

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Variabilita lakušníku štítnatého (*Ranunculus
peltatus*)**

Magisterská práce

Bc. Vojtěch Dolejšek

Školitel: Mgr. Petr Kouřecký, Ph.D.

České Budějovice 2023

Dolejšek V. (2023): Variabilita lakušního štítnatého (*Ranunculus peltatus*). [Variability of pond water-crowfoot (*Ranunculus peltatus*). Mgr. Thesis, in Czech] – 71 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This thesis covers variability of pond water-crowfoot (*Ranunculus peltatus*) from different parts of Europe. The aim of this thesis is to investigate morphological and genetic variability in different ploidy levels of *Ranunculus peltatus*. Multivariate statistical methods were used for analysing morphological data, neighbor net and haplotype network were used to analyse sequence data.

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

V Českých Budějovicích 4. 4. 2023

.....

Vojtěch Dolejšek

Poděkování

Poděkování patří především mému školiteli Petru Kouteckému za vedení mé práce, za užitečné rady a veškerou pomoc. Další poděkování patří všem, kteří mi pomohli se sběrem materiálu, vedle školitele především Janu Prančlovi, Zdeňku Kaplanovi a Magdaleně Lučanové. Janu Prančlovi děkuji také za užitečné rady týkající se metodického přístupu k morfometrice.

Obsah

1 Úvod.....	1
1.1 Vymezení skupiny, rozšíření, ohrožení.....	1
1.2 Ekologie	2
1.3 Morfologie.....	3
1.4 Velikost genomu a polyploidizace	4
1.5 Hybridizace	5
1.6 Fenotypová plasticita.....	5
1.7 <i>Ranunculus pelatus</i>	6
1.7.1 Popis	6
1.7.2 Ekologie a rozšíření	7
1.7.3 Ploidie a velikost genomu.....	7
1.7.4 Hybridizace.....	7
1.7.5 Podobné taxony	9
1.8 Problematika a cíle práce	12
2 Metodika	13
2.1 Použitý materiál.....	13
2.2 Stanovení DNA ploidie	14
2.3 Sekvenování	20
2.3.1 Materiál.....	20
2.3.2 Izolace DNA	20
2.3.3 PCR.....	21
2.3.4 Gelová elektroforéza.....	22
2.3.5 Příprava vzorků k sekvenování.....	22
2.4 Morfometrika	22
2.5 Analýza dat.....	26
2.5.1 Sekvenační data	26
2.5.2 Morfometrická data	27
3 Výsledky	29
3.1 Morfometrické analýzy	29
3.1.1. Popisné statistiky	29
3.1.2 Korelační analýza	32
3.1.3 Vlastní morfometrické analýzy	34
3.1.4 Analýza hlavních komponent (PCA).....	34
3.1.5 Lineární diskriminační analýza	41

3.1.6 Klasifikační diskriminační analýza	51
3.2 Genetické analýzy	51
3.2.1 ITS neighbor network	51
3.2.2 Chloroplastové úseky	52
4 Diskuze	55
4.1 Materiál	55
4.1.1 Sběr materiálu	55
4.1.2 Stanovení DNA ploidie	55
4.2 Morfometrická měření	56
4.3 Morfometrické analýzy	57
4.4 Genetická variabilita a původ cytotypů	58
4.5 Taxonomické hodnocení ploidních úrovní (cytotypů)	60
4.6 Fotografie studovaných cytotypů a <i>R. schmalhauseni</i>	62
5 Závěr	67
6 Literatura	68

1 Úvod

Tato práce navazuje na moji bakalářskou diplomovou práci, v níž jsem se zabýval stejným druhem (*Ranunculus peltatus*). Tématem mojí bakalářské diplomové práce byla analýza variability říčních a hybridogenních říčních populací druhu převážně v jižních Čechách v porovnání s populacemi ze stojatých vod. V magisterské práci zvolený metodický přístup je tedy podobný jako metodický přístup v práci bakalářské. Část dat použitých v mé bakalářské práci bude použita i v práci magisterské.

Lakušníky jsou taxonomicky problematická skupina. Jejich komplikovanost je dána především velkou fenotypovou plasticitou, hybridizací a polyploidizací (často allopolyploidizací). V případě některých druhů či druhových komplexů je známá genetická, morfologická a ekologická variabilita, která dosud postrádá taxonomické zhodnocení (Cook, 1966; Zalewska-Gałosz, 2014; Prančl et al., 2018).

Ve své diplomové práci se zabývám druhem lakušníku *Ranunculus peltatus*. Jde o široce rozšířený evropský druh udávaný ve třech hlavních ploidních úrovních: diploidní, tetraploidní a hexaploidní (Cook, 1966). Zároveň je známo, že se kříží s jinými druhy lakušníků. Náplní této práce je posoudit, zda se populace o odlišných ploidních úrovních morfologicky liší. Dále je náplní práce zhodnotit genetickou variabilitu napříč ploidiemi druhu a porovnat ji s morfologickou variabilitou.

1.1 Vymezení skupiny, rozšíření, ohrožení

Pryskyřník (*Ranunculus*) je rod cévnatých rostlin z čeledi Ranunculaceae z řádu Ranunculales (Angiosperm Phylogeny Group, 2016). Jde o široký rod čítající téměř 1700 akceptovaných druhů (POWO, 2023). Kromě terestrických druhů čítá rod i druhy obojživelné či vodnímu prostředí zcela přizpůsobené (např. obojživelné druhy *R. flammula* či *R. sceleratus*) (Cook, 1966; Hejný et Slavík, 1997). Nápadná skupina přizpůsobená vodnímu prostředí jsou lakušníky. Všechny druhy lakušníků se vyznačují přizpůsobením na vodní prostředí – schopností tvorby nit'ovitých ponořených listů. Nit'ovité listy nemusí být vyvinuty vždy, ale schopnost je vyvíjet rostliny mají. Nit'ovité listy mohou tvořit i jiné druhy pryskyřníků (např. *R. polyphyllus*) (Király et al., 2011). Kromě přizpůsobení se vodnímu prostředí je pro ně charakteristické i to, že, na rozdíl od většiny ostatních pryskyřníků, kvetou téměř zpravidla bíle. To vedlo k tomu, že byly dříve někdy vyčleňovány do samostatného rodu (*Batrachium*) (např. Hejný et Slavík, 1997; Kubát et al., 2002). Pomocí molekulárních metod se potvrdila neoprávněnost tohoto přístupu, jelikož lakušníky jsou vnořeny do větvi rodu pryskyřník. Proto

je správné je klasifikovat jako sekci rodu pryskyřník: *Ranunculus* sect. *Batrachium* (Emadzade et al., 2010; Hörandl et Emadzade, 2012).

Wiegleb et al., 2017 rozlišuje třicet druhů lakušníků, nicméně pro jejich nedostatečnou prostudovanost určitě není tento počet druhů konečný. Kupříkladu *R. trichophyllus* se na základě výzkumu ve střední Evropě ukázal být komplexem dvou taxonů, které se liší mimo jiné ekologicky a velikostí genomu (Prančl et al., 2018). Dalším příkladem je *R. penicillatus*. Jde o komplex více allopolyploidních taxonů (Zalewska-Gałosz, 2014). Lakušníky jsou rozšířeny celosvětově, ale v některých oblastech jsou výrazně méně početné či chybí (zejména ve velkých částech jižní polokoule). Těžištěm diverzity skupiny je severní polokoule, zejména pak západní Evropa, kde se vyskytují dvě třetiny dosud známých druhů (Cook, 1966; Wiegleb et al., 2017).

Vlivem změn v obhospodařování krajiny, regulacemi vodních toků a vysoušením mokřadů došlo u některých druhů k úbytku populací až zařazení do seznamů ohrožených druhů (Grulich, 2012; Englmaier, 2016). Například z českých druhů (uznáváno 8 druhů) je do nějaké kategorie ohrožení zahrnuto sedm druhů (Grulich, 2012). Ne všechny ohrožené lakušníky jsou, stejně jako v případě jiných rodů, zákonem chráněné. To je možno opět demonstrovat příkladem České republiky, kde jsou podle vyhlášky Ministerstva životního prostředí ČR č. 395/1992 Sb. nějakým způsobem chráněny dva druhy z celkových sedmi ohrožených.

1.2 Ekologie

Lakušníky jsou jednoleté až vytrvalé rostliny vázané na vodní prostředí. Vytrvalé druhy bývají většinou krátkověké (žijí několik let) (Cook, 1966; Englmaier, 2016). Obývají především sladké stojaté a tekoucí vody, přičemž některé druhy jsou vázané jen na jeden typ vodního prostředí (*R. fluitans* v tekoucí vodě, *R. circinatus* ve stojaté vodě), jiné druhy obývají oba typy prostředí (např. *R. peltatus*) (Cook, 1966; Kaplan et al., 2019). Některé druhy rostou v solemi bohatším prostředí nebo jsou ho schopny snášet. Mezi takové druhy patří *R. rionii* či *R. baudotii*, které jsou nalézány mimo jiné na slaniskách. Některé druhy (např. opět *R. baudotii*) rostou i v brakické vodě na mořském pobřeží (Cook, 1966; Hejný et Slavík, 1997; Chytrý et al., 2021). Část druhů snese pokles vodní hladiny, při kterém je schopna na vlhkém dně vytvářet terestrické formy (*R. trichophyllus*, *R. peltatus*, *R. rionii* a jiné). Terestrické prostředí má vliv na morfologii rostlin, což komplikuje jejich determinaci (Cook, 1966; Vlčková, 2022). *Ranunculus hederaceus* je na prostředí vlhké půdy a obnaženého dna vázán primárně (Cook, 1966). Některé druhy jsou schopny po celý život růst, kvést a plodit pod vodní hladinou na dně

(*R. confervoides*) (Cook, 1966; Bobrov et al., 2015). Část druhů je schopna snášet eutrofní vody (*R. rionii*) (Cook, 1966), část upřednostňuje vody oligotrofnější (*R. confervoides*) (Bobrov et al., 2015). Některé druhy (*R. schmalhauseni*) mají mít dokonce indikační hodnotu pro neznečištěné vody (Bobrov et al., 2015). Lakušníky osidlují prostředí od nížin do hor, od subtropických oblastí až po oblasti boreální (Cook, 1966; Wiegleb et al., 2017).

Lakušníky jsou nejčastěji hmyzosubné, ale byla zaznamenána i autogamie až kleistogamie (opylení vlastním pylem v trvale zavřeném květu) (Kaplan et al., 2019). V případě, že rostliny kvetou pod vodou (např. trvale ponoření jedinci *R. confervoides*), je kleistogamie dokonce jejich jedinou možností opylení (Cook, 1966; Hong, 1991).

1.3 Morfologie

Jde zpravidla o byliny se střídavě uspořádanými listy. Ačkoliv působí na první pohled jako lysé, mohou být různé vegetativní orgány lakušníků drobně krátce chlupaté (Cook, 1963). Lakušníky vykazují heterofylii, tvoří dva typy listů: listy ponořené a listy plovoucí na vodní hladině. Čepele ponořených listy jsou trojdílné, několikrát členěné na řadu nit'ovitých úkrojků. Plovoucí listy jsou lupenité s dlanitolaločnou až dlanitosečnou čepelí v obrysu okrouhlého až ledvinitého tvaru. Plovoucí list je v základu trijdílný, často může být i pětídílný, či jinak členěný. Na bázi řapíku vyrůstají drobné palisty (Cook, 1963; Cook, 1966), které jsou podle některých autorů užitečné při určování. Jejich význam je ovšem limitován jejich morfologickou proměnlivostí v rámci druhu a obtížnou fixací (tak, aby tvar zůstal zachován). V praxi se proto k určování nepoužívají (Cook, 1963; Cook, 1966; Kaplan et al., 2019). Některé druhy nejsou heterofylní, ale vytvářejí jen jeden typ listu (*R. trichophyllus* s nit'ovitými listy, *R. hederaceus* s lupenitými listy), jiné heterofylní jsou, ale plovoucí listy někdy nevytvářejí (*R. aquatilis* či *R. baudotii*) (Cook, 1963; Cook, 1969). V případě druhu *R. aquatilis* bylo experimentálně ověřeno, že na určení morfologie listu (zda bude lupenitý či nit'ovitý) má zásadní vliv délka fotoperiody a skutečnost, že list je ponořený či nad hladinou. Naopak faktory jako intenzita světla (kromě případů intenzity velmi nízké) či teplota prostředí na určení morfologie listu vliv neměly. Dále bylo zjištěno, že segment lodyhy s lupenitými listy nekoření v uzlinách a za obvyklých podmínek nezačne znovu tvořit nit'ovité listy (Cook, 1969). Některé druhy jsou schopny vytvářet listy přechodného typu mezi nit'ovitým a lupenitým (*R. peltatus*, *R. aquatilis*) (Cook, 1966; Cook, 1969).

Květy jsou bílé, s výjimkou světle žlutě kvetoucího *R. flavidus* (Cook, 1966). Korunních lístků je obvykle pět, jsou volné. Některé druhy (*R. fluitans*, *R. penicillatus*) tvoří i květy s vyšším

počtem korunních lístků (obvykle 6–7). Korunní lístky jsou podepřeny volnými kališními lístky, které jsou přitisklé či později až nazpět ohnuté (Cook, 1966). Barva kališních lístků je určovacím znakem v případě některých druhů. Konkrétně Wigleb et al. udává, že *R. baudotii* se liší od ostatních druhů tím, že jeho kališní lístky jsou namodralé (Hejný et Slavík, 1997; Wigleb et al., 2017). Květy vyrůstají po jednom na dlouhých stopkách. Korunní lístky jsou obvejčité se žlutou skvrnou na bázi. Na bázi korunních lístků se také nachází nektarium různého tvaru: pŕlměsíčitě, kulatě a hruškovitě. Kromě těchto hlavních tvarů se objevuje škála různých jejich přechodů a nepravidelných tvarů (Cook, 1963; Cook, 1966). Tvar nektária je některými autory uváděn jako užitečný determinační znak (Cook, 1963). Jeho použití ale komplikuje skutečnost, že se během ontogeneze jedince může měnit a též může měnit tvar během vysychání, dále může být ovlivněn hybridizací. Někteří autoři ho tedy považují za méně spolehlivý a doporučují jeho užití jen v případě, že ostatní znaky při determinaci selhávají (Englmaier, 2016) a to nejlépe na plně vyvinutých neseschlých korunních plátcích. Použitelným určovacím znakem může být i počet nektárií na korunním lístku, který může být vyšší než jedna (např. často dvě až čtyři u druhu *R. schmalhauseni*) (Bobrov et al., 2015). Květní lůžko je kulovité až oválné, za plodu někdy protažené. Může být chlupaté, téměř lysé až lysé. Opět je významné při determinaci. Hledí se na jeho tvar a hustotu a délku chlupů na něm vyrůstajících (Cook, 1966; Pizzaro, 1995).

Plodem lakušníků jsou nažky vyrůstající v souplodí po několika málo kusech až po velkých množstvích (několik desítek) (Cook, 1966; Englmaier, 2016). Nažka je zhruba ledvinitého až vejčitého tvaru a má příčná žebra (Hejný et Slavík, 1997), která hrají zřejmě roli v pukání nažky během klíčení (Cook, 1963). Příčná žebra nažky jsou udávána jako znak celého podrodu, ne u všech druhů jsou ale stejně nápadná (Cook, 1963; Cook, 1966). V případě některých druhů (*R. baudotii*) je nažka opatřena křídlatým lemlem (Kaplan et al., 2019). Nažky jsou lysé nebo do různé míry chlupaté, chlupaté nažky někdy za zralosti olysávají (Cook, 1963; Cook, 1966; Englmaier, 2016). Délka nažky a míra její chlupatosti jsou udávány jako užitečné znaky, ale jejich užití je opět komplikováno jejich proměnlivostí (např. olysáváním za zralosti). Počet nažek v souplodí je také používaným určovacím znakem, ale může být komplikován vypadáváním zralých nažek ze souplodí či nekompletním opylením po zaplavení květů vodou (Cook, 1966; Pizzaro, 1995; Kaplan et al., 2019).

1.4 Velikost genomu a polyploidizace

Základním chromosomovým číslem lakušníků je $x = 8$ (Cook, 1962; Cook, 1966). Mezi lakušníky běžně dochází k polyploidizaci. Kromě diploidů byli zaznamenáváni triploidi,

tetraploidi, pentaploidi a hexaploidi, výrazně méně často jsou zaznamenáni aneuploidní polyploidi (Cook, 1962; Cook, 1966; Prančl et al., 2018; Koutecký et al., 2022). Aneuploidi byly také zaznamenáni jako produkt umělých křížení (Cook, 1966). Běžným impulzem k polyploidizaci ve skupině je hybridizace, po které následuje allopolyploidizace (Dahlgren, 1991).

Při determinaci se počet chromosomů dá užít jen ve specifických případech, protože chromosomová čísla řady druhů se neliší. Jde tedy spíš o příležitostnou pomůcku (Webster, 1987).

Jako praktičtější určovací pomůcka se jeví velikost genomu stanovená pomocí průtokové cytometrie. Studie na střeoevropských družích ukázala, že všechny tyto druhy lze od sebe odlišit. Pomocí metody je možné odlišit i některé hybridy, především F1 generaci, zatímco mnohonásobní zpětní hybridy bývají špatně detekovatelní až nedetekovatelní (Prančl et al., 2018; Dolejšek, 2021).

1.5 Hybridizace

K hybridizaci dochází mezi lukušníky poměrně často (Cook, 1966). Životoschopní hybridy vznikají přirozeně, řada jich též byla získána umělým křížením. Diploidní hybridy nejsou podle literatury životoschopní, případně jsou životoschopní, ale sterilní. Tetraploidní hybridy jsou sterilní či fertily, obdobně jsou sterilní či fertily pentaploidní hybridy. Hexaploidní hybridy jsou nejčastěji fertily (Cook, 1970). Hybridy mají v některých případech sníženou fertilitu, což se projevuje menším podílem životoschopného pylu či sníženým počtem nažek v souplodích, zralé nažky mohou v souplodí hybridů také zcela chybět (Cook, 1966; Hong, 1991). Snížená fertilita či úplná neplodnost hybridů může být kompenzována vegetativním množením, jehož prostřednictvím se mohou hybridy udržet v přírodě a vytvářet stabilní populace (Cook, 1966; Cook, 1970; Webster, 1990; Hong, 1991; Kaplan et al., 2019). Znamé jsou i případy hybridizace mezi taxony o odlišných ploidních úrovních (Webster, 1987). Hybridizace mezi lukušníky významně přispívá k jejich taxonomické komplikovanosti. Často není možné hybridy odlišit morfologicky a je potřeba použít molekulární metody. I tyto metody mají ale někdy potíž hybridy spolehlivě odlišit. To platí zejména pro zpětné křížence, kteří se již geneticky velmi přiblížili zpět k jednomu z rodičů (Prančl et al., 2018; Koutecký et al., 2022).

1.6 Fenotypová plasticita

Vodní rostliny obecně, lukušníky nevyjímaje, vykazují vysokou míru fenotypové plasticity (Cook, 1966; Santamaria, 2002). Fenotypová plasticita se projevuje u znaků jako je celková

velikost, míra větvení, podíl ponořených a plovoucích listů, délka ponořených listů a řapíků plovoucích listů (Zanger et Wiegleb, 1987; Garbey et al., 2004), celková velikost listových čepelí a květů, délka nažek či stavba palistů (Hong, 1991). Plasticita je podmíněna jak chemicky (koncentrace určitých iontů ve vodě) tak fyzikálně (např. mírou zastínění či intenzitou pohybu vody). V případě chemicky podmíněné plasticity byla zaznamenána např. korelace mezi některými kvantitativními znaky (délka internodií) s koncentrací NH_4^+ iontů, koncentrace PO_4^{3-} iontů ovlivňovala míru adventivního kořenění (Garbey et al., 2004). Lakušníky též vykazují tvarovou proměnlivost v průběhu sezóny. Projevuje se například postupným zkracování délky ponořeného listu či posunem umístění nejdelšího internodia na lodyze (Zanger et Wiegleb, 1987; Garbey et al., 2004). Zvláštním případem projevu fenotypové plasticity je růst terestrických forem, které se vytvářejí na obnaženém vlhkém substrátu. Morfologie takových jedinců je značně zjednodušená. Nedochází u nich k vývoji typických lupenitých listů. Pokud je lupenitý list vyvinutý, bývá drobnější a více členěný. Celkovým habitem jsou terestrickí jedinci značně drobní. Jejich určování podle morfologických znaků je komplikované, ale do určité míry (alespoň v prostředí střední Evropy) je možné (Vlčková, 2022).

1.7 Ranunculus pelatus

1.7.1 Popis

Lakušník štítnatý (*Ranunculus pelatus*) je jednoletá až vytrvalá vodní bylina. Roste jak ve stojatých, tak v tekoucích vodách (Cook, 1966; Englmaier, 2016; Chytrý et al., 2021). Jde o lakušník heterofylní. Plovoucí listy mají čepel do jedné až dvou třetin členěnou, úkrojky jsou většinou širší než delší. Listy jedinců z tekoucích vod bývají členěnější než listy jedinců z vod stojatých. Plovoucí listy mohou vzácně chybět (Cook, 1966; Wiegleb et al., 2017; Kaplan et al., 2019). Ponořené listy jsou chabé, po vyndání z vody zplihlé (úkrojky neudrží svůj původní tvar a slepují se dohromady) (Wiegleb et al., 2017). Vzácně se objevují listy přechodného typu (Cook, 1966). Plodní stopky jsou za zralosti obvykle delší než 5 cm. Korunní lístky jsou velké, 12–15(–21) mm dlouhé, dlouze obvejčité, bílé se žlutou skvrnou na bázi. Nektária jsou víceméně hruškovitá. Na korunním lístku vyrůstá pouze jedno nektarium (Wiegleb et al., 2017). Nažek je (25) 30–40 (80). Nezralé nažky jsou chlupaté, zralé někdy olysávají. Květní lůžko je za plodu kulovité až oválné a hustě chlupaté dlouhými chlupy (Cook, 1966; Pizzaro, 1995; Englmaier, 2016; Wiegleb et al., 2017; Kaplan et al., 2019).

1.7.2 Ekologie a rozšíření

Ranunculus peltatus je do jisté míry pionýrským druhem. Vyhovují mu místa postižená disturbancemi, kanály, strouhy a nově zbudované nádrže. Je nalézán v nedávno bagrovaných rybnících v mělké vodě (Cook, 1966; Wigleb et al., 2017). Na obnaženém dně je schopen tvořit terestrické formy (Vlčková, 2022). Po disturbančních událostech je z prostředí často postupně vytlačován konkurenčně zdatnějšími druhy (Cook, 1966). Zároveň ale osidluje i vodní toky, kde je schopen dlouhodobě existovat (Kaplan et al., 2019). Obývá jak vody eutrofní (Cook, 1966) tak i oligotrofnější (Hejný et Slavík, 1997) a zcela se vyhýbá vodám vápnatým či minerálně bohatším (Englmaier, 2016). Jde o druh Evropy a severní Afriky. V Evropě roste od oblasti Středozemního moře po Skandinávii, ale nejsevernější Skandinávii neobývá. Těžištěm rozšíření druhu je střední a západní Evropa, v části východní Evropy chybí (Cook, 1966; Wigleb et al., 2017).

1.7.3 Ploidie a velikost genomu

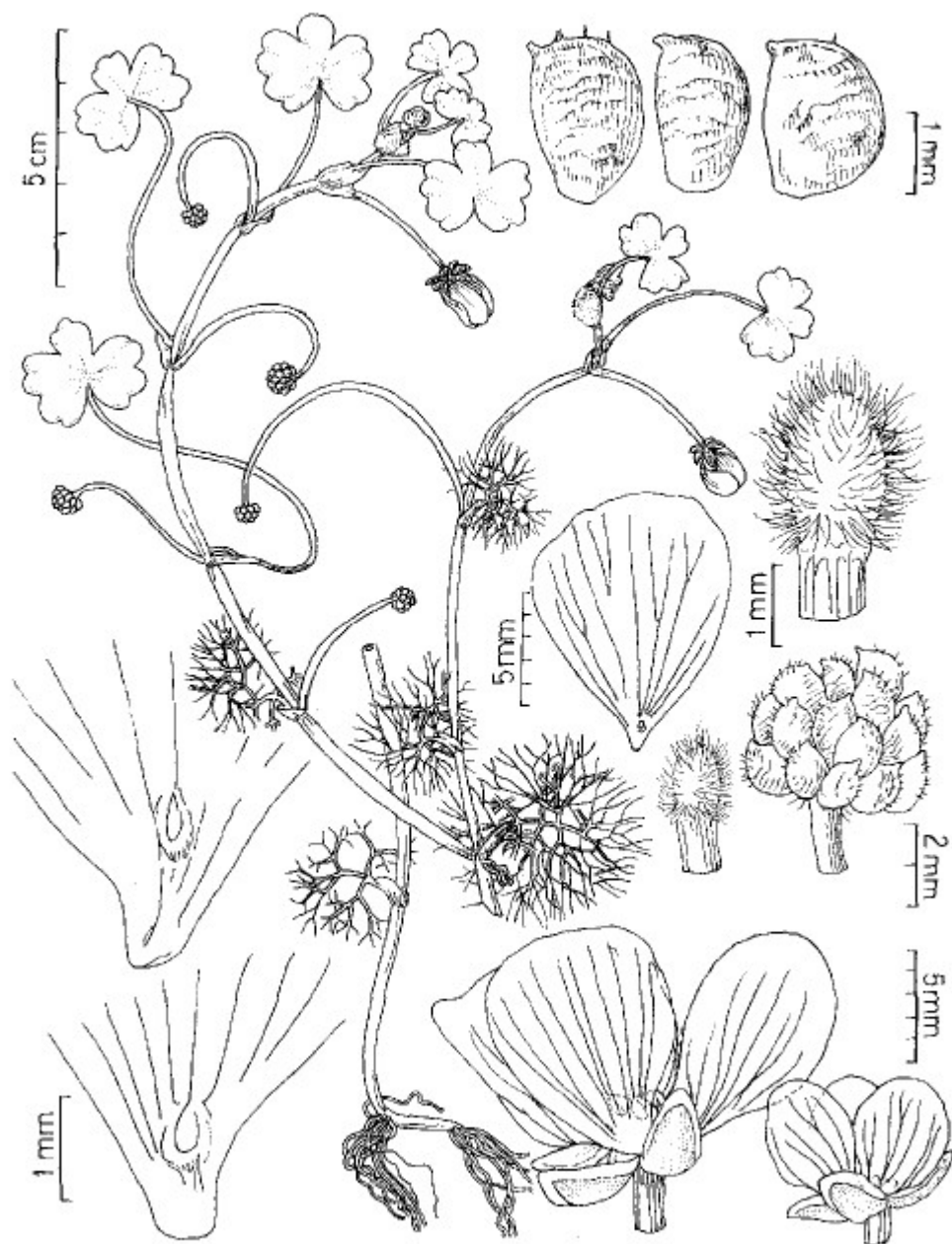
Druh se vyskytuje ve třech ploidních úrovních. Diploidi ($2n = 16$) jsou známi ze západního Mediteránu (Španělsko, Portugalsko). Tetraploidi ($2n = 32$) jsou popsáni ze střední, západní a severní Evropy (Česká republika, Rakousko, Německo, Belgie, Nizozemsko, Francie, Švédsko a další). Hexaploidní jedinci byli zaznamenáni v Británii (Cook, 1962; Cook, 1966; Hong, 1991). Dále byli hexaploidi zaznamenáni v severní Evropě (Švédsko, Norsko) a v Evropě jižní a jihovýchodní (Itálie, Maďarsko, Chorvatsko) (Prančl & Koutecký, nepubl. data). Kromě zmíněných ploidních úrovní byli zaznamenáni i pravděpodobní pentaploidi (Prančl et al., 2018).

Pomocí metody průtokové cytometrie bylo zjištěno, že při měření se standardem sedmikráska chudobka (*Bellis perennis*) je poměr velikosti genomu druhu ku standardu (= 1) průměrně 2.00 v případě tetraploidů. Diploidi mají poměr ku standardu v průměru 1.167 (Prančl et Koutecký, nepubl. data) a hexaploidi 2.978 (spočteno z hodnot jasných hexaploidů) (Prančl et al., 2018; Koutecký et al., 2022).

1.7.4 Hybridizace

Z přírody i z pokusných křížení je známo poměrně dost hybridů *R. peltatus*. Z přírody jsou udávány např. hybridy s *R. fluitans*, *R. baudotii* či *R. aquatilis* (Cook, 1966; Wigleb et al., 2017). Hojný je kříženec s *R. trichophyllus*. Tento hybrid a jeho zpětní kříženci se v přírodě často udržují pomocí vegetativního množení, zejména je toto patrné ve vodních tocích, kde voda roznáší fragmenty lodyh a dává tak vzniknout bohatým populacím (Prančl et al., 2018;

Kaplan et al., 2019; Koutecký et al., 2022). Z pokusných křížení jsou známi např. kříženci s *R. baudotii* či *R. tripartitus* (Cook, 1966). Kromě F1 kříženců jsou často zaznamenáváni i zpětní kříženci např. s *R. aquatilis* či *R. trichophyllus* (Prančl et al., 2018; Kaplan et al., 2019; Koutecký et al., 2022). Hybridní původ jedinců se může projevit morfologicky např. protažením plodních stopek, absencí zralých nažek či některými poměrnými znaky. Určování hybridních jedinců (především zpětných hybridů) je ovšem komplikované a často není čistě na základě morfologie rostlin možné (Dolejšek, 2021).



Obr. 1: *Ranunculus peltatus*, převzato (Pizzaro, 1995).

1.7.5 Podobné taxony

Následující taxony jsou všechny víceméně podobné druhu *Ranunculus peltatus*. Jde ve všech případech o heterofylní druhy. Pro každý taxon je uveden stručný popis s ohledem na odlišnosti od *Ranunculus peltatus* a od sebe navzájem. Taxony jsou vybrané na základě podobnosti a

zároveň alespoň částečně sdíleného areálu. Podobné taxony z jiných částí světa nejsou ve výčtu uvedeny.

Ranunculus aquatilis

Jde o převážně vytrvalý druh. Plovoucí listy nemusí být za květu přítomny. Mohou být přítomny intermediární listy. Květy jsou středně velké. Květní lůžka jsou chlupatá. Nažky má řídce chlupaté až chlupaté. Rozšířen je v Evropě (především severozápadní: Španělsko, Francie, státy Beneluxu, jižní Skandinávie, Pobaltí, dále Rakousko, Česká republika, Švýcarsko, Itálie, na jihu až Bálkánský poloostrov), západní Asii a v severní Africe (Cook, 1966; Pizzaro, 1995; Wiegleb et al., 2017). Častěji ve vodě stojaté než tekoucí. Na rozdíl od *R. peltatus* má čepele plovoucích listů členěné hlouběji a na více laloků. Liší se i nektárii, která má kulatá či pohárkovitá. Odlišuje se i ekologicky, roste v minerálně bohatší vodě (Wiegleb et al., 2017; Kaplan, 2019).

Dříve nebyl některými autory odlišován *R. aquatilis* od *R. peltatus*. *Ranunculus peltatus* byl hodnocen pouze jako varieta *R. aquatilis* (Hejný et Slavík, 1997).

Jde o hexaploidní druh, $2n = 6x = 48$ (Cook, 1966; Prančl et al., 2018).

Ranunculus baudotii

Jde o převážně vytrvalý druh. Niťovité listy jsou tuhé. Plovoucí listy často chybí či jsou nedokonale vyvinuté. Čepel plovoucích listů je hluboce členěná. Nažka je opatřena křídlatým lemem, který je patrný na suchých nažkách. Květní lůžko je za plodu prodloužené, chlupaté. Nektária jsou pŕlměsíčitá. Kališní lístky mohou být namodralé. Roste často v brakické vodě, ale není na ni striktně vázaný. Rozšířen je v Evropě, západní Asii a v severní Africe. V Evropě roste především v pobřežních částech Evropy – Španělsko, Francie, Velká Británie, Nizozemsko, Norsko, Švédsko, dále pak roste roztroušeně ve střední Evropě a v Mediteránu (Itálie, Rakousko, Česká republika) (Cook, 1966; Pizzaro, 1995; Wiegleb et al., 2017). Na rozdíl od *R. peltatus* má lysé nažky odlišného tvaru opatřené křídlatým lemem. Liší se též prodlouženým květním lůžkem za plodu. Odlišuje se i tvarem čepele plovoucího listu, která je často členěná jen na tři úkrojky a je členěná hluboce, což pro *R. peltatus* není běžné. Liší se ekologicky. Roste často v brakické vodě, případně ve vodě minerálně bohaté, např. na slaniskách. *R. peltatus* se minerálně bohaté vodě vyhýbá (Pizzaro, 1995; Wiegleb et al., 2017; Kaplan, 2019).

Druh byl někdy hodnocen jen jako poddruh *R. peltatus* (Wiegleb et al., 2017).

Jde o tetraploidní druh, $2n = 4x = 32$ (Cook, 1966; Prančl et al., 2018).

Ranunculus saniculifolius

Jde o převážně jednoletý druh. Je podobný druhu *Ranunculus peltatus*, ale je drobnější. Niťovité listy obvykle chybí či jsou přítomny pouze u mladých rostlin. Často tvoří květy s více než pěti korunními plátky. Nažky má lysé či řídce chlupaté. Roste v eutrofních vápnitě sladké vodě, vzácně ve vodě brakické. Často roste na přechodně vysychavých stanovištích. Rozšířen je v Mediteránu (udáván z Pyrenejského poloostrova, Balkánského poloostrova, Itálie, Sardinie, Korsiky, Kypru, Turecka, severní Afriky) (Cook, 1966; Pizzaro, 1995; Wiegleb et al., 2017). Na rozdíl od *R. peltatus* je celkově drobnější, květní lůžko má lysé či řídce chlupaté. Liší se také tím, že nektária má nejčastěji půlměsíčitá, na korunním plátku někdy zmnožená. Může též tvořit květy s více než pěti korunními plátky (Cook, 1966; Pizzaro, 1995; Wiegleb et al., 2017).

Jde o diploidní druh, $2n = 2x = 16$ (Cook, 1966).

Ranunculus schmalhauseni

Jde o vytrvalý poměrně mohutný druh. Čepel plovoucích listů je nápadně hluboce členěná. Čepel ponořených listů je také nápadně bohatě členěná. Hruškovitá nektária jsou na korunním lístku často zmnožená do počtu dvou až čtyř. Květy jsou velké a mohou mít zmnožený počet korunních lístků. Nažky má lysé či řídce chlupaté. Roste v hlubokých čistých vodách. Rozšířen je v severní Evropě (Norsko, Švédsko, Finsko, evropské Rusko). Na rozdíl od *R. peltatus* má květní lůžka lysá či řídce chlupatá. Čepel plouvoucích listů je, stejně jako v případě *R. peltatus*, členěná v základu na pět úkrojků. Úkrojky jsou ale dále členěné na větší počet užších a špičatějších úkrojků než je typické pro *R. peltatus*. To ovšem neplatí vždy, morfologie čepele je v případě obou druhů proměnlivá a někdy dochází k překryvu obou druhů. Má větší počet koncových úkrojků ponořených listů, což listu dává charakteristický keříčkovitý vzhled. Liší se též často zmnoženými nektárii na korunním lístku. Odlišuje se i ekologicky. Roste v hlubokých oligotrofních vodách. Nevytváří pro *R. peltatus* charakteristické bohaté porosty, roste spíše jednotlivě (Bobrov et al., 2015; Wiegleb et al., 2017).

Jde zřejmě o tetraploidní druh (autor popisu druhu se domnívá, že vlivem záměny *R. schmalhauseni* za *R. peltatus* platí některé zjištěné chromosomové počty *R. peltatus* ve

skandinávské oblasti pro *R. schmalhauseni*), pak by tedy platilo $2n = 4x = 32$ (Bobrov et al., 2015).

1.8 Problematika a cíle práce

Jak již bylo zmíněno, *Ranunculus peltatus* je, jako jiné druhy sekce, tvarově polymorfní. Je udáváný ve třech hlavních ploidních úrovních: diploidní, tetraploidní a hexaploidní (Cook, 1966). Jednotlivé ploidie jsou zastoupeny v různých zeměpisných oblastech Evropy. Zároveň je známo, že některé druhy lakušníků vykazují morfologickou variabilitu napříč ploidními úrovněmi (*R. trichophyllus*, *R. penicillatus*) (Zalewska-Gałosz, 2014; Prančl et al., 2018; Koutecký et al., 2022). Cílem této práce je ověřit, zda podobný jev platí i v případě zkoumaného druhu *Ranunculus peltatus*. V práci se zaměřím na porovnání morfologie diploidů z Pyrenejského poloostrova, tetraploidů ze střední, západní a severní Evropy a hexaploidů z jižní a severní Evropy (jihoevropští hexaploidi jsou v práci označováni jako mediteránní, severoevropští hexaploidi jsou v práci označováni jako skandinávští). Morfologie bude porovnána pomocí statistické analýzy souboru naměřených morfologických znaků. Zároveň bude zhodnocena a porovnána genetická variabilita vybraných skupin. Genetická variabilita bude studována pomocí základních molekulárních metod (průtoková cytometrie, Sangerovo sekvenování). Půjde o prvotní vhled do morfologické a genetické variability cytotypů druhu.

2 Metodika

2.1 Použitý materiál

Pro morfometrická měření byly použity herbářové položky. Informace o lokalitách, počtu měřených jedinců z populace (morfometrika, velikost genomu), velikosti genomu a ploidii jsou shrnuty v tabulce 1. Mapa sběrů je na obrázku 2. Rostliny z populací 36 až 43 byly použity již v mojí bakalářské práci. Kromě rostlin z populací 31-35 jsem již sebrané a vylišované rostliny obdržel od školitele a jeho spolupracovníků (Jan Prančl, Zdeněk Kaplan). Během sběrů, kterých jsem se účastnil, bylo sbíráno pět dobře vyvinutých rostlin z populace (pokud byly k dispozici). Sebrané rostliny byly okamžitě lisovány. U kvetoucích rostlin byl alespoň jeden otevřený květ fixován malou papírovou obálkou. Z každé sebrané rostliny byla odebrána část lodyhy s několika listy pro průtokovou cytometrii a několik čepelí plovoucích či ponořených listů pro genetické analýzy. Odebrané listy byly očištěny od nečistot a vodních organismů. Vzorke pro cytometrii byly uchovávány v živém stavu v uzavíratelných plastových pytlících, pokud možno v lednici. Vzorke pro genetické analýzy byly uloženy do malých obálek z buničiny a rychle sušeny v silikagelu. Rostliny z populací, jejichž sběru jsem se nezúčastnil, byly většinou sbírány stejným způsobem. Pouze z některých rostlin pocházejících z nejstarších sběrů nebyl pořízen vzorek pletiv pro genetické analýzy.

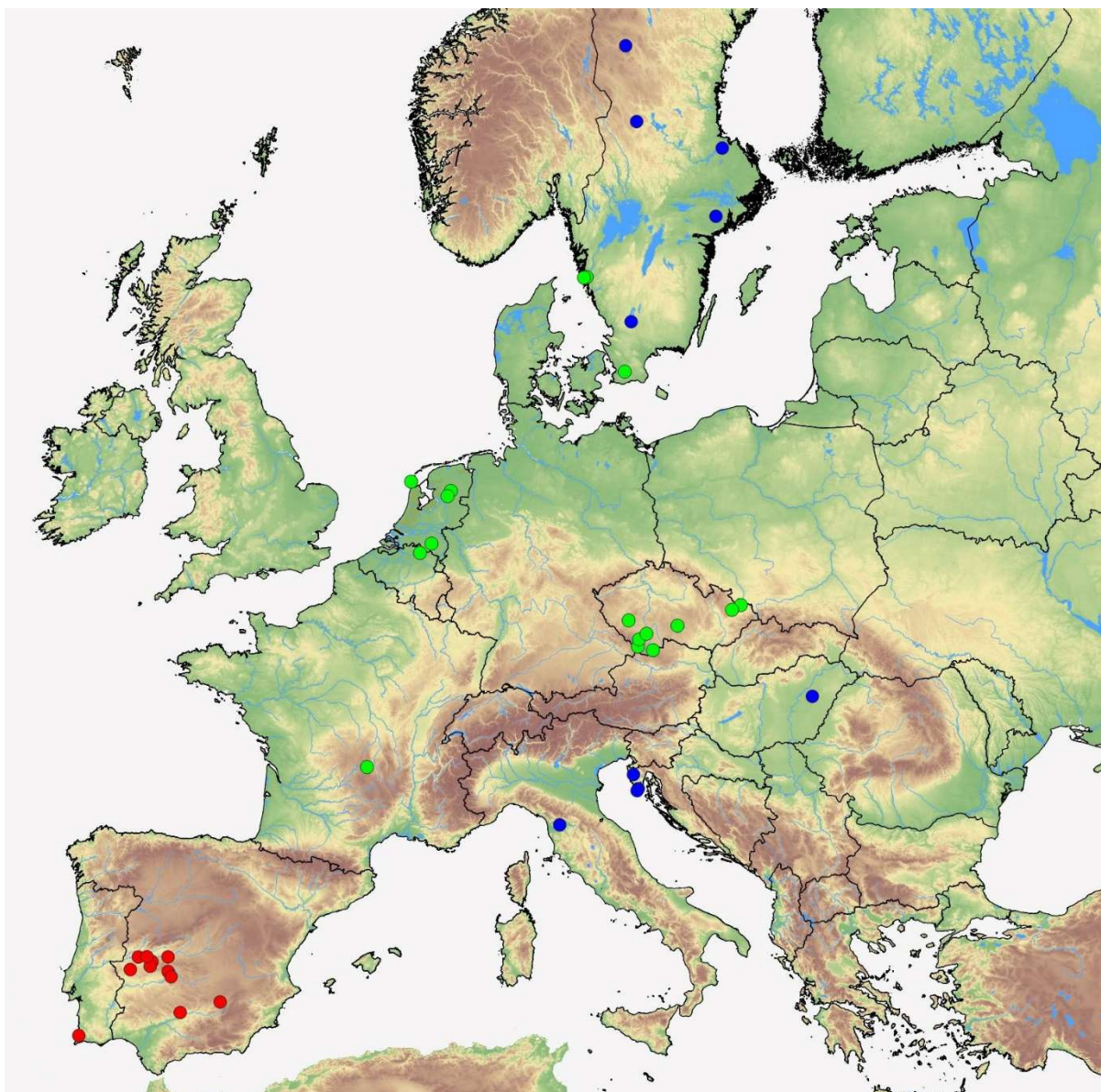
Pro stanovení velikosti genomu většiny zpracovávaných rostlin byl užitá metoda průtokové cytometrie. Vylišované rostliny, které mi poskytl školitel, byly již cytometrem změřeny, rostliny, jejichž sběru jsem se zúčastnil, byly změřeny bez mojí přítomnosti. Nepodílel jsem se tedy na cytometrickém měření žádných rostlin, které jsem na morfometriku použil. Z tohoto důvodu velikost genomu a DNA ploidii rostlin uvádím v oddílu metodiky a nikoliv v oddílu výsledků. Metodu průtokové cytometrie jsem si ale vyzkoušel v případě měření jiných vzorků, které v této práci neprezentuji. Získané informace o relativní velikosti genomu (poměry intenzity fluorescence vzorku ku intenzitě fluorescence standartu) byly použity k výpočtu velikosti genomu a ke stanovení DNA ploidní úrovně rostlin podle Prančl et al., 2018.

Preparáty na cytometrická měření byly připraveny z čerstvých rostlin. V Petriho misce bylo v 0,4 ml pufru Otto I (0,1M kys. citronová, 5% Tween 20) vychlazeného v ledu pomocí žiletky nasekáno zhruba 0,25 cm² rostlinného materiálu. Společně se vzorkem lakušníku bylo v misce nasekáno stejné množství standartu (*Bellis perennis*). Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes filtr 42- μ m (tkanina Uhelon 130T). K filtrátu bylo přidáno 0,8 ml pufru Otto II (0,4M Na₂HPO₄·12H₂O a 2-merkptoethanol (2 μ l/ml)). Poté bylo v závislosti na použitém cytometru přidáno různé fluorescenční barvivo: propidium jodid (PI) (finální koncentrace 50 μ g/ml) či

4,6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) s koncentrací 4 µg/ml. Před měřením se každý roztok nechal několik minut barvit. Vzorky barvené barvivem DAPI byly měřeny na cytometru Sysmex CyFlow Space s 365 nm UV-LED (některé starší vzorky byly měřeny na přístroji Partec PAII s rtuťovou výbojkou), vzorky barvené barvivem PI byly měřeny cytometry Partec CyFlow SL nebo Sysmex CyFlow Space s 532 nm (zeleným) laserem o výkonu 100 mW.

2.2 Stanovení DNA ploidie

V případě většiny rostlin byla ploidie (resp. DNA ploidie) stanovena na základě relativní velikosti genomu určené metodou průtokové cytometrie podle publikovaných dat (Prančl et al., 2018). Jedinci s poměrem ku standartu (*Bellis perennis*) v rozmezí 1,15–1,19 byli klasifikováni jako diploidi, jedinci s poměrem ku standartu v rozmezí 1,96–2,06 byli klasifikováni jako tetraploidi, jedinci s poměrem ku standartu v rozmezí 2,5–3,9 byli klasifikováni jako hexaploidi. U některých starých sběrů (populace 1, 2, 3) nebyla použita průtoková cytometrie. V případě populace 1 byla DNA ploidie odhadnuta na základě sekvencí (vychází stejně jako ostatní zkoumaní hexaploidní jedinci měření pomocí cytometrie). V případě populací 2 a 3 byla DNA ploidie odhadnuta na základě přibližných 2C hodnot. Tyto 2C hodnoty byly odečteny z pozice píku endospermu při analýze semen barvivem DAPI za předpokladu, že jde o sexuálně vzniklé semeno a podle průměrného rozdílu měření s propidium jodidem a DAPI. V případě některých populací skandinávských hexaploidů naměřené cytometrické hodnoty (tedy relativní velikosti genomu, RGS) neodpovídají hexaploidům, ale jsou vyšší než tetraploidi (hodnotám hexaploidů se blíží). Tito jedinci byli v analýzách klasifikováni jako hexaploidi. Byla snaha zjistit jejich počet chromosomů (počítání prováděla M. Lučanová), ale pro neklíčení semen (tedy nemožnost získat rostoucí kořínky) se chromosomy spočítat nepodařilo. Mediteránní hexaploidi mají RGS v rozmezí 3,6–3,8. Toto rozmezí neodpovídá hodnotám známým pro *R. peltatus* (trojnásobku RGS diploidů), ale je velmi podobné hodnotám známým pro hexaploidní *R. aquatilis* (3,88) (Prančl et al., 2018). Ploidie mediteránních hexaploidů je tedy stanovena na základě podobnosti RGS s hexaploidním *R. aquatilis*.



Obr. 2: Mapa sběrů (zkoumaných populací), červeně diploidi, zeleně tetraploidi, modře hexaploidi. Vytvořeno pomocí softwaru QGIS.

Tab. 1: Číslo populace (ID), počet morfometricky měřených vzorků (N_{morf}), popis lokalit (BE – Belgie, CZ – Česká republika, ES – Španělsko, FI – Finsko, FR – Francie, HR – Chorvatsko, HU – Maďarsko, IT – Itálie, NL – Nizozemsko, PT – Portugalsko, SE – Švédsko), zeměpisné souřadnice, sběratelé (JH – Hanzlíčková, JP – J. Prančl, ML – M. Lučanová, PK – P. Koutecký, VD – V. Dolejšek, ZK – Z. Kaplan), nadmořská výška lokality (N. v.) v metrech nad mořem (m n. m.), datum sběru, počet cytometrovaných jedinců z populace (N_{fcm}), průměrná relativní velikost genomu v populaci vůči standartu (2C), rozpětí naměřených RGS (minimum a maximum) a DNA ploidie (D. p.).

ID	N_{morf}	Lokalita	Zeměpisné souřadnice	Sběratel/é	N. v.	Datum sběru	N_{fcm}	2C	Min–Max	D. p.
1	2	FI, řeka Jerisjoki 0.9 km proti proudu od ústí do řeky Muonio (Muonionjoki) ve městě Muonio	67°57'20"N, 23°40'30"E	ZK	230	6.8.2013	0	_***	_***	6x
2	1	SE, mělčiny řeky Muonio (Muonionjoki) po proudu od mostu na S okraji města Karesuando	68°26'33"N, 22°28'54"E	ZK	320	6.8.2013	1	3.004**	_***	6x
3	2	SE, mělčiny řeky Muonio (Muonionjoki) na ostrově 1 km JJV - V od města Karesuando	68°26'09"N, 22°31'03"E	ZK	320	6.8.2013	1	2.914**	_***	6x
4	4	SE; řeka Dalälven, proudící úsek pod hrází a silničním mostem asi 3,5 km SZ od obce Söderfors	60°26'09"N, 17°22'23"E	JH, PK, JP	50	25.7.2017	4	2.978	2.97–2.99	6x
5	5	IT; Fucecchio, Lago delle Docce, na JZ břehu	43°47'53.2"N, 10°45'45.8"E	JH, PK, ZK	25	27.4.2018	5	3.724	3.664–3.838	6x*
6	5	HR; Istrie, Šišan, rybníček Lovrenc poblíž Grabrovići	44°51'03.8"N, 13°57'36.7"E	ML, PK, ZK	65	10.5.2019	5	3.755	3.640–3.838	6x*
7	1	HR; Istrie, Mališi, rybník Korneda	45°15'20.9"N, 13°45'43.0"E	ML, PK, ZK	275	10.5.2019	5	3.676	3.663–3.691	6x*
8	1	HU; bahnitá rozšlapaná deprese 9.4 km ZSZ od kostela Szent Kereszt felmagasztalása templom, Nádudvar	47°27'05"N, 21°02'24"E	ZK, A. Mesterházy	85	2018	3	3.601	3.579–3.617	6x*
9	1	SE; Stutt, potok Littran, poblíž mostu ulice Högbovägen	60°57'52"N, 13°53'26"E	L. Rejlová	260	2017	1	3.015	3.015–3.015	6x

ID	N _{morf}	Lokalita	Zeměpisné souřadnice	Sběratel/é	N. v.	Datum sběru	N _{fcm}	2C	Min–Max	D. p.
10	3	ES; El Puente del Arzobispo, rybník na levém břehu řeky Tajo, cca 50 m po proudu od mostu	39°47'56"N, 05°10'12"W	JP, PK, ZK	320	1.5.2016	3	1.158	1.150–1.170	2x
11	3	ES; Alía, řeka Guadalupejo a blízká jezírka, cca 12.8 km JJV od kostela Iglesia de Santa Catalina	39°20'31"N, 05°09'52"W	JP, PK, ZK	381	2.5.2016	4	1.174	1.150–1.180	2x
12	3	ES; Herrera del Duque, potok Pelochejo, cca 1.2 km S od kostela Convento de la Concepción	39°10'40"N, 05°02'46"W	JP, PK, ZK	418	2.5.2016	3	1.167	1.153–1.178	2x
13	2	ES; Aliseda, jezírko cca 2.3 km JJZ od kostela Iglesia Parroquial de Ntra. Sra. de la Asunción	39°24'11"N, 06°42'16"W	JP, PK, ZK	409	3.5.2016	6	1.169	1.149–1.182	2x
14	1	ES; Jaraicejo, řeka Almonte cca 2.3 km J od kostela Iglesia de la Asunción	39°38'47"N, 05°49'05"W	JP, PK, ZK	351	3.5.2016	6	1.150	1.120–1.160	2x
15	4	PT; Aljezur, potok Ribeira das Alfambras, poblíž silnice EN 120, cca 2.0 km SSZ od hradu	37°17'56"N, 08°47'59"W	JP, PK, ZK, U. Schwarzer	15	6.5.2016	5	1.191	1.150–1.190	2x
16	3	ES; Adamuz, potok Guadalmellato pod přehradou Embalse del Guadalmellato	38°02'24"N, 04°40'27"W	JP, PK, ZK	157	7.5.2016	3	1.175	1.170–1.180	2x
17	3	ES; Montizón, Venta de los Santos, jezírko Laguna de los Perales, cca 6.2 km SV od kostela v Montizón	38°22'41"N, 03°02'59"W	JP, PK, ZK	757	7.5.2016	4	1.169	1.160–1.190	2x
23	4	NL; ostrov Texel, Den Hoorn, jezírko mezi dunami, cca 2.1 km Z od hřbitovní kaple	53°01'35.1"N, 4°43'12.3"E	JP, PK, ZK	5	6.6.2019	5	2.014	2.004–2.025	4x
24	4	NL; Dwingeloo, příkop podél ulice Achterste Weide (Dwingelerweg), cca 4.5 km JJZ od kostela Sint-Nicolaaskerk	52°47'56.9"N, 6°20'00.5"E	JP, PK, ZK	3	5.6.2019	5	1.995	1.991–2.004	4x
25	4	NL; Staphorst, kanál podél ulice Maatslootweg, cca 2.3 km J od železničního nádraží Meppel	52°40'15.8"N, 6°12'04.8"E	JP, PK, ZK	-2	5.6.2019	5	2.028	1.971–2.063	4x
26	4	NL; Nuenen, Ijsbaan, mělká nádržka, cca 1.4 km S od kostela De Regenboog	51°29'03.7"N, 5°32'52.0"E	JP, PK, ZK	14	4.6.2019	5	2.053	2.028–2.073	4x

ID	N _{morf}	Lokalita	Zeměpisné souřadnice	Sběratel/é	N. v.	Datum sběru	N _{fcm}	2C	Min–Max	D. p.
27	4	FR; Compains, jezero Lac du Bourdouze, S břeh, asi 3,1 km S od města	45°28'17.0"N, 2°55'32.0"E	PK	1170	9.6.2016	3	2.008	1.994–2.021	4x
28	3	ES; Cañaverál, jezírko poblíž silnice N-630, cca 1.6 km SV–VSV od kostela Iglesia de Santa Marina	39°47'48"N, 06°22'42"W	JP, PK, ZK	386	3.5.2016	3	1.153	1.152–1.155	2x
29	3	HR; Istrie, Premantura, jezírko cca 860 m J od kostela Sv. Lovre	44°47'37.8"N, 13°54'44.4"E	ML, PK, ZK	10	10.5.0219	11	3.674	3.630–3.717	6x*
30	3	BE, Dessel, potok Desselse Neet, cca 2.4 km VSV od kostela Sint-Niklaaskerk	51°14'52.6"N, 5°4'53.0"E	JP, PK, ZK	18	8.6.2019	5	2.044	2.033–2.057	4x
31	3	SE; Dalby, jezírko v kravské pastvině JV od obce, 540 m S od zámku Björnstorp	55°37'58.0"N, 13°24'29.6"E	VD, PK	40	20.7.2022	3	1.985	1.961–2.009	4x
32	4	SE, Björlanda, rybníčky Kålsereids dammar, cca 3.3 km JV od kostela Björlanda kyrka	57°44'34.4"N, 11°52'3.1"E	VD, PK	40	21.7.2022	5	1.996	1.981–2.020	4x
33	3	SE; Lundby, potok Madbäcken cca 200 V od osady Heden	57°43'55.3"N, 11°44'52.0"E	VD, PK	20	21.7.2022	3	1.987	1.975–2.002	4x
34	4	SE; Hede, zátoka přehrady Halfvardammen na řece Ljusán, cca 3.6 km Z od obce (Hede hembygdsgränd)	62°25'35.6"N, 13°26'40.4"E	VD, PK	440	25.7.2022	6	2.882	2.865–2.893	6x*
35	4	SE; Skeen, S břeh přehrady na řece Bolmán, SZ od obce	56°45'42.7"N, 13°40'13.4"E	VD, PK	140	28.7.2022	5	2.545	2.505–2.587	6x*
36	1	CZ; Nepomuk, malý rybník u silnice na Plzeň, cca 1.2 km Z od zámku Zelená Hora	49°29'49"N, 13°33'53"E	PK	433	2.6.2013	3	2.013	1.994–2.028	4x
37	5	CZ; Jilešovice, malá tůň, cca 700 m SZ od Kaple sv. Jana Nepomuckého	49°54'00"N, 18°08'00"E	PK	225	10.6.2013	5	2.020	1.996–2.037	4x
38	3	CZ; Popice u Jihlavy, rybník Horní Okrouhlík, Z břeh	49°21'28"N, 15°33'12"E	PK	565	30.5.2010	5	1.963	1.943–1.976	4x
39	5	CZ; Nová Pec, v. n. Lipno, cca 1.2 km od infocentra v obci	48°48'04"N, 13°56'50"E	PK	725	2.7.2015	3	2.038	2.025–2.062	4x
40	4	CZ; Prachatice, malý rybník na Fefrovském potoce, cca 1.1 km J od Kaple Panny Marie Loretské	48°59'38"N, 13°59'22"E	PK	665	12.7.2012	5	2.001	1.986–2.011	4x

ID	N _{morf}	Lokalita	Zeměpisné souřadnice	Sběratel/é	N. v.	Datum sběru	N _{fcm}	2C	Min–Max	D. p.
41	3	CZ; Záblatí, rybník Dolní Kozlovna, V břeh při silnici	49°08'34"N, 14°17'27"E	K. Šumberová	405	9.6.2017	2	1.977	1.968–1.986	4x
42	1	CZ; Jaroměř, rybník Malý Hodonický, S břeh	48°42'17"N, 14°33'21"E	K. Šumberová	630	8.6.2017	2	1.968	1.961–1.974	4x
43	3	CZ; Vítkov, soustava rybníků Bělidla, cca 580 m V od rozvodny	49°46'34"N, 17°46'18"E	PK	475	9.6.2015	5	1.994	1.972–2.010	4x
44	3	ES; Trujillo, periodická jezírka v travnaté planině asi 5,5 km SSZ od města	39°30'21.0"N, 5°53'42.0"W	PK	460	6.5.2015	3	1.171	1.168–1.174	2x
45	3	SE, Björnlanda: zátoka na V břehu jezera Lockvattnet, asi 3,8 km JZ od obce	59°02'25.5"N, 17°07'00.2"E	JH, PK, JP	40	2017	3	2.979	2.968–3.000	6x
46	3	ES, Torrejon, Arroyo de la Vid, asi 3,5 km S od kostela Iglesia parroquial de San Miguel Arcángel	39°48'11.7"N, 6°1'31.6"W	JP, PK, ZK	240	3.5.2016	5	1.163	1.155–1.181	2x

Poznámky:

(*) DNA ploidie neodpovídá přesně naměřeným RGS. DNA plodie je zde odhadnuta kromě RGS podle podobnosti s jiným měřeními rostlinami z regionu, které svou DNA ploidii RGS odpovídaly dobře, či podle podobnosti s *R. aquatilis* (Prančl et al., 2018).

(**) DNA ploidie odhadnuta na základě přibližných 2C hodnot. Tyto 2C hodnoty byly odečteny z pozice píku endospermu při analýze semen barvivem DAPI za předpokladu, že jde o sexuálně vzniklé semeno, a podle průměrného rozdíluměření s propidium jodidem a DAPI.

(***) DNA ploidie odhadnuta na základě sekvencí (vychází stejně jako ostatní zkoumaní hexaploidní jedinci měření pomocí cytometrie).

2.3 Sekvenování

2.3.1 Materiál

Část rostlin byla osekvenována již před zahájením mé diplomové práce. Osobně jsem zpracovával některé rostliny z populací 31-35 (celkem 10 rostlin z výpravy do Skandinávie 2022) a rostliny z populací 36-43 (použité již v mé bakalářské práci).

DNA byla izolována ze vzorků pletiv uchovaných v silikagelu. V případě několika jedinců pocházejících ze starších sběrů byla izolována přímo z herbářové položky z nepoškozené a nezhnědlé části rostliny.

Z každé populace byli obvykle sekvenováni tři jedinci, pouze z některých populací byl z technických či jiných důvodů sekvenován jen jeden či dva jedinci. Kromě některých rostlin z populací 10, 13, 14, 22, 28 byly všechny sekvenované rostliny zároveň měřené na morfometrické analýzy.

2.3.2 Izolace DNA

DNA byla ze vzorku pletiva izolována CTAB metodou (Doyle et Doyle, 1987). Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo vloženo asi 0,5 cm² rostlinného materiálu (sušeného listu) spolu se dvěma ocelovými kuličkami o průměru asi 3 mm. Následně byl rostlinný materiál v uzavřených mikrozkušavkách rozdrčen v mlýnku Retsch 400MM (plný výkon (30 Hz) po dobu zhruba jedné až dvou minut). Poté bylo ke každému rozdrčenému listu v digestoři přidáno 700 µl roztoku CTAB (obsahuje 2% (w/v) CTAB, 0,1M Tris, 0,02M Na₂-EDTA, 1,4M NaCl, 2% (w/v) PVP-40) a 10 µl 2-merkapt ethanolu. Mikrozkušavky byly krátce protřepány a ponechány inkubovat v třepačce 30 minut při teplotě 50 °C. Následně byly vzorky krátce centrifugovány na stolní centrifuze a napipetovány do nových 1,5 ml mikrozkušavek. V digestoři bylo ke každému vzorku přidáno 500 µl roztoku chloroformu s isoamylalkoholem v poměru 24:1. Mikrozkušavky byly krátce ručně promíchány a ponechány pět minut v klidu. Poté byly vzorky centrifugovány na centrifuze po dobu 10 minut při 13000 rpm. Následně byla v digestoři ze vzorku horní vodná fáze s obsahem DNA přepipetována do nových 1,5 ml mikrozkušavek. K vodné fázi bylo v digestoři přidáno 500 µl vychlazeného isopropanolu z mrazáku (-20 °C), vše bylo krátce ručně promícháno a zkušavky byly ponechány inkubovat 30 minut v mrazáku při (-20 °C). Po inkubaci byly vzorky centrifugovány po dobu pěti minut při 13000 rpm. Centrifugací se izolovaná DNA usadila na dně mikrozkušavky v podobě bílého peletu. V digestoři byl následně odpipetován supernatant a k peletu DNA bylo poté přidáno

400 µl vychlazeného 96% ethanolu (-20 °C). Odpipetovaný supernatant byl opět přelit do příslušné lahve na nebezpečný odpad. Zkumavky byly ručně promíchány a nechány inkubovat 15 minut v termobloku při 37 °C. Po skončení inkubace byl v digestoři supernatant odpipetován a k peletu bylo přidáno 200 µl vychlazeného 70% etanolu (-20 °C). Zkumavky byly ručně promíchány a nechány inkubovat pět minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány po dobu pěti minut při 13000 rpm. Poté byl supernatant odpipetován a mikrozukavky byly nechány otevřené při pokojové teplotě po dobu 15-20 minut. Po skončení této doby bylo zkontrolováno, že na dně zkumavek zůstává již jen pelet DNA a žádný neodpařený etanol. Na závěr bylo ke každému peletu DNA do mikrozukavky přidáno 50 µl čisté vody, vzorky byly ponechány přibližně noc v lednici, aby se pelet DNA rozpustil, a následně byly uloženy v mrazáku k dlouhodobému skladování.

2.3.3 PCR

Amplifikovány byly tři úseky DNA. Dva úseky chloroplastové DNA (3'*rps16*–5'*trnK* a *rpl32*–*trnL*^{UAG}) a úsek ITS jaderné DNA. Úsek ITS byl amplifikován pomocí primerů ITS-F (King et al., 2001) a ITS4 (White et al., 1990). Chloroplastový úsek 3'*rps16*–5'*trnK* byl amplifikován pomocí primerů *rps16x2*-a a *trnKx1*-a (Shaw et al. 2007). Chloroplastový úsek a *rpl32*–*trnL*^{UAG} je problematický kvůli nízké výtěžnosti a tvorbě primerových dimerů. Proto byl amplifikován za pomoci vnitřních primerů (*rpl32-trnL-i1*: 5'-GRT ATG GGG TTT TTC TTT TCC-3' a *rpl32-trnL-i2* 5'-TGA ATA GTA TAC TTA CSA AAC CAA TTA- 3') ve dvou separátních reakcích s primerovými kombinacemi *trnL*^{UAG} + *rpl32-trnL-i1* a *rpl32-trnL-i2* + *rpl32*-F (Shaw et al. 2007; Koutecký et al., 2022).

Na jednu PCR reakci byl použit roztok 5 µl komerčně dodávaného PP Master Mixu (Top-Bio, Česká republika), 0,6 µl forward a reverse primeru v koncentraci 5 µM, 3,4 µl PCR vody a 0,5 µl DNA izolátu. Výsledný objem jedné PCR reakce činil 10 µl. PCR směs bez DNA byla vždy připravena do jedné zkumavky pro potřebný počet jednotlivých reakcí a kontrolu a až poté rozpipetována po 9,5 µl do zkumavek stripu. K rozpipetovanému roztoku PCR reakce bylo přidáno po 0,5 µl izolátu DNA, vše bylo ručně promícháno a krátce centrifugováno na stolní centrifuze. PCR reakce probíhaly v cycleru při nastavení: počáteční denaturace 94 °C po dobu pěti minut, poté 35 cyklů po 30 sekundách při 94 °C, následně 30 sekund při 53 °C, jedna minuta při 72 °C a finální elongace po dobu 10 minut při 72 °C.

2.3.4 Gelová elektroforéza

Úspěšnost PCR byla ověřena pomocí gelové elektroforézy. Objem 1,5 µl PCR produktu byl smíchán na mikrotitrační destičce s 0,5 µl nanášecího pufru obsahujícího fluorescenční barvivo GelRed. Roztok byl poté nanesen na 1,5% agarosový gel v pufru TBE. Do vybraných jamek agarosového gelu byl nanesen ladder (100bp). Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu zhruba 25 minut. Následně byl agarosový gel vyhodnocen v komoře pod UV světlem. Jako zdařilé byly vyhodnoceny PCR produkty s jedním výrazným proužkem.

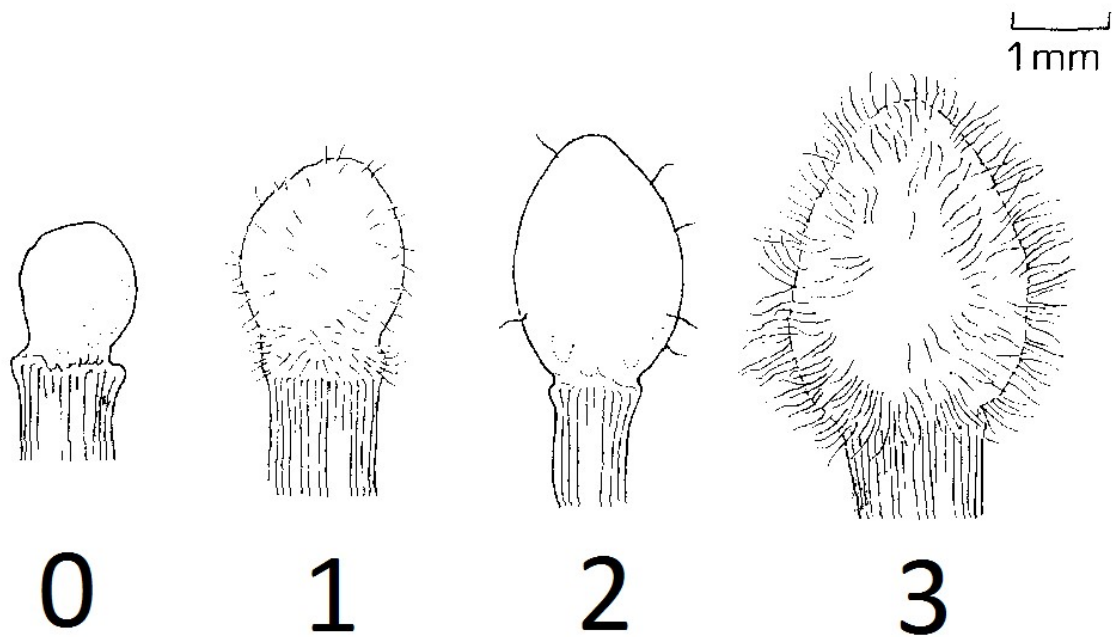
2.3.5 Příprava vzorků k sekvenování

Ke 2,8 mikrolitru PCR produktu bylo přidáno 0,8 µl směsi Exo-AP (směs komerčně dodávaných enzymů). Vzorky byly ručně promíchány a inkubovány v cycleru 15 minut při 37 °C a 15 minut při 85 °C. Přečištěný produkt byl napipetován do nových mikrozkušavek spolu s 5µl 5µM patřičného primeru a 1,4 µl vody. Jelikož úsek ITS vykazuje polymorfismus (přítomnost několika různých kopií) v rámci jednoho jedince, byl, alespoň v případě některých jedinců, čten z obou stran (tedy sekvenován od obou konců). Chloroplastový úsek *rpl32–trnL^{UAG}* byl sekvenován od vnitřních primerů, opět tedy ve dvou bžích. Úsek 3'*rps16–5'trnK* a *rpl32–trnL^{UAG}* je bezproblémový, sekvenován byl od jednoho z konců. Kódem označené zkumavky byly poté odeslány k sekvenování do firmy GATC Biotech (dnes součást Eurofins Genomics).

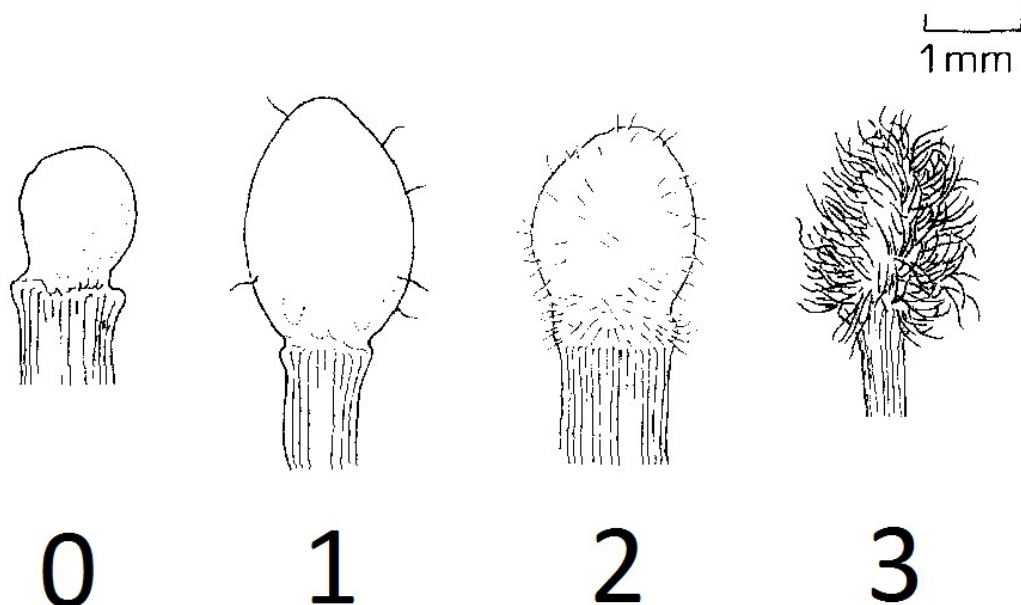
2.4 Morfometrika

Měřené morfometrické znaky byly vybrány na základě určovací literatury (Hejný et Slavík, 1997; Englmaier, 2016; Prančl et al., 2018; Kaplan et al., 2019) podle zkušeností školitele a jeho spolupracovníků (Jan Prančl, Zdeněk Kaplan) z předchozího výzkumu. Celkem bylo měřeno 21 morfologických znaků shrnutých v tabulce 2 na 129 rostlinách (viz tabulka 1). Z toho bylo 35 diploidů, 58 tetraploidů, 15 skandinávských hexaploidů a 21 mediteránních hexaploidů. Dále byly v analýzách zahrnuté i poměrné znaky spočtené ze znaků naměřených (též uvedeny v tabulce 2). Šlo o znaky DSKP (DKP/SKP), PLSI (PL/SI), DZPL((PL-DZ)/PL) a DPLDI (DPL/DI). Znaky DI, PL a DR, DPL a RPL byly měřeny na jedné lodyze hned nad sebou. Pod to nebylo možné, byly měřeny na různých částech položky (menší podíl měřených rostlin). Znak CHL (chlupatost nažky) byl určován ve třech kategoriích: 0 (lysé nažky), 1 (řídce chlupaté nažky), 2 (hustě chlupaté nažky). Pro účely morfometrických analýz byl znak CHL (chlupatost nažky) kódován následovně: pokud všechny nažky byly chlupaté v kategorii 1 či 2, rostlině byla přidělena hodnota 1, pokud byly všechny nažky lysé, rostlině byla přidělena hodnota 0, pokud měla rostlina nažky chlupaté i lysé, byla jí přidělena hodnota podle

převažujících nažek. Znak byl takto upraven, aby splňoval binární rozdělení. Tímto způsobem kódování je znak prezentován ve výsledcích. Znaky DCH a HCH byly určovány pomocí relativní stupnice vytvořené autorem s užitím Pizarro, 1995 (viz obr. 3 a 4). Jelikož nakonec nebyly do finálních morfometrických analýz zahrnuty (viz výsledky), nebude zde popis jejich kódování pro účely analýz uveden. V sekci výsledky jsou znaky prezentovány kódováním popsaným v tabulce znaků (tab. 2).



Obr. 3: Stupnice znaku DCH (délka chlupů květního lůžka) vytvořená podle Pizarro, 1995. Žádné (0), krátké (1), střední (2), dlouhé (3).



Obr. 4: Stupnice znaku HCH (hustota chlupů květního lůžka) vytvořená podle Pizzaro, 1995. Žádná (0), nízká (1), střední (2), vysoká (3).

Přímo na herbářové položce byly pomocí pravítka (30 cm) a krejčovského metru (v případě ohnutých struktur) měřeny znaky DI, DPS, DPL, DTU, PL a DR s přesností 1 mm. Dále byly přímo na položce pomocí binokulární lupy zjišťovány znaky DCH a HCH. Pomocí binokulární lupy (s přesností 0,05 mm) s měřítkovým okulárem byly měřeny znaky DKP, SKP, NJS a DN. Znaky listové čepele plovoucího listu SI, TE, DZ a UH byly měřeny na oskenovaných listových čepelích pomocí programu QuickPHOTO s přesností 0,1 mm. Pokud se bazální laloky čepele plovoucího listu překrývaly, byl znak UH (úhel bazálních laloků) zaznamenán se záporným znaménkem.

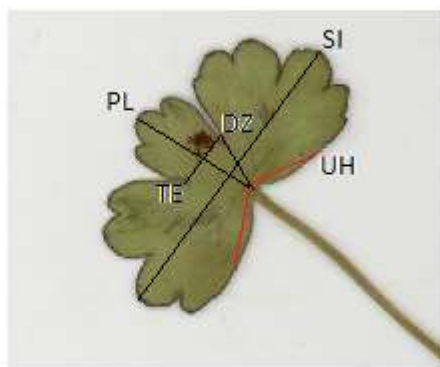
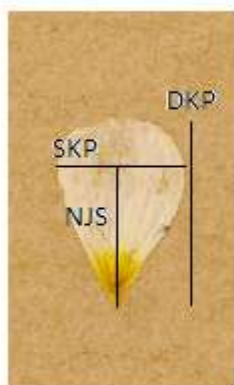
Morfometrická měření populací 36–43 byla použita již v mojí bakalářské diplomové práci a do práce magisterské byla doplněna jen o dříve neměřené znaky (DPL, RPL, DCH, HCH).

Tab. 2: Měřené morfologické znaky.

Značka znaku	Popis	Poznámka
DI	Délka internodia (cm)	Měřena nad nejvýše položeným dobře vyvinutým ponořeným listem

DPS	Délka plodní stopky (cm)	Měřeny tři pokud možno na jedné lodyze nad sebou
DPL	Délka čepele ponořeného listu (cm)	Měřen nejvýše položený dobře vyvinutým ponořený list
RPL	Délka řapíku ponořeného listu (cm)	Měřen nejvýše položený dobře vyvinutým ponořený list
DTU	Délka terminálního úkrojku (cm) ponořeného listu	Měřen nejvýše položený dobře vyvinutým ponořený list
PZN	Počet zralých nažek	Měřeno na třech souplodích pokud možno na jedné lodyze nad sebou
PL	Délka čepele plovoucího listu (cm)	Měřen nejnižší položený dobře vyvinutý plovoucí list na lodyze
DR	Délka řapíku plovoucího listu (cm)	Měřen nejnižší položený dobře vyvinutý plovoucí list na lodyze
DKP	Délka korunního plátku (cm)	viz obr. 5
SKP	Maximální šířka korunního plátku (cm)	viz obr. 5
NJS	Místo maximální šířky korunního plátku (cm)	viz obr. 5
TN	Tvar nektária	Určován ve třech kategoriích: H (hruškovité nektarium), K (kulaté nektarium), P (půlměsíčné nektarium).
DN	Délka nažky (mm)	Měřen třikrát, na nažce zhruba na bázi, uprostřed a na vrcholu souplodí, na nažkách vyjmutých ze souplodí pomocí pinzety
CHL	Chlupatost nažky	Měřeny tři nažky, měřen na stejných nažkách jako DN, určován ve třech kategoriích: 0 (lysé nažky), 1 (řídce chlupaté nažky), 2 (hustě chlupaté nažky)
DCH	Délka chlupů květního lůžka	Určováno na květním lůžku zbaveném mechanicky (pomocí pinzety) nažek, stanovováno ve čtyřech kategoriích: žádné (0), krátké (1), střední (2), dlouhé (3)
HCH	Hustota chlupů květního lůžka	Určováno na květním lůžku zbaveném mechanicky

		(pomocí pinzety) nažek, stanovovány ve čtyřech kategoriích: žádná (0), nízká (1), střední (2), vysoká (3)
SI	Šířka čepele plovoucího listu (cm)	viz obr. 5
TE	Šířka báze terminálního úkrojku plovoucího listu (cm)	viz obr. 5
DZ	Délka od báze čepele k zářezu při terminálním úkrojku (cm)	viz obr. 5
UH	Úhel báze listu	viz obr. 5
PO	Počet zubů plovoucího listu	
DSKP	Poměr délky a šířky korunního plátku	DKP/SKP
PLSI	Poměr délky a šířky plovoucího listu	PL/SI
DZPL	Hloubka členění plovoucího listu	(PL-DZ)/PL
DPLDI	Poměr délky ponořeného listu a délky internodia	DPL/DI



Obr. 5: Morfologické znaky na korunním plátku a na listové čepele plovoucího listu.

2.5 Analýza dat

2.5.1 Sekvenační data

Sekvenační data jsem zpracovával i v případě velké části populací, jejichž sběru jsem se nezúčastnil. Hrubá sekvenční data byla nejprve prohlédnuta v programu FinchTV, kde byla provedena ruční editace sekvencí.

Úseky chloroplastové DNA (*3'rps16–5'trnK* a *rpl32–trnL^{UAG}*) byly po ruční editaci v programu Finch TV zpracovány v programu BioEdit. Dvě dílčí sekvence chloroplastového

úseku *rpl32-trnL*^{UAG} byly spojeny do jednoho celku pomocí překryvu části sekvence. Následně byl proveden alignment sekvencí, nekompletně osekvenované začátky a konce sekvencí byly z další analýzy vyloučeny. Dále byly sekvence sloučeny (konkatenovány) a zpracovávány pomocí programu FaBox. V tomto programu byly nalezeny všechny unikátní chloroplastové sekvence (nástroj „DNA to haplotype collapser and converter“ pro výběr unikátních variant), které byly následně zpracovány v programu PopART (Leigh et Bryant, 2015). V tomto programu byla z unikátních chloroplastových úseků vyhotovena síť typu TCS (Clement et al., 2002). Jednotlivé mutace včetně tzv. gapů („mezer“) byly kódovány jako substitute, aby byly v analýzách počítány jako jeden mutační krok. Sekvenační data byla pro porovnání analyzována společně se vzorovými sekvencemi středoevropských druhů lakušníků, které pocházejí z předchozího výzkumu (Koutecký et. al, 2022) a byly mi poskytnuty školitelem. Dále byly do analýzy zahrnuty vzorové sekvence *R. schmalhauseni* (Koutecký et al., nepubl.), jelikož tento druh roste v kontaktu se skandinávskými populacemi a může je potenciálně ovlivňovat.

Většina získaných sekvencí ITS obsahuje polymorfni pozice, které byly kódovány jako degenerované báze podle IUPAC kódování v programu FinchTV. Sekvence byly alespoň u některých rostlin z populace čteny z obou stran a do analýzy byly zahrnuty jen polymorfismy společné pro obě čtení. Po ruční editaci byly ITS úseky zpracovány v programu BioEdit (alignment) a v programu FaBox (nástroj DNA to haplotype collapser and converter pro výběr unikátních variant). Jednotlivé unikátní ITS sekvence byly poté zpracovány v programu SplitsTree 4.15 (Huson et Bryant, 2006), kde byla vyhotovena fylogenetická síť metodou Neighbor Network (použita „Uncorrected P distance“ a místa s polymorfismy byla kódována jako Average states). Data byla opět pro porovnání analyzována společně se vzorovými sekvencemi středoevropských druhů lakušníků (Koutecký et. al, 2022) a vzorovými sekvencemi *R. schmalhauseni* (Koutecký et al., nepubl.).

2.5.2 Morfometrická data

Morfometrická data byla vyhodnocována dvakrát ve dvou různých datových souborech. První byly vyhodnoceny všechny měřené znaky. Poté byly vyhodnoceny všechny znaky kromě znaků na nažkách (DN, TN, CHL), které u části jedinců chyběly. Vyloučení těchto znaků umožnilo analyzovat větší počet jedinců. Po předběžných analýzách byly z obou analýz vyřazeny i znaky DCH a HCH.

Data byla analyzována pomocí programu R v prostředí RStudio (R Core Team, 2022) pomocí souboru příkazů MorphoTools (Koutecký, 2015). Nejprve byl pro každý znak vytvořen histogram, na základě kterého se ověřilo, zda se distribuce dat blíží normální distribuci. V případě pozitivně šikmého rozdělení byla data logaritmována přirozeným logaritmem. Byly logaritmovány tyto znaky: DI, DPL, RPL, PZN, DR, DPLDI.

Nezávislost jednotlivých morfologických znaků byla ověřena pomocí Spearmanovy korelační matice. Silně korelované znaky (korelace větší než $|0,9|$) byly vyřazeny (viz výsledky, tab. 6). Takto korelované byly dvojice znaků DKP a NJS, PL a SI. Vyřazené znaky byly NJS a SI.

Morfometrická data byla vyhodnocena pomocí analýzy hlavních komponent (PCA), lineární diskriminační analýzy a klasifikační diskriminační analýzy. Pro účely analýz bylo potřeba jedince rozdělit do předem definovaných skupin. Jedinci byly rozděleni na základě DNA ploidie a zeměpisného původu takto: diploidi (2xSP), tetraploidi (4x), hexaploidi mediteránní (6xM), hexaploidi skandinávští (6xSP). Standardizace dat pro analýzu hlavních komponent byla softwarem provedena automaticky.

3 Výsledky

3.1 Morfometrické analýzy

3.1.1. Popisné statistiky

V tabulce 3 jsou uvedeny základní popisné statistiky měřených znaků jednotlivých skupin *R. peltatus* (diploidi, tetraploidi, skandinávští hexaploidi a mediteránní hexaploidi). Tabulka neobsahuje znaky kategoriální (TN, CHL, DCH, HCH), které jsou shrnuty v tabulce 4 a 5. V tabulce 5 není uveden znak TN (tvar nektária), jelikož všechny měřené rostliny měly nektárium hruškovité.

Tab. 3: Základní popisné statistiky měřených znaků *R. peltatus*. Označení znaku se shoduje se značením v metodice (tab. 2). Taxon: 2xSP – diploidi, 4x – tetraploidi, 6xM – mediteránní hexaploidi, 6xS – skandinávští hexaploidi. N – počet měřených jedinců, SD – směrodatná odchylka, Min – minimální naměřená hodnota znaku, Max – maximální naměřená hodnota znaku. Záporné hodnoty znaku UH (úhel bazálních úkrojků čepele plovoucího listu) značí překryv laloků. Rozměry jsou uvedeny v centimetrech a zaokrouhleny na dvě desetinná místa. Úhel báze čepele (UH) je uveden ve stupních. Znak DN (délka nažky) je udáván v milimetrech.

Znak	Taxon	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
DI	2xSP	35	4.19	3.12	1.00	3.20	17.50
DI	4x	58	3.92	2.29	0.80	3.40	10.80
DI	6xM	15	2.81	1.44	1.30	2.30	6.40
DI	6xS	21	4.03	2.03	0.70	3.50	8.90
DPS	2xSP	35	5.39	1.04	2.90	5.43	7.67
DPS	4x	51	5.34	1.32	2.97	5.33	9.33
DPS	6xM	15	5.18	1.40	3.07	5.03	7.90
DPS	6xS	21	6.88	2.27	2.50	7.57	10.2
DPL	2xSP	32	2.99	1.52	0.70	2.55	7.80
DPL	4x	58	2.26	0.73	1.00	2.30	3.90
DPL	6xM	13	2.72	1.06	1.50	2.60	5.50
DPL	6xS	19	3.07	1.79	1.40	2.20	7.80
RPL	2xSP	32	0.59	0.96	0.10	0.35	5.20
RPL	4x	58	0.88	0.59	0.30	0.60	2.90
RPL	6xM	13	0.51	0.24	0.30	0.50	1.20
RPL	6xS	19	2.67	2.25	0.70	2.20	9.30
DTU	2xSP	32	0.75	0.37	0.30	0.65	1.70
DTU	4x	58	0.70	0.29	0.20	0.70	1.60
DTU	6xM	13	0.82	0.47	0.30	0.70	2.10
DTU	6xS	19	0.40	0.20	0.10	0.40	0.70
PZN	2xSP	35	19.38	15.77	0.00	17.33	64.00
PZN	4x	50	12.17	12.44	0.00	7.67	43.67
PZN	6xM	15	26.31	11.99	6.33	23.33	48.00
PZN	6xS	21	5.89	6.67	0.00	4.33	21.67
PL	2xSP	35	1.09	0.31	0.60	1.10	1.80
PL	4x	57	0.98	0.22	0.60	0.90	1.60
PL	6xM	15	1.05	0.18	0.80	1.00	1.40

Znak	Taxon	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
PL	6xS	21	0.79	0.22	0.40	0.80	1.10
DR	2xSP	35	4.92	3.30	1.60	4.30	17.10
DR	4x	57	4.90	1.77	1.60	5.20	8.90
DR	6xM	15	5.65	1.78	2.80	5.30	8.30
DR	6xS	21	5.71	2.81	1.60	5.70	11.50
DKP	2xSP	35	1.04	0.28	0.55	1.03	1.72
DKP	4x	56	0.99	0.14	0.54	1.01	1.26
DKP	6xM	14	0.73	0.09	0.61	0.73	0.90
DKP	6xS	21	0.99	0.24	0.58	1.00	1.32
SKP	2xSP	35	0.76	0.22	0.37	0.77	1.17
SKP	4x	56	0.74	0.14	0.33	0.72	1.10
SKP	6xM	14	0.58	0.11	0.41	0.56	0.77
SKP	6xS	21	0.69	0.22	0.35	0.74	1.07
NJS	2xSP	35	0.73	0.19	0.40	0.70	1.20
NJS	4x	56	0.71	0.11	0.40	0.70	0.90
NJS	6xM	14	0.52	0.06	0.45	0.50	0.65
NJS	6xS	21	0.72	0.18	0.40	0.75	1.00
DN	2xSP	26	1.50	0.02	1.20	1.40	2.00
DN	4x	45	1.70	0.02	1.30	1.70	2.00
DN	6xM	15	1.90	0.03	1.00	1.80	2.40
DN	6xS	12	1.80	0.01	1.60	1.90	2.00
SI	2xSP	35	2.44	0.66	1.41	2.30	4.13
SI	4x	57	2.17	0.45	1.31	2.14	3.58
SI	6xM	15	2.09	0.31	1.57	2.06	2.64
SI	6xS	21	1.79	0.51	1.03	1.71	2.62
TE	2xSP	35	0.60	0.21	0.20	0.61	1.09
TE	4x	57	0.51	0.14	0.27	0.49	0.95
TE	6xM	15	0.54	0.12	0.35	0.51	0.80
TE	6xS	21	0.37	0.11	0.18	0.38	0.55
DZ	2xSP	35	0.60	0.22	0.17	0.61	1.09
DZ	4x	57	0.53	0.17	0.22	0.48	0.94
DZ	6xM	15	0.47	0.12	0.30	0.45	0.70
DZ	6xS	21	0.39	0.13	0.18	0.4	0.63
PO	2xSP	35	9.83	2.75	5.00	10.00	16.00
PO	4x	57	10.04	3.26	5.00	11.00	18.00
PO	6xM	15	12.73	2.05	11.00	12.00	17.00
PO	6xS	21	12.05	2.67	9.00	11.00	18.00
UH	2xSP	35	74.77	46.77	-13.5	71.30	169.10
UH	4x	57	98.57	36.15	-2.40	99.00	178.00
UH	6xM	15	46.21	43.68	-24.7	50.00	110.10
UH	6xS	21	103.08	28.14	63.7	94.6	154.80
DSKP	2xSP	35	1.40	0.24	1.07	1.39	2.19
DSKP	4x	56	1.36	0.16	0.99	1.33	1.78
DSKP	6xM	14	1.29	0.16	1.09	1.28	1.68
DSKP	6xS	21	1.48	0.26	1.19	1.43	2.04
PLSI	2xSP	35	0.45	0.05	0.33	0.46	0.53

Znak	Taxon	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
PLSI	4x	57	0.45	0.04	0.37	0.45	0.56
PLSI	6xM	15	0.51	0.11	0.43	0.47	0.89
PLSI	6xS	21	0.44	0.04	0.39	0.44	0.53
DZPL	2xSP	35	0.45	0.13	0.06	0.46	0.76
DZPL	4x	57	0.47	0.09	0.27	0.47	0.69
DZPL	6xM	15	0.54	0.13	0.36	0.52	0.75
DZPL	6xS	21	0.50	0.08	0.36	0.50	0.70
DPLDI	2xSP	32	0.97	0.65	0.18	0.83	3.83
DPLDI	4x	58	0.73	0.40	0.21	0.63	1.77
DPLDI	6xM	13	1.04	0.42	0.33	0.96	1.73
DPLDI	6xS	19	0.92	0.63	0.29	0.64	2.86

Tab. 4: Četnost znaků DCH a HCH. V druhém sloupci jsou uvedeny ploidie (skupina): 2xSP – diploidi, 4x – tetraploidi, 6xM – mediteránní hexaploidi, 6xS – skandinávští hexaploidi. V druhém řádku jsou uvedeny kombinace znaků DCH-HCH (délka chlupů květního lůžka-hustota chlupů květního lůžka). Značkou n-n je označena absence znaků na měřené rostlině. K patřičné kombinaci znaků je pro jednotlivé skupiny uveden počet zaznamenaných jedinců. Většina kombinací nebyla zaznamenána (-).

		Znak (DCH-HCH)										
		3-3	3-2	2-3	2-2	2-1	1-2	1-1	1-0	0-1	0-0	n-n
Skupina	2xSP	-	-	-	2	-	-	32	-	-	-	-
	4x	49	3	3	-	-	-	-	-	-	-	3
	6xM	1	-	-	6	1	7	-	-	-	-	1
	6xS	14	3	-	4	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 5: Četnost znaku CHL. Ve druhém sloupci jsou uvedeny ploidie (skupina): 2xSP – diploidi, 4x – tetraploidi, 6xM – mediteránní hexaploidi, 6xS – skandinávští hexaploidi. V druhém řádku jsou uvedeny kategorie znaku (0 – všechny lysé, 1 – všechny chlupaté, n – nažky nepřítomny). K patřičné hodnotě znaku je pro jednotlivé skupiny uveden počet zaznamenaných jedinců.

		Znak (CHL)		
		0	1	n
Skupina	2xSP	24	2	9
	4x	5	40	13
	6xM	14	1	-
	6xS	7	9	5

3.1.2 Korelační analýza

Korelace znaků byla ověřena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Znaky silně korelované (korelace větší než $|0.9|$) byly z analýz vyřazeny. V případě všech znaků i souboru bez názek šlo o dvojice znaků DKP a NJS, PL a SI. Vyřazené znaky byly NJS a SI. Korelace znaků jsou shrnuty v tabulce 6.

Tab. 6: Korelace jednotlivých znaků. Korelace větší než $|0.9|$ jsou zvýrazněny tučně a žlutě.

	logDI	DPS	logDPL	logRPL	DTU	logPZN	PL	logDR	DKP	SKP	NJS	DN	CHL	SI	TE	DZ	PO	UH	DSKP	PLSI	DZPL	logDPLDI
logDI	-	0.267	0.393	0.028	0.215	-0.176	0.166	0.167	0.065	0.036	0.046	0.101	-0.025	0.213	0.101	0.084	-0.186	0.045	-0.019	0.006	0.094	-0.685
DPS	0.267	-	0.217	0.285	0.067	0.085	0.054	0.393	0.265	0.24	0.228	0.217	-0.008	0.112	-0.063	-0.046	0.014	-0.11	-0.084	-0.064	0.179	-0.028
logDPL	0.393	0.217	-	0.032	0.586	-0.059	0.252	0.062	-0.008	0.033	0.012	0.234	-0.245	0.254	0.257	0.155	-0.149	-0.162	-0.048	0.055	0.058	0.354
logRPL	0.028	0.285	0.032	-	-0.143	-0.245	0.007	0.213	0.166	0.128	0.198	0.155	0.377	0.011	-0.105	0.025	0.029	0.358	0.018	-0.05	-0.026	0.008
DTU	0.215	0.067	0.586	-0.143	-	0.03	0.268	0.003	-0.066	0.039	-0.112	0.185	-0.126	0.273	0.289	0.177	-0.277	-0.075	-0.129	0.06	0.05	0.215
logPZN	-0.176	0.085	-0.059	-0.245	0.03	-	0.081	-0.015	-0.024	0.145	-0.022	-0.112	-0.319	0.009	-0.059	-0.03	0.204	-0.311	-0.373	0.149	0.142	0.185
PL	0.166	0.054	0.252	0.007	0.268	0.081	-	0.286	0.182	0.259	0.15	0.013	-0.225	0.907	0.805	0.774	-0.18	-0.064	-0.172	0.361	-0.114	0.021
logDR	0.167	0.393	0.062	0.213	0.003	-0.015	0.286	-	0.097	0.046	0.116	0.211	0.011	0.305	0.141	0.147	0.008	0.101	-0.021	0.025	0.125	-0.06
DKP	0.065	0.265	-0.008	0.166	-0.066	-0.024	0.182	0.097	-	0.84	0.958	0.056	0.222	0.257	0.125	0.245	-0.016	0.083	0.003	-0.074	-0.063	-0.087
SKP	0.036	0.24	0.033	0.128	0.039	0.145	0.259	0.046	0.84	-	0.772	0.007	0.148	0.308	0.213	0.297	-0.017	-0.093	-0.489	-0.022	-0.073	-0.027
NJS	0.046	0.228	0.012	0.198	-0.112	-0.022	0.15	0.116	0.958	0.772	-	0.108	0.277	0.223	0.086	0.199	0.038	0.107	0.061	-0.071	-0.034	-0.05
DN	0.101	0.217	0.234	0.155	0.185	-0.112	0.013	0.211	0.056	0.007	0.108	-	0.21	0.069	-0.021	-0.039	-0.03	0.069	0.01	0.038	0.034	0.018
CHL	-0.025	-0.008	-0.245	0.377	-0.126	-0.319	-0.225	0.011	0.222	0.148	0.277	0.21	-	-0.12	-0.191	-0.068	-0.049	0.31	0.031	-0.148	-0.06	-0.195
SI	0.213	0.112	0.254	0.011	0.273	0.009	0.907	0.305	0.257	0.308	0.223	0.069	-0.12	-	0.833	0.819	-0.208	-0.037	-0.144	0.015	-0.238	-0.011
TE	0.101	-0.063	0.257	-0.105	0.289	-0.059	0.805	0.141	0.125	0.213	0.086	-0.021	-0.191	0.833	-	0.85	-0.355	-0.13	-0.156	0.147	-0.401	0.035
DZ	0.084	-0.046	0.155	0.025	0.177	-0.03	0.774	0.147	0.245	0.297	0.199	-0.039	-0.068	0.819	0.85	-	-0.322	0.183	-0.101	0.108	-0.654	0.025
PO	-0.186	0.014	-0.149	0.029	-0.277	0.204	-0.18	0.008	-0.016	-0.017	0.038	-0.03	-0.049	-0.208	-0.355	-0.322	-	-0.214	-0.001	-0.062	0.269	0.038
UH	0.045	-0.11	-0.162	0.358	-0.075	-0.311	-0.064	0.101	0.083	-0.093	0.107	0.069	0.31	-0.037	-0.13	0.183	-0.214	-	0.311	-0.011	-0.39	-0.109
DSKP	-0.019	-0.084	-0.048	0.018	-0.129	-0.373	-0.172	-0.021	0.003	-0.489	0.061	0.01	0.031	-0.144	-0.156	-0.101	-0.001	0.311	-	-0.077	-0.005	-0.009
PLSI	0.006	-0.064	0.055	-0.05	0.06	0.149	0.361	0.025	-0.074	-0.022	-0.071	0.038	-0.148	0.015	0.147	0.108	-0.062	-0.011	-0.077	-	0.202	0.023
DZPL	0.094	0.179	0.058	-0.026	0.05	0.142	-0.114	0.125	-0.063	-0.073	-0.034	0.034	-0.06	-0.238	-0.401	-0.654	0.269	-0.39	-0.005	0.202	-	-0.041
logDPLDI	-0.685	-0.028	0.354	0.008	0.215	0.185	0.021	-0.06	-0.087	-0.027	-0.05	0.018	-0.195	-0.011	0.035	0.025	0.038	-0.109	-0.009	0.023	-0.041	-

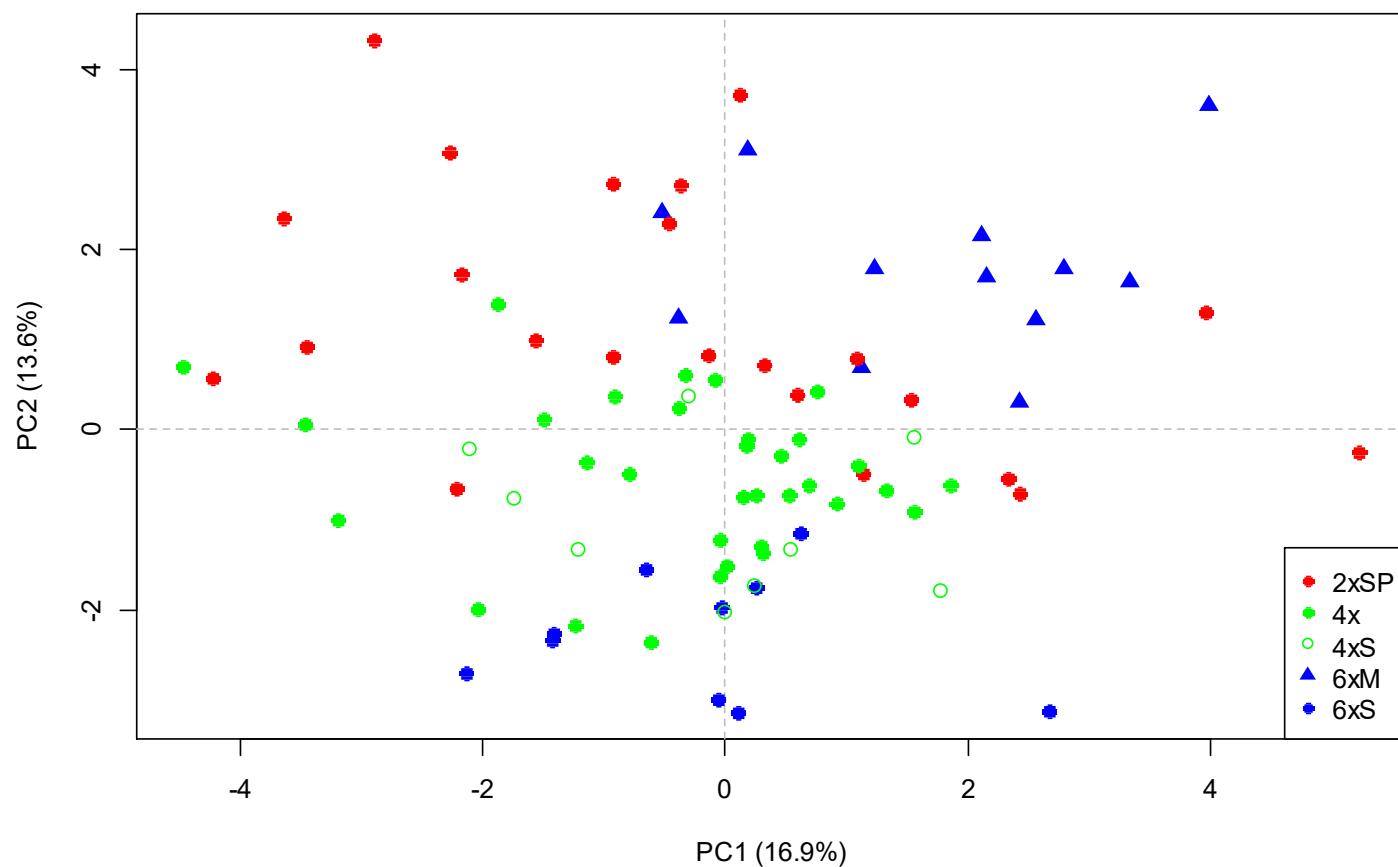
3.1.3 Vlastní morfometrické analýzy

Po předběžné analýze dat byly z datového souboru vyřazeny znaky DCH a HCH. Jelikož jsou tyto znaky spolu korelované, byl znak DCH (jako hůře uchopitelný) vyřazen. Znak HCH byl vyřazen protože je v jednotlivých skupinách konstantní, což odporuje předpokladům diskriminační analýzy. Při určování skupin *R. peltatus* je tedy třeba mít toto na paměti a tyto znaky dobře odlišující některé skupiny zohlednit. V analýzách nebyl zahrnut ani znak TN (tvar nektária), jelikož byl u všech měřených rostlin stejný, hruškovitý.

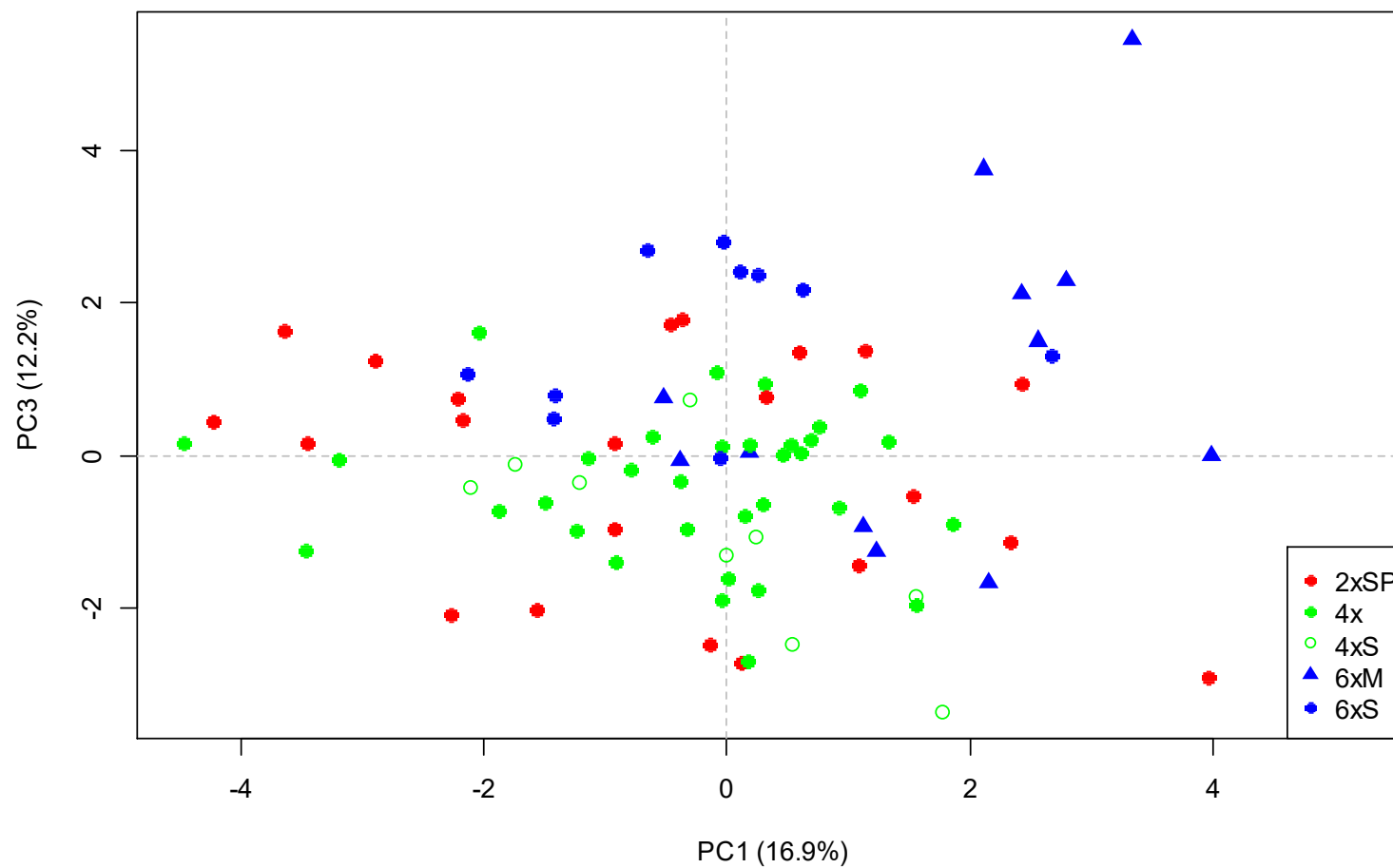
3.1.4 Analýza hlavních komponent (PCA)

Obrázky 6 až 8 ukazují PCA provedenou se všemi znaky (kromě HCH a DCH). Obrázky 9 až 11 ukazují PCA provedenou bez znaků na nažkách (PZN, DN, CHL + HCH a DCH).

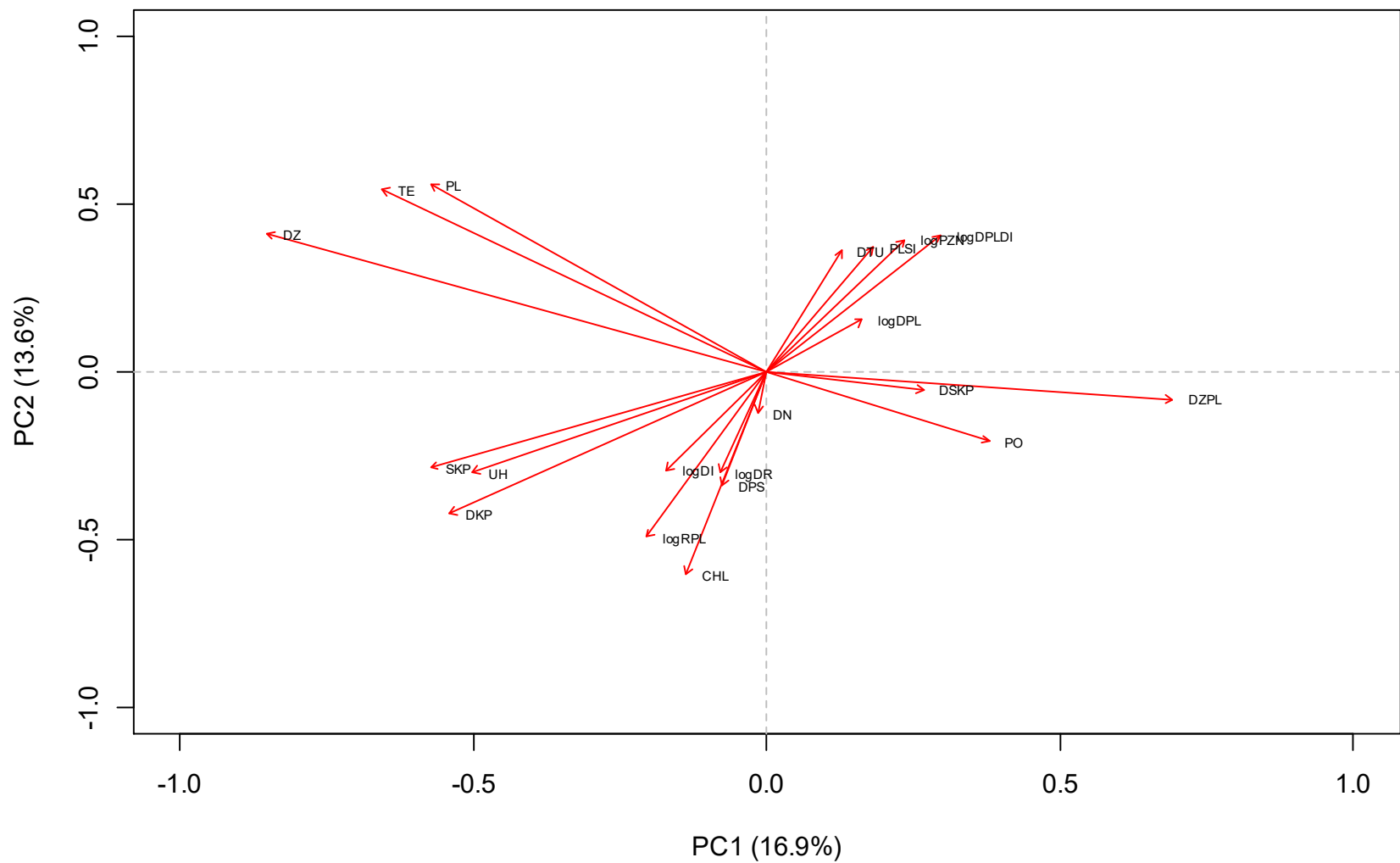
Při užití všech znaků je patrné oddělení skandinávských a mediteránních hexaploidů. Skandinávští hexaploidi se překrývají s tetraploidy. Tetraploidi ze Skandinávie (zelené kružnice) jsou rozptýlení mezi zbylými tetraploidy (zelené kruhy) a vykazují víceméně celý rozsah variability tohoto cytotypu. Největší rozptyl vykazují diploidi, kteří se částečně překrývají s tetraploidy a mediteránními hexaploidy. Vypuštěním znaků na nažkách (PZN, DN, CHL) se rozlišení jednotlivých skupin zhoršuje. Dochází k překryvu všech skupin a neoddělují se od sebe hexaploidní populace ze Skandinávie a z Mediteránu. V případě kompletní sady znaků jsou s první osou nejvíce korelovány znaky DZ (délka zářezu plovoucího listu), DZPL (podíl délky zářezu v celkové délce listu, viz metodika) a TE (šířka terminálního úkrojku plovoucího listu). V případě souboru znaků bez znaků na nažkách byly s první osou nejkorelovanější znaky DZ (délka zářezu plovoucího listu), PL (délka čepele plovoucího listu), TE (šířka terminálního úkrojku plovoucího listu).



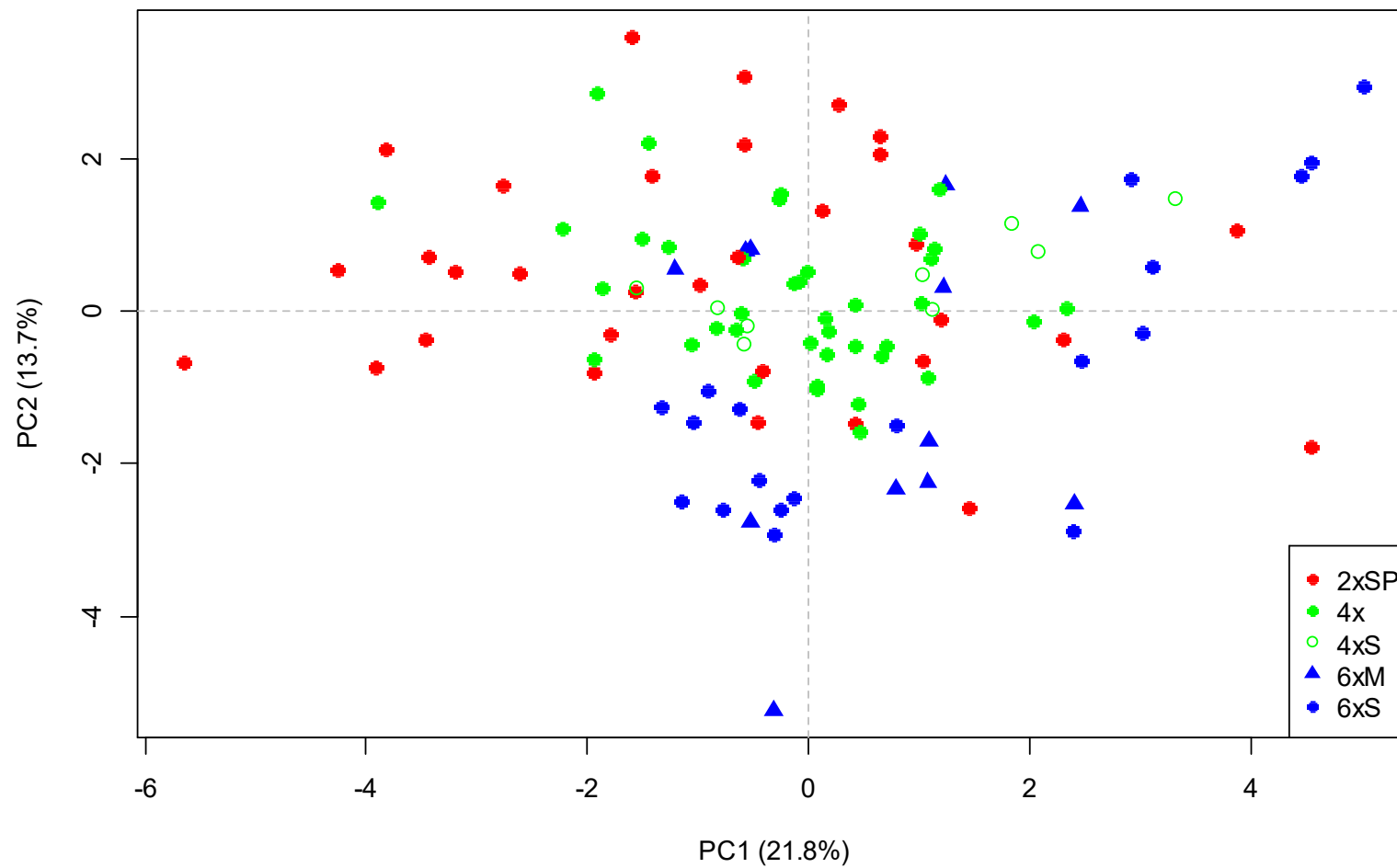
Obr. 6: Analýza hlavních komponent souboru všech znaků. První osa (PC1) vysvětluje 16.9 % variability, druhá osa (PC2) vysvětluje 13.6 % variability. 2xSP – diploidi, 4x – středoevropští a západoevropští tetraploidi, 4xS – skandinávští tetraploidi, 6xM – mediteránní hexaploidi, 6xS – skandinávští hexaploidi. Dvě geografické skupiny tetraploidů jsou zde rozlišeny, protože ve Skandinávii se tetraploidi vyskytují v částečném kontaktu s hexaploidy a cílem bylo vizualizovat, jestli si nejsou tyto dvě geografické skupiny v důsledku možné hybridizace morfologicky bližší než rostliny z jiných oblastí.



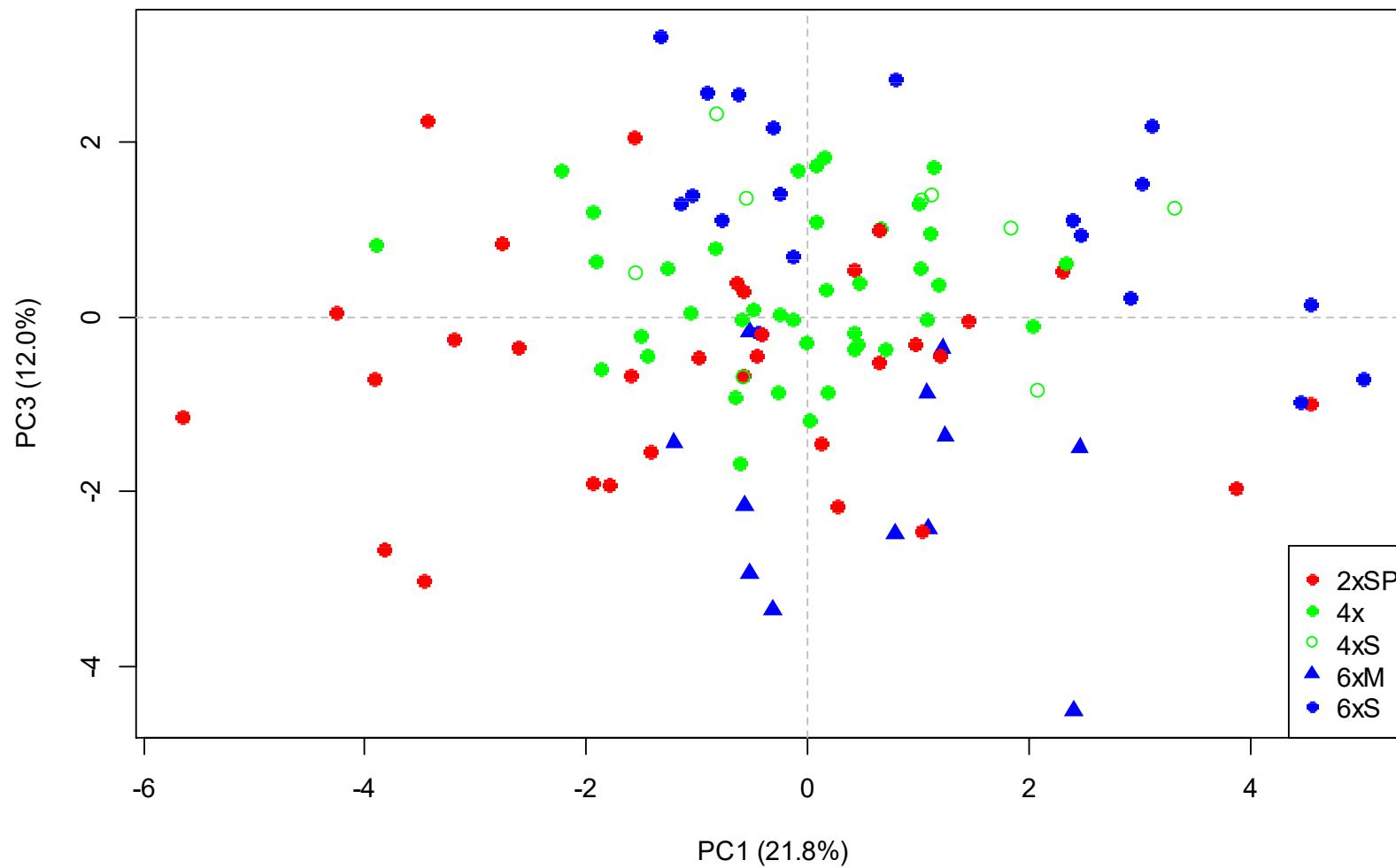
Obr. 7: Analýza hlavních komponent souboru všech znaků. První osa (PC1) vysvětluje 16.9 % variability, třetí osa (PC3) vysvětluje 12.2 % variability. Symboly a názvy skupin odpovídají obr. 6.



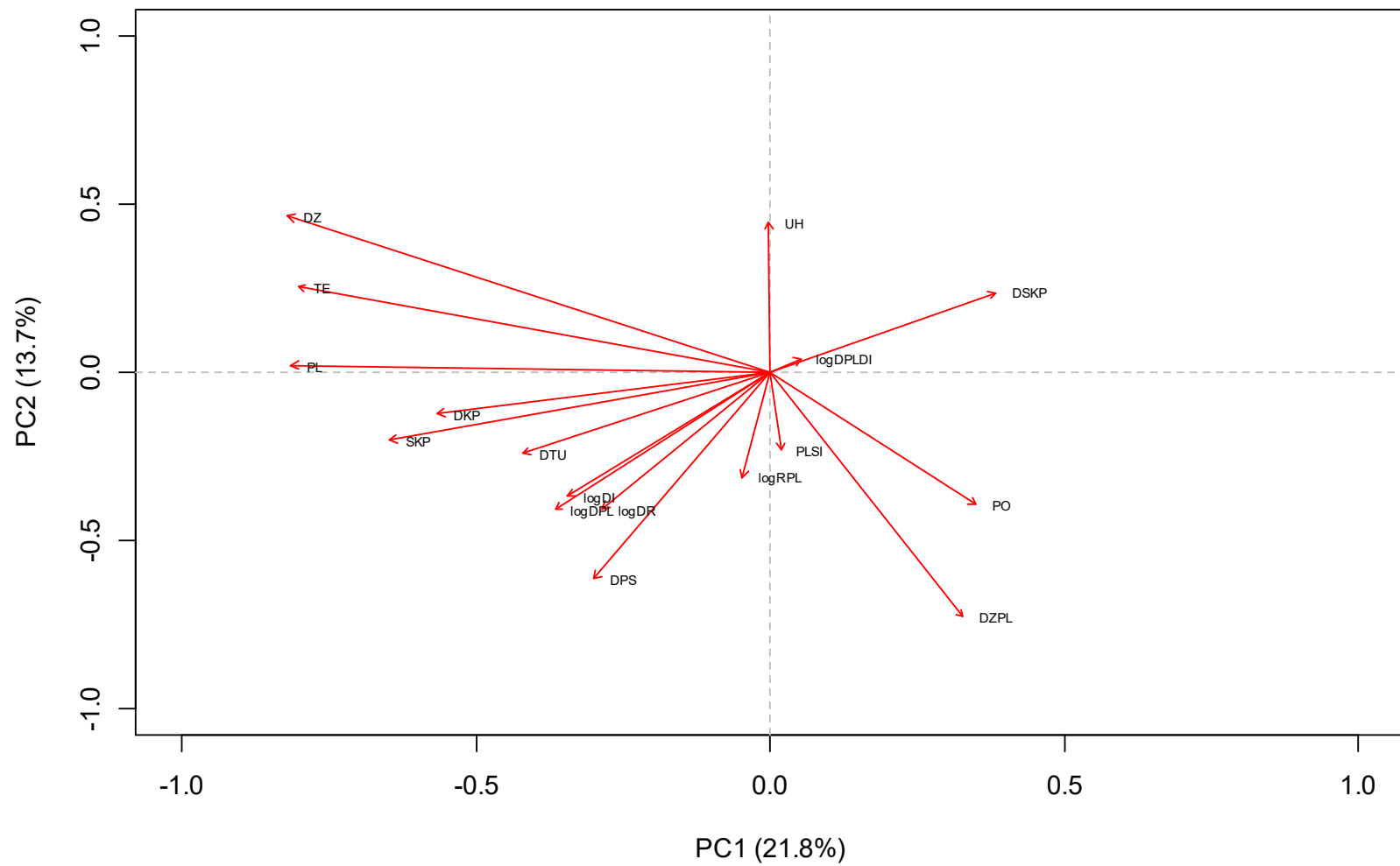
Obr. 8: Analýza hlavních komponent souboru všech znaků: korelace znaků s osami. První osa (PC1) vysvětluje 16.9 % variability, druhá osa (PC2) vysvětluje 13.6 % variability.



Obr. 9: Analýza hlavních komponent souboru znaků bez znaků na nažkách. První osa (PC1) vysvětluje 21.8 % variability, druhá osa (PC2) vysvětluje 13.7 % variability. Symboly a názvy skupin odpovídají obr. 6.



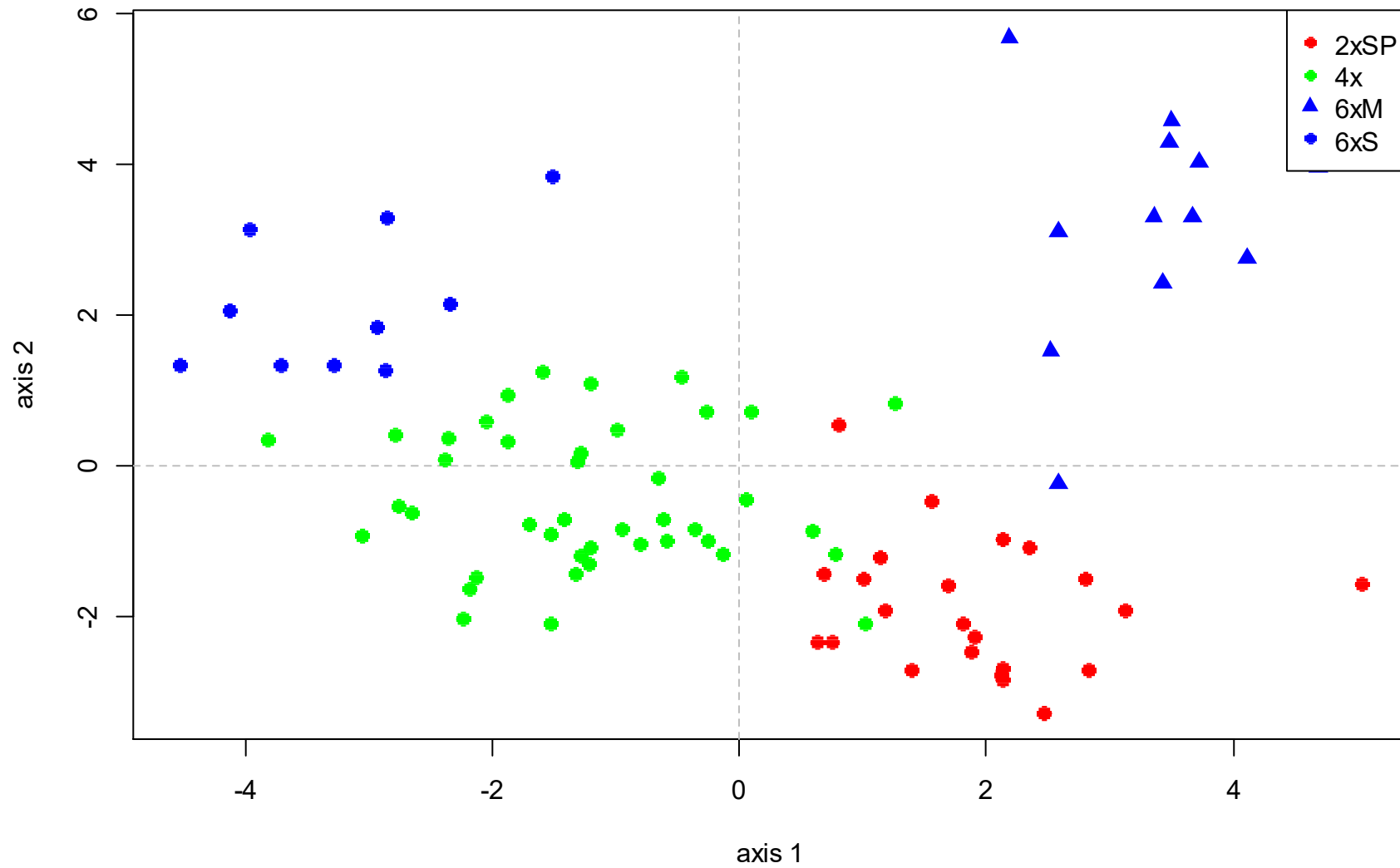
Obr. 10: Analýza hlavních komponent souboru znaků bez znaků na názkách. První osa (PC1) vysvětluje 21.8 % variability, třetí osa (PC3) vysvětluje 12.0 % variability. Symboly a názvy skupin odpovídají obr. 6.



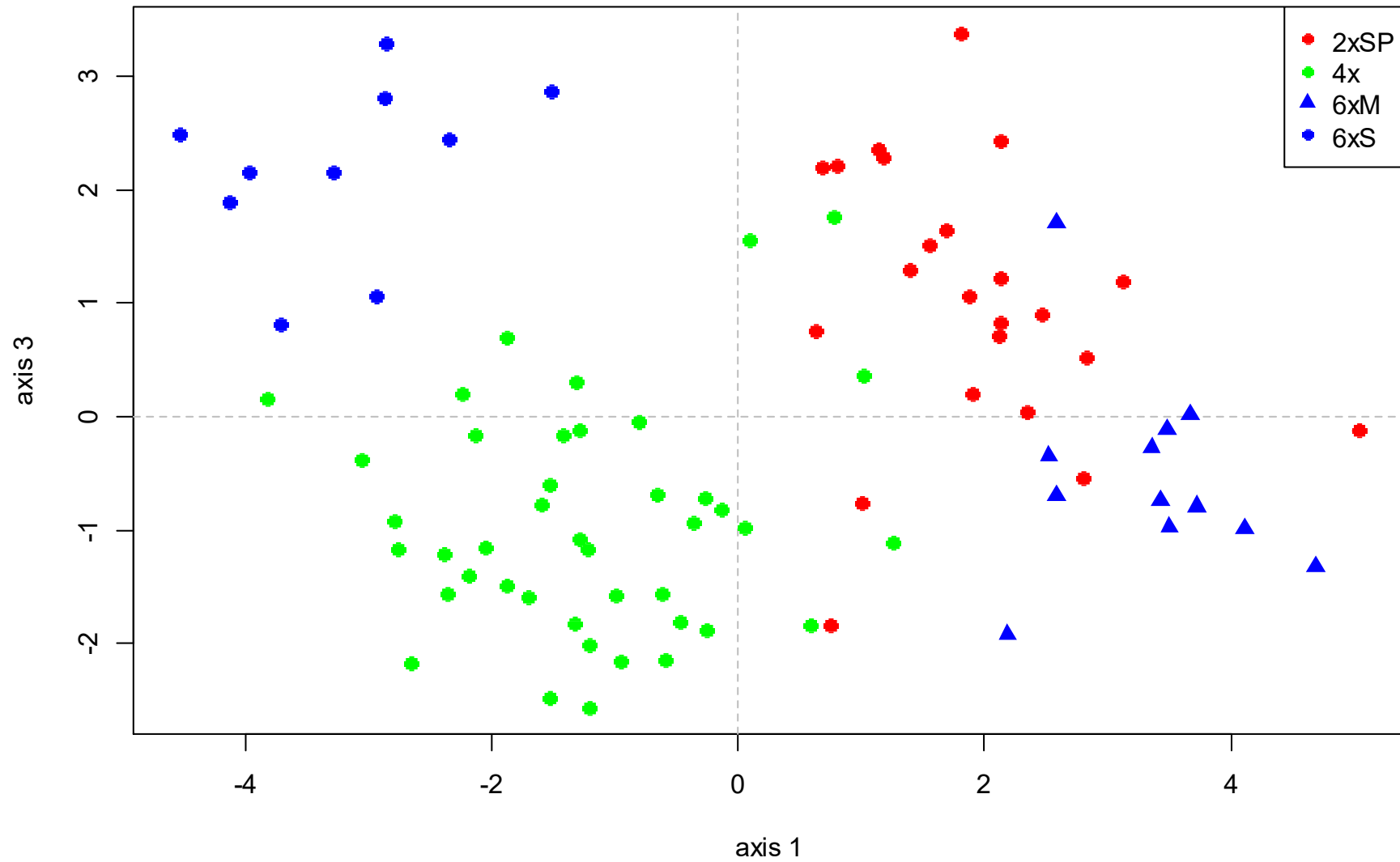
Obr. 11: Analýza hlavních komponent souboru znaků bez znaků na nážkách: korelace znaků s osami. První osa (PC1) vysvětluje 21.8 % variability, druhá osa (PC2) vysvětluje 13.7 % variability.

3.1.5 Lineární diskriminační analýza

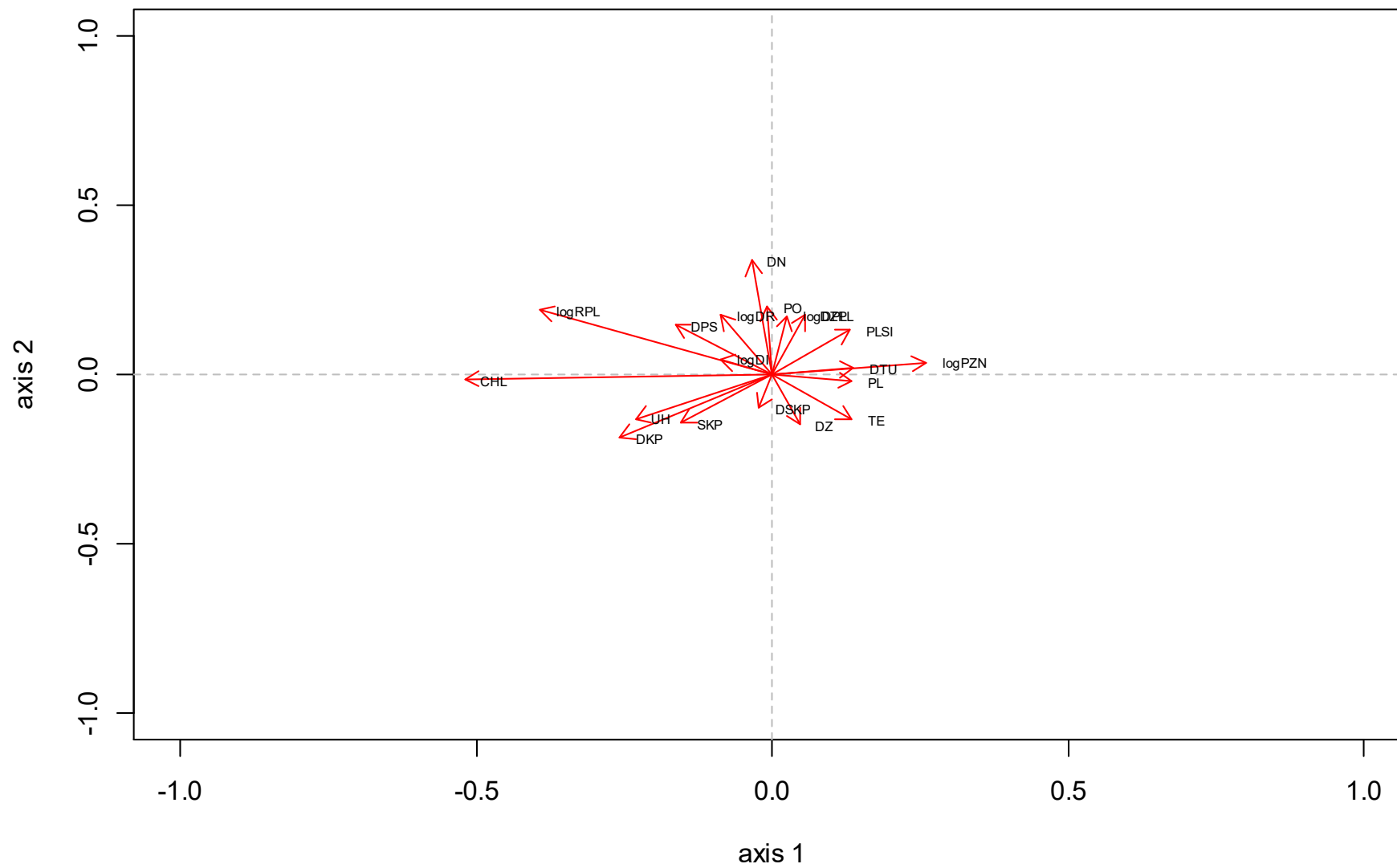
Obrázky 12 až 14 ukazují výsledek lineární diskriminační analýzy provedené se všemi znaky (kromě HCH a DCH). Obrázky 15 a 16 ukazují výsledek lineární diskriminační analýzy provedené se všemi znaky kromě znaků na nažkách (PZN, DN, CHL + HCH a DCH). S použitím kompletního souboru znaků se skupiny odlišily téměř bez překryvů. S užitím souboru znaků bez znaků na nažkách se skupiny odliší výrazně hůře a dochází k překryvům.



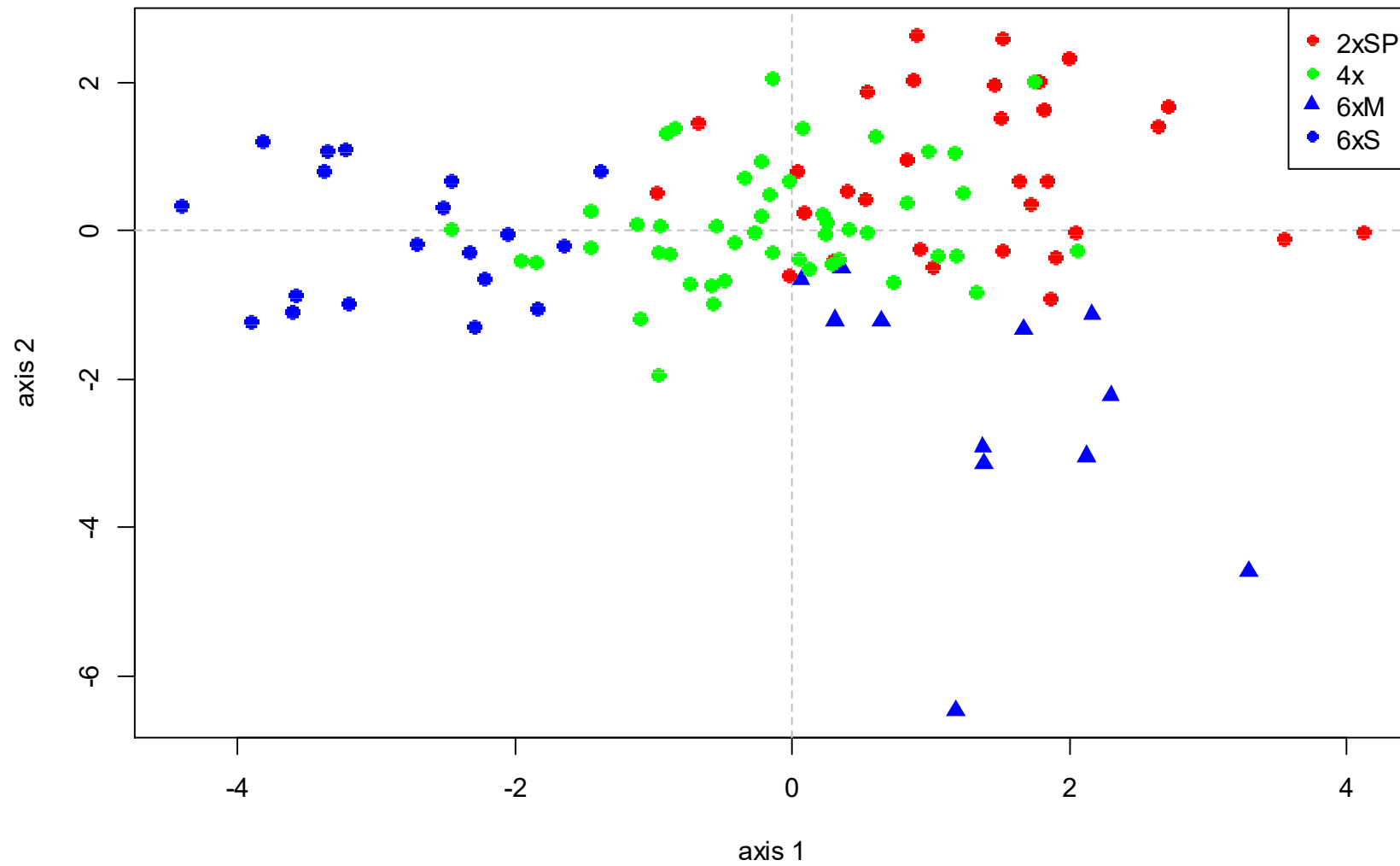
Obr. 12: Diskriminační analýza souboru všech znaků, první a druhá osa. 2xSP – diploidi, 4x – tetraploidi, 6xM – mediteránní hexaploidi, 6xS – skandinávští hexaploidi.



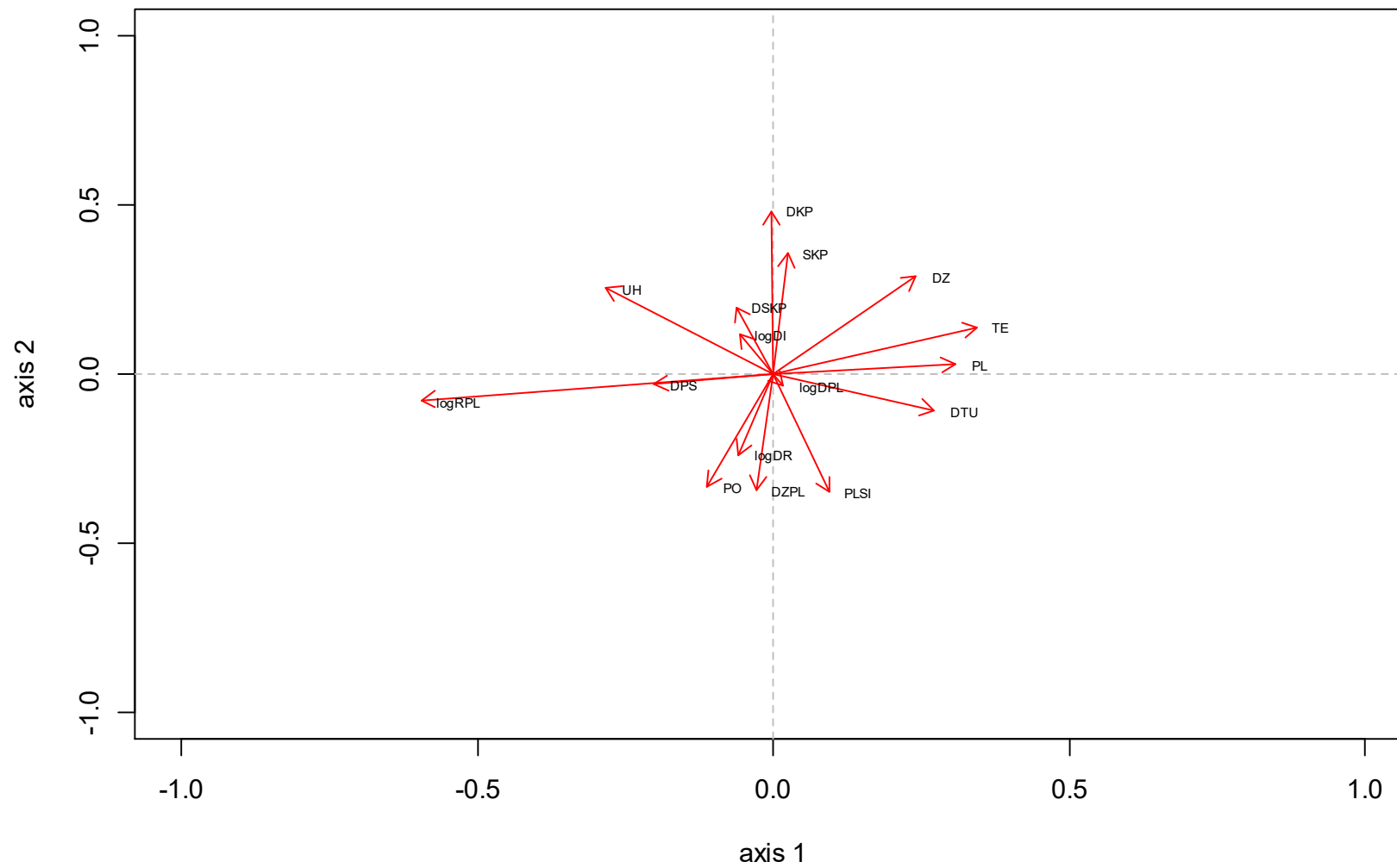
Obr. 13: Diskriminační analýza souboru všech znaků, první a třetí osa. 2xSP – diploidi, 4x – tetraploidi, 6xM – mediteránní hexaploidi, 6xS – skandinávští hexaploidi.



Obr. 14: Diskriminační analýza souboru všech znaků: korelace znaků s osami.



Obr. 15: Diskriminační analýza souboru znaků bez znaků na nažkách. 2xSP – diploidi, 4x – tetraploidi, 6xM – mediteránní hexaploidi, 6xS – skandinávští hexaploidi.



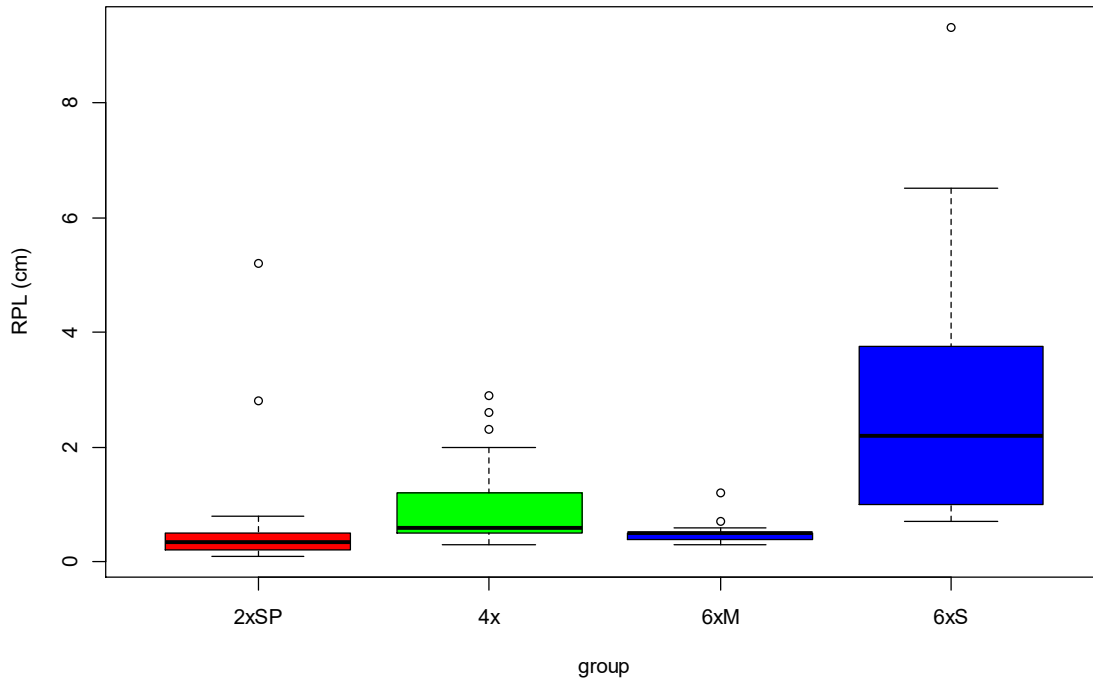
Obr. 16: Diskriminační analýza souboru znaků bez znaků na nážkách: korelace znaků s osami.

Tabulka 7 ukazuje hodnoty pseudo-F-statistiky a hladiny signifikance pro měřené znaky (znaky jsou testovány každý zvlášť bez ohledu na ostatní, tzv. *marginal effects*) v rámci souboru všech znaků a v rámci souboru znaků bez znaků na načkách. Znaky s průkazným vlivem (znaky na hladině signifikance ≤ 0.05) jsou uvedeny tučně.

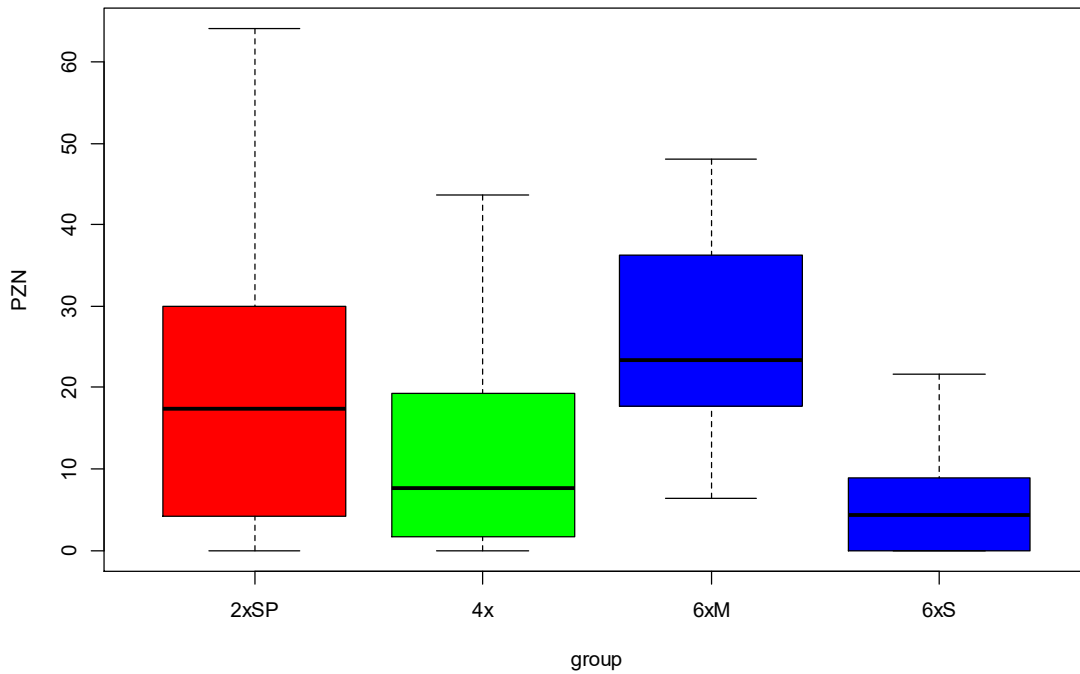
Tab. 7: Hodnoty pseudo-F-statistiky a hladiny signifikance pro měřené znaky.

znak	Všechny znaky		Znaky bez naček	
	F	p	F	p
logDI	1,997	0.13	0,655	0.62
DPS	9,4	0.005	3,955	0.01
logDPL	3,803	0.015	2,988	0.025
logRPL	15,816	0.005	18,51	0.005
DTU	3,471	0.02	5,562	0.005
logPZN	8,168	0.005		
PL	2,236	0.095	6,528	0.005
logDR	3,387	0.03	2,393	0.065
DKP	12,374	0.005	6,833	0.005
SKP	5,626	0.015	3,334	0.01
DN	8,913	0.005		
CHL	21,549	0.005		
TE	2,672	0.03	8,354	0.005
DZ	1,983	0.11	6,091	0.005
PO	3,702	0.015	4,335	0.005
UH	7,354	0.005	9,068	0.005
DSKP	0,763	0.55	1,442	0.23
PLSI	3,556	0.015	4,463	0.015
DZPL	2,784	0.075	3,385	0.035
logDPLDI	1,766	0.185	2,71	0.045

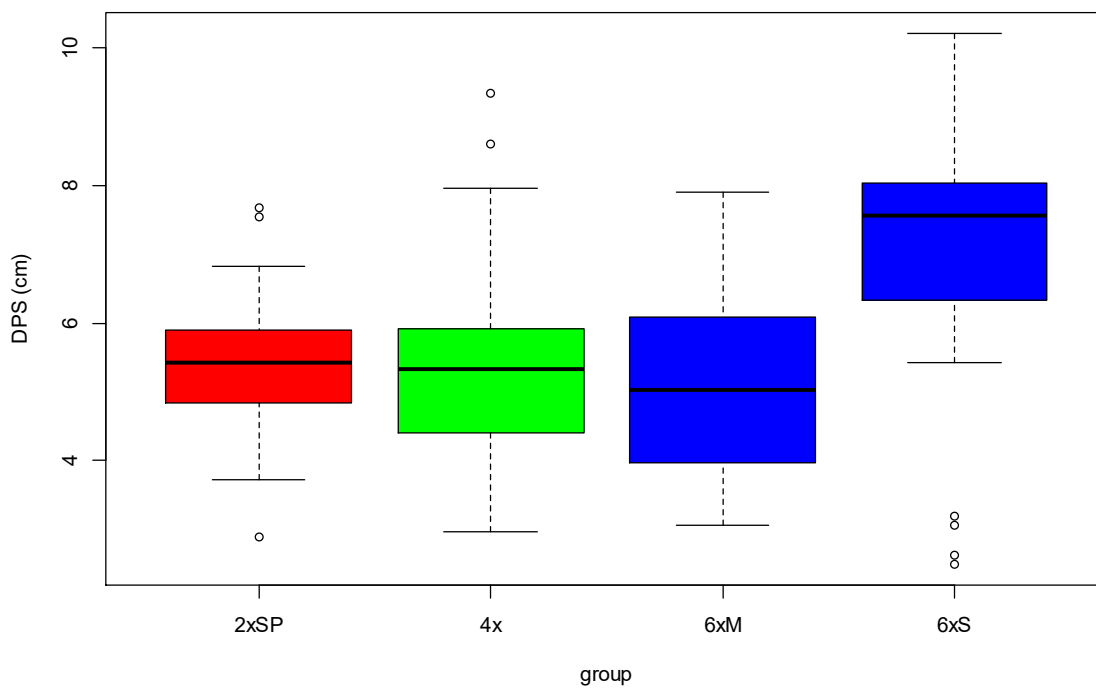
Nejvyšší míru variabilitu v souboru všech znaků vysvětlují znaky DPS (délka plodní stopky), RPL (délka řapíku ponořeného listu), PZN (počet zralých naček), DKP (délka korunního plátku), DN (délka načky), CHL (chlupatost načky), UH (úhel báze čepele plovoucího listu). Následující obrázky ukazují krabicové diagramy vytvořené pro výše uvedené znaky (kromě CHL). Znak CHL je binární, jeho hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5. Žádný z těchto znaků sám neodliší všechny skupiny. Pro určování by bylo potřeba použít znaků více.



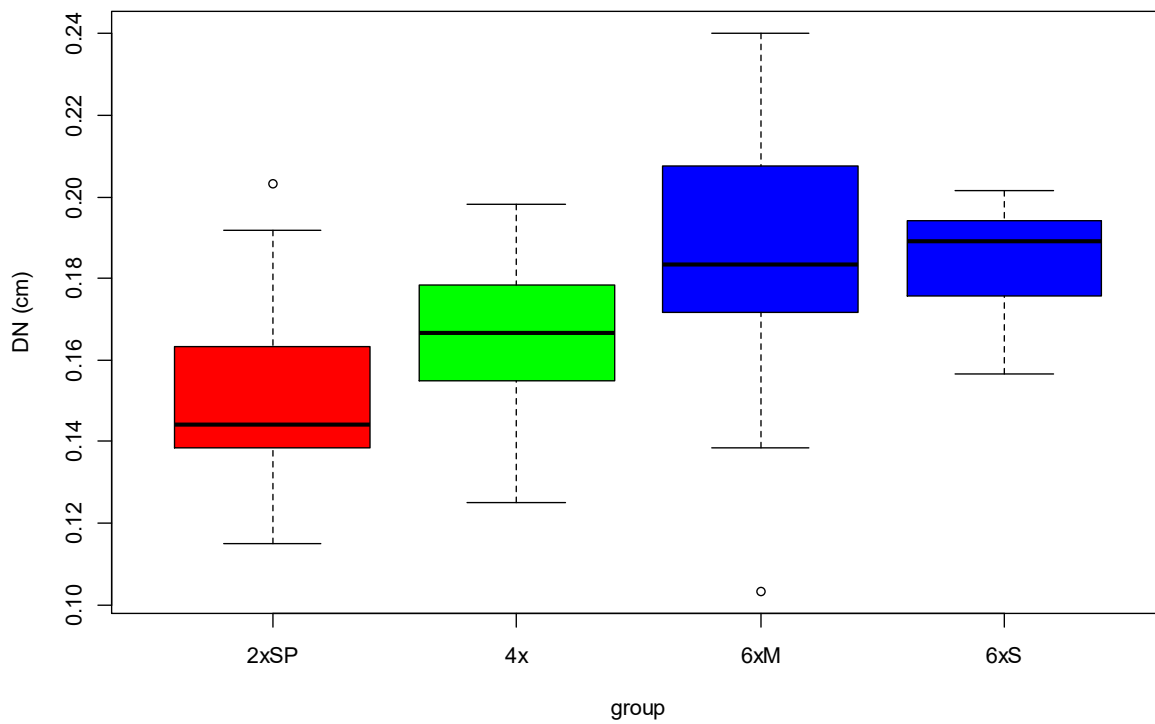
Obr. 17: Krabicový diagram znaku RPL (řapík ponořeného listu).



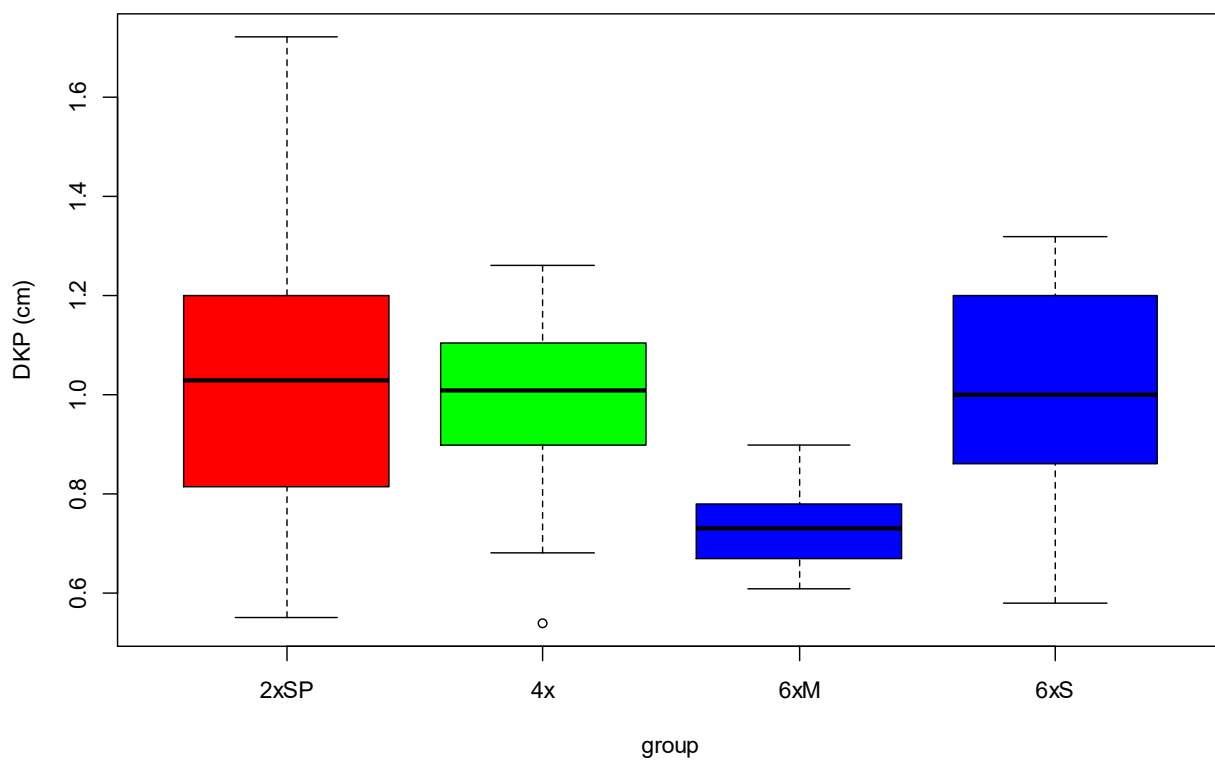
Obr. 18: Krabicový diagram znaku PZN (počet zralých nažek).



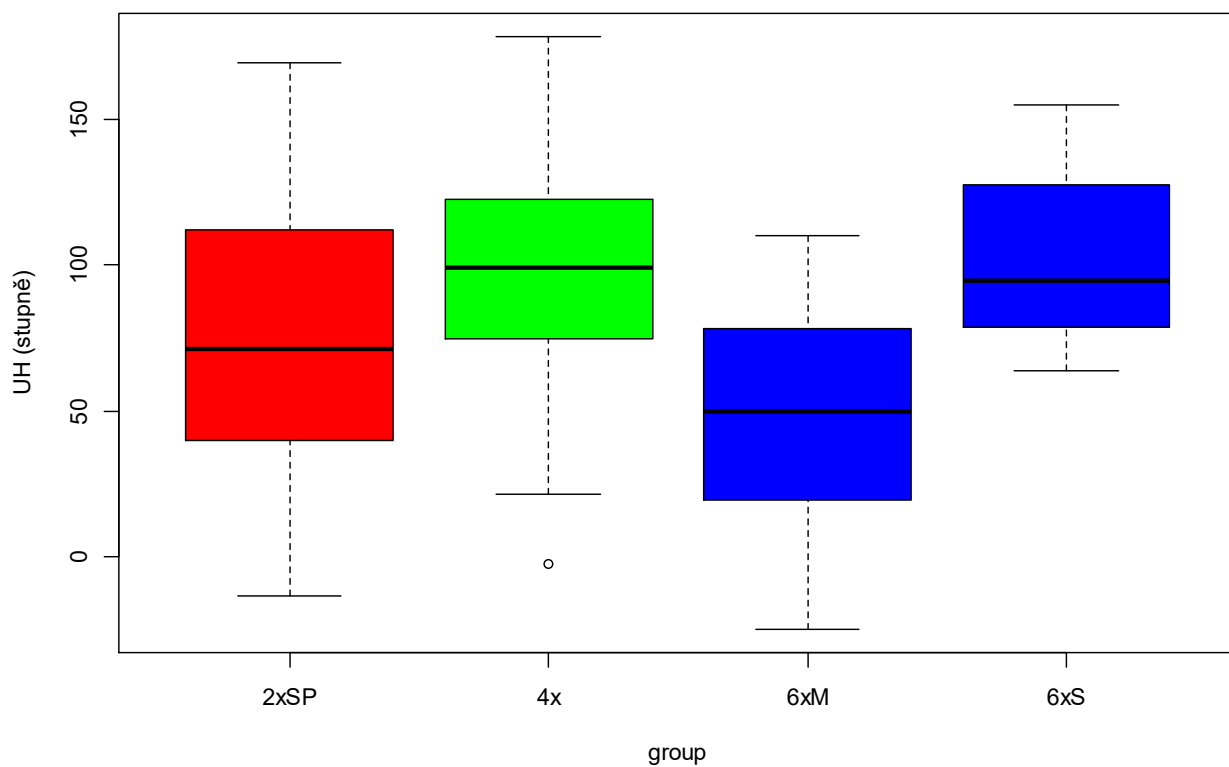
Obr. 19: Krabicový diagram znaku DPS (délka plodní stopky).



Obr. 20: Krabicový diagram znaku DN (délka nažky).



Obr. 21: Krabicový diagram znaku DKP (délka korunního plátku).



Obr. 22: Krabicový diagram znaku UH (úhel báze čepel plovoucího listu).

3.1.6 Klasifikační diskriminační analýza

Klasifikační diskriminační analýza potvrzuje dobré oddělení cytotypů při užití všech znaků a zhoršené oddělení při vypuštění nažek. Při užití všech znaků se vyskytly jen dvě záměny mediteránních hexaploidů a dvě záměny skandinávských hexaploidů za tetraploidy. Při vypuštění nažek je největší podíl záměn tetraploidů za diploidy.

Tab. 8: Klasifikační diskriminační analýza pro všechny znaky. 2xSP – diploidy, 4x – tetraploidy, 6xM – mediteránní hexaploidy, 6xS – skandinávští hexaploidy. N – počet jedinců.

Taxon	2xSP	4x	6xM	6xS	N	Úspěšnost klasifikace (%)
2xSP	23	0	0	0	23	100
4x	0	38	2	2	42	90.48
6xM	0	0	12	0	12	100
6xS	0	0	0	10	10	100
Celkem	23	38	14	12	87	95.40

Tab. 9: Klasifikační diskriminační analýza pro všechny znaky bez znaků na nažkách. 2xSP – diploidy, 4x – tetraploidy, 6xM – mediteránní hexaploidy, 6xS – skandinávští hexaploidy. N – počet jedinců.

Taxon	2xSP	4x	6xM	6xS	N	Úspěšnost klasifikace (%)
2xSP	18	11	3	0	32	56.25
4x	7	35	0	6	48	72.92
6xM	3	3	6	0	12	50
6xS	0	3	0	16	19	84.21
Celkem	28	52	9	22	111	67.57

3.2 Genetické analýzy

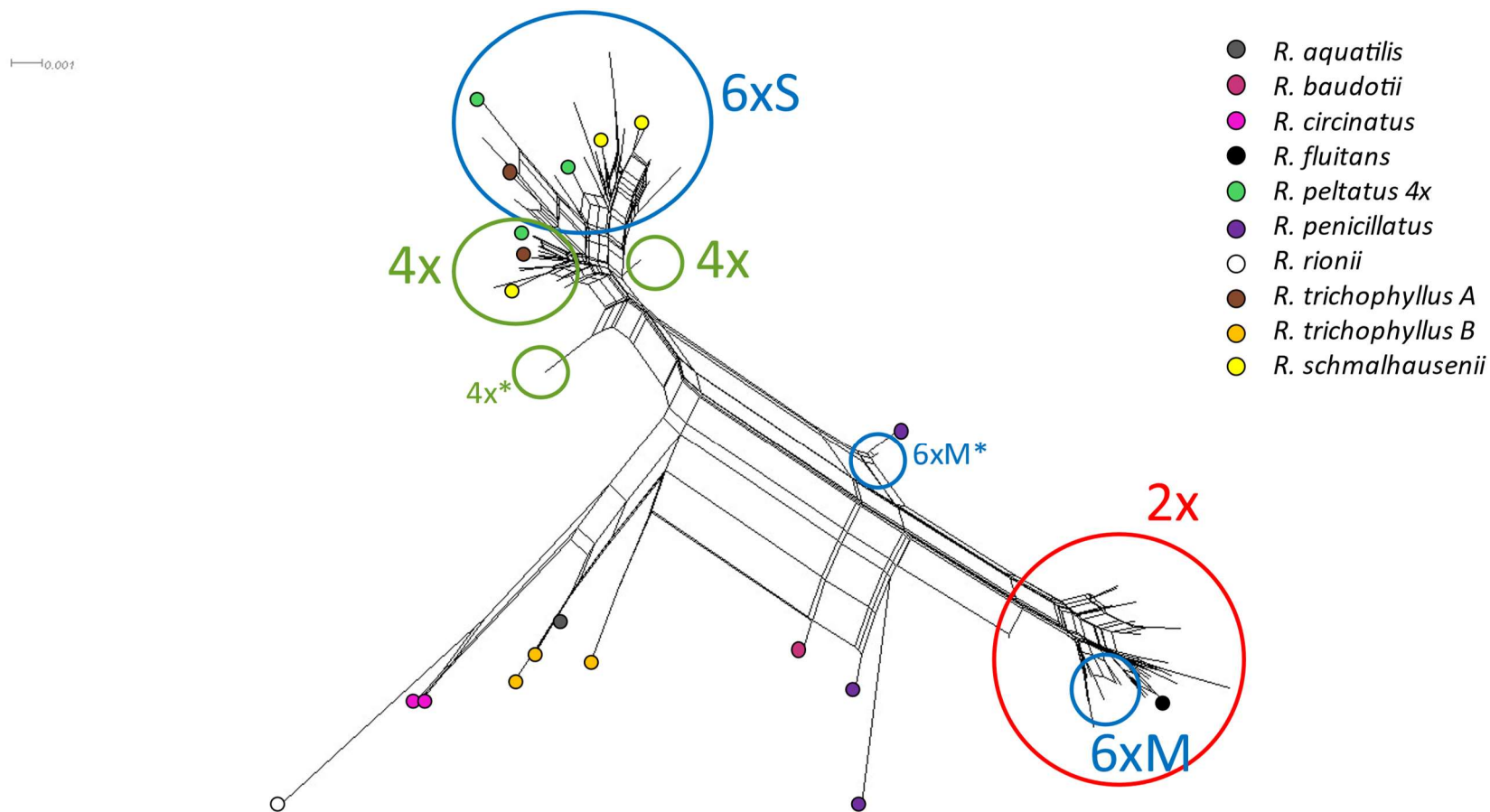
3.2.1 ITS neighbor network

Celkem bylo použito 90 ITS sekvencí zpracovávaných rostlin. Celková délka alignmentu byla 602 bází, z toho 64 pozíci bylo polymorfních. Většina mutací byly substituce, pouze dvě pozice obsahovaly inzerci/deleci. Na obrázku 23 je neighbour-net síť vytvořená na základě unikátních ITS sekvencí a vzorových sekvencí středoevropských druhů (Koutecký et al., 2022) a *R. schmalhauseni*. Diploidní jedinci (2x) spadají do blízkosti středoevropského *R. fluitans*, stejně tak mediteránní hexaploidy (6xM). Tetraploidy (4x) a skandinávští hexaploidy (6xS) spadají do jedné skupiny tvořené vzorovými sekvencemi *R. peltatus* (4x), *R. schmalhauseni*

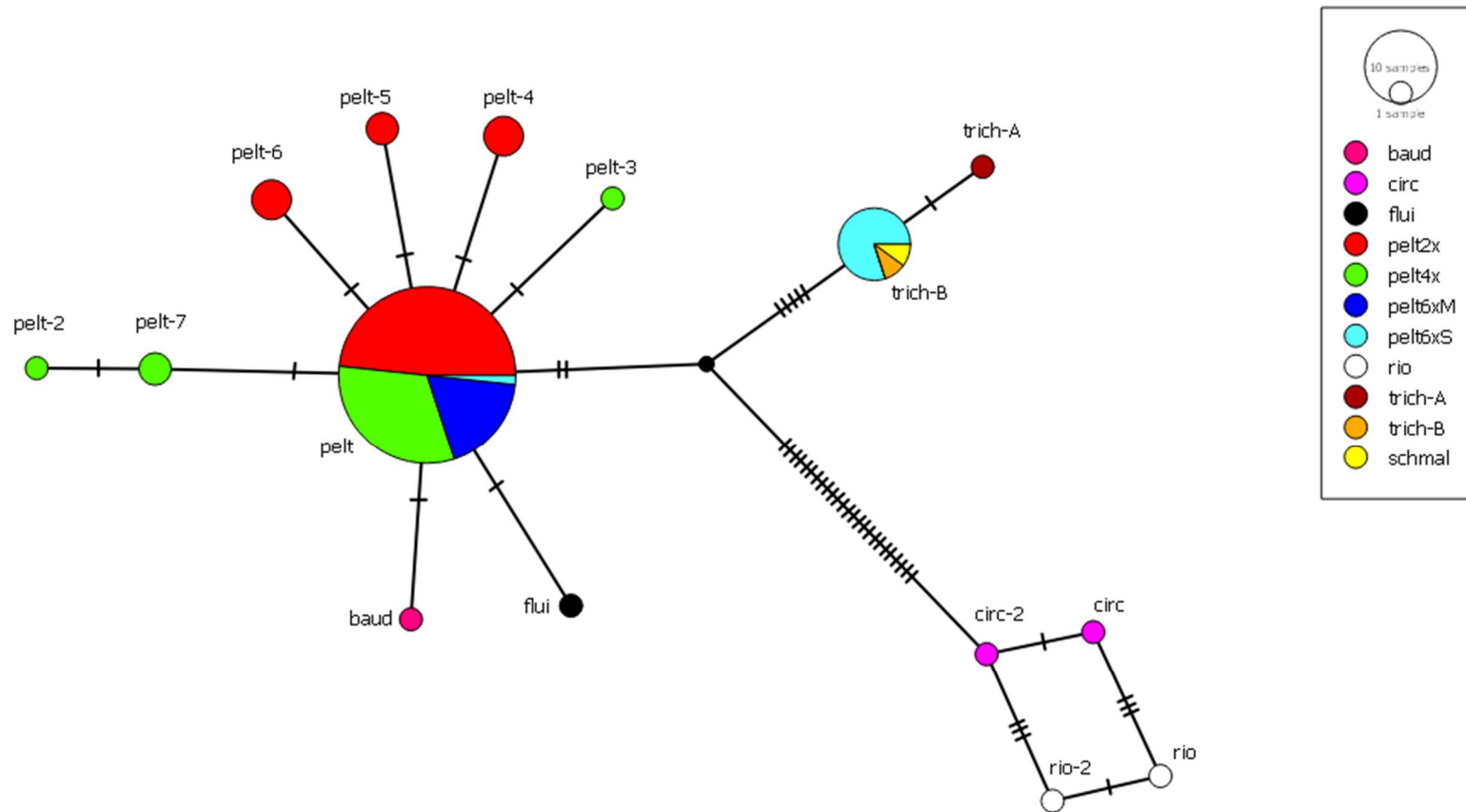
a *R. trichophyllus* typ A. Mezi tetraploidy (4x) a skandinávskými hexaploidy (6xS), vzorovými sekvencemi *R. peltatus* (4x), *R. schmalhauseni* a *R. trichophyllus* typ A není patrná žádná struktura, nedochází k oddělení dílčích skupin (vzorových sekvencí) po taxonech. Dvě sekvence (označené hvězdičkou) stojí samostatně, jde zřejmě o recentní hybridy. Skandinávští hexaploidy jsou na základě úseku ITS geneticky odlišní od mediteránních hexaploidů. Diploidy jsou odlišní od tetraploidů.

3.2.2 Chloroplastové úseky

Celkem bylo použito 78 chloroplastových sekvencí zpracovávaných rostlin. Celková délka konkatenovaného alignmentu byla 1390 bází, z toho 45 pozíci bylo polymorfních. Většina mutací byly opět substituce, sedm pozic obsahovalo inzerci/deleci. Oproti úseku ITS se podařilo kompletně osekvenovat méně jedinců. Na obrázku 24 je haplotypová síť vytvořená na základě chloroplastových sekvencí a vzorových sekvencí (Koutecký et al., 2022) středoevropských druhů a *R. schmalhauseni*. Většina jedinců (60) diploidů, tetraploidů a mediteránních hexaploidů má stejný haplotyp identický s nejčastějším středoevropským haplotypem *R. peltatus* (pelt). U několika jedinců byly zaznamenány podobné haplotypy lišící se jednotlivými mutacemi: u dvou diploidních španělských populací tři jedinci (haplotypy pelt4, pelt6), u jedné diploidní španělské populace dva jedinci (haplotypy pelt5) a u jedné tetraploidní populace dva jedinci (haplotyp pelt7). Haplotypy pelt2 a pelt3 jsou unikátní haplotypy přítomné u vzorových sekvencí, které se v mých datech nevyskytovaly. Z devíti jedinců severských hexaploidů byl jeden identický se vzorovou sekvencí *R. peltatus* (nejčastější haplotyp pelt) a zbylých osm bylo shodných se sekvencí *R. trichophyllus* cytotyp B, se kterou se shoduje i *R. schmalhauseni* (haplotyp trich-B).



Obr. 23: Neighbor network jaderného úseku ITS. Diploidi (2x) jsou značeni červeným prázdným kolečkem, tetraploidi (4x) zelenými prázdnými kolečky a hexaploidi (6xM, 6xS) modrými prázdnými kolečky. Vzorové sekvence jsou značeny malými plnými kolečky různých barev – viz legenda. Sekvence označené hvězdičkou (*) jsou nejspíš recentní hybridy.



Obr. 24: Haplotypová síť dvou studovaných úseků DNA (spojené sekvence úseků *rpl32-trnL^{UAG}* a *3'rps16-5'trnK*). Diploidi (pelt2x) jsou značeni červeně, tetraploidi (pelt4x) zeleně, mediteránní hexaploidi (pelt6xM) modře a skandinávští hexaploidi (pelt6xS) tyrkysově. Vzorové sekvence jsou značeny různými barvami – viz legenda. Velikost kolečka odráží počet jedinců. baud – *R. baudotii*, circ – *R. circinatus*, flui – *R. fluitans*, rio – *R. rionii*, trich-A – *R. trichophyllus* cytotyp A, trich-B – *R. trichophyllus* cytotyp B, schmal – *R. schmalhauseni*.

4 Diskuze

4.1 Materiál

4.1.1 Sběr materiálu

V počtu analyzovaných jedinců jednotlivých ploidí je nepoměr. To je dáno rozšířením jednotlivých cytotypů a také možnostmi sběru a množstvím materiálu, který byl k dispozici již sesbíraný. Výrazně nejméně je hexaploidních populací. V roce 2022 byla podniknuta cesta do Švédska a Norska s cílem mimo jiné nasbírat další hexaploidní populace *R. peltatus*. Oblast byla bohužel postižena suchem, což omezilo množství úspěšných sběrů na vytipovaných lokalitách (na části lokalit byly nalezeny pouze terestrické nebo regenerující rostliny, které jsou pro morfometrické analýzy nepoužitelné). Z celkových pěti dovezených populací *R. peltatus* použitelných na morfometrické analýzy byly tři tetraploidní a jen dvě hexaploidní. V plánu byla i cesta do Španělska s cílem nasbírat další diploidy. Cesta se měla realizovat na jaře roku 2022, ale kvůli extrémnímu suchu, kterým byla toho času oblast postižená, byla odložena až na sezónu 2023, takže sběry již nebude možné do této práce zařadit. Covidová situace zase znemožnila cestu do Maďarska s cílem doplnit tamní hexaploidy.

4.1.2 Stanovení DNA ploidie

Stanovení DNA ploidie některých hexaploidních populací je problematické. Zatímco u diploidů a tetraploidů je rozptýl relativní velikosti genomu (RGS) malý a RGS dobře odpovídají ploidii a chromosomovým počtům už u lukušníků známých (Cook, 1966; Prančl et al., 2018), v případě některých skandinávských hexaploidních populací RGS neodpovídá očekávaným. Podle známých RGS tetraploidů (Prančl et al., 2018) by měli hexaploidi vykazovat hodnotu kolem 3.00 (jedenapůlnásobek RGS tetraploidů – 2.00). V případě problematických populací (34, 35) se RGS pohybovala v rozmezí od 2,5 až do 2,9. Pokusy ověřit chromosomové počty selhaly. Počítání prováděla M. Lučanová. Nažky bohužel nevyklíčily a počítání chromosomů se nezdařilo (nebyly k dispozici rostoucí kořínky). Jaká je tedy skutečná ploidie problematických jedinců není úplně jasné. Z morfometrických a genetických analýz (viz dále) ale plyne, že problematické populace jsou těm neproblematickým blízké jak morfologicky, tak geneticky, a jsou tedy v této práci označovány jako hexaploidní.

Je ale taky možné, že skandinávští hexaploidi jsou ve skutečnosti tetraploidní. Vzhledem k domněnce o původu hexaploidů v hybridizaci s druhem *R. schmalhauseni*, který je zřejmě tetraploidní (Bobrov et al., 2015) (viz dále) by pak skandinávští hexaploidi byli homoploidní hybridy tetraploidních druhů. RGS skandinávských hexaploidů je na horní hranici rozmezí RGS tetraploidů (*R. trichophyllus* B) (Koutecký et al., 2022). Problematické populace by pak mohly

být tvořené zpětnými hybridy, kteří mají RGS posunutou, takové případy jsou u lakušníků zaznamenány (Dolejšek, 2021). Nejisté je určení ploidie *R. schmalhauseni*, jelikož je stanovena nepřímo (Bobrov interpretuje data pro *R. peltatus* z Finska jako *R. schmalhauseni* s argumentem, že v oblasti *R. peltatus* neroste) a nemusí být tedy správně (Bobrov et al., 2015). Podle nepublikovaných dat je RGS *R. schmalhauseni* trochu více než 3.00 (Prančl et al., nepubl.), což by odpovídalo spíše tomu, že je *R. schmalhauseni* hexaploidní. Poté by tedy předchozí vyřčená domněnka neplatila (viz 4.4 Genetická variabilita a původ cytotypů).

DNA ploidie mediteránních hexaploidů je stanovena na základě podobnosti RGS s druhem *R. aquatilis*. Zjištěné RGS mediteránních hexaploidů neodpovídají úplně hexaploidnímu *R. peltatus* (resp. trojnásobku diploidů), ale jsou blízké RGS hexaploidního *R. aquatilis*, podle toho je tedy velmi pravděpodobné, že v případě zpracovaných mediteránních populací půjde o hexaploidy.

4.2 Morfometrická měření

Některé morfologické znaky použité při měření se ukázaly být hůře uchopitelné.

Problematickým znakem byl hlavně tvar nektária. *Ranunculus peltatus* má podle literatury nektarium hruškovité (Kaplan et al., 2019). Měřené rostliny vykazovaly v tvaru nektária variabilitu. Tvar vždy víceméně odpovídal hruškovitému nektáriu, ale napříč měřenými jedinci se nektária navzájem celkem lišila. Lišila se mírou vyvinutosti (tedy velikostí a vystouplostí), mírou vystouplosti jednotlivých částí, délkou a šířkou. Nejčastější pozorovanou odlišností byla míra vystouplosti horního okraje nektaria. Někdy byl horní okraj málo nápadný a na první pohled nektarium vypadalo jako pŕlměsíčné. Naopak konzistentní byl počet nektárií na korunním lístku. Všechny měřené rostliny měly na korunním lístku jen jedno nektarium (odlišení od druhů *R. schmalhauseni* a *R. saniculifolius*).

Dalším poněkud problematickým znakem je počet nažek. Domnívám se, že v některých případech je počet nažek ovlivněn vypadáváním zralých nažek ze souplodí, ačkoliv zjevně rozsypaná souplodí měřena nebyla. V případě několika měřených rostlin tímto mohlo dojít ke zkreslení. Celkové výsledky ale tato skutečnost prakticky neovlivní, jelikož rostlin s podezřením na rozpadlá souplodí bylo velmi málo a vyskytovaly se napříč všemi skupinami (cytotypy).

Dále byl v několika případech problematickým znak počet zubů čepele plovoucího listu. V případě, kdy některý zub byl jen velice slabě vyvinutý, nebylo jasné, zda ho započítat či nikoliv. Tento problém se ale vyskytl jen u několika jedinců a zub byl většinou započítán.

4.3 Morfometrické analýzy

Hlavní směr variability vyjádřený první ordinační osou PCA ovlivňují nejvíce tyto znaky (řazeno podle vysvětlující síly): DZ (délka zářezu při terminálním úkroju plovoucího listu), DZPL (poměrný znak vyjadřující míru délky zářezu v rámci délky plovoucího listu), TE (šířka terminálního úkroju plovoucího listu), PL (délka čepele plovoucího listu) a SKP (šířka korunního plátku), tedy především variabilní znaky listové čepele a velikost květů. Ordinační prostor PCA znaků bez nažek tvoří nejvíce tyto znaky: DZ (délka zářezu při terminálním úkroju plovoucího listu), PL (délka plovoucího listu), TE (šířka terminálního úkroju plovoucího listu), SKP (šířka korunního plátku) a DKP (délka korunního plátku), tedy variabilní znaky čepele plovoucího listu a korunního plátku.

V diskriminační analýze souboru všech znaků vyšly nejprůkaznější znaky (řazeno podle vysvětlující síly): DPS (délka plodní stopky), RPL (délka řapíku ponořeného listu), PZN (počet zralých nažek), CHL (chlupatost nažky), DKP (délka korunního plátku), UH (úhel báze čepele plovoucího listu), tedy znaky na generativních orgánech a na listech.

V diskriminační analýze souboru znaků bez nažek vyšly nejprůkaznější znaky: DPS (délka plodní stopky), RPL (délka řapíku ponořeného listu), **TE** (šířka terminálního úkroju plovoucího listu), **PL** (délka čepele plovoucího listu), DKP (délka korunního plátku), UH (úhel báze čepele plovoucího listu), tedy především znaky na listech. Tučně značené znaky jsou nové oproti diskriminační analýze souboru všech znaků. Vzhledem k tomu, že bez nažek odděluje diskriminační analýza skupiny hůře, nové znaky nebudou příliš silné.

Znaky definující největší směr variability v PCA nejsou zcela shodné se znaky nejvýznamnějšími pro určování skupin. To je dáno tím, první osy PCA jsou definovány znaky, které vysvětlují nejvíce variability obecně, zatímco diskriminační analýza se zaměřuje na znaky, které nejlépe odliší definované skupiny.

Pro odlišení jednotlivých cytotypů na základě morfologie jsou důležité znaky na ponořených a plovoucích listech a na generativních orgánech (plodní stopka, květní lůžko, korunní lítky, nažky). Žádný ze znaků všechny skupiny spolehlivě neodliší.

Morfologicky nejproměnlivější (podle PCA) jsou diploidi. Tetraploidi, ačkoliv jsou v analýzách zastoupeni početněji než diploidi, jsou variabilní méně, tvoří kompaktnější shluk. Hexaploidi ze Skandinávie jsou odděleni v PCA od hexaploidů mediteránních. V PCA souboru znaků bez nažek nejsou skandinávští a mediteránní hexaploidi odděleni, je tedy patrné, že znaky na nažkách (délka nažky, chlupatost nažky a počet zralých nažek v souplododí) jsou pro

jejich určování významné. Snížení úspěšnosti odlišení jedinců ukazuje i klasifikační diskriminační analýza provedená na souboru znaků bez nažek. Protože analyzovaných hexaploidů bylo poměrně malé množství, bylo by pro obecnější potvrzení významu nažek potřeba zanalyzovat více jedinců. Dobrým znakem, který odlišuje skandinávské hexaploidy, je délka řapíku ponořeného listu. Ta byla nápadná již během měření morfologických znaků a morfometrické analýzy její roli potvrdily. Skandinávští hexaploidi mají řapíky ponořených listů výrazně delší než všechny ostatní skupiny. Opět ale platí, že měřených jedinců by muselo být více, aby se dala platnost znaku zobecnit.

Nabízí se otázka, zda je možné na jednotlivé cytotypy sestavit určovací klíč. Vzhledem k tomu, že se jednotlivé znaky ve svých rozmezích částečně překrývají a žádný z nich není stoprocentně spolehlivý, bylo by sestavení klíče obtížné. Při určování cytotypů je potřeba hledět na širokou škálu znaků, což příliš nevyhovuje konceptu určovacího klíče.

4.4 Genetická variabilita a původ cytotypů

Chloroplastové úseky zkoumaných jedinců jsou málo variabilní, chloroplastová variabilita je u lakušníků obecně poměrně nízká, existují tři dobře oddělené skupiny haplotypů (*circinatus* + *rionii*, *peltatus* s.l. a *trichophyllus* s.l.), rozdíly mezi haplotypy uvnitř skupin jsou malé, často jen jednotlivé mutace (Koutecký et al., 2022). Moje výsledky jsou s tímto ve shodě. Velmi podobné jako *R. peltatus* jsou ve dvou studovaných chloroplastových úsecích i druhy *R. baudotii* a *R. fluitans* (od nejčastějšího haplotypu „pelt“ se liší pouze jednou mutací). *Ranunculus fluitans* je od *R. peltatus* odlišný morfologicky, *R. baudotii* je druhu *R. peltatus* podobnější a dříve byl některými autory hodnocen pouze jako poddruh *R. peltatus* (Wiegleb et al., 2017).

Diploidní populace a tetraploidní populace se v úsecích cpDNA shodují či jsou si velmi blízké (což je ve shodě s tím, že lakušníky mají obecně nízkou chloroplastovou variabilitu (Koutecký et al., 2022), není to tedy překvapivé), v úseku ITS se ale liší. Možným vysvětlením je vznik tetraploidů jako následek hybridizace diploidů (tedy allopolyploidizace, která je ve skupině celkem častá) s nějakým jiným taxonem sekce *Batrachium*. Různí jiní fertillní tetraploidní allopolyploidi jsou již v literatuře popsáni (Prančl et al., 2018), uvádí je například i Cook ve svém článku, který popisuje souvislost hybridizace a určité morfologické variability (Cook, 1970).

Mediterránní hexaploidi a diploidi z Pyrenejského poloostrova se v chloroplastových úsecích neliší, podle úseku ITS spadají do jedné skupiny a jsou blízce příbuzní druhu *R. fluitans* (který

je diploidní, vzácněji autotriploidní, Koutecký et al. 2022). Nabízí se vysvětlení, že mediteránní hexaploidi jsou produktem autopolyloidizace diploidů *R. peltatus* z Pyrenejského poloostrova. Může též jít o allopolyploidy taxonů velmi podobných ve studovaném úseku ITS. Proces polyloidizace z diploidů na hexaploidy by musel probíhat ve více krocích a probíhal by nejspíš mj. prostřednictvím neredukovaných gamet. Hexaploidní hybridy (allopolyploidy) mohou být fertlní (alespoň co se týče umělých křížení) a mohou se udržet (Cook, 1970).

Příbuzní jsou na základě ITS úseku skandinávští hexaploidi a tetraploidi, liší se však (až na jednoho skandinávského hexaploida) v úsecích cpDNA. Skandinávští hexaploidi se v tomto úseku shodují s haplotypem *R. trichophyllus* typ B, který má ale kromě skupiny *R. trichophyllus* také severský heterofylní druh *R. schmalhauseni*. Zde je možným vysvětlením původu hexaploidů allopolyploidizace *R. peltatus* s *R. schmalhauseni*, který je podle literatury nejspíš také tetraploidní (Bobrov et al., 2015). K této domněnce vede kromě shodných chloroplastových úseků i skutečnost, že někteří skandinávští hexaploidi byli svými morfologickými znaky *R. schmalhauseni* podobní. Podobnost byla v „keříčkovité“ a hodně členěné stavbě ponořených listů, která pro *R. peltatus* není typická (viz 4.6 fotografie studovaných cytotypů: 7 až 10). *Ranunculus schmalhauseni* má také ponořené listy dlouze řapíkaté, *R. peltatus* má řapíky kratší (většinou ne delší než pár milimetrů) (Pizzaro, 1995; Bobrov et al., 2015). Skandinávští hexaploidi jsou nápadní dlouhým řapíkem ponořeného listu. Mají také v průměru větší počet zubů čepele plovoucího listu než tetraploidi, což opět může svědčit pro domněnku o allopolyploidizaci, jelikož *Ranunculus schmalhauseni* má čepel plovoucích listů členěné hlouběji a na větší počet úkrojků než *R. peltatus* (Bobrov et al., 2015). Domněnku o allopolyploidizaci *R. peltatus* a *R. schmalhauseni* podporuje i výskyt skandinávských hexaploidů v oblasti kontaktu obou druhů. Hybrid *R. peltatus* a *R. schmalhauseni* není ale v literatuře udáván (Bobrov et al., 2015).

Alternativní hypotézou je scénář, kdy je *R. schmalhauseni* hexaploidní (viz 4.1.2 Stanovení DNA ploidie). Kdyby se v oblasti vyskytoval i hexaploidní *R. peltatus* (vzniklý např. prostřednictvím neredukované gamety), mohlo by docházet k jeho křížení s hexaploidním *R. schmalhauseni* a vnikal by hexaploidní hybrid. Hybridizace by pak probíhala téměř jednosměrně, matkou by byl většinou *R. schmalhauseni* (poskytuje chloroplast typu *R. trichophyllus* cytotyp B). Pro tuto domněnku svědčí výskyt chloroplastových úseků *R. peltatus* u jednoho ze skandinávských hexaploidů, kteří mají jinak tyto úseky shodné s druhem *R. trichophyllus* (cytotyp B) a *R. schmalhauseni*.

Už podle rozdílných RGS je zřejmé, že skandinávští hexaploidi jsou odlišní od těch mediteránních. To potvrzuje i PCA a genetické analýzy. Skupiny se liší v chloroplastových úsecích i v úseku ITS a mají tedy zcela jiný původ.

Výsledky morfometrických analýz jsou ve shodě s vyřčenými domněnkami o původu jednotlivých hexaploidů. Skandinávští hexaploidi jsou podobnější tetraploidům a mediteránní hexaploidi jsou podobnější diploidům *R. peltatus*. Naopak geografické rozšíření diploidů a mediteránních hexaploidů tuto domněnku příliš nepodporuje. Diploidi se nachází jen na území Pyrenejského poloostrova, zatímco hexaploidi rostou východněji v Mediteránu (Itálie, Chorvatsko) a širším okolí (Maďarsko), existuje mezi nimi velká bariéra geografického prostoru. Je ale možné, že diploidi se vyskytují i východněji a mediteránní hexaploidi západněji, jen nebyli (např. z důvodu vzácnosti v těchto oblastech rozšíření) zaznamenáni.

4.5 Taxonomické hodnocení ploidních úrovní (cytotypů)

Ztotožnění cytotypů s některým již známým taxonem není možné, jde o odlišné taxony. V případě diploidů je relativně podobný *R. saniculifolius* (geografickým rozšířením, celkovou morfologií), který se ale morfologicky liší tvarem nektária (půlměsíčitě) a často zmnoženým počtem nektárií na korunním lístku či zmnoženým počtem korunních lístků (Cook, 1966; Pizzaro, 1995; Wiegleb et al., 2017). Tetraploidi jsou typičtí zástupci druhu. Mediteránní hexaploidi jsou podobní druhu *R. aquatilis* relativní velikostí genomu, ale jinak mu podobní nejsou: liší se od něj např. méně členěnými listy či nektárii (*R. aquatilis* má nektária kulatá až pohárkovitá) (Cook, 1966; Pizzaro, 1995; Wiegleb et al., 2017). Kromě morfologických znaků se liší geneticky v úseku ITS. Skandinávští hexaploidi jsou podobní druhu *R. schmalhauseni*. *Ranunculus schmalhauseni* se liší lysými či jen řídko chlupatými květními lůžky, členitostí čepele plovoucích listů či zmnoženým počtem nektárií na korunním lístku a korunních lístků samotných (Cook, 1966; Pizzaro, 1995; Bobrov et al., 2015; Wiegleb et al., 2017). Liší se zřejmě také relativní velikostí genomu.

Zkoumané cytotypy vykazují genetické a morfologické rozdíly a rozdíly ve velikosti genomu. Především genetické rozdíly jasně naznačují, že tetraploidi nevznikli jen prostou autopolyloidizací z diploidů. Skandinávští hexaploidi též pravděpodobně nevznikli pouze procesem autopolyloidizace, ale allopolyloidizací. Někteří skandinávští hexaploidi (populace 34 a 35) mají RGS nižší než ostatní, ale jsou morfologicky a geneticky shodní se zbylými hexaploidy. Proces allopolyloidizace je častým impulzem ke vzniku nových druhů, zajistí reprodukční bariéru mezi allopolyploidy a jejich rodiči (Rieseberg et Willis, 2007).

Mediterránní hexaploidi na základě provedených genetických analýz nevykazují odlišnost od diploidů, jejich RGS ale úplně neodpovídá trojnásobku RGS diploidů a věc vyžaduje další zkoumání. Je ale pravděpodobné (vzhledem k výsledkům genetických i morfologických analýz), že mediteránní hexaploidi vznikli polyploidizací z diploidů.

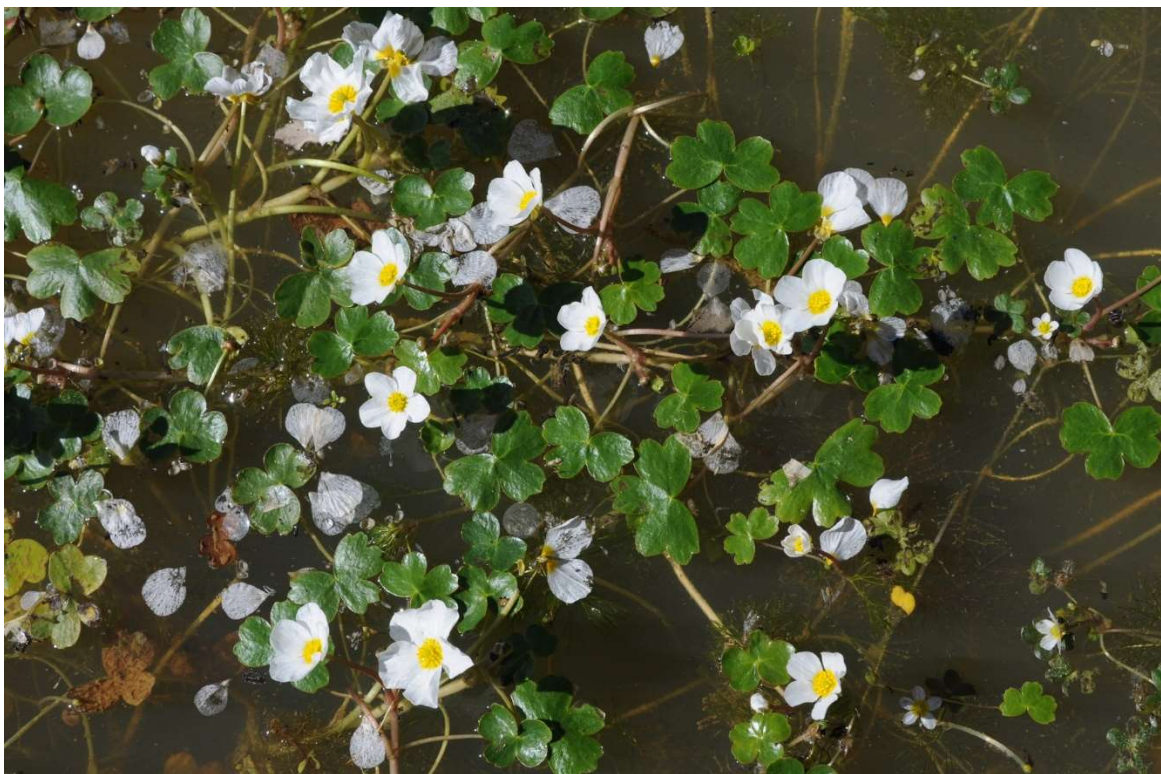
Pro srovnání je možno uvést rozdíly mezi některými druhy lakušníků. Mediteránní diploidi a hexaploidi jsou v úseku ITS od *R. peltatus* podobně odlišní jako je od *R. peltatus* odlišný *R. rionii*, *R. fluitans*, *R. circinatus* či *R. baudotii* (Koutecký et al., 2022), vše dobře vymezené samostatné druhy.

Všechny cytotypy jsou plošně rozšířené v nemalých oblastech. Proto se nabízí možnost klasifikovat alespoň diploidy a tetraploidy a skandinávské hexaploidy jako samostatné taxony, především genetické rozdíly jsou, soudím, dostatečné. Morfologicky jsou si diploidi, tetraploidi a hexaploidi podobní, to ale nevylučuje možnost klasifikace jednotlivých cytotypů jako samostatných druhů. Kupříkladu *R. trichophyllus* typ A a B jsou také morfologicky podobné, ale geneticky i ekologicky se liší a klasifikovat je jako dva samostatné druhy je oprávněné (Koutecký et al., 2022, nepubl. data).

4.6 Fotografie studovaných cytotypů a *R. schmalhauseni*



Obr. 25: *R. peltatus* 2x (Španělsko, pop. 11), foto P. Koutecký.



Obr. 26: *R. peltatus* 2x (Španělsko, pop. 13), foto P. Koutecký.



Obr. 27: *R. peltatus* 4x (Česko, Choryně), foto P. Koutecký.



Obr. 28: *R. peltatus* 4x (Česko, Drahov), foto P. Koutecký.



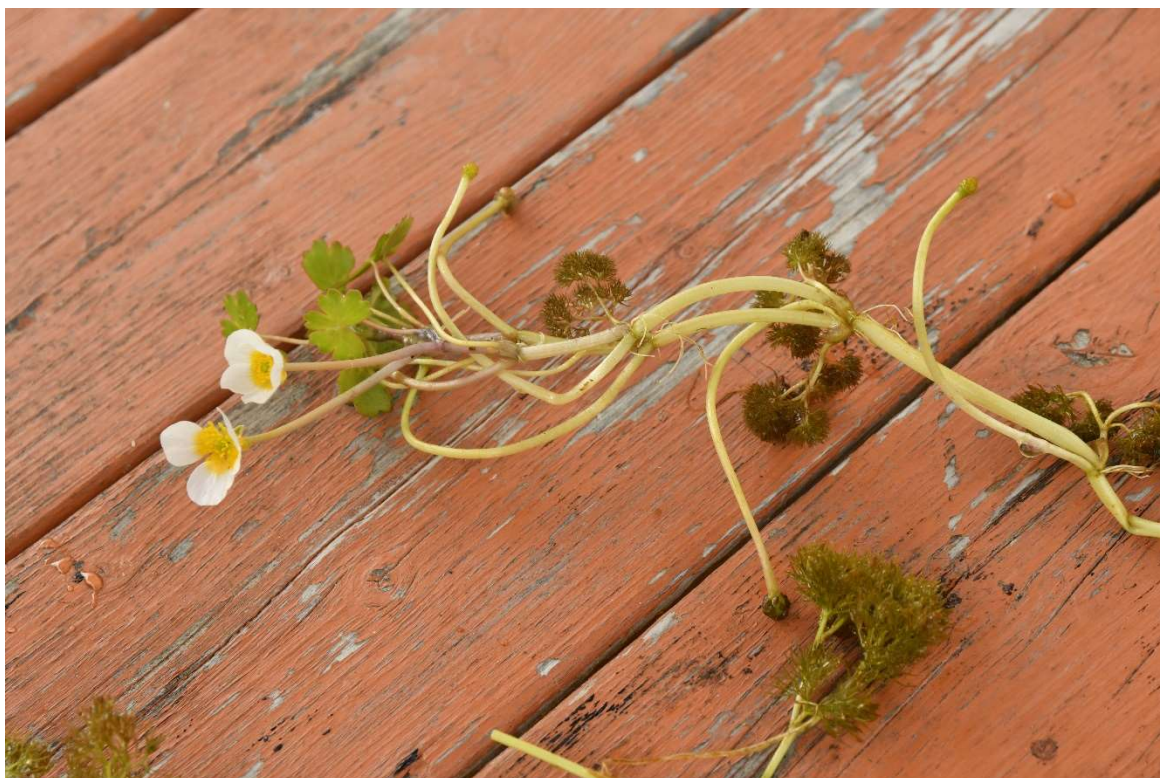
Obr 29: *R. peltatus* 6xM, několik listů *R. aquatilis* (hluboce členěné) (Itálie, pop. 5), foto P. Koutecký.



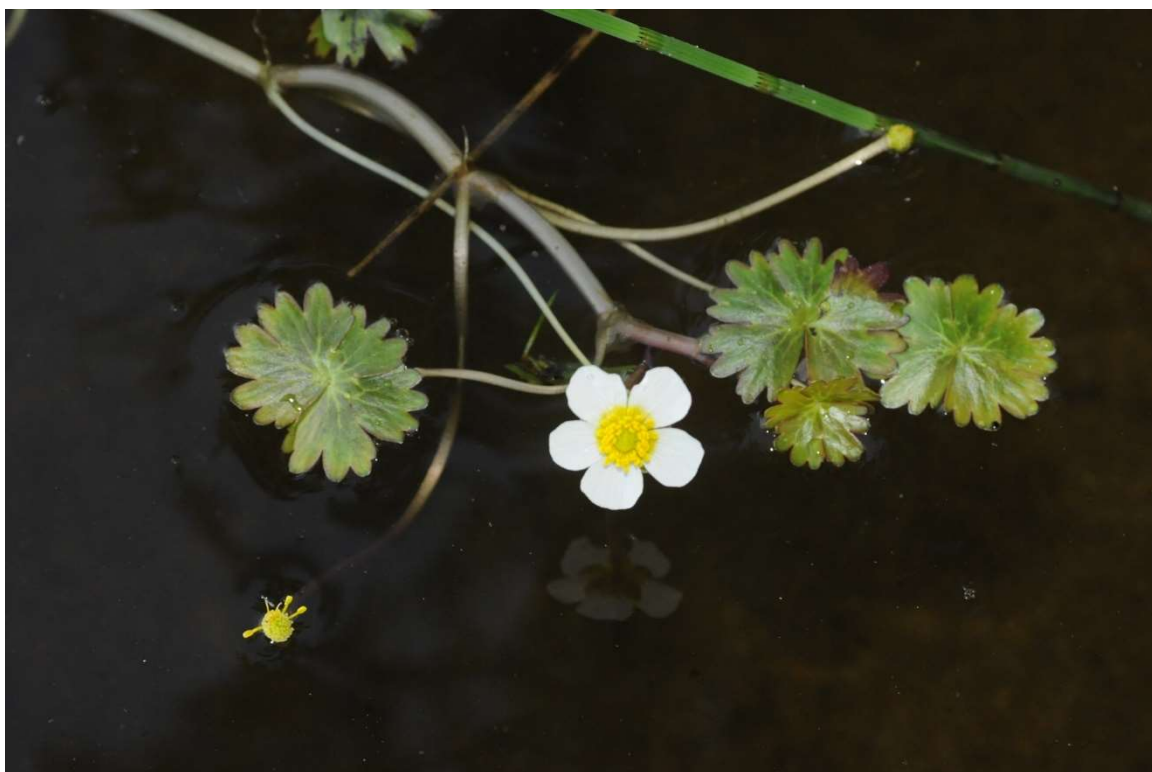
Obr. 30: *R. peltatus* 6xM (Chorvatsko, pop. 6), foto P. Koutecký.



Obr. 31: *R. peltatus* 6xS (Švédsko, Mehedeby), foto P. Koutecký.



Obr. 32: *R. peltatus* 6xS (Švédsko, pop. 34), foto P. Koutecký.



Obr. 33: *R. schmalhauseni* (Finsko, Konnovesi), foto P. Koutecký.



Obr. 34: *R. schmalhauseni* (Finsko, Konnovesi), foto P. Koutecký.

5 Závěr

Práce uvádí prvotní vhled do morfologické a genetické variability druhu *R. peltatus* napříč ploidními úrovněmi v Evropě. Studováni byli diploidi z Pyrenejského poloostrova, tetraploidi ze střední a západní Evropy a ze Skandinávie, hexaploidi z jižní Evropy a hexaploidi ze Skandinávie. Morfologie rostlin byla studována pomocí mnohorozměrných analýz (diskriminační analýza a analýza hlavních komponent), genetická variabilita byla studována pomocí síťových analýz dvou chloroplastových úseků a úseku ITS.

Diploidní populace, tetraploidní populace, hexaploidní populace z jižní Evropy a hexaploidní populace ze severní Evropy se svojí morfologickou variabilitou poměrně liší, dochází jen k částečnému překryvu. Pro odlišení cytotypů na základě morfologie jsou důležité znaky na ponořených a plovoucích listech a na generativních orgánech (plodní stopka, květní lůžko, korunní lítky, nažky). Neexistuje jediný znak, který by všechny skupiny spolehlivě odlišil.

Ve zkoumaných chloroplastových úsecích se kromě skandinávských hexaploidů ostatní cytotypy podobají či se shodují se střeoevropskými tetraploidy (vzorový cytotyp), skandinávští hexaploidi se shodují s druhem *R. trichophyllus* cytotyp B. V úseku ITS jsou si blízcí tetraploidi a skandinávští hexaploidi. Blízcí jsou si i diploidi a jihoevropští hexaploidi, kteří ale, na rozdíl od tetraploidů a skandinávských hexaploidů, spadají podle úseku ITS do příbuzenstva druhu *R. fluitans*.

Je možné, že alespoň tetraploidi a skandinávští hexaploidi jsou allopolyploidy. V takovém případě by bylo oprávněné alespoň diploidy, tetraploidy a skandinávské hexaploidy považovat za samostatné taxony.

6 Literatura

Angiosperm Phylogeny Group (2016): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1–20.

Bobrov A. A., Zalewska-Gałosz J., Jopek M., Movergoz E. A. (2015): *Ranunculus schmalhauseni* (section *Batrachium*, Ranunculaceae), a neglected water crowfoot endemic to Fennoscandia – a case of rapid hybrid speciation in postglacial environment of North Europe. – *Phytotaxa* 233 (2): 101–138.

Clement M., Snell Q., Walke P., Posada D., Crandall K. (2002): TCS: estimating gene genealogies. – Proceedings - 16th International Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS), 15–19 April 2002, Fort Lauderdale, FL, USA. Los Alamitos: IEEE Computer Society, 184.

Cook C. D. K. (1962): Studies in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. I. Chromosome numbers. – *Watsonia* 5: 123–126.

Cook C. D. K. (1963): Studies in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. II. General morphological considerations in the taxonomy of the subgenus. – *Watsonia* 5: 294–303.

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

Cook C. D. K. (1969): On the determination of leaf form in *Ranunculus aquatilis*. – *New Phytologist* 68: 469–480.

Cook C. D. K. (1970): Hybridization in the Evolution of *Batrachium*. – *Taxon* 19: 161–166.

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

Dolejšek V. (2021): Určování říčních populací lakušníku štítnatého (*Ranunculus peltatus*). – Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

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

Emadzade K., Lehnebach C., Lockhart P., Hörandl E. (2010): A molecular phylogeny, morphology and classification of genera of Ranunculeae (Ranunculaceae). – *Taxon* 59: 809–828.

Garbey C., Thiébaud G., Muller S. (2004): Morphological plasticity of a spreading aquatic macrophyte, *Ranunculus peltatus*, in response to environmental variables. – *Plant Ecology* 173: 125–137.

Grulich, V. (2012): Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. – *Preslia* 84, 631–645.

Hejný S., Slavík B. (1997): Květena České republiky 1. Ed. 2. – Academia, Praha.

Hong D. Y. (1991): A biosystematic study on *Ranunculus* subgenus *Batrachium* in S Sweden. – *Nordic Journal of Botany* 11: 41–59.

Hörandl E, Emadzade K (2012): Evolutionary classification: A case study on the diverse plant genus *Ranunculus* L. (Ranunculaceae). – *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14: 310–324.

Huson D. H., Bryant D. (2006): Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. – *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267.

Chytrý M., Danihelka J., Kaplan Z., Wild J., Holubová D., Novotný P., Řezníčková M., Rohn M., Dřevojan P., Grulich V., Klimešová J., Lepš J., Lososová Z., Pergl J., Sádlo J., Šmarda P., Štěpánková P., Tichý L., Axmanová I., Bartušková A., Blažek P., Chrtek J. Jr., Fischer F. M., Guo W.-Y., Herben T., Janovský Z., Konečná M., Kühn I., Moravcová L., Petřík P., Pierce S., Prach K., Prokešová H., Štech M., Těšitel J., Těšitelová T., Večeřa M., Zelený D. & Pyšek P. (2021): Pladias Database of the Czech Flora and Vegetation. – *Preslia* 93: 1–87. URL: <https://doi.org/10.23855/preslia.2021.001> (přístup 1. 3. 2023).

Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M., Štěpánek J. (eds) (2019): Klíč ke květeně České republiky, Ed. 2 – Academia, Praha.

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.

- Király G., Virók V., Molnár V. A. (2011): Új magyar fűvészkönyv. Magyarország hajtásos növényei. Ábrák. – Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, Josvafő.
- 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* 198: 417–437.
- Kubát K. (ed.) (2002): Klíč ke květeně České republiky. Ed. 1.– Academia, Praha.
- Leigh J. W., Bryant D. (2015): POPART: full-feature software for haplotype network construction. – *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1110–1116.
- Pizarro J. (1995): Contribución al estudio taxonómico de *Ranunculus* L. subgen. *Batrachium* (DC.) A. Gray (Ranunculaceae). – *Lazaroa* 15: 21–113.
- 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.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.
- Rieseberg L. H., Willis J. H. (2007): Plant speciation. – *Science* 317: 910–914.
- POWO 2023. Plants of the World online. – Royal Botanic Gardens, Kew, URL: <http://www.plantsoftheworld-online.org> (přístup 28.2.2023).
- Santamaria L. (2002): Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. – *Acta Oecologica* 23: 137–154.
- Shaw J., Lickey E. B., Schilling E. E. & Small R. L. (2007): Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise and the hare III. – *American Journal of Botany* 94: 275–288.

Vlčková L. (2022): Morfologická variabilita a určování terestrických forem středoevropských druhů lakušníků (*Ranunculus* sect. *Batrachium*). – Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

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. – Academic Press, New York.

Webster S. D. (1986): Two natural hybrids in *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. – *Watsonia* 16: 25–30.

Webster S. D. (1990): Three natural hybrids in *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. – *Watsonia* 18: 139–146.

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

Zalewska-Gałosz J., Jopek M. & Ilnicki T. (2014): Hybridization in *Batrachium* group: Controversial delimitation between heterophyllous *Ranunculus penicillatus* and the hybrid *Ranunculus fluitans* × *R. peltatus*. – *Aquatic Botany* 120: 160–168.

Zanger B., Wiegand G. (1987): Biosystematische Untersuchung an Populationen von *Ranunculus* subgen. *Batrachium* in Nordwest-Deutschland. – *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 109: 81–130.