu. Počet okvětních lístků je také velmi proměnlivý. Nejčastějším počtem bývá okolo 5 okvětních lístků. Běžný rozsah je ale 4–9 (Smit 1973).

Počet plodolistů také není konstantní. Některé populace mají větší počet plodolistů (11–16), jiné zase menší (6–11). Smit (1968) a Woodell et Kootin-Sanwu (1971) zjistili, že v kultivaci se počet plodolistů zvyšuje. Též Burkill (1895) pozoroval, že květy na starších lodyhách produkují více tyčinek a pestíků než květy na mladých stoncích.

Semena evropských a amerických rostlin *C. palustris* mají asymetrický tvar. Jsou tmavě hnědá se světle hnědým trvalým raphe. Semena z asijských populací jsou symetrická, lesklá a téměř černá (Smit et Punt 1969). Tento druh má morfofyzilogickou dormanci semen (Forbis et Diggle 2001). Semena obsahují nedostatečně vyvinuté embryo, které musí před vyklíčením projít dalším vývojem (Baskin et Baskin 2004).

Čas kvetení se mění v rámci nadmořské výšky a zeměpisné šířky. Pokusy byly provedeny na populacích z hor. Ty po roce rozkvetly spolu s populací z nížiny, avšak v době, kdy rostliny z nížiny odkvétaly, jedinci z hor stále kvetli (Smit 1968).

2.3.1.3 Cytotypy a jejich rozšíření

U *Caltha palustris* byly zjištěny různé počty chromozomů v rozmezí 16–120 (Rice et al. 2015). Chromozomy jsou 3 až 15 mikrometrů dlouhé s průměrnou délkou 10 mikrometrů (Dahl et Rowley 1956). Z pohledu celosvětového jsou u tohoto druhu nejvíce zastoupeny dvě hodnoty, a to $2n=32$ a $2n=56$.

U tohoto druhu jsou udávána 2 základní chromozomová čísla a původ cytotypu $2n=56$ vysvětlují dvě hypotézy. Někteří autoři považují tento typ za heptaploidní, protože předpokládaným základním chromozomovým číslem rodu je 8. Tento závěr podporuje výskyt chromozomového počtu 16, nepravidelná meióza, produkce velkého množství aneuploidů a časté neredukované gamety v experimentálních podmínkách u tohoto cytotypu (Kootin-Sanwu et Woodell 1971). Vysoký obsah aneuploidních semenáčků je v přírodě eliminován (Wcisło 1968).

Výskyt hexaploidů v přírodě může být výsledkem spojení redukovaných a neredukovaných gamet tetraploidů ($2n=32$). Spojení neredukované gamety tetraploida s normální gametou hexaploida by mohlo vytvořit heptaploid ($32 + 24 = 56$) (Kootin-Sanwu et Woodell 1971).

Jiní autoři (např. Kootin Sanwu 1965) se přiklánějí k názoru, že se jedná o oktoploidní úroveň. V tomto případě by v rodě *Caltha* byla dvě základní chromozomová čísla, 7 a 8. Toto tvrzení podporuje výskyt chromozomového počtu 28 (Reese 1954, Johnson et Packer 1968), který odpovídá tetraploidní úrovni se základním chromozomovým číslem 7. Cytotyp $2n=56$ by tedy mohl být oktoploid. Přímý cytologický doklad této hypotézy však chybí. Ani analýza karyotypů zatím nepřinesla přesvědčivé výsledky (Wcisło 1968).

Kootin-Sanwu et Woodell (1971) předpokládají, že tetraploidi vznikli ze dvou odlišných diploidních druhů allopolyploidizací. Argumenty pro toto tvrzení jsou vzácnost diploidního cytotypu a výhradní tvorba bivalentů během meiózy u tetraploidní formy.

Tetraploid je hojně rozšířený v Evropě, především ve Španělsku, Francii, Itálii, Rakousku, Německu, České republice, Slovensku, Polsku a Nizozemsku. Nicméně chybí ve

Velké Británii. Dále roste v Severní Americe, kde zasahuje až do polárních oblastí. Také je uváděn z východní Asie, především z Japonska a Jižní Koreje (Rice et al. 2015).

Vyšší ploidní stupeň ($2n=56$) v Evropě převládá ve Velké Británii. Dále je udáván jako běžný v České republice, na Slovensku, v Polsku, Nizozemsku, Rusku a na Islandu. V Severní Americe je tento cytotyp poměrně vzácný. Nalezen byl pouze na Aljašce (Rice et al. 2015).

V Evropě, Severní Americe a Asii byly nalezeny i další cytotypy. Nejnižší počet $2n=16$ byl zjištěn pouze u rostlin z Itálie, Ruska a Indie (Leoncini 1951, Kumar et Singhal 2008). Pár jedinců s $2n=28$ bylo nalezeno ve Finsku, Švédsku a Indii (Reese 1954, Johnson et Packer 1968, Kumar et Singhal 2008). Rostliny s chromozomovým počtem 48 byli objeveni v řadě evropských zemí, např. na Slovensku, v Polsku a Bělorusku (Wcisło 1964, Chrtková et Jarolímová 1988). Jako nejčastější je však udáván z Itálie (Leoncini 1951, Maugini 1957). Další euploidní počet $2n=64$ se vyskytuje vzácně (Rice et al. 2015). Kromě euploidů bylo objeveno i mnoho aneuploidů. Jedná se však spíše o ojedinelé rostliny.

Někteří autoři uvádějí různé počty chromozomů v rámci jedné rostliny (Leoncini 1951, 1952; Reese 1954; Kootin-Sanwu et Woodell 1971, Cieslak 2000). Například v jednom kořeni byly nalezeny počty: $2n = 30, 32, 35, 40, 42, 52, 53$ (Cieslak 2000). Reese (1954) navrhl, že počet nejčastěji opakovaný lze brát jako hlavní somatické číslo rostliny. Také byly nalezeny smíšené populace. Wcisło (1964) odkazuje na lokalitu v blízkosti Krakova, kde $2n=32$ roste společně s $2n=56$. Podle autorky se však jedná o vzácný případ. V neposlední řadě Reese (1954) zjistil výskyt B-chromozomů. Jedná se o speciální chromozomy, které nejsou pro existenci rostlin nezbytné. Nacházejí se pouze u některých jedinců v populaci a do pohlavních buněk se nerozdělují rovnoměrně (Jones 1995). Nejčastěji se vyskytují u rostlin s 56 chromozomy a méně často u jedinců s 32 chromozomy (Blagojević et al. 2013).

Podle Reese (1954) a Wcisło (1968) není proměnlivost v počtu chromozomů v korelaci s variabilitou morfologických znaků. S tím souhlasí i Woodell et Kootin-Sanwu (1971) a tvrdí, že na základě počtu chromozomů nelze druh taxonomicky členit. Nicméně Smit (1967) objevila jemné ekologické rozdíly mezi cytotypy $2n=32$ a $2n=56$.

2.3.1.4 Poddruhy *C. palustris* L.

C. palustris* subsp. *palustris (syn. *C. palustris* var. *typica* Beck, *C. palustris* var. *palustris*)

Lodyhy jsou buď vztyčené nebo poléhavé. V horní části se větví. Hlavní kořeny mají v průměru 2 až 3 mm. Mladé listy jsou obklopeny četnými pochvami. Řapík je 12 až 100 cm dlouhý. Čepel je ledvinitá, 3–25 cm dlouhá, 3–20 cm široká. Čepel lodyžních listů je srdčité ledvinitá až okrouhlá a neúplně přisedlá. Čepele na vrcholu bývají tupé, okraje čepele zubaté nebo pilovitě zubaté. Okraje horních listů jsou vroubkované nebo celokrajné. Počet květů se pohybuje od 4 do 6 a mají zhruba 40 mm v průměru. Okvěť je složena z 4 až 9 žlutkově žlutých lístků, které jsou široce obvejčité, až 19 mm dlouhé, 13 mm široké, tupé ale v některých případech i špičaté. Okvětní lístky se okraji často překrývají. Plodolistů je 5 až 25, mají čárkovitě-podlouhlý tvar a obsahují mnoho vajíček. Čnělka není ostře ohraničena, nahoře je nezřetelně vnořena dvoulaločná blizna. Přisedlé měchýřky jsou 8–20 mm dlouhé, 2,5–5 mm široké, asymetricky obdélníkové, na obou stranách zakřivené, jejich vrchol je náhle zúžený a za zralosti jsou od sebe odkloněné. Zobánek je zahnutý směrem ven. Obsahují 7–20 semen. (Smit 1973, Chrtková 1988).

Obvykle se předpokládá, že tomuto poddruhu odpovídá tetraploidní úroveň a obsahuje 32 chromozomů (Chrtková et Jarolímová 1999). Nicméně autoři z Polska (Wcisło 1967, Cieslak 2000) také uvádějí výskyt jednoho specifického cytotypu a to $2n = 56$ (Wcisło 1967, Cieslak 2000).

Poddruh je rozšířen v temperátní a arktické Evropě, Severní Americe a Asii. V Himalájích roste až do nadmořské výšky 4 300 m. Vyhovují mu především bažiny, mokřiny, močály, rákosiny, příkopy, zamokřené lesy i louky se stagnující vodou, lužní lesy, okraje potoků a litorální zóna rybníčních nádrží, kde vytváří trsy se vzpřímeným vzrůstem (Chrtek et Křísa 1967). Vyskytuje se ve společenstvech tříd *Montio-Cardaminetea*, *Phragmiti-Magnocaricetea* a *Alnetea glutinosae*, řádů *Molinietalia* a *Caricetalia fuscae* a také ve svazu *Alno-Ulmion* (Chrtková 1988).

V ČR roste v termofytiku až oreofytiku roztroušeně, místy až hojně. Zasahuje do planárního až supramontánního stupně, v subalpínském pouze v karech (Chrtková 1988). *C. palustris* subsp. *palustris* je rozšířen ve středních Čechách, v Českém středohoří, Českém ráji, Krkonoších, Slezsku a na Českomoravské vrchovině (Chrtek et Křísa 1967, Chrtková et Jarolímová 1999).

C. palustris subsp. procumbens (Beck) Neumayer (syn. *C. radicans* Foster, *C. minor* Miller)

Jedná se většinou o menší rostliny, které po odkvětu koření z uzlin kvetoucího stonku a vytvářejí plazivou lodyhu (Smit 1968). Právě tato vlastnost se zdá být klíčovým znakem a přetrvává i po vysazení do experimentální zahrady. Podle Woodell et Kootin-Sanwu (1971) to ukazuje na geneticky fixovaný znak a je ho tedy možno použít k taxonomickému vymezení.

Tento typ rostliny byl popsán z Británie jako druh *C. minor* (Miller 1768) a ze Skotska jako druh *C. radicans* (Forster 1805). Hultén (1968) kořenující rostliny ze Severní Ameriky popsal jako *subsp. arctica*. Pravděpodobně se jedná o synonyma k poddruhu *procumbens*.

V horní části se stonek nevětví nebo velice málo. Čepel listů je okrouhlá, ledvinitá nebo srdčitě ledvinitá, vroubkovaná nebo zubatá (Forster 1805). Květy mají jasnou, až žloutkově žlutou barvu. Okvětní lístky bývají většinou podlouhlé až vejčité. Okraje se zpravidla nepřekrývají nebo jen velmi slabě. Měchýřek se na obou stranách zakřivuje a jeho vrchol se náhle zužuje. Zralé měchýřky jsou odkloněné, nazpět prohnuté. Zobánek je též zahnutý směrem ven (Chrtková 1988).

Pro tento poddruh je nejčastěji udáván počet chromozomů 56 (Chrtková et Jarolímová 1999).

Roste na rašeliništích, rašelinných loukách, v údolních mokřadních loukách, na březích potoků a rybníků, svahových prameništích, v podmáčených olšinách a často také ve vlhkých příkopech podél silnic. Téměř výhradně se vyskytuje na kyselých půdách. Na rozdíl od *C. palustris subsp. palustris* roste na extrémnějších místech jako omývané břehy divokých řek. Nevadí mu ani tundrové klima (Woodell et Kootin-Sanwu 1971). Objevuje se ve společenstvech řádů *Caricetalia fuscae* a *Montio-Cardaminetalia* a podsvazu *Alnenion glutinoso-incanae* (Chrtková 1988).

U nás je dosud znám ostrůvkovitý výskyt v mezofytiku až oreofytiku roztroušeně. Vzácně se vyskytuje i v termofytiku v Doupovské pahorkatině, Středním Poohří a Lounsko-labském středohoří. Roste v kolinním až montánním stupni (Chrtková 1988) v nadmořské výšce 500–800 m. n. m. Poddruh byl nalezen v Krušných horách, Slavkovském lese, Třeboňské pánvi, Českomoravské vrchovině, Orlických horách, Českomoravském Mezihoří, na Kralickém Sněžníku, v Hrubém a Nízkém Jeseníku (Chrtek et Křísa 1967). Na Slovensku je udáván z vysokých Karpat. Nicméně výskyt tohoto poddruhu byl na Slovensku zpochybněn a pravděpodobně zde neroste (Futák 1982).

C. palustris* subsp. *laeta (Shott, Nyman et Kotschy) Hegi

Rostliny jsou vystoupavé a v horní části větvené. Čepel je ledvinitá, ledvinitě srdčitá až okrouhle srdčitá nebo střelovitá, 8 až 15 cm velká, pilovitě zubatá, zubatá až vroubkovaná. Květy mají žloutkově žlutou barvu. Okvětní lístky bývají vejčité až široce vejčité. Okraje se většinou nepřekrývají. Měchýřky jsou k vrcholu náhle zúžené, hřbetní strana rovná a břišní strana zakřivená. Zralé měchýřky bývají k sobě přikloněné a vzpřímené. Zobánek je víceméně rovný (Chrtková 1988).

V ČR a na Slovensku Chrtková et Jarolímová (1999) uvádějí pro tento poddruh dvě hodnoty somatického počtu chromozomů – 32 z nížin a 56 z horských biotopů. Naopak v Rumunsku rostou na horách výhradně tetraploidi. Cytotyp $2n=32$ měly i rostliny z Bulharska ve studii Wcisło (1967). V Polsku je pro tento taxon uváděn výhradně chromosomový počet 56 (Wcisło 1968).

Poddruh roste na vlhkých loukách, prameništích, březích potoků a rašelinných loukách ve společenstvech svazů *Calthion*, *Cardamino-Montion* a *Caricion fuscae* (Chrtková 1988).

V ČR se vyskytuje v mezofytiku až oreofytiku a to především ve vyšších polohách. Nejhojnější je v suprakolinním až subalpinském stupni (Chrtková 1988). Nižší ploidie je uváděna z úpatí Šumavy, Středočeské pahorkatiny, Blanského lesa a střední Moravy. Vyšší ploidie se vyskytuje na Hrubém Jeseníku (Chrtková et Jarolímová 1999). Na Slovensku je poddruh zaznamenán v karpatské oblasti, ojediněle také v nižších polohách panonské oblasti (Futák 1982). V Rakousku se vyskytuje zejména v podhůří Alp (Beck 1886).

C. palustris* subsp. *cornuta (Shott, Nyman et Kotschy) Hegi

Vzpřímené vysoké lodyhy jsou silné a v horní části se větví. Čepel je srdčitá až okrouhlá, často delší než široká, 15–25 cm velká, oddáleně pilovitá, pilovitě zubatá až zubatá. Květy jsou velké, jasně až žloutkově žluté. Okvětní lístky bývají široce vejčité a jejich okraje se většinou částečně překrývají. Vrchol měchýřku se pozvolna zužuje. Obě strany jsou zakřivené, za zralosti odkloněné, obloukovitě ven vyhnuté. Zobánek je prohnutý (Chrtková 1988).

Pro tento poddruh Chrtková a Jarolímová (Chrtková a Jarolímová 1999) uvádějí tetraploidní počet chromozomů ($2n=32$).

Roste na okrajích rybníků, v mokřadech, lužních lesích či v rákosinách u stojatých vod (Chrtková 1988). V Rakousku byl zaznamenán v nížinách (Beck 1886). Nachází se ve

společenstvech svazu *Phragmition communis* a *Salicion albae* a podsvazu *Ulmenion* (Chrtková 1988).

U nás se vyskytuje pouze na jihovýchodní Moravě v planárním až kolinním stupni (Chrtková 1988). Byl nalezen ve Znojensko-brněnské pahorkatině, Mikulovské pahorkatině, Jihomoravském úvalu a Jihomoravské pahorkatině. Na Slovensku je udáván z jižního a východního Slovenska (Futák 1982, Chrtková et Jarolímová 1988).

2.3.1.5 Další variety *C. palustris* L.

C. palustris var. *alba* (Cambess.) Hook. f. et Thomson

Je typická svými bílými květy a má pantaporátní pyl. Je rozšířena převážně na horách severní Indie, Pákistánu, Kašmíru a Afganistánu. Obývá vlhká místa podél potoků v nadmořské výšce 2200–3500 m. n. m. (Beck 1886, Smit 1978)

C. palustris var. *purpurea* Spare et Fischer

Květy jsou rudo-růžové. Hlavními oblastmi výskytu jsou horské louky a mechové svahy v Himalájích v nadmořské výšce 4000 až 5000 m. n. m. (Smit 1973).

2.3.2 *Caltha scaposa* Hook. f. et Thomson

Lodyhy jsou okolo 11 cm vysoké. Hlavní kořeny bývají tlusté. Čepel je oválná, 2,2 cm dlouhá a 1,6 cm široká, tupá, báze hluboce srdčitá, celistvá nebo zoubkovaná. Řapík je 3x delší než čepel. Úzké a četné pochvy měří 2–3 cm. Květy mají 5–9 žlutých okvětních lístků, které jsou obvejčité a tupé, 13 mm dlouhé a 8 mm široké. Tyčinek je 30 a mají široce zploštělé nitky. Pylová zrna jsou trikolpátní. Má zhruba 12 asymetrických, úzce-obdélníkových plodolistů. Blizna je zakřivená. Měchýřky jsou na stopkách, zploštělé, obdélníkovité s krátkým zobánkem. Obsahují 3–6 černých vejcovitých semen, ca 1,8 mm dlouhých a 1 mm širokých (Smit 1973). Doba květu je od června do července (Zhang et al. 2017).

Vyskytuje se v jižním Tibetu a v Číně. Je součástí bažinaté vysokohorské vegetace od 2 800 do 6 000 m. n. m (Smit 1973, Zhang et al. 2017).

V Číně *C. scaposa* zahrnuje dva cytotypy, tetraploidní ($2n=32$) a oktoploidní ($2n=64$), přičemž první se vyskytuje v severovýchodní části geografického rozšíření druhu, zatímco druhý v jihozápadní části (Wang et al. 2013, Wang et al. 2019).

2.4 Sekce *Psychrophila*

Do této sekce spadají druhy *Caltha leptosepala* DC., *Caltha sagittata* Cav., *Caltha appendiculata* Pers., *Caltha dionaeifolia* Hook. f., *Caltha novae-zelandiae* Hook. f., *Caltha obtusa* Cheeseman a *Caltha introloba* F. a Muell. (Schuettzel et al. 2004, Cheng et al. 2014). Většinou mají stvol s přízemní růžicí, podlouhlé sepaly (více než dvakrát delší než široké) a zpravidla ohnuté přívěsky na bázi čepele (Hill 1918, Schuettzel et al. 2004). Vyskytují se ve vysokých horách a do nižších nadmořských výšek zasahují pouze v subantarktických oblastech (Smit 1973).

2.4.1 *Caltha leptosepala* DC.

Tento druh se vyznačuje velkou morfologickou variabilitou, která vedla k nejednotnému taxonomickému určování (Wefferling et al. 2017).

Rostliny jsou vysoké 10 až 40 cm. Hlavní kořeny měří v průměru 2 mm. Čepel bývá obdélně-oválná se srdčitou bází, může být i okrouhlo-ledvinitá až oválná. Řapík je asi 2–3x delší než čepel. Četné pochvy jsou až 3 mm dlouhé. Lodyha může být bezlistá nebo s jedním listem, nese 1–2 květy, prodlužuje se po rozkvetu. Obvykle má 7–10 bílých lineárně-obdélníkových nebo obdélně-obvejčitých okvětních lístků. Jsou 15 mm dlouhé, 6 mm široké, tupé. Květ obsahuje okolo 60 tyčinek se zploštělými nitkami. Pylová zrna mohou být trikolpátní, pantokolpátní nebo pantoporátní. 8 zploštělých měchýřků má lineárně-obdélníkový tvar. Měchýřky vyrůstají na krátké stopce nebo jsou i přisedlé, 12–20 mm dlouhé, 3 mm široké, zploštělé, obdélně-elipsoidní s mnoha semeny. Ta jsou symetricky vejcovitá, černá a lesklá, 2,3 x 1,1 mm velká. Doba květu je od června do srpna (Punt et al. 1967, Smit 1973).

Nejčastější počty chromozomů u tohoto druhu jsou 48, 72, a 96 (Wefferling et al. 2017, Rice et al. 2015). *C. leptosepala* má relativně malé a úzké chromozomy (Dahl et al. 1956).

Má poměrně malý areál a roste především na severozápadě Spojených států, západním pobřeží Kanady a části jihozápadní Aljašky. Obývá vlhké vysokohorské a podhorské biotopy v nadmořské výšce od 3 900 m.n.m (Wefferling et al. 2017).

Tento druh obsahuje komplex hexaploidů, vzácných nonaploidů a dodecaploidů. V rámci hexaploidů jsou rozeznávány dva poddruhy. První z nich je *C. leptosepala* subsp. *howelli*, která má ledvinité až okrouhlé listy s překrývajícími se bazálními listovými boltci, jeden nebo dva kvetoucí stonky, obdélníkovité okvětní lístky a pantoporátní pylová zrna. Je

znám z Britské Kolumbie a z Cascade Sierra Nevada. Druhý poddruh *C. leptosepala* subsp. *leptosepala* se vyznačuje podlouhle–vejčitými listy, jedním květem, přibližně lineárními okvětními lístky a trikolpátním pylem. V Severní Americe roste v jižních a severních Rockies (Punt et Smit 1967, Wefferling et al. 2017). Dodecaploidi jsou charakterističtí podlouhle–obvejčitými listy se srdčitou bází a jsou rozšířeni severně od hexaploidů (Wefferling et al. 2017).

2.5 Sekce *Natans*

Patří sem pouze jediný druh *C. natans*, který byl dlouho řazen do sekce *Caltha*. Typickými znaky pro tuto skupinu je plazivý stonek a malé květy (průměr 1 cm) s obvejčitými bílými okvětními lístky (Schuettpelez et Hoot 2004, Cheng et Xie 2014).

2.5.1 *Caltha natans* Pallas

Tento drobnější druh roste v mělkých, pomalu tekoucích vodách jako jsou potoky, tůňe, příkopy, okraje jezer, bažiny a rybníky v Severní Americe (Dahl et Rowley 1956), na Sibiři (Forster 1805) a okrajově zasahuje až do evropské části Ruska (Euro+Med 2006–). Oproti *C. palustris* a *C. leptosepala* vykazuje malou morfologickou proměnlivost (Dahl et Rowley 1956).

Stonek dosahuje délky 15 až 50 cm a často se vznáší na hladině. Lodyhy zakořeňují v bahně nebo jílu, a tím dochází k šíření druhu (Harms 1976, Smit 1973). Hlavní kořeny mají v průměru 1–2 mm (Smit 1973). Listy jsou srdčito-ledvinité (Forster 1805). Čepel je ledvinitá, 2–5 cm dlouhá a široká, tupá, na bázi srdčitá, celokrajná nebo vroubkovaná. Řapík bývá 8 až 20 cm dlouhý. *C. natans* má četné a nenápadné pochvy. Vyznačuje se 2–6 nenápadnými bílými až růžovými květy na konci hlavního rozvětveného stonku. Květy mají v průměru 10 mm, skládají se z 5 okvětních lístků oválného tvaru. Lístky jsou 6–8 mm dlouhé, 5 mm široké, tupé. Květy nemají mnoho tyčinek, většinou okolo 17 se široce zploštělou nitkou (Smit 1973). Pylová zrna jsou trikolpátní, měří průměrně 19 mikrometrů a jsou tedy menší než u *C. palustris*. Vnější vrstva je mírně papilnato-bradavičnatá (Dahl et Rowley 1956). Semena jsou tmavě hnědá a 1 mm dlouhá. Doba květu je od června do srpna (Smit 1973).

Udávaný počet chromozomů je 16 a 32 (Rice et al. 2015). Oproti *C. palustris* jsou malé a úzké. Většina z nich má kinetochory ve středu a jejich délka je 1 až 4 mikrometry. Průměrná chromozomální délka je 2,5 mikrometru (Dahl et Rowley 1956).

2.6 Dosavadní experimenty *C. palustris*

Dosavadní experimenty testovaly viabilitu pylu, klíčivost semen a hybridizaci v rámci i mezi cytotypy.

2.6.1 Nehybridizační experimenty

U *C. palustris* mnozí autoři uvádějí neschopnost samoopylení (Smit 1968, Wcisło 1968, Kootin-Sanwu et Woodell 1971). Experimenty s odstřihováním prašníků a zakrýváním blizen sáčky ukázaly, že všechny testované cytotypy ($2n=32$, $2n=56$, $2n=64$) jsou autoinkompatibilní (Kootin-Sanwu et Woodell 1971). Pokusy na alogamii ukázaly, že rostliny preferují opylení rostlinou stejného cytotypu (Wcisło 1968).

Za účelem zjištění fertility pylu jednotlivých cytotypů byla pylová zrna obarvena v acetokarmínu. Zjistilo se, že fertilita je vysoká bez ohledu na ploidii. Dvě rostliny s chromozomovým počtem 64 měly fertilitu 89 %, 98 jedinců s 56 chromosomy dosahovaly až 94,6 % a 17 rostlin s 32 chromosomy měly 93,3 % (Kootin-Sanwu et Woodell 1971).

Také byly provedeny pokusy s vysetím zralých semen. Ty byly odebrány v přírodě od rostlin s chromozomovým počtem 56 a vysety do experimentální zahrady. Skoro 70 % potomstva mělo jiný počet chromozomů než jejich rodiče (Kootin-Sanwu et Woodell 1971).

2.6.2 Hybridizace

Řada vědců prováděla experimentální křížení s cílem pochopit cytologické vztahy v této skupině. Umělá hybridizace umožňuje testovat příbuznost mezi jednotlivými druhy (Goulet et al. 2017). Nejvíce pokusů učinila Wcisło (1964, 1968) v Polsku, Bulharsku a Československu a Kootin-Sanwu et Woodell (1971) ve Velké Británii. Smit (1968) pak pracovala s materiálem z řady evropských zemí (Holandska, Španělska, Portugalska, Německa, Francie, Rakouska a Finska).

Protože se doba květu mezi cytotypy liší, je třeba ji pro experimentální křížení sjednotit (Wcisło 1964). Nižší ploidní stupně kvetou dříve než vyšší. Tyto rozdíly ve fenologii v přírodních podmínkách brání hybridizaci mezi cytotypy. Další komplikací je, že v době zralosti měchýřků není v semenech dostatečně vyvinuté embryo (Forbis et Diggle 2001), proto je obtížnou fází experimentálního křížení vysévání a klíčení semen. Je třeba udržet příznivé teplotní podmínky a dostatek vody. Z tohoto důvodu Wcisło (1964) a Smit (1968) umístily semena na filtrační papír do Petriho misky s vodou. Po absorbování vody je zasadily do květináčů.

U *Caltha palustris* bylo uskutečněno jak křížení uvnitř cytotypů, tak mezi určitými cytotypy. Wcisło (1964, 1968) a Smit (1968) provedly křížení s chromosomovými počty 32, 56 a 44. Kootin-Sanwu et Woodell (1971) vybrali také počty 32, 56, navíc 64 a některé potomky z F1 generace. Kombinacemi zjišťovali schopnost reprodukce získaných kříženců. Kootin-Sanwu et Woodell (1971) zjistili, že hybridní kombinace s použitím nižší ploidie jako mateřských rostlin jsou v produkci hybridních semen úspěšnější. Wcisło (1964) však tvrdí pravý opak.

2.6.2.1 Křížení v rámci cytotypů

Pro zjištění reprodukčních bariér bylo provedeno několik hybridizačních experimentů mezi rostlinami se stejným počtem chromozomů ze stejných i různých populací. Při vnitropopulačním křížení u $2n=56$ byla získána viabilní semena u 14 z 15 hybridizačních zásahů. Podobně úspěšně dopadla i mezipopulační hybridizace. Z celkových 13 křížení bylo 12 úspěšných. Vzniklí hybridi měli opět 56 chromozomů, dokončili klíčení do měsíce, rychle rostli a někteří dosáhli větší velikosti než jejich rodiče. Semena byla životaschopná a jejich fertilita pyly byla vysoká, téměř 90 %. Křížení proběhlo i mezi F1 hybridy z mezipopulačního křížení. Z 16 křížení bylo 10 úspěšných. F2 jedinci rostli dobře a většina z nich měla fertilitu pyly přes 90 %. U hybridizace mezi rostlinami z nížin a hor se fertilita u F2 jedinců pohybovala od 45 do 90 %, s průměrem 63 % (Kootin-Sanwu et Woodell 1971).

Wcisło (1968) také provedla pokusy s chromosomovým počtem 56. Zkřížila morfologicky odlišné rostliny, které hodnotí jako poddruh *genuina* a poddruh *laeta*. Výslední hybridi měli opět chromosomový počet 56. Smit (1968) uskutečnila 32 mezipopulačních křížení mezi populacemi s 56 chromosomy. Získala 30 rostlin s životaschopnými semeny a

pouze 2 rostliny bez semen. Rovněž generace F1 byla stabilní v počtu chromozomů a měla 56 chromozomů.

Ze sedmi vnitropopulačních křížení mezi $2n=32$ a $2n=32$ bylo 5 úspěšných. Vzniklí F1 kříženci měli stejný počet chromozomů (Kootin-Sanwu et Woodell 1971). I Smit (1968) provedla 22 křížení mezi těmito cytotypy. Dostala 19 rostlin s životaschopnými semeny a 3 rostliny bez semen. Generace F1 měla 32 chromozomů.

Kootin-Sanwu et Woodell (1971) provedli 4 křížení mezi rostlinami se stejným počtem chromozomů již hybridního původu ($2n=60$), které vznikly kombinací $2n=56$ a $2n=64$. Ta byla sice úspěšná, ale průměrný počet získaných semen byl nízký.

Naopak hybridizace mezi F1 rostlinami s 44 chromosomy (rodičovské cytotypy s chromosomovým počtem $2n=32$ a $2n=56$) vedla ke vzniku rostlin s výrazně zpomaleným pomaturitním vývojem. Byli vysoce sterilní a nedokázali se adaptovat podmínkám (Wcisło 1968).

Jako neúspěšná se ukázala i vnitropopulační hybridizace mezi jedinci s 64 chromosomy, kteří zřejmě pocházeli ze stejného klonu (Kootin-Sanwu et Woodell 1971).

2.6.2.2 Křížení mezi cytotypy $2n=32$ a $2n=56$

Rovněž výsledky experimentální hybridizace mezi těmito cytotypy ukazují na značné reprodukční bariéry. Ve studii Kootin-Sanwu et Woodell (1970), kde $2n=56$ sloužil jako samičí rostlina, bylo pouze 10 křížení úspěšných z celkového počtu 19. Lepší výsledky byly získány u pokusů, kde jako samičí rostlina byl použit tetraploid. Z 16 křížení pouze jedno selhalo. Počet chromozomů se u hybridních jedinců pohyboval mezi 41 až 45. Většina z nich (73 %) však měla $2n=44$. Získané rostliny rostly dobře, měly však abortovaná semena (Kootin-Sanwu et Woodell 1970).

K odlišným výsledkům došla u hybridizačních pokusů se stejnými cytotypy Wcisło (1968). Všichni získaní kříženci měli $2n=44$. Tento počet je výsledkem fúze dvou redukovaných gamet $n=16$ a $n=28$. Většina hybridních rostlin rozkvetla ve třetím roku kultivace, a poté na konci sezóny zahynula. Pouze omezený počet hybridů byl schopen přežít zimu třetí sezóny. Ti, co uspěli, měli schopnost vegetativního rozmnožování, kořenění z uzlin nebo měli adventivní pupeny. Ve vegetativních znacích byly hybridní rostliny morfologicky stejné jako rodičovské

cytotypy a nebyly odlišitelné. I v těchto experimentech byla většina hybridů sterilních a nevytvořila semena.

Vytvoření hybridních rostlin mezi $2n=32$ a $2n=56$ ve volné přírodě je velmi omezené. Původně se předpokládalo, že mezi těmito cytotypy existuje úplná vnitřní reprodukční bariéra. Reprodukční experimenty však prokázaly, že tato reprodukční bariéra existuje, ale zdaleka není úplná. V přírodě má nicméně za následek neúspěch hybridů s intermediárním počtem chromozómů 44 a k eliminaci málo životaschopných kříženců dochází už ve stádiu semenáčků. Také jsou zde vnější bariéry zabráňující volnému křížení mezi odlišnými cytotypy, které mají lehce odlišné ekologické preference a které kvetou v různých obdobích (Wcisło 1968).

2.6.2.3 Křížení mezi cytotypy $2n=56$ a $2n=64$

Toto křížení bylo úspěšné a počet chromozómů v hybridech se pohyboval od 56 do 63. Nezáleželo na tom, který cytotyp byl použit jako samičí, úspěšnost hybridizace i variabilita potomstva byly stejné v obou případech. Ve volné přírodě takovíto kříženci nemohou vznikat často, protože oba cytotypy obvykle nerostou společně. (Kootin-Sanwu et Woodell 1971).

Snížená viabilita získaných hybridů ukazuje na bariéry mezi těmito cytotypy. Kootin-Sanwu et Woodell (1971) prokázali sníženou fertilitu jejich pylu, která se pohybovala mezi 45–80 % a byla mnohem nižší než u rodičovských cytotypů. Dvě rostliny se 61 chromosomy byly abnormální s drobnými okvětními lístky a kvetly nezvykle brzy. Jejich samčí orgány byly kompletně sterilní. Zbylí kříženci byli růstově aktivní.

2.6.2.4 Další křížení

Značně neúspěšná byla hybridizace mezi $2n=32$ a $2n=64$. Pouze jeden z deseti pokusů byl úspěšný. Z tohoto jediného hybrida byla zaseta 3 semena, ta ale nevyklíčila. Úspěšný byl ten pokus, kde jako samičí rostlina byla použita ta s menším počtem chromozómů. Reciproční křížení selhalo. (Kootin-Sanwu et Woodell 1971).

Kootin-Sanwu et Woodell (1971) dále vzali F1 jedince s 62 chromosomy, který vznikl hybridizací mezi rostlinami s 56 a 64 chromosomy, a křížili ho se samičí rostlinou s chromozomovým počtem 56. Sice získali pět semen, ale ta nevzešla. I reciproční křížení selhalo.

2.6.3 Aneuploidi a B-chromozómy

Při karyologických studiích byla také věnována pozornost rostlinám s aneuploidním počtem chromozomů a případným B chromosomům. Kootin-Sanwu et Woodell (1971) z Velké Británie uvádí, že z hybridů vzniklých z křížení mezi $2n=32$ a $2n=56$ byli 4 % aneuploidi a 20 % z nich mělo B chromozomy. Taktéž Reese (1954), který zkoumal populace v Německu našel mnoho aneuploidů a B chromozomů. Maugini (1953, 1957) a Leoncini (1951, 1952) u rostlin z Rakouska a Itálie neuvádí žádné B chromosomy, ale zato objevili řadu aneuploidů. Wcisło (1967) analyzovala 1 200 rostlin z Polska, Bulharska a Československa. Z toho bylo pouze 8 aneuploidů a nenašla žádné B chromozomy. Studie Smit (1973) zahrnovala několik stovek rostlin z Holandska, Španělska, Portugalska, Německa, Francie, Rakouska a Finska. Nenalezla ani aneuploidy a ani B chromozomy.

2.6.4 Mikrosporogeneze a makrosporogeneze

Velmi různorodé počty chromozomů nastolují otázku, do jaké míry a za jakých podmínek je meióza během mikro a makrosporogeneze pravidelná u různých cytotypů. Navzdory rozsáhlým karyologickým studiím je informací o této problematice velice málo. Reese (1954) uvádí ve svých experimentech na $2n=32$, $2n=56$, $2n=60$ velmi pravidelnou meiózu bez přítomnosti multivalentů. Byly pozorované pouze univalenty. S tímto ale ostatní autoři nesouhlasí. Maugini (1957), která studovala jak euploidy, tak aneuploidy, pozorovala abnormality jako fragmenty chromozomů, chromozómové mosty a opožděné chromozómy. Kootin-Sanwu (1963) zkoumal meiózu na $2n=56$. Zjistil, že nejčastější uspořádání byly bivalenty a kvadrivalenty. Univalenty, trivalenty a další uskupení měly velmi nízkou frekvenci. Kootin-Sanwu et Woodell (1971) dále sledovali hybridy s chromosomovým počtem 42 a 44. Párování bylo velmi proměnlivé, často se v pylových mateřských buňkách objevovaly nepárující chromozomy. Překvapující byla anafáze, která probíhala neobvykle normálně.

Wcisło (1968) také analyzovala pylové mateřské buňky F1 hybridů s chromosomovým počtem $2n=44$. Dospěla k závěru, že pouze 32 % mělo v metafázi I pravidelné uspořádání chromozomů. U zbývajících 68 % byly pozorovány nepravidelnosti. Nejvyšší pozorovaná uspořádání byly bivalenty, ale počet univalentů byl variabilní a pohyboval se od 2 do 16. Z toho lze usoudit, že u $2n=44$ je nejčastějším typem seskupení u mateřských pylových buněk 20 bivalentů a 4 univalenty. V několika případech byly pozorovány opožděné chromozómy či

chromozomové mosty. Také tam probíhal proces eliminace některých univalentů. Tyto výsledky se tedy liší od výsledků Kootin-Sanwu et Woodell (1971), a to v pravidelnosti v počtech chromozomů a nepřítomnosti vícevalentních chromozomů.

Meióza u hybridních jedinců z $2n=56 \times 2n=64$ byla velmi nepravidelná. Frekvence nepárových chromozomů byla často velmi vysoká. V některých hybridech se v mateřských pylových buňkách vyskytly lepkavé chromozomy. Anafáze byla často velmi neobvyklá. V jednom kříženci s chromosomovým počtem 60 byly v anafázi II pozorovány fragmenty chromozomů. Mnoho pylových mateřských buněk bylo po meioze vícejaderných, což je následek chování opožděných chromozomů v meiotické anafázi (Kootin-Sanwu et Woodell 1971).

Wcisło (1968) sledovala proces meiózy i u makrosporogeneze F1 hybridů s chromosomovým počtem 44. Získala 3 pozorovatelné mateřské buňky zárodečného vaku. V jedné buňce se daly rozlišit pouze bivalenty, ve zbývajících 20 bivalentů a 4 univalenty. Embrya měla velmi opožděný vývoj, a nakonec se mitotické dělení zastavilo ve stádiu osmi jader.

3. Metodika

3.1 Sběr materiálu

Pro určení ploidní úrovně a velikosti genomu bylo v letech 2021 a 2022 sebráno 1669 rostlin z 363 populací. Z každé populace byly nejčastěji sebráni 3 jedinci, ale počet se pohyboval od 1 do 10 kusů. Seznam jednotlivých lokalit a počet analyzovaných rostlin je uveden v Příloze 1. Na základě charakteristického vyhnutí měchýřků byla vymezena subsp. *cornuta* a na základě poléhavých a záhy kořenujících lodyh byla určena subsp. *procumbens*, které byly hodnoceny samostatně.

Pro pilotní morfometrickou analýzu měchýřků *C. palustris* bylo vybráno 11 populačních vzorků. Ploidie byla určena průtokovou cytometrií. Jednalo se o 9 tetraploidů a o 2 populace s vyšší ploidii. Bylo vybráno 15 znaků na měchýřkách, které byly zvoleny tak, aby popisovaly udávané rozdíly mezi rozlišovanými poddruhy subsp. *palustris* a subsp. *laeta*. Měřené znaky jsou vyznačené na Obr. 1 a zkratky jsou vysvětleny v Tab. 2.

3.2 Stanovení ploidní úrovně

Ze vzorků se odebraly čerstvé listy, které byly následně analyzovány metodou průtokové cytometrie (Suda 2005). V několika případech byla pokusně analyzována i semena s cílem odhalit případné nepravidelnost ve vývoji embrya a endospermu. Celkově bylo provedeno 536 analýz.

Jednotlivé rostliny nebo hromadné sdružené vzorky (nejčastěji tři jedinci, maximálně 10) byly nasekány společně s vnitřním standardem *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Jacq. v poměru 1:2 ve 400 µl pufru Otto I () pomocí ostré žiletky v Petriho misce a následně přefiltrovány přes nylonovou sítku 42 µm (textilie Uhelon 130T). Velikost jaderného genomu *Chlorophytum comosum* je 154,248 bp (Mun Yao et al. 2020). Po zhruba 10 minutách bylo do vzorku přidáno 800 µl pufru Otto II s fluorochromem DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol) (Doležel et al. 2007, Otto 1990). Konečná koncentrace DAPI tedy činila 4 µl/ml. Obarvené vzorky byly analyzovány pomocí přístroje CyFlowSpace (Sysmex-Partec), který je vybavený 365 nm UV-LED jako světelným zdrojem. Fluorescence byla obvykle zaznamenána pro 3000 částic. Histogramy byly vyhodnoceny pomocí FlowJo 10 (TREESTAR Inc.) nebo s pomocí balíku flowPloidy (Smith et al. 2018) v programu R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2020) v prostředí

R studio (RStudio Team 2020). Program R byl rovněž použit pro vizualizaci zjištěných poměrů vzorků a standardu formou histogramu a grafů Box Plot. Byly hodnoceny pouze analýzy, u kterých variační koeficienty (CV) vzorku i standardu byly pod 5 %.

3.3 Morfometrická analýza

Z každé rostliny byly oskenovány 3 měchýřky v rozlišení 300 dpi. V programu ImageJ, verze Java 1.8.0_172 bylo určeno 6 dobře definovaných bodů: báze (1), střed břišní strany (2), zlom v horní části břišní strany (3), vrchol (4), střed hřbetní strany (5), střed měchýřku (6). Souřadnice těchto bodů byly uloženy, převedeny na vzdálenosti a uloženy do Excelu. Další analýzy probíhaly v programu R, verze 4.0.4 s použitím balíku R funkcí MorphoTools2, verze 1.0.0 tutorial (Šlenker et al. 2022).

Nejdříve byly spočteny korelace mezi zjištěnými vzdálenostmi. Jelikož většina dat odpovídala normálnímu rozdělení, byl použit parametrický Pearsonův korelační koeficient. Přehled korelací znaků je uveden v Příloze 2. Z dvojic znaků, u kterých byla zjištěna extrémně silná korelace (korelační koeficienty větší než 0,9), byl vždy jeden vyřazen. Jednalo se o 6 znaků: BSDC, DDC, BPS, DHCT, DHC a HPS. Do statistických analýz tak bylo použito 9 z 15 znaků (viz Tab. 1)

S těmito 9 znaky byla provedena kanonická diskriminační analýza (CDA) pro zjištění, které znaky nejlépe oddělují tetraploidy od vyšší ploidie. Ze znaků, které vykazovaly největší rozdíly, byly pro srovnání rozdílů mezi zkoumanými taxony udělány box-ploty.



Obr. 1: Vyznačení bodů, mezi kterými byly spočítány vzdálenosti použité k morfologické analýze.

Tab. 2: Přehled měřených vzdáleností na měchýřkách. Kurzívou jsou označeny znaky, které byly vyřazeny z důvodu vysoké korelace s dalšími rozměry.

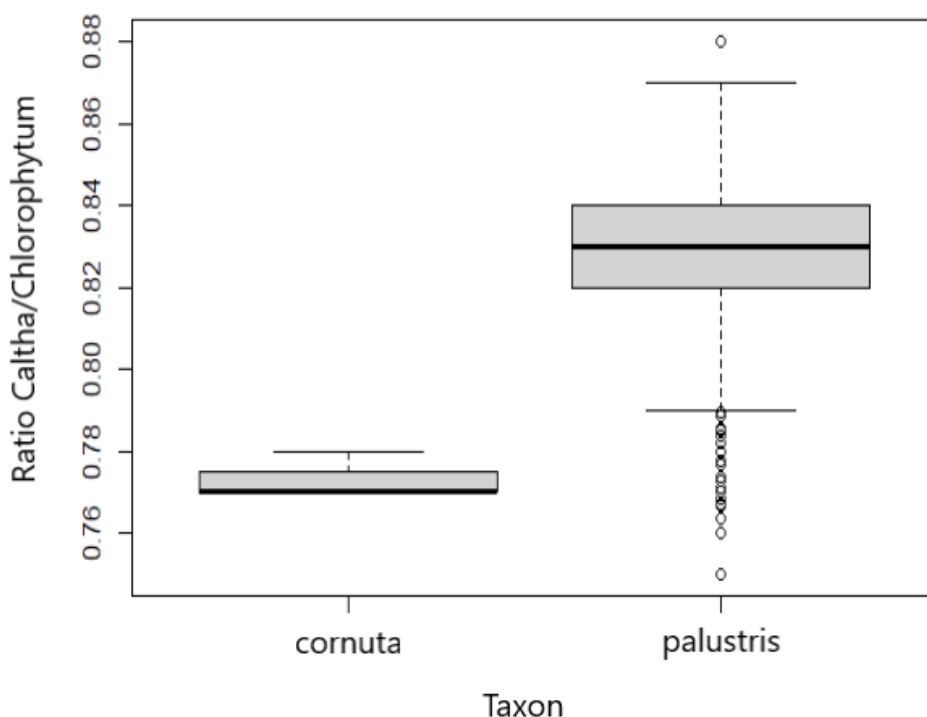
	zkratka	popis znaku
1--2	<i>BSDC</i>	<i>břišní strana dolní části měchýřku</i>
1--3	DTM	délka těla měchýřku
1--4	CDM	celková délka měchýřku
1--5	HSDC	hřbetní strana dolní části měchýřku
1--6	<i>DDC</i>	<i>délka dolní části měchýřku</i>
2--3	BSSC	břišní strana střední části měchýřku
2--4	BSHC	břišní strana horní části měchýřku
2--5	SM	šířka měchýřku
2--6	<i>BPS</i>	<i>břišní půlšířka</i>
3--4	BSZ	břišní strana zobánku
3--5	SZ	šířka zobánku na bázi
3--6	<i>DHCT</i>	<i>délka horní části těla měchýřku</i>
4--5	HS HC	hřbetní strana horní části měchýřku
4--6	<i>DHC</i>	<i>délka horní části měchýřku</i>
5--6	<i>HPS</i>	<i>hřbetní půlšířka</i>

4. Výsledky

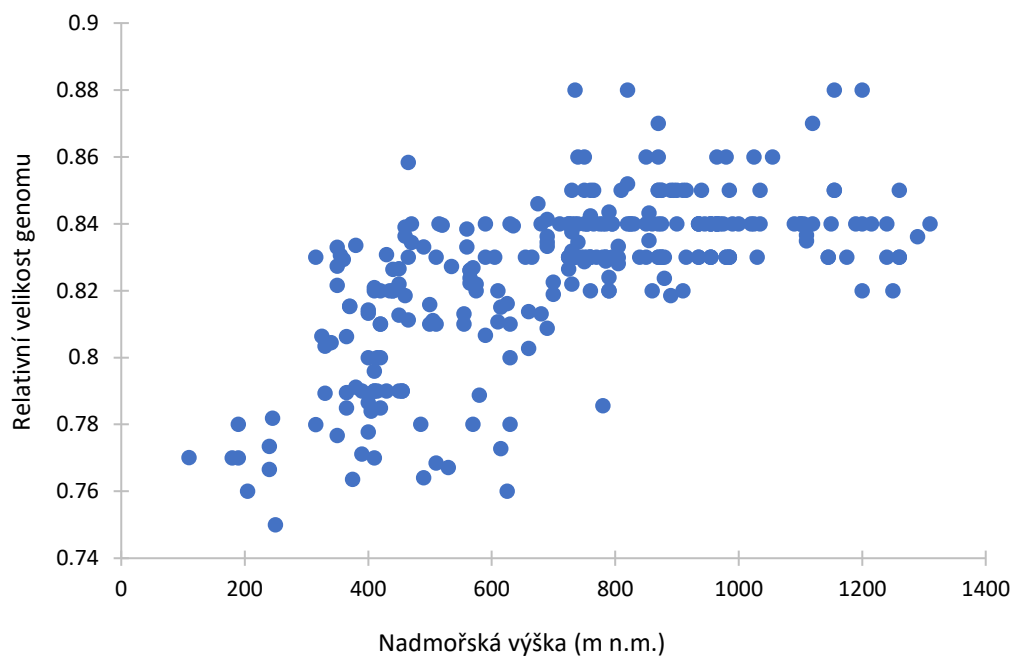
4.1 Průtoková cytometrie

Bylo zjištěno, že rod *Caltha* je vhodný materiál pro cytometrické analýzy a jejich kvalita byla až na výjimky velmi dobrá. Na základě zjištěného poměru vzorků a standardu lze většinu analyzovaných rostlin zařadit do dvou hlavních skupin, které se zjevně liší ploidní úrovní. Nižší ploidní úroveň se vztahuje na tetraploidy, vyšší ploidní stupeň odpovídá hepta nebo oktoploidům.

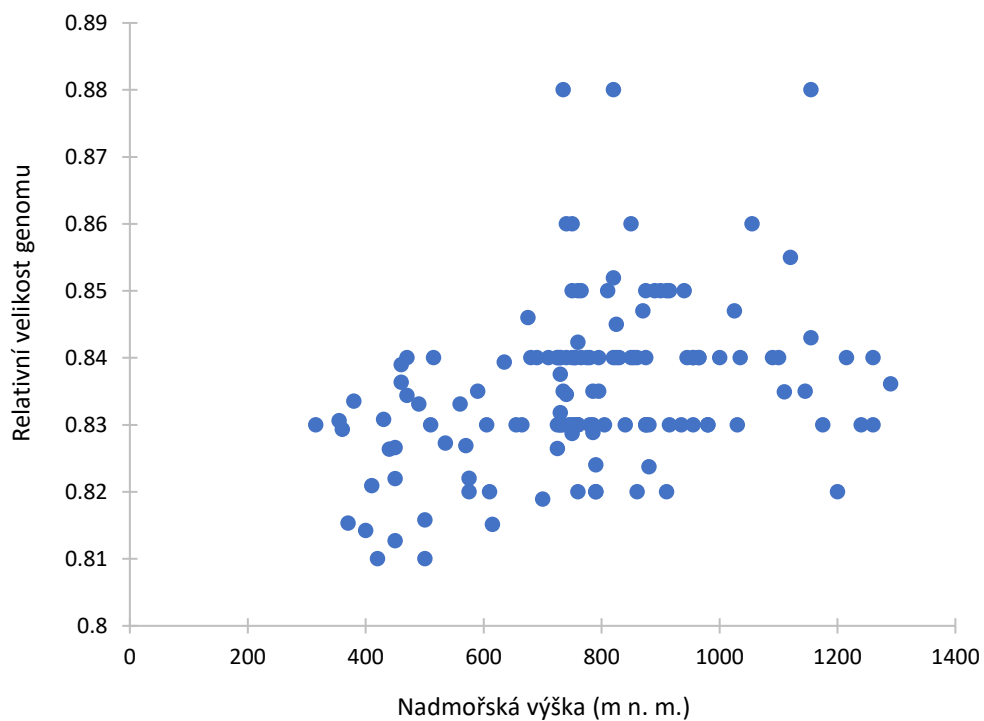
Při detailním pohledu na jednotlivé ploidní úrovně je patrná variabilita i v rámci těchto ploidí. Morfologicky definovaná subsp. *cornuta* má nejmenší genom (Obr. 2). Ostatní tetraploidní rostliny vykazují velkou variabilitu, mají zřejmou geografickou strukturu a jsou v korelaci s nadmořskou výškou (Obr. 3, 4). Vyšší velikost genomu byla zjištěna na Šumavě. Směrem k severu se velikost genomu zmenšuje. Rozdíly jsou tak velké, že rostliny z některých populací lze při společné analýze na průtokovém cytometru dobře rozlišit. První výsledky naznačovaly, že se rostliny ze Šumavy liší od rostlin z Českomoravské vrchoviny, se kterými byly srovnávány (Obr. 5). Ale poté, co byl zahuštěn sampling, je zjištěná velikost genomu studovaných tetraploidů víceméně kontinuální. I přesto, že histogram naznačuje dvě maxima (Obr. 6).



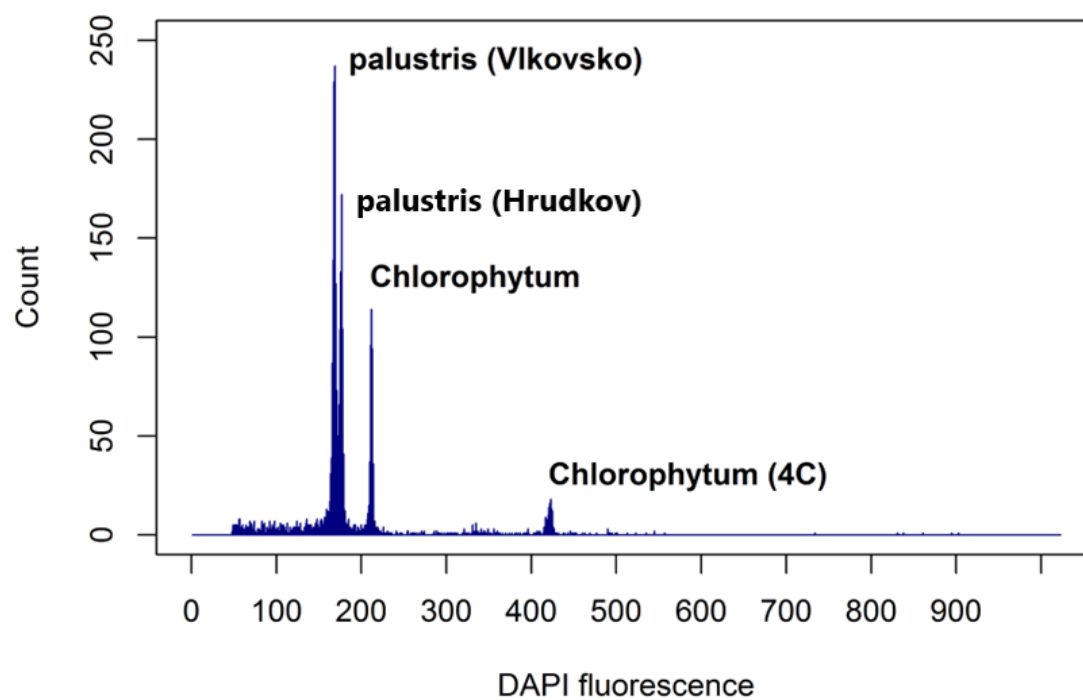
Obr. 2: Box-ploty znázorňující relativní velikost genomu u tetraploidů.



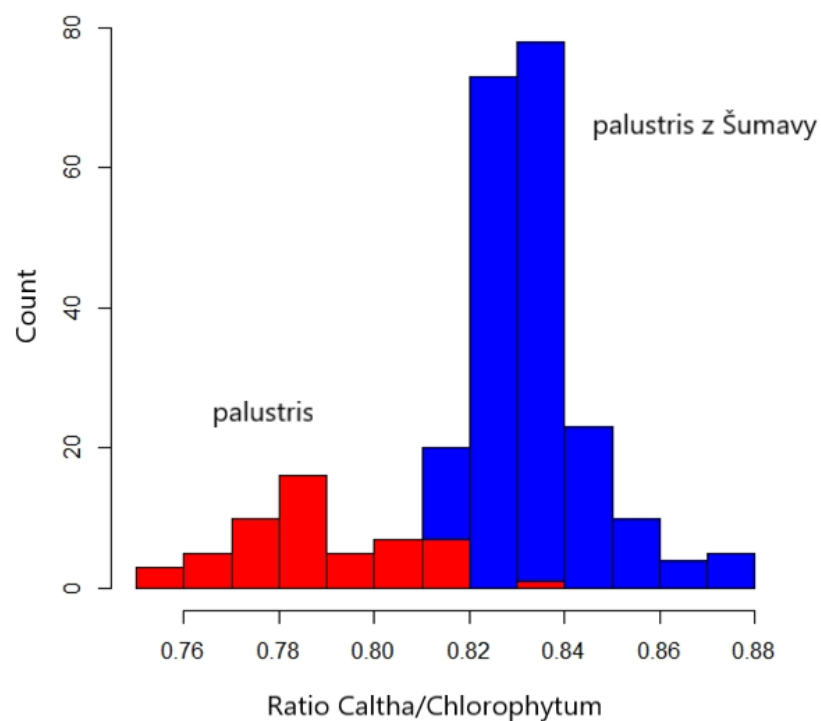
Obr.3: Závislost relativní velikosti genomu na nadmořské výšce u subsp. *palustris*.



Obr. 4: Závislost relativní velikosti genomu na nadmořské výšce u subsp. *palustris* z Šumavy.

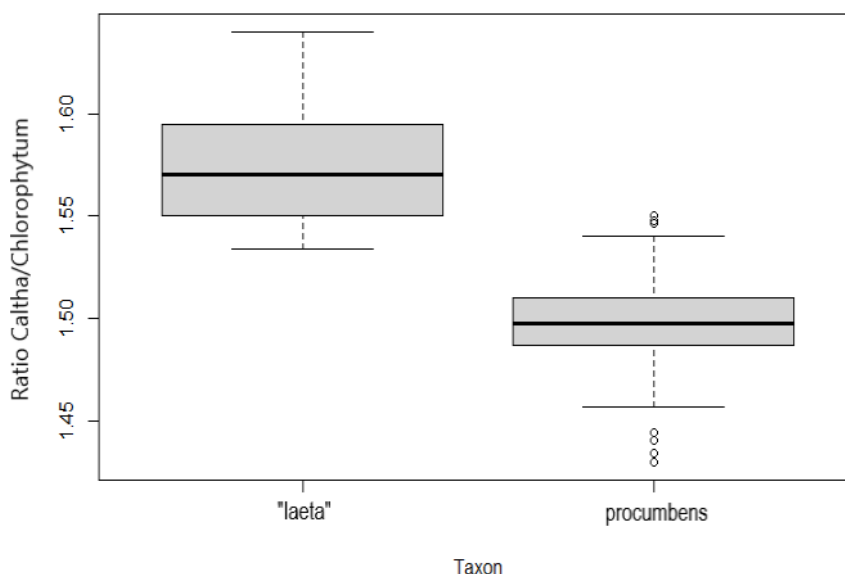


Obr. 5: Histogram fluorescence společné analýzy subsp. *palustris* z Vysočiny a Šumavy.

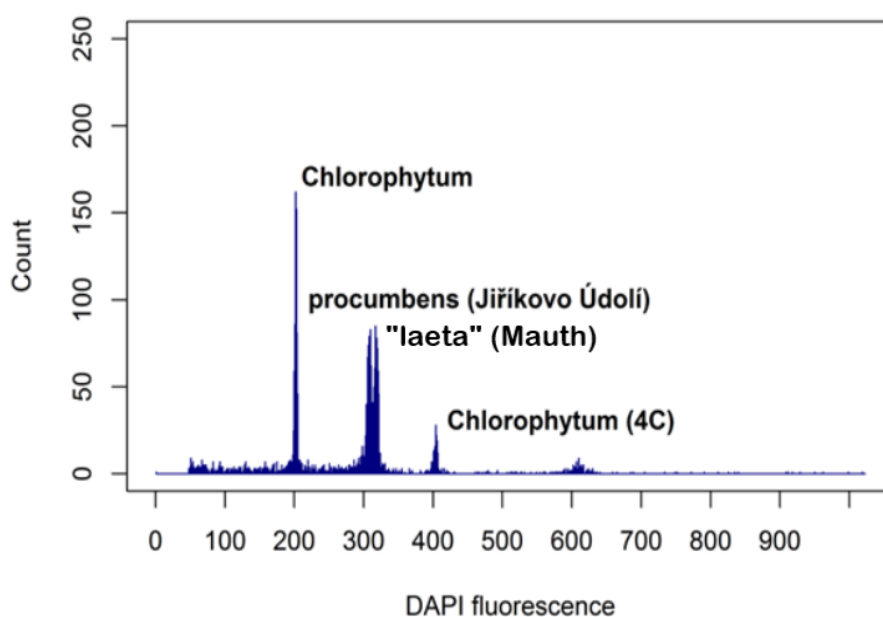


Obr. 6: Histogram relativní velikosti genomu subsp. *palustris*.

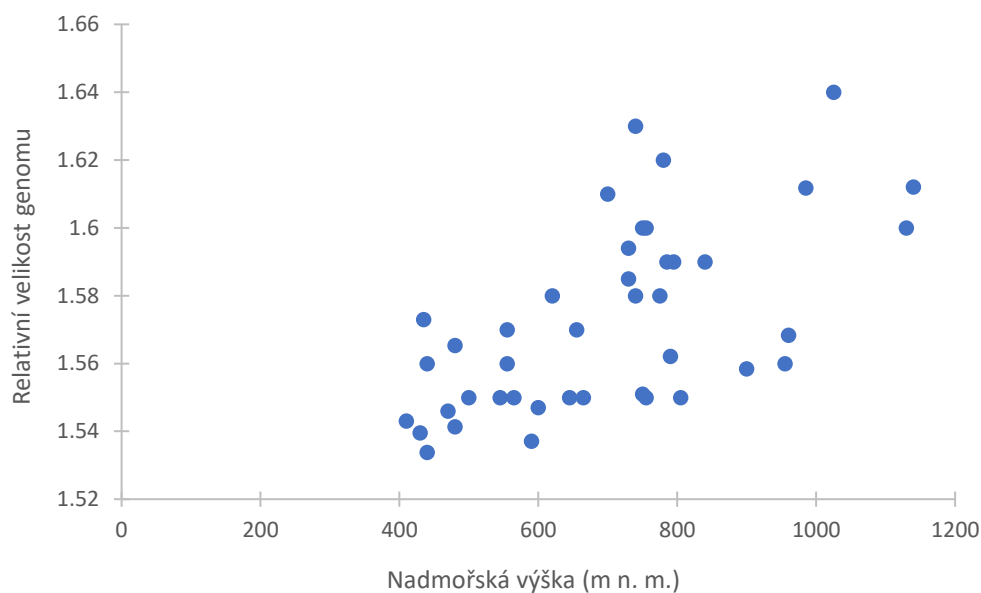
U vyšší ploidie je členění jednodušší. Morfologicky definovaná subsp. *procumbens* se liší od zbylých rostlin této ploidie (Obr. 7). Tyto rostliny jsou nadále označovány jako „*laeta*“ kvůli rozšíření, které částečně koreluje s udávaným výskytem subsp. *laeta*. Rozdíl mezi oběma typy lze u některých populací prokázat společnou analýzou (Obr. 8). Při vynesení závislosti velikosti genomu populací subsp. „*laeta*“ na nadmořské výšce lze opět pozorovat vzájemnou korelaci a trend ke zvětšování genomu s rostoucí nadmořskou výškou (Obr. 9).



Obr. 7: Box-ploty znázorňující velikost genomu u „*laeta*“ a *procumbens*.

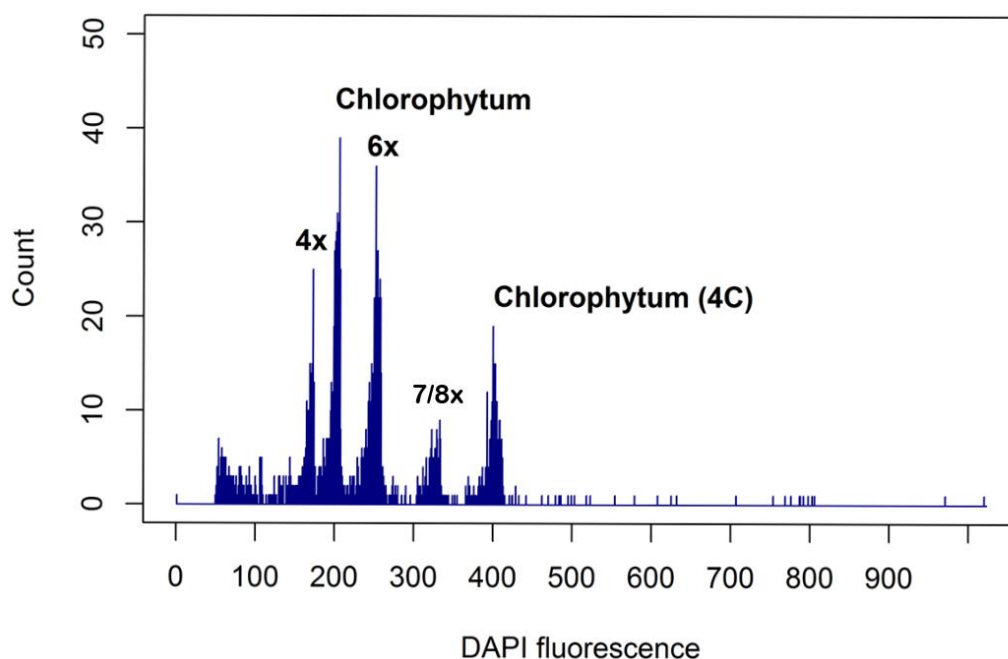


Obr. 8: Histogram fluorescence společné analýzy morfologicky odlišných poddruhů „*laeta*“ a *procumbens*.



Obr. 9: Závislost relativní velikosti genomu na nadmořské výšce u subsp. "*laeta*".

Vzácně byly zjištěny směsné populace tetraploidů a hepta/oktoploidů. Relativně častým případem v těchto populacích je výskyt potenciálních hybridů s hexaploidním počtem chromozómů (Obr. 10, viz Příloha 1). Ty byly však také zjištěny v nesmíšených populacích. Velikost genomu se ale liší od potenciálně hybridních. V oktoploidních populacích byly pak obdobně zjištěny vzácně rostliny odpovídající dodekaploidním rostlinám (viz Příloha 1).

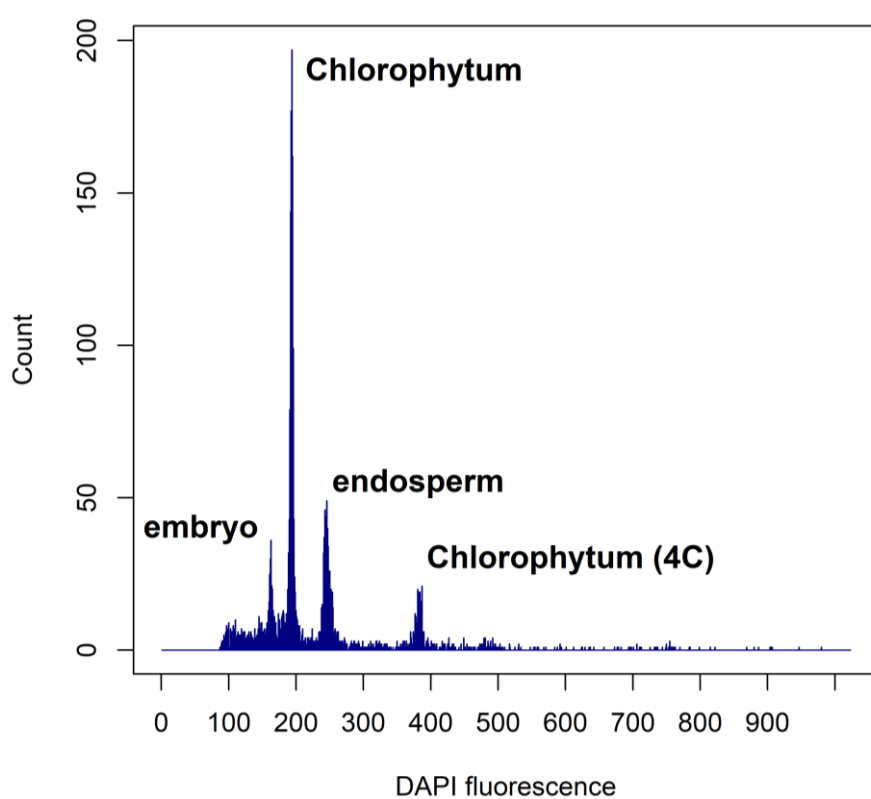


Obr. 10: Histogram fluorescence směšného vzorku obsahující tetraploidy a hepta/oktoploidy, a také hexaploidy.

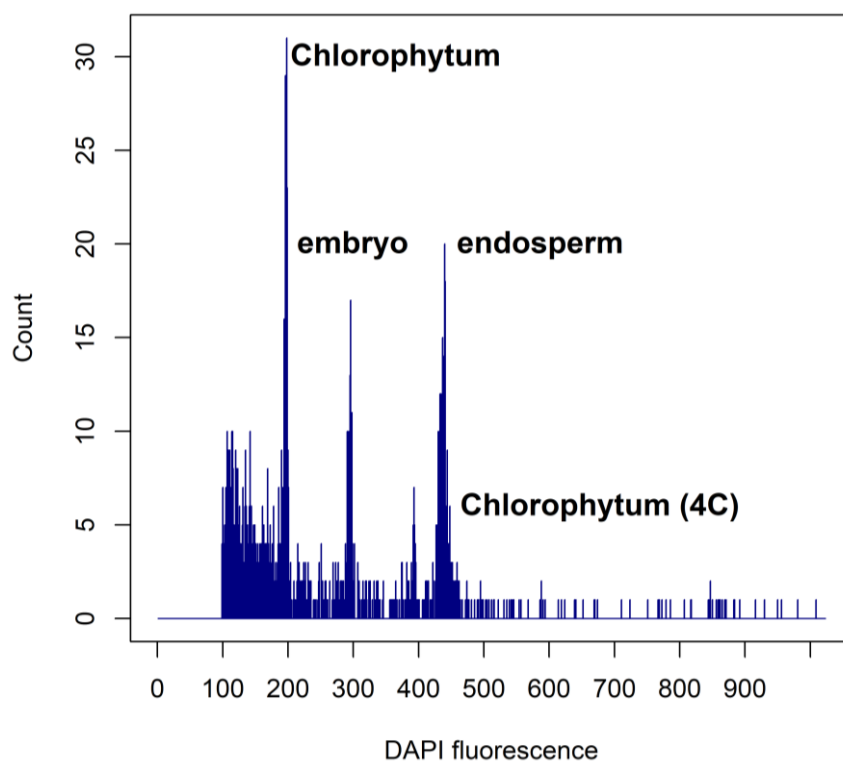
Nezřídka byly v populacích zjištěny rostliny, které se mírně odlišovaly od zjištěných převládajících cytotypů. S velkou pravděpodobností je lze považovat za aneuploidy (viz Příloha 1). Bohužel pro tyto jedince nejsou k dispozici žádné počty chromozomů.

4.1.1 Analýza semen

Pomocí průtokové cytometrie byla analyzovaná i semena z několika rostlin různých cytotypů. I přesto, že byl problém s malým množstvím buněk embrya, bylo zjištěno zřejmě diploidní embryo a normální vývoj triploidního endospermu (Obr. 11, 12).



Obr. 11: Histogram analýzy semen subsp. *palustris*.

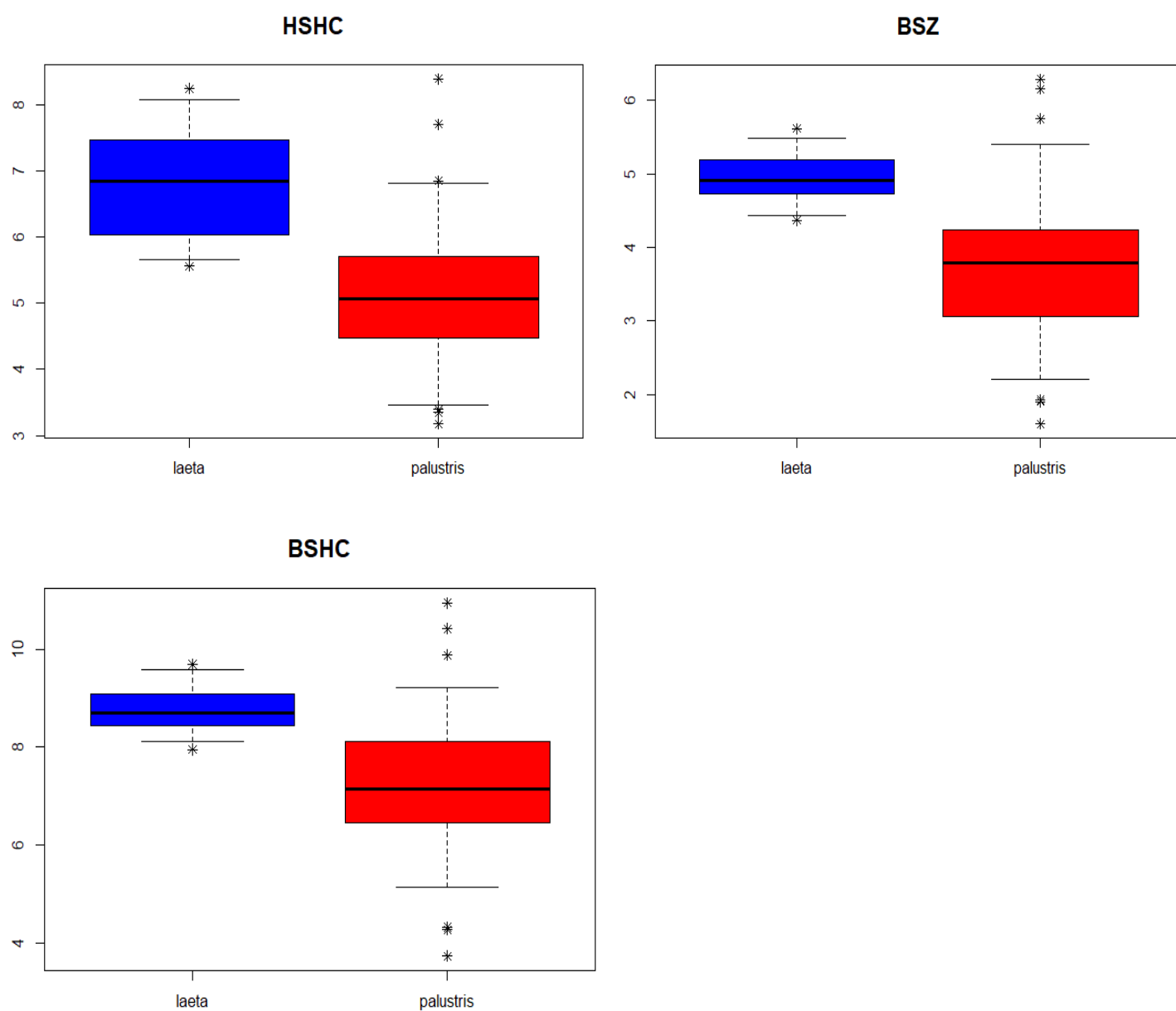


Obr. 12: Histogram analýzy semen u subsp. *procumbnes*.

4.2 Morfometrická analýza

4.2.1 Box-plots

Z jednotlivých naměřených vzdáleností na měchýřkách byl spočítán aritmetický průměr a udělány box-ploty (Obr. 13). Z nich lze vyvozovat, že rozdíly mezi rostlinami různých ploidií existují. Zdá se, že vyšší ploidie se od tetraploidů výrazně liší v těchto znacích: hřbetní strana horní části měchýřku (HSHC), břišní strana zobánku (BSZ) a břišní strana horní části měchýřku (BSHC).

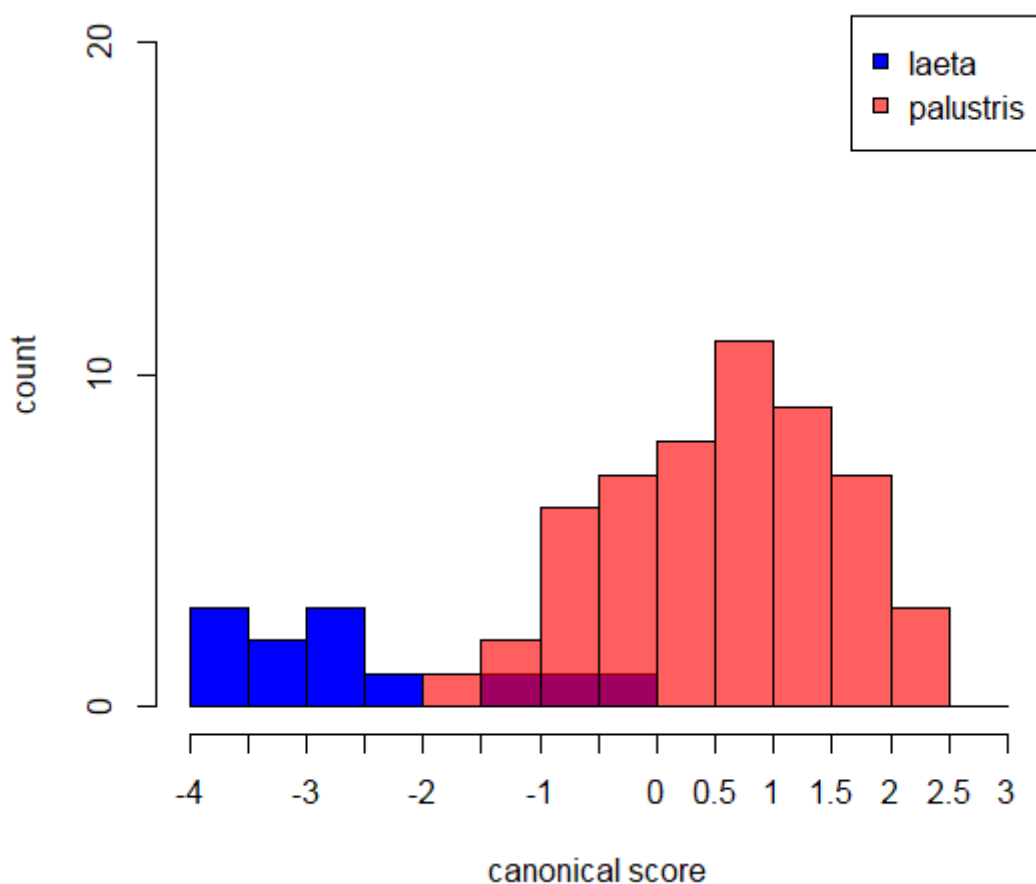


Obr. 13: Box-ploty třech znaků HSHC, BSZ a BSHC, které nejvíce odlišují studované taxony.

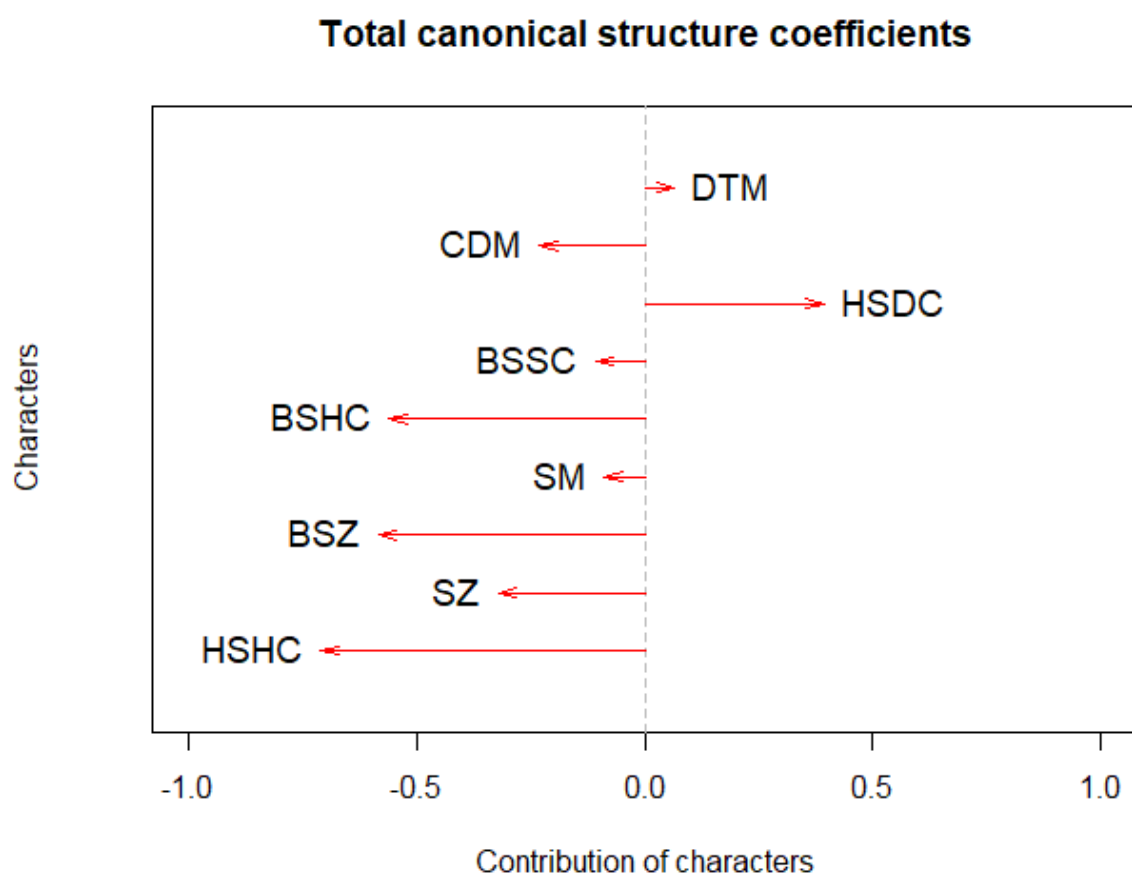
4.2.2 Kanonická diskriminační analýza

Diskriminační analýzou bylo testováno, zda je možné odlišit subsp. *palustris* (tetraploid) od subsp. "*laeta*" (vyšší ploidie) na základě tvaru měchýřků, a které znaky k tomuto oddělení nejvíce přispívají.

Z diskriminační analýzy vyplývá, že se většina rostlin vyšší ploidie odděluje podle diskriminační osy od tetraploidů (Obr. 14). Mezi nejvýznamnější znaky, které nejvíce přispívají k oddělení populací poddruhu "*laeta*" a *palustris* patří délka hřbetní strany horní části měchýřku (HSHC), břišní strany zobánku (BSZ) a břišní strany horní části měchýřku (BSHC) (Obr. 15). Zjištěné strukturní koeficienty jsou uvedeny v Tab. 3.



Obr. 14: Kanonická diskriminační analýza tetraploidů a hepta/oktoploidů.



Obr. 15: CDA 9 studovaných znaků (vyřazeny byly korelované znaky).

Tab. 3: Celkové strukturní koeficienty diskriminační funkce.

Znak	Celkové struk. koef.
	OSA1
HSDC	0,39253008
HSHC	-0,71130754
BSZ	-0,58416026
BSHC	-0,56128859
CDM	-0,23141117
SM	-0,08938908
SZ	-0,32055684
DTM	0,06312680
BSSC	-0,10895310

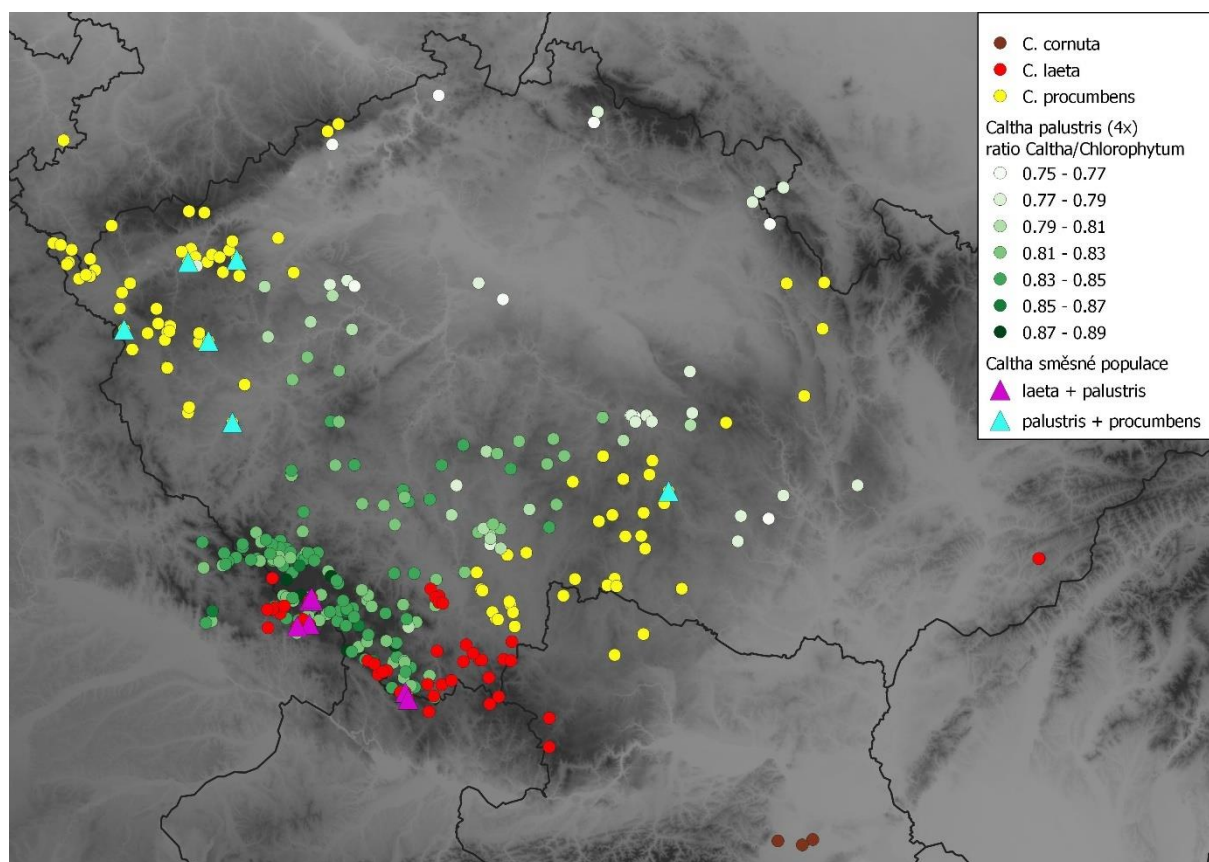
4.3 Rozšíření cytotypů

Bylo zjištěno, že rozšíření rozlišených morfologických taxonů a rozlišených cytotypů se velmi málo překrývá. Výskyt poddruhu subsp. *procumbens* byl zaznamenán v jižní části Třeboňské pánve, v jižní a střední části Českomoravské vrchoviny a jednotlivé výskyty byly zjištěny až do Orlických hor. Také se jedná o dominantní typ v západních Čechách včetně Krušných hor a Slavkovského lesa.

Nekořenící oktoploidní taxon ("subsp. *laeta*") byl nalezen na jihu Budějovické pánve, ve Vyšebrodském průsmyku, Novohradských horách, Freiwaldu, na jižních svazích Šumavy a jejím bavorském úpatí. Izolovaný výskyt byl zjištěn u Luhačovic v Karpatech.

Mimo tato území je rozšířen tetraploidní cytotyp, který je značně variabilní a byl u něj zjištěn gradient ve velikosti genomu (obr. 16). Je patrné, že rostliny ze Šumavy a jižní části Čech mají poněkud větší velikost genomu než ve zbytku území (např. Českomoravská vrchovina, Třeboňsko, Tábořsko, Jizerské hory, Děčínsko a další).

Několik analyzovaných vzorků z okolí Vídně odpovídalo morfologicky poddruhu subsp. *cornuta*.



Obr. 16: Lokality studovaných taxonů *C. palustris*. Cytotypy byly určeny průtokovou cytometrií.

5. Diskuze

5.1 Cytotypy a jejich rozšíření

I přesto, že nebyly počítány chromozomy, zjištěné dominantní cytotypy s vysokou pravděpodobností odpovídají v literatuře uváděným chromozomovým počtům 32 a 56 (Rice et al. 2015). Dosavadní autoři zjišťovali somatické počty chromozomů pomocí roztakových preparátů buněk kořenových špiček (Kootin-Sanwu et Woodell 1971). Zde byla k tomuto využita rychlejší metoda umožňující určit ploidii u velkého množství rostlin, a to průtoková cytometrie. Ta doposud nebyla použita u druhu *Caltha palustris*, ale v Severní Americe ji využil Wefferling (2017) u druhu *Caltha leptosepala*.

Zjištěné rozšíření subsp. *procumbens* ($2n=56$) odpovídá z velké části dřívějším pracím Chrtková (1988), Chrtková et Jarolímová (1999) a Chrtek et Křísa (1967). Výskyt u tohoto poddruhu byl prokázán v Krušných horách, Slavkovském lese, na Českomoravské vrchovině a v Orlických horách.

Cytotyp $2n=56$, který nekořenil z uzlin, byl nalezen v jižní části Čech. V některých těchto území jako Šumava či Blanský les uvádí Chrtková (1988) a Chrtková et Jarolímová (1999) výskyt poddruhu *laeta*, který má 32 chromozomů. Jelikož tvar měchýřků u cytotypu $2n=56$ celkem odpovídá popisu poddruhu *laeta*, je tento taxon takto provizorně označen, i když neodpovídá ploidní úrovni. Tento typ byl dále nalezen v Karpatech, odkud Chrtková et Jarolímová (1999) také uvádí subsp. *laeta* ale s 56 chromosomy.

Poddruh *cornuta* nebyl z ČR získán. Podle Chrtkové (1988) roste pouze na jihu Moravy. Bohužel z této oblasti se mi nepodařilo získat vzorky, takže tento údaj zatím nelze ověřit.

V rámci ploidii byla zjištěna značná variabilita a určité rozdíly mezi taxony, ale jedná se do značné míry o kontinuum a taxony nejsou jednoznačně odlišeny. U tetraploidů je rozdíl sice naznačen, ale vzorků subsp. *cornuta* a subsp. *palustris* mimo Šumavu je relativně málo. Pro dokončení studie je třeba doplnit vzorky z dalších regionů a vyváženě pokrýt i nadmořskou výšku.

Zjištěný trend rostoucí velikosti genomu s rostoucí nadmořskou výškou je poměrně překvapivý, protože velikost genomu je obecně považována za poměrně stabilní charakteristiku taxonů. Na druhou stranu je však známo několik faktorů, které jsou příčinou variability genomu u některých rostlin (Šmarda et Bureš 2010).

Kontaktní zóny cytotypů jsou překvapivě ostré a asi málo promíchané. I přesto se podařilo najít několik smíšených populací (viz. např. Knížecí Pláně). Jedná se však o poměrně vzácné případy. V těchto populacích se často vyskytovali hexaploidi, kteří patrně vznikají samovolně. Taktéž byli detekováni pravděpodobní aneuploidi. Smíšené populace byly nalezeny více autory. Wcislo (1964) objevila lokalitu blízko Krakowa, kde rostl cytotyp $2n=32$ společně s cytotypem $2n=56$. Taktéž Kootin-Sanwu et Woodell (1971) uvádí v Anglii smíšené populace. Na území, kde rostl typ s 56 chromozomy, byly objeveny rostliny s $2n=57$, $2n=58$, a $2n=60$. Jedná se pravděpodobně o aneuploidy.

5.2 Analýza semen

Průtoková cytometrie byla také použita ke stanovení reprodukčního způsobu na základě určení ploidie embrya a endospermu u zralých semen. Předběžné výsledky však byly zkomplikovány malým množstvím jader a suchými semeny. Zdá se, že velkým problémem je skutečnost, že u nenaklíčených semen je výrazně nedovinité embryo. Jedna z hlavních příčin je zřejmě morfofyziologická dormance semen (Forbis et Diggle 2001). Z těchto důvodů jsou v analýzách zpravidla špatně zastoupena diploidní pletiva. Lepší výsledky dávalo používání čerstvých semen. Na několika analýzách u různých taxonů bylo zjištěno, že embryo je diploidní a endosperm je triploidní (Obr. 10, 11). Z toho vyplývá, že rostliny vytváří embryo i endosperm zpravidla bez odchylek. Pravidelný vývoj a zřejmě regulární rozchod chromozomů do gamet nasvědčuje, že rostlina s chromozomovým počtem 56 by mohla být spíše oktoploid se základním chromozomovým číslem 7 (Kootin-Sanwu 1963). Heptaploid je tedy méně pravděpodobný, protože u něho by bylo možno předpokládat spíše tvorbu chromozomově variabilních gamet.

5.3 Morfometrická analýza

Hlavním problémem morfologických analýz byl malý počet populací (především u vyšší ploidie), takže data nejsou robustní. Je nezbytné na ně takto pohlížet. Dá se však přesto konstatovat, že zjištěné rozdíly naznačují, že rozlišené cytotypy jsou potenciálně dobře odlišeny i morfologicky.

Studie této bakalářské práce se zaměřila na morfologii měchýřků a byl sledován typ lodyhy. Další morfologické znaky jako velikost a tvar přizemních listů nebyl zatím hodnocen.

Morfologie stonku u subsp. *procumbens* se sice speciálně nehodnotila, ale u všech sbíraných populací byl pozorován kořenící typ lodyhy. Tento znak byl sledován řadou autorů (Miller 1768, Forster 1805, Hultén 1968, Smit 1973, Kootin-Sanwu et Woodell 1971). Naproti tomu Cieślak (2004) uvádí, že subsp. *radicans* (syn. subsp. *procumbens*) nemusí vždy kořenit z uzlin. To potvrzuje i Chrtková et Jarolímová (1999). Dále bylo zjištěno, že měchýřků je u tohoto taxonu obvykle málo a často se nevyvíjí pořádně, což činí problém při měření semen. Jejich tvar nebyl v tomto případě morfometricky hodnocen.

Poddruh "*laeta*" má v mé studii břišní stranu zobánku a hřbetní stranu horní části měchýřku delší než taxon *palustris*. Cieślak (2004) hodnotí poddruh *laeta* na úrovni druhu a uvádí, že zralé měchýřky jsou rovné a přikloněné k sobě, náhle zúžené do krátkého zobánku. Zobánek je víceméně rovný.

6. Závěr

Literární rešerše zhodnotila uváděnou variabilitu druhu *C. palustris* a hodnotí také různé taxonomické přístupy. I přesto, že se v minulém století cytologií a morfologií tohoto druhu zabývala řada autorů, novodobých studií této problematiky je velice málo. Dosud žádné členění komplexu *C. palustris* nebylo široce akceptováno.

Průtokové cytometrie odlišila dvě dominantní skupiny cytotypů. Jedná se o široce rozšířené tetraploidy a o vyšší ploidii s nejistým základním chromozomovým číslem. Ovšem z předběžných analýz zralých semen a výskytu rostlin, které by odpovídaly euploidnímu počtu $3n$ možno předpokládat, že by se spíše mohlo jednat o oktoploidy.

U tetraploidů byla zjištěna variabilita ve velikosti genomu korelující s geografickým rozšířením a nadmořskou výškou. U hepta/oktoploidů byly rozlišeny dva morfologické typy s mírným rozdílem ve velikosti genomu a odlišným rozšířením. Také bylo zjištěno, že se cytotypy téměř regionálně nemíchají.

Uváděný poddruh subsp. *laeta* není zatím jasně ztotožnitelný s žádným rozlišeným cytotypem a k objasnění jeho identity je potřeba další studium.

Výsledky morfologické studie na měchýřkách nejsou dostatečně průkazné především pro malý počet zkoumaných populací. Na získaná data je potřeba tedy pohlížet jako na pilotní studii a pro získání robustních morfologických dat je třeba provést rozsáhlejší výzkum. Nicméně se zdá, že ve tvaru měchýřků lze mezi taxony různých ploidních úrovní najít rozdíly a bude je snad možno použít k morfologickému rozlišování cytotypů v budoucnu.

7. Citovaná literatura

- BASKIN J. M. et BASKIN C. C. (2004): A classification system for seed dormancy. *Seed science research*, Vol. 14, No. 1, 1-16.
- BECK G. (1886): Versuch einer Gliederung des Formenkreises der *Caltha palustris* L. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien*, Vol. 36, 347–352.
- BLAGOJEVIĆ J., JOVANOVIĆ V., ADNAĐEVIĆ T., BUDINSKI I. et VUJOŠEVIĆ M. (2013): Chromosome status of marsh marigold, *Caltha palustris* L. (*Ranunculaceae*) from Serbia. *Genetika*, Vol. 45, No. 3, 793–798.
- BURKILL I. H. (1895): On some variations in the number of stamens and carpels. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Vol. 31, No. 214, 216–245.
- CIEŚLAK E., ILNICKI T. et FLIS M. (2000): Cytotaxonomical studies on the *Caltha palustris* complex (*Ranunculaceae*) in Poland: preliminary report. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, Vol. 42, No. 1, 121–129.
- CIEŚLAK E. (2004) Morphological variability of the *Caltha palustris* L. complex [*Ranunculaceae*] in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, Vol. 73, No. 3, 193–201.
- COSSARD G., SANNIER J., SAUQUET H., DAMERVAL C., DE CRAENE L. R., JABBOUR F. et NADOT S. (2016): Subfamilial and tribal relationships of *Ranunculaceae*: evidence from eight molecular markers. *Plant Systematics and Evolution*, Vol. 302, No. 4, 419–431.
- DAHL A. O. et ROWLEY J. R. (1956): The cytology of *Caltha* L. *Journal of the Minnesota Academy of Science*, Vol. 24, No. 1, 30–36.
- DE CANDOLLE A. P. (1818): Regni vegetabilis Systema naturale, Sive ordines, genera et species plantarum secundum methodi naturalis normas digestarum et descriptarum, Sistens Prolegomena et Ordines quinque nempe *Ranunculaceas*, *Dilleniaceas*, *Magnoliaceas*, *Anonaceas*, et *Menispermicas*. Vol. 1, 307–311. – sumptibus sociorum Treuttel et Würtz.
- DOLEŽEL J., GREILHUBER J. et SUDA J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, Vol. 2, No. 9, 2233–2244.
- EURO+MED (2006-): Euro+Med PlantBase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. [cit. 17. 11. 2022]. <<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>>
- FISCHER M. A., OSWALD K. et ADLER W. (2008): Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. Land Oberösterreich. Ed. 3, 227. – Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, Linz.
- FORBIS T. A. et DIGGLE P. K. (2001): Subnivean embryo development in the alpine herb *Caltha leptosepala* (*Ranunculaceae*). *Canadian Journal of Botany*, Vol. 79, No. 5, 635–642.
- FORSTER T. F. (1807): Account of a new British Species of *Caltha*. *Transactions of the Linnean Society of London*, Vol. 8, No. 9, 323–324.
- FUTÁK J., BERTOVIČ L., HLAVAČEK A., HOSTIČKA M., CHRTEK J., JASIČOVÁ M., KMEŤOVÁ E., KŘÍSA B., OSVAČILOVÁ V., ZAHRADNÍKOVÁ K. et ZELENÝ V. (1982): Flóra Slovenska. Vol. 3, 31–36. – Veda, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied.

- GOULET B. E., RODA F. et HOPKIN R. (2017): Hybridization in Plants: Old Ideas, New Techniques. *Plant Physiology*, Vol. 173, No. 1, 65–78.
- HARMS V. L. (1978) The White Floating Marsh Marigold, *Caltha natans*, in Saskatchewan. *Blue Jay*, Vol. 36, No. 4, 186–188.
- HE J., LYU R., LUO Y., XIAO J., XIE L., WEN J., LI W., PEI L. et CHENG J. (2022): A phylotranscriptome study using silica gel-dried leaf tissues produces an updated robust phylogeny of Ranunculaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 174, No. 9, 1–16.
- HEGI G. (1912): Illustrierte flora von Mitteleuropa: Mit besonderer berücksichtigung von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz. Zum gebrauch in den schulen und zum selbstunterricht. Vol. 3, 457–459. – J. F. Lehmann's Verlag, München.
- HILL A. W. (1918): The Genus *Caltha* in the Southern Hemisphere. *Annals of Botany*, Vol. 32, No. 127, 421–435.
- HULTÉN E. (1968): Flora of Alaska and Neighboring Territories: A Manual of the Vascular Plants, 451–454. – Stanford University Press, Stanford California.
- CHENG J. et XIE L. (2014): Molecular phylogeny and historical biogeography of *Caltha* (Ranunculaceae) based on analyses of multiple nuclear and plastid sequences. *Journal of Systematics and Evolution*, Vol. 52, No. 1, 51–67.
- CHRTEK J. et KŘÍSA B. (1967): Poznámky k rozšíření *Caltha palustris* L. subsp. *procumbens* (Beck) Neumayer v území Východních Sudet. *Acta Musei Silesiae series A*, Vol. 16, 53–55.
- CHRTKOVÁ A. (1988): 1. *Caltha* L. – blatouch. – In: HEJNÝ S. et SLAVÍK B. (eds.), Květena České socialistické republiky, Vol. 1, 366–371. – Academia, Praha.
- CHRTKOVÁ A. et JAROLÍMOVÁ V. (1999): Cytotaxonomical study of *Caltha palustris*. *Preslia*, Vol. 71, No. 4, 349–360.
- JENSEN U., HOOT S. B., JOHANSSON J. T. et KOSUGE K. (1995): Systematics and phylogeny of the Ranunculaceae – a revised family concept on the basis of molecular data. – In: JENSEN U. et KADEREIT J. W. (eds.), Systematics and Evolution of the Ranunculiflorae. Vol. 9, 273–280. – Springer-Verlag, Wien.
- JONES R. N. (1995): B chromosomes in plants. *New Phytologist*, Vol. 131, No. 4, 411–434.
- JOHNSON A. W. et PACKER J. G. (1968): Chromosome numbers in the flora of N. W. Alaska. *Botaniska Notiser*, Vol. 121, No. 3, 422.
- KAPLAN Z., DANIHELKA J., CHRTEK J. jun., KIRSCHNER J., KUBÁT K., ŠTECH M. et ŠTĚPÁNEK J. (eds) (2019): Klíč ke květeně České republiky [Key to the flora of the Czech Republic]. Ed. 2, 361–362. – Academia, Praha.
- KOOTIN-SANWU M. (1963): Cytology and distribution of *Caltha*. *Botanical Society of the British Isles*, Vol. 5, 377–378.
- KOOTIN-SANWU M. et WOODDELL S. R. J. (1971): The cytology of *Caltha palustris*: Cytogenetic relationships. *Heredity*, Vol. 26, No. 1, 121–135.
- KUMAR P. et SINGHAL V. K. (2008): Cytology of *Caltha palustris* L. (Ranunculaceae) from Cold Regions of Western Himalayas. *Cytologia*, Vol. 73, No. 2, 137–143.

- KUMAR M., PAUL Y. et ANAND V. K. (2009): An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants used by the Locals in Kishtwar, Jammu and Kashmir, India. *Ethnobotanical Leaflets*, Vol. 13, No. 10, 1240–1256.
- LEONCINI M. L. (1951): Biotipi Cariologici e Sistematici di *Caltha* in Italia. *Caryologia*, Vol. 3, No. 3, 336–350.
- LEONCINI M. L. (1952): Nuove Osservazioni Cariologiche Sul Genere *Caltha*. *Caryologia*, Vol. 4, No. 3, 367–371.
- LIACH V., KONECHNA R., MYLYANYCH A., ZHURAKHIVSKA L., HUBYTSKA I. et NOVIKOV V. (2020): *Caltha palustris*. Analytical overview. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, Vol. 24, No. 2, 51–56.
- MARSHALL E. S. (1906): Report for 1905. *The Botanical Exchange Club and Society of the British Isles*, 152–153.
- MAUGINI E. (1953): Contributo alla conoscenza cariologica e sistematica de genere *Caltha* in Italia. *Caryologia*, Vol. 5, No. 3, 297–305.
- MAUGINI E. (1957): Ricerche Cito-Sistematiche Sul Genere *Caltha* in Italia. *Caryologia*, Vol. 9, No. 3, 408–435.
- MILLER P. (1768): The Gardeners Dictionary: Containing the Best and Newest Methods of Cultivating and Improving the Kitchen, Fruit, Flower Garden, and Nursery; as Also for Performing the Practical Parts of Agriculture. Ed. 8, CAL–CAM. – London.
- MUNYAO J. N., DONG X., YANG J. X., MBANDI E. M., WANGA V. O., OULO M. A., SAINA J. K., MUSILI P. L. et HU G. W. (2020): Complete Chloroplast Genomes of *Chlorophytum comosum* and *Chlorophytum gallabatense*: Genome Structures, Comparative and Phylogenetic Analysis. *Plants*, Vol. 9, No. 3, 296.
- MÜLLER F., RITZ C. M., WELK E. et WESCHE K. (eds.) (2021): Rothmaler – Exkursionsflora von Deutschland: Gefäßpflanzen: Grundband. Ed. 22, 324. – Springer Spektrum, Heidelberger etc.
- OTTO F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. – In: *Methods in cell biology*. Vol. 33, 105–110. – Academic Press.
- PATOČKA K. (1963): Českosloveské taxony rodu *Caltha*. Diplomová práce, 1-111. – Přírodovědecká fakulta KU, katedra botaniky [non vidi].
- PRAEGER R. L. (1934): *Caltha radicans* in Ireland. *The Irish Naturalists Journal*, Vol. 5, No. 5, 98–102.
- REESE G. (1954): Euploidie, Aneuploidie und B-Chromosomen bei *Caltha palustris* L. *Planta*, Vol. 44, 203–268.
- RICE et al. (2015): The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist*, Vol. 206, No. 1, 19–26.
<<http://ccdb.tau.ac.il/Angiosperms/Ranunculaceae/Caltha/>>
- RStudio Team (2020): RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC. Boston, MA.
<<http://www.rstudio.com/>>.

- SCHOTT H., C. F. NYMAN et TH. KOTSCHY (1854): *Analecta Botanica*. Ed. 2, Vol. 1, 31–33. – Vindobonae, Typis C. Gerold.
- SLAVÍKOVÁ Z. (1971): Beitrag zur Morphologie der Blütenhülle von *Caltha palustris* L. *Novit. Bot. Prag.*, 17–19.
- SMIT P. G. (1967): Taxonomical and ecological studies in *Caltha palustris* L. I (preliminary report). *Mededelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijksuniversiteit te Utrecht*, Vol. 278, No. 1, 500–510.
- SMIT P. G. (1968): Taxonomical and ecological studies in *Caltha palustris* L. II. *Mededelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijksuniversiteit te Utrecht*, Vol. 311, No. 1, 280–292.
- SMIT P. G. (1973): A revision of *Caltha* (Ranunculaceae). *Blumea*, Vol. 21, No. 1, 119–150.
- SMIT P. G. et PUNT W. J. (1969): Taxonomy and pollen morphology of the *Caltha leptosepala* complex. *Mededelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijksuniversiteit te Utrecht*, Vol. 312, No. 1, 16–27.
- SMITH T. W., KRON P. et MARTIN S. L. (2018): flowPloidy: An R package for genome size and ploidy assessment of flow cytometry data. *Applications in Plant Sciences*, Vol. 6, No. 7, e01164.
- STEVENS P. F. (2022): Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [cit. 4. 9. 2022]. <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>
- SUDA J. (2005): Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, Vol. 53, No. 1, 46–48.
- ŠLENKER M., KOUTECKÝ P. et MARHOLD K. (2022): MorphoTools2: an R package for multivariate morphometric analysis. *Bioinformatics*, Vol. 38, No. 10, 2954–2955.
- ŠMARDA P. et BUREŠ P. (2010): Understanding intraspecific variation in genome size in plants. *Preslia*, Vol. 82, No. 1, 41–61.
- TAMURA M. (1993): *Ranunculaceae*. – In: KUBITZKI K., ROHWER J. G. et BITTRICH V. (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants: Flowering Plants· Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families*. Vol. 2, 563–573. – Springer-Verlag, Berlin.
- TAMURA M. (1997): Taxonomic studies of the *Ranunculaceae*: retrospect and prospect. *Memoirs of the School of Biology-Oriented Science and Technology of Kinki University*, No. 2, 69–85.
- TUTIN T. G., HEYWOOD V., BURGESS A., VALENTINE D. H., WALTERS S. M. et WEBB D. (1964): *Flora Europaea: Lycopodiaceae to Platanaceae*. Vol. 1, 211. – Cambridge University Press, London.
- WANG L. Y., REN C. et YANG Q. E. (2013): Cytology of two species in the genus *Caltha* (*Ranunculaceae*) from China. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, Vol. 21, No. 1, 21–28.
- WANG G. Y., ZHOU N., QIAN M., ZHANG C. et YANG Y. (2019): Cytogeography of *Caltha palustris* (*Ranunculaceae*) from China. *Guangxi Zhiwu/Guihaia*, Vol. 39, No. 9, 1191–1200.
- WCISŁO H. (1964): Experimental hybrids in the genus *Caltha* L. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, Vol. 7, 185–189.

- WCISŁO H. (1967): Karyological studies in *Caltha palustris* L. s. l. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, Vol. 10, No. 1, 1–23.
- WCISŁO H. (1968): Further studies on experimental hybrids in *Caltha palustris* L. s. l. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, Vol. 11, No. 2, 87–103.
- WEFFERLING K. M., CASTRO S., LOUREIRO J., CASTRO M., TAVARES D. et HOOT S. B. (2017): Cytogeography of the subalpine marsh marigold polyploid complex (*Caltha leptosepala* s.l., *Ranunculaceae*)¹. *American Journal of Botany*, Vol. 104, No. 2, 271–285.
- WOODELL S. R. et KOOTIN-SANWU M. (1971): Intraspecific variation in *Caltha palustris*. *New Phytologist*, Vol. 70, No. 1, 173–186.
- ZHANG G., MENG L., WU Z., ZHANG Z., YIN L., YANG Y. et DUAN Y. (2017): Natural selection on floral traits of *Caltha scaposa* (*Ranunculaceae*), an alpine perennial with generalized pollination system from Northwest Yunnan. *Plant Diversity*, Vol. 39, No. 4, 202–207.

