Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Morfologická variabilita a určování terestrických forem středoevropských druhů lakušníků (*Ranunculus* sect. *Batrachium*)

Diplomová práce

Bc. Linda Vlčková

Školitel: Mgr. Petr Koutecký, Ph.D.

České Budějovice 2022

Vlčková, L., 2022: Morfologická variabilita a určování terestrických forem středoevropských druhů lakušníků (*Ranunculus* sect. *Batrachium*). [Morphological variability and determination of terrestrial forms of the Central European species of water-crowfoots (*Ranunculus* sect. *Batrachium*). Mgr. Thesis, in Czech] – 89 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Ranunculus sect. *Batrachium* is a considerably complicated group of aquatic plants. Some of the species can facultatively grow terrestrially on wet sediment surface. Due to their extensive phenotypic plasticity, they form terrestrial modificants in the terrestrial conditions. This theses deals with the Central European species that create the terrestrial modificants, namely *Ranunculus aquatilis*, *R. baudotii*, *R. peltatus*, *R. rionii*, *R. trichophyllus* A and *R. trichophyllus* B (two distinct cytotypes of *Ranunculus trichophyllus*). The aim of this theses is to establish whether the terrestrial forms of these species differ in their morphology. The species were determined using flow cytometry, and then morphological features were measured. Subsequently, the data were analysed using multivariate statistical methods to assess whether the terrestrial modificants can be determined.

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, 31. 3. 2022 .....

Linda Vlčková

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli Petru Kouteckému za to, že mi vždy pohotově poskytl potřebné rady a ochotně pomohl se vším, s čím jsem v průběhu vypracovávání celé diplomové práce potřebovala pomoci. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli a Vojtěchu Dolejškovi za významnou pomoc při sběru rostlin v terénu, Zdeňku Kaplanovi, Janu Prančlovi, Atillovi Mesterházimu, Pavlu Kúrovi, Pavlu Trávníčkovi, Karin Hustákové, Haroldu Shau, Clemensi Pachschwöllovi, Dieteru Reichovi, Alexandře Čurnové, Liboru Ekrtovi a Magdaleně Lučanové za poskytnutí herbářových položek. Také děkuji Johaně Hanzlíčkové a Vojtěchu Dolejškovi za poskytnutí dat měřených na vodních formách studovaných druhů. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také své rodině za podporu po celou dobu studia.

Obsah

1. Úvod 1

1.1 Charakteristika lakušníků 2

1.2 Středoevropské druhy lakušníků 3

1.2.1 Morfologické znaky 4

1.2.2. Ekologie a rozšíření 7

1.2.3 Ploidie a velikost genomu 10

1.3 Fenotypová plasticita 11

1.3.1 Faktory ovlivňující fenotyp rostliny 12

1.3.2. Fenotypová plasticita u lakušníků 14

1.4 Terestrické formy 15

1.5 Cíle práce 19

2. Metodika 20

2.1 Terénní sběr 20

2.2 Průtoková cytometrie 30

2.3 Sekvenace 32

2.3.1 Izolace DNA 32

2.3.2 PCR 33

2.3.3 Elektroforéza 34

2.3.4 Sekvenace 34

2.4 Měření morfologických znaků 35

2.5 Analýza dat 38

3. Výsledky 40

3.1 Průtoková cytometrie 40

3.2 Sekvenace morfologicky nejasných jedinců 42

3.3 Morfometrické analýzy 46

3.3.1 Popisná statistika taxonů 46
3.3.2 Korelační analýza 49
3.3.3 Analýza hlavních komponent 49
3.3.4 Lineární diskriminační analýza 55
3.3.5 Klasifikační diskriminační analýza 60
3.4 Srovnání s vodními formami 62
4. Diskuze 69
4.1 Určování terestrických forem lakušníků pomocí měřených znaků 69
4.2 Porovnání naměřených hodnot s literaturou 71
4.3 Porovnání terestrických a vodních forem 78
4.4 Porovnání výsledků s klíčem pro terestrické formy P. Englmaiera 78
4.5 Určovací klíč pro terestrické formy 79
4.6 Fotografie studovaných druhů 81
5. Závěr 83
6. Literatura 84
7. Přílohy 90

1. Úvod

Lakušníky (*Ranunculus* sect. *Batrachium*) jsou vodní rostliny z čeledi pryskyřníkovitých (Ranunculaceae). Ačkoliv je jejich původním habitatem vodní prostředí, řada druhů osidluje také stanoviště s kolísající hladinou vody (Cook 1966, Kaplan et al. 2019b). Při poklesu vodní hladiny tvoří na bahnitých substrátech terestrické formy, které se výrazně liší od vodních forem (Englmaier 2016).

Při přechodu na souš dochází k výrazné redukci celé rostliny a změně řady znaků. Například u některých druhů lakušníků se ve vodním prostředí vytvářejí dva typy listů – plovoucí a niťovité. U rostlin v terestrickém prostředí pak často dochází k redukci plovoucích listů a zůstávají pouze niťovité listy. I ty se ovšem svou anatomií a morfologií liší od listů u vodních forem – jsou obvykle menší a mezi druhy mnohem uniformnější. Dále dochází ke změně velikosti květu a délky květních a plodních stopek (Cook 1966, Englmaier 2016).

Řada druhů, ve vodním prostředí morfologicky odlišných, může v terestrických podmínkách vypadat velmi podobně a determinace je proto často náročná. Většina určovacích klíčů se zabývá pouze vodními formami lakušníků a terestrické formy podle nich mnohdy nelze určit (např. Husák et al. 1982, 1988, Fisher et al. 2008, Jäger et al. 2011, Kaplan 2019a). Jediný klíč pro určování terestrických forem dosud vytvořil pouze Peter Englmaier (2016). Podle jeho klíče ovšem není možné určit druhy na základě vegetativních znaků, navíc poukazuje na to, že i v případě plně vyvinuté rostliny s květy a plody není determinace spolehlivá.

Cílem této diplomové práce je zjistit, zda lze od sebe odlišit terestrické formy středoevropských druhů lakušníků, stanovit rozmezí variability jednotlivých znaků a výsledky porovnat s dostupnou literaturou. V bakalářské práci jsem se zabývala druhy *Ranunculus peltatus* a *R. trichophyllus* A (Vlčková 2020). V diplomové práci navazuji na předchozí výzkum rozšířením o další středoevropské druhy, které tvoří terestrické formy, konkrétně *R. aquatilis*, *R. baudotii*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* B. *Ranunculus trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B dosud nebyly formálně popsány jako taxony, jedná se o dva různé cytotypy druhu *R. trichophyllus* lišící se velikostí genomu i podle molekulárních dat (Prančl et al. 2018, Koutecký et al. 2022).

Teoretická část se zabývá nejprve obecnou charakteristikou skupiny lakušníků (1.1), dále středoevropskými druhy lakušníků (1.2), fenotypovou plasticitou (1.3) a terestrickými formami (1.4).

1.1 Charakteristika lakušníků

Lakušníky jsou bíle kvetoucí vodní rostliny s těžištěm výskytu na severní polokouli, především v mírném, subtropickém a částečně i boreálním pásu. Jejich areál však zasahuje i do Jižní Ameriky, na jih Afriky, jihovýchod Austrálie, do Tasmánie a na Nový Zéland (Cook 1966, Wiegleb 2017).

Do rodu lakušník patří okolo 30 druhů, z nichž se jich v Evropě vyskytuje 14–18. Za centrum druhové diverzity je považována atlantská a středozemní Evropa (Cook 1966, Wiegleb et al. 2017). V České republice je udáváno 8 druhů (Kaplan et al. 2019a).

Lakušníky se řadí mezi vyšší dvouděložné rostliny (Eudicots), v rámci nichž patří do řádu Ranunculales (pryskyřníkotvaré) a do čeledi Ranunculaceae (pryskyřníkovité, Angiosperm Phylogeny Group 2016). Taxonomické pojetí této skupiny se v rámci české i světové literatury často liší (někdy jsou klasifikovány jako samostatný rod *Batrachium*), na základě výsledků molekulárních studií je však nejlepší ji vnímat jako sekci v rámci rodu pryskyřník (Hörandl & Emadzade 2012).

Jedná se o poměrně komplikovanou skupinu rostlin, jejichž determinace je často náročná. K variabilitě celé sekce přispívá polyploidizace (tj. znásobení sad chromozomů) a hybridizace, což jsou u rostlin velmi časté a významné evoluční procesy (Briggs & Walters 2001). Časté křížení jednotlivých druhů v kombinaci s polyploidizací vede ke vzniku mnoha cytotypů a genetických linií, mnohdy morfologicky téměř neodlišitelných (Prančl et al. 2018). V neposlední řadě determinaci znesnadňuje výrazná fenotypová plasticita, díky níž rostliny dokáží produkovat odlišné fenotypy na základě změn podmínek vnějšího prostředí, jako je například intenzita slunečního záření, množství dostupné vody nebo živin (Bradshaw 1965). Celá sekce je tak jednou z nejkomplikovanějších skupin vodních rostlin vůbec.

1.2 Středoevropské druhy lakušníků

Ve střední Evropě se vyskytuje 8 druhů lakušníků – *Ranunculus aquatilis*, *R. baudotii*, *R. circinatus*, *R. fluitans*, *R. peltatus*, *R. penicillatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* (Kaplan et al. 2019a).

U druhů *R. aquatilis*, *R. baudotii*, *R. peltatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* jsou terestrické formy relativně běžné, jelikož tyto druhy často obývají stanoviště s kolísající hladinou vody. Druhy *R. fluitans* a *R. penicillatus* obývají výhradně tekoucí vody, které nevysychají, a proto se jen zřídka dostanou do terestrických podmínek (Kaplan et al. 2019b). U druhu *R. fluitans* se terestrické formy objevují velmi vzácně a málokdy kvetou, u druhu *R. penicillatus* nebyly terestrické formy dosud pozorovány (Cook 1966, Wiegleb 2017). *Ranunculus circinatus* roste především ve stojatých vodách, kde může krátce přežívat i na bahnitých substrátech bez vody (Englmaier 2016). Tyto rostliny se sice od vodních forem liší, na rozdíl od terestrických forem ostatních druhů však nikdy nekvetou a neplodí (Cook 1966, Englmaier 2016, Wiegleb 2017). Jelikož druhy *R. circinatus*, *R. fluitans* a *R. penicillatus* tvoří terestrické formy jen zřídka nebo vůbec, nebyl k dispozici žádný materiál (s výjimkou jedné herbářové položky *R. circinatus)*. Z tohoto důvodu se těmito druhy práce dále nezabývá.

Mezi rostlinami tradičně rozlišovanými jako *R. trichophyllus* byly odhaleny dva středoevropské cytotypy, které se liší jak velikostí genomu, tak morfologií, ekologií a rozšířením. Cytotypy jsou prozatím označovány jako *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B. Cytotyp A má o 11 % menší velikost genomu než cytotyp B. Dále je cytotyp A celkově drobnější – má menší květy, užší lodyhy a kratší listy i internodia. Vyskytuje se převážně na kyselém podloží, což je spojeno s tím, že ho na území České republiky najdeme spíše ve středních a vyšších polohách. Cytotyp B je naopak vázán především na vápnité substráty, proto ho u nás obvykle najdeme v nížinách a teplých oblastech (Prančl et al. 2018, Kaplan et al. 2019b). Oba cytotypy se také liší v sekvenci ITS úseku jaderné DNA a drobné rozdíly najdeme i v plastidové DNA (Koutecký et al. 2022). Odlišnosti mezi těmito dvěma cytotypy jsou srovnatelné s rozdíly mezi jinými rozeznávanými druhy, a proto by si zasloužily taxonomické odlišení (Prančl et al. 2018, Koutecký et al. 2022). Z těchto důvodů jsou v této práci studovány oba cytotypy zvlášť.

1.2.1 Morfologické znaky

Morfologické znaky studovaných druhů jsou uvedeny v tabulce (viz tab. 1). Údaje se vztahují k rostlinám rostoucím ve vodním prostředí, charakteristika terestrických forem se může lišit. Terestrickými formami jednotlivých druhů se zabývá kapitola 1.4. Tabulka s morfologickými znaky je zpracována na základě prací Cook (1966), Englmaier (2016), Wiegleb (2017), Prančl et al. (2018), Kaplan et al. (2019a).

Tab. 1 – Morfologické znaky jednotlivých druhů.

	R. aquatilis	*R. baudotii*	*R. peltatus*	*R. rionii*	*R. trichophyllus* *
délka života	jednoletá nebo vytrvalá rostlina	jednoletá nebo vytrvalá rostlina	vytrvalá rostlina	jednoletá rostlina	vytrvalá, vzácně jednoletá rostlina
niťovité listy	kratší než příslušné internodium; délka řapíku do 25 mm; úkrojky po vytažení z vody splihnou (měkké, slepí se k sobě)	kratší nebo stejně dlouhé jako příslušné internodium; délka řapíku 5–20 mm; úkrojky po vytažení z vody zachovají původní tvar	kratší než příslušné internodium; délka řapíku 5–25 mm; úkrojky po vytažení z vody splihnou	kratší než příslušné internodium; délka řapíku do 20 mm; úkrojky po vytažení z vody splihnou	kratší než příslušné internodium; délka řapíku do 40 mm; úkrojky po vytažení z vody splihnou
lupenité listy	délka řapíku do 90 mm; šířka čepele do 30 mm, čepel ledvinitá až okrouhlá se 17–26 tupě špičatými koncovými zuby, členěná na 3–5 (vzácně 7) laloků, členěná minimálně do 2/3 délky; lupenité listy se tvoří obvykle za květu, často chybí u jedinců rostoucích v hluboké stojaté vodě	délka řapíku do 80 mm; šířka čepele do 30 mm, čepel ledvinitá až okrouhlá s 8–14 koncovými zuby, hluboce dělená na 3 (vzácněji 5) laloků, členěná minimálně do 2/3 délky; lupenité listy se tvoří často v mělkých vodách, jinak druh zůstává homofylní	délka řapíku do 70 mm; šířka čepele do 40 mm, čepel ledvinitá až okrouhlá s 5–15 široce zaokrouhlenými koncovými zuby, členěná na 3–5 (vzácně 7) laloků, členěná cca do 1/3 délky; lupenité listy se za květu tvoří téměř vždy	chybí	chybí
palisty	trojúhelníkovité; délka lehce přesahuje 5 mm; k řapíku přirostlé alespoň ze 3/4 délky	široce vejčité až trojúhelníkovité; délka cca 5 mm; k řapíku přirostlé cca do 1/2 délky	vejčité až trojúhelníkovité; délka přesahuje 5 mm; k řapíku přirostlé alespoň ze 3/4 délky	vejčité; délka do 4 mm; k řapíku přirostlé cca ze 2/3 jejich délky	vejčité; délka do 4 mm; k řapíku přirostlé alespoň ze 2/3 jejich délky

	R. aquatilis	*R. baudotii*	*R. peltatus*	*R. rionii*	*R. trichophyllus* *
kališní lístky	3–5 mm, cca 1/2 délky korunních lístků	2,5–4,5 mm, mnohem kratší než korunní lístky (méně než 1/2 jejich délky), někdy namodralé	3–6 mm, cca 1/2 délky korunních lístků, většinou přitisklé ke koruně	2–2,5 mm, mírně kratší než korunní lístky, přitisklé ke koruně	2,5–3,5 mm, více než 1/2 délky korunních lístků, přitisklé ke koruně, opadavé
korunní lístky	5–12 mm, široce obvejčité, překrývající se, neopadávají během kvetení	5,5–13 mm, široce obvejčité, mírně se překrývají, neopadávají během kvetení	9–17 mm, široce obvejčité, mírně se překrývají, neopadávají během kvetení	3,5–5 mm, vejčité až obvejčité, nepřekrývají se, opadávají během kvetení	2–7,5 mm (*R. trichophyllus* A: 2–4 mm, *R. trichophyllus* B: 3,5–7 mm), vejčité až obvejčité, na okraji se nepřekrývající se, opadávají
tvar nektária	okrouhlý	nejčastěji poloměsíčitý, ale může být variabilní	hruškovitý	poloměsíčitý	poloměsíčitý
počet tyčinek	15–25	10–25	10–30	10–25	10–15
plodní stopky	do 50 mm, rovné až mírně zakřivené	30–100 mm, výrazně zakřivené	delší než 50 mm, rovné až mírně zakřivené	30–50 mm, zakřivené	10–50 mm (*R. trichophyllus* A: 10–30 mm, *R. trichophyllus* B: 15–50 mm), zakřivené
nažky	počet (20) 30–40 (68); délka 1,4–1,7 mm; nezralé jsou chlupaté, za zralosti mohou olysávat	počet (16) 30–60 (100); délka 1–1,4 (1,8) mm; lysé nebo řídce chlupaté, v suchém stavu zpravidla s úzkým křídlatým lemem	počet 30–40; délka 1,8–2 (2,2) mm; nezralé jsou chlupaté, za zralosti mohou olysávat	počet 20–60 (100); délka 1–1.4 mm; lysé nebo jen řídce chlupaté	počet 15–40 (*R. trichophyllus* A: 10–30, *R. trichophyllus* B: 15–40 mm); délka 1,5–1,7 mm; za zralosti mohou olysávat

* Pro cytotypy A a B druhu *R. trichophyllus* nejsou k dispozici přesné morfologické údaje. V literatuře (Prančl et al. 2018, Kaplan et al. 2019b) se však uvádí, že ačkoliv je mezi oběma cytotypy překryv, *R. trichophyllus* A je drobnější a hodnoty kvantitativních znaků jsou tedy spíše v dolní části rozmezí druhu. Naproti tomu *R. trichophyllus* B je v průměru robustnější a kvantitativní znaky dosahují vyšších hodnot.

1.2.2. Ekologie a rozšíření

Lakušníky osidlují široké spektrum vodních habitatů od eutrofních stojatých vod po oligotrofní rychle tekoucí vody. Často se vyskytují také na stanovištích s kolísajícím vodním sloupcem, kde při poklesu hladiny vytvářejí na bahnitých substrátech typické terestrické formy (Cook 1966, Hong 1991, Englmaier 2016). Většina druhů roste pouze ve sladkých vodách, ale například *Ranunculus baudotii* se vyskytuje běžně i v brakických vodách v pobřežních oblastech (Cook 1966). Právě rozdílné nároky na chemismus vod jsou považovány za hlavní faktor ovlivňující rozšíření jednotlivých druhů lakušníků (Lumbreras et al. 2009).

Z osmi druhů lakušníků vyskytujících se na území České republiky je sedm zahrnuto v Červeném seznamu České republiky (Grulich 2012, 2017). Nejohroženějším druhem je *Ranunculus baudotii*, který je klasifikován jako kriticky ohrožený druh (C1b, resp. EN podle IUCN kritérií). Následují taxony *R. rionii* a *R. penicillatus*, které jsou silně ohrožené (C2b, C2r, resp. VU). *Ranunculus circinatus* je uváděn jako ohrožený druh (C3, resp. NT), *R. fluitans* a *R. trichophyllus* jako vzácnější taxony vyžadující pozornost – méně ohrožené (C4a, ve verzi podle IUCN kritérií jako neohrožené, kategorie LC). *Ranunculus aquatilis* je klasifikován jako vzácnější taxon vyžadující pozornost – nedostatečně prostudovaný (C4b, resp. DD).

Následuje tabulka, která shrnuje údaje o ekologii a rozšíření studovaných druhů (viz tab. 2). Údaje jsou zpracovány dle Cook (1966), Englmaier (2016), Wiegleb (2017), Prančl et al. (2018), Kaplan et al. (2019b).

Je nutno zmínit, že údaje o rozšíření nemusí být zcela přesné, jelikož druhové pojetí není ve všech oblastech sjednocené a zároveň některé položky mohly být chybně určeny (Englmaier 2016). Je známo mnoho příkladů, kdy bylo rozšíření a četnost taxonu špatně odhadováno kvůli záměně druhu.

Například až donedávna byl za nejhojnější lakušník vyskytující se na území České republiky považován *Ranunculus aquatilis*. Ve starších určovacích klíčích, včetně Květeny ČR (Husák et al. 1988), ale nebyl uveden druh *R. peltatus*, ke kterému většina údajů o výskytu *R. aquatilis* ve skutečnosti patří, a abundance druhu *R. aquatilis* tak byla výrazně nadhodnocována (Kaplan et al. 2019b).

Četnost druhu *R. rionii* byla v minulosti naopak podhodnocována díky častým záměnám za druh *R. trichophyllus* (Englmaier 2016, Kaplan et al. 2019b).

Chybovosti mohou podléhat i údaje o rozšíření druhu *R. peltatus*. Jeho hranice areálu v mediteránu není přesně známá kvůli časté záměně za druhy *R. saniculifolius* a *R. sphaerospermus*. Na severní hranici výskytu ve Skandinávii a Rusku je pro změnu zaměňován za *R. schmalhausenii* (Bobrov et al. 2015, Wiegleb 2017).

Tab. 2 – Ekologie a rozšíření jednotlivých druhů.

Druh	Ekologie	Areál výskytu	Rozšíření v České republice
Ranunculus aquatilis	nejčastěji stojaté mezotrofní až přirozeně eutrofní vody, často na lokalitách s kolísající vodní hladinou nebo v periodicky vysychajících vodních habitatech, v tekoucí vodě vzácně	většina Evropy, severní Afrika, Asie (vzácně), západ Severní a Jižní Ameriky	převážně v nížinách na bazických substrátech – Polabí, východní Čechy, říční nivy na jižní a střední Moravě (v západních a jižních Čechách chybí)
Ranunculus baudotii	eutrofní vody s vysokým obsahem minerálních látek a chloridů, převážně zatopené lomy, rybníky a pískovny, v přímořských oblastech i v brakické vodě, v tekoucí vodě jen zřídka (nevyskytuje se v proudivých úsecích)	Evropa (převážně v přímořských oblastech, ve vnitrozemí méně často), severní Afrika	v ČR vzácně, téměř výhradně v nížinách, převážně na jižní Moravě, v Polabí a v okolí města Podbořany
Ranunculus peltatus	oligotrofní až eutrofní vody, tekoucí i stojaté vody, rybníky, řeky a potoky (často s kolísající hladinou vody), obnažená rybniční dna	Evropa (převážně temperátní a mediterránní zóna, nejsevernější výskyty se udávají v jižním Švédsku a v Estonsku), severní Afrika, západní Asie	nejhojnější druh ČR, vyskytuje se na většině území, v nížinách jen vzácně
Ranunculus rionii	mělké stojaté eutrofní vody s vysokým obsahem minerálních látek a solí, často okraje rybníků a obnažená rybniční dna, zatopené lomy, pískovny a štěrkovny	střední a východní Evropa, severní Afrika, západní až centrální Asie	převážně na jižní Moravě (na severní a střední Moravě jen vzácně), dále v severozápadních Čechách, v oblasti východních Čech, poblíž města Turnov a v oblasti jihozápadně od Prahy
Ranunculus trichophyllus	oligotrofní až eutrofní vody, stojaté i tekoucí vody (s výjimkou proudivých úseků), nejčastěji rybníky, tůně a obnažená dna; cytotyp A převažuje v mezotrofních až eutrofních vodách na kyselých substrátech, cytotyp B se vyskytuje spíš na přirozeně eutrofních stanovištích na bazických substrátech	Severní a Jižní Amerika, Grónsko, Evropa, Asie (s výjimkou Japonska), severní a jižní Afrika, Austrálie, Tasmánie, Nový Zéland	*R. trich.* A se vyskytuje hlavně v oblasti jižních Čech *R. trich.* B se vyskytuje převážně v Polabí, na jižní a střední Moravě

1.2.3 Ploidie a velikost genomu

Základní chromozomové číslo lakušníků je 8, což je zároveň nejčastější chromozomové číslo u celé čeledi pryskyřníkovitých (Baltisberger & Hörandl 2016). U lakušníků je častá polyploidizace, přičemž je známých pět ploidních úrovní od diploidů (2n = 16) až po hexaploidy (2n = 48, Prančl et al. 2018). Asi u poloviny evropských druhů je známo více ploidních úrovní (Cook 1966, Wiegleb et al. 2017). Aneuploidie je u lakušníků vzácná (Cook 1966, Dahlgren 1991, Diosdado et al. 1993).

Ranunculus aquatilis má převážně hexaploidní cytotyp (2n = 48, Cook 1966), ale existují i tetraploidi (2n = 32, Dahlgren 1993). V České republice se vyskytují pouze hexaploidi (Prančl et al. 2018).

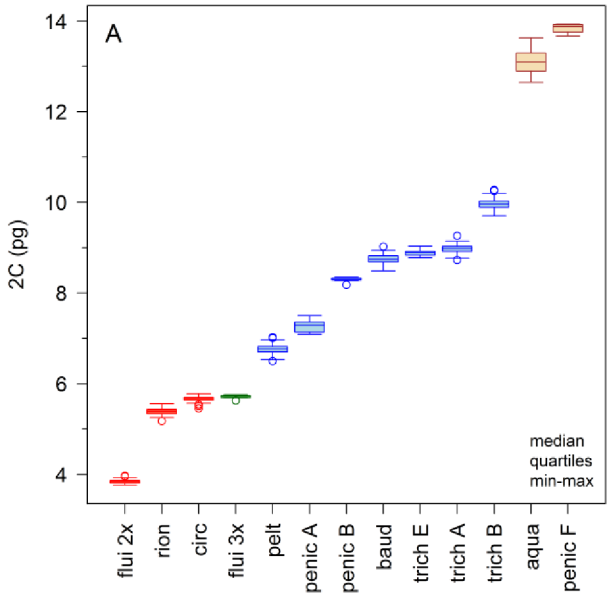
Ranunculus baudotii má dva geograficky oddělené cytotypy – tetraploidní (2n = 32, Cook 1966) a diploidní (2n = 16, Diosdado et al. 1993). Tetraploidní forma se vyskytuje převážně v severní a střední Evropě. Diploidní forma je známá z oblasti kolem Středozemního moře, ze západní a z jižní Evropy (Wiegleb 2017). V České republice jsou pouze rostliny s tetraploidním cytotypem (Prančl et al. 2018).

Ranunculus peltatus má diploidní (2n = 16), tetraploidní (2n = 32) a hexaploidní (2n = 48) cytotyp (Cook 1966). V České republice rostou pouze tetraploidi (Prančl et al. 2018).

Ranunculus rionii se vyskytuje pouze v diploidní formě (Cook 1966).

U druhu *Ranunculus trichophyllus* jsou známí diploidi (2n = 16, Diosdado et al. 1993), tetraploidi (2n = 32, Cook 1966), pentaploidi (2n = 40, Dahlgren 1991) a hexaploidi (2n = 48, Dahlgren 1991). V České republice se vyskytují dva cytotypy, oba tetraploidní (Prančl et al. 2018).

Všechny středoevropské lakušníky se signifikantně liší ve velikosti genomu, tudíž lze jednotlivé druhy i jejich hybridy snadno rozeznat pomocí průtokové cytometrie. Velmi podobnou velikost genomu mají pouze dvojice druhů *R. circinatus* s triploidním cytotypem *R. fluitans* a *R. baudotii* s některými cytotypy *R. trichophyllus*, zejména s rostlinami z vysokohorských jezer v Alpách označovanými jako *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* (viz obr. 1). Tyto druhy jsou však morfologicky i ekologicky nezaměnitelné. Metoda průtokové cytometrie tudíž slouží jako spolehlivý nástroj k určování jednotlivých druhů lakušníků (Prančl et al. 2018).



Obr. 1 – Krabicový diagram zobrazující porovnání velikostí genomů u různých cytotypů lakušníků. Zkratky cytotypů: aqua – *R. aquatilis*; baud – *R. baudotii*; circ – *R. circinatus*; flui – *R. fluitans* (diploidní a triploidní cytotyp); pelt – *R. peltatus*; penic – *R. penicillatus* (cytotypy A, B a F); rion – *R. rionii*; trich – *R. trichophyllus* (cytotypy A a B; E = subsp. *eradicatus*). Červenou barvou jsou znázorněni diploidi, zelenou triploidi, modrou tetraploidi a hnědou hexaploidi. 2C (pg) – velikost genomu v pg. Převzato (Prančl et al. 2018).

1.3 Fenotypová plasticita

Rostliny jsou sedentární organismy, tudíž se musí umět vypořádat s proměnlivostí podmínek vnějšího prostředí. Za tímto účelem u nich vznikla fenotypová plasticita (Bradshaw 1972, Pigliucci 2001). Jedná se o schopnost rostlin měnit svou morfologii a fyziologii v závislosti na změně podmínek prostředí (Bradshaw 1965, Schlichting 1986).

Fenotypová plasticita může značně komplikovat správnou determinaci taxonů, jelikož řada určovacích znaků je mnohdy závislá na podmínkách vnějšího prostředí (Kaplan 2002). To je i případ sekce lakušníků, kde při změně vnějších podmínek (např. přechod do terestrického prostředí) dochází k posunu u řady znaků a rostliny se tak velmi obtížně určují (Englmaier 2016).

Jednotlivé fenotypy mohou vypadat velmi různorodě, což komplikuje rostlinnou taxonomii. Hlavně v minulosti bylo obtížné odlišit, zda se jedná pouze o jeden z fenotypů již známého druhu nebo o jiný, geneticky vymezený druh (Davis & Heywood 1963). Rostlinná taxonomie je díky tomu náchylná k chybám. Pokud by byly například určité

modifikace jednoho taxonu chybně označeny za rozdílné druhy, taxonomie by vyústila v pouhou klasifikaci fenotypů (Meyer 1987, Pigliucci et al. 1991, Sultan 1995).

Vodní rostliny obvykle vykazují větší míru fenotypové plasticity než rostliny suchozemské. Například druhy *Ranunculus hederaceus* a *R. omiophyllus* mají ve srovnání s druhy žijícími v podobném prostředí (např. *Peplis portula* nebo *Montia fontana*) díky svým vodním předkům výrazně větší stupeň fenotypové plasticity (Cook 1966).

Kromě lakušníků (Cook 1966) jsou dalšími příklady komplikovaných vodních rostlin rody vodní mor – *Elodea* (Simpson 1988) nebo rdest – *Potamogeton* (Kaplan 2002). Některé druhy rdestů dokáží díky fenotypové plasticitě vytvořit fenotypy téměř neodlišitelné od jiných, více či méně příbuzných druhů. To je v podstatě i případ lakušníků, které mohou v terestrickém prostředí také tvořit téměř nerozpoznatelné fenotypy (Englmaier 2016).

Ačkoliv je fenotypová plasticita studována převážně u vodních skupin rostlin, je zkoumána i u suchozemských zástupců. Příkladem je rod *Ornithogalum* (Pigliucci et al. 1991) nebo modelový organismus *Arabidopsis thaliana* (Pigliucci & Kolodynska 2002).

1.3.1 Faktory ovlivňující fenotyp rostliny

Fenotyp rostliny je ovlivňován podmínkami vnějšího prostředí. Mezi ně patří například množství dostupné vody a živin, sezonalita, teplota vody či intenzita slunečního záření. V závislosti na těchto podmínkách se nemusí měnit pouze morfologie rostliny, ale také další vlastnosti, jako je například životní strategie (Garbey et al. 2004).

1.3.1.1 Množství vody

Voda je důležitým zdrojem pro všechny organismy. Její dostupnost je klíčová jak pro vodní, tak pro suchozemské rostliny. Přísun vody však musí být v adekvátním množství, jelikož její nedostatek (sucho) i nadbytek (přílišné zaplavení) působí na rostliny jako stres. Nadbytek vody je stresem převážně pro suchozemské a mokřadní druhy. Jak nedostatek, tak nadbytek vody vyžaduje rozdílné mechanismy obrany (Blom and Voesenek 1996, Zhang et al. 2000).

Hlavním problémem rostlin trpících nadbytkem vody je snížená koncentrace kyslíku v půdě, což ovlivňuje primárně kořeny, ale také nadzemní část rostliny (Pigliucci & Kolodynska 2002). Odpověď organismů na přílišné zaplavení byla zkoumána převážně u mokřadních rodů, jako je např. *Carex* nebo *Rumex* (Baruch & Merida 1995, Visser

& Voesenek 1996, Moog 1998). Méně studií bylo provedeno na druzích, které nejsou odolné vůči záplavám. Ty mohou trpět například nadměrnými srážkami, kdy voda zaplní půdní póry a způsobí anoxii (Pigliucci & Kolodynska 2002). Vodní rostliny jsou ovšem na nadbytek vody velmi dobře přizpůsobeny a tyto problémy se jich tudíž příliš netýkají.

1.3.1.2 Sezonalita

Fenotyp rostliny se mění také v průběhu roku. Garbey a spol. (2004) popsali morfologickou plasticitu u druhu *Ranunculus peltatus* v závislosti na sezonalitě. Objevili tři různá stádia, ve kterých se rostlina vyskytuje od dubna do srpna. V první fázi, která trvá od dubna do května, dochází k prodlužování rostliny ve směru toku a k vývoji internodií. Následuje fáze rozvoje pupenů, kdy rostlina začíná kvést a niťovité listy už se tolik neprodlužují. Rostlina kvete od počátku května až do července, přičemž k vrcholu dochází v červnu. Poté nastává poslední fáze, kdy se výhonky stávají křehčími a náchylnějšími k rozpadu, což usnadňuje vegetativní rozmnožování. Při určování druhů rostlin tedy musíme brát v úvahu roční období, ve kterém jsme rostliny sbírali.

1.3.1.3 Množství živin

Množství vyprodukované biomasy a elongace rostlin závisí na úživnosti a mineralizaci vod. Thiébaut a Muller (1998) uvádějí, že množství biomasy u druhu *Ranunculus peltatus* stoupá s množstvím dostupných živin, jelikož nejvyšší množství biomasy zaznamenali v eutrofních tocích. Také Wiegleb (2017) popisuje, že *R. peltatus* se může v eutrofních vodách značně prodlužovat a svou morfologií se tak blížit druhu *R. penicillatus*. Eichenberger (1983) naopak uvádí, že u dalšího druhu lakušníku, *R. fluitans*, není žádná přímá korelace mezi množstvím živin a biomasou.

1.3.1.4 Teplota vody a intenzita slunečního záření

Míra produkce květů u lakušníků je závislá na teplotě vody a intenzitě slunečního záření (Dawson 1980, Garbey et al. 2004). Dawson (1980) ve své studii uvádí, že schopnost kvetení u *Ranunculus penicillatus* var. *calcareus* závisí na teplotě vody a na množství světla. Garbey a spol. (2004) toto potvrzují, jelikož také *R. peltatus* má maximální produkci květů na slunných stanovištích s méně než 5 % stínu, naopak nejnižší produkci květů mají jedinci na stinných místech.

1.3.1.5 Životní strategie v důsledku fenotypové plasticity

Rostliny vykazující vysokou míru fenotypové plasticity mohou mít různé životní strategie v závislosti na vnějších podmínkách (Kautsky 1987). Příkladem může být *Ranunculus peltatus*, který se na živinami chudých nenarušených habitatech chová jako stres tolerantní (S-stratég), na živinami bohatých nenarušených stanovištích zaujímá kompetitivní strategii (C-stratég) a v narušeném prostředí má ruderální strategii (R-stratég). Tato schopnost mu umožňuje přežívat v širokém škále vodních habitatů (Garbey et al. 2004).

1.3.2. Fenotypová plasticita u lakušníků

Cook (1966) ve své monografii popisuje pokusy s druhy *Ranunculus aquatilis*, *R. peltatus* a *R. trichophyllus*. Zkoušel kultivovat rostliny pocházející ze vzdálených částí Evropy v různých podmínkách a zkoumal jejich odpověď na tyto podmínky. Podle jeho závěrů nejsou na vnějších podmínkách příliš závislé znaky, jako je počet korunních lístků či chlupatost nažek. Naopak vegetativní znaky či délka květní stopky se mohou značně lišit v závislosti na prostředí. Dalšími znaky, které jsou variabilní, jsou délka korunního lístku, počet tyčinek a pestíků (Cook 1966).

Délka květní stopky je ovlivněna hloubkou vody, ve které jedinec roste. U jedinců rostoucích v mělké vodě byly květní stopky kratší než u jedinců rostoucích v hloubce. Když však byly rostliny pěstovány nejprve v mělké vodě a poté byly přesunuty do hlubší vody, k prodloužení květní stopky došlo jen u části studovaných rostlin (Cook 1966). Podobně u jedinců v terestrickém prostředí dochází ke zkrácení květních stopek (Englmaier 2016).

Výraznou fenotypovou plasticitu vykazují také listy. U druhu *R. trichophyllus* bylo pozorováno, že u většiny jedinců jsou listy poměrně tuhé a drží svůj tvar i po vytažení z vody, zatímco některé rostliny tohoto druhu mají listy tenčí. Všichni zástupci *R. trichophyllus* s křehčími listy původně pocházeli z permanentně tekoucích vod. Když byli naopak jedinci s tužšími listy vysazeni do tekoucích vod, zachytávalo se na jejich listy příliš materiálu, což zpomalilo jejich rychlost růstu. Tenčí a měkčí listy jsou tedy pravděpodobně adaptací na proudivé úseky (Cook 1966).

R. aquatilis je heterofylní druh, ale někteří studovaní jedinci ve svých přírodních habitatech lupenité listy netvořili. Jednalo se pravděpodobně o reakci na kompetici, kdy byly

tyto rostliny vytlačovány jinými druhy. Po kultivaci, při které byl vliv kompetice odstraněn, tyto rostliny nejenže tvořily lupenité listy, ale také celkově zrobustněly (Cook 1966).

Cook (1966) při těchto pokusech také zaznamenal, že když jsou rostliny pěstovány v nepříznivých podmínkách, jako je nedostatek světla, nízká teplota a nedostatek živin, druhy lze často zaměnit. *Ranunculus peltatus* se pak nápadně podobá *R. aquatlis* a *R. aquatlis* se dá snadno zaměnit za *R. trichophyllus*.

I další druhy lakušníků jsou výrazně plastické. Příkladem je *R. baudotii*, který se rozděluje na dva morfologicky a geograficky odlišné cytotypy. Diploidní forma se vyskytuje převážně v západní a jižní Evropě, v létě je heterofylní a v zimě tvoří jen lupenité listy. Tetraploidní forma roste hlavně v severní a střední Evropě. Jedná se o trvale ponořený typ druhu *R. baudotii*, který často kvete a plodí, aniž by vytvořil lupenité listy (Cook 1966, Wiegleb 2017).

1.4 Terestrické formy

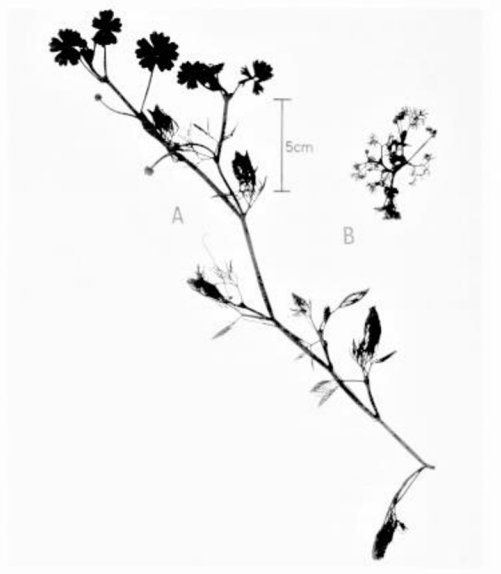
Řada druhů lakušníků osidluje vysychající habitaty a při poklesu vodní hladiny rostou na permanentně vlhkém sedimentu jako terestrické formy (Englmaier 2016, Kaplan 2019b). Terestrické formy nejsou typické pouze pro lakušníky, ale vytváří je i některé další vodní rody, jako je například úpor – *Elatine* (Molnár et al. 2015) nebo hvězdoš – *Callitriche* (Jones 1955). Naopak běžně spíše terestrické či mokřadní rostliny tvoří i plovoucí formy. Z pryskyřníků je příkladem mokřadní druh *Ranunculus sceleratus*, který je lakušníkům blízce příbuzný, a není tedy příliš překvapivé, že je schopen vytvořit vodní formu s plovoucími listy (He et al. 1999, Hörandl & Emadzade 2012).

Lakušníky jsou schopné reagovat na změnu prostředí pomocí změny strategie z vytrvalé na jednoletou. Cook (1966) během kultivačních experimentů zjistil, že druhy, které v přírodě rostou vytrvale (např. *R. circinatus*), se při kultivaci v terestrických podmínkách chovají jako jednoletky. Tento posun ve změně růstu můžeme pozorovat i přírodě, kdy při jednorázovém vyschnutí stanoviště lakušníky vydrží růst jako trvalky, ale když rostou na periodicky vysychajícím stanovišti, kde vodní hladina klesá každé léto, chovají se jako jednoletky. Strategie rostlin se může změnit také opačným směrem, jelikož při kultivaci rostlin ve vhodných podmínkách jsou některé obvykle jednoleté druhy (např. *R. aquatilis, R. baudotii*, *R. peltatus, R. trichophyllus*,…) schopné růst vytrvale. Některé druhy

(např. *R. rionii*) jsou však výhradně jednoleté a i v Cookových v kultivačních experimentech se chovaly jako jednoletky.

Terestrické formy lakušníků se od vodních forem značně liší (viz obr. 2). Mají obvykle kratší květní a plodní stopky a menší květy, než vodní formy. Tvar nektária zůstává u obou forem stejný. Jelikož se u terestrických forem většina ostatních znaků liší, tvar nektária se často stává důležitým znakem pro determinaci (Englmaier 2016). Tento znak však musí být brán s rezervou, jelikož není výjimkou, když tvar nektária neodpovídá údajům uváděným v určovacích klíčích (Cook 1966).

Pravděpodobně nejplastičtějším rostlinným orgánem je list (Nicotra et al. 2011). Řada druhů lakušníků vykazuje tzv. heterofylii, tedy schopnost vytvářet různé typy listů (Wells & Pigliucci 2000). Za běžných okolností tvoří lupenité listy plovoucí na hladině a niťovité listy rozdělené do úkrojků, které jsou obvykle ponořené (Cook 1966, Hong 1991). Jistý stupeň heterofylie vykazuje většina rostlin vyskytujících se jak ve vodních, tak v terestrických podmínkách (např. *Hippuris vulgaris* nebo *Ranunculus flabellaris*). Právě díky přítomnosti různých typů listů dokáží rostliny lépe osídlit vodní prostředí. U terestrických forem lakušníků nejsou tudíž dva typy listů potřebné a plovoucí listy, které jsou pravděpodobně adaptací na rozhraní vody a vzduchu, se tak na souši obvykle netvoří (Cook 1966). Pokud jsou plovoucí listy přítomny, jde o první vyvinutý pár listů (Englmaier 2016). Zbytek olistění tvoří terestrické listy, které jsou podobné listům niťovitým, ale jsou obvykle menší, silnější, světlejší a na průřezu listu nejsou okrouhlé, ale zploštělé. Také mají na rozdíl od listů vodních forem funkční průduchy. Terestrické listy jsou mnohem uniformnější než niťovité listy vodních forem, takže se podle nich druhy špatně rozeznávají (Cook 1966, Wells & Pigliucci 2000, Kim et al. 2018).



Obr. 2 – Rozdíl mezi vodní a terestrickou formou druhu *R. aquatilis*. A – vodní forma, B – terestrická forma. Převzato (Cook 1966).

Běžné určovací klíče zahrnují pouze popis vodních forem a terestrické formy podle nich mnohdy nelze určit (Husák et al. 1982, 1988, Fisher et al. 2008, Jäger et al. 2011, Kaplan 2019a). Jediný, kdo se dosud pokusil vytvořit určovací klíč pro terestrické formy, je Peter Englmaier (2016). Podle jeho určovacího klíče však není možné vůbec určit sterilní jedince. Poukazuje i na to, že ani determinace jedinců ve fertilním stavu není jednoduchá. Podle Englmaiera některé druhy odlišit lze, jiné se determinují velmi obtížně. Například *R. rionii* lze poměrně snadno odlišit od *R. aquatilis, R. baudotii* a *R. peltatus*. Lze ho ale zaměnit za *R. trichophyllus*. Relativně spolehlivými znaky k určování terestrických forem lakušníků jsou podle Englmaiera tvar nektária, květního lůžka a nažky, někdy také délka plodní stopky (u *R. baudotii*). Jediný znak ke spolehlivému určení však nikdy nestačí (Englmaier 2016).

Na základě určovacího klíče Petera Englmaiera lze sestavit stručnou charakteristiku terestrických forem jednotlivých druhů.

R. aquatilis má v terestrickém prostředí pouze bazální pár lupenitých listů, nebo lupenité listy úplně chybí. Úkrojky terestrických niťovitých listů jsou obvykle zaoblené. Květy jsou velké, (12)15–18 mm v průměru, tvar valu jamky kolem nektária je okrouhlý. Korunní lístky během kvetení neopadávají. Počet tyčinek se pohybuje mezi 15 a 30. Nažky jsou 1,4–1,7 mm dlouhé, nezřetelně žebrované. Květní lůžko má kulovitý až mírně vejcovitý tvar.

R. baudotii má obvykle také pouze terestrické niťovité listy, lupenité listy často chybí. Průměr květů je 12–15 mm a korunní lístky přetrvávají po celou dobu kvetení. Nažky mají za zralosti úzký křídlatý lem. Květní lůžko je prodloužené, dlouze vejcovité až kuželovité.

R. peltatus také obvykle postrádá lupenité listy, nebo se tyto listy vyskytují pouze jako bazální pár hned po vyklíčení. Úkrojky terestrických listů jsou zaokrouhlené a špičky úkrojků nesesychají. Květy jsou velké, jejich velikost dosahuje 15–20(25) mm v průměru, korunní lístky neopadávají. Nektária jsou hruškovitého tvaru. Počet tyčinek se pohybuje mezi 15 a 25. Nažky jsou zřetelně žebrované a jejich délka přesahuje 1,7 mm. Tvar květního lůžka je kulovitý až mírně vejcovitý

R. rionii lupenité listy nikdy netvoří. Květy jsou malé a v průměru měří pouze 6–8(12) mm, korunní lístky opadávají. Nažky nejsou okřídlené. Květní lůžko je prodloužené, dlouze vejcovitého tvaru.

R. trichophyllus má vždy pouze niťovité listy a špičky jejich úkrojků zasychají. Průměr květu se pohybuje mezi 8 a 12 mm, korunní plátky opadávají. Tyčinek je obvykle 10–15. Květní lůžko je kulovité nebo jen mírně vejcovité.

1.5 Cíle práce

Ačkoliv jsou terestrické formy u lakušníků poměrně běžné, nebyl pro ně dosud vytvořen spolehlivý určovací klíč a neexistuje ani souhrnná práce zabývající se podrobným popisem jejich morfologie. Zároveň je ale předpoklad, že alespoň některé druhy od sebe lze odlišit, což bylo zjištěno i v rámci mojí bakalářské práce, na kterou tato diplomová práce přímo navazuje a doplňuje je o další středoevropské druhy lakušníků. Hlavní cíle práce jsou:

1. Zjistit, zda lze od sebe na základě morfologických znaků odlišit terestrické formy druhů *Ranunculus aquatilis*, *R. baudotii*, *R. peltatus*, *R. rionii*, *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B.

2. Stanovit rozmezí variability jednotlivých znaků pro tyto druhy.

3. Porovnat výsledky s literaturou.

2. Metodika

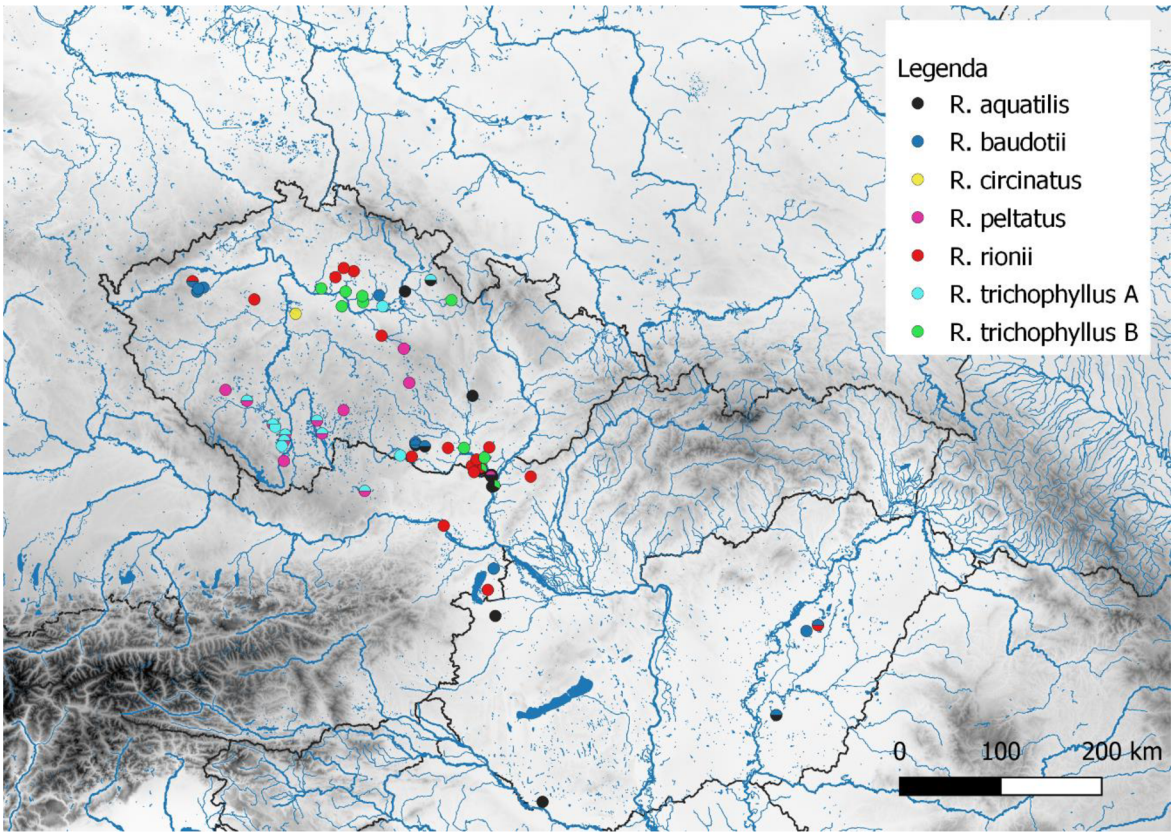
2.1 Terénní sběr

Na bakalářskou a diplomovou práci bylo odebráno v terénu celkem 411 vzorků. V rámci bakalářské práce bylo nasbíráno 134 jedinců, a to 64 vzorků druhu *Ranunculus peltatus* a 70 vzorků druhu *R. trichophyllus* A. V rámci diplomové práce bylo odebráno dohromady 277 vzorků. Diplomová práce doplnila data z bakalářské práce o několik dalších jedinců druhů *R. peltatus* (5 vzorků) a *R. trichophyllus* A (8 vzorků), ale převážně byly měřeny druhy *R. aquatilis* (77 vzorků), *R. baudotii* (63 vzorků), *R. rionii* (75 vzorků) a *R. trichophyllus* B (48 vzorků). Jeden vzorek se podařilo získat od druhu *R. circinatus*, který jinak terestrické formy téměř netvoří.

Data z bakalářské a diplomové práce pocházejí dohromady z 65 různých lokalit v oblasti střední Evropy (viz obr. 3, tab. 3). Bakalářská práce je založena na vzorcích ze 13 lokalit a vzorky na diplomovou práci byly nasbírány na 52 lokalitách. Většina lokalit je z území České republiky (55), 5 lokalit pochází z Maďarska, 4 z Rakouska a 1 ze Slovenska. Na většině lokalit se vyskytoval pouze jeden ze studovaných taxonů, ale na některých místech byly přítomny populace dvou i tří druhů lakušníků najednou. Z každé populace bylo odebráno 1–10 rostlin v závislosti na velikosti populace. Většina populací rostla na obnažených rybničních dnech, ale některé vzorky pocházejí i z říčních náplavů, tůní v nivách řek, břehů pískoven a dalších podobných stanovišť.

Z každé rostliny byla odebrána malá část na určení druhu průtokovou cytometrií a ze zbytku rostliny byl pořízen herbářový doklad. Korunní lístky byly otrhány pinzetou a vloženy do malé obálky vytvořené z přeloženého papíru. Většina herbářových položek je uložena v herbářích katedry botaniky PřF JU (CBFS). Položky sbírané Janem Prančlem a Zdeňkem Kaplanem jsou uloženy v Botanickém ústavu AV ČR v Průhonicích.

Mapa s vyznačenými lokalitami sběru (obr. 3) byla vytvořena v programu QGIS 3.10.3 (QGIS Development Team 2020) a jako podklad byla použita SRTM data (Jarvis et al. 2020).



Obr. 3 – mapa lokalit.

Tab. 3 – Seznam lokalit. Lokality převzaté z bakalářské práce jsou podbarveny šedě.

Číslo	Lokalita	Zeměpisné souřadnice (systém WGS84)	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
1	Česká republika; okres Blansko; Skalní mlýn, rybník Jakubovo jezero	49°21'36"N, 16°41'30"E	*R. aquatilis*	4	Petr Koutecký Karin Hustáková	15.08.2019
2	Česká republika; okres Brno-venkov; Ivaň: tůň v Plačkově lese	48°56'26"N, 16°35'17"E	*R. trichophyllus* B	5	Linda Vlčková Petr Koutecký	27.05.2020
3	Česká republika; okres Břeclav; Břeclav: Soutok, Lánské louky, pískovna Dolečky	48°42'30"N, 16°55'23"E	*R. aquatilis*	7	Linda Vlčková Petr Koutecký	28.05.2020
3	Česká republika; okres Břeclav; Břeclav: Soutok, Lánské louky, pískovna Dolečky	48°42'30"N, 16°55'23"E	*R. peltatus*	2	Petr Koutecký	07.06.2014
4	Česká republika; okres Břeclav; Břeclav: Soutok, Lánské louky, tůň u Veřejné cesty	48°42'27"N, 16°55'41"E	*R. aquatilis*	5	Petr Koutecký Zdeněk Kaplan	07.06.2014
5	Česká republika; okres Břeclav; Břeclav: Soutok, Lánské louky, zemník Bornova jáma	48°42'54"N, 16°55'2"E	*R. aquatilis*	9	Linda Vlčková Petr Koutecký	28.05.2020
5	Česká republika; okres Břeclav; Břeclav: Soutok, Lánské louky, zemník Bornova jáma	48°42'54"N, 16°55'2"E	*R. peltatus*	2	Linda Vlčková Petr Koutecký	28.05.2020
6	Česká republika; okres Břeclav; Břeclav: Soutok, tůň u Kazůbkové cesty	48°43'22"N, 16°55'32"E	*R. aquatilis*	2	Jan Prančl	21.05.2014
7	Česká republika; okres Břeclav; Hlohovec: Allahovy rybníky	48°46'7"N, 16°47'47"E	*R. aquatilis*	5	Linda Vlčková Petr Koutecký	29.05.2020
7	Česká republika; okres Břeclav; Hlohovec: Allahovy rybníky	48°46'7"N, 16°47'47"E	*R. rionii*	10	Linda Vlčková Petr Koutecký	29.05.2020
7	Česká republika; okres Břeclav; Hlohovec: Allahovy rybníky	48°46'7"N, 16°47'47"E	*R. trichophyllus* B	9	Linda Vlčková Petr Koutecký	29.05.2020
7	Česká republika; okres Břeclav; Hlohovec: Allahovy rybníky	48°46'7"N, 16°47'48"E	*R. trichophyllus* B	1	Jan Prančl Zdeněk Kaplan	27.06.2011

Číslo	Lokalita	Zeměpisné souřadnice (systém WGS84)	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
8	Česká republika; okres Břeclav; Kobylí: Biocentrum Ostrůvek	48°56'43"N, 16°53'51"E	*R. rionii*	8	Linda Vlčková Petr Koutecký	27.05.2020
9	Česká republika; okres Břeclav; Lanžhot: Dědova pískovna	48°38'1"N, 16°57'35"E	*R. aquatilis*	6	Linda Vlčková Petr Koutecký	28.05.2020
9	Česká republika; okres Břeclav; Lanžhot: Dědova pískovna	48°38'1"N, 16°57'35"E	*R. rionii*	5	Linda Vlčková Petr Koutecký	28.05.2020
9	Česká republika; okres Břeclav; Lanžhot: Dědova pískovna	48°38'1"N, 16°57'35"E	*R. trichophyllus* B	1	Linda Vlčková Petr Koutecký	28.05.2020
10	Česká republika; okres Břeclav; Lanžhot: Soutok, zemník na Košárských loukách	48°37'40"N, 16°55'59"E	*R. aquatilis*	4	Zdeněk Kaplan	08.06.2014
11	Česká republika; okres Břeclav; Lanžhot: Soutok; Lánské louky, kanál u Tůně Jaroslava Holého	48°42'21"N, 16°55'57"E	*R. aquatilis*	8	Linda Vlčková Petr Koutecký	28.05.2020
12	Česká republika; okres Břeclav; Lednice: Prostřední rybník	48°46'59"N, 16°47'32"E	*R. rionii*	9	Jan Prančl Zdeněk Kaplan	29.06.2011
13	Česká republika; okres Břeclav; Mikulov: Mušlovský dolní rybník	48°47'44"N, 16°41'2"E	*R. rionii*	5	Linda Vlčková Petr Koutecký	29.05.2020
14	Česká republika; okres Břeclav; Rakvice: Trkmanec-Rybníčky	48°51'46"N, 16°50'22"E	*R. trichophyllus* B	5	Linda Vlčková Petr Koutecký	27.05.2020
14	Česká republika; okres Břeclav; Rakvice: Trkmanec-Rybníčky	48°51'43"N, 16°50'17"E	*R. trichophyllus* B	2	Jan Prančl Zdeněk Kaplan	28.06.2011
15	Česká republika; okres Břeclav; Valtice: Úvalský rybník	48°44'42"N, 16°42'38"E	*R. rionii*	4	Linda Vlčková Petr Koutecký	29.05.2020
16	Česká republika; okres Břeclav; Zaječí: pískovna v lokalitě Ohrádky	48°50'47"N, 16°44'28"E	*R. rionii*	6	Linda Vlčková Petr Koutecký	27.05.2020

Číslo	Lokalita	Zeměpisné souřadnice (systém WGS84)	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
17	Česká republika; okres České Budějovice, Čejkovice: rybník Malý Machovec	49°0'1"N, 14°22'25"E	*R. peltatus*	7	Petr Koutecký Eva Koutecká	12.05.2018
17	Česká republika; okres České Budějovice, Čejkovice: rybník Malý Machovec	49°0'1"N, 14°22'25"E	*R. trichophyllus* A	7	Petr Koutecký Eva Koutecká	12.05.2018
18	Česká republika; okres České Budějovice; Habří: Haberský Mlýnský rybník	48°57'24"N, 14°20'37"E	*R. trichophyllus* A	10	Petr Koutecký Eva Koutecká	09.09.2018
19	Česká republika; okres České Budějovice; Zliv: rybník Bezdrev	49°2'52"N, 14°23'9"E	*R. peltatus*	10	Linda Vlčková Petr Koutecký	15.05.2018
19	Česká republika; okres České Budějovice; Zliv: rybník Bezdrev	49°2'52"N, 14°23'9"E	*R. trichophyllus* A	8	Linda Vlčková Petr Koutecký	15.05.2018
20	Česká republika; okres Český Krumlov; Černice: Vltava (náplavy pod ústím Jíleckého pot., 0,9 km JZ od kostela)	48°50'6"N, 14°22'8"E	*R. peltatus*	7	Petr Koutecký	13.07.2018
21	Česká republika; okres Havlíčkův Brod; Ždírec nad Doubravou: rybník Januš	49°44'11"N, 15°50'47"E	*R. peltatus*	1	Pavel Kúr	2011
22	Česká republika; okres Hradec Králové; Hradec Králové: býv. vojenské cvičiště Na Plachtě	50°11'24"N, 15°51'38"E	*R. aquatilis*	9	Linda Vlčková Petr Koutecký	06.07.2021
23	Česká republika; okres Hradec Králové; Stará Voda: pískovna Kosičky II	50°9'35"N, 15°32'32"E	*R. baudotii*	3	Jan Prančl	28.05.2013
24	Česká republika; okres Chomutov; Mašťov: vodní nádrž Sedlec	50°16'09"N, 13°14'41"E	*R. baudotii*	4	Linda Vlčková Petr Koutecký	30.06.2021
24	Česká republika; okres Chomutov; Mašťov: vodní nádrž Sedlec	50°16'09"N, 13°14'41"E	*R. rionii*	1	Linda Vlčková Petr Koutecký	30.06.2021
25	Česká republika; okres Chrudim; Běstvina, Pařížov, rybník Starý	49°50'21"N, 15°34'22"E	*R. rionii*	7	Petr Koutecký	10.07.2019

Číslo	Lokalita	Zeměpisné souřadnice (systém WGS84)	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
26	Česká republika; okres Jičín; Psinice: rybník Dědek	50°20'58"N, 15°13'44"E	*R. rionii*	1	Zdeněk Kaplan	10.06.2012
27	Česká republika; okres Jindřichův Hradec, Novosedly nad Nežárkou: Oběšený	49°3'25"N, 14°50'18"E	*R. peltatus*	7	Linda Vlčková Petr Koutecký	14.06.2018
27	Česká republika; okres Jindřichův Hradec, Novosedly nad Nežárkou: Oběšený	49°3'25"N, 14°50'18"E	*R. trichophyllus* A	10	Linda Vlčková Petr Koutecký	14.06.2018
28	Česká republika; okres Kladno; Kamenné Žehrovice: dlouhodobě vypuštěný ryb. Šmanťák	50°7'36"N, 14°0'20"E	*R. rionii*	1	Jan Prančl	17.05.2012
29	Česká republika; okres Klatovy; Olšany: Jámský rybník	49°24'26"N, 13°39'4"E	*R. peltatus*	5	Linda Vlčková Petr Koutecký	20.06.2019
30	Česká republika; okres Kolín; Cerhenice, tůňka v polích východně od obce	50°4'21"N, 15°4'58"E	*R. trichophyllus* B	1	Alexandra Čurnová	16.05.2019
31	Česká republika; okres Kolín; Radovesnice II: strouha v Dománovickém lese	50°6'18"N, 15°20'37"E	*R. trichophyllus* B	7	Petr Koutecký	08.06.2021
32	Česká republika; okres Louny; Buškovice: Velký Olprám (bývalý kaolinový lom)	50°13'15"N, 13°22'42"E	*R. baudotii*	9	Linda Vlčková Petr Koutecký	30.06.2021
33	Česká republika; okres Louny; Dětaň: bývalý kaolinový lom	50°11'19"N, 13°18'11"E	*R. baudotii*	10	Zdeněk Kaplan	03.07.2014
34	Česká republika; okres Louny; Nepomyšl: Nepomyšlský rybník (bývalý kaolinový lom)	50°12'44"N, 13°18'49"E	*R. baudotii*	4	Linda Vlčková Petr Koutecký	30.06.2021
35	Česká republika; okres Mladá Boleslav; Chudíř: Dubnický rybník	50°18'8"N, 15°0'17"E	*R. rionii*	1	Jan Prančl	07.06.2013
36	Česká republika; okres Mladá Boleslav; Ujkovice: rybník Kabát	50°22'26"N, 15°6'20"E	*R. rionii*	2	Zdeněk Kaplan	11.06.1999

Číslo	Lokalita	Zeměpisné souřadnice (systém WGS84)	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
37	Česká republika; okres Nymburk; Kouty: tůň v SV rohu Křečkovského boru	50°11'19"N, 15°7'43"E	*R. trichophyllus* B	10	Linda Vlčková Petr Koutecký	05.07.2021
38	Česká republika; okres Nymburk; Kněžičky: vyschlý rybníček v oboře Kněžičky	50°9'13"N, 15°20'7"E	*R. trichophyllus* B	2	Zdeněk Kaplan	10.06.2015
39	Česká republika; okres Nymburk; Lysá nad Labem: tůň na Hrabanovské černavě	50°12'49"N, 14°49'44"E	*R. trichophyllus* B	3	Jan Prančl Pavel Trávníček	14.06.2012
40	Česká republika; okres Pardubice; Břehy: rybník Černý Nadýmač	50°4'21"N, 15°35'2"E	*R. trichophyllus* A	5	Linda Vlčková Petr Koutecký	06.07.2021
41	Česká republika; okres Pelhřimov; Nová Včelnice: rybník Chochol	49°14'43"N, 15°6'12"E	*R. peltatus*	6	Petr Koutecký Vojtěch Dolejšek	13.06.2019
42	Česká republika; okres Prachatice, Malovice: rybník Jezero	49°6'41"N, 14°15'42"E	*R. trichophyllus* A	10	Linda Vlčková Petr Koutecký	29.05.2018
43	Česká republika; okres Rychnov nad Kněžnou; Dobruška; rybník Drnov	50°16'45"N, 16°10'36"E	*R. trichophyllus* A	1	Linda Vlčková Petr Koutecký	06.07.2021
43	Česká republika; okres Rychnov nad Kněžnou; Dobruška; rybník Drnov	50°16'45"N, 16°10'36"E	*R. aquatilis*	3	Linda Vlčková Petr Koutecký	06.07.2021
44	Česká republika; okres Strakonice; Čížčenice – Strpí: rybník Nový u Strpí	49°07'53"N, 14°13'59"E	*R. peltatus*	10	Linda Vlčková Petr Koutecký	29.05.2018
44	Česká republika; okres Strakonice; Čížčenice – Strpí: rybník Nový u Strpí	49°07'53"N, 14°13'59"E	*R. trichophyllus* A	10	Linda Vlčková Petr Koutecký	29.05.2018
45	Česká republika; okres Strakonice; Leskovice: rybník Malduchy	49°19'12"N, 13°54'51"E	*R. peltatus*	3	Petr Koutecký	10.07.2014
45	Česká republika; okres Strakonice; Leskovice: rybník Malduchy	49°19'12"N, 13°54'51"E	*R. trichophyllus* A	8	Petr Koutecký	10.07.2014

Číslo	Lokalita	Zeměpisné souřadnice (systém WGS84)	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
46	Česká republika; okres Tábor; Drahov: rybník Smíchov II	49°09'37"N, 14°46'41"E	*R. peltatus*	2	Petr Koutecký	02.06.2014
46	Česká republika; okres Tábor; Drahov: rybník Smíchov II	49°09'37"N, 14°46'41"E	*R. trichophyllus* A	2	Petr Koutecký	02.06.2014
47	Česká republika; okres Ústí nad Orlicí; Kameničná: Kunrtův rybník (v mapách též Kaplanův)	50°07'15"N, 16°25'58"E	*R. trichophyllus* B	2	Zdeněk Kaplan	2008
48	Česká republika; okres Znojmo; Bezkov: rybník Nový Bezkov	48°52'15"N, 15°56'37"E	*R. rionii*	3	Linda Vlčková Petr Koutecký	29.05.2020
49	Česká republika; okres Znojmo; Bojanovice: Bojanovický rybník	48°57'49"N, 15°59'30"E	*R. aquatilis*	1	Linda Vlčková Petr Koutecký	26.05.2020
49	Česká republika; okres Znojmo; Bojanovice: Bojanovický rybník	48°57'49"N, 15°59'30"E	*R. baudotii*	2	Linda Vlčková Petr Koutecký	26.05.2020
50	Česká republika; okres Znojmo; Jevišovice: mělký rybník na J okraji obce	48°59'2"N, 15°59'17"E	*R. baudotii*	6	Linda Vlčková Petr Koutecký	26.05.2020
51	Česká republika; okres Znojmo; Mikulovice: bývalá pískovna Jezero	48°57'9"N, 16°6'17"E	*R. baudotii*	8	Linda Vlčková Petr Koutecký	26.05.2020
51	Česká republika; okres Znojmo; Mikulovice: bývalá pískovna Jezero	48°57'9"N, 16°6'17"E	*R. aquatilis*	1	Linda Vlčková Petr Koutecký	26.05.2020
52	Česká republika; okres Znojmo; Podmyče: U Jejkala, dolní rybník	48°52'47"N, 15°48'7"E	*R. trichophyllus* A	2	Libor Ekrt	03.05.2020
53	Česká republika; okres Znojmo; Suchohrdly u Miroslavi: Suchohrdelský rybník	48°56'26"N, 16°23'22"E	*R. rionii*	3	Linda Vlčková Petr Koutecký	26.05.2020
54	Česká republika; okres Žďár nad Sázavou; Znětínek: Staroborský rybník	49°27'51"N, 15°54'47"E	*R. peltatus*	3	Libor Ekrt	květen 2013

Číslo	Lokalita	Zeměpisné souřadnice (systém WGS84)	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
55	Česká republika; Praha; Praha-Šeberov: Kovářský rybník	50°00'50"N, 14°30'50"E	*R. circinatus*	1	Jan Prančl	16.06.2014
56	Maďarsko; okres Barcs; Darány: jezero mezi písečnými dunami	45°59'46"N, 17°33'16"E	*R. aquatilis*	7	Zdeněk Kaplan Petr Koutecký Magdalena Lučanová	08.05.2019
57	Maďarsko; okres Kapuvár; Vitnyéd: obnažené dno téměř vyschnuté pískovny	47°33'49"N, 16°58'21"E	*R. aquatilis*	1	Zdeněk Kaplan Petr Koutecký Magdalena Lučanová	07.05.2019
58	Maďarsko; okres Karcag; Kunmadaras: mokřad na S obce	47°26'16"N, 20°48'10"E	*R. baudotii*	2	Atillla Mesterházy	24.05.2021
59	Maďarsko; okres Szentes; Szetnes: mokřad v NP Körös-Maros, Cserebökény	46°43'58"N, 20°25'54"E	*R. aquatilis*	1	Atillla Mesterházy	22.05.2021
59	Maďarsko; okres Szentes; Szetnes: mokřad v NP Körös-Maros, Cserebökény	46°43'58"N, 20°25'54"E	*R. baudotii*	2	Atillla Mesterházy	23.05.2021
60	Maďarsko; okres Tiszafüred; Nagyiván: S část mokřadu v NP Hortobágyi	47°29'11"N, 20°56'42"E	*R. aquatilis*	4	Atillla Mesterházy	21.05.2021
60	Maďarsko; okres Tiszafüred; Nagyiván: S část mokřadu v NP Hortobágyi	47°29'11"N, 20°56'42"E	*R. baudotii*	9	Atillla Mesterházy	21.05.2021
60	Maďarsko; okres Tiszafüred; Nagyiván: S část mokřadu v NP Hortobágyi	47°29'11"N, 20°56'42"E	*R. rionii*	4	Atillla Mesterházy	21.05.2021
61	Rakouská republika; okres Neusiedl am See; Apetlon: vysychající jezera Wörtenlacken	47°46'45"N, 16°52'46"E	*R. rionii*	1	Clemens Pachschwöll	23.09.2017
62	Rakouská republika; okres Neusiedl am See; Zurndorf: bývalá štěrkovna	47°57'20"N, 16°57'08"E	*R. baudotii*	4	Harald Shau	15.09.2017

Číslo	Lokalita	Zeměpisné souřadnice (systém WGS84)	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
63	Rakouská republika; okres Tulln; Klosterneuburg: břeh slepého ramene Dunaje	48°18'28"N, 16°20'17"E	*R. rionii*	2	Dieter Reich	22.09.2018
64	Rakousko; okres Zwettl; Rudmanns: rybník Rudmannser Teich	48°35'28"N, 15°21'52"E	*R. peltatus*	4	Petr Koutecký	06.06.2017
64	Rakousko; okres Zwettl; Rudmanns: rybník Rudmannser Teich	48°35'28"N, 15°21'52"E	*R. trichophyllus* A	5	Petr Koutecký	06.06.2017
65	Slovenská republika; okres Senica; Kunov: vodní nádrž Kunov	48°42'29"N, 17°24'29"E	*R. rionii*	2	Linda Vlčková Petr Koutecký	10.11.2018

2.2 Průtoková cytometrie

Středoevropské druhy lakušníků se liší ve velikosti genomu, proto byla metoda průtokové cytometrie použita k ověření určení druhu jinak morfologicky podobných terestrických forem (viz kapitola 1.2.3). Vzorky byly klasifikovány na základě rozmezí velikosti genomu jednotlivých druhů vycházející z práce Prančla a kol. (2018). V tabulce č. 4 jsou uvedeny velikosti genomu pro studované taxony a poměr vzorku ku standardu. Jako standard byla použita *Bellis perennis*, která má podobnou velikost genomu jako lakušníky (2C = 3,38 pg, Schönswetter et al. 2007), s žádným z druhů se však nepřekrývá.

Tab. 4 – Velikost genomu jednotlivých druhů lakušníků (Prančl et al. 2018). Jako 2C je označeno rozmezí velikosti genomu v pg DNA. Poměr označuje poměr vzorku ku standardu *Bellis perennis*.

Druh	2C (pg)	Poměr
R. aquatilis	12,65–13,63	3,74–4,03
R. baudotii	8,49–9,02	2,51–2,67
R. circinatus	5,46–5,78	1,62–1,71
R. peltatus	6,50–7,03	1,92–2,08
R. rionii	5,18–5,56	1,53–1,64
R. trichophyllus A	8,73–9,26	2,58–2,74
R. trichophyllus B	9,07–10,28	2,68–3,04

Nejprve byla provedena izolace buněčných jader z listů. V Petriho misce byl spolu s 0,4 ml vychlazeného pufru Otto I (0,1M kyselina citrónová, 0,5% Tween 20) žiletkou nasekán vzorek (asi 0,25 cm^2 listu z jednoho nebo více jedinců ze stejné populace) společně se stejným množstvím standardu *Bellis perennis*. Následně byla kvůli odstranění zbytků listové tkáně suspenze přefiltrována přes 42-μm filtr (tkanina Uhelon 130T) a inkubována po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo k izolovaným jádrům přidáno 0,8 ml pufru Otto II (0,4M $Na_2HPO_4.12H_2O$ a 2-merkaptoethanol (koncentrace 2 μl/ml)). Jako fluorescenční barvivo sloužil 4.6-diamidino-2-fenylindol (DAPI, koncentrace 4 μg/ml) nebo propidium jodid (PI) a RNáza IIA (finální koncentrace obou 50 μg/ml). Vzorek se nechal stát po dobu nejméně 1 minuty a poté byl vložen do průtokového cytometru.

Vzorky, u kterých bylo použito fluorescenční barvivo DAPI, byly analyzovány průtokovým cytometrem Partec CyFlow Space (Partec GmbH, Münster, Německo, nyní Sysmex). Zdrojem světla byla UV-LED (365 nm) a byla zaznamenána fluorescence 3000–5000 částic. Vzorky s barvivem PI byly analyzovány pomocí průtokového cytometru Partec CyFlow Space se zeleným laserem jako zdrojem záření (Cobolt Samba, 532 nm, 100 mW) a zaznamenána byla fluorescence 5000 částic. Histogramy byly analyzovány v programu FloMax, ver. 2.4d (Partec GmbH) a vzorové obrázky byly vytvořeny v programu R (R Core Team 2018).

U všech vzorků byl vypočten poměr vzorku a standardu, podle něhož byl určen druh. K analýze většiny vzorků bylo použito fluorescenční barvivo PI, ale u některých vzorků bylo použito barvivo DAPI. U analýz, kde bylo použito barvivo DAPI, byl poměr vzorku ku standardu přepočten, aby odpovídal hodnotám u analýz měřených s barvivem PI. Poměr vzorku a standardu měřený s PI je v průměru 1,25x větší než poměr měřený s DAPI (Koutecký et al., nepubl. data, na základě vzorků změřených s oběma barvivy). Data měřená s barvivem DAPI byla vynásobena koeficientem 1,25, aby poměr vzorek/standard odpovídal hodnotám naměřeným s PI.

U vzorků, které jsem sbírala se svým školitelem v rámci bakalářské a diplomové práce, a položek od Atilly Mesterháziho jsem měřila velikost genomu sama se svým školitelem. U většiny ostatních vzorků byly k dispozici výsledky získané stejnou metodou z čerstvého materiálu (sběry převážně z let 2010–2017).

U několika starších sběrů nebylo určení druhu cytometricky ověřeno z čerstvého materiálu (lokality Kabát a Kněžičky, č. lokalit 36 a 38 viz tab. 3). V takovém případě byla provedena analýza ze zralých nažek, pro srovnání byly analyzovány také nažky z jiných populací všech druhů, kde bylo určení ověřeno z čerstvého materiálu. Byla použita stejná metodika jako pro listy a barvivo DAPI. Byla odečítána velikost triploidního genomu endospermu, jehož pík je u lakušníků vyšší a lépe hodnotitelný než pík diploidního embrya. Získané hodnoty byly vyděleny 1,5x, aby výsledek odpovídal ostatním diploidním hodnotám.

U novějších sběrů byly průtokovou cytometrií změřeny všechny rostliny. U některých starších dat, která jsem získala společně s položkami (lokality č. 4, 10, 14 a 33 viz tab. 3), byla změřena pouze část populace, a pokud byly zjištěné hodnoty i populace jako celek morfologicky uniformní, výsledky byly vztaženy na celou populaci.

U jedné populace (Kunrtův rybník, lokalita č. 47 viz tab. 3) nebyla k dispozici žádná data a kvůli absenci plodů nemohla být provedena analýza z nažek. Tyto rostliny byly za účelem ověření určení druhu osekvenovány (viz kapitola 2.3).

2.3 Sekvenace

Kvůli ověření určení druhu bylo 12 jedinců osekvenováno (9 v rámci bakalářské a 3 v rámci diplomové práce).

Vzorky byly standardně klasifikovány podle velikosti genomu metodou průtokové cytometrie. Tato metoda spolehlivě rozezná jednotlivé druhy i jejich F_1 kříženec (tj. kříženec první generace). Průtokovou cytometrií však nelze odhalit zpětnou hybridizaci. Ze studovaných taxonů tvoří zpětné kříženec zejména druhy *R. peltatus* a *R. trichophyllus* A (Prančl et al. 2018, Koutecký et al. 2022). Na základě předběžné analýzy hlavních komponent a diskriminačních analýz bylo vybráno 9 jedinců, kteří byli podle velikosti genomu určeni jako *R. peltatus*, ale jejich morfologie odpovídala spíše druhu *R. trichophyllus* A. Tyto vzorky byly osekvenovány a jedinci, u nichž se potvrdil hybridní původ, byli z dat vynecháni a analýzy přepočítány.

Dále byla sekvenována jedna rostlina určená jako *R. trichophyllus* B, která pochází z oblasti, kde se vyskytuje vzácný kříženec *R. aquatilis* × *R. peltatus*, který má podobnou velikost genomu.

Sekvenovány byly také dvě další položky, které pocházely z doby, kdy nebylo prováděno měření velikosti genomu a nebyly u nich k dispozici nažky pro dodatečné měření a jejich určení do druhu tedy nebylo cytometricky ověřeno.

2.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena CTAB metodou (Doyle & Doyle 1987) a byly k ní použity vzorky z herbářových položek, případně listy vysušené v silikagelu, pokud byly k dispozici.

Nejprve bylo asi 0,5 cm^2 listu rozdrceno pomocí dvou kovových kuliček v mlýnku Retsch 400MM po dobu 1 min za maximální rychlosti. K homogenizovanému materiálu bylo přidáno 700 µl zásobního roztoku CTAB (2% (w/v) CTAB, 0,1M Tris, 0,02M Na_2-EDTA, 1,4M NaCl, 2% (w/v) PVP-40) a 10 µl 2-merkaptoethanolu. Poté byly zkumavky s materiálem promíchány a inkubovány po dobu 30 minut při 50 °C na třepačce. Po uplynutí

této doby byly zkumavky stočeny na stolní centrifuze, jejich obsah byl přenesen do nových zkumavek a byly vyjmuty kovové kuličky. Následně bylo k roztoku přidáno 500 µl směsi chloroform : isoamylalkohol (poměr 24 : 1), zkumavky byly promíchány a ponechány 5 minut v klidu. Poté byly vzorky centrifugovány 10 min při 10 000 rpm. Při centrifugaci se oddělila horní vodná fáze s DNA, která byla přepipetována do nových zkumavek spolu s 500 µl vychlazeného isopropanolu. Zkumavky byly znovu promíchány a ponechány 30 minut v -20ºC. Poté byly vzorky vloženy do centrifugy na dobu 5 minut při 13 000 rpm. Během centrifugace se na dně zkumavky vytvořil bílý pelet DNA. Supernatant byl odpipetován a následovalo přečištění DNA. Nejprve bylo do zkumavek s peletem DNA přidáno 400 µl vychlazeného 96% ethanolu, zkumavky byly promíchány a 15 minut inkubovány v termobloku při 37 ºC. Poté byly centrifugovány 5 minut při 13 000 rpm. Zbylý supernatant byl opět odpipetován, do každé zkumavky s DNA bylo přidáno 200 µl vychlazeného (-20°C) 70% ethanolu a vzorky byly promíchány. Následně byly ponechány v klidu při pokojové teplotě a po 5 minutách byly vloženy do centrifugy (5 min, 13 000 rpm). Supernatant byl odpipetován a přečištěný pelet DNA byl vysušen (15 minut při pokojové teplotě v otevřených zkumavkách). Nakonec bylo k peletu přidáno 30 µl sterilní vody a zkumavky byly vloženy na noc do ledničky, aby došlo k rozpuštění DNA ve vodě.

2.3.2 PCR

Získaná DNA byla použita k amplifikaci úseku ITS (Internal transcribed spacer) jaderné ribozomální DNA a jednoho chloroplastového úseku (3′rps16-5′trnK). Kombinace těchto úseků spolehlivě odlišuje studované druhy (Koutecký et al. 2022). Vzhledem k předpokládané horší kvalitě a fragmentaci DNA u herbářových položek byl úsek ITS amplifikován po částech, ITS1 a ITS2. Pro amplifikaci úseku ITS1 byly použity primery ITS-F (King et al. 2001) a ITS2 (White et al. 1990) a k amplifikaci úseku ITS2 sloužily primery ITS3 a ITS4 (White et al. 1990). Chloroplastový úsek byl amplifikován primery rps16x2-a a trnKx1-a (Shaw et al. 2007). Sekvence všech použitých primerů jsou vypsány v tabulce 5.

Na jednu reakci bylo použito 3,75 µl PP Master Mix (Top-Bio, Česká republika), 0,45 µl každého primeru (koncentrace 5 µM), 2,35 µl H_2O a 0,5 µl DNA. Celkový objem reakce činil 7,5 µl. Počáteční denaturace PCR trvala 5 min a probíhala při 94 ºC. Dále proběhlo 35 cyklů po 30 s při teplotě 94 ºC, 30 s při 53 ºC a 1 min při 72 ºC. Závěrečná extenze probíhala při 72 ºC po dobu 10 minut.

Tab. 5 – Sekvence použitých primerů

Název primeru	Sekvence primeru	Citace
ITS-F	CTC CTT CCT CTA AAT GAT A	King et al. 2001
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	White et al. 1990
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	White et al. 1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. 1990
rps16x2-a	GAA AGT GGG TTT TTA TGA TCC	Shaw et al. 2007
trnKx1-a	TAA AAG CCG AGT ACT CTA CC	Shaw et al. 2007

2.3.3 Elektroforéza

Elektroforéza sloužila ke kontrole, zda u všech vzorků proběhla PCR, než byly vzorky poslány na sekvenaci. 1,5 µl PCR produktu bylo smícháno s 0,5 µl nanášecího pufru obsahujícího fluorescenční barvivo GelRed. Vzniklá směs byla přenesena na 1,5% agarózový gel v pufru TBE. Spolu se vzorky byl na gel nanesen také ladder (100 bp) a negativní kontrola. Po proběhnutí elektroforézy, která probíhala pod napětím 120 V, byl gel vyfocen pod UV světlem. Snímky byly zachyceny a upraveny v programu Scion VisiCapture. Vzorky s viditelným intenzivním proužkem amplifikované DNA nemusely být nijak ředěny a byly přečištěny a poslány na sekvenaci. U vzorků, kde nebyl patrný intenzivní proužek, byl původní izolát DNA zředěn vodou v poměru 1:10. Poté byly PCR i elektroforéza opakovány s původními i zředěnými vzorky.

2.3.4 Sekvenace

PCR produkty byly nejprve enzymaticky přečištěny směsí dvou enzymů Exo-AP (exonukleasa I a alkalická fosfatasa, 1 : 1) tak, že byly smíchány 2 µl PCR produktu s 0,7 µl směsi enzymů. Poté byly vzorky krátce centrifugovány a vloženy do cycleru na 15 min při 37°C a 15 min při 85°C. Do nových zkumavek byla připravena sekvenační směs – 2,5 µl primeru (ITS-F, ITS3 nebo rps16x2-a, koncentrace 5 pmol/µl), 4,8 µl sterilní vody a 2,7 µl přečištěného PCR produktu. Tyto vzorky byly následně zpracovány sekvenační firmou GATC Biotech (součást Eurofins Genomics). Získané sekvence byly upraveny v programu Finch TV 1.4 software (Geospiza, USA). Nečitelné začátky a konce sekvencí byly vymazány a pozice s mnohonásobnými píky byly přepsány na degenerované báze podle IUPAC kódování. Upravené sekvence byly seřazeny v programu BioEdit 7.2.0 (Hall 1999)

a porovnány se vzorovými sekvencemi. Na závěr byly sekvence v programu FaBox (Villesen 2007) rozděleny do skupin s identickou sekvencí (haplotypů).

2.4 Měření morfologických znaků

Pro účel morfometrických analýz byly zkoumány znaky na vegetativních i generativních orgánech (viz tab. 6). Jednotlivé znaky byly vybrány na základě určovacích klíčů (např. Englmaier 2016, Kaplan 2019a).

Znaky měřené na listu (délka řapíku a čepele; délka, šířka a počet listových úkrojků) byly měřeny na listu, v jehož paždí vyrůstá první květní stopka ve směru od báze lodyhy.

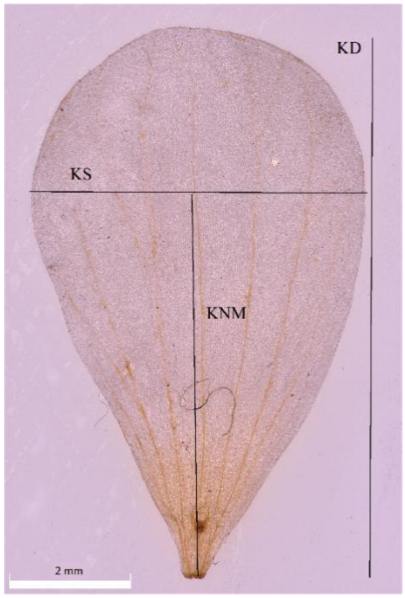
Délka listového úkrojku a délka nažky byla měřena pro každý vzorek třikrát (tři různé úkrojky a tři různé nažky). Do analýz byl zahrnut průměr ze získaných hodnot.

Tab. 6 – Morfologické znaky používané pro morfometrické analýzy.

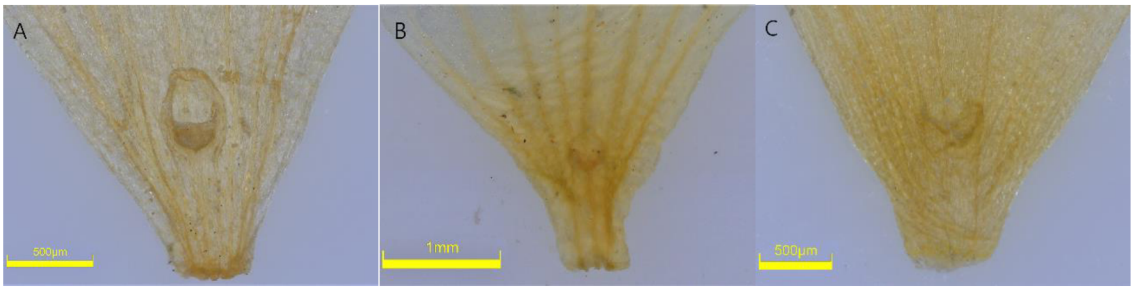
Zkratka znaku	Znak	Popis
LoD	Délka lodyhy	Měřeno pravítkem v mm
LP	Počet listů na lodyze	
RD	Délka řapíku	Měřeno pravítkem v mm
CD	Délka čepele	Měřeno pravítkem v mm
UD	Průměrná délka listového úkrojku posledního řádu (viz obr. 4)	Měřeno na binolupě s přesností 0,05 mm Průměr z hodnot naměřených na třech různých úkrojkách
US	Šířka listového úkrojku posledního řádu (viz obr. 4)	Měřeno na binolupě s přesností 0,05 mm
UP	Počet listových úkrojků	
PlL	Přítomnost lupenitých listů	0 – nepřítomny 1 – přítomny
KSD	Délka květní stopky	Měřeno pravítkem v mm
KD	Délka korunního lístku (viz obr. 5)	Měřeno na binolupě s přesností 0,05 mm
KS	Šířka korunního lístku (viz obr. 5)	Měřeno na binolupě s přesností 0,05 mm
Kpo	Poměř délky a šířky korunního lístku	KD/KS
KNM	Vzdálenost od báze až po nejširší místo korunního lístku (viz obr. 5)	Měřeno na binolupě s přesností 0,05 mm

Zkratka znaku	Znak	Popis
TNP	Tvar valu kolem jamky nektária poloměsíčitý	0 – jiný tvar nektária 1 – poloměsíčitý tvar nektária
TNH	Tvar valu kolem jamky nektária hruškovitý	0 – jiný tvar nektária 1 – hruškovitý tvar nektária
PSD	Délka plodní stopky	Měřeno pravítkem v mm
NP	Počet nažek	
ND	Průměrná délka nažky (včetně zobánku, viz obr. 7)	Měřeno na binolupě s přesností 0,05 mm Průměr z hodnot naměřených na třech různých nažkách
NChH	Chlupatost nažek – hustě chlupaté	0 – jiná chlupatost nažek (lysé nebo řídce ochlupené) 1 – hustě ochlupené nažky
NChL	Chlupatost nažek – lysé	0 – jiná chlupatost nažek (hustě nebo řídce ochlupené) 1 – lysé nažky

Obr. 4 – Listové úkrojky posledního řádu. UD – délka listového úkrojku (měřena na třech různých úkrojkách a poté zprůměrována), US – šířka listového úkrojku.



Obr. 5 – Přehled znaků měřených na koruně: délka korunního lístku (KD), šířka korunního lístku (KS), vzdálenost od báze až po nejširší místo korunního lístku (KNM).



Obr. 6 – Tvar valu kolem jamky nektária. A – hruškovitý, B – okrouhlý, C – poloměsíčitý.

Obr. 7 – Délka nažky.

2.5 Analýza dat

Získaná data byla analyzována v programech R (verze 3.5.2, R Core Team 2018) a RStudio (RStudio Team 2016) pomocí skriptů MorphoTools (Koutecký 2015). Nejprve byly spočteny popisné statistiky taxonů pro jednotlivé znaky (minimální a maximální naměřená hodnota, průměr, medián a směrodatná odchylka). Následně byla ověřeno, zda mají data normální rozdělení. Jelikož žádný ze studovaných znaků neměl normální rozdělení a rozdělení bylo pozitivně šikmé, data byla zlogaritmována (s výjimkou binárních znaků, kde logaritmus z povahy dat nelze použít – přítomnost plovoucích listů, tvar nektária a chlupatost nažek). Dále bylo pomocí Spearmanova koeficientu zjištěno, zda jsou znaky vzájemně korelované. Dvojice znaků s korelačním koeficientem větším než |0,9| byly považovány za silně korelované a jeden znak z takové dvojice byl z ostatních analýz vynechán.

Za účelem zobrazení morfologické podobnosti vzorků byla provedena analýza hlavních komponent (PCA). Metoda nahrazuje původní soubor proměnných novými, vzájemně nekorelovanými proměnnými. Ve směru nejvyšší variability mezi vzorky je vedena první osa (PC1), ve směru druhé nejvyšší variability je vedena druhá osa (PC2), která je zároveň kolmá na první osu. Na druhou osu je kolmá třetí osa, která vede ve směru třetí nejvyšší variability, atd. Relativní vzdálenost objektů v prostoru daném hlavními komponenty je stejná jako vzdálenost objektů v původním prostoru.

Dále byly provedeny diskriminační analýzy. Lineární diskriminační analýza vyžaduje rozdělení objektů do předem definovaných skupin a stanovuje znaky nejlépe odlišující tyto skupiny. Klasifikační diskriminační analýza zařazuje objekty do skupin, výsledek se často vyjadřuje jako klasifikační matice, tj. procentuální úspěšnost správného zařazení vzorků do skupin na základě studovaných znaků (Marhold & Suda 2001). Tato metoda zároveň určuje, které taxony lze nejčastěji vzájemně zaměnit. Byla použita kros-validace, kdy byl postupně každý vzorek vynechán z analýzy a následně byl zařazen do skupiny podle pravidel založených na analýze ostatních vzorků.

Pro účely analýzy hlavních komponent, lineární a klasifikační disrkiminační analýzy byly vzorky klasifikovány na základě velikosti genomu (ta byla určena metodou průtokové cytometrie, viz kap. 1.2.3) nebo sekvenování.

Všichni jedinci neměli vyvinuté květy a plody zároveň a některá data u nich tudíž chyběla. Všechny analýzy byly proto provedeny celkem čtyřikrát - nejprve pro všechny

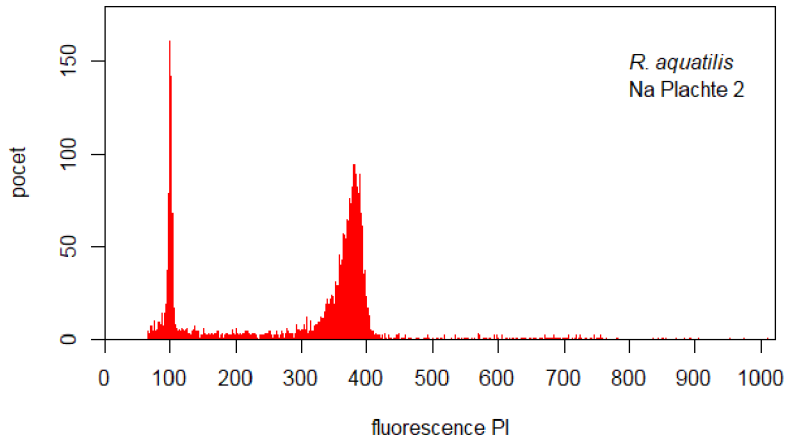
znaky, dále pouze pro vegetativní znaky, pro vegetativní znaky společně se znaky měřenými na květu a pro vegetativní znaky se znaky měřenými na plodu. Každá analýza tedy pracovala s jiným počtem jedinců podle toho, u kolika vzorků byly změřeny dané znaky. Díky tomu, že byly jednotlivé analýzy provedeny zvlášť pro určité kombinace znaků, může být porovnána úspěšnost determinace v závislosti na tom, jaké znaky jsou k dispozici (např. zda lze lépe klasifikovat kvetoucí či plodné rostliny a zda je možné určovat sterilní jedince).

Získaná data pro terestrické formy byla v programu R porovnána t-testem s hodnotami pro vodní formy, které byly transformovány stejným způsobem jako data pro terestrické formy. Pro hodnoty p byla provedena korekce False discovery value. Byla vytvořena tabulka pro porovnání rozmezí a průměrných hodnot pro terestrické a vodní formy a bylo také stanoveno, ve kterých znacích se tyto dvě formy signifikantně liší. Data pro vodní formy druhů *R. aquatilis*, *R. baudotii*, *R. rionii*, *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B měřila Johana Hanzlíčková (Hanzlíčková 2021) a data pro *R. peltatus* mi poskytl Vojtěch Dolejšek. Soubor vodních forem druhu *R. aquatilis* čítá 47 jedinců, *R. baudotii* 29 jedinců, *R. peltatus* 45 jedinců, *R. rionii* 70 jedinců, *R. trichophyllus* A 62 jedinců a *R. trichophyllus* B 99 jedinců.

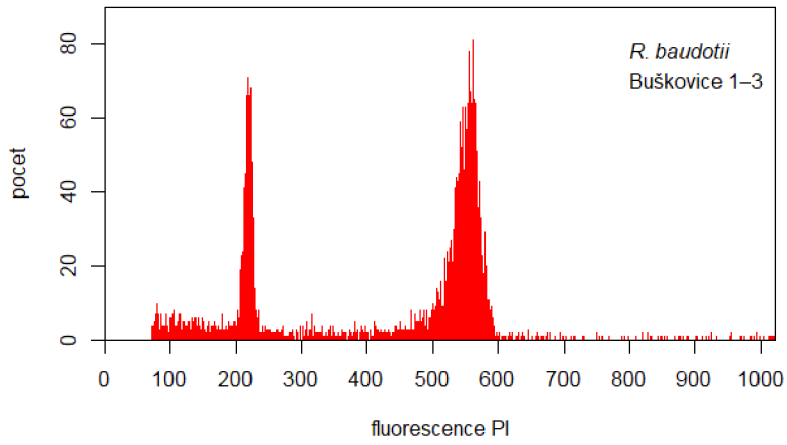
3. Výsledky

3.1 Průtoková cytometrie

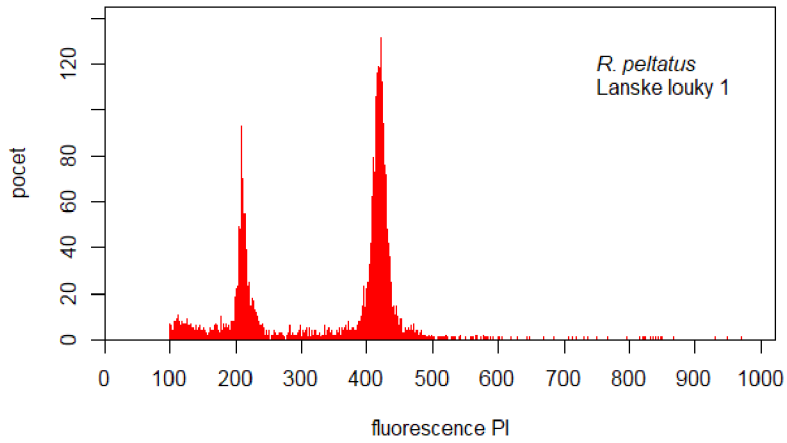
Na obrázcích 8 – 13 jsou typické histogramy fluorescence jader se standardem *Bellis perennis* pro *Ranunculus aquatilis* (obr. 8), *R. baudotii* (obr. 9), *R. peltatus* (obr. 10), *R. rionii* (obr. 11), *R. trichophyllus* A (obr. 12) a *R. trichophyllus* B (obr. 13).



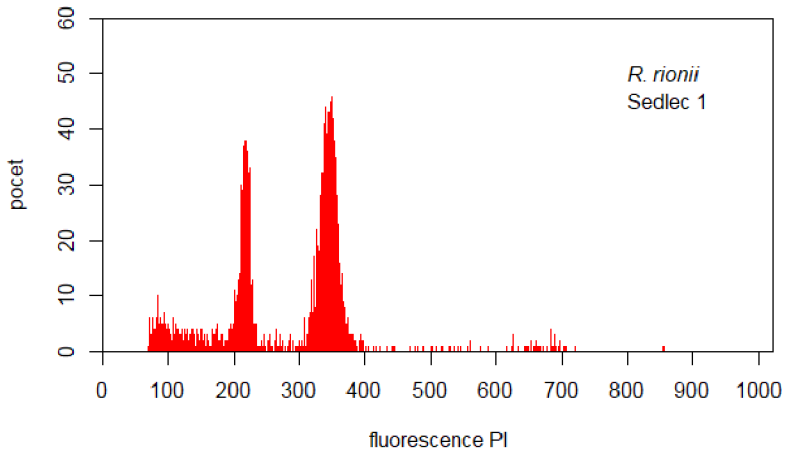
Obr. 8 – Histogram fluorescence jader *R. aquatilis* a *Bellis perennis*. Pík standardu je umístěn přibližně na kanálu 100.



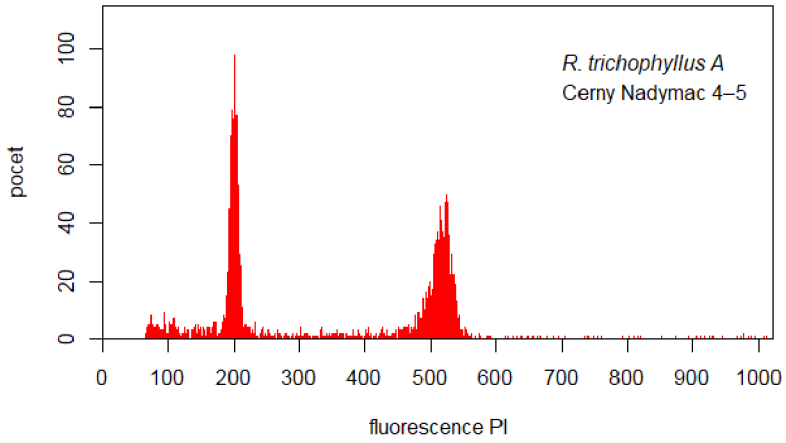
Obr. 9 – Histogram fluorescence jader *R. baudotii* a *Bellis perennis*. Pík standardu je umístěn přibližně na kanálu 200.



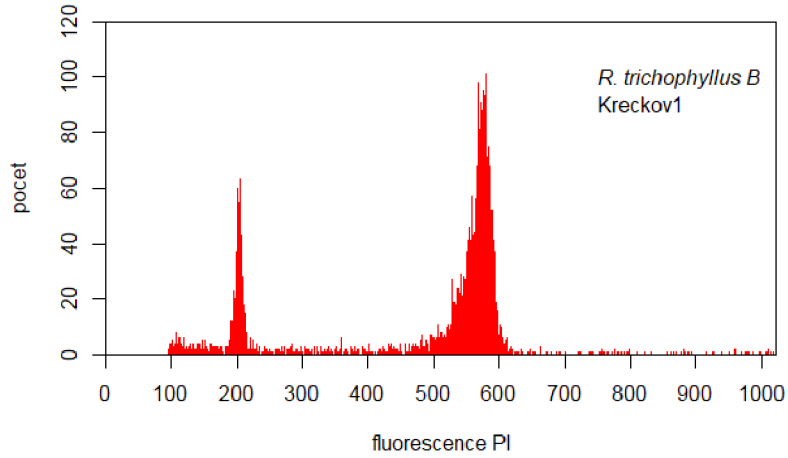
Obr. 10 – Histogram fluorescence jader *R. peltatus* a *Bellis perennis*. Pík standardu je umístěn přibližně na kanálu 200.



Obr. 11 – Histogram fluorescence jader *R. rionii* a *Bellis perennis*. Pík standardu je umístěn přibližně na kanálu 200.



Obr. 12 – Histogram fluorescence jader *R. trichophyllus* A a *Bellis perennis*. Pík standardu je umístěn přibližně na kanálu 200.



Obr. 13 – Histogram fluorescence jader *R. trichophyllus* B a *Bellis perennis*. Pík standardu je umístěn přibližně na kanálu 200.

V příloze 1 jsou uvedeny hodnoty naměřené v cytometrické analýze. Pro vzorek i standard byla zaznamenána průměrná fluorescence, počet jader a koeficient variance. Dále byl vypočten poměr vzorku a standardu, na základě něhož byly vzorky klasifikovány (rozmezí poměru vzorek/standard pro jednotlivé druhy viz tab. č. 4). V tabulce se některé ze vzorků vyskytují víckrát, jelikož byly opakovaně analyzovány průtokovou cytometrií a výsledný poměr byl vypočten jako průměr jednotlivých měření. Číslo za tečkou v takovém případě znázorňuje pořadí opakovaných měření (např. Januš 1.1).

3.2 Sekvenace morfologicky nejasných jedinců

V rámci bakalářské a diplomové práce bylo k sekvenaci vybráno celkem 12 vzorků. V bakalářské práci bylo osekvenováno 9 vzorků, které byly vybrány pro ujištění, že se nejedná o zpětné hybridy druhů *R. peltatus* a *R. trichophyllus* A. Šlo o vzorky z rybníku Bezdrev (lokalita č. 19, rostliny č. 15 a 16 viz tab. 3), dále vzorky z rybníku Oběšený (lokalita 27, rostliny č. 1, 3, 4), Jámský (lokalita 29, rostliny č. 2, 4, 6) a Nový (lokalita 44, rostliny č. 11). Pro účely diplomové práce vybrány další tři vzorky. Jedna osekvenovaná položka pocházela z Dědovy louky (lokalita 9, rostlina č. 6) a podle velikosti genomu nebylo možné rozeznat, zda jde o druh *R. trichophyllus* B, či o kříženec druhů *R. peltatus* a *R. aquatilis*. Další dva vzorky pocházely z Kunrtova rybníku (lokalita 47, rostliny č. 1 a 2) a šlo sběry z doby, kdy průtoková cytometrie nebyla využívána k určení druhu, a rostliny neměly vyvinuté nažky, ze kterých by šla analýza provést i po delší době. Z rostliny č. 2 se kvůli stáří materiálu nepodařilo získat dostatečné množství DNA. Byla tedy osekvenována

pouze rostlina č. 1 a na základě její sekvence byly obě položky klasifikovány (populace byla uniformní).

Vzorky byly srovnávány se vzorovými sekvencemi druhů *R. aquatilis* (kvůli možné přítomnosti křížence s *R. peltatus*), *R. peltatus, R trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B. Ostatní druhy byly na základě velikosti genomu vyloučeny, proto nejsou níže uvedeny. Jako vzorové sekvence sloužily chloroplastové haplotypy a nejčastější ITS genotypy těchto druhů podle studie Koutecký et al. (2022).

V jaderném úseku ITS (= ITS1 a ITS2) bylo nalezeno 6 genotypů (viz tab. 7), v chloroplastovém úseku 3'*rps*16–5'*trn*K byly nalezeny 2 haplotypy (viz tab. 8). Označení genotypů/haplotypů je převzato z práce Koutecký et al. (2022).

Vzorky č. 4 a 6 z Jámského rybníku byly klasifikovány jako zpětní hybridi druhů *R. peltatus* a *R. trichophyllus* A, jelikož jejich chloroplastová DNA odpovídá vzorové sekvenci pro *R. trichophyllus* A, ale velikost genomu a ITS sekvence jaderné DNA se shodovaly se vzorovými sekvencemi pro *R. peltatus*. U vzorků z populací Bezdrev, Oběšený rybník, Nový rybník a u vzorku č. 2 z Jámského rybníku bylo potvrzeno určení jako *R. peltatus.* Vzorky z Kunrtova rybníku a z Dědovy louky byly oba klasifikovány jako *R. trichophyllus* B. Jejich ITS genotyp zcela odpovídá vzorovým sekvencím *R. trichophyllus* B. Sekvence chloroplastového úseku je shodná s *R. peltatus*, což je však pro tento druh naprosto běžné (tento haplotyp se vyskytuje u obou druhů). Zároveň sekvence rostliny z Dědovy louky neobsahuje polymorfismy v pozicích, kde se odlišují *R. aquatilis* a *R. peltatus*, takže lze vyloučit, že jde o kříženec těchto druhů.

Tab. 7 – Variabilní pozice v úseku ITS jaderné DNA. Vzorové sekvence jsou vyznačeny modře. Polymorfismy jsou označeny IUPAC kódy a nukleotidy identické s první sekvencí pro daný druh jsou znázorněny tečkami. Číslování ITS genotypů odpovídá studii Koutecký et al. (2022).

Vzorek	Genotyp	Pozice																							
		36	63	80	85	86	94	95	98	103	116	128 – 129	134 – 135	155	200	222	232 – 233	444 – 445	476	491	507	527	538	553	561	604
Ranunculus aquatilis																										
Loučeň	15	C	G	G	C	C	T	Y	Y	C	Y	WY	YY	G	C	Y	RY	RY	T	Y	G	C	W	C	C	C
Čestice	21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	..	..	.	.	.	..	..	.	.	.	Y	.	.	.	.
Ranunculus peltatus																										
Lipno	57	C	G	A	C	C	T	C	C	C	C	TT	TT	G	C	C	GT	GC	C	C	A	C	T	C	C	C
Bohdaneč 4	59	.	.	A	.	Y	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Bohdaneč 1	108	.	R	A	.	Y	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Bezdrev 15	108	.	R	A	.	Y	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Bezdrev 16	108	.	R	A	.	Y	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Mláka 1	108	.	R	A	.	Y	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Nový 11	108	.	R	A	.	Y	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Žemlička	64	.	.	A	.	.	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Jámský 2	64	.	.	A	.	.	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Jámský 4	64	.	.	A	.	.	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Jámský 6	64	.	.	A	.	.	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Chanovice pelt.	68	.	.	A	.	.	.	C	C	T	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Mláka 3	68	.	.	A	.	.	.	C	C	T	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Mláka 4	–	.	.	A	.	.	.	C	C	Y	C	TT	TT	.	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	Y
Ranunculus trichophyllus A																										
Vlkov	102	C	A	A	C	C	T	C	C	C	C	TT	TT	G	T	C	GT	GC	C	C	A	C	T	C	C	C
Chanovice trich.	85	Y	R	A	.	.	Y	C	C	.	C	TT	TT	R	Y	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Žehrov	82	T	G	A	.	.	C	C	C	.	C	TT	TT	A	.	C	GT	GC	C	C	A	.	T	.	.	.
Ranunculus trichophyllus B																										
Radomyšl	162	C	G	G	Y	C	T	T	T	C	T	TT	TT	G	C	C	GT	GC	T	T	G	C	T	Y	Y	C
Lüssarm	168	.	.	.	.	.	.	T	T	.	T	TT	TT	.	.	C	GT	GC	.	T	.	.	T	.	.	.
Kunrtův ryb. 1	168	.	.	.	.	.	.	T	T	.	T	TT	TT	.	.	C	GT	GC	.	T	.	.	T	.	.	.
Dědova l. 6	–	.	.		.	.	.	T	T	.	T	TT	TT	.	.	C	GT	GC	.	.	R	Y	T	.	.	.

Tab. 8 – Variabilní pozice v úseku 3'*rps*16-5'*trn*K chloroplastové DNA. Vzorové sekvence jsou vyznačeny modře. Chybějící nukleotidy jsou znázorněny pomlčkami a nukleotidy identické se vzorovými sekvencemi jsou znázorněny tečkami.

Vzorek	**Haplotyp**	**Pozice**			
		251–252	263	268	513–518
Ranunculus aquatilis					
Bornova jáma	pelt	--	G	C	AATTTT
Ranunculus peltatus					
Chanovice pelt.	pelt	--	G	C	AATTTT
Bezdrev 15	pelt	..	.	.	.....
Bezdrev 16	pelt	..	.	.	.....
Mláka 1	pelt	..	.	.	.....
Mláka 3	pelt	..	.	.	.....
Mláka 4	pelt	..	.	.	.....
Nový 11	pelt	..	.	.	.....
Jámský 2	pelt		.	.	.....
Kunrtův ryb. 1	pelt	..	.	.	.....
Dědova l. 6	pelt	..	.	.	.....
Ranunculus trichophyllus A					
Vlkov	trich-A	TT	-	T	------
Jámský 4	trich-A	TT	-	T	------
Jámský 6	trich-A	TT	-	T	------
Ranunculus trichophyllus B					
Radomyšl	trich-B	T-	-	T	------

3.3 Morfometrické analýzy

3.3.1 Popisná statistika taxonů

Jako první analýza byla spočtena popisná statistika taxonů (viz tab. 9). Pro každý znak byl u jednotlivých taxonů vypočten aritmetický průměr hodnot, směrodatná odchylka (SD), minimální a maximální hodnota a medián. Z minimální a maximální hodnoty bylo vytvořeno rozmezí hodnot pro daný znak, které bylo později použito v tabulce srovnání terestrických forem s vodními formami (viz tab. 16–21) a ve srovnání výsledků práce s dostupnou literaturou (viz tab. 22–26).

Pro *Ranunculus circinatus* je uveden vždy jen jediná hodnota ve sloupci průměr, jelikož od tohoto druhu byla změřena pouze jedna položka (terestrické formy obvykle netvoří). Směrodatná odchylka, minimální, maximální hodnota a medián jsou vynechány. U znaků měřených na generativních orgánech údaje pro tento druh chybí úplně, jelikož byl měřený jedinec sterilní.

U binárních znaků je ve sloupci průměr uveden počet jedinců se stavem znaku 1. Ostatní popisné statistiky u těchto znaků nemají smysl a jsou vynechány.

Tab. 9 – Popisná statistika taxonů. N = počet vzorků, průměr = aritmetický průměr hodnot, SD = směrodatná odchylka, Min = minimální hodnota, Max = maximální hodnota, Medián.

Znak	Taxon	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
LoD	*R. aquatilis*	77	63,75	44,27	11	48	227
LoD	*R. baudotii*	62	58,13	27,36	12	54	135
LoD	*R. circinatus*	1	75,00				
LoD	*R. peltatus*	69	59,62	29,82	18	50	132
LoD	*R. rionii*	75	64,92	28,75	7	65	138
LoD	*R. trichophyllus* A	77	30,55	15,49	6	30	90
LoD	*R. trichophyllus* B	48	73,90	34,07	20	72,5	146
LP	*R. aquatilis*	77	5,73	1,56	3	6	11
LP	*R. baudotii*	62	5,50	1,75	2	5	10
LP	*R. circinatus*	1	6,00				
LP	*R. peltatus*	69	5,54	1,93	2	5	9
LP	*R. rionii*	75	8,03	2,03	3	8	14
LP	*R. trichophyllus* A	77	4,56	1,59	2	5	8
LP	*R. trichophyllus* B	48	6,85	1,86	3	7	12
RD	*R. aquatilis*	76	6,58	3,55	2,5	5	22
RD	*R. baudotii*	62	4,93	2,56	1,5	4	15
RD	*R. circinatus*	1	3,50				
RD	*R. peltatus*	66	8,70	4,39	2	8	20
RD	*R. rionii*	75	3,59	2,37	1,5	3	13

Znak	Taxon	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
RD	*R. trichophyllus* A	78	6,89	4,01	2,5	6	31
RD	*R. trichophyllus* B	48	4,68	2,39	1,5	4	13
CD	*R. aquatilis*	76	11,69	4,51	4,5	11	30
CD	*R. baudotii*	62	11,74	3,93	5	11	20
CD	*R. circinatus*	1	8,00				
CD	*R. peltatus*	66	11,20	4,04	5	11	22
CD	*R. rionii*	75	9,51	3,13	3	9	18
CD	*R. trichophyllus* A	78	7,65	2,81	1	7	17
CD	*R. trichophyllus* B	48	10,95	3,81	5	11	18
UD	*R. aquatilis*	76	2,96	1,03	1,4	2,8	7,0
UD	*R. baudotii*	62	3,41	1,27	1,6	3,1	8,4
UD	*R. circinatus*	1	2,50				
UD	*R. peltatus*	66	2,51	1,01	1,1	2,2	5,7
UD	*R. rionii*	75	2,05	0,68	1,0	2,0	4,2
UD	*R. trichophyllus* A	78	2,72	1,02	1,4	2,5	8,0
UD	*R. trichophyllus* B	48	2,54	0,92	1,1	2,5	5,2
US	*R. aquatilis*	76	0,30	0,15	0,1	0,3	0,8
US	*R. baudotii*	62	0,28	0,20	0,1	0,3	0,5
US	*R. circinatus*	1	0,20				
US	*R. peltatus*	66	0,31	0,14	0,1	0,3	1,0
US	*R. rionii*	75	0,16	0,07	0,1	0,2	0,4
US	*R. trichophyllus* A	78	0,37	0,18	0,1	0,4	1,5
US	*R. trichophyllus* B	48	0,26	0,10	0,1	0,2	0,5
UP	*R. aquatilis*	76	54,57	22,28	15	50	118
UP	*R. baudotii*	62	30,69	10,31	15	30	66
UP	*R. circinatus*	1	26,00				
UP	*R. peltatus*	65	67,28	30,52	16	63	195
UP	*R. rionii*	75	58,57	21,61	17	55	113
UP	*R. trichophyllus* A	78	19,62	7,75	8	18	50
UP	*R. trichophyllus* B	48	53,44	20,99	22	50	121
PlL	*R. aquatilis*	77	0,03				
PlL	*R. baudotii*	62	0,14				
PlL	*R. circinatus*	1	0,00				
PlL	*R. peltatus*	69	0,43				
PlL	*R. rionii*	75	0,00				
PlL	*R. trichophyllus* A	78	0,00				
PlL	*R. trichophyllus* B	48	0,00				
KSD	*R. aquatilis*	71	20,32	5,85	7,5	20	45
KSD	*R. baudotii*	52	33,37	9,30	19	33,5	67
KSD	*R. peltatus*	59	33,05	10,21	17	31	60
KSD	*R. rionii*	69	13,78	4,23	6,5	13	25
KSD	*R. trichophyllus* A	73	16,10	5,74	2	15	32
KSD	*R. trichophyllus* B	44	14,91	4,10	6	14	25
KD	*R. aquatilis*	67	5,77	1,26	2,2	5,7	8,7
KD	*R. baudotii*	47	5,19	0,97	3,8	5,2	7,8
KD	*R. peltatus*	56	8,48	1,73	3,8	8,8	11,7

Znak	Taxon	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
KD	*R. rionii*	66	3,71	0,68	2,5	3,6	5,8
KD	*R. trichophyllus* A	73	4,14	0,90	1,6	4,2	6,2
KD	*R. trichophyllus* B	42	4,48	0,75	3,2	4,4	6,3
KS	*R. aquatilis*	67	3,81	1,22	1,5	3,8	7,1
KS	*R. baudotii*	47	3,20	0,65	2	3	4,6
KS	*R. peltatus*	56	5,86	1,53	3,1	5,8	9,2
KS	*R. rionii*	66	2,22	0,50	0,9	1,2	3,3
KS	*R. trichophyllus* A	73	2,33	0,67	0,9	1,2	4,5
KS	*R. trichophyllus* B	42	2,67	0,65	1,7	2,5	4,5
Kpo	*R. aquatilis*	67	1,59	0,33	1,1	1,5	2,8
Kpo	*R. baudotii*	47	1,64	0,23	1,3	1,6	2,5
Kpo	*R. peltatus*	56	1,49	0,26	1,0	1,5	2,4
Kpo	*R. rionii*	66	1,71	0,28	1,2	1,7	2,8
Kpo	*R. trichophyllus* A	73	1,83	0,29	1,2	1,8	2,7
Kpo	*R. trichophyllus* B	42	1,73	0,30	1,1	1,7	2,6
KNM	*R. aquatilis*	67	4,11	0,94	1,4	4,0	6,5
KNM	*R. baudotii*	48	3,35	0,90	2,2	3,2	5,5
KNM	*R. peltatus*	56	5,98	1,45	2,0	6,0	8,5
KNM	*R. rionii*	66	2,62	0,51	1,8	2,6	4,0
KNM	*R. trichophyllus* A	73	2,88	0,68	1,0	2,9	4,5
KNM	*R. trichophyllus* B	42	3,10	0,61	2,2	3,1	4,5
TNP	*R. aquatilis*	67	0,75				
TNP	*R. baudotii*	45	0,87				
TNP	*R. peltatus*	56	0,11				
TNP	*R. rionii*	65	0,78				
TNP	*R. trichophyllus* A	73	1,00				
TNP	*R. trichophyllus* B	39	1,00				
TNH	*R. aquatilis*	67	0,00				
TNH	*R. baudotii*	45	0,02				
TNH	*R. peltatus*	56	0,88				
TNH	*R. rionii*	65	0,00				
TNH	*R. trichophyllus* A	73	0,00				
TNH	*R. trichophyllus* B	39	0,00				
PSD	*R. aquatilis*	47	21,33	6,47	6,5	20	36
PSD	*R. baudotii*	34	38,56	11,67	17	39,5	65
PSD	*R. peltatus*	42	34,07	9,99	16	35	60
PSD	*R. rionii*	51	13,21	3,39	8	13	25
PSD	*R. trichophyllus* A	49	16,46	4,57	6	17	28
PSD	*R. trichophyllus* B	37	17,62	6,62	8	17,1	33
NP	*R. aquatilis*	43	22,14	6,03	10	20	40
NP	*R. baudotii*	34	35,68	9,01	20	35	55
NP	*R. peltatus*	42	25,55	7,37	10	25	47
NP	*R. rionii*	51	40,47	13,93	11	40	70
NP	*R. trichophyllus* A	49	20,96	6,49	10	20	40
NP	*R. trichophyllus* B	37	26,95	5,11	20	28	40
ND	*R. aquatilis*	41	1,49	0,26	1,3	1,5	1,8

Znak	Taxon	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
ND	*R. baudotii*	34	1,30	0,29	1,0	1,3	1,7
ND	*R. peltatus*	42	1,76	0,37	0,9	1,7	2,8
ND	*R. rionii*	51	1,02	0,11	0,8	1,1	1,2
ND	*R. trichophyllus* A	49	1,68	0,49	1,2	1,6	2,8
ND	*R. trichophyllus* B	33	1,42	0,17	1,1	1,4	1,8
NChH	*R. aquatilis*	41	0,05				
NChH	*R. baudotii*	34	0,00				
NChH	*R. peltatus*	42	0,33				
NChH	*R. rionii*	48	0,00				
NChH	*R. trichophyllus* A	49	0,02				
NChH	*R. trichophyllus* B	33	0,15				
NChL	*R. aquatilis*	41	0,54				
NChL	*R. baudotii*	34	0,62				
NChL	*R. peltatus*	42	0,07				
NChL	*R. rionii*	48	0,48				
NChL	*R. trichophyllus* A	49	0,16				
NChL	*R. trichophyllus* B	33	0,18				

3.3.2 Korelační analýza

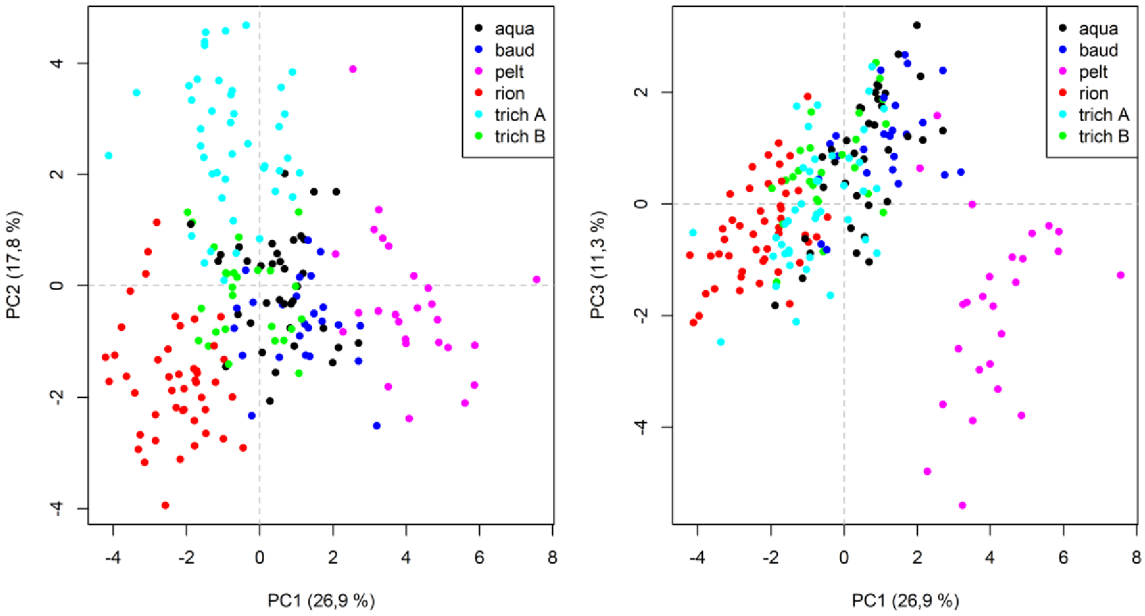
Pro kontrolu, že znaky nejsou korelované, byl spočítán Spearmanův korelační koeficient mezi znaky. Byly zjištěny dvě dvojice korelovaných znaků, a to KNM (vzdálenost od báze až po nejširší místo korunního lístku) a KD (délka korunního lístku) s korelačním koeficientem 0,96 a KS (šířka korunního lístku) a KD (délka korunního lístku) s korelačním koeficientem 0,90. Znaky KNM a KS byly tedy z následujících analýz vynechány.

3.3.3 Analýza hlavních komponent

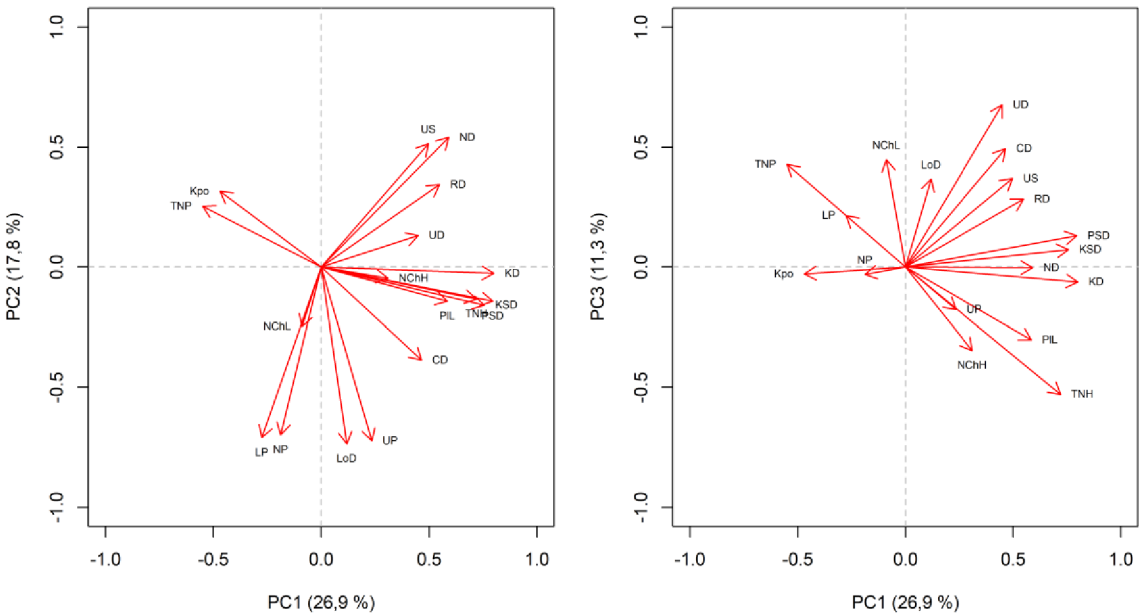
Analýza hlavních komponent (PCA) byla provedena celkem čtyřikrát pro různé kombinace znaků. První analýza zahrnovala všechny znaky (obr. 14, obr. 15), druhá pracovala pouze s vegetativními znaky (obr. 16, obr. 17), třetí analýza vycházela z dat pro vegetativní znaky a znaky měřené na květu (obr. 18. obr. 19) a čtvrtá analýza zahrnovala vegetativní znaky společně se znaky měřenými na plodu (obr. 20, obr. 21).

U analýzy zahrnující všechny znaky byly s první osou nejvíce korelovány znaky KD (délka korunního lístku), PSD (délka plodní stopky), KSD (délka květní stopky) a TNH (hruškovitý tvar nektária, obr. 15). U analýzy pro vegetativní znaky to byly znaky LP (počet listů na lodyze) a US (šířka úkrojku, obr. 17). U analýzy zahrnující vegetativní znaky a znaky měřené na květu byly s první osou opět nejvíce korelovány znaky KD, TNH a KSD

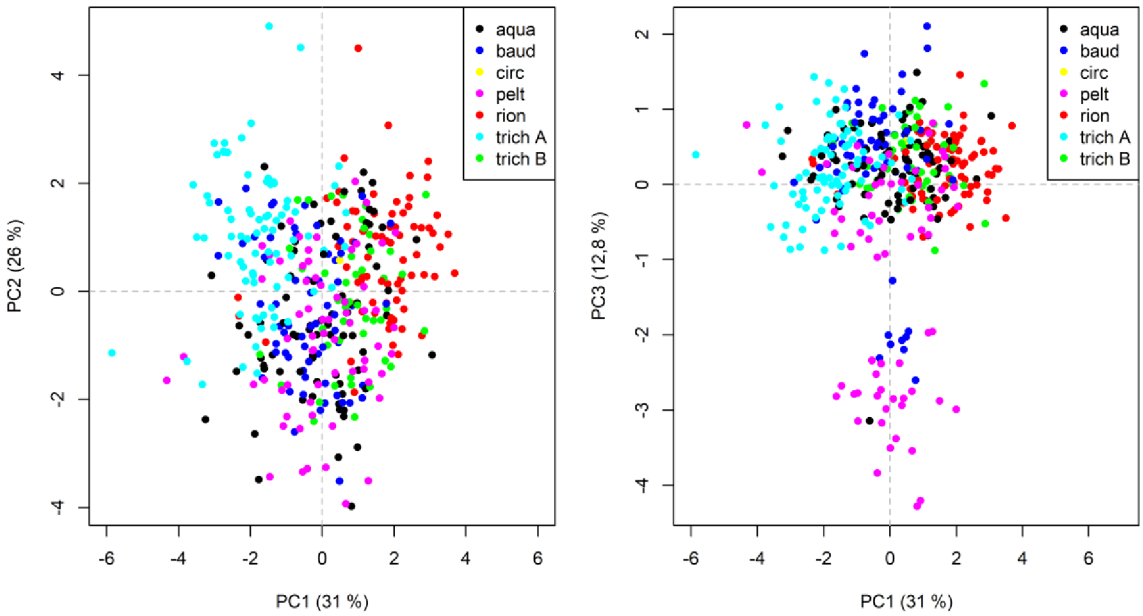
(obr. 19). U analýzy zahrnující vegetativní znaky a plody se jednalo o znaky ND (délka nažky) a US (šířka úkrojku). Hodnoty korelačních koeficientů byly |0,7–0,8|.



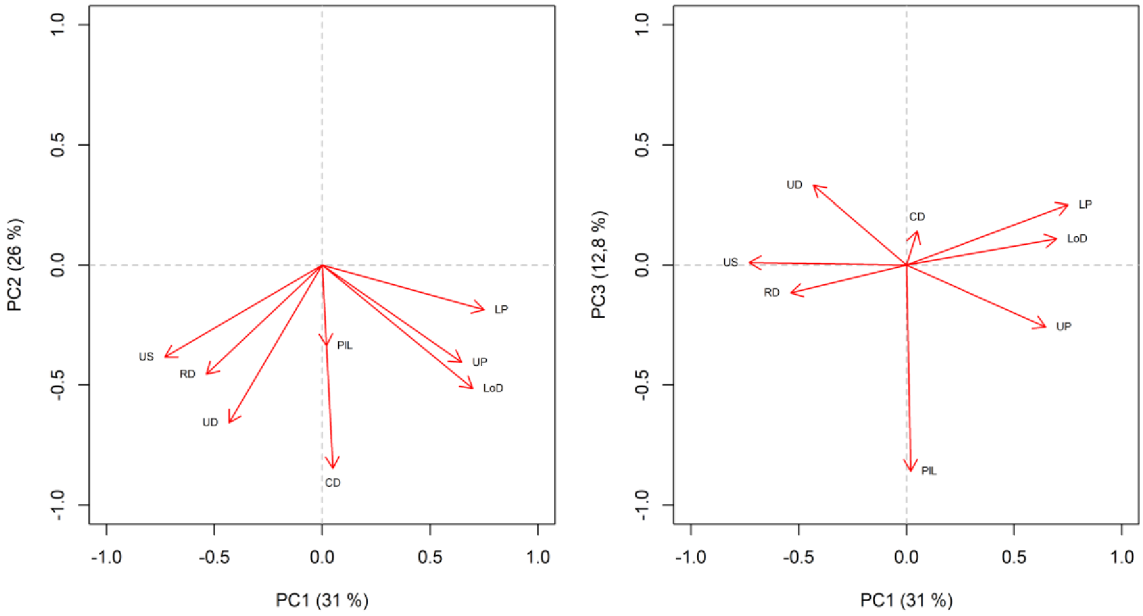
Obr. 14 – Analýza hlavních komponent zahrnující všechny měřené znaky. Graf vlevo zobrazuje první a druhou osu ve směru nejvyšší variability, pravý graf zobrazuje první a třetí osu. První osa vysvětluje 26,9 %, druhá osa vysvětluje 17,8 % a třetí osa vysvětluje 11,3 % celkové variability. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.



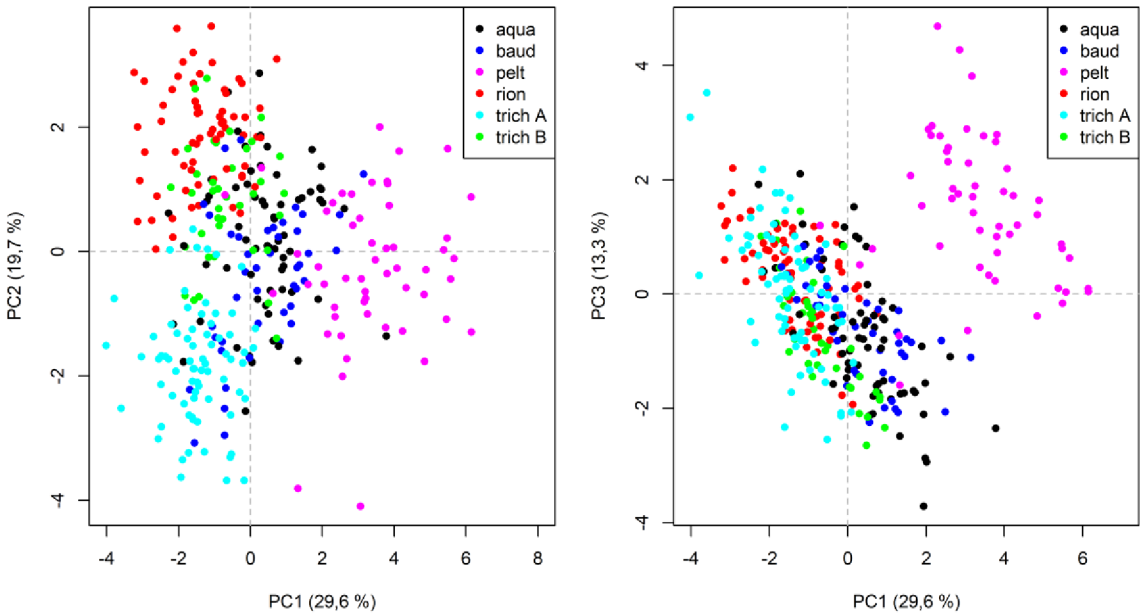
Obr. 15 – Analýza hlavních komponent zahrnující všechny měřené znaky. Vlevo je zobrazena první a druhá osa ve směru nejvyšší variability, vpravo je zobrazena první a třetí osa.



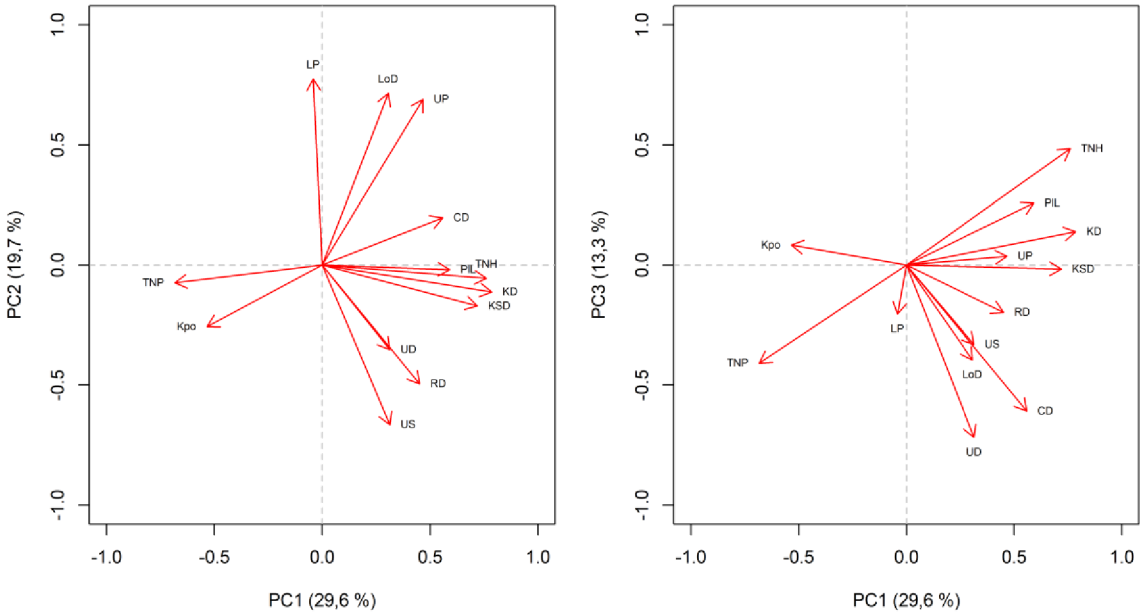
Obr. 16 – Analýza hlavních komponent zahrnující pouze vegetativní znaky. Graf vlevo zobrazuje první a druhou osu ve směru nejvyšší variability, pravý graf zobrazuje první a třetí osu. První osa vysvětluje 31 %, druhá osa vysvětluje 26 % a třetí osa vysvětluje 12,8 % celkové variability. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.



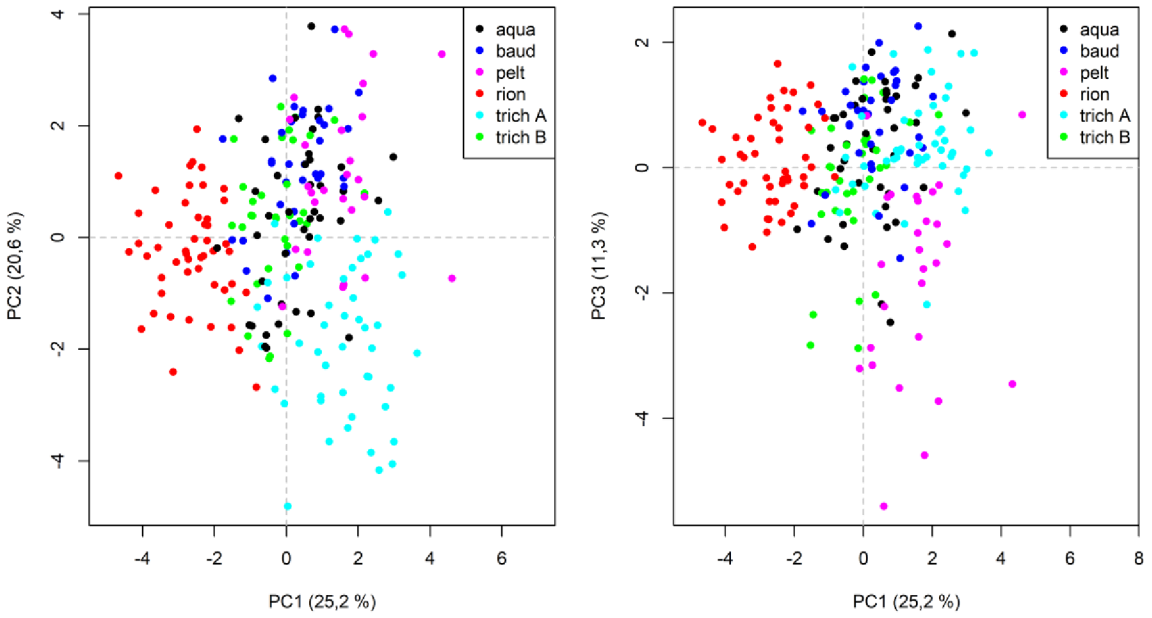
Obr. 17 – Analýza hlavních komponent zahrnující pouze vegetativní znaky. Vlevo je zobrazena první a druhá osa ve směru nejvyšší variability, vpravo je zobrazena první a třetí osa.



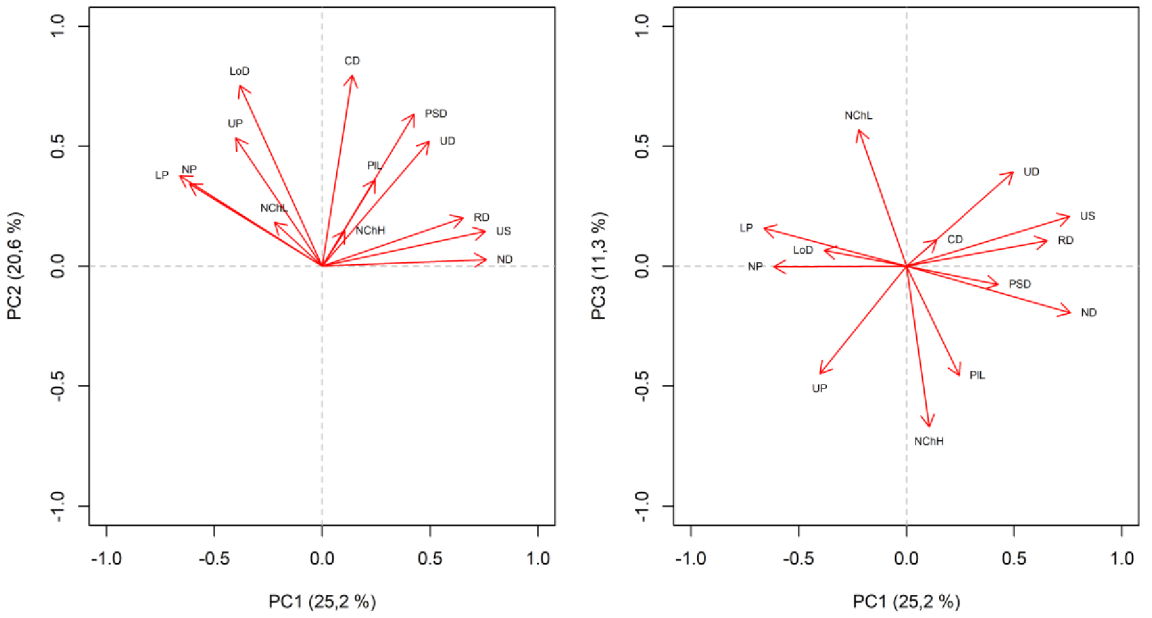
Obr. 18 – Analýza hlavních komponent zahrnující vegetativní znaky společně se znaky měřenými na květu. Graf vlevo zobrazuje první a druhou osu ve směru nejvyšší variability, pravý graf zobrazuje první a třetí osu. První osa vysvětluje 29,6 %, druhá osa vysvětluje 19,7 % a třetí osa vysvětluje 13,3 % celkové variability. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.



Obr. 19 – Analýza hlavních komponent zahrnující vegetativní znaky společně se znaky měřenými na květu. Vlevo je zobrazena první a druhá osa ve směru nejvyšší variability, vpravo je zobrazena první a třetí osa.

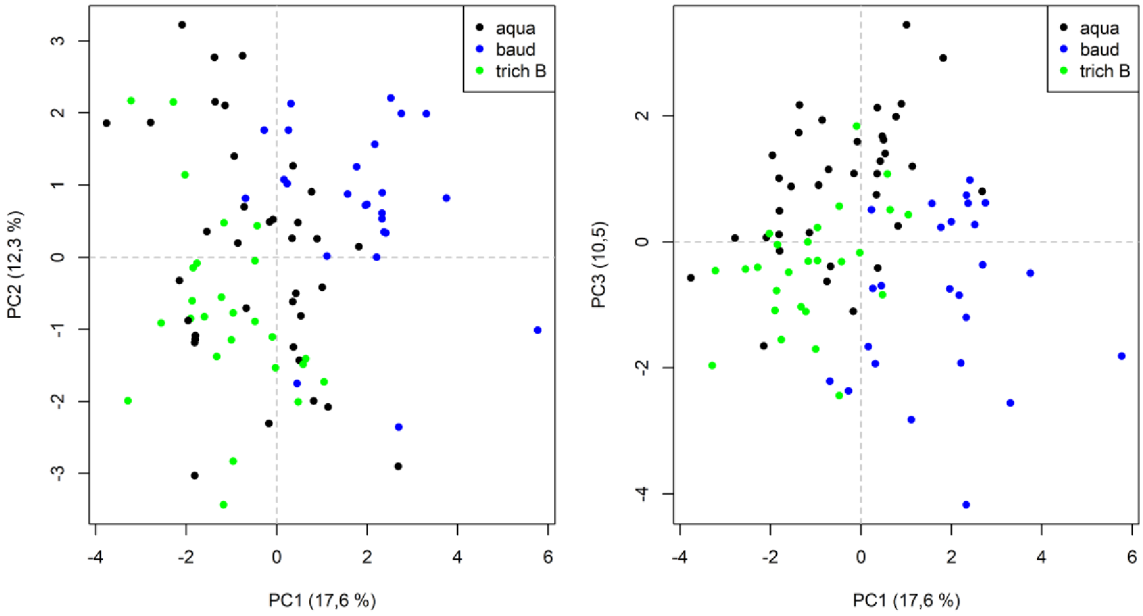


Obr. 20 – Analýza hlavních komponent zahrnující vegetativní znaky společně se znaky měřenými na plodu. Graf vlevo zobrazuje první a druhou osu ve směru nejvyšší variability, pravý graf zobrazuje první a třetí osu. První osa vysvětluje 25,2 %, druhá osa vysvětluje 20,6 % a třetí osa vysvětluje 11,3 % celkové variability. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.

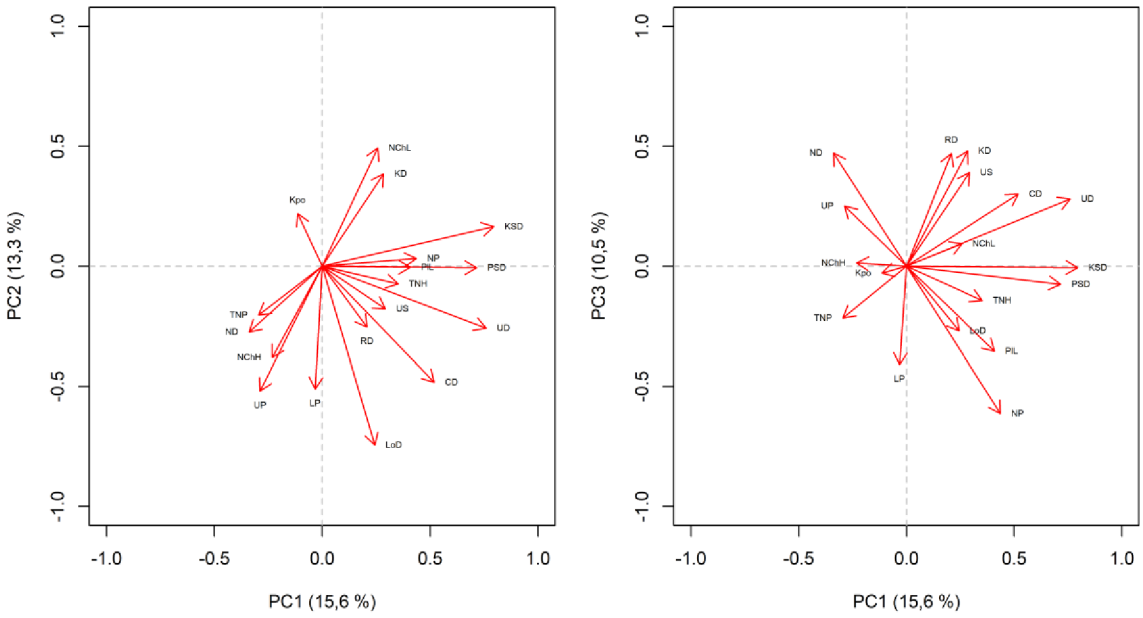


Obr. 21 – Analýza hlavních komponent zahrnující vegetativní znaky společně se znaky měřenými na plodu. Vlevo je zobrazena první a druhá osa ve směru nejvyšší variability, vpravo je zobrazena první a třetí osa.

Jako zřetelně odlišné vyšly taxony *R. peltatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* A. Druhy *R. aquatilis, R. baudotii* a *R. trichophyllus* B se naopak jeví jako obtížně odlišitelné. Pro odlišení těchto tří taxonů však mohou být významné jiné znaky, než znaky oddělující *R. peltatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* A. Analýza hlavních komponent proto byla provedena znovu pouze pro tyto druhy, přičemž byly zahrnuty všechny měřené znaky (obr. 22). Znaky nejvíce korelovaným s první osou, a tedy nejdůležitější pro odlišení těchto druhů, jsou délka květní stopky (KSD), délka listového úkrojku (UD) a délka plodní stopky (PSD, obr. 23).



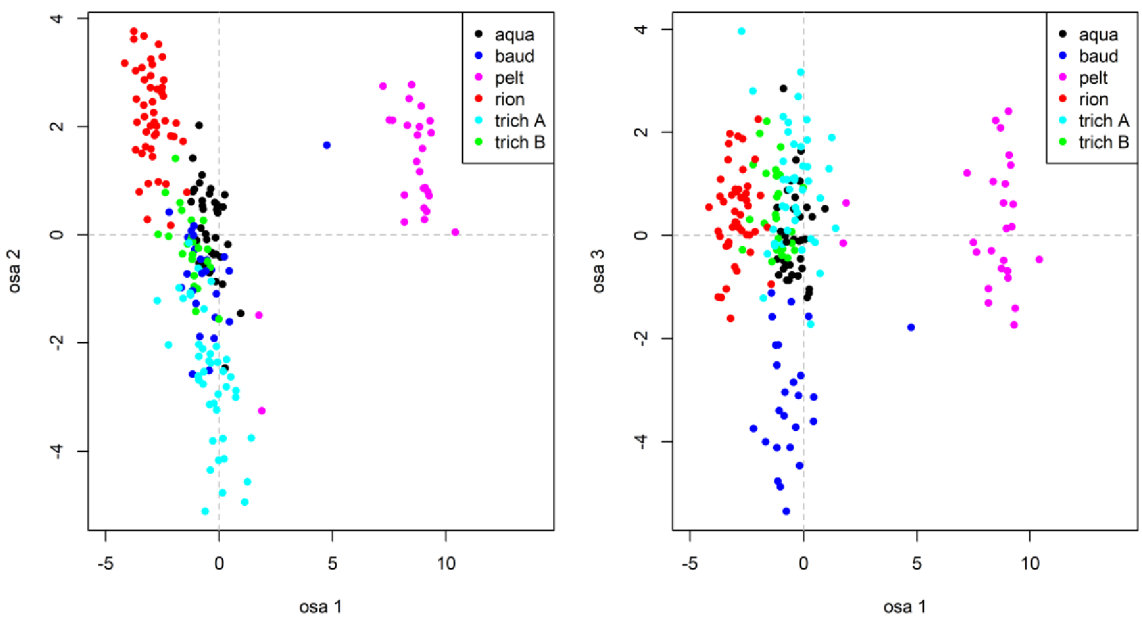
Obr. 22 – Analýza hlavních komponent pro druhy *R. aquatilis*, *R. baudotii* a *R. trichophyllus* B zahrnující všechny měřené znaky. Graf vlevo zobrazuje první a druhou osu ve směru nejvyšší variability, graf vpravo zobrazuje první a třetí osu. První osa vysvětluje 17,6 % z celkové variability, druhá vysvětluje 12,3 % variability a třetí 10,5 %. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, trich B – *R. trichophyllus* B.



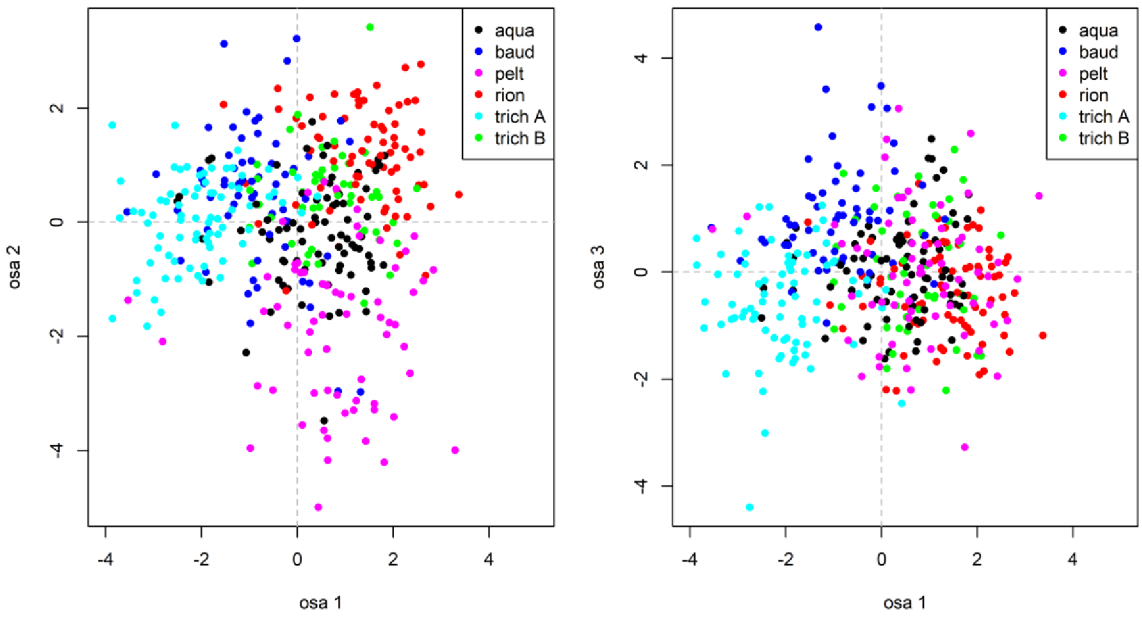
Obr. 23 – Analýza hlavních komponent pro druhy *R. aquatilis*, *R. baudotii* a *R. trichophyllus* B zahrnující všechny měřené znaky. Levý graf zobrazuje první a druhou osu ve směru nejvyšší variability, pravý graf zobrazuje první a třetí osu.

3.3.4 Lineární diskriminační analýza

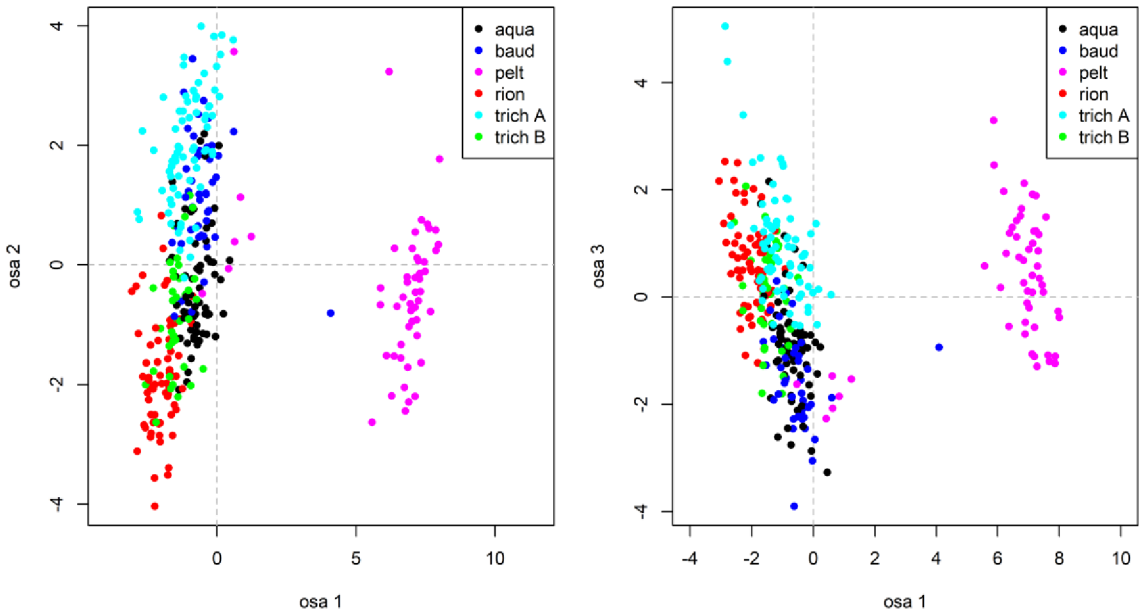
Výsledky lineární diskriminační analýzy jsou zobrazeny v grafech (viz obr. 24–27). Lineární diskriminační analýza byla opět provedena pro různé kombinace znaků, a to pro všechny měřené znaky, pouze pro vegetativní znaky, pro vegetativní znaky společně se znaky měřenými na květu a pro vegetativní znaky se znaky měřenými na plodu.



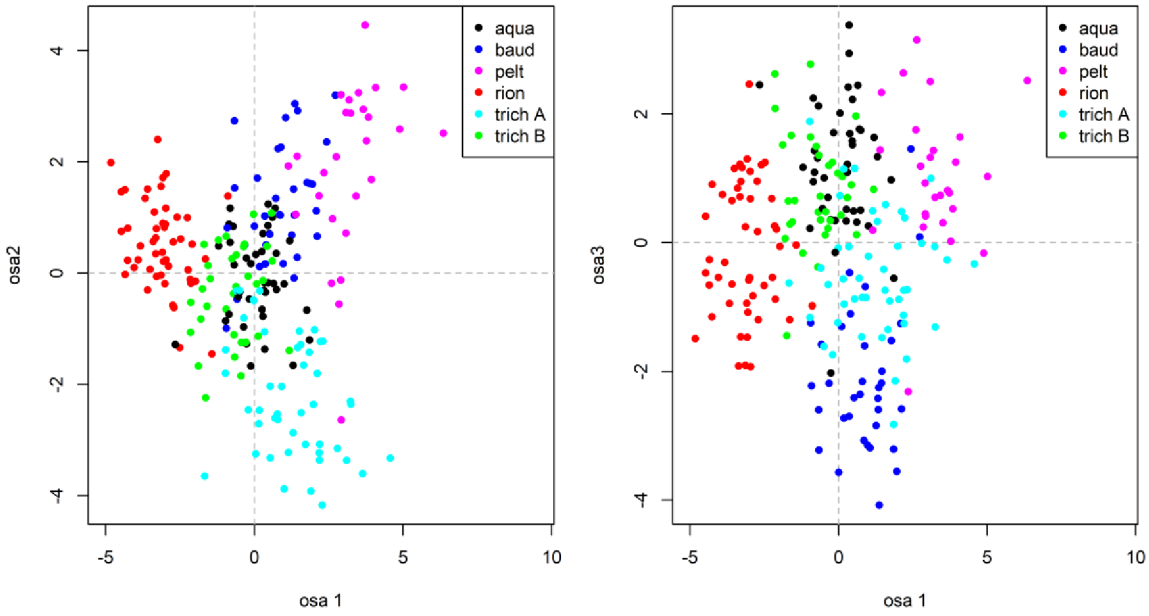
Obr. 24 – Lineární diskriminační analýza zahrnující všechny znaky. Graf vlevo zobrazuje první a druhou osu, graf vpravo zobrazuje první a třetí osu. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.



Obr. 25 – Lineární diskriminační analýza zahrnující vegetativní znaky. Graf vlevo zobrazuje první a druhou osu, graf vpravo zobrazuje první a třetí osu. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, circ – *R. circinatus*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.

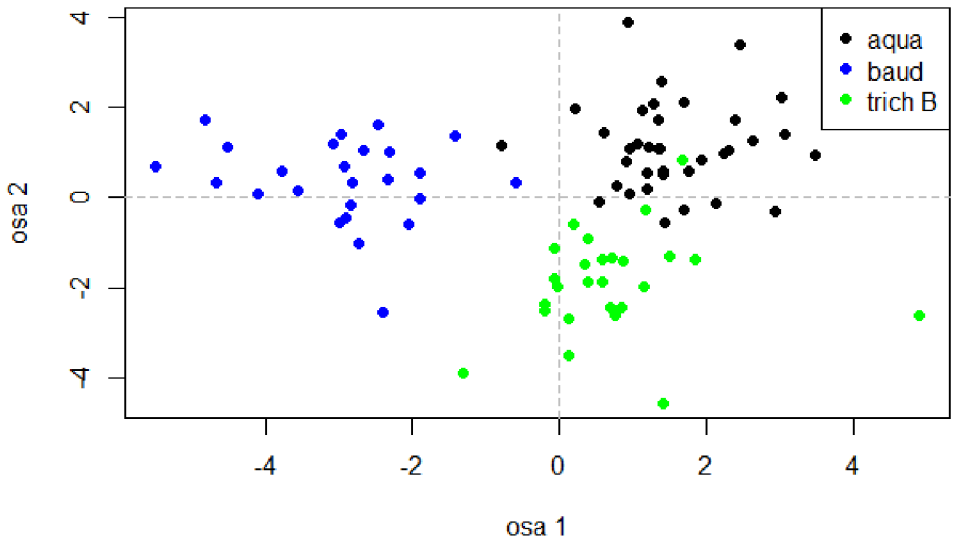


Obr. 26 – Lineární diskriminační analýza zahrnující vegetativní znaky a znaky měřené na květu. Graf vlevo zobrazuje první a druhou osu, graf vpravo zobrazuje první a třetí osu. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.



Obr. 27 – Lineární diskriminační analýza zahrnující vegetativní znaky a znaky měřené na plodu. Graf vlevo zobrazuje první a druhou osu, graf vpravo zobrazuje první a třetí osu. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.

Druhy *R. peltatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* A se v lineární diskriminační analýze většinou odlišily v prostoru prvních dvou ordinačních os (s částečným překryvem), u druhů *R. aquatilis, R. baudotii* a *R. trichophyllus* B byl však výrazný překryv. Analýza byla tedy provedena znovu pouze pro tyto druhy (viz obr. 28), jelikož pro jejich odlišení mohou být důležité jiné znaky, než pro rozlišení morfologicky rozdílnějších druhů *R. peltatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* A, a na předchozích analýzách tedy nejsou rozdíly mezi *R. aquatilis, R. baudotii* a *R. trichophyllus* B patrné.



Obr. 28 – Lineární diskriminační analýza pro druhy *R. aquatilis*, *R. baudotii* a *R. trichophyllus* B zahrnující všechny znaky. Zkratky druhů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, trich B – *R. trichophyllus* B.

Tabulka č. 10 ukazuje, jak přispívají jednotlivé znaky rozmístění jedinců v ordinačním prostoru lineární diskriminační analýzy. První část tabulky, zde pojmenovaná „znaky samostatně“, zobrazuje příspěvek znaku k rozdělení vzorků do skupin (klasifikaci) bez ohledu na ostatní znaky. Druhá část tabulky („unikátní příspěvek“) zobrazuje příspěvek daného znaku v porovnání s ostatními znaky. Nejprve jsou použity všechny ostatní znaky a poté je posuzován unikátní příspěvek daného znaku. Pokud jsou znaky vzájemně korelované, samy o sobě dobře odlišují skupiny, ale jejich unikátní příspěvek je malý.

Tab. 10 – Morfologické znaky testované lineární diskriminační analýzou. Znaky, které se podílejí na rozřazení vzorků do skupin ($p < 0,05$), jsou zvýrazněny.

Znak	**Všechny znaky**				**Vegetativní znaky**				**Vegetativní znaky a znaky měřené na květu**			
	Znaky samostatně		Unikátní příspěvek		Znaky samostatně		Unikátní příspěvek		Znaky samostatně		Unikátní příspěvek	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
PlL	18,41	**0,005**	4,10	**0,002**	23,06	**0,005**	21,25	**0,001**	21,91	**0,005**	2,82	**0,016**
TNP	19,47	**0,005**	2,86	**0,015**					36,11	**0,005**	6,94	**0,001**
TNH	42,46	**0,005**	25,11	**0,001**					65,53	**0,005**	39,75	**0,001**
NChH	5,19	**0,005**	0,45	0,809								
NChL	9,29	**0,005**	2,67	**0,024**								
LoD	15,66	**0,005**	5,18	**0,001**	18,70	**0,005**	5,72	**0,001**	20,18	**0,005**	3,13	**0,013**
LP	17,37	**0,005**	2,66	**0,022**	23,38	**0,005**	9,95	**0,001**	22,62	**0,005**	3,77	**0,006**
RD	13,84	**0,005**	4,29	**0,001**	24,15	**0,005**	15,23	**0,001**	24,71	**0,005**	13,30	**0,001**
CD	8,42	**0,005**	2,03	0,077	13,74	**0,005**	4,48	**0,001**	13,03	**0,005**	2,43	**0,018**
UD	9,05	**0,005**	0,89	0,518	14,82	**0,005**	4,96	**0,002**	12,15	**0,005**	1,80	**0,047**
US	15,86	**0,005**	2,66	**0,019**	22,71	**0,005**	6,32	**0,001**	23,23	**0,005**	5,48	**0,001**
UP	25,28	**0,005**	13,23	**0,001**	50,11	**0,005**	28,00	**0,001**	43,12	**0,005**	17,79	**0,001**
KSD	25,28	**0,005**	2,51	**0,02**					41,36	**0,005**	25,17	**0,001**
KD	28,93	**0,005**	9,94	**0,001**					47,42	**0,005**	15,28	**0,001**
Kpo	8,02	**0,005**	2,63	**0,02**					10,67	**0,005**	1,54	0,138
PSD	27,80	**0,005**	10,50	**0,001**								
NP	19,88	**0,005**	9,95	**0,001**								
ND	28,61	**0,005**	5,84	**0,001**								

Znak	**Vegetativní znaky a znaky měřené na plodu**				**Pouze pro *R. aquatilis*, *R. baudotii* a *R. trichophyllus* B**			
	Znaky samostatně		Unikátní příspěvek		Znaky samostatně		Unikátní příspěvek	
	F	p	F	p	F	p	F	p
PlL	20,62	**0,005**	12,85	**0,001**	10,34	**0,005**	4,52	**0,012**
TNP					3,43	**0,045**	1,51	0,226
TNH					1,24	0,305	0,21	0,875
NChH	5,68	**0,005**	1,58	0,18	1,56	0,235	0,15	0,873
NChL	8,21	**0,005**	6,78	**0,001**	8,83	**0,005**	0,94	0,371
LoD	16,07	**0,005**	6,07	**0,001**	0,81	0,485	3,74	**0,027**
LP	17,53	**0,005**	2,63	**0,019**	0,36	0,66	2,18	0,131
RD	15,20	**0,005**	5,10	**0,001**	3,99	**0,025**	5,94	**0,001**
CD	9,20	**0,005**	1,01	0,419	0,69	0,525	2,67	0,071
UD	10,42	**0,005**	2,24	0,054	2,46	0,11	0,15	0,841
US	16,08	**0,005**	3,41	**0,003**	0,33	0,68	0,23	0,798
UP	28,22	**0,005**	20,69	**0,001**	12,41	**0,005**	8,35	**0,001**
KSD					34,48	**0,005**	6,52	**0,002**
KD					12,81	**0,005**	15,56	**0,001**
Kpo					2,09	0,115	1,62	0,216
PSD	30,94	**0,005**	20,14	**0,001**	21,91	**0,005**	5,71	**0,007**
NP	21,81	**0,005**	8,60	**0,001**	23,14	**0,005**	9,71	**0,002**
ND	30,65	**0,005**	6,82	**0,001**	6,86	**0,005**	0,46	0,625

3.3.5 Klasifikační diskriminační analýza

Pomocí klasifikační diskriminační analýzy bylo určeno procento správně zařazených jedinců a populací do druhu. Analýza byla opět provedena nejprve pro kombinaci všech znaků (tab. 11), dále pro vegetativní znaky (tab. 12), pro vegetativní znaky se znaky měřenými na květu (tab. 13) a pro vegetativní znaky se znaky měřenými na plodu (tab. 14). Poté byla analýza provedena pouze pro druhy *R. aquatilis*, *R. baudotii* a *R. trichophyllus* B, které se ukázaly být obtížně odlišitelné (tab. 15). V tabulkách (tab. 11–15) je uvedena procentuální úspěšnost zařazení vzorků do druhů.

Pravděpodobnost klasifikace do správné skupiny byla u většiny druhů poměrně vysoká, s výjimkou analýzy pracující pouze s vegetativními znaky. Nejproblematičtějšími populacemi byly rostliny *R. aquatilis* z Bojanovického rybníku, *R. trichophyllus* A z rybníku Drnov a populace *R. trichophyllus* A z rybníku Jejkal. Ani jedna ze studovaných rostlin nebyla klasifikována správně, všechny populace se však skládaly pouze z 1–2 vzorků. Dále byly obtížně určitelné rostliny z rybníků Alloch (pouze *R. trichophyllus* B) a Bezdrev (*R. trichophyllus* A). Pravděpodobnost správné klasifikace byla u obou populací 33,3 %. Dále byly záměny u populace z Černého Nadýmače (pravděpodobnost klasifikace 40 %). Dalšími problematickými populacemi byly rostliny z Bojanovického rybníku (*R. baudotii*), z rybníku Kabát, Malduchy, Skalní Mlýn a z obory Kněžičky. Pravděpodobnost správné klasifikace všech výše uvedených populací dosahovala 50 %. Nepřesnosti v klasifikaci byly i u několika dalších populací, více než polovina rostlin z těchto populací však byla určena správně.

Obecně byly vzájemně zaměňovány různé dvojice druhů, nejčastěji se však jednalo o záměny *R. trichophyllus* A s *R. trichophyllus* B. Dále lze častěji zaměnit *R. aquatilis* s oběma cytotypy *R. trichophyllus*. Také byl často špatně klasifikován *R. baudotii*, který byl nejčastěji zaměňován za *R. aquatilis, R. peltatus* a *R. trichophyllus* A (a tyto druhy byly naopak zaměňovány za *R. baudotii*).

Tab. 11 – Klasifikační matice pracující se všemi měřenými znaky. V řádku jsou skutečné taxony určené průtokovou cytometrií nebo sekvenací, zatímco ve sloupci jsou taxony přiřazené klasifikační diskriminační analýzou na základě jejich morfologie. Zkratky taxonů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.

Taxon	aqua	baud	pelt	rion	trich A	trich B	Počet jedinců (N)	Úspěšnost klasifikace (v %)
aqua	**29**	0	0	0	1	6	36	80,56
baud	2	**21**	1	0	0	1	25	84
pelt	1	0	**24**	0	1	0	26	92,31
rion	0	1	0	**45**	0	1	47	95,75
trich A	1	2	0	0	**33**	7	43	76,74
trich B	5	0	0	1	1	**19**	26	73,08
Celkem	38	24	25	46	36	34	203	**84,24**

Tab. 12 – Klasifikační matice pracující s vegetativními znaky. V řádku jsou skutečné taxony určené průtokovou cytometrií nebo sekvenací, zatímco ve sloupci jsou taxony přiřazené klasifikační diskriminační analýzou na základě jejich morfologie. Zkratky taxonů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.

Taxon	aqua	baud	pelt	rion	trich A	trich B	Počet jedinců (N)	Úspěšnost klasifikace (v %)
aqua	**37**	3	2	14	6	14	76	48,68
baud	7	**35**	4	3	9	4	62	56,45
pelt	17	1	**36**	2	2	7	65	55,39
rion	5	1	1	**57**	2	9	75	76
trich A	4	9	0	1	**62**	1	77	80,52
trich B	9	4	1	7	2	**25**	48	52,08
Celkem	79	53	44	84	83	60	403	**62,53**

Tab. 13 – Klasifikační matice pracující s vegetativními znaky a znaky měřenými na květu. V řádku jsou skutečné taxony určené průtokovou cytometrií nebo sekvenací, zatímco ve sloupci jsou taxony přiřazené klasifikační diskriminační analýzou na základě jejich morfologie. Zkratky taxonů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.

Taxon	aqua	baud	pelt	rion	trich A	trich B	Počet jedinců (N)	Úspěšnost klasifikace (v %)
aqua	**44**	1	0	2	8	10	65	67,69
baud	4	**35**	1	0	3	1	44	79,55
pelt	4	1	**47**	0	1	0	53	88,68
rion	1	1	0	**52**	1	10	65	80
trich A	3	2	0	0	**60**	7	72	83,33
trich B	5	1	0	5	2	**26**	39	66,67
Celkem	61	41	48	59	75	54	338	**78,11**

Tab. 14 – Klasifikační matice pracující s vegetativními znaky a znaky měřenými na plodu. V řádku jsou skutečné taxony určené průtokovou cytometrií nebo sekvenací, zatímco ve sloupci jsou taxony přiřazené klasifikační diskriminační analýzou na základě jejich morfologie. Zkratky taxonů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus* B.

Taxon	aqua	baud	pelt	rion	trich A	trich B	Počet jedinců (N)	Úspěšnost klasifikace (v %)
aqua	**29**	0	0	1	4	6	40	72,5
baud	1	**29**	2	0	0	2	34	85,29
pelt	3	1	**20**	0	2	1	27	74,07
rion	1	1	0	**47**	0	0	49	95,92
trich A	2	2	0	0	**38**	4	46	82,61
trich B	7	0	0	0	1	**25**	33	75,76
Celkem	43	33	22	48	45	38	229	**82,10**

Tab. 15 – Klasifikační matice pro druhy *R. aquatilis, R. peltatus* a *R. trichophyllus* B pracující se všemi znaky. V řádku jsou skutečné taxony určené průtokovou cytometrií nebo sekvenací, zatímco ve sloupci jsou taxony přiřazené klasifikační diskriminační analýzou na základě jejich morfologie. Zkratky taxonů: aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, trich B – *R. trichophyllus* B.

Taxon	aqua	baud	trich B	Počet jedinců (N)	Úspěšnost klasifikace (v %)
aqua	**30**	0	6	36	83,33
baud	3	**24**	0	27	88,89
trich B	4	0	**24**	28	85,71
Celkem	37	24	30	91	**85,71**

3.4 Srovnání s vodními formami

Terestrické formy byly pomocí t-testu porovnány s vodními formami lakušníků (viz tab. 16–21) a rozdíly mezi vybranými znaky byly znázorněny krabicovými diagramy (obr. 29–32). Některé zkoumané znaky byly z analýzy vynechány, jelikož pro vodní formy nebyly měřeny.

Terestrické a vodní formy se průkazně liší ve většině znaků ($p<0,05$). Výjimkou byla délka a šířka korunního lístku u druhu *Ranunculus aquatilis*, počet nažek u *R. peltatus*, délka řapíku, délka a šířka korunního lístku u *R. rionii* a délka řapíku a délka korunního lístku u *R. trichophyllus* B.

Tab. 16 – Srovnání terestrických a vodních forem druhu *R. aquatilis*.

Znak	Terestrické formy		Vodní formy		t	df	p
	Rozmezí	Průměr	Rozmezí	Průměr			
Délka řapíku niťovitého listu (mm)	2,5–22	6,6	1,6–7,1	3,9	5,76	106,79	**$7,86x10^{-8}$**
Délka čepele niťovitého listu (mm)	4,5–30	11,7	7–60,5	23	7,46	58,26	**$4,86x10^{-10}$**
Počet úkrojků	15–118	55	25–180	87	4,92	62,19	**$6,63x10^{-6}$**
Délka korunního lístku (mm)	2,2–8,7	5,8	3,5–9,6	5,8	-0,22	84,18	0,8257
Šířka korunního lístku (mm)	1,5–7,1	3,8	1,8–6,6	3,6	0,91	97,73	0,3643
Délka plodní stopky (mm)	6,5–36	21,3	19,5–118	40,7	-5,79	52,49	**$4,08x10^{-7}$**
Počet nažek	10–40	22	8–43	18	2,56	79,28	**0,0123**
Délka nažky (mm)	1,3–1,8	1,5	1,3–2,3	1,7	-4,64	71,36	**$1,5x10^{-5}$**

Tab. 17 – Srovnání terestrických a vodních forem druhu *R. baudotii*.

Znak	Terestrické formy		Vodní formy		t	df	p
	Rozmezí	Průměr	Rozmezí	Průměr			
Délka řapíku niťovitého listu (mm)	1,5–15	4,8	1–20,2	3	2,52	44,53	**0,0156**
Délka čepele niťovitého listu (mm)	5–20	11,5	6,2–49,3	17,1	-2,88	31,77	**0,0070**
Počet úkrojků	15–66	30	12–100	43	-3,27	35,17	**0,0024**
Délka korunního lístku (mm)	3,8–7,8	5,2	2,6–8,6	6,2	-3,56	43,73	**0,0009**
Šířka korunního lístku (mm)	2–4,6	3,2	1,7–7,2	4,4	-4,93	37,84	**$1,68x10^{-5}$**
Délka plodní stopky (mm)	17–65	38,8	10,5–142	72,3	-5,53	33,90	**$3,52x10^{-6}$**
Počet nažek	20–55	36	16–61	25	4,51	57,16	**$3,27x10^{-5}$**
Délka nažky (mm)	1–1,7	1,3	1,3–1,9	1,6	-6,92	49,93	**$8,03x10^{-9}$**

Tab. 18 – Srovnání terestrických a vodních forem druhu *R. peltatus*.

Znak	Terestrické formy		Vodní formy		t	df	p
	Rozmezí	Průměr	Rozmezí	Průměr			
Délka řapíku niťovitého listu (mm)	2–20	8,8	15–63	34,3			
Délka čepele niťovitého listu (mm)	5–21	10,8					
Délka úkrojku posledního řádu (mm)	1,1–5,7	2,5	4–19	7,8	-11,44	51,08	**$1{,}06 \times 10^{-15}$**
Délka korunního lístku (mm)	3,8–11,7	8,3	6–12,2	10	-4,93	94,39	**$5{,}63 \times 10^{-06}$**
Šířka korunního lístku (mm)	3,1–9,2	5,7	4,5–12,8	7,7	-5,88	86,03	**$1{,}51 \times 10^{-07}$**
Poměř délky a šířky korunního lístku	1,03–2,42	1,5	1–1,7	1,3	3,64	91,88	**0,0005**
Vzdálenost od báze až po nejširší místo korunního lístku (mm)	2–8,5	5,9	4–9,5	7	-4,35	94,9	**$4{,}64 \times 10^{-05}$**
Délka plodní stopky (mm)	15–60	34	25–90	51	-7,03	61,69	**$5{,}17 \times 10^{-09}$**
Počet nažek	10–47	26	1–57	23	0,05	35,35	0,9631
Délka nažky (mm)	0,9–2,8	1,8	1,3–2,1	1,6	1,67	53,37	**$1{,}68 \times 10^{-10}$**

Tab. 19 – Srovnání terestrických a vodních forem druhu *R. rionii.*

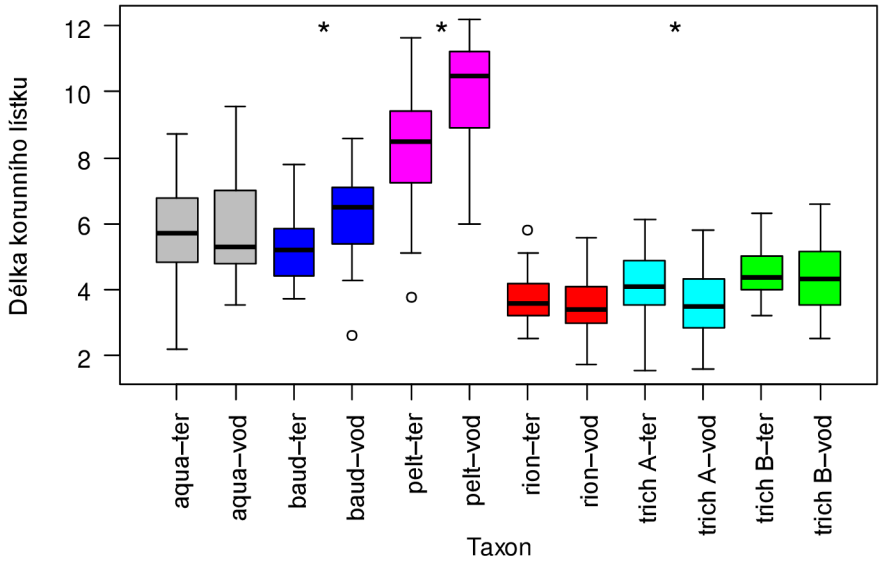
Znak	Terestrické formy		Vodní formy		t	df	p
	Rozmezí	Průměr	Rozmezí	Průměr			
Délka řapíku (mm)	1,5–13	3,6	0,5–18	3,6	-0,06	121,23	0,9492
Délka čepele (mm)	3–18	9,5	8–35,3	18,6	-10,48	97,42	**$2{,}2\times10^{-16}$**
Počet úkrojků	17–113	59	14–120	75	-4,48	142,52	**$1{,}518\times10^{-5}$**
Délka korunního lístku (mm)	2,5–5,8	3,7	2,2–5,6	3,6	1,13	125,22	0,2602
Šířka korunního lístku (mm)	0,9–3,3	2,2	1,2–3,2	2,1	1,55	127,55	0,1239
Délka plodní stopky (mm)	8–25	13,2	11,4–36,5	22,1	-11,45	104,69	**$2{,}2\times10^{-16}$**
Počet nažek	11–70	41	13–68	33	3,19	93,23	**0,0020**
Délka nažky (mm)	0,8–1,2	1,0	0,9–1,3	1,1	-2,39	106,95	**0,0184**

Tab. 20 – Srovnání terestrických a vodních forem druhu *R. trichophyllus* A.

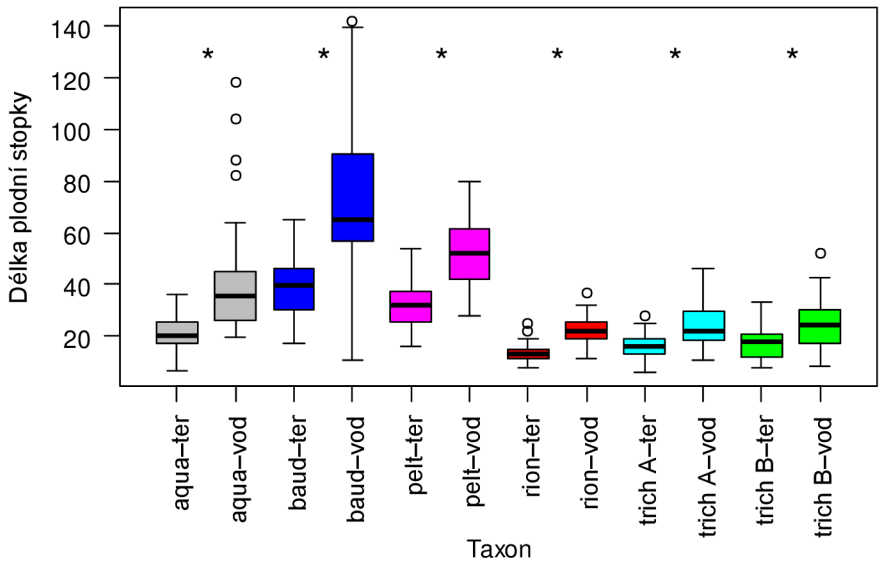
Znak	Terestrické formy		Vodní formy		t	df	p
	Rozmezí	Průměr	Rozmezí	Průměr			
Délka řapíku (mm)	2,5–31	7,2	1,7–7	3,6	7,07	80,83	**$1{,}65\times10^{-9}$**
Délka čepele (mm)	1–17	7,7	8,1–32,5	21,3	-16,7	96,54	**$1{,}10\times10^{-15}$**
Počet úkrojků	8–50	18	20-99	39	-11,8	95,05	**$1{,}10\times10^{-15}$**
Délka korunního lístku (mm)	1,6–6,2	4,1	1,6–5,8	3,5	3,42	125,54	**0,0011**
Šířka korunního lístku (mm)	0,9–4,5	2,3	0,7–3,6	1,9	3,84	123,32	**0,0003**
Délka plodní stopky (mm)	6–28	15,9	10–44	24	-6,69	97,33	**$2{,}82\times10^{-9}$**
Počet nažek	10–40	20	18–41	28	-7,05	75,06	**$1{,}84\times10^{-9}$**
Délka nažky (mm)	1,2–2,8	1,7	1–1,7	1,4	3,49	55,21	**0,0009**

Tab. 21 – Srovnání terestrických a vodních forem druhu *R. trichophyllus* B.

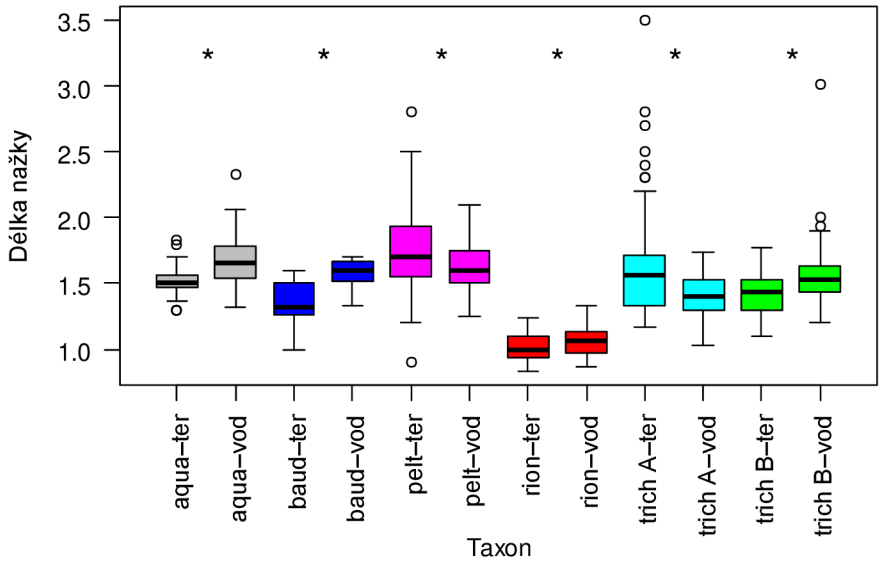
Znak	Terestrické formy		Vodní formy		t	df	p
	Rozmezí	Průměr	Rozmezí	Průměr			
Délka řapíku (mm)	1,5–13	4,7	1–26,5	5,0	-0,60	143,25	0,5469
Délka čepele (mm)	5–18	11	8–47	22,4	-10,76	143	**$2{,}2\times10^{-16}$**
Počet úkrojků	22–121	53	35–270	106	-10,22	144,63	**2.2×10^{-16}**
Délka korunního lístku (mm)	3,2–6,3	4,5	2,5–6,6	4,4	0,80	106,76	0,4272
Šířka korunního lístku (mm)	1,7–4,5	2,7	1,2–4	2,3	2,76	81,27	**0,0071**
Délka plodní stopky (mm)	8–33	17,6	5,8–52	24,3	-4,74	84,58	**$8{,}44\times10^{-6}$**
Počet nažek	20–40	27	4–40	16	11,13	71,53	**$2{,}2\times10^{-16}$**
Délka nažky (mm)	1,1–1,8	1,4	1,2–3	1,6	-3,75	73,74	**0,0004**



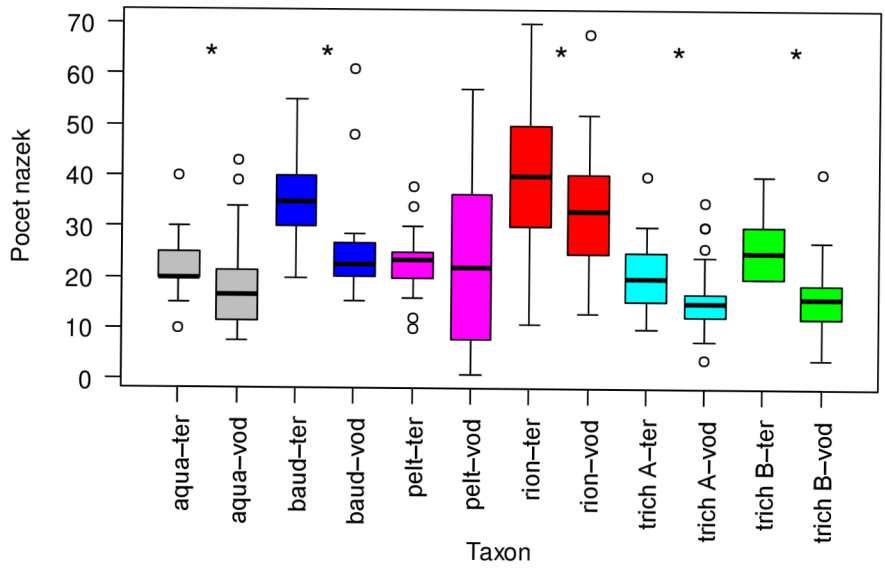
Obr. 29 – Krabicové diagramy pro porovnání délky korunního lístku mezi terestrickými a vodními formami. Taxony, u kterých je rozdíl statisticky významný, jsou označeny hvězdičkou. Zkratky: ter – terestrický, vod – vodní, aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus*.



Obr. 30 – Krabicové diagramy pro porovnání délky plodní stopky mezi terestrickými a vodními formami. Taxony, u kterých je rozdíl statisticky významný, jsou označeny hvězdičkou. Zkratky: ter – terestrický, vod – vodní, aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus.*



Obr. 31 – Krabicové diagramy pro porovnání délky nažky mezi terestrickými a vodními formami. Taxony, u kterých je rozdíl statisticky významný, jsou označeny hvězdičkou. Zkratky: ter – terestrický, vod – vodní, aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus.*



Obr. 32 – Krabicové diagramy pro porovnání počtu nažek mezi terestrickými a vodními formami. Taxony, u kterých je rozdíl statisticky významný, jsou označeny hvězdičkou. Zkratky: ter – terestrický, vod – vodní, aqua – *R. aquatilis*, baud – *R. baudotii*, pelt – *R. peltatus*, rion – *R. rionii*, trich A – *R. trichophyllus* A, trich B – *R. trichophyllus.*

4. Diskuze

4.1 Určování terestrických forem lakušníků pomocí měřených znaků

Analýzy byly provedeny celkem čtyřikrát pro různé kombinace znaků. Podle klasifikační analýzy je největší pravděpodobnost správného určení terestrických forem v případě, kdy jsou k dispozici všechny znaky (tj. rostlina má vyvinuté květy i plody). Analýza pracující se všemi znaky určila správně 84,2 % vzorků. Pokud nejsou na rostlině vyvinuté květy i plody zároveň, postačí ke správnému určení, když má rostlina vyvinuté buď pouze květy, nebo pouze plody. Analýza pracující s vegetativními znaky společně se znaky měřenými na plodu byla úspěšnější a úspěšnost klasifikace dosahovala 82,1 %. Analýza pracující s vegetativními znaky společně se znaky měřenými na květu byla úspěšná v 78,1 % případů. Nejhůře dopadla analýza pracující s vegetativními znaky, která určila správně 62,5 % vzorků.

Všechny studované znaky se signifikantně podílejí na odlišení druhů, ale ne vždy mají zároveň unikátní příspěvek. Z vegetativních znaků je pro určování nejdůležitější počet úkrojků, délka řapíku a přítomnost plovoucích listů. Ze znaků měřených na květu je to tvar nektária, délka korunního lístku a délka květní stopky. Ze znaků na plodech je nejdůležitější délka plodní stopky a délka nažky.

Jako nejlépe odlišitelné taxony vyšly *R. peltatus*, který se v lineární diskriminační analýze a v analýze hlavních komponent zcela oddělil od ostatních taxonů, a *R. rionii*, který má podle klasifikační analýzy nejvyšší procento správné klasifikace (95,8 %). Dále lze podle lineární diskriminační analýzy a PCA dobře určit *R. trichophyllus* A, v klasifikační analýze však vyšel jako jeden z obtížněji odlišitelných taxonů (pravděpodobnost úspěšné klasifikace byla 76,8 %). *Ranunculus peltatus, R. rionii* a *R. trichophyllus* A nejlépe rozlišíme podle velikosti květů, délky plodní a květní stopky a podle tvaru nektária. Zbylé tři taxony *R. aquatilis, R. baudotii* a *R. trichophyllus* B jsou podle PCA morfologicky podobnější. Z diskriminačních analýz a analýzy hlavních komponent vytvořených pouze pro tyto taxony je však patrné, že je odlišit lze (pravděpodobnost 85,7 %), a to hlavně pomocí délky květní a plodní stopky a počtu nažek. Dalšími znaky, které se také signifikantně podílejí na rozdělení druhů, jsou přítomnost plovoucích listů, chlupatost nažek, tvar nektária, délka řapíku, počet listových úkrojků, délka korunního lístku a délka nažky. Ostatní znaky nemají na rozlišení těchto tří druhů žádný vliv, s výjimkou délky lodyhy, která má unikátní

příspěvek. Z těchto tří druhů je nejlépe odlišitelný *R. baudotii* (úspěšnost klasifikace 84 %), druhy *R. aquatilis* a *R. trichophyllus* B byly v klasifikační diskriminační analýze často zaměňovány. Obecně nejmenší procento správné klasifikace má *R. trichophyllus* B (73,1 %), který se často plete kromě *R. aquatilis* také s *R. trichophyllus* A. I tak z výsledků vyplývá, že druhy obvykle pomocí několika znaků určit lze, ačkoliv některé se určují obtížněji.

Jedním z důležitých znaků je tvar valu jamky kolem nektária, který se také často uvádí v určovacích klíčích. V lineární diskriminační analýze tento znak vyšel jako průkazně se podílející na rozřazení vzorků do druhů, ale výsledky měření se v některých případech neshodují s určovacími klíči (např. Husák et al. 1982, 1988, Fisher et al. 2008, Jäger et al. 2011, Kaplan et al. 2019a), na což poukazují i další autoři, kteří se lakušníky zabývají (např. Cook 1966, Wiegleb 1988). *Ranunculus aquatilis* by podle uvedených zdrojů měl mít okrouhlý tvar nektária, častěji u něj však byla zaznamenána poloměsíčitá nektária (v 67 % případů). Také z dat pro vodní formy, které jsem získala od Johany Hanzlíčkové (Hanzlíčková 2021), vyplývá, že *R. aquatilis* má mnohem častěji poloměsíčitý tvar nektária (v 74 % případů). Tvar nektária u *R. peltatus* byl také variabilní, ale převažoval hruškovitý tvar nektária, který se uvádí v určovacích klíčích. U ostatních druhů se tvar valu jamky kolem nektária ve většině případů shodoval s určovacími klíči.

Pravděpodobnost správného určení rostlin v terénu nebo i v herbářích bude při určité zkušenosti jistě ještě vyšší, než vyplývá z výsledků diskriminačních analýz, jelikož do studie nebyla zahrnuta řada znaků, které jsou obtížně kvantifikovatelné, ale mohou přispět ke správné determinaci. Celkový habitus rostliny je významným ukazatelem toho, o jaký druh by se mohlo jednat. Některé rostliny jsou obecně menší a drobnější, jiné jsou naopak robustnější. To lze vypozorovat z mnoha měřených znaků, jako je délka lodyhy či délka a šířka listových úkrojků, ale také podle znaků, které měřeny nebyly, jako je například šířka lodyhy, květních a plodních stopek, které nám mohou při determinaci také pomoci. Dalším znakem, který se velmi obtížně kvantifikuje, obzvláště na základě herbářových položek, je barva rostliny. Na základě zkušenosti z terénního sběru lze například vypozorovat, že *R. rionii* je oproti ostatním lakušníkům zbarvený více do hněda. Na herbářových položkách tento rozdíl není příliš patrný, ale v přirozeném prostředí může být velmi nápomocný. Kromě celkového habitu rostliny nám může pomoci také ekologie rostliny, případně geografie.

Dále se k determinaci dají použít i další znaky, které jsou uváděny v literatuře, já jsem je však ve své práci neměřila. Jde o znaky, které se na herbářových položkách měří obtížně, nebo by při jejich měření byl příliš poničen materiál. Je to například délka, tvar a chlupatost květního lůžka, počet tyčinek, či tvar palistů. Použití těchto znaků by jistě také pomohlo k určení druhu.

4.2 Porovnání naměřených hodnot s literaturou

Tabulky 22–26 ukazují srovnání mých výsledků s dostupnou literaturou. Hodnoty v tabulkách se týkají vodních forem, jelikož se určovací klíče nezabývají terestrickými formami. Oba cytotypy druhu *R. trichophyllus* jsou zobrazeny v jedné tabulce (tab. 26, každý ve vlastním sloupci), jelikož se v literatuře obvykle nerozlišují a srovnávané hodnoty jsou pro oba druhy stejné. Pouze v Klíči ke květeně České republiky (Kaplan et al. 2019a) je zmínka o intermediárních rostlinách mezi *R. trichophyllus* a *R. aquatilis* vyskytujících se v nížinách a teplých pahorkatinách na minerálně bohatších podkladech, což odpovídá cytotypu *R. trichophyllus* B. Pro tento zdroj jsou tedy uvedeny některé hodnoty pro každý cytotyp zvlášť.

V Květeně České republiky (Husák et al. 1988) je *R. peltatus* uveden jako varieta druhu *R. aquatilis*. Údaje, které se vztahují zároveň k *R. peltatus* a *R. aquatilis*, jsou označeny hvězdičkou. Ostatní údaje jsou uvedeny pro každý taxon zvlášť.

Obecně lze ze srovnání hodnot s literaturou vypozorovat, že terestrické formy lakušníků jsou drobnější a redukovanější než vodní formy. Nejvíce patrný rozdíl je v délce lodyhy, která je obvykle mnohonásobně kratší než u vodních forem. Niťovité listy bývají také menší než u vodních forem, ale mohou dosahovat i srovnatelných rozměrů. Květní a plodní stopky terestrických forem jsou obvykle kratší, ale mezi naměřenými a srovnávanými hodnotami je opět překryv. U druhů, které mají ve vodním prostředí větší květy, obvykle dochází ke zmenšení květů. U malokvětých lakušníků však k této změně pravděpodobně nedochází, dokonce u nich byly naměřeny i vyšší hodnoty, než uvádí některé zdroje. Počet a chlupatost nažek se od určovací literatury příliš neliší, pouze u některých vzorků byly zaznamenány nižší hodnoty pro počet nažek. Nažky jsou obvykle podobně dlouhé, jako se uvádí v literatuře, ale u některých druhů bylo naměřeno větší rozpětí. Dále nedochází ke změně tvaru nektária, jehož tvar ale může být u některých druhů jiný, než je tradičně popisováno (viz výše).

Pokud bychom chtěli určovat terestrické formy lakušníků podle běžně dostupné literatury, je dobré se zaměřit spíše na generativní znaky, které se u vodních a terestrických forem tolik neliší (např. tvar nektária, chlupatost a počet nažek,…). Lze využít i znaky, které v této práci nebyly využívány, ale také se mezi vodními a terestrickými formami neliší (květní lůžko, palisty,…). Naopak není dobré se spoléhat na proměnlivé znaky, jako je délka lodyhy, délka květních a plodních stopek či velikost listů. Velikost korunních lístků může být při určování nápomocná, ale nelze se jí řídit doslovně, jelikož u řady druhů se mohou hodnoty zásadně lišit.

Tab. 22 – Srovnání naměřených znaků pro druh *R. aquatilis* s literaturou.

Ranunculus aquatilis						
Znak	**Naměřené znaky u terestrických forem**	**Klíč ke květeně České republiky** (Kaplan et al. 2019a)	**Květena České republiky** (Husák et al. 1988)	**Flóra Slovenska** (Husák et al. 1982)	**Klíč pro Rakousko, Lichtenštejnsko a jižní Tyrolsko** (Fisher et al. 2008)	**Klíč pro Německo** (Jäger et al. 2011)
Délka lodyhy	1,1–22,7 cm		30–150(–200) cm *	30–50(–200) cm	50–150 cm	10–200 cm
Délka řapíku	0,25–2,2 cm		do 2,5 cm *			niťovité listy měří max. 8 cm
Délka čepele	0,5–3 cm					
Přítomnost lupenitých listů	ano	ano	ano *	ano	ano	ano
Délka květní stopky	0,75–4,5 cm		zřídka delší než 5 cm *			
Délka korunního lístku	2,2–8,7 mm	4–10 mm	5–10 mm	5–10(–12) mm		5–10(–12) mm
Tvar valu jamky kolem nektária	poloměsíčitý nebo okrouhlý	zpravidla okrouhlý	okrouhlý až hruškovitý *	okrouhlý	okrouhlý	okrouhlý
Délka plodní stopky	0,7–3,6 cm	do 5 cm	zřídka delší než 5 cm *	do 5 cm		do 5 cm
Počet nažek	10–40		(20–)30–40(–80) *	(20–)30–40(–50)		(20–)30–40(–50)
Délka nažky	1,3–1,8 mm		do 1,7 mm			
Chlupatost nažek	řídce chlupaté	chlupaté nebo olysalé	lysé	lysé		

*hodnoty jsou společné pro *R. aquatilis* a *R. peltatus*

Tab. 23 – Srovnání naměřených znaků pro druh *R. baudotii* s literaturou.

Ranunculus baudotii						
Znak	**Naměřené znaky u terestrických forem**	**Klíč ke květeně České republiky** (Kaplan et al. 2019a)	**Květena České republiky** (Husák et al. 1988)	**Flóra Slovenska** (Husák et al. 1982)	**Klíč pro Rakousko, Lichtenštejnsko a jižní Tyrolsko** (Fisher et al. 2008)	**Klíč pro Německo** (Jäger et al. 2011)
Délka lodyhy	1,2–13,5 cm		20–90 cm	20–40cm	20–50 cm	20–50 cm
Délka řapíku	0,15–1,5 cm		niťovité listy 3–5 cm dlouhé, řapík 5–10 mm			
Délka čepele	5–20 mm					
Přítomnost lupenitých listů	ano	ano	ano	ano	ano	ano
Délka korunního lístku	3,8–7,8 mm	(4–)5–10 mm	5–10 mm	6–10 mm	6–7,5 mm	5,5–10 mm
Tvar valu jamky kolem nektária	poloměsíčitý, okrouhlý nebo hruškovitý	poloměsíčitý, okrouhlý nebo hruškovitý	obvykle poloměsíčitý	poloměsíčitý		poloměsíčitý
Délka plodní stopky	1,7–6,5 cm	5–18 cm	3–9 cm		4–8 cm	více než 5 cm
Počet nažek	20–55		30–70	(16–)33–39(–60)	obvykle méně než 40	20–30(–60)
Délka nažky	1–1,7 mm		1–1,4 mm		(1,1–)1,2–1,5(–1,7) mm	1–1,5 mm
Chlupatost nažek	lysé nebo řídce chlupaté	lysé nebo jen s ojedinělými chlupy	lysé	lysé		

Tab. 24 – Srovnání naměřených znaků pro druh *R. peltatus* s literaturou.

Ranunculus peltatus						
Znak	**Naměřené znaky u terestrických forem**	**Klíč ke květeně České republiky** (Kaplan et al. 2019a)	**Květena České republiky** (Husák et al. 1988)	**Flóra Slovenska** (Husák et al. 1982) **	**Klíč pro Rakousko, Lichtenštejnsko a jižní Tyrolsko** (Fisher et al. 2008)	**Klíč pro Německo** (Jäger et al. 2011)
Délka lodyhy	1,8–13,2 cm		30–150(–200) cm *		50–200 cm	20–200 cm
Délka řapíku	0,22–2 cm	délka niťovitého listu 1–8 cm (vč. řapíku)	do 2,5 cm *	do 2,5 cm		do 8 cm
Délka čepele	0,5–2,2 cm					
Přítomnost lupenitých listů	ano	ano	ano *	ano	ano	ano
Délka květní stopky	1,7–6 cm		zřídka delší než 5 cm *			
Délka korunního lístku	3,8–11,7 mm	(6–)8–15 mm	9–17(–20) mm	9–17 mm		(9–)12–15(–23) mm
Tvar valu jamky kolem nektária	hruškovitý, vzácně poloměsíčitý	hruškovitý, vzácně okrouhlý	okrouhlý až hruškovitý *		hruškovitý	hruškovitý
Délka plodní stopky	1,6–6 cm	delší než 5 cm	zřídka delší než 5 cm *			delší než 5 cm
Počet nažek	10–47		(20–)30–40(–80) *	(25–)30–40(–80)		(25–)30–40(–80)
Délka nažky	0,9–2,8 mm		1,7–2,2 mm	1,8–2,2 mm		1,8–2,3 mm
Chlupatost nažek	chlupaté	chlupaté nebo olysalé	lysé *	obvykle lysé		

*hodnoty jsou společné pro *R. aquatilis* a *R. peltatus*
**druh je zde uveden pod jménem *Batrachium rhipiphyllum*

Tab. 25 – Srovnání naměřených znaků pro druh *R. rionii* s literaturou.

Ranunculus rionii						
Znak	**Naměřené znaky u terestrických forem**	**Klíč ke květeně České republiky** (Kaplan et al. 2019a)	**Květena České republiky** (Husák et al. 1988)	**Flóra Slovenska** (Husák et al. 1982)	**Klíč pro Rakousko, Lichtenštejnsko a jižní Tyrolsko** (Fisher et al. 2008)	**Klíč pro Německo** (Jäger et al. 2011)
Délka lodyhy	7–13,8 cm		30–80 cm		5–50 cm	10–50 cm
Délka řapíku	1,5–13 mm					listy měří max. 4 cm, řapík do 2 cm
Délka čepele	3–18 mm					
Přítomnost lupenitých listů	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Délka květní stopky	0,7–2,5 cm		3–5 cm	3,5–5 cm	3–5 cm	do 4 cm
Délka korunního lístku	2,5–5,8 mm	2–5 mm	3,5–5 mm		5–7 mm	2,5–5 mm
Tvar valu jamky kolem nektária	poloměsíčitý, vzácně okrouhlý	poloměsíčitý, řidčeji hruškovitý	poloměsíčitý			okrouhlý nebo poloměsíčitý
Délka plodní stopky	0,8–2,5 cm	do 5 cm				
Počet nažek	11–70	25–70(–100)	(50–)60–100	50–100	často více než 50	do 90
Délka nažky	0,8–1,2 mm	0,8–1,3 mm	do 1 mm	do 1mm	0,8–1,2 mm	do 1,4 mm
Chlupatost nažek	lysé	lysé	lysé	lysé		

Tab. 26 – Srovnání naměřených znaků pro druh *R. trichophyllus* s literaturou.

Ranunculus trichophyllus							
Znak	**Naměřené znaky u terestrických forem** (*R. trich.* A)	**Naměřené znaky u terestrických forem** (*R. trich.* B)	**Klíč ke květeně České republiky** (Kaplan et al. 2019a)	**Květena České republiky** (Husák et al. 1988)	**Flóra Slovenska** (Husák et al. 1982)	**Klíč pro Rakousko, Lichtenštejnsko a jižního Tyrolsko** (Fisher et al. 2008)	**Klíč pro Německo** (Jäger et al. 2011)
Délka lodyhy	0,6–9 cm	2–14,6 cm		až přes 100 cm		10–150 cm	10–200 cm
Délka řapíku	0,25–3 cm	0,15–1,3 cm		0,2–3,5 cm			listy měří max. 8 cm, řapík do 4 cm
Délka čepele	0,1–1,7 cm	0,5–1,8 cm					
Přítomnost lupenitých listů	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Délka květní stopky	0,2–3,2 cm	0,6–2,5 cm		do 5 cm			do 4 cm
Délka korunního lístku	1,6–6,2 mm	3,2–6,3 mm	2–5 mm (*R. trich.* A) 3,5–6,5(–7,5) mm (*R. trich*. B)	3,5–6(–10) mm	(3,5–)5–10 mm	3,5–5 mm	3,5–5,5(–8) mm
Tvar valu jamky kolem nektária	poloměsíčitý	poloměsíčitý	poloměsíčitý	poloměsíčitý	poloměsíčitý		poloměsíčitý
Délka plodní stopky	0,6–2,8 cm	0,8–3,3 cm	1–3 cm (*R. trich.* A) 1,4–4,5 cm (*R. trich.* B)		do 5 cm	1–4 cm	
Počet nažek	10–40	20–40	10–30 (*R. trich.* A) 10–50 (*R. trich.* B)	15–40	15–40	méně než 40	15–33
Délka nažky	1,2–2,8 mm	1,1–1,8 mm	1–1,5 mm (*R. trich.* A) 1–1,8 mm (*R. trich.* B)	více než 1mm	1–2 mm	(1,1–)1,2–1,5(–1,7) mm	více než 1,5 mm
Chlupatost nažek	řídce chlupaté	řídce chlupaté	chlupaté nebo alespoň s ojedinělými chlupy		často lysé	chlupaté	

4.3 Porovnání terestrických a vodních forem

Obvykle se v literatuře (např. Cook 1966, Englmaier 2016) uvádí, že terestrické formy lakušníků mají oproti vodním formám kratší lodyhy, menší listy, kratší květní a plodní stopky, menší květy i nažky a u heterofylních druhů často chybí lupenité listy. Při srovnání naměřených hodnot s hodnotami pro vodní formy se však ukázalo, že to nemusí platit u všech druhů.

Například menší květy, které se často uvádějí jako jedna z charakteristik terestrických forem, mají pouze druhy *R. peltatus* a *R. baudotii*. U druhů *R. aquatilis*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* B ke změně velikosti květů vůbec nedochází a *R. trichophyllus* A má květy v terestrickém prostředí dokonce větší. Tyto posuny nám mohou trochu zkomplikovat determinaci podle určovacích klíčů, jelikož mezi velikostí květů pak není tak výrazný rozdíl jako u vodních forem. Přesto z provedených analýz vyplývá, že velikost korunních lístků je jedním z nejdůležitějších znaků i pro odlišení terestrických forem.

U většiny druhů byly pro terestrické formy naměřeny menší nažky, ale u *R. peltatus* a *R. trichophyllus* A byly nažky naopak větší.

Počet nažek byl u většiny studovaných druhů vyšší u terestrických forem, výjimkou byl pouze *R. peltatus*, kde nebyl v počtu nažek signifikantní rozdíl. Tento znak ovšem také může být ovlivněn subjektivitou, jelikož lze počítat buď pouze plně vyvinuté nažky, nebo i nažky, které nejsou plně vyvinuty. Ostatně nažky *R. peltatus*, které se s mými naměřenými hodnotami shodovaly, počítal Vojtěch Dolejšek, zatímco nažky ostatních druhů počítala Johana Hanzlíčková. Nabízí se tak možnost, že každý použil pro počítání nažek jiná kritéria.

Vegetativní znaky se v naprosté většině studovaných znaků průkazně lišily. Jedinou výjimkou byla délka řapíku, která je u taxonů *R. trichophyllus* B a *R. rionii* pro obě formy srovnatelná.

4.4 Porovnání výsledků s klíčem pro terestrické formy P. Englmaiera

Peter Englmaier (2016) se ve své práci zaměřil mimo jiné na terestrické formy a vytvořil klíč pro jejich určování. Neměřil však komplexní soubor znaků, jako je tomu v této práci, ale zaměřil se především na znaky, které se u terestrických forem neliší od vodních (tvar květního lůžka, tvar nektária, znaky na nažkách – křídlatost a rýhování, počet tyčinek). K určování využívá i některé znaky, které se u terestrických forem obvykle

liší (velikost květů a délka nažky). Jelikož je většina uvedených znaků na generativních orgánech, nelze podle nich určit sterilní jedince a obvykle ani jedince, kteří nemají vyvinuté květy a plody zároveň.

Většinu těchto znaků jsem ve své diplomové práci neměřila, ale některé lze využít pro srovnání naměřených hodnot. Například velikost květů Englmaier uvádí jako průměr květu, já jsem však měřila délku korunního lístku, jelikož by průměr nebylo možné na herbářových položkách změřit. Obě práce se ale shodují v tom, že největší květy ze všech studovaných druhů má *R. peltatus* s průměrem 15–20(–25) mm a délkou korunního lístku 3,8–11,7 mm (medián délky 8,8 mm). Další v pořadí je *R. aquatilis* s průměrem (12–)15–18 mm a délkou korunního lístku 2,2–8,7 mm (medián 5,7 mm). Jen o něco menší květy má *R. baudotii* s průměrem 12–15 mm a délkou korunního lístku 3,8–7,8 mm (medián 5,2 mm). *Ranunculus trichophyllus* s průměrem květu 6–12 mm zaujímá čtvrté místo, čemuž odpovídají i hodnoty naměřené pro terestrické formy: 3,2–6,3 mm (medián 4,4 mm) pro *R. trichophyllus* B a 1,6–6,2 mm (medián 4,2 mm) pro *R. trichophyllus* A. Zcela nejmenší květy má *R. rionii* s průměrem květu 6–8(–12) mm a délkou korunního lístku 0,9–3,3 mm (medián 3,6 mm).

U druhů *R. aquatilis* a *R. peltatus* je navíc zmíněna velikost nažky a tvar nektária. U *R. aquatilis* je uvedeno rozmezí velikosti nažek 1,4–1,7 mm, které odpovídá naměřeným hodnotám (1,3–1,8 mm). Jako typ nektária je stejně jako v jiné určovací literatuře uvedeno okrouhlé nektárium, což se neshoduje s mými výsledky, kde většina vzorků měla poloměsíčitá nektária. *Ranunculus peltatus* by podle Englmaierova klíče měl mít nažky delší než 1,7 mm, naměřené hodnoty však ukazují, že mohou být i menší (0,9–2,8 mm). Uvedený tvar nektária pro *R. peltatus* je hruškovitý, tedy stejný, jaký měla většina zkoumaných jedinců.

4.5 Určovací klíč pro terestrické formy

Pro správné určení je nutné vždy studovat více rostlin z populace a vzhledem k překryvu znaků brát v úvahu rozmezí variability spíše než jednotlivé hodnoty. Je také nutné mít na paměti, že některé druhy se mohou vyskytovat ve směsných populacích (nejčastěji byly na společných lokalitách nalezeny *R. peltatus* a *R. trichophyllus* A, *R. aquatilis* a *R. baudotii, R. aquatilis* a *R. trichophyllus* cytotypy A i B).

V určovacím klíči jsou uvedeny i některé znaky, které se běžně uvádějí v literatuře (např. Kaplan et al. 2019), ale v této práci jsem je neměřila. Tyto znaky jsou od ostatních odděleny pomlčkou.

1a Korunní lístky 2,5–6,5 mm dlouhé a 0,9–4,5 mm široké; květní a plodní stopky kratší než 35 mm; nektária převážně poloměsíčitá, vzácně okrouhlá; nikdy netvoří lupenité listy **2**

b Korunní lístky 2,2–11,7 mm dlouhé a 1,5–9,2 mm široké; květní a plodní stopky 6,5–70 mm; nektária poloměsíčitá, hruškovitá nebo okrouhlá; mohou tvořit i lupenité listy, ale ty se nevyskytují u všech rostlin ani všech populací **4**

2a Nektária poloměsíčitá, vzácně okrouhlá; počet nažek 11–70; nažky malé, 0,8–1,2 mm dlouhé, převážně lysé ..... ***Ranunculus rionii***

b Nektária pouze poloměsíčitá; nažek v souplodí max. 40; nažky větší, 1,1–2,8 mm dlouhé, řídce chlupaté **3**

3a Lodyha obvykle 6–90 mm dlouhá; řapík 2,5–31 mm dlouhý; listových úkrojků 8–50; korunní lístky 1,6–6,2 mm dlouhé a 0,9–4,5 mm široké... ***Ranunculus trichophyllus* A**

b Lodyha obvykle 20–146 mm dlouhá; řapík kratší, 1,5–13 mm dlouhý; listových úkrojků 22–121; korunní lístky 3,2–6,3 mm dlouhé a 1,7–4,5 mm široké..... ***Ranunculus trichophyllus* B**

4a Nektária převážně hruškovitá, vzácně poloměsíčitá; korunní lístky velké, 3,8–11,7 mm dlouhé a 3,1–9,2 mm široké; nažky 0,9–2,8 mm dlouhé; plodní stopka 16–60 mm; listové úkrojky 1,1–5,7 mm dlouhé, listových úkrojků 16–195..... ***Ranunculus peltatus***

b Nektária poloměsíčitá nebo okrouhlá, vzácně hruškovitá, korunní lístky 2,2–8,7 mm dlouhé a 1,5–9,2 mm široké; nažky 1–1,7 mm dlouhé; plodní stopka 6,5–65 mm; listové úkrojky 1,4–8,4 mm dlouhé; listových úkrojků 15–118 ..... **5**

5a Plodní stopky 6,5–36 mm; listových úkrojků 15–118; listové úkrojky 1,4–7 mm dlouhé; nažek 10–40; nažky 1,3–1,8 mm dlouhé – bez křídlatého lemu; květní lůžko za plodu zpravidla kulovité až široce vejcovité ..... ***Ranunculus aquatilis***

b Plodní stopky 17–65 mm; listových úkrojků 15–66; listové úkrojky 1,6–8,4 mm dlouhé; nažek 20–55; nažky 1–1,7 mm dlouhé – za zralosti v suchém stavu zpravidla s úzkým křídlatým lemem; květní lůžko za plodu prodloužené ..... ***Ranunculus baudotii***

4.6 Fotografie studovaných druhů

Fotografie studovaných druhů pořídil Petr Koutecký.

Obr. 33 – vodní forma *R. aquatilis*.

Obr. 34 – terestrická forma *R. aquatilis*.

Obr. 35 – vodní forma *R. baudotii*.

Obr. 36 – terestrická forma *R. baudotii*.

Obr. 37 – vodní forma *R. peltatus*.

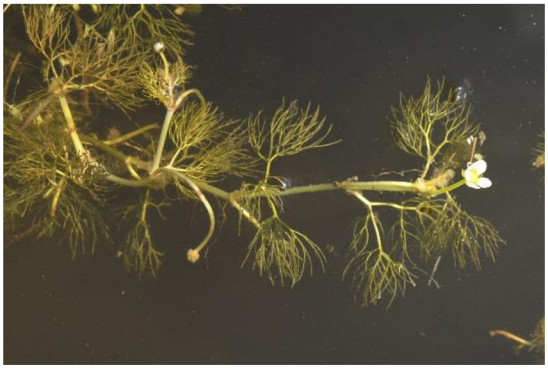
Obr. 38 – terestrická forma *R. peltatus*.

Obr. 39 – vodní forma *R. rionii*.

Obr. 40 – terestrická forma *R. rionii*.

Obr. 41 – vodní forma *R. trichophyllus* A.

Obr. 42 – terestrická forma *R. trichophyllus* A.



Obr. 43 – vodní forma *R. trichophyllus* B.

Obr. 44 – terestrická forma *R. trichophyllus* B.

5. Závěr

Terestrické formy lakušníků jsou oproti běžnějším vodním formám velmi redukované a jejich determinace je náročná. Řada znaků se mezi těmito dvěma formami významně liší, proto nelze spoléhat pouze na určovací klíče, které se zabývají vodními formami.

Tato práce potvrdila, že terestrické formy středoevropských druhů lakušníků *Ranunculus aquatilis*, *R. baudotii, R. peltatus, R. rionii, R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B od sebe lze odlišit, ačkoliv obtížněji než vodní formy. Nejlépe rozpoznatelné druhy jsou *R. peltatus* a *R. rionii*. Dobře rozeznat jdou také taxony *R. trichophyllus* A a *R. baudotii*. *Ranunculus aquatilis* a *R. trichophyllus* B mohou být vzájemně zaměnitelné, ale ve většině případů by mělo být možné je odlišit.

Pro úspěšné určení je třeba sledovat mnoho znaků, jelikož neexistuje jediný znak ani několik málo znaků, pomocí nichž by druhy šly spolehlivě určit. Nejvýznamnější znaky pro určování terestrických forem jsou převážně na květech (např. délka a šířka korunního lístku, tvar nektária a délka květní stopky) a na plodech (délka plodní stopky). Nejen generativní, ale i vegetativní znaky mohou být nápomocné při určování, nejvíce počet listových úkrojků niťovitých listů a přítomnost plovoucích listů. Většina rozmezí znaků se mezi sebou překrývá a je potřeba brát v potaz celkový habitus rostliny, ekologii a geografii. Ke správné determinaci je potřeba posuzovat více rostlin z populace a je zapotřebí určitá zkušenost s určováním těchto rostlin.

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.

Baltisberger M. & Hörandl E. (2016): Karyotype evolution supports the molecular phylogeny in the genus *Ranunculus* (Ranunculaceae). – Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 18: 1–14.

Baruch Z. & Merida T. (1995): Effects of drought and flooding on root anatomy in four tropical forage grasses. – International Journal of Plant Sciences 156: 514–521.

Blom C. W. P. M. & Voesenek L. A. C. J. (1996): Flooding: the survival strategies of plants. – Trends in Ecology and Evolution 11: 290–295.

Bobrov A. A., Zalewska-Gałosz J., Jopek M. & Movergoz E. A. (2015): *Ranunculus schmalhausenii* (section *Batrachium*, Ranunculaceae), a neglected water crowfoot endemic to Fennoscandia – a case of rapid hybrid speciation in postglacial environment of North Europe. – Phytotaxa 233: 101–138.

Bradshaw A. D. (1965): Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. – Advances in Genetics 13: 115–155.

Bradshaw A. D. (1972): Some of the evolutionary consequences of being a plant. – Evolutionary biology 6: 25–47.

Briggs D. & Walters S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. Ed. 3. – Univerzita Palackého, Olomouc.

Cook C. D. K. (1966): A monographic study of *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. – Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München 6: 47–237.

Dahlgren G. (1991): Karyological investigations in *Ranunculus* subg. *Batrachium* (Ranunculaceae) on the Aegean Islands. – Plant Systematics and Evolution 177: 193–211.

Dahlgren G. (1993): *Ranunculus penicillatus* in Norden. – Nordic Journal of Botany 13: 593–605.

Davis P. H. & Heywood V. H. (1963): Principles of angiosperm taxonomy. – Oliver and Boyd, Edinburgh.

Dawson F. H. (1980): Flowering of *Ranunculus penicillatus* (Dum.) Bab. var. *calcareus* (R. W. Butcher) C. D. K. Cook in the river piddle (Dorset, England). – Aquatic Botany 9: 145–157.

Diosdado J. C., Pastor J. E. & Valdés B. (1993): Contributions to the karyological study of the genus *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray from the Iberian Peninsula. – Botanical Journal of the Linnean Society. 112: 75–87.

Doyle J. J. & Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – Phytochemical Bulletin, Botanical Society of America 19: 11–15.

Eichenberger E. (1983): The effect of seasons on the growth of *Ranunculus fluitans* Lam. – International Symposium on aquatic Macrophytes. Nijmegen, The Netherlands.

Englmaier P. (2016): *Ranunculus* sect. *Batrachium* (Ranunculaceae): Contribution to an excursion flora of Austria and the Eastern Alps. – Neilreichia 8: 97–125.

Fischer M. A., Oswald K. & Adler W. (2008): Exkusionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. Ed. 3. – Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, Linz.

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, Praha, 35: 75–132.

Hanzlíčková J. (2021): Zhodnocení kryptické diverzity ve skupině lakušníku niťolistého (*Ranunculus trichophyllus* agg.). – Ms. Diplomová práce [depon in: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha].

He J. B., Bögemann G. M., van de Steeg H. M., Rijnders J. G. H. M., Voesenek L. A. C. J. & Blom C. W. P. M. (1999): Survival tactics of *Ranunculus* species in river floodplains. – Oecologia 118: 1–8.

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.

Husák Š., Hejný S. & Slavík B. (1988): *Batrachium* (DC.) S. F. Gray – lakušník. – In: Hejný S. & Slavík B. (eds), Květena České socialistické republiky 1: 446–456, Academia, Praha.

Husák Š., Slavík S. & Futák J. (1982): *Batrachium* (DC.) S. F. Gray. Močiarka. – In: Futák J., Bertová L., Hlavaček A., Hostička M., Chrtek J., Jasičová M., Kmeťová E., Křísa B., Osvačilová V., Zahradníková K. & Zelený V. (1982): Flóra Slovenska III: 197–215, VEDA – vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava.

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.

Jäger E. J. (2011): Rothmaler, Exkursionsflora von Deutschland. Ed. 20. – Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Jones H. (1955): Heterophylly in some Species of *Callitriche*, with especial reference to *Callitriche intermedia*. – Annals of Botany 74: 225–245.

Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. Jr., 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.

Kautsky L. (1987): Life-cycle of three populations of *Potamogeton pectinatus* L. at different degrees of wave exposure in the Askö area, northern Baltic proper. – Aquatic Botany 27: 177–186.

Kim J., Joo Y., Kyung J., Jeon M., Park J. Y., Lee H. G., Chung D. S., Lee E. & Lee I. (2018): A molecular basis behind heterophylly in an amphibious plant, *Ranunculus trichophyllus*. – PLOS Genetics 14: 1–21.

King R. A., Gornall R. J., Preston C. D. & Croft M. (2001): Molecular confirmation of *Potamogeton×bottnicus* (*P. pectinatus×P. vaginatus*, Potamogetonaceae) in Britain. – Botanical Journal of the Linnean Society 135: 67–70.

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. (2022): 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).

Lumbreras A., Olives A., Quintana J. R., Pardo C., & Molina J. A. (2009): Ecology of aquatic *Ranunculus* communities under the Mediterranean climate – Aquatic Botany 90: 59– 66.

Marhold K. & Suda J. (2001): Analýza multivariačních dat v taxonomii (Fenetické metody), verze 0.2. – Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra botaniky, Praha.

Meyer A. (1987): Phenotypic plasticity and heterochrony in *Cichlasoma managuense* and their implications for speciation in cichlid fishes. – Evolution 41: 1357–1369.

Molnár V. A, Tóth J. P., Sramkó G., Horváth O., Popiela A., Mesterházy A. & Lukács B. A. (2015): Flood induced phenotypic plasticity in amphibious genus *Elatine* (Elatinaceae) – PeerJ 3:e1473.

Moog P. R. (1998): Flooding tolerance in *Carex* species. I. Root structure. – Planta 207: 189–198.

Nicotra A. B., Leigh A., Boyce C. K., Jones C. S., Niklas K. J., Royer D. L. & Tsukaya H. (2011): The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. Functional Plant Biology 38: 535–52.

Pigliucci M. (2001): Phenotypic plasticity: Beyond nature and nurture. – John Hopkins University Press, Baltimore, MD.

Pigliucci M. & Kolodynska A. (2002): Phenotypic plasticity and integration in response to flooded conditions in natural accessions in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Brassicaceae). – Annals of Botany 90: 199–207.

Pigliucci M., Politi M. G. & Bellincampi D. (1991): Implications of phenotypic plasticity for numerical taxonomy of *Ornithogalum montanum* (Liliaceae). – Canadian Journal of Botany 69: 34–38.

Prančl J., Koutecký P., Trávníček P., Jarolímová V., Lučanová M., Koutecká E. & Kaplan Z. (2018): Cytotype variation, cryptic diversity and hybridization in *Ranunculus* sect. *Batrachium* revealed by flow cytometry and chromosome numbers. – Preslia 90: 195–223.

QGIS Development Team (2020): QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. URL http://qgis.osgeo.org.

Schlichting C. D. (1986): The evolution of phenotypic plasticity in plants. – Annual Review of Ecology and Systematics 17: 667–693.

Schönswetter P., Suda J., Popp M., Weiss-Schneeweiss H. & Brochmann C. (2007): Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. – Molecular Phylogenetics and Evolution 42: 92–103.

Simpson D. A. (1988): Phenotypic plasticity of *Elodea nuttallii* (PLANCH.) H. ST JOHN and *Elodea canadensis* MICHX. in the British Isles. – Watsonia 17: 121–132.

Sultan S. E. (1995): Phenotypic plasticity and plant adaptation. – Acta Botanica Neerlandica 44: 363–383.

Thiébaut G. & Muller S. (1998): Les communautés de macrophytes aquatiques comme descripteurs de la qualité de l'eau: exemple de la rivière Moder. – Annales de Limnologie 34: 141–153.

Villesen P. (2007): FaBox: an online toolbox for fasta sequences. – Molecular Ecology Notes, 7(6): 965–968.

Visser E. J. W., Blom C. W. P. M. & Voesenek L. A. C. J. (1996): Flooding-induced adventitious rooting in *Rumex*: morphology and development in an ecological perspective. – Acta Botanica Neerlandica 45: 17–28.

Vlčková L. (2020): Určování terestrických forem lakušníků (*Ranunculus* sect. *Batrachium*). – Bc. Diplomová práce [depon in: Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice].

Wells C. L. & Pigliucci M. (2000): Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. – Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 3: 1–18.

White T. J., Bruns T. D., Lee S. & Taylor J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. &White T. J. (eds), PCR protocols: a guide to methods and applications, 315–322, Academic Press, New York.

Wiegleb G., Bobrov A. A. & Zalewska-Gałosz J. (2017): A taxonomic account of *Ranunculus* section *Batrachium* (Ranunculaceae). – Phytotaxa 319: 1–55.

Zhang J., Van-Toai T., Huynh L., Preiszner J. (2002): Development of flooding-tolerant *Arabidopsis thaliana* by autoregulated cytokinin production. – Molecular Breeding 6: 135–144.

7. Přílohy

Příloha 1 – Hodnoty naměřené v cytometrické analýze. Průměr = průměrná fluorescence, počet = počet jader, CV % – koeficient variance v procentech, poměr = poměr vzorku a standardu s barvivem DAPI nebo PI; pokud je uváděn poměr s DAPI, byla hodnota přepočtena na odpovídající poměr s PI a jsou uvedeny obě.

		Ranunculus			***Bellis***				
Vzorek	Číslo lokality	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %	Poměr DAPI	Poměr PI
***Ranunculus aquatilis* 6x**									
Bojanovický r. 1	49	596,3	1309	3,7	200,9	496	1,7	2,968	3,71
Mikulovické j. 12	51	608,3	2306	1,9	196,7	1158	2,1	3,094	3,87
Alloch 2	7	619,5	1444	1,7	198,1	585	1,5	3,129	3,91
Bornova jáma 1,2,3	5	596,0	964	1,5	190,3	1733	1,9	3,133	3,92
Bornova jáma 4,5,6	5	601,3	1324	2,5	194,6	699	1,8	3,101	3,88
Bornova jáma 7,8,9	5	586,7	1332	2,2	186,3	1153	3,7	3,149	3,94
Dědova louka 7	9	599,4	2251	1,5	192,8	858	1,7	3,111	3,89
Dědova louka 8,9	9	606,9	1457	1,6	195,6	1569	1,9	3,105	3,88
Dědova louka 10,11,12	9	596,8	2402	2,0	192,0	767	2,3	3,108	3,89
Lánské louky 1,2,3	11	594,2	2309	1,9	190,6	676	2,1	3,119	3,90
Lánské louky 4,5,6	11	603,3	2571	1,6	192,8	696	1,9	3,131	3,91
Lánské louky 7,8	11	599,2	1887	1,8	192,0	511	1,3	3,121	3,90
Dolečky 1,2	3	599,5	2136	1,8	193,2	892	1,6	3,103	3,88
Dolečky 4,5,6	3	596,4	2073	1,9	191,8	887	1,8	3,111	3,89
Dolečky 7,8	3	605,0	2851	1,7	195,1	572	2,3	3,103	3,88
Alloch 18	7	600,7	2015	1,8	194,0	809	1,9	3,098	3,87
Alloch 19	7	594,2	1253	1,7	192,5	420	2,6	3,088	3,86
Alloch 24	7	586,6	1667	1,9	189,0	1290	2,3	3,107	3,88
Alloch 25	7	584,6	2579	1,9	188,6	745	2,2	3,101	3,88
Nagyivan 4/5.1	60	402,5	1967	4,8	107,2	2150	5,0		3,75
Nagyivan 4/5.2	60	403,3	2147	5,1	108,6	1531	5,6		3,71
Nagyivan 4/5.3–5	60	422,0	2768	5,0	112,6	1061	5,2		3,75
Cserebokeny 1/3.4	59	394,7	2562	4,2	103,2	1416	4,1		3,82
Drnov 2–4	43	393,3	2234	4,6	106,0	1553	2,8		3,71
Na Plachtě 1	22	373,0	2379	4,0	96,9	1314	2,9		3,85
Na Plachtě 2	22	374,8	2810	4,0	99,1	865	2,6		3,78
Na Plachtě 3–6	22	384,8	2516	3,9	97,9	1280	3,0		3,93
Na Plachtě 7–10	22	379,0	2444	3,5	100,7	1289	2,7		3,76
Vitnyéd 1	57	404,2	2198	2,3	102,9	1237	2,7		3,92
Darány 1.1	56	377,9	1615	3,0	97,7	1409	3,5		3,87
Darány 1.2	56	392,2	1845	2,4	97,6	768	2,7		4,02
Darány 2.1	56	384,8	2809	2,0	96,2	622	2,2		4,00

		Ranunculus			*Bellis*				
Vzorek	Číslo lokality	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %	Poměr DAPI	Poměr PI
Darány 2.2	56	417,2	2051	2,3	102,0	546	2,3		4,09
Darány 3.1	56	392,7	2213	2,2	99,8	1118	2,4		3,93
Darány 3.2	56	391,0	2468	3,1	96,4	596	4,1		4,06
Darány 4,5	56	390,7	2673	2,3	98,1	860	2,5		3,98
Darány 5–8	56	362,2	2083	2,2	91,2	1306	3,0		3,97
Skalní Mlýn 3.1	1	390,1	1909	2,4	101,3	845	2,8		3,85
Skalní Mlýn 3.2	1	395,5	1932	2,4	101,7	773	3,1		3,89
Skalní Mlýn 6.1	1	392,6	1580	2,1	101,3	1153	2,6		3,88
Skalní Mlýn 6.2	1	392,3	1829	2,5	100,6	854	2,9		3,90
Skalní Mlýn 9.1	1	398,5	1760	2,9	101,4	701	3,4		3,92
Skalní Mlýn 9.2	1	364,5	1697	11,1	100,2	971	6,3		3,64
Skalní Mlýn 10.1	1	389,7	1860	2,8	99,8	622	3,7		3,90
Skalní Mlýn 10.2	1	392,5	1566	3,2	101,4	961	3,9		3,87
Lánské louky 1	4	426,8	2836	2,7	112,0	734	3,6		3,81
Lánské louky 2	4	417,3	2674	2,0	106,2	1055	2,2		3,93
Lánské louky 3	4	431,2	2786	3,1	112,2	849	3,1		3,84
Košárské louky 1.1	10	652,0	2675	5,0	167,8	909	9,1		3,89
Košárské louky 1.2	10	789,1	1653	2,5	209,47	1971	2,7		3,77
Košárské louky 1.3	10	757,8	2215	1,6	201,95	981	1,9		3,75
Lanžhot, obora soutok 1.1	6	769,5	898	3,1	199,4	2162	3,2		3,86
Lanžhot, obora soutok 1.2	6	761,9	1402	2,5	202,58	1640	2,8		3,76
Lanžhot, obora soutok 1.3	6	778,8	1187	2,5	202,83	1663	2,7		3,84
Lanžhot, obora soutok 1–5	6	613,5	1091	1,5	202,10	2420	1,8	3,035	3,79
***Ranunculus baudotii* 4x**									
Bojanovický r. 2,4	49	411,9	1844	1,8	199,7	656	1,5	2,063	2,58
Mikulovické j. 1,2,3	51	411,5	2055	1,7	200,0	989	1,5	2,058	2,57
Mikulovické j. 4,5,6	51	408,1	2296	1,8	198,3	1043	1,9	2,058	2,57
Mikulovické j. 7	51	413,6	1789	2,0	202,3	1617	1,8	2,040	2,55
Mikulovické j. 9	51	416,2	2210	2,3	199,8	1008	2,2	2,084	2,61
Mikulovické j. 10	51	402,8	1221	2,0	192,0	1172	1,9	2,095	2,62
Mikulovické j. 11	51	417,5	1430	3,5	196,5	1005	3,5	2,125	2,66
Mikulovické j. 13,14,15	51	406,4	1757	2,3	196,9	1510	1,9	2,066	2,58
Jevišovice 1,2,3	50	393,4	2273	1,9	189,1	1102	2,7	2,080	2,60
Jevišovice 4,5,6	50	393,2	2869	1,8	190,8	663	2,7	2,062	2,58
Nagyivan 4/1,1	60	542,2	2211	4,1	213,4	1362	3,8		2,54
Nagyivan 4/1,2	60	541,0	2605	3,3	211,6	1152	3,7		2,56
Nagyivan 4/1,3–5	60	539,5	1822	3,5	210,4	2090	4,2		2,56
Nagyivan 4/4,1	60	520,0	3067	2,7	204,0	429	3,4		2,55
Nagyivan 4/4,2–4	60	503,8	2311	4,7	200,9	1235	4,7		2,51
Cserebokeny 1 / 2,1	59	535,2	2656	3,2	214,4	1105	3,5		2,50

		Ranunculus			*Bellis*				
Vzorek	Číslo lokality	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %	Poměr DAPI	Poměr PI
Cserebokeny 1 / 2,2	59	484,0	2950	3,0	194,2	891	3,7		2,49
Kunmadaras 3,2	58	469,5	1396	5,1	186,4	1703	5,3		2,52
Kunmadaras 3,3	58	477,5	1090	6,5	189,5	2078	5,6		2,52
Velký Olprám 1–3	32	550,9	2617	3,3	217,8	963	2,8		2,53
Velký Olprám 4–6	32	537,4	2141	3,3	208,8	1199	2,9		2,57
Velký Olprám 7–10	32	550,3	2457	3,0	215,6	911	3,0		2,55
Nepomyšlský rybník 1–3	34	519,7	2266	3,0	199,4	464	2,7		2,61
Nepomyšlský rybník 4–5	34	536,7	2317	3,3	209,8	547	2,5		2,56
Sedlec 1–3	24	530,1	1989	3,2	208,6	984	2,9		2,54
Sedlec 4–6	24	547,1	9485,	3,0	212,5	795	2,8		2,57
Zurndorf 1	62	536,7	2434	3,4	209,7	1177	3,4		2,56
Zurndorf 2–4	62	517,0	2734	3,1	202,2	1058	3,8		2,56
Dětaň 1.1	33	525,6	1654	1,6	204,7	2028	1,7		2,57
Dětaň 1.2	33	521,3	844	1,5	202,2	3136	1,9		2,58
Dětaň 2.1	33	523,5	1403	1,8	206,5	2039	2,0		2,54
Dětaň 2.2	33	523,5	1558	2,1	204,0	1929	2,0		2,57
Kosičky 1	23	526,2	1313	1,7	206,7	2294	2,5		2,55
Kosičky 1–3	23	423,3	621	1,5	207,6	757	1,8	2,039	2,55
Kosičky 1–5	23	405,0	815	1,6	195,2	1532	2,6	2,075	2,59
***Ranunculus circinatus* 2x**									
Kovářský rybník 1.1	55	347,8	2415	2,1	209,0	1257	2,4		1,66
Kovářský rybník 1.2	55	339,2	2416	2,3	199,9	1124	2,8		1,70
***Ranunculus peltatus* 4x**									
Chochol 1–4	41	377,3	2407	2,1	184,9	287	2,4		2,04
Chochol 5–7	41	402,5	2872	2,0	200,2	844	2,3		2,01
Jámský r. 1	29	338,6	2328	1,3	207,0	682	1,6	1,64	2,01
Jámský r. 2	29	335,7	1022	1,2	205,2	992	1,3	1,64	2,01
Jámský r. 3	29	336,5	2348	1	201,8	806	1,3	1,67	2,05
Jámský r. 4	29	354,9	764	1,0	204,0	292	1,6	1,74	2,14
Jámský r. 5–7	29	331,6	3348	1,6	202,2	640	1,4	1,64	2,01
Bezdrev 1–5	19	402,5	2545	2,9	200,7	1074	3,1		2,01
Bezdrev 6–10	19	419,8	2418	3,3	209,7	367	3,7		2,00
Bezdrev 11–14	19	428,5	2173	3,1	215,1	698	3,2		1,99
Malý Machovec 8–11	17	405,4	3267	2,5	203,2	534	2,8		2,00
Malý Machovec 12–14	17	411,5	3056	2,8	208,7	537	2,7		1,97
Vltava 1–4	20	419,1	2742	2,4	209,3	502	2,8		2,00
Vltava 5–7	20	405,1	2299	2,7	201,9	649	2,6		2,01
Oběšený r. 1	27	419,3	2919	2,6	211,4	841	2,6		1,98
Oběšený r. 2	27	409,7	2332	2,1	205,5	1645	2,9		1,99
Oběšený r. 3	27	421,8	2327	1,9	204,8	947	2,5		2,06

		Ranunculus			*Bellis*				
Vzorek	Číslo lokality	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %	Poměr DAPI	Poměr PI
Oběšený r. 4	27	411,4	2169	2,3	203,6	1416	2,2		2,02
Oběšený r. 6	27	409,1	2603	2,1	203,9	1238	2,5		2,01
Oběšený r. 7	27	413,9	2746	2,3	205,1	1093	2,6		2,02
Oběšený r. 8	27	421,8	2372	2,1	206,1	1565	2,6		2,05
Oběšený r. 9	27	408,1	3324	2,0	207,1	818	2,3		1,97
Nový r. 11	44	416,7	1887	2,9	202,4	813	3,7		2,06
Nový r. 12, 14–16	44	424,0	2748	3,1	211,6	445	3,1		2,00
Nový r. 13	44	388,9	2641	2,7	196,3	725	3,3		1,98
Nový r. 17, 18, 20, 22	44	401,6	2753	2,9	199,0	484	3,0		2,02
Nový r. 19	44	411,7	2229	3,1	204,7	880	3,6		2,01
Nový r. 21	44	421,8	2207	3,2	210,3	490	2,8		2,01
Malduchy 1	45	411,4	2205	4,4	210,2	1051	4,8		1,96
Malduchy 4	45	406,3	2844	3,2	206,3	682	3,9		1,97
Malduchy 6	45	418,9	2975	3,5	214,1	628	3,7		1,96
Rudmannser Teich 5	64	404,5	2528	2,9	204,4	810	3,4		1,98
Rudmannser Teich 6	64	415,0	2680	3,1	210,4	859	3,3		1,97
Rudmannser Teich 12	64	405,2	3098	2,7	206,0	520	3,2		1,97
Rudmannser Teich 13	64	400,8	2564	2,8	202,3	539	3,1		1,98
Smíchov II 3	46	428,1	1058	2,5	211,3	1079	2,7		2,03
Smíchov II 4	46	427,2	712	2,4	208,2	1201	2,8		2,05
Staroborský r. 1	54	411,9	842	2,8	212,5	568	2,6		1,94
Staroborský r. 2	54	413,3	1296	2	212,3	938	2,9		1,95
Staroborský r. 3	54	417,3	1520	2,7	214,1	1179	2,9		1,95
Bornova jáma 10,11	5	318,1	2408	2,1	194,3	609	2,0	1,639	2,05
Januš 1.1	21	413,6	2895	3,8	202,7	866	4,2		2,04
Januš 1.2	21	370,6	2807	5,6	184,5	375	4,8		2,00
Januš 1.3	21	417,8	3083	4,7	208,9	712	5,1		2,00
Januš 2.1	21	419,2	2244	4,0	211,4	1195	4,7		1,98
Januš 2.2	21	411,4	3118	4,1	208,6	871	4,1		1,98
Januš 2.3	21	433,3	2855	4,4	218,9	1054	4,5		1,98
Lánské louky - Dolečky 1	3	417,7	2715	2,5	209,6	1048	3,6		1,99
Lánské louky - Dolečky 2	3	421,4	3148	2,4	214,0	770	2,6		1,97
***Ranunculus rionii* 2x**									
Zaječí 1-6	16	241,3	2022	2,1	192,1	513	1,9	1,259	1,57
Biocentrum Ostrůvek 5-8	8	248,5	1818	1,8	198,5	673	1,6	1,251	1,56
Biocentrum Ostrůvek 1-4	8	245,7	2352	1,4	196,8	544	1,2	1,249	1,56
Bezkovský r. 1-3	48	253,0	2442	2,46	199,5	686	2,6	1,268	1,59
Alloch 8,9	7	249,4	2231	1,8	198,3	991	2,0	1,258	1,57
Alloch 10,11	7	247,7	1237	1,7	195,6	296	1,7	1,266	1,58
Alloch 12,15	7	249,9	2127	1,8	198,1	633	2,0	1,261	1,58

		Ranunculus			*Bellis*				
Vzorek	Číslo lokality	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %	Poměr DAPI	Poměr PI
Alloch 13,14	7	244,2	2627	2,00	194,5	769	2,2	1,256	1,57
Alloch 16,17	7	251,1	2061	1,3	199,6	883	1,7	1,258	1,57
Dědova louka 1,2,3	9	242,8	1923	1,9	193,5	889	2,0	1,255	1,57
Dědova louka 4,5	9	243,3	2406	1,9	193,7	1347	2,4	1,256	1,57
Suchohrdelský r. 1,2,3	53	245,9	1963	1,6	194,6	691	1,5	1,263	1,58
Dolní Mušlovský r. 1-5	13	243,9	2885	1,8	192,9	514	1,7	1,265	1,58
Úvalský r. 1–4	15	240,5	2160	2,2	190,1	1330	2,3	1,265	1,58
Alloch 22	7	234,4	2485	2,2	187,0	963	2,7	1,253	1,57
Kabát (analýza z nažek)	36	202,3	1349	16,1	95,4	1515	13,0	1,41	1,77
Nagyivan 4/2.1–4	60	306,1	2857	2,8	199,2	765	2,3		1,54
Sedlec 1	24	343,4	1318	3,8	215,5	625	3,3		1,59
Klosterneuburg 6	63	336,3	2999	2,9	210,7	1011	5,6		1,60
Klosterneuburg 7	63	335,6	3210	3,0	212,3	789	3,3		1,58
Běstvina 1, 4, 5	25	346,2	1978	6,1	214,6	597	6,8		1,61
Běstvina 6, 7	25	341,2	2761	6,1	219,2	687	8,3		1,56
Wörtenlacken 1	61	317,5	2740	3,0	203,8	1149	3,0		1,56
Kunov 1	65	345,4	2295	2,7	218,3	1239	3,3		1,58
Kunov 2	65	331,5	2238	2,7	209,4	1036	2,7		1,58
Dědek	26	321,47	1307	1,4	202,95	2970	1,5		1,58
Dubnický rybník 1–10.1	35	319,8	2922	2,6	201,7	1229	2,6		1,59
Dubnický rybník 1–10.2	35	322,9	1145	3,8	202,9	2804	3,9		1,59
Dubnický rybník 1–10.3	35	327,7	1621	2,8	207,7	1549	3,2		1,58
Prostřední rybník 1	12	331,2	2597	3,0	203,3	1362	3,4		1,63
Prostřední rybník 1–10	12	338,6	1906	3,0	208,0	1750	3,2		1,63
Šmaňák 1	28	324,7	1058	2,2	203,9	2678	2,0		1,59
Šmaňák 1–5	28	235,0	682	2,3	187,4	1560	2,5	1,254	1,57
Šmaňák 6–10	28	244,2	409	2,1	199,3	1850	2,0	1,225	1,53
***Ranunculus trichophyllus* A 4x**									
Bezdrev 1–4	19	541,1	1781	2,2	207,8	473	2,9		2,60
Bezdrev 5–8	19	546,9	1180	2,6	210,6	767	3,4		2,60
Malý Machovec 1–4	17	550,5	3160	2,2	207,8	581	2,9		2,65
Malý Machovec 5–7	17	547,9	3255	2,2	207,6	490	2,9		2,64
Oběšený r. 1–5	27	538,9	2359	1,5	205,5	514	2,1		2,62
Oběšený r. 6–8	27	550,6	2923	2,0	206,9	565	2,2		2,66
Oběšený r. 9–11	27	548,0	2666	2,1	206,4	740	2,5		2,66
Oběšený r. 12	27	539,2	2395	1,8	205,2	814	2,3		2,63
Jezero 1–5	42	533,8	2488	3,1	201,7	891	3,2		2,65
Jezero 6–10	42	536,6	2247	2,8	199,0	665	3,4		2,70
Jezero 11	42	533,0	1176	1,5	203,5	1438	2,6		2,62
Jezero 12	42	543,7	1677	1,9	205,7	1293	2,8		2,64

		Ranunculus			*Bellis*				
Vzorek	Číslo lokality	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %	Poměr DAPI	Poměr PI
Jezero 13	42	530,7	1513	2,4	204,9	941	3,3		2,59
Jezero 14–16	42	557,7	1648	3,1	210,8	974	3,6		2,65
Nový r. 1	44	568,6	2371	3,3	212,4	851	3,7		2,68
Nový r. 2–5	44	548,6	2812	2,2	203,8	388	2,5		2,69
Nový r. 6, 8, 9	44	558,5	2108	2,9	210,4	535	3,2		2,66
Nový r. 7	44	570,7	1952	2,3	212,4	591	3,7		2,69
Nový r. 10	44	557,6	1475	1,7	209,5	1164	3,1		2,66
Haberský Mlýnský r. 1	18	557,1	1931	2,0	210,9	1308	2,9		2,64
Haberský Mlýnský r. 2, 3, 5–7	18	539,7	2578	2,0	202,7	1301	2,9		2,66
Haberský Mlýnský r. 4	18	546,6	2564	1,6	208,0	992	2,6		2,63
Haberský Mlýnský r. 9–13	18	543,7	3043	2,2	203,9	563	2,8		2,67
Malduchy 1	45	560,6	2417	3,0	212,9	702	5,0		2,63
Malduchy 2	45	580,5	2118	2,6	219,1	477	2,5		2,65
Malduchy 3	45	577,7	1987	3,0	215,0	670	3,2		2,69
Malduchy 4	45	560,5	2665	2,7	208,2	549	2,9		2,69
Malduchy 5	45	591,5	2493	2,2	223,8	611	3,2		2,64
Malduchy 6–10	45	422,0	2803	1,8	194,4	500	1,6	2,17	2,66
Rudmannser Teich 1	64	521,5	2440	2,1	196,0	704	2,6		2,66
Rudmannser Teich 2	64	511,0	1821	2,8	195,1	892	3,0		2,62
Rudmannser Teich 3	64	531,6	2001	2,9	202,4	760	3,4		2,63
Rudmannser Teich 4	64	524,9	2032	2,4	200,5	969	2,9		2,62
Rudmannser Teich 5	64	513,5	2124	3,0	200,9	979	4,4		2,56
Smíchov II 1	46	602,1	1863	2,1	224,9	1464	2,9		2,68
Smíchov II 2	46	552,1	905	2,4	205,8	736	3,4		2,68
Jejkal 1–2	52	421,5	2318	1,7	198,1	693	1,9	2,13	2,66
Černý Nadýmač 1–5	40	515,6	1425	3,0	199,2	1170	2,8		2,59
Drnov 1	43	504,5	2214	3,0	199,3	996	2,5		2,53
***Ranunculus trichophyllus* B 4x**									
Trkmanec-Rybníčky 4-5	14	447,5	2203	1,9	191,4	857	2,0	2,338	2,93
Trkmanec-Rybníčky 1-3	14	460,2	1969	1,7	198,3	859	1,7	2,322	2,90
Alloch 1	7	459,7	2151	1,8	198,3	557	1,6	2,319	2,90
Alloch 3	7	462,5	2263	1,7	199,0	713	1,7	2,324	2,91
Alloch 4,5	7	460,6	1523	1,7	198,1	423	1,5	2,325	2,91
Alloch 6,7	7	465,2	1981	1,6	199,6	379	1,8	2,338	2,92
Dědova louka 6	9	456,8	1094	1,5	196,5	913	2,0	2,325	2,91
Plačkův les 1-5	2							2,354	2,94
Alloch 20,21	7	447,0	2033	1,7	193,2	629	2,3	2,313	2,81
Alloch 23	7	440,3	2823	2,2	188,7	794	2,6	2,335	2,92
Kněžičky 1 (analýza z nažek)	38	346,2	186	3,6	98,6	2030	14,1	2,341	2,93

		Ranunculus			*Bellis*				
Vzorek	Číslo lokality	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %	Poměr DAPI	Poměr PI
Kněžičky 2 (analýza z nažek)	38	357,3	533	5,8	96,4	2233	13,3	2,471	3,09
Dománovický les 1	31	586,6	2606	2,6	205,7	989	2,4		2,85
Dománovický les 2–4	31	601,8	2138	3,0	211,7	1483	2,1		2,84
Dománovický les 5–7	31	620,8	2451	3,5	213,2	923	2,8		2,91
Křečkovský bor 1	37	568,9	3019	2,9	201,4	633	2,5		2,82
Křečkovský bor 2	37	567,0	2974	3,0	200,9	851	2,5		2,82
Křečkovský bor 3–6	37	565,8	2189	2,2	197,6	951	2,5		2,86
Křečkovský bor 7–10	37	597,4	2416	3,3	211,0	1434	3,0		2,83
Cerhenice 1	30	568,4	1866	2,8	196,3	1132	4,4		2,90
Alloch 1–2.1	7	314,8	2188	3,9	104,4	1455	4,0		3,02
Trkmanec-Rybníčky 1.1	14	311,6	1932	3,4	104,1	1935	4,2		2,99
Trkmanec-Rybníčky 1.2	14	619,6	2411	3,2	212,1	1265	3,8		2,92
Hrabanovská černava 1	39	604,5	2506	1,8	201,7	1214	1,9		3,00
Hrabanovská černava 2	39	610,0	2302	1,8	202,7	1140	2,0		3,01
Hrabanovská černava 3	39	608,8	2286	1,8	203,2	1091	1,8		3,00
Hrabanovská černava 4	39	599,4	2429	1,9	200,6	1327	1,9		2,99