

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Testování mikrosatelitních markerů pro lakušník
vzplývavý (*Ranunculus fluitans*) a lakušník štítnatý
(*Ranunculus peltatus*)

Bakalářská práce

Lucie Sázavská

Školitel: Mgr. Petr Kouřec, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jiří Kořnar, Ph.D.

České Budějovice

2022

Sázavská L., 2022: Testování mikrosatelitních markerů pro lakušník vzplývavý (*Ranunculus fluitans*) a lakušník štítnatý (*Ranunculus peltatus*) [Testing of microsatellite markers for *Ranunculus fluitans* and *Ranunculus peltatus*. Bc. Thesis, In Czech]. – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Microsatellite markers are a suitable tool for population genetics studies in plants. Despite that, they have not yet been properly tested for some European species of *Ranunculus* sect. *Batrachium*. Therefore this work was focused on testing newly developed markers mainly for two species - *Ranunculus fluitans* and *R. peltatus*. Screening of PCR amplification of microsatellite markers was performed on other *Ranunculus* sect. *Batrachium* species, too. Fragment analysis was carried out to test the amplification and variability of the selected loci in the two study species.

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

V Českých Budějovicích 2022, dne 7. 12. 2022

.....

Lucie Sázavská

Poděkování

Děkuji mému školiteli Kout'ovi za vše, co mě během mé praxe v laboratoři a psaní bakalářské práce naučil, a za to, že si vždy našel čas, když jsem potřebovala pomoci. Dále bych chtěla poděkovat Jiřímu Košnarovi, Bety Manukjanové, Jakubovi Kořenáři a Janu Pokornému za to, že mi vždy ochotně pomohli, když jsem si v laboratoři s něčím nevěděla rady. Také děkuji své rodině, která mě při studiu podporovala.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Rešerše	3
3.1 Lakušníky	3
3.2 Mikrosatelity	5
3.3 Výzkum populační genetiky lakušníků	6
3.4 Shrnutí	12
4 Metodika	15
4.1 Materiál	15
4.2 Primery	19
4.3 Izolace DNA	21
4.3.1 Metoda CTAB	21
4.3.2 Metoda NaOH	22
4.4 PCR	23
4.5 PCR s fluorescenčně značeným primerem M13	24
4.6 Gelová elektroforéza	25
4.7 Sekvenční analýza	27
4.8 Fragmentační analýza	27
5 Výsledky	28
6 Diskuse	32
6.1 Fragmentační analýza	32
6.2 Srovnání s vývojem mikrosatelitů u jiných druhů lakušníků	32
6.3 Srovnání lakušníků s jinými vodními rostlinami	34
7 Závěr	36
8 Literatura	37

1 Úvod

Lakušníky (*Ranunculus* sect. *Batrachium*) jsou jednou z evolučně nejkomplexnějších skupin vodních rostlin (Prančl et al., 2018). Vyskytují se převážně na severní polokouli a rozlišujeme asi 30 druhů (Wiegleb et al., 2017). Definovat hranice jednotlivých druhů lakušníků není z mnoha různých důvodů jednoduché. Tyto vodní rostliny s nitřovitými či lupenitými listy a bílými květy plovoucími na hladině (Prančl, 2015) na první pohled nemusí působit příliš pozoruhodně, ale při důkladnějším zkoumání skrývají mnoho zvláštností, které z nich dělají výzvu pro taxonometry.

Mezi tyto zvláštnosti patří například fenotypová plasticita, tedy mnoho znaků těchto rostlin silně závisí na podmínkách prostředí (Butkuvienė et al., 2017), a tak mohou být geneticky stejné rostliny morfologicky odlišné, a naopak rostliny, které si nejsou blíže příbuzné, mohou vypadat velmi podobně (Prančl et al., 2018). Také další jevy, jako častá hybridizace či polyploidie, způsobují, že podobnosti v morfologii druhů nemusí odrážet skutečné evoluční vztahy (Prančl et al., 2018). Proto jsou klíčovým prostředkem pro zkoumání populační genetiky lakušníků molekulární metody, které nám umožňují mimo jiné odkrýt pouhým okem nezjistitelné rozdíly.

Znalost genetické diverzity druhu je pro jeho charakteristiku velmi důležitá (Wade et al., 2002). Butkuvienė et al. (2017) ve své práci o genetické diverzitě lakušníků v litevských řekách podotýkají, že zkoumání genetické diverzity lakušníků a jejich populačních struktur je zásadní, pokud chceme porozumět jejich roli v ekosystému, a také pro následné zavedení opatření, která by mohla předcházet ztrátě diverzity jednotlivých populací lakušníků. Navzdory důležitosti lakušníků jakožto indikátorů udržitelnosti vodních ekosystémů (Butkuvienė et al., 2017) jsou studie jejich populační genetiky poměrně vzácné. Avšak začíná se jim dostávat čím dál více pozornosti ze strany vědců, kteří vyvíjejí a testují různé molekulární metody. Tyto metody nám umožňují odhalit také evoluční procesy, které formovaly variabilitu této skupiny, a to tvoří základ pro další, taxonomické studie (Zalewska-Gałosz et al., 2015).

Jednou z těchto metod je využití mikrosatelitních neboli SSR (simple sequence repeat) markerů. U klonálních rostlin mohou být odhady genetické variability zavádějící při použití markerů s nízkou rozlišovací schopností (Arnaud-Haond et al., 2005). Proto jsou vhodným nástrojem pro genetické studie vodních makrofytů, které se často množí klonálně, polymorfní markery (Wu et al., 2017). Mezi ně patří SSR markery, které umožňují rozlišovat více alel

jednoho lokusu a obě alely genu jedince, a právě pro tyto výhodné vlastnosti jsou hojně využívány pro výzkum genotypů klonálních rostlin (Mason, 2015). Pro studium lakušníků byly mikrosatelitní markery poprvé vyvinuty v roce 2017 pro druh *Ranunculus bungei* (Wu et al., 2017), druh široce rozšířený v Číně (Chen et al., 2014). Wu et al., 2017 vytvořili 22 ETS-SSR markerů pro výzkum jeho populační genetiky.

Možnost využití těchto markerů navržených pro *Ranunculus bungei* na evropské druhy lakušníků byla testována v rámci bakalářské práce (Gemeinhardt, 2019), jejíž cílem bylo zjistit, zda jsou tyto mikrosatelitní markery vhodným nástrojem pro populačně-genetický výzkum evropských druhů. Většina primerů úspěšně amplifikovala DNA při PCR, téměř ve všech případech však byla délka mikrosatelitních sekvencí kratší než zaznamenali Wu et al., 2017, dalším častým problémem bylo přerušení sekvence mikrosatelitu jedním nebo více páry bazí. Kratší, přerušené opakování mají nižší frekvenci mutací (Vieira et al., 2016), a tak nejsou vhodným nástrojem pro výzkum blízkce příbuzných jedinců.

Primery navržené pro *R. bungei* byly tedy shledány nevhodnými pro výzkum evropských druhů, zvláště kvůli výsledně nízké vnitrodruhové diverzitě a dalším zmíněným problémům. Proto se objevila nutnost pro výzkum středoevropských druhů vyhledat pro ně specifické lokusy s mikrosatelity. V prvních předběžných analýzách byly zjištěny v jednotlivých lokusech rozdíly na druhové úrovni, a tak je potřeba hledat lokusy pro každý druh zvlášť. Proto se má práce zaměřuje pouze na dva druhy: *Ranunculus peltatus* a *Ranunculus fluitans*.

2 Cíle práce

Cílem této práce bylo otestovat mikrosatelitní markery pro dva druhy lakušníků: *Ranunculus peltatus* a *Ranunculus fluitans*, ideálně najít lokusy vhodné pro budoucí výzkum těchto dvou druhů a shrnout v rešerši důležité studie dosavadního výzkumu populační genetiky lakušníků.

3 Rešerše

3.1 Lakušníky

Lakušníky (*Ranunculus* sect. *Batrachium*) jsou, co se týče jejich evoluce a určování druhů, velmi složitou skupinou rostlin. Do rodu lakušník patří přibližně 30 různých druhů, obecně se převážně vyskytují na severní polokouli. Evropa je považována za centrum diverzity lakušníků, vyskytuje se zde 14-18 druhů (Wiegleb et al., 2017), z nich 8 bychom našli ve střední Evropě. Lakušníky obývají různé mokřadní habitaty, od eutrofních rybníků a jezer v nížinách po vysokohorská oligotrofní jezera, kromě stojatých vod je najdeme i v rychle tekoucích řekách (Prančl et al., 2018).

Skupina je známá přítomností dvou odlišných typů listů. Lupenité listy jsou ploché, laločnaté a plavou na hladině, oproti tomu niťovité listy jsou obvykle ponořené. Rostliny mohou být heterofylní a mít oba dva typy, nebo pouze jeden z nich. Ve střední Evropě rostou homofylní lakušníky výhradně s niťovitými listy, jinde ve světě se však můžeme setkat i s druhy, které mají pouze listy lupenité. Jaké má druh listy často odráží jeho životní strategii (Prančl et al., 2018). Velikost květů různých druhů se také liší, a je spojena se způsobem, jakým se daný druh rozmnožuje. Skupiny s malými nenápadnými květy jsou většinou považovány za autogamní, zatímco rostliny s velkými květy, které produkují velké množství pylu, mají tendenci k alogamii. Některé malokvěté druhy mohou být dokonce kleistogamické, to znamená, že u nich k opylení dochází v uzavřeném poupěti pod vodní hladinou. Zejména v tekoucích vodách se pak lakušníky snadno rozmnožují vegetativně pomocí fragmentů lodyh (Prančl, 2015).

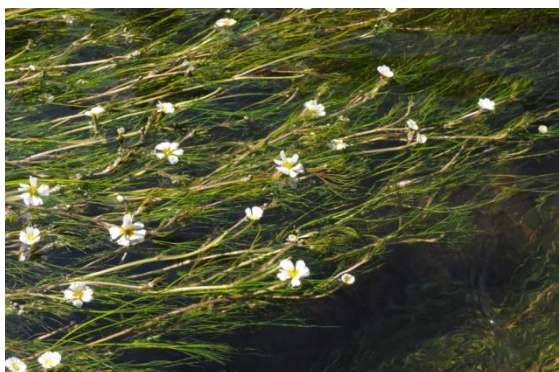
Pro lakušníky je velmi běžná polyploidie, mohou mít 5 různých úrovní ploidie od diploidů po hexaploidy. (Prančl et al., 2018) Přibližně polovina evropských druhů může mít dokonce více ploidních úrovní (Wiegleb et al., 2017). U lakušníků také často dochází k mezidruhové hybridizaci, pravděpodobně všechny taxony jsou schopné se křížit s jiným. Za klíčové faktory, které umožňují šíření hybridů, je považováno klonální šíření a autogamie. (Prančl et al., 2018).

Předmětem mé práce jsou dva druhy lakušníků: *Ranunculus fluitans* a *Ranunculus peltatus*. *R. fluitans* se v České republice vyskytuje roztroušeně v Čechách a na jihozápadní Moravě v tekoucích vodách jako diploid nebo triploid a má pouze niťovité listy. *R. peltatus* se u

nás nachází roztroušeně od pahorkatin do podhůří, velmi vzácně v nížinách v tekoucích i stojatých vodách, jako tetraploid a může mít oba typy listů. (Kaplan et al., 2019; Prančl, 2015)

Vodní rostliny obecně patří do taxonomicky nejkomplikovanějších kvetoucích rostlin. I nepříbuzné druhy jsou často velmi podobným způsobem adaptované na prostředí, ve kterém rostou, a tak je jejich diverzitu těžké zkoumat (Barrett et al., 1993). Zkoumání lakušníků komplikuje zejména morfologická redukce, fenotypová plasticita a častý výskyt polyploidie a hybridizace. Fenotypová plasticita má za následek, že dokonce i klony mohou v závislosti na prostředí vypadat odlišně, a druhy nepříbuzné mohou vypadat velmi podobně. A tak může být u těchto rostlin tradiční klasifikace založená pouze na morfologických znacích zavádějící a nemusí odrážet reálné evoluční vztahy (Prančl et al., 2018). Proto jsou pro výzkum populační genetiky lakušníků důležité molekulární metody. Jednou z těchto metod je využití mikrosatelitních neboli SSR (simple sequence repeat) markerů (Koutecký et al., 2022), viz dále.

Takový výzkum má význam zejména proto, že úseky řek s výskytem lakušníků patří mezi nejohroženější sladkovodní typy habitatů v Evropě (Butkuvienė et al., 2017). Lakušníky mohou být indikátory udržitelnosti říčních ekosystémů. Svě okolí ovlivňují zejména regulací proudění vody, dynamikou toku živin a sedimentů a také poskytují útočiště vodním bezobratlým a rybám. Jsou ohrožovány zejména eutrofizací, znečištěním a šířením invazivních druhů (Mony et al., 2006). I přes jejich klíčovou roli ve sladkovodních ekosystémech jsou studie genetické variability lakušníků stále poměrně vzácné, ale začíná se jim postupně dostávat čím dál více pozornosti.



Obrázek 1: kvetoucí *Ranunculus fluitans*
(zdroj: Petr Koutecký)



Obrázek 2: kvetoucí *Ranunculus peltatus*
(zdroj: Petr Koutecký)

3.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity, nebo také single sequence repeats (SSRs), či short tandem repeats (STRs) jsou tandemové opakování krátkých motivů nukleotidů DNA, patří do tandemových repetitivních sekvencí, které spolu s transpozony tvoří podstatnou část repetitivní DNA (Vieira et al., 2016). SSRs jsou obzvláště zajímavé z evolučního pohledu, protože jsou kvůli chybám, které dělá DNA polymeráza při replikaci sekvence mikrosatelitu, velmi nestabilní (Mason, 2015). Tandemové repetice mutují s frekvencí mezi 10^{-7} a 10^{-3} na buněčnou generaci, což je o jeden až deset řádů vyšší míra, než u bodových mutací (liší se pro různé organismy) (Tautz, 1989). Většina mutací v mikrosatelitních sekvencích znamená přidání jednoho nebo více opakování motivu konkrétního mikrosatelitu, tedy změnu délky mikrosatelitu (Jansen et al., 2012).

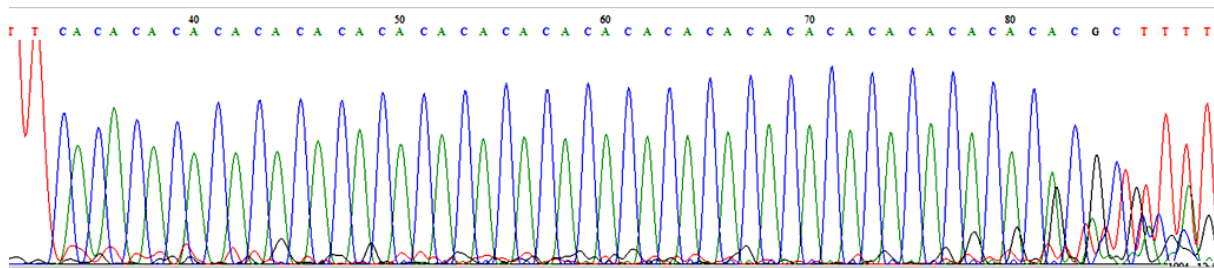
Mikrosatelity jsou obvykle složené z opakování dlouhých 1-6 bp. Najdeme je v prokaryotních i eukaryotních genomech, zejména jsou hojně zastoupené v eukaryotním euchromatinu, v kódující i nekódující, jaderné i organelové DNA (Mason, 2015). Historicky byly TRs považovány pouze za součást nekódující DNA bez jakékoli funkce. S možností sekvenování celých genomů přišlo odhalení, že se mikrosatelity vyskytují i v kódujících oblastech, promotorech a jiných regulačních sekvencích. U lidského genomu se dokonce odhaduje, že bychom repetitivní sekvence našli ve čtecích rámcích až 17% genů (Jansen et al., 2012). Obecně se SSRs v oblasti genů vyskytují méně často, než v nekódujících oblastech, právě kvůli vysoké frekvenci mutací, která by mohla ohrozit expresi těchto genů (Vieira et al., 2016). V některých případech jsou však TR polymorfismy v genech spojovány s funkčními změnami odpovídajících proteinů, což naznačuje, že tyto repetitivní sekvence mohou plnit určitou biologickou roli. Následkem tohoto předpokladu a velké nestability by TRs mohly být nástrojem pro rychlou adaptivní evoluci genů a jim odpovídajících fenotypů (Jansen et al., 2012).

Rozmístění těchto repetitivních sekvencí uvnitř genů není úplně náhodné. TRs s dlouhými motivy opakování (>10 nukleotidů, tzv. minisatelitní opakování) se nacházejí zejména v genech, které kódují extracelulární proteiny nebo proteiny buněčného povrchu, kdežto mikrosatelitní sekvence, které mají kratší motivy opakování (<10 nt), jsou zastoupeny v regulačních genech včetně genů, které kódují transkripční faktory nebo DNA- a RNA-binding proteiny. Repetice uvnitř genů jsou obvykle opakováními motivů nukleotidů o velikosti násobků 3, pravděpodobně

díky selekci proti mutacím, které posouvají čtecí rámeček, a které vznikají u nestabilních opakování motivů, jež nejsou délkou násobky 3 (Jansen et al., 2012).

Nástrojem pro zkoumání genotypů pomocí mikrosatelitů jsou mikrosatelitní markery, odvozené od vlastní DNA s mikrosatelitní sekvencí, které umožňují amplifikaci SSR sekvence pomocí PCR (Mason, 2015). Konkrétně jsou odvozeny od tzv. „flanking“ sekvence, neboli sekvence v okolí mikrosatelitu v určité vzdálenosti od něj, které musí být pro daný druh předem známé. Nacházejí široké využití v mnoha různých oblastech vědy. Jsou klíčové například při studiu populačních struktur, genového mapování a evolučních procesů. SSRs s repeticemi motivů třech až pěti nukleotidů jsou hojně využívány také ve forenzní genetice a pro analýzu rodičovství (Vieira et al., 2016).

Také jsou široce používané pro genetický výzkum populační genetiky rostlin, a to zejména díky jejich hojnému rozšíření v genomech většiny rostlin, a díky jejich vysokému polymorfismu a rozlišovací schopnosti, které umožňují rozlišit všechny alely genu jedince či konkrétního lokusu v populaci. Pro tyto vlastnosti jsou vhodné i pro genetický výzkum klonálních rostlin (Mason, 2015). Konkrétně jsou mikrosatelity divoce rostoucích rostlin užitečné například pro evoluční studie, tedy odvozování vnitrodruhových genetických vztahů, pro zkoumání variability druhů či populací, pro odhad toku genů populací nebo zkoumání diverzity měřené na základě genetické vzdálenosti (Vieira et al., 2016).



Obrázek 3: Mikrosatelitní sekvence s 26 opakováními motivu CA

3.3 Výzkum populační genetiky lakušníků

Mikrosatelitní markery byly pro výzkum lakušníků navrženy poprvé v roce 2017. Wu et al. (2017) vyvinuli SSR markery pro druh *Ranunculus bungei* za účelem jejich následného použití při zkoumání vlivu ekologických faktorů na tok genů a genetickou strukturu tohoto druhu. Testovali také s pomocí těchto primerů amplifikaci lokusů dvou jiných příbuzných druhů

lakušníků. Ta proběhla úspěšně, a tak navrhli využití jimi vyvinutých primerů i pro výzkum jiných druhů lakušníků. Toto využití bylo testováno na evropské druhy v rámci bakalářské práce Gemeinhardt (2019) viz Úvod. Do té doby však proběhlo několik studií, které se věnovaly populační genetice těchto rostlin, za použití jiných molekulárních metod.

Populární metodou pro analýzu neosekvenovaných genomů je metoda ISSR (inter simple sequence repeats), která je hojně používána v populačních, ekologických a fylogenetických studiích (Coppi et al., 2015) Metoda ISSR, cílená na úseky DNA mezi mikrosatelitními lokusy, při které jsou primery kladeny přímo do mikrosatelitů (Godwin et al., 1997), obchází problém vlastní SSR markerům, pro které je potřeba znát „flanking“ sekvence. Má však jiné nevýhody jako například, že podobně dlouhé fragmenty DNA, které jsou amplifikovány při PCR, nemusí být vždy homologní, tedy pocházet ze stejné oblasti v genomu. Další nevýhodou je problém s reprodukovatelností (Godwin et al., 1997), podobně jako u metody ALFP.

Další nevýhodou metody AFLP (Amplified fragment length polymorphism) je náchylnost k chybám, které znemožňují při výzkumu variability populací lakušníků rozlišit, zda se u dvou podobných profilů, které se liší pouze několika málo fragmenty, jedná o ramety stejného genotypu, či blízko příbuzné genotypy (Butkuvienė et al., 2017). V některých studiích lakušníků je toto rozlišení problematické vzhledem k nízké genetické diverzitě populací.

Další metoda používaná při výzkumu populační genetiky lakušníků RAPD (random amplified polymorphic DNA), která už se dnes pro svou nepřesnost nepoužívá. RAPD primery jsou cílené na náhodné sekvence o délce přibližně 10 bp (Tingey, 2003). Její výhodou je rychlé, poměrně snadné provedení, pro které je potřeba malé množství DNA a naopak není potřeba vytvářet primery na základě konkrétní známé sekvence. Největší nevýhodou je, že tyto primery téměř nejsou přenositelné mezi různými výzkumy, tedy nejsou vhodné ke srovnávání výsledků podobných prací. Vyžadují vysoce standardizované experimentální postupy kvůli citlivosti na podmínky reakce. A kvůli schopnosti této metody amplifikovat DNA téměř jakéhokoli organismu je velmi nebezpečná kontaminace vzorků (Hadrys et al., 1992).

S pomocí právě metody RAPD proběhl jeden z prvních výzkumů populační genetiky lakušníků zaměřený na analýzu genetické variability druhu *R. kadzusensis*. Záměrem práce bylo také schromáždit informace o rozšíření a habitatech tohoto druhu, který roste v Jižní Koreji jako neškodný plevel na rýžových polích. Výsledky výzkumu ukázaly nízké hodnoty genetické variability populací. To bylo přisuzováno převaze autogamie nad alogamií a mladé historii

druhu na zkoumaném území, kam byl pravděpodobně zaveden nedávno, což úzce souvisí s efektem hrdla láhve (Ku et al., 2007), tedy poklesu genetické diverzity populace jako následek předcházejícího prudkého poklesu počtu jedinců, a tedy i alel, v populaci. I po následné obnově velikosti populace tak zůstává genetická variabilita populace snižena.

Ze stejného roku pochází studie, která se dopracovala k podobným výsledkům (Koga et al., 2007). V této studii odhadovali pomocí metody ISSR genetickou diverzitu a strukturu 11 populací *Ranunculus nipponicus*, který roste výhradně v čisté vodě a tak je považován za indikátor neznečištěných vod. V posledních několika desetiletích je jeho původní přirozené prostředí v Japonském regionu Kansai ohrožováno stavbou betonem hraničených kanálů, kvůli tomu dochází k úbytku a zmenšování populací, proto bylo cílem citované studie schromáždit poznatky důležité pro zavedení strategií pro ochranu tohoto druhu a jeho přirozeného prostředí. Věnovali se genetické variabilitě každé populace zvlášť i genetické variabilitě mezi všemi 11 populacemi. Zkoumali také, jak se rostliny rozšiřují. Zjistili, že populace byly na sobě geneticky nezávislé a významně se od sebe lišily, zároveň genetická diverzita každé z populací byla nízká. Zkoumali také, zda by mohli být za šíření druhu *R. nipponicus* na delší vzdálenosti zodpovědní vrubozobí ptáci. Takové šíření by mělo přispívat k redukci genetické diferenciaci mezi populacemi. Protože byly však jednotlivé populace od sebe velmi odlišné, byla možnost pravidelného šíření rostlin ptáky zavržena. Kromě toho byly zkoumané populace geneticky izolované kvůli nedostatečnému šíření semen, vegetativních fragmentů rostlin i pylu. Z těchto důvodů by mohla být ochrana každé z populací důležitá pro zamezení ztrátám genetické diverzity.

K podobným výsledkům dospěla také rozsáhlejší studie, která zkoumala genetickou variabilitu 14 populací *Ranunculus bungei* v čínském pohoří Hengduan opět za použití metody ISSR (Wang et al., 2010). V citované studii byly ISSR markery použity pro odhad genetické variability každé z populací a mezi všemi populacemi, dále pro odhad toku genů mezi populacemi a jak moc jsou od sebe geneticky vzdálené. Byla odhalena nízká genetická diverzita uvnitř populací v kontrastu s vysokou genetickou odlišností mezi populacemi. Také odhalili nízký tok genů, který byl pravděpodobně limitován zejména prostorovou izolací habitatů jednotlivých populací. Obecně organismy, které se množí nepohlavně, vykazují nízkou úroveň genetické diverzity populací, na rozdíl od těch, kteří se množí pohlavně (Loveless and Hamrick, 1984). Nízkou genetickou diverzitu tedy přisuzovali zejména způsobu, kterým se lakušníky rozmnožují, tedy častému klonálnímu šíření a tomu, že většina druhů je schopna samoopylení a mají tendenci ke kleistogamii (Cook, 1969). Populace *R. bungei* v pohoří Hengduan také

pravděpodobně v historii prošly řadou změn habitatů, rekolonizací a fragmentací v době glaciálů a interglaciálů. Dalším důvodem nízké diverzity tedy mohou být jevy jako efekt zakladatele v postglaciální rekolonizaci, to znamená zakládání nových populací malým počtem jedinců, kteří byli dříve součástí jiné větší populace, z čehož vyplývá omezený genofond nově vzniklých populací, a dále efekt hrdla lahve následkem lidských zásahů do přírody.

Další významná studie na téma populační genetiky lakušníků zkoumala jedinou populaci druhu *Ranunculus fluitans*, omezenou na 12km úsek řeky Six Mile Water River v Irsku, za účelem shromáždění informací využitelných při vymýšlení strategií pro ochranu tohoto druhu (Bradley et al., 2013). Používali metodu AFLP. Cílem práce bylo zjistit, zda rozsáhlý klonální růst způsobil snížení genetické diverzity této populace, jako to bylo dříve prokázáno u jiných menších a izolovaných populací (Beatty et al., 2008), jelikož je nízká úroveň genetické variability spojována se snížením adaptivního potenciálu rostlin (Bradley et al., 2013) a populace se tak stávají ohroženými. Dále chtěli zjistit, zda dochází k hybridizaci s *R. pennicillatus*, jelikož hybridizace mezi takovýmto běžným druhem (v západní Evropě) a druhem vzácnějším může vést k zániku jeho genofondu skrz genetickou asimilaci (Bradley et al., 2013). Vegetativní způsob rozmnožování je u lakušníků v přirozených podmínkách považován za důležitější, než pohlavní, zejména kvůli častému výskytu rostlin hybridního původu, které jsou nezávisle na podmínkách prostředí sterilní (Barrat, 1996). Přesto však Bradley et al. (2013) nenašli žádný důkaz toho, že by se zkoumané rostliny klonálně množily. Dále zjistili, že tato nepřilíš rozlehlá populace má srovnatelnou genetickou diverzitu s většími populacemi stejného druhu v Anglii. Malé velikost populace ji tedy výrazně negativně neovlivňovala genetickým driftem ani inbreedingem přesto, že jsou malé populace v tomto ohledu často zranitelnější než ty velké (Bradley et al., 2013). Analýza pěti jaderných SNPs (single nucleotide polymorphisms) neodhalila hybridizaci s *Ranunculus pennicillatus*, i přes to, že byla dříve udávána. Hybridizace tedy pro tuto populaci nepředstavuje nebezpečí ani v podobě genetické asimilace, ani v podobě nárůstu vegetativního rozmnožování sterilních hybridů. Podobně také Butkuvienė et al. (2017) neodhalili žádný jednoznačný důkaz časté mezidruhovité hybridizace, přesto, že výsledky některých předchozích studií dokazují, že je hybridizace u lakušníků běžná (Zalewska-Gałosz et al., 2015).

Cílem jiné ochranné studie druhu *Ranunculus baudotii* bylo porovnat genetickou diverzitu vzorků *ex situ* banek semen s genetickou diverzitou kvetoucích rostlin přirozených populací daného druhu, jak moc se záchranné výsevy semen mohou lišit mezi sebou a od mateřské populace a zejména jaký to má význam pro ochranu tohoto druhu (Coppi

et al., 2015). Dále porovnávali genetickou diverzitu populací *R. baudotii* před a po provedení projektu pro obnovu stanoviště, tedy přírodního rybníku v italském Národním parku Toskánské ostrovy. Tento projekt zahrnoval odstranění vysokých bahenních rostlin, jako například *Typha* sp. a *Phragmites australis* z rybníku. ISSR analýza pěti skupin vzorků ukázala relativně vysokou úroveň genetické diverzity *ex situ* kultivovaných rostlin, které se tak staly cenným potenciálním nástrojem pro ochranu tohoto druhu. Ověřili také, že když rostliny kultivovali v teplotě stanovené jako optimální pro klíčení tohoto druhu, projevila se široká škála různých genotypů, kdežto při teplotách, které se od optima odchylovaly, vyklíčilo semen méně a diverzita genotypů byla výrazně nižší. Tyto požadavky na podmínky klíčení *ex situ* záchranných výsevů *R. baudotii* byly testovány v předchozím výzkumu (Carta et al., 2012). Proto by při podobných záchranných strategiích měl být na tuto specificky optimální teplotu brán ohled. Po provedení obnovovacího projektu došlo k rozsáhlé rekolonizaci *R. baudotii*, úroveň genetické diverzity se však samovolně po tomto jednom zásahu neobnovila, v následujících letech by bylo v tomto případě vhodné vysadit rostliny znovu (Coppi et al., 2015).

Butkuvienė et al. (2017) analyzovali v Litvě 16 populací lakušníků pomocí morfologických znaků a molekulárních markerů (ISSRs a sekvence chloroplastového úseku *trnH-psbA* sekvence). Studie byla zaměřená na základní popis diverzity lakušníků: jaká je variabilita každé z populací a mezi všemi 16, kolik druhů se v populacích vyskytuje, a zda se rostliny často šíří klonálně. Studie rozlišila oddělené skupiny různých druhů lakušníků v Litevských řekách. Opět odhalili nízký stupeň genetické diverzity, vysokou úroveň genetické odlišnosti populací a nízký tok genů mezi populacemi. Na rozdíl od jiných studií (Bradley et al., 2013) pozorovali důležitou roli vegetativního způsobu rozmnožování u studovaných populací. Například u druhu *R. fluitans* byly přítomny květy, nebyla však nalezena jejich semena, a tak předpokládali převahu vegetativního rozmnožování.

Roli vegetativního a sexuálního rozmnožování u lakušníků se věnovali také Lambertini et al. (2017), kteří studovali genetickou strukturu tří populací druhu *Ranunculus baudotii* v Dánské řece Aarhus. Za použití metody AFLPs zkoumali kromě způsobu rozmnožování také jak je genetická variabilita v populacích rozprostřena podél toku a genetické vztahy populace *R. baudotii* s jinými druhy lakušníků, jelikož identifikovali hybridy, kteří by mohli ovlivňovat strukturu populací. Předchozí studie dokázaly, že populace *R. baudotii* v nížinných tocích v Dánsku jsou primárně zakládány díky vegetativnímu rozmnožování. Šířením vodních rostlin v řece Aarhus se už zabývala studie Riis (2008), ve které autorka uvádí, že 80% makrofytní

kolonizace má na svědomí právě šíření fragmentů s dosahem 300m a pouze 20% vyplývá z šíření semen. Výsledky Lambertini et al. (2017) se s tímto shodují. Vegetativní rozmnožování bylo shledáno dominantním způsobem, pohlavní rozmnožování ale nebylo zcela vyloučeno a mohlo by být vysvětleno z většiny samooplozením. Byla také zjištěna nízká genetická variabilita u každé ze 3 populací i pro všechny populace zároveň. Kvůli výše popsané nepřesnosti metody AFLP však mohou být profily, které se liší pouze několika fragmenty, ramety stejného genotypu nebo blízce příbuzné genotypy, rozlišování těchto dvou jevů bylo v citované studii zvláště problematické kvůli nízké genetické variabilitě populací. Výskyt hybridů *R. baudotii* nebyl jednoznačně vyloučen, ani potvrzen.

Jiný druh lakušníku, *Ranunculus subrigidus*, byl vybrán jako reprezentativní taxon pro zkoumání vlivu podmínek prostředí na genetickou variabilitu vodních rostlin na velkém prostorovém měřítku (Wu et al., 2019). V této studii se zajímali o genetickou diverzitu 13 populací *Ranunculus subrigidus* Tibetské náhorní plošiny. Cílem práce bylo objasnit, jak přispívá geografická vzdálenost a podmínky prostředí k rozložení genetické podobnosti populací. Za použití mikrosatelitních markerů odhalili nízkou genetickou diverzitu všech ze zkoumaných populací. U většiny zkoumaných jedinců odhalili také unikátní genotypy testováním několika lokusů, což poukazuje na skutečnost, že u tohoto druhu pravděpodobně nedochází k převaze klonálního rozmnožování. Dále prokázali významný vliv klimatických podmínek na genetickou variabilitu v rámci druhu, a naopak nenalezli důkaz prostorově-genetické struktury tohoto druhu. Z výsledků práce bylo vyvozeno, že historické procesy jako například šíření na velké vzdálenosti a lokální adaptace by mohly být zodpovědné za genetickou strukturu populací *R. subrigidus* a že současné faktory prostředí hrají důležitou roli v genetické diferenciaci a lokální adaptaci vodních rostlin ve vysokohorských ekosystémech.

Z Tibetské náhorní plošiny pochází také 2 nejnovější studie z roku 2022, které zkoumaly již za použití mikrosatelitních markerů různé taxony vodních rostlin, mezi nimi lakušníky (Wu, et al., 2022a; Wu et al., 2022b). První z nich (Wu et al., 2022a) zkoumala hybridizaci u třech rodů rostlin, konkrétně *Myriophyllum*, *Stuckenia* a *Ranunculus* (*R. trichophyllus* a *R. subrigidus*), a její souvislost s prostředím a překryvem nik rodičovských druhů. Výsledky potvrdily překryv nik a koexistenci druhů pro všechny tři rody, u všech třech párů také pozorovali častou hybridizaci. Právě rozsáhlý překryv míst výskytu různých druhů byl již dříve shledán optimálním pro existenci hybridních zón (Yakimowski and Rieseberg, 2014), a tak k této časté hybridizaci ekologicky odlišných druhů pravděpodobně také přispěl (Wu et al., 2022a). Častá hybridizace mezi druhy *R. trichophyllus* a *R. subrigidus* byla poprvé odhalena

právě ve vysokohorských ekosystémech (Wiegleb et al., 2017). Tito hybridní jedinci byli považováni za sterilní, pravděpodobně kvůli rozdílům v ploidii dvou rodičovských druhů (Wiegleb et al., 2017). Studie Wu et al., (2022a) potvrdila důležitost hybridizace při speciaci lakušníků a také evoluční důležitost hybridizace pro zachování vodních rostlin ve vysokohorských ekosystémech. Prokázali, že výškové gradienty Tibetské náhorní plošiny poskytují vhodné niky pro rozsáhlou sympatrii a hybridizaci příbuzných druhů.

Ve druhé studii (Wu, et al., 2022b) se zabývali klonální diverzitou 4 rodů rostlin a jakým způsobem je ovlivněna faktory vysokohorského prostředí. Porovnání mezi čtyřmi taxony, které se všechny rozmnožují sexuálně i vegetativně, jim také umožnilo prokázat, zda je jejich pohlavní rozmnožování ovlivněno určitými ekologickými faktory. U lakušníků prokázali, že se zvyšující se klonální diverzitou se zvyšuje i genetická diverzita populací. Neprokázali zásadní vliv faktorů prostředí na klonální diverzitu ani způsob rozmnožování lakušníků. Mezi čtyřmi zkoumanými druhy vodních rostlin měly lakušníky výrazně nižší klonální diverzitu.

3.4 Shrnutí

Hlavními zkoumanými oblastmi populační genetiky lakušníků byla tedy genetická variabilita, genetická diference populací, hybridizace lakušníků a jejich reprodukce, a jaké faktory mohou tyto jevy ovlivňovat. Co se týče genetické variability populací lakušníků, všechny práce, které se jí zabývaly, dospěly k tomu, že jednotlivé populace různých druhů lakušníků vykazují relativně nízkou úroveň genetické variability (Butkuvienė et al., 2017; Koga et al., 2007; Ku et al., 2007; Lambertini et al., 2017; Wang et al., 2010; Wu et al., 2019). Vysvětlení byla různá, mezi nimi právě způsob, jakým se rostliny rozmnožovaly. Ku et al., 2007 přisuzovali nízkou genetickou variabilitu druhu *Ranunculus kadszensis* zejména převaze autogamie nad alogamií. Tendencí některých lakušníků ke kleistogamii, a obecně tím, že je většina druhů schopna autogamie, vysvětlovali nízkou genetickou diverzitu druhu *Ranunculus bungei* také Wang et al., 2010, kteří ji dále přisuzovali častému klonálnímu šíření, různým historickým faktorům, jako jsou rekolonizace habitatů a fragmentace populací v době glaciálů a interglaciálů a lidským zásahům do přírody, které taky mohly zapříčinit bottleneck efekt a mít tak za následek snížení genetické diverzity. Bottleneck efekt také předpokládali (Ku et al., 2007) u populací druhu *R. kadszensis*, který byl na zkoumané území Jižní Koreji zaveden pravděpodobně nedávno jako neškodný plevel na rýžová pole.

Jiná studie se zabývala vlivem podmínek prostředí na genetickou variabilitu vodních rostlin, pro tuto studii vybrali druh *Ranunculus subrigidus* jako vzorový (Wu et al., 2019). Z výsledků byl patrný významný vliv klimatických podmínek na genetickou variabilitu v rámci druhu. Bradley et al., 2013 zkoumali, zda má na genetickou variabilitu populace vliv její velikost, konkrétně zda má malá populace druhu *Ranunculus fluitans*, která byla předmětem práce, nižší genetickou variabilitu, než větší populace lakušníků, a mohla by tak být kvůli své velikosti zranitelnější. Zjistili, že zkoumaná populace měla srovnatelnou genetickou variabilitu s většími populacemi stejného druhu v Anglii. Malé velikost populace tedy genetickou variabilitu negativně neovlivňovala inbreedingem ani genetickým driftem.

Obvykle byla porovnávána genetická variabilita v rámci každé z několika studovaných populací a mezi všemi populacemi zároveň (Butkuvienė et al., 2017; Koga et al., 2007; Lambertini et al., 2017; Wang et al., 2010). Jedna ochránářsky zaměřená studie také porovnávala genetickou diverzitu kvetoucích rostlin přirozených populací daného druhu s diverzitou vzorků *ex situ* banek semen lakušníků, dále jak moc se geneticky lišily různé záchranné výsevy semen mezi sebou a od mateřské populace, a zejména jaký to má význam pro ochranu tohoto druhu. Také porovnávali genetickou diverzitu živých sbírek *Ranunculus baudotii* před a po provedení obnovovacího projektu (Coppi et al., 2015).

Několik studií se zabývalo otázkou reprodukce lakušníků (Bradley et al., 2013; Butkuvienė et al., 2017; Lambertini et al., 2017; Wu et al., 2019). Bradley et al., 2013 nenašli žádný důkaz toho, že by se rostliny jedné zkoumané populace druhu *R. fluitans* rozmnožovaly vegetativně. Převahu klonálního rozmnožování u populací druhu *R. subrigidus* vyloučili Wu et al. (2019), jelikož u většiny zkoumaných jedinců odhalili unikátní genotypy testováním několika lokusů. Jiná práce naopak prokázala zásadní roli vegetativního způsobu rozmnožování u studovaných populací lakušníků, například u druhu *R. fluitans* byly nalezeny květy, ale nikoli semena, a tak byla předpokládána převaha vegetativního rozmnožování (Butkuvienė et al., 2017). Vegetativní rozmnožování bylo shledáno převažujícím nad pohlavním rozmnožováním také ve výzkumu Lambertini et al., (2017), pohlavní rozmnožování ale nebylo zcela vyloučeno a mohlo by být vysvětleno z většiny autogamií.

Několik studií odhalilo vysokou genetickou diferenciaci mezi zkoumanými populacemi (Butkuvienė et al., 2017; Koga et al., 2007; Wang et al., 2010). Tato genetická rozdílnost populací byla vysvětlována například omezeným šířením semen, vegetativních fragmentů i pylu mezi populacemi (Koga et al., 2007). Nízký tok genů a vysoké hodnoty genetické diferenciaci odhalili také Wang et al., (2010) u populací druhu *R. bungei*. Tok genů byl pravděpodobně

limitován prostorovou izolací habitatů jednotlivých populací. Výsledky zkoumání Wu et al. (2019) zase poukazovaly na významný vliv klimatických faktorů na genetickou diferenciaci populací a také na lokální adaptaci vodních rostlin ve vysokohorských ekosystémech.

Některé ze studií se věnovaly hybridizaci lakušníků (Bradley et al., 2013; Butkuvienė et al., 2017; Lambertini et al., 2017; Wu et al., 2022b; Zalewska-Gałosz et al., 2015). Bradley et al. (2013) neodhalili hybridizaci mezi druhy *R. fluitans* a *R. pennicillatus* i přes svědectví o domnělém výskytu hybridů. Hybridizace tedy v tomto případě nepředstavovala pro zkoumanou menší populaci *R. fluitans* nebezpečí ani v podobě genetické asimilace, ani v podobě nárůstu vegetativního rozmnožování sterilních hybridů. Podobně také Butkuvienė et al. (2017) neodhalili žádný jednoznačný důkaz časté mezidruhové hybridizace, přesto, že výsledky některých předchozích studií dokazují, že je hybridizace u lakušníků běžná (Zalewska-Gałosz et al., 2015). Jedna z prací nevyloučila ani nepotvrdila výskyt hybridů druhu *R. baudotii* (Lambertini et al., 2017).

Častou hybridizaci odhalil jiný výzkum, který se soustředil mimo jiné na dva druhy lakušníků: *R. trichophyllus* a *R. subrigidus* (Wu et al., 2022a). Také zkoumali, zda souvisí míra hybridizace s překryvem nik rodičovských druhů a jak je ovlivňována okolním prostředím. Výsledky potvrdily překryv nik dvou zmíněných druhů lakušníků. Právě tento překryv byl již dříve shledán optimálním pro existenci hybridních zón (Yakimowski and Rieseberg, 2014). Častá hybridizace mezi druhy *R. trichophyllus* a *R. subrigidus* byla poprvé odhalena ve vysokohorských ekosystémech (Wiegleb et al., 2017). Studie Wu et al. (2022a) potvrdila důležitost hybridizace při speciaci lakušníků a také evoluční důležitost hybridizace pro zachování vodních rostlin ve vysokohorských ekosystémech.

Některé ze studií byly ochranně zaměřené a doporučovaly zavedení opatření pro ochranu zkoumaného druhu (Bradley et al., 2013; Coppi et al., 2015; Koga et al., 2007). Výsledky studie Coppi et al. (2015) poskytly důležité poznatky pro zrealizování těchto opatření. Ověřili, že by měl být při kultivaci lakušníků pro záchranné projekty brán ohled na optimální teplotu specifickou pro druh, protože se tak u kultivovaných rostlin projevila větší genetická diverzita genotypů, než při kultivaci za neoptimálních teplot.

4 Metodika

4.1 Materiál

Vzorky rostlin, které jsem použila pro svůj výzkum, byly sesbírány školitelem této práce a spolupracovníky před začátkem mé bakalářské praxe, jejich sběru jsem se tedy neúčastnila. Postupně byly testovány 3 sady vzorků. Nejprve bylo potřeba na 16 vzorcích různých druhů otestovat, zda probíhá PCR. Takto byly vybrány úspěšné primery pro druhou sadu 8 vzorků, tentokrát už jen dvou druhů: *R. fluitans* a *R. peltatus*, PCR produkty byly následně poslány na fragmentační analýzu. Po vyhodnocení prvního kola fragmentační analýzy byly vybrány vhodné primery, které amplifikovaly cílený lokus, pro kolo druhé, které bylo prováděno na 32 vzorcích, pro posouzení genetické variability obou druhů uvnitř populací a mezi nimi.

16 vzorků, které byly amplifikovány PCR v prvním kroku (viz kapitola PCR, str. 23) patřilo dohromady sedmi druhům lakušníků (*Ranunculus aquatilis*, *R. baudotii*, *R. circinatus*, *R. fluitans*, *R. peltatus*, *R. rionii*, *R. trichophyllus*), byly sesbírány z 16 různých populací (Tabulka 1) a byly mi poskytnuty ve formě celých listů uchovávaných v silikagelu.

Další sada vzorků testovaná v prvním kole PCR s M13 fluorescenčně značeným primerem (viz kapitola PCR s fluorescenčně značeným primerem M13, str. 24) sestávala ze 4 vzorků druhu *R. peltatus* a 4 vzorků druhu *R. fluitans*, které byly opět sesbírány každý z jiné lokality, tedy z 8 populací (Tabulka 2). Tyto vzorky mi byly poskytnuty již ve formě izolátů.

Sada 32 vzorků, kterou jsem testovala v druhém kole PCR s fluorescenčně značeným primerem (viz kapitola PCR s fluorescenčně značeným primerem M13, str. 24), obsahovala 16 vzorků druhu *R. fluitans* z 6 různých populací a 16 vzorků *R. peltatus* ze 4 různých populací (Tabulka 3). Tyto vzorky mi byly poskytnuty z části ve formě izolátů a z části jako listy vysušené silikagelem.

Tabulka 1: Seznam vzorků pro první krok PCR. Čísla v prvním sloupci byla přidělena vzorkům jako pracovní v laboratoři. Druhý sloupec informuje o druhu, ze kterého byl vzorek izolován. Třetí sloupec odpovídá populaci, kde byl vzorek nalezen, popsané místem, kde se nachází, přesné souřadnice najdeme ve čtvrtém sloupci. Ve sloupci Kód populace najdeme kódy podle prací (Prančl et al., 2018) a (Koutecký et al., 2022), které byly každé populaci přiděleny při sběru vzorků, stejně tak čísla rostlin v posledním sloupci Číslo rostliny.

Č. vzorku	Taxon	Populace	Souřadnice	Kód populace	Č. rostliny
816	<i>R. aquatilis</i>	CZ, Blansko, řeka Svitava	49°21'07", 16°38'59"	K18-35	2
817	<i>R. aquatilis</i>	AT, Marchegg, potok	48°16'39", 16°53'44"	K17-15	1
812	<i>R. baudotii</i>	AT, Angern an der March, pískovna	48°22'23", 16°50'18"	K17-11	2
820	<i>R. baudotii</i>	HU, Sarród, pískovna	47°41'03", 16°53'07"	HU-02	1
808	<i>R. circinatus</i>	PL, Sandomierz, slepé rameno řeky	50°41'02", 21°46'46"	K18-10	1
811	<i>R. fluitans 2x</i>	CZ, Senorady, řeka Jihlava	49°05'49", 16°14'46"	K13-27	3
819	<i>R. fluitans 2x</i>	HU, Mescér, řeka Mosoni-Duna	47°47'57", 17°28'25"	HU-01	1
810	<i>R. peltatus</i>	CZ, Nová Včelnice, ryb. Velká Peruť	49°14'33", 15°06'27"	K19-09	1
818	<i>R. peltatus</i>	AT, Rudmanns, rybník	48°35'28", 15°21'52"	K17-30	1
814	<i>R. trichophyllus A</i>	CZ, Lipí, ryb. Haberský Mlýnský	48°57'25", 14°20'39"	K18-43	1
822	<i>R. trichophyllus A</i>	CZ, Krnov–Chomýž, rybník	50°06'29", 17°38'45"	K13-10	3
815	<i>R. trichophyllus B</i>	AT, Goggendorf, řeka Schmida	48°35'53", 15°52'20"	K18-47	1
813	<i>R. trichophyllus s.l.</i>	AT, Göritz, řeka Steyr	47°51'12", 14°11'20"	AT-02	2
821	<i>R. trichophyllus s.l.</i>	AT, Feistritz, potok	46°33'28", 14°45'59"	K18-25	1
809	<i>R. rionii</i>	HU, Szeksárd, pískovna	46°20'12", 18°45'16"	K19-05	1
823	<i>R. trichophyllus B</i>	AT, Marchegg, potok	48°16'39", 16°53'44"	K17-15	1

Tabulka 2: Seznam vzorků pro první kolo PCR s fluorescenčně značeným primerem M13. Význam sloupců odpovídá Tabulce 1.

Č. vzorku	Taxon	Populace	Souřadnice	Kód populace	Č. Rostliny
227	<i>R. fluitans</i> 2x	CZ, Senorady, řeka Jihlava	49°05'49", 16°14'46"	K13-27	3
291	<i>R. fluitans</i> 2x	CZ, Roudné, řeka Malše	48°56'05", 14°29'23"	K15-33	3
325	<i>R. fluitans</i> 2x	AT, Sittendorf, řeka Kamp	48°26'05", 15°42'59"	K17-29	1
475	<i>R. fluitans</i> 3x	CZ, Senožaty, řeka Želivka	49°34'12", 15°14'26"	K14-05	1
286	<i>R. peltatus</i>	CZ, Nová Pec, Lipno	48°48'04", 13°56'50"	K15-28	2
425	<i>R. peltatus</i>	CZ, Třísov, řeka Vltava	48°53'09", 14°21'34"	K13-26	2
780	<i>R. peltatus</i>	CZ, Volary, Volarský potok	48°53'24", 13°53'35"	K12-22	2
784	<i>R. peltatus</i>	CZ, Právičkov, rybník	49°19'35", 15°05'46"	K14-06	2

Tabulka 3: Seznam vzorků pro druhé kolo PCR s fluorescenčně značeným primerem M13. Význam sloupců odpovídá Tabulce 1.

Č. vzorku	Taxon	Populace	Souřadnice	Kód populace	Č. rostliny
910	<i>R. fluitans</i> 2x	AT, Sittendorf, řeka Kamp	48°26'05", 15°42'59"	K17-29	2
911	<i>R. fluitans</i> 2x	AT, Sittendorf, řeka Kamp	48°26'05", 15°42'59"	K17-29	3
440	<i>R. fluitans</i> 3x	CZ, Havraníky, Dyje	48°49'25", 15°58'43"	K10-17	1
912	<i>R. fluitans</i> 3x	CZ, Havraníky, Dyje	48°49'25", 15°58'43"	K10-17	2
913	<i>R. fluitans</i> 3x	CZ, Havraníky, Dyje	48°49'25", 15°58'43"	K10-17	3
916	<i>R. fluitans</i> 3x	CZ, Jaroslavice, Dyje	48°46'08", 16°15'31"	K19-32	1
917	<i>R. fluitans</i> 3x	CZ, Jaroslavice, Dyje	48°46'08", 16°15'31"	K19-32	2
116	<i>R. fluitans</i> 2x	CZ, Jetřichovice	50°50'57", 14°20'51"	K14-44	1

906	<i>R. fluitans</i> 2x	CZ, Jetřichovice	50°50'57", 14°20'51"	K14-44	2
907	<i>R. fluitans</i> 2x	CZ, Jetřichovice	50°50'57", 14°20'51"	K14-44	3
908	<i>R. fluitans</i> 2x	CZ, Roudné, řeka Malše	48°56'05", 14°29'23"	K15-33	1
909	<i>R. fluitans</i> 2x	CZ, Roudné, řeka Malše	48°56'05", 14°29'23"	K15-33	2
532	<i>R. fluitans</i> 2x	CZ, Senorady, řeka Jihlava	49°05'49", 16°14'46"	K13-27	2
811	<i>R. fluitans</i> 2x	CZ, Senorady, řeka Jihlava	49°05'49", 16°14'46"	K13-27	3
914	<i>R. fluitans</i> 3x	CZ, Senožaty, řeka Želivka	49°34'12", 15°14'26"	K14-05	2
915	<i>R. fluitans</i> 3x	CZ, Senožaty, řeka Želivka	49°34'12", 15°14'26"	K14-05	3
157	<i>R. peltatus</i>	CZ, Nová Pec, Lipno	48°48'04", 13°56'50"	K15-28	1
159	<i>R. peltatus</i>	CZ, Nová Pec, Lipno	48°48'04", 13°56'50"	K15-28	3
799	<i>R. peltatus</i>	CZ, Nová Pec, Lipno	48°48'04", 13°56'50"	K15-28	4
918	<i>R. peltatus</i>	CZ, Nová Pec, Lipno	48°48'04", 13°56'50"	K15-28	5
923	<i>R. peltatus</i>	CZ, Pravíkov, rybník	49°19'35", 15°05'46"	K14-06	1
785	<i>R. peltatus</i>	CZ, Pravíkov, rybník	49°19'35", 15°05'46"	K14-06	3
786	<i>R. peltatus</i>	CZ, Pravíkov, rybník	49°19'35", 15°05'46"	K14-06	4
878	<i>R. peltatus</i>	CZ, Pravíkov, rybník	49°19'35", 15°05'46"	K14-06	5
5	<i>R. peltatus</i>	CZ, Třisov, řeka Vltava	48°53'09", 14°21'34"	K13-26	1
782	<i>R. peltatus</i>	CZ, Třisov, řeka Vltava	48°53'09", 14°21'34"	K13-26	3
919	<i>R. peltatus</i>	CZ, Třisov, řeka Vltava	48°53'09", 14°21'34"	K13-26	4
920	<i>R. peltatus</i>	CZ, Třisov, řeka Vltava	48°53'09", 14°21'34"	K13-26	5
477	<i>R. peltatus</i>	CZ, Volary, Volarský potok	48°53'24", 13°53'35"	K12-22	1
921	<i>R. peltatus</i>	CZ, Volary, Volarský potok	48°53'24", 13°53'35"	K12-22	3
922	<i>R. peltatus</i>	CZ, Volary, Volarský potok	48°53'24", 13°53'35"	K12-22	4
781	<i>R. peltatus</i>	CZ, Volary, Volarský potok	48°53'24", 13°53'35"	K12-22	7

4.2 Primery

Primery, které jsem testovala v rámci této bakalářské práce, navrhoval konzultant mé práce Jiří Košnar, vzorky opatřil a izoloval školitel mé práce Petr Koutecký. Postup vyhledávání úseků DNA lakušníků, které obsahují mikrosatelity, a následného navržení primerů odpovídal metodice podle článků Kúr et al. (2014) a Drag et al. (2013).

Pro každý ze 7 vzorků byl vybrán odlišný druh lakušníku, konkrétně byly vybrány druhy: *R. peltatus*, *R. trichophyllus* (cytotypy A a B), *R. fluitans*, *R. aquatilis*, *R. circinatus* a kříženec nalezený v rakouských Alpách podobný *R. trichophyllus*. DNA bylo nejprve potřeba rozštěpit na malé fragmenty pomocí enzymů. Ze směsi těchto fragmentů byly odděleny ty, které z většiny obsahovaly ve své sekvenci mikrosatelit. Tento krok byl proveden za pomoci magnetických kuliček, které na svém povrchu nesly mikrosatelitní sekvence komplementární k cíleným mikrosatelitům.

K takto vytříděným fragmentům DNA byla připojena sekvence jedinečná pro každý ze sedmi vzorků (tzv. „barcode“), která následně umožnila rozpoznat, k jakému druhu patří jaký fragment. Úseky DNA byly smíchány do tzv. obohacené knihovny fragmentů, která byla následně osekvenována firmou SEQme (Doříš, ČR). Pro sekvenaci byla použita metoda tzv. sekvenování nové generace a přístroj PacBio. Bylo takto osekvenováno asi 100 000 fragmentů, které byly následně seřazeny podle druhů za pomoci *barcode* sekvence, která umožnila přiřazení sekvencí odpovídajících stejnému taxonu k sobě. Dále byly sekvence rozřazeny podle podobnosti tak, aby byly sekvence odpovídající jednomu lokusu u sebe, a byly vyhledávány ty lokusy, které obsahovaly mikrosatelit, a pro které se sešlo několik sekvencí, a byla tak větší pravděpodobnost, že byly programem nalezeny a opraveny případné chyby sekvenace.

Tímto způsobem byly získány řádově stovky lokusů pro *R. fluitans* i pro *R. peltatus*, pro každý druh různé. Primery pro amplifikaci DNA v rámci mé bakalářské práce byly navrženy na základě části těchto lokusů, výjimkou byly dva primery, které byly navrženy na základě lokusů druhu *R. trichophyllus* A (Kořenář, 2022). Konkrétně jsem pracovala s 11 lokusy *R. fluitans*, 10 lokusy *R. peltatus* a 2 lokusy *R. trichophyllus* (Tabulka 4).

Tabulka 4: Seznam testovaných primerů. První sloupec odpovídá názvu primeru, kde první písmeno před pomlčkou (F/P/A) odpovídá druhu lakušniku (*R. fluitans*, *R. peltatus* / *R. trichophyllus*, cytotyp A) pro který byl primer vyvinut, AC informuje dvoubázovém o motivu mikrosatelitu a číslo bylo přiřazeno pro rozlišení jednotlivých primerů. V druhém sloupci jsou sekvence forward a reverse primeru, ve třetím teplota, při kterém primer nasedá a v posledním je přibližná délka produktu PCR v bp odečtená na základě prvního kola fragmentační analýzy.

Lokus	Primer		Annealing (°C)	Délka PCR produktu (bp)
F-AC-03	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTAGATAAAGAAATAGTTTTAGAAAGTAGG	48	325-345
	R	AGATCAAAAATAGGGCACA		
F-AC-05	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTGAAGATTTGAAGAGAAGATGAAGAA	48	320
	R	GTGAAATAGAGATGAATAACCTTTTTA		
F-AC-21	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTTGAGTAACAAAACATAGTGATCGTG	48	190
	R	TTTAAATGTGCTATTGCTAAACC		
F-AC-40	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTGTAGACATGTTCTATGACAATAAATAC	48	300
	R	CAACATTCCAAATAACCAACT		
F-AC-42	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTTCCAGCATAAACCTCAAGC	48	390
	R	TTCAGTACCTTTGTGGACATTT		
F-AC-56	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTGCGCCACTAAGGGTTGAAATT	56	250
	R	GGCGTGCTTTAYTTGATTCC		
F-AC-72	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTCAAGTGA AACAGGCTCTCC	50	200
	R	TCCAAAATGGAGAATTGCTG		
F-AC-78	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTGGCTCCTCTTAATCAGTCTCTCTT	56	155-175
	R	GGGTGTGAGGAATTTGGATG		
F-AC-81	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTGAGAAAATATGGCATCATGAAAA	56	235-245
	R	TCCCTGAAAGTCCATACAAAAG		
F-AC-85	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTTGGAGGCACAGATTACACCTT	56	250
	R	ATCGGGTCTCGGTCCATT		
F-AC-91	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTTATTTGGCTGGTCCCTTTGT	56	140-150
	R	ACCCAAAGATCCAATGCAAG		
P-AC-14	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTCTATTTGACAACAACTAAAAAA	48	350
	R	TGTTTTAGTGGA AACCAAA		
P-AC-49	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTTGTTTGGTCTCGTATCTTGGTAA	56	125-140
	R	TGTTCAATACTATCTACTGCATACCG		
P-AC-52	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTGGTAGGTGTTACTTGTGATCC	48	160
	R	TCTGAATAAGTTTGCTCACC		
P-AC-71	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTCCA ACTGGGCTGTGTA AAC	48	230
	R	ACTTGCCA ACTCAGGTCCAG		
P-AC-73	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTAGTCGTGGACGTCTTTCATTA	48	380-405
	R	CAATTCCTCAAATTA ACCAGGA		

P-AC-79	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTAAGCAA AACCCGAACAAAA	50	150-160
	R	CGCTGAGAATTAGCATTCTGT		
P-AC-88	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTTTTGGAGAAAACCGTTCA	54	210
	R	TCCATTGTTTGATTGGCAGA		
P-AC-137	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTTCAGATCCACGAAAAGTGAAT	54	116-140
	R	CGCGACAAAAGCAGAATAAA		
P-AC-159	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTCCTTCGATACGCCTTTGTGT	56	335-345
	R	CAATCTGCTCACCCAAAAC		
P-AC-168	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTGATGTCCGGTAGTGGATTGG	56	170-180
	R	GAGAGAGCAGGCTTGTTCAATA		
A-AC-03	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTGCATCGTACCTTAGAGAACAACA	50	330-345
	R	TTTCTATCACCTCGCAGTCTC		
A-AC-156	Ft	TGTA AACGACGGCCAGTCTACTCCGTATGAACCCAGA	56	275-300
	R	TCAATGCTGGAGAGGTAAAGG		

4.3 Izolace DNA

4.3.1 Metoda CTAB

DNA vzorků pro první krok PCR (Tabulka 1) byla izolována podle návodu (Koutecký & Košnar, 2018) pomocí metody CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Vzorky 808-815 jsem izolovala sama, druhá polovina (816-823) byla izolována Jakubem Kořenářem v rámci bakalářské práce (Kořenář, 2022).

Malé množství suché tkáně rostlin (cca 0,25 cm² plovoucího listu nebo odpovídající množství úkrojků ponořených listů) jsem vložila do každé z 8 mikrozkušavek s rovným víčkem o objemu 1,5 ml, dále jsem přidala dvě kovové kuličky pro rozdrčení tkáně. Zkušavky jsem poté upnula do nástavců mlýnku Retsch 400MM, který byl nastaven na 30Hz a základní dobu homogenizace- 1 minutu. K rozdrčenému materiálu jsem v digestoři přidala do každé z mikrozkušavek 700 µl zásobního roztoku CTAB a 10 µl 2-merkapt ethanolu. Poté jsem zkušavky zavřela, promíchala proklepáním a 30 minut nechala inkubovat na třepačce při 50 °C.

Po inkubaci jsem vzorky krátce stočila ve stolní centrifuze (2-3 s) a přenesla bez kovových kuliček do nových 1,5 ml mikrozkušavek, které jsem označila fixem před tímto krokem. Kuličky jsem vyklepala do Petriho misky, propláchnula vodou a osušila buničinou, aby ve vodě nedošlo ke korozi. Do všech nových mikrozkušavek jsem následně v digestoři

přidala 500 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1. Po přidání směsi jsem zkumavky uzavřela, několikrát převrátila, aby se roztok promíchal, a ponechala 5 minut odstát.

Následovalo vložení vzorků do centrifugy na 10 min při 10 000 rpm. Po centrifugaci jsem horní vodnou fázi s obsahem DNA (cca 500 µl) opět šetrně přepipetovala v digestoři do nových 1,5 mikrozkuvek, které jsem před tímto krokem opět označila fixem. Použité špičky i mikrozkuvky jsem vyhodila do speciální nádoby na nebezpečný odpad, odpadní fázi s chloroformem jsem také slila do příslušné lahve na nebezpečný odpad.

Z mrazáku jsem k roztoku přidala vychlazený isopropanol, zkumavky jsem poté převrátila pro zamíchání a ponechala 30 minut v mrazáku při -20°C. Následně jsem je vložila na 5 minut do centrifugy nastavené na 13 000 rpm. Po centrifugaci jsem supernatant pipetou v digestoři odstranila do kádinky na odpad, na dně zkumavek zůstal pelet DNA, ke kterému jsem následně přidáno 400 µl vychlazeného 96% etanolu, směs jsem promíchala ručním proklepnutím a nechala inkubovat 15 minut v termobloku při teplotě 37°C.

Po inkubaci následovala opět centrifugace při 13 000 rpm. Po 5 minutách centrifugace jsem supernatant opatrně odpipetovala do odpadní kádinky. K peletu, který zbyl ve zkumavkách, jsem přidala z mrazáku 200 µl vychlazeného 70% etanolu, obsah zkumavky jsem opět promíchala poklepnutím, ponechala 5 minut stát při pokojové teplotě a následně jsem zkumavky vložila do centrifugy na 5 min při 13 000 rpm. Supernatant jsem odpipetovala do kádinky a zkumavky ponechala přibližně 15 minut sušit při pokojové teplotě.

Ve chvíli, kdy byly zkumavky suché bez kapek etanolu, jsem přidala k vysušenému peletu 50 µl sterilní vody. Vzorky jsem ponechala přes noc v ledničce, aby se DNA úplně rozpustila, pro dlouhodobé uchování jsem později vzorky přesunula do mrazáku.

4.3.2 Metoda NaOH

Pro druhé kolo PCR s fluorescenčně značeným primerem M13 bylo také potřeba některé z 32 vzorků izolovat (některé byly již izolovány před začátkem mé práce). Izolaci jsem prováděla podle návodu (Koutecký & Košnar, 2018) tentokrát pomocí metody NaOH (Werner et al., 2002). Konkrétně jsem izolovala vzorky s čísly 906-922.

Pro izolaci DNA jsem z vysušeného rostlinného materiálu odebrala a vložila do každé 1.5ml mikrozkuvky cca 0.5 cm² velký kousek tkáně. Ke tkáni jsem přidala 20 µl 0,5M

NaOH a následně tkáň rozdrtila pomocí sterilního písku a homogénizátorku, který jsem předtím obalila v písku. Poté jsem zkumavky vložila na 2 minuty do centrifugy při 13 000 rpm. Do všech zkumavek PCR stripu jsem připravila 20 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 8,3), izoláty jsem ředila v poměru 1:10 (supernatant:pufr), k pufru jsem tedy přidala 2 μ l supernatantu. Výsledné izoláty byly dlouhodobě skladovány v mrazáku.

4.4 PCR

Polymerázovou řetězovou reakcí jsem amplifikovala pomocí primerů 21 lokusů u prvních 16 vzorků různých druhů lakušníků (Tabulka 1), úspěšnost amplifikace jsem následně kontrolovala pomocí gelové elektroforézy, přítomnost mikrosatelitu v amplifikované sekvenci jsem následně ověřila u některých vzorků pomocí sekvenční analýzy.

Nejprve jsem si připravila zkumavky, které jsem fixem označila čísly vzorků, datem a kódem příslušného použitého primeru, mezitím jsem nechala všechny potřebné reagenty- PCR vodu, forward primer, reverse primer a Plain PP Master Mix (výrobce Top-Bio) v pokojové teplotě rozmraznout. Poté, co všechny složky roztály, jsem je promíchala ručním poklepáním a krátce stočila v centrifuze. Následně jsem vše vložila do zamrazeného stojánku na Zkumavky z mrazáku, tam jsem vše ponechala do konce pipetování.

Jednotlivé složky jsem pipetovala do sterilní zkumavky v pořadí: voda, primery a Plain PP Master Mix. Množství jsem přepočítávala podle počtu vzorků. K objemu příslušného počtu vzorků jsem přičetla také objem negativní kontroly a objem pro rezervu v případě chyby pipetování, oba tyto objemy odpovídaly každý objemu jednoho vzorku. Množství složek na jeden vzorek je uvedeno v Tabulce 5. Objem reakce byl 5,5 μ l, z toho 0,5 μ l byl objem roztoku DNA.

Tabulka 5: objemy složek PCR směsi pro 1 vzorek

reagencie	objem (μ l)	finální molární koncentrace
voda	1,59	
primer F	0,33	0,3 μ M
primer R	0,33	0,3 μ M
PP Master Mix	2,75	

Po napipetování všech složek PCR jsem směs promíchala proklepáním a krátce stočila na stolní centrifuze a následně rozpipetovala po 5 μ l do nových zkumavek, zbytek mixu jsem

ponechala v původní zkumavce a použila jako negativní kontrolu. Do všech mikrozkuhavek s PCR směsí kromě negativní kontroly jsem přidala 0,5 µl DNA. Vše jsem opět promíchala, stočila v centrifuze. Spustila jsem teplotní program termocyklieru a když dosáhla teplota bloku termocyklieru 70°C, vložila jsem vzorky do přístroje. Teplotní program termocyklieru ve všech případech sestával z šesti fází (Tabulka 6). Třetí fáze se jediná lišila pro jednotlivé primery použité při míchání směsi, podle specifické teploty, při které nasedají na DNA (Tabulka 4). Druhá až čtvrtá fáze se opakovaly ve 40 cyklech.

Tabulka 6: Teplotní program termocyklieru pro PCR.

	Fáze	Doba trvání	Teplota bloku (°C)	Počet opakování
1.	počáteční denaturace DNA	5 minut	94	1
2.	cyklová denaturace	30 vteřin	94	40
3.	annealing primerů	30 vteřin	48/50/54/56	40
4.	cyklová elongace	45 vteřin	72	40
5.	finální elongace	10 minut	72	1
6.	chlazení		15	1

4.5 PCR s fluorescenčně značeným primerem M13

PCR se značeným primerem M13 jsem prováděla ve dvou různých krocích pro dvě různé sady vzorků. V obou případech byly vzorky po zkontrolování produktů PCR pomocí elektroforézy poslány na fragmentační analýzu. Prvním krokem bylo testování lokusů pro 4 vzorky *R. fluitans* a 4 vzorky *R. peltatus* (Tabulka 2), na základě kterého byly vybrány primery vhodné pro druhý krok- testování primerů pro 16 vzorků *R. fluitans* a 16 vzorků *R. peltatus* (Tabulka 3).

Princip míchání i pipetování směsi byl stejný, jako u PCR (viz str. 23), ale obsahovala o jednu složku navíc – fluorescenčně značený primer M13. Dále jsem místo PP Master mixu jsem používala Plain Combi PP Master mix a místo obyčejného forward primeru byl používán „tailed“ forward primer, který umožňuje nasedání M13 značeného primeru, má totiž připojenou k němu univerzální komplementární sekvenci („tail“). Po spotřebování tohoto forward primeru v prvních cyklech PCR nasedají v následujících cyklech na DNA s forward primerem M13 primery (metoda podle: Schuelke, 2000).

Objemy jednotlivých reagentů pro jeden vzorek se také lišily, to ukazuje Tabulka 7. M13 primer mohl být značený jednou ze 4 fluorescenčních barev kompatibilních se sekvenátory firmy Applied Biosystems, které byly použity pro fragmentační analýzu: 6-FAM („modrá“), VIC („zelená“), NED („žlutá“), PET („červená“). Posledním rozdílem byl program

termocyklieru, ten se skládal tentokrát z 9 fází (Tabulka 8). Třetí fáze byla opět specifická pro každý primer podle teploty nasedání (Tabulka 4). Fáze 2-4 se opakovaly ve 33 cyklech, fáze 5-7 v 11 cyklech.

Tabulka 7: objemy složek směsi pro PCR se značeným primerem M13 pro jeden vzorek.

reagencie	objem (μ l)	finální molární koncentrace
voda	1,18	
M13 primer	0,66	0,3 μ M
primer F (tailed)	0,08	0,075 μ M
primer R	0,33	0,3 μ M
Plain Combi PP Master Mix	3,75	

Tabulka 8: Teplotní program termocyklieru pro PCR s M13 primerem.

	Fáze	Doba trvání	Teplota bloku ($^{\circ}$ C)	Počet opakování
1.	počáteční denaturace	3 minuty	94	1
2.	cyklová denaturace	30 vteřin	94	33
3.	annealing primerů	30 vteřin	48/50/54/56	33
4.	cyklová elongace	1 minuta	72	33
5.	cyklová denaturace 2	30 vteřin	94	11
6.	annealing primerů M13	30 vteřin	46	11
7.	cyklová elongace 2	1 minuta	72	11
8.	finální elongace	10 minut	72	1
9.	chlazení		15	1

4.6 Gelová elektroforéza

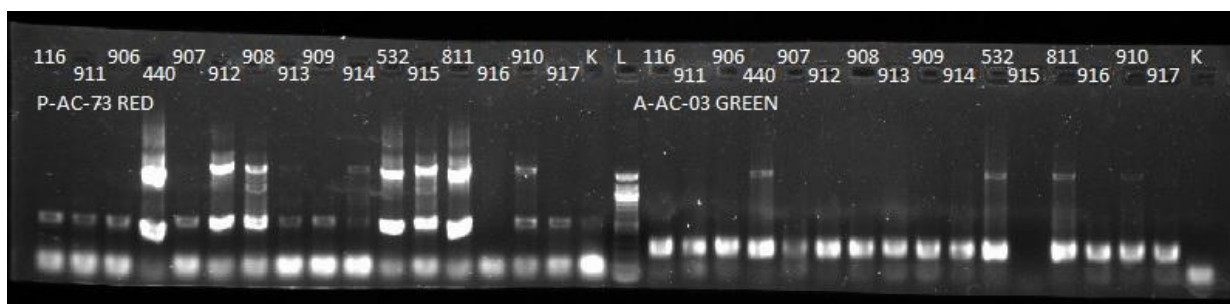
Výsledky PCR jsem vyhodnotila pomocí gelové elektroforézy. Produkty PCR jsem nechala rozmrazit, promíchala jsem je proklepnutím, stočila v centrifuze. Do mikrotitrační destičky, vložené do předem připravené vaničky s ledovou drtí, jsem rozpipetovala po 0,5 μ l modrý nanášecí pufr s barvivem GelRed pro plánovaný počet vzorků včetně negativní kontroly. Do všech jamek s pufrům jsem následně napipetovala 1,5 μ l PCR produktu.

Výslednou směs jsem z jamek mikrotitrační destičky přepipetovala do jamek agarózového gelu. Gel je umístěn ve vaně uzavřené víkem s přívodními kabely, které ji připojují ke zdroji energie. K tomu jsem nanesla do vedlejší jamky 100 bp ladder (6 μ l). Po

nanesení vzorků jsem přiklopila víko a spustila elektroforézu. Jakmile se pruh barvy, která prostupuje gelem rychleji, než PCR produkt, dostal skoro ke konci gelu, vypnula jsem elektrický proud, sundala víko, vyjmula potřebnou část gelu a přesunula ho do komory UV transluminátoru. Na počítači s ním propojeném jsem si poté gel mohla prohlédnout a uložit díky softwaru Scion VisiCapture a dokumentačnímu systému Gel Imager. Fotografování DNA umožnilo její fluorescenční značení a osvětlení gelu UV světlem. Příklad takového obrázku gelu můžeme vidět na Obrázku 3.

Výsledek gelové elektroforézy mi umožnil ověřit přítomnost PCR produktu, kontaminace či nesespecifických produktů. PCR produkt je přítomný, pokud je na gelu viditelný světlý proužek DNA s délkou přibližně odpovídající délce lokusu. Proužek může být různě výrazný, záleží na množství amplifikované DNA. Délku DNA, která se na gelu ukazuje v podobě proužku, jsem odhadovala pomocí 100 bp ladderu, který obsahuje fragmenty DNA o známé délce po 100bp. Proužky DNA o jiných délkách, než je délka lokusu, znamenají přítomnost nežádoucích fragmentů DNA neboli nesespecifických produktů PCR. Proužky v kontrole, která by DNA neměla obsahovat, znamenají kontaminaci.

Na Obrázku 3 můžeme vidět 32 vzorků, popsaných čísly v horní části obrázku, které jsou na gelu rozděleny na 2 sady, za každou z nich je negativní kontrola, označena písmenem K, uprostřed je ladder, označený písmenem L. V první sadě byl amplifikován lokus P-AC-73, druhá sada obsahovala amplifikaci lokusu A-AC-03. U první sady vidíme u šesti vzorků, kde se podařilo namnožit větší množství DNA, jasné proužky. Zbytek proužků je slabý, vzorky tedy obsahovaly méně DNA, u vzorku 916 DNA chyběla úplně. Zejména u vzorků s jasnými proužky vidíme další proužek nebo dva, které neodpovídají délce lokusu (jsou delší), jedná se o nesespecifický produkt PCR. V kontrole je slabý proužek kontaminace. Druhá sada měla kontrolní vzorek čistý, kromě vzorku 915 se amplifikace DNA zdařila, opět jsou u některých vzorků přítomné proužky nesespecifických produktů.



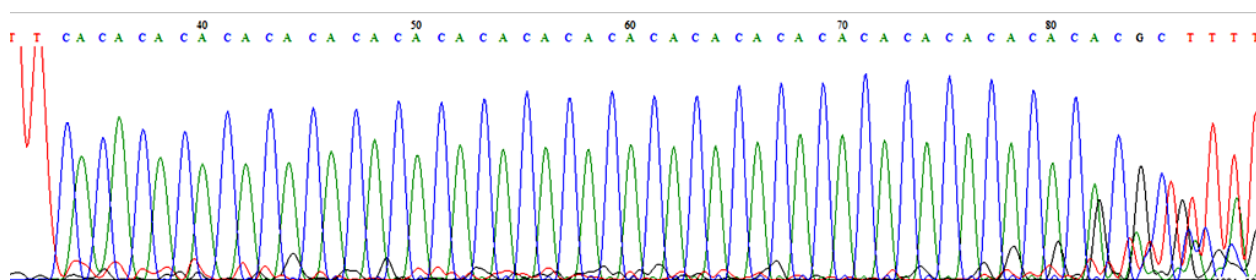
Obrázek 3: Gelová elektroforéza PCR produktů.

4.7 Sekvenční analýza

Pro ověření přítomnosti mikrosatelitu (Obrázek 4) ve fragmentech DNA PCR produktů byly vybrané vzorky poslány na sekvenační analýzu firmě Eurofins Genomics, Německo. Protože metoda sekvenční analýzy umožňuje zjištění pořadí jednotlivých bazí nukleotidů DNA, mohla jsem kromě potvrzení výskytu mikrosatelitu také spočítat, kolik opakování AC motivu se v mikrosatelitu nachází. Celkově bylo osekvenováno 22 vzorků.

Vzorky na sekvenaci jsem připravila smícháním 3,5 µl vody, 1 µl PCR produktu a 0,5 µl Exo-SAP pro každý vzorek. Exo-SAP kombinuje 2 enzymy- exonukleázu 1, která štěpí jednovláknovou DNA a tak likviduje zbylé primery a AP (Fast Alkaline Phosphatase), která odstraňuje nevyužitá nukleotidy. Vzorky s výslednou směsí jsem promíchala, krátce stočila v centrifuze a vložila do termocyklieru, na kterém jsem předtím zapnula příslušný program.

Tento program sestával ze tří fází. První z nich udržovala vzorky po dobu 15 minut v teplotě 37°C, která zajišťuje aktivitu obsažených enzymů. Druhá fáze zvýšila teplotu na 85°C také na 15 minut pro inaktivaci enzymů a ve třetí fázi se blok ochladil na 15°C. Takto přečištěné vzorky od zbylých nepotřebných přísad PCR jsem následně napipetovala do 1,5ml zkumavek, a přidala jsem ke každému 5 µl forward-tailed primeru. Zkumavky jsem následně polepila čárovými kódy a odeslala firmě Eurofins Genomics, Německo.



Obrázek 4: Mikrosatelitní sekvence s 26 opakováními motivu CA u vzorku číslo 820 po amplifikaci lokusu P-AC-14.

4.8 Fragmentační analýza

Pomocí fragmentační analýzy, která umožňuje zjištění přesné délky amplifikovaného PCR produktu, jsem vyhodnocovala zejména, zda se ve vybraných lokusech objevuje jedna či více alel, tedy zda studované lokusy vykazovaly polymorfismus.

Firmě SEQme s.r.o., Česká republika jsem zaslala vybrané vzorky ve dvou sadách. První sada vzorků sestávala z PCR produktů celkem 16 lokusů testovaných na 8 vzorcích (4 vzorky pro *R. peltatus* a 4 vzorky pro *R. fluitans*), některé pouze na 4 vzorcích jednoho druhu. Výsledky fragmentační analýzy této sady vzorků mi umožnily porovnat, zda jsou výsledky interpretovatelné a případně jestli se liší výskyt alel stejných lokusů mezi 4 odlišnými populacemi jednoho druhu (každý vzorek pocházel z jiné populace, viz Tabulka 2)

Na základě výsledků tohoto prvního kola fragmentační analýzy bylo pro druhé kolo vybráno 8 lokusů pro *R. fluitans* a 8 lokusů pro *R. peltatus*, z toho šest bylo společných pro oba. Druhé kolo bylo prováděno na 16 vzorcích *R. fluitans* a 16 vzorcích *R. peltatus*, z neznámých technických důvodů se nezdařilo a nepřineslo žádné výsledky.

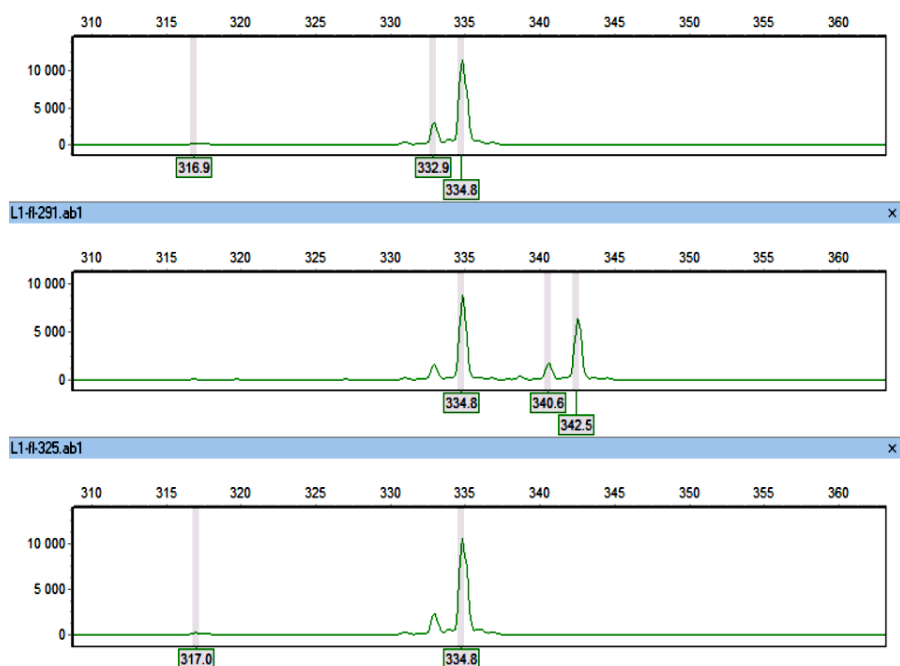
5 Výsledky

Z 21 lokusů (Tabulka 4), které byly testovány pomocí PCR na první sadě 16 vzorků různých druhů lakušníků (Tabulka 1), bylo po tomto prvním kroku vyřazeno 7 lokusů, které amplifikovaly kromě cílených lokusů nespecifické produkty nebo se DNA nedařilo amplifikovat vůbec, případně v amplifikované sekvenci po kontrole PCR produktů pomocí sekvenční analýzy chyběl mikrosatelit. Konkrétně byly z dalšího výzkumu vyřazeny 4 primery navržené na základě lokusů *R. fluitans* a 3 primery navržené pro *R. peltatus*.

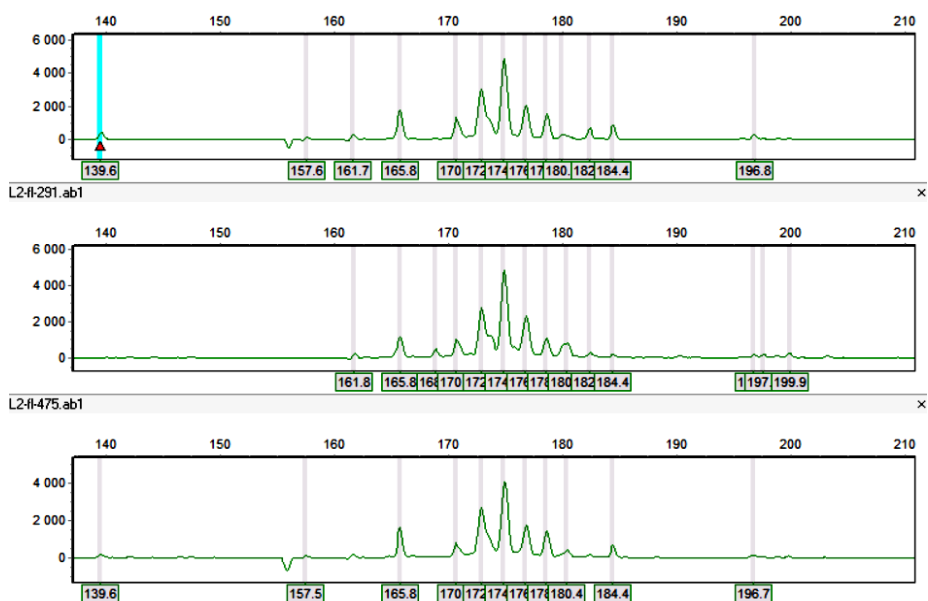
Zbýlých 14 lokusů jsem amplifikovala PCR s M13 fluorescenčně značeným primerem na čtyřech vzorcích pro každý z druhů *R. fluitans* a *R. peltatus* (Tabulka 2). Navíc byly přidány dva lokusy, které byly navrženy pro *R. trichophyllus* A (Tabulka 4), které testoval kolega J. Kořenář (2022) a které dobře amplifikovaly i *R. fluitans* a *R. peltatus*. Produkty této PCR byly po ověření amplifikace gelovou elektroforézou poslány na fragmentační analýzu. Na základě výsledků tohoto prvního kola fragmentační analýzy bylo vybráno pro další kolo fragmentační analýzy celkem 8 lokusů pro *R. fluitans* a 8 lokusů pro *R. peltatus*, z toho 6 společných pro oba (Tabulka 9). Vybrány byly takové lokusy, jejichž alely byly jednoznačně interpretovatelné (Obrázek 5), tedy byly ve výsledcích fragmentační analýzy přítomné u všech nebo většiny testovaných vzorků a zobrazené jako jednotlivé píky dostatečné intenzity (případně s výskytem dalších píků jednoznačně identifikovatelných jako „stutter peaks“, které vznikají v důsledku chyb DNA polymerázy, kdy je délka PCR produktu zkrácena nebo prodloužena o jedno nebo několik opakování mikrosatelitního motivu). Naopak pro další analýzu nebyly vybrány lokusy,

kteře produkovaly více píků blízko u sebe (Obrázek 6), takže nebylo možné určit jednotlivé alely, lokusy s větším počtem nespécifických produktů (jiného tvaru a mimo očekávané rozmezí délek), nebo lokusy, u kterých lze předpokládat mutace v okolních („flanking“) sekvencích. Tyto mutace se pak projevují tak, že velikosti jednotlivých „alel“ neodpovídají délce repeticity mikrosatelitního motivu (v mém případě vždy 2 bp) či jejím násobkům (Obrázek 7).

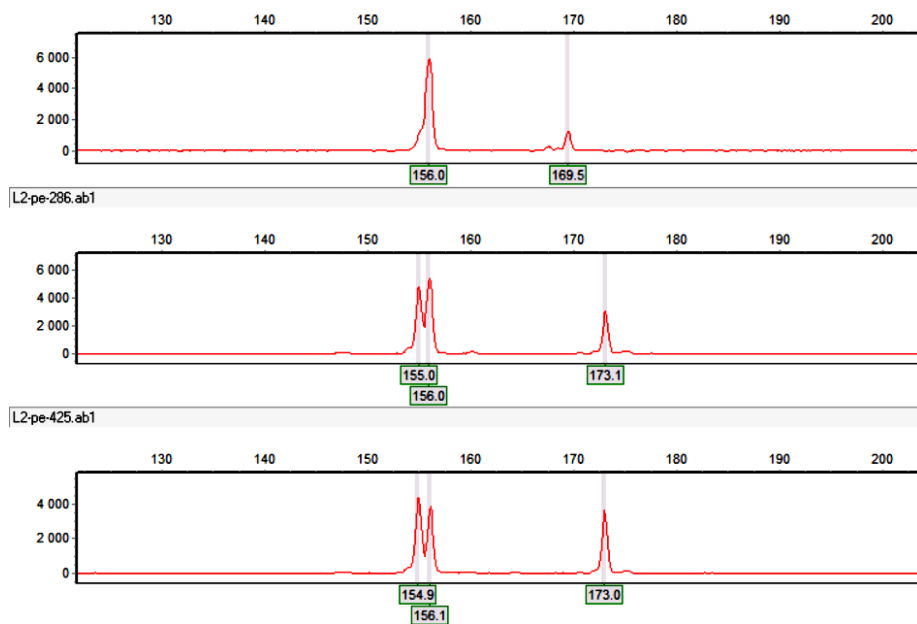
Pro vybraných 8 lokusů pro *R. fluitans* a 8 lokusů pro *R. peltatus* byla provedena opět PCR s fluorescenčně značeným primerem M13 na 16 a 16 vzorcích (Tabulka 3), jejíž produkty byly po ověření úspěšné amplifikace pomocí gelové elektroforézy následně poslány na druhé kolo fragmentační analýzy, které se ale z nejasných důvodů nezdařilo a tedy nepřineslo žádné výsledky. Těchto 8 lokusů pro *R. fluitans* a 8 lokusů pro *R. peltatus* by tedy bylo potřeba znovu otestovat, a v případě dobře interpretovatelných výsledků dále testovat na větší sadě vzorků jedinců jedné populace příslušného druhu pro získání informací o vnitropopulační variabilitě lokusů. Tyto informace jsou klíčové pro následný výzkum populační genetiky těchto dvou druhů.



Obrázek 5: Jednoznačně interpretovatelný výsledek fragmentační analýzy u třech vzorků. U prvního a třetího vzorku můžeme vidět jedince homozygotní pro alelu o délce 335 bp, druhý vzorek je pro zkoumaný lokus heterozygotní s alelami o délce 335 bp a 343 bp. U všech alel je také viditelný jeden „stutter peak“ o 2 bp kratší.



Obrázek 6: Výsledek fragmentační analýzy u třech vzorků, který nebylo možné interpretovat kvůli velkému množství píků blízko u sebe.



Obrázek 7: Výsledek fragmentační analýzy u třech vzorků, který nebylo možné interpretovat kvůli předpokládané mutaci v okolní („flanking“) sekvenci. Alely druhého a třetího vzorku mají délku 155 a 156 bp a liší se tak pouze o 1 bp, což neodpovídá délce repetyce (2 bp).

Tabulka 9: Souhrn výsledků PCR a dvou kol fragmentační analýzy (Frag.1 a Frag. 2) pro oba druhy: *R. fluitans* a *R. peltatus*. Políčka označená „ok“ znamenají, že krok proběhl úspěšně, „nespec.“ označuje přítomnost nespecifických produktů po vyhodnocení PCR pomocí elektroforézy, „krátký“ označuje lokusy, kde proběhla PCR, ale kontrolní sekvence ukázaly, že mikrosatelitní motiv chybí, nebo je krátký (< 6 repetice), a tedy nejspíše nebude pro daný druh variabilní, „nečit.“ znamená nečitelný výsledek fragmentační analýzy a přeškrtnutá políčka znamenají, že krok nebyl pro daný lokus proveden (vzhledem k absenci amplifikace nebo neinterpretovatelnosti výsledků v předešlých krocích). 2. kolo fragmentační analýzy je označeno otazníky u nadějných lokusů, pro které se pokus z technických důvodů nepovedl.

Lokus	PCR		Frag. 1		Frag. 2	
	<i>R. fluitans</i>	<i>R. peltatus</i>	<i>R. fluitans</i>	<i>R. peltatus</i>	<i>R. fluitans</i>	<i>R. peltatus</i>
A-AC-03	ok	ok	ok	ok	?	?
A-AC-156	ok	ok	nespec.	ok	/	?
F-AC-03	nespec.	nespec.	/	/	/	/
F-AC-05	ok	ok	nečit.	nečit.	/	/
F-AC-21	ok	ok	nečit.	nečit.	/	/
F-AC-40	nespec.	nespec.	/	/	/	/
F-AC-42	krátký	krátký	/	/	/	/
F-AC-56	ok	ok	ok	ok	?	?
F-AC-72	ok	ok	ok	nečit.	?	/
F-AC-78	ok	ok	ok	ok	?	?
F-AC-81	ok	ok	ok	nečit.	?	/
F-AC-85	krátký	krátký	/	/	/	/
F-AC-91	ok	ok	nespec.	ok	/	/
P-AC-14	ok	ok	nespec.	nespec.	/	/
P-AC-49	ok	ok	ok	ok	/	?
P-AC-52	nespec.	nespec.	/	/	/	/
P-AC-71	krátký	krátký	/	/	/	/
P-AC-73	ok	ok	ok	ok	?	?
P-AC-79	ok	ok	ok	ok	?	?
P-AC-88	nespec.	nespec.	/	/	/	/
P-AC-137	ok	ok	ok	ok	/	/
P-AC-159	ok	ok	nespec.	nespec.	/	/
P-AC-168	ok	ok	ok	ok	?	?

6 Diskuse

6.1 Fragmentační analýza

Jak bylo zmíněno již v kapitole Výsledky, druhé kolo fragmentační analýzy, které mělo poskytnout informace zejména o variabilitě lokusů uvnitř jednotlivých populací dvou zkoumaných druhů, se z neznámých technických důvodů nezdařilo. V úvahu připadá několik možných příčin. Mohlo dojít k degradaci DNA ve vzorcích, které byly několik měsíců v mrazáku, to je ale nepravděpodobné, protože všechny vzorky byly testovány dvakrát a kontrolní gely po proběhnutí PCR vypadaly v pořádku. Chyba se mohla stát také při míchání vzorků pro fragmentační analýzu, což je ale také nepravděpodobné, jde o jednoduchý krok (smíchání stejného objemu od všech vzorků). Mohlo dojít k degradaci fluorescenčního značení M13 primerů, které byly používány po celou dobu pokusu, jako následek jejich vystavení světlu (přestože zkumavky s primery byly chráněny alobalem a byly rozmrazeny a vystaveny světlu co nejkratší dobu). To by znemožnilo fragmentační analýzu PCR produktů, která se skutečně v drtivé většině vzorků nepovedla, navzdory tomu, že při kontrole úspěšné amplifikace lokusů pomocí gelové elektroforézy byla DNA ve vzorcích přítomna. Tento krok by bylo potřeba provést znovu, a v případě dobře interpretovatelných výsledků testovat vybrané lokusy na větší sadě vzorků jedinců jedné populace příslušného druhu pro získání informací o jejich vnitropopulační variabilitě, o které z výsledků mé práce nemohu nic vyvozovat.

6.2 Srovnání mé práce s vývojem mikrosatelitů u jiných druhů lakušníků

Z původních 23 lokusů, pro které byla DNA úspěšně amplifikována při PCR, bylo první kolo fragmentační analýzy úspěšné pro 8 lokusů u druhu *R. fluitans* a 8 lokusů u druhu *R. peltatus*, z toho 6 bylo společných. V bakalářské práci Jakuba Kořenáře bylo takto vybráno z celkového počtu 31 testovaných lokusů po prvním kole fragmentační analýzy pro kolo druhé 14 lokusů pro každý z cytotypů druhu *R. trichophyllus* a společných bylo pouze 7 z nich. Poměr společných lokusů pro oba cytotypy (v mém případě druhy) ku celkovému počtu lokusů, které byly vybrány pro druhé kolo fragmentační analýzy, byl tedy výrazně nižší v případě cytotypů *R. trichophyllus*. Jakub Kořenář (2022) ve své práci tento nízký počet společných lokusů vysvětluje tím, že jsou si cytotypy příbuzné pouze vzdáleně, jak je naznačeno v nedávném výzkumu evropských druhů lakušníků (Koutecký et al., 2022). Vyšší počet společných lokusů pro mé dva zkoumané druhy by mohl naznačovat, že by si druhy *R. fluitans* a *R. peltatus* mohly

být geneticky relativně blízké, ve studii evropských lakušníků (Koutecký et al., 2022) založené na třech úsecích DNA vychází všechny čtyři zmíněné taxony (*R. fluitans*, *R. peltatus*, a oba cytotypy *R. trichophyllus*) dobře geneticky oddělené a vztahy mezi nimi nejsou zcela jasné, podle jaderného úseku ITS ale *R. fluitans* a *R. peltatus* opravdu patří do jedné linie.

Při prvním testování 16 vzorků různých druhů lakušníků SSR primery vyvinuté na druhy *R. fluitans* a *R. peltatus* amplifikovaly příslušné lokusy úspěšně u jiných druhů. Na základě těchto výsledků převzal pro svůj výzkum některé z těchto primerů J. Kořenář (2022) a otestoval je na vzorcích druhu *R. trichophyllus* (cytotypy A a B). Nalezl jeden lokus navržený pro *R. fluitans*, který byl vhodný pro výzkum cytotypu A a jeden lokus navržený pro *R. peltatus*, který byl zase vhodný pro výzkum cytotypu B. Naopak lokusy navržené na druh *R. trichophyllus* v případě některých lokusů úspěšně amplifikovaly i u vzorků druhů *R. fluitans* a *R. peltatus*, proto byly vybrány v mé práci pro fragmentační analýzu dva lokusy navržené na *R. trichophyllus* (cytotyp A), jeden z nich byl vhodný pro oba druhy, druhý pouze pro *R. peltatus*. V rámci jiné bakalářské práce bylo prokázáno (Gemeinhardt, 2019), že lokusy nejsou dobře přenositelné mezi různými druhy lakušníků. Gemeinhardt (2019) však testovala primery vyvinuté pro asijský druh *R. bungei* na evropské druhy. Možnost přenositelnosti primerů mezi různými druhy lakušníků potvrzená v mé práci a práci J. Kořenáře by tedy mohla souviset s tím, že všechny primery byly navrženy na základě evropských druhů a všechny námi testované druhy byly evropské, a byly si tak blíže příbuzné. Markery, které testovala v rámci své bakalářské práce Gemeinhardt (2019), byly vyvinuty Wu et al. (2017) pro studium vlivu ekologických faktorů na tok genů druhu *R. bungei* a pro zkoumání jeho prostorově-genetické struktury. V citované studii vyvinuli 22 těchto primerů, pomocí kterých amplifikovali vzorky *R. bungei* i vzorky příbuzných zástupců čeledi *Ranunculaceae* (dvou druhů lakušníků: *R. aquatilis* L. var. *eradicatus* a *R. trichophyllus* a šesti dalších druhů: *R. cheirophyllus*, *R. natans*, *Halerpestes tricuspis*, *H. ruthenica*, *Caltha palustris*, *C. natans*). Všechny lokusy byly úspěšně amplifikovány u všech 3 druhů lakušníků a 4 z nich u všech 8 zkoumaných druhů. Na rozdíl od lokusů testovaných v mé práci a práci J. Kořenáře, u kterých neznáme přesné umístění v genomu, ale pravděpodobně budou součástí nekódujících sekvencí, byly markery navržené Wu et al. (2017) odvozeny z transkriptomu, tedy kódujících sekvencí. Nevýhodou tohoto přístupu je, že mikrosatelity v kódujících oblastech bývají méně variabilní (mají méně opakování konkrétního motivu). Naopak výhodou tohoto postupu je, že okolní sekvence, tedy geny, bývají konzervativnější, a proto si mohou být sekvence podobné i mezi některými příbuznými druhy či rody rostlin, a tedy markery mohou být mezi nimi přenositelné.

6.3 Srovnání lakušníků s jinými vodními rostlinami

Dalo by se předpokládat, že kdyby se druhý krok fragmentační analýzy povedl, genetická variabilita uvnitř populací druhů *R. fluitans* a *R. peltatus* by byla nízká, protože k tomuto výsledku dospěla většina prací, které se tématem genetické variability populací různých druhů lakušníků zabývají (viz Shrnutí), včetně bakalářské práce J. Kořenáře (2022), který testoval primery vyvíjené na dva cytotypy *Ranunculus trichophyllus* s pracovním označením A a B. Jakub Kořenář přisuzoval nízkou vnitropopulační variabilitu druhu *Ranunculus trichophyllus* rozmnožování pomocí fragmentů lodyh, které by mohlo hrát roli i v případě mnou testovaných druhů, a také samoopylení, jelikož *R. trichophyllus* má malé nenápadné květy, a tento způsob rozmnožování je u něj častý. Mnou testované druhy mají květy velké a dají se tak u nich očekávat jiné strategie rozmnožování, jako například přenos pylu opylovači (Prančl et al., 2018). Díky tomuto rozdílu by tedy mohla být genetická variabilita populací druhů *R. fluitans* a *R. peltatus* vyšší, než u *R. trichophyllus*, ale na toto téma by bylo potřeba provést navazující práci.

Populace různých druhů lakušníků tedy obvykle vykazují nízké hodnoty genetické variability, to je nejčastěji vysvětlováno převahou autogamie nad alogamií, klonálním šířením či různými evolučními faktory. U vodních rostlin je toto poměrně obvyklým jevem. I když to není pravidlo, u většiny z nich bychom se mohli setkat s nízkou genetickou variabilitou uvnitř a častým klonálním šířením, jak ukazují následující studie různých druhů vodních rostlin.

Ani co se týče převahy autogamie v pohlavním rozmnožování nejsou lakušníky mezi vodními rostlinami výjimkou. Kaplan & Štěpánek (2003) zkoumali genetickou variabilitu populací druhů *Potamogeton pusillus* a *P. bertholdii* a jak se rozmnožují ve střední Evropě a odhalili, že u nich autogamie také převažovala. Kromě toho měly populace obou druhů rdestu velmi nízké hodnoty genetické variability, některé byly dokonce geneticky uniformní, to však mohlo být do jisté míry způsobeno tím, že byly analyzovány izozymy, kde obvykle bývá méně alel, než při analýze mikrosatelitů. Déle objevili vysokou genetickou odlišnost mezi populacemi.

V jiné, ochrannářsky zaměřené, studii (Hardion et al., 2021) zkoumali populační genetiku oligotrofního druhu *Potamogeton coloratus*, který vyžaduje člověkem nenarušená a neznečištěná stanoviště, ve východní Francii. Odhalili velmi nízkou úroveň genetické diverzity všech zkoumaných populací a relativně nízkou genetickou variabilitu mezi populacemi zkoumaného druhu i přes to, že populace byly navzájem geneticky odlišné.

Důležitou roli klonálního šíření vodních rostlin zejména při invazivním šíření prokázali Mukherjee et al. (2016), kteří zkoumali genetickou variabilitu původních i zavlečených populací invazivního druhu *Hygrophila polysperma* pomocí mikrosatelitů a chloroplastové DNA, s cílem porozumět historii invaze této rostliny na jihu USA a pomoci při její kontrole. Invazivní populace tohoto druhu byly všechny téměř identické a pocházely pravděpodobně z jedné klonální linie. Oproti tomu původní genotypy vykazovaly poměrně vysokou genetickou variabilitu. Podobný výzkum se zabýval jiným invazivním druhem- *Nymphaea mexicana* (Reid et al., 2021) s cílem poskytnout informace pro zavedení biologické kontroly tohoto druhu, který se šíří v Jižní Africe. Obecně se rod stulík často množí klonálně pomocí úlomků rhizomů, které jsou unášeny vodou na nová místa. Opět se věnovali genetické variabilitě původních populací a populací zavedených mimo místo původního výskytu. Tato práce překvapivě dospěla k opačným výsledkům, co se týče genetické variability zkoumaných rostlin. Genetická diverzita invazivních populací byla vyšší než u původních populací. Vysokou genetickou diverzitu invazivních populací vysvětlovali zejména tím, že je druh pro svůj estetický vzhled oblíbenou okrasnou květinou.

Ve studii Wu et al. (2022b) porovnávali genetickou diverzitu lakušníků s genetickou diverzitou dalších 3 rodů vodních rostlin v Tibetu: *Stuckenia filiformis*, *Hippuris vulgaris* a *Myriophyllum*. Genetická diverzita rodů klesala v uvedeném pořadí a lakušníky měly ze všech 4 rodů diverzitu nejnižší. To bylo opět vysvětlováno způsobem rozmnožování, protože, jak bylo již několikrát zmíněno, lakušníky mají tendenci k autogamii, zatímco u ostatních tří druhů zkoumaných v citované práci rozdílná doba dozrávání pestíků a tyčinek květů podporuje alogamii, a jsou nejčastěji opylovány větrem, což usnadňuje přenos genetického materiálu (Wu et al., 2022b).

7 Závěr

Práce potvrdila, že mikrosatelitní markery mohou být vhodnými nástroji pro budoucí výzkum populační genetiky lakušníků. Vzhledem k mezidruhovým rozdílům je nutné lokusy (a primery pro jejich amplifikaci) testovat specificky pro konkrétní druhy, přestože některé lokusy mohou být přenositelné mezi různými evropskými druhy. Povedlo se najít 8 lokusů pro každý ze dvou druhů, *R. fluitans* a *R. peltatus*, z toho 6 společných pro oba, které je vhodné dále testovat pro další výzkum populační genetiky těchto dvou druhů. Pokud by se v budoucnu podařilo najít dostatek lokusů pro výzkum druhů *R. fluitans* a *R. peltatus*, bylo by potřeba je pro studium populační genetiky otestovat na větší sadě vzorků jedinců konkrétních populací druhů. Nalezení těchto lokusů a zkoumání lakušníků pomocí mikrosatelitních markerů by také mohlo pomoci odhalit klonální strukturu na větším prostorovém měřítku, například jakých rozměrů dosahuje výskyt klonu určitého druhu v říčních tocích, nebo zkoumat, zda je jeden rozsáhlý porost lakušníků v rybníce klonální, a jaký je možný podíl autogamie nebo alogamie.

8 Literatura

- Arnaud-Haond, S., Alberto, F., Teixeira, S., Procaccini, G., Serrão, E.A., Duarte, C.M., 2005. Assessing genetic diversity in clonal organisms: Low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. *J. Hered.* 96, 434–440.
- Barrat, M., 1996. Strategies of reproduction, dispersion, and competition in river plants: a review. *Vegetatio* 123, 13–37.
- Barrett, S.C.H., Eckert, C.G., Husband, B.C., 1993. Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquat. Bot.* 44, 105–145.
- Beatty, G.E., McEvoy, P.M., Sweeney, O., Provan, J., 2008. Range-edge effects promote clonal growth in peripheral populations of the one-sided wintergreen *Orthilia secunda*. *Divers. Distrib.* 14, 546–555.
- Bradley, C.R., Duignan, C., Preston, S.J., Provan, J., 2013. Conservation genetics of Ireland's sole population of the River water crowfoot (*Ranunculus fluitans* Lam.). *Aquat. Bot.* 107, 54–58.
- Butkuvienė, J., Sinkevičienė, Z., Naugžemys, D., Patamsytė, J., Žvingila, D., 2017. Genetic diversity of *Batrachium* (*Ranunculaceae*) species reveals the necessity of their protection in Lithuanian rivers. *Aquat. Bot.* 142, 61–70.
- Carta, A., Bedini, G., Foggi, B., Probert, R.J., 2012. Laboratory germination and seed bank storage of *Ranunculus peltatus* subsp. *baudotii* seeds from the Tuscan Archipelago. *Seed Sci. Technol.* 40, 11–20.
- Chen, J.M., Du, Z.Y., Yuan, Y.Y., Wang, Q.F., 2014. Phylogeography of an alpine aquatic herb *Ranunculus bungei* (*Ranunculaceae*) on the Qinghai-Tibet Plateau. *J. Syst. Evol.* 52, 313–325.
- COOK, C.D.K., 1969. On the Determination of Leaf Form in *Ranunculus Aquatilis*. *New Phytol.* 68, 469–480.
- Coppi, A., Lastrucci, L., Carta, A., Foggi, B., 2015. Analysis of genetic structure of *Ranunculus baudotii* in a Mediterranean wetland. Implications for selection of seeds and seedlings for conservation. *Aquat. Bot.* 126, 25–31.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh

leaf tissue (No. RESEARCH).

Drag, L., Zima, J. and Cizek, L., 2013. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci for a threatened saproxylic beetle *Rosalia alpina* (Coleoptera: Cerambycidae). Conservation Genetics Resources, 5(4), pp.903-905.

Gemeinhardt, H.S., 2019. Testing cross-amplification of microsatellites on European *Ranunculus* sect. *Batrachium* species Ms. [Bc. Thesis, depon in: Jihočeská univerzita, České Budějovice, Czech Republic]. 36.

Godwin, I.D., Aitken, E.A.B., Smith, L.W., 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis 18, 1524–1528.

Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B., 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. 1, 55–63.

Hardion, L., Chanez, E., Staentzel, C., Combroux, I., Beisel, J.N., Espinosa Prieto, A., Béral, H., Trémolières, M., Grac, C., 2021. An infraspecific dimension of bioindication? Comparison between genotypes and ecological distribution of *Potamogeton coloratus*. Aquat. Bot. 171.

Jansen, A., Gemayel, R., Verstrepen, K.J., 2012. Unstable microsatellite repeats facilitate rapid evolution of coding and regulatory sequences. Genome Dyn. 7, 108–125.

Kaplan, Z., Danihelka, J., Chrtěk, J., Zázvorka, J., Koutecký, P., Ekrt, L., Řepka, R., Štěpánková, J., Jelínek, B., Grulich, V., Prančl, J., Wild, J., 2019. Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 8. Preslia 91, 257–368.

Kaplan, Z., Štěpánek, J., 2003. Genetic variation within and between populations of *Potamogeton pusillus* agg. Plant Syst. Evol. 239, 95–112.

Koga, K., Kadono, Y., Setoguchi, H., 2007. The genetic structure of populations of the vulnerable aquatic macrophyte *Ranunculus nipponicus* (Ranunculaceae). J. Plant Res. 120, 167–174.

Kořenář, J., 2022. Testování mikrosatelitních markerů pro lakušník nitřolistý (*Ranunculus trichophyllus*). [Testing of microsatellite markers for *Ranunculus trichophyllus*. Bc. Thesis, In Czech]. – 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

- 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. *Bot. J. Linn. Soc.* 198, 417–437.
- Ku, Y.B., Oh, H.K., Lee, J.H., Kong, H.Y., Kil, J.H., Cho, K.H., 2007. Distribution and genetic uniformity of an endangered aquatic plant, *Ranunculus kadzusensis*, in a South Korean rice paddy: Short report. *Weed Biol. Manag.* 7, 120–123.
- Kúr, P., Košnar, J. and Štech, M., 2014. Characterization and cross-species amplification of 16 microsatellite loci in *Spergularia echinosperma* (*Caryophyllales: Caryophyllaceae*). *Conservation genetics resources*, 6(3), pp.571-573.
- Lambertini, C., Gustafsson, M.H.G., Baattrup-Pedersen, A., Riis, T., 2017. Genetic structure of the submersed *Ranunculus baudotii* (sect. *Batrachium*) population in a lowland stream in Denmark. *Aquat. Bot.* 136, 186–196.
- Loveless, M.D. and Hamrick, J.L., 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and systematics*, pp.65-95.
- Mason, A.S., 2015. SSR genotyping. In *Plant genotyping* (pp. 77-89). Humana Press, New York, NY.
- Mony, C., Mony, J.F., Thiébaud, G., Muller, S., 2006. Floristic and ecological diversity of *Ranunculus* aquatic habitats in the sub-Atlantic range: Implications for conservation. *Biodivers. Conserv.* 15, 3383–3400.
- Mukherjee, A., Williams, D., Gitzendanner, M.A., Overholt, W.A., Cuda, J.P., 2016. Microsatellite and chloroplast DNA diversity of the invasive aquatic weed *Hygrophila polysperma* in native and invasive ranges. *Aquat. Bot.* 129, 55–61.
- Prančl, J., 2015. Lakušníky – výkladní skříň evoluce skrytá v našich vodách. *Živa*. 1: 12–15.
- Prančl, J., Koutecký, P., Travníček, 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.
- Reid, M.K., Naidu, P., Paterson, I.D., Mangan, R., Coetzee, J.A., 2021. Population genetics of invasive and native *Nymphaea mexicana Zuccarini*: Taking the first steps to initiate a

- biological control programme in South Africa. *Aquat. Bot.* 171, 103372.
- Riis, T., 2008. Dispersal and colonisation of plants in lowland streams: Success rates and bottlenecks. *Hydrobiologia* 596, 341–351.
- Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18, 233–234.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*, 17(16), pp.6463-6471.
- Tingey, S., 2003. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs). *Nucleic Acid Protoc. Handbook*, 25, 675–677.
- Vieira, M.L.C., Santini, L., Diniz, A.L., Munhoz, C. de F., 2016. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* 39, 312–328.
- Wade, A.J., Whitehead, P.G., Hornberger, G.M., Jarvie, H.P., Flynn, N., 2002. On modelling the impacts of phosphorus stripping at sewage works on in-stream phosphorus and macrophyte/epiphyte dynamics: A case study for the River Kennet. *Sci. Total Environ.*
- Wang, Y.H., Chen, J.M., Xu, C., Liu, X., Wang, Q.F., Motley, T.J., 2010. Population genetic structure of an aquatic herb *Batrachium bungei* (*Ranunculaceae*) in the Hengduan Mountains of China. *Aquat. Bot.* 92, 221–225.
- Werner, O., Ros, R.M., Guerra, J., 2002. Direct amplification and NaOH extraction: Two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). *J. Bryol.* 24, 127–131.
- Wiegleb, G., Bobrov, A.A. and Zalewska-Gałosz, J., 2017. A taxonomic account of *Ranunculus* section *Batrachium* (*Ranunculaceae*). *Phytotaxa*, 319(1), pp.1-55.
- Wu, Z., Wang, Z., Xie, D., Wang, Huijun, Zhao, A., Wang, Y., Wang, Hanling, Xu, X., Li, T., Zhao, J., 2022b. Effects of highland environments on clonal diversity in aquatic plants: An interspecific comparison study on the Qinghai-Tibetan Plateau 1–12.
- Wu, Z., Wang, Z., Xie, D., Zhang, J., Cai, P., Li, X., Xu, X., Li, T., Zhao, J., 2022a. Extensive Sympatry and Frequent Hybridization of Ecologically Divergent Aquatic Plants on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Front. Plant Sci.* 13, 1–13.

- Wu, Z., Wu, J., Wang, Y., Hou, H., 2017. Development of EST-Derived Microsatellite Markers in the Aquatic Macrophyte *Ranunculus bungei* (*Ranunculaceae*). *Appl. Plant Sci.* 5, 1700022.
- Wu, Z., Xu, X., Zhang, J., Wiegleb, G., Hou, H., 2019. Influence of environmental factors on the genetic variation of the aquatic macrophyte *Ranunculus subrigidus* on the Qinghai-Tibetan Plateau. *BMC Evol. Biol.* 19, 1–11.
- Yakimowski, S.B., Rieseberg, L.H., 2014. The role of homoploid hybridization in evolution: A century of studies synthesizing genetics and ecology. *Am. J. Bot.* 101, 1247–1258.
- Zalewska-Gałosz, J., Jopek, M., Ilnicki, T., 2015. Hybridization in *Batrachium* group: Controversial delimitation between heterophyllous *Ranunculus penicillatus* and the hybrid *Ranunculus fluitans* × *R. peltatus*. *Aquat. Bot.* 120, 160–168.