

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Určování terestrických forem lakušníků**  
**(*Ranunculus* sect. *Batrachium*)**

Bakalářská práce

**Linda Vlčková**

Školitel: Mgr. Petr Koutecký, Ph.D.

České Budějovice 2020

Vlčková, L., 2020: Určování terestrických forem lakušníků (*Ranunculus* sect. *Batrachium*). [Determination of the terrestrial forms of water-crowfoots (*Ranunculus* sect. *Batrachium*). Bc. Thesis, in Czech] – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Annotation**

*Ranunculus* sect. *Batrachium* is one of the most intricate groups of aquatic plants. Apart from typical submerged plants, they may grow also terrestrially and determination of the terrestrial forms is very difficult. The aim of this thesis was to establish whether the terrestrial forms of *Ranunculus trichophyllus* and *Ranunculus peltatus* differ in their morphology. The species were determined by flow cytometry and the morphological features were measured and analysed.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 23. 4. 2020

.....

Linda Vlčková

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli Petrovi Kouteckému za výborné vedení mé bakalářské práce, za cenné rady a za to, že si na mě našel čas vždy, když jsem potřebovala. Dále mé díky patří všem dalším, kteří se podíleli na sběru mých vzorků, jmenovitě Evě Koutecké, Liborovi Ekrtovi a Vojtěchovi Dolejškovi. Děkuji také Johaně Hanzlíčkové a Vojtěchovi Dolejškovi za poskytnutí dat ke srovnání terestrických forem lakušníků s vodními formami.

## Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Charakteristika skupiny .....	1
1.2. Polyploidizace.....	2
1.3. Hybridizace.....	3
1.4. Fenotypová plasticita .....	3
1.5. Morfologie a určovací znaky .....	4
1.5.1. Listy .....	4
1.5.2. Květ .....	6
1.5.3. Plody.....	7
1.5.4. Květní lůžko .....	8
1.6. Rozmnožování .....	8
1.7. Ekologie a rozšíření .....	8
1.8. Velikost genomu .....	9
1.9. <i>Ranunculus peltatus</i> .....	11
1.10. <i>Ranunculus trichophyllus</i> .....	12
1.11. Terestrické formy .....	13
1.12. Cíl práce .....	14
2. Materiál a metody.....	15
2.1. Terénní sběr .....	15
2.2. Průtoková cytometrie .....	18
2.3. Morfometrika .....	18
2.3.1. Morfometrické znaky .....	18
2.3.2. Srovnání s vodními formami .....	20

2.4.	Analýza dat .....	20
2.5.	Sekvenování morfologicky nejasných jedinců .....	21
2.5.1	Izolace DNA .....	22
2.5.2	PCR.....	23
2.5.3	Elektroforéza .....	24
2.5.4.	Sekvenace vzorků.....	24
3.	Výsledky.....	25
3.1.	Průtoková cytometrie .....	25
3.2.	Morfometrické analýzy .....	28
3.2.1.	Popisná statistika taxonů .....	28
3.2.2.	Srovnání s vodními formami lakušníků .....	30
3.2.3.	Korelační analýza .....	31
3.2.4.	Analýza hlavních komponent .....	31
3.2.5.	Lineární diskriminační analýza .....	36
3.2.6.	Klasifikační diskriminační analýza .....	39
3.2.7.	Sekvenace morfologicky nejasných jedinců.....	42
4.	Diskuze.....	45
5.	Závěr.....	53
6.	Literatura .....	54

## 1. Úvod

Má bakalářská práce se zabývá lakušníky (*Ranunculus* sect. *Batrachium*). Jedná se o komplikovanou, avšak bezesporu zajímavou skupinu vodních rostlin. Jejich jednotlivé druhy se často špatně určují, například kvůli časté polyploidizaci a hybridizaci. Tyto procesy jsou zodpovědné za vznik nových druhů a tudíž i značnou variabilitu celé sekce. Vodní rostliny jsou taxonomicky složité a najdeme mezi nimi řadu dalších komplikovaných skupin. Kromě lakušníků je příkladem rod rdest, *Potamogeton* (Kaplan et al. 2013). Mezi vodními druhy je častá konvergence, tedy podobná adaptace na prostředí. I zcela nepříbuzné druhy tak mohou vypadat podobně (Barrett et al. 1993, Kaplan 2002). Nápadná je u nich také fenotypová plasticita. Rostliny jednoho druhu se mohou velmi lišit podle podmínek, ve kterých rostou. Jejich morfologie pak záleží na řadě faktorů, jako je množství dostupných živin, intenzita slunečního záření apod. Vodní rostliny při přechodu na souš (např. při poklesu vodní hladiny) často zásadně mění svou morfologii. Určování terestrických forem je pak ještě složitější než u forem vodních. Díky fenotypové plasticitě v kombinaci se zjednodušenou morfologií, která je u vodních rostlin častá, vznikají kryptické linie. I reprodukčně, ekologicky či geograficky oddělené taxony tak mohou vypadat velmi podobně (Bickford et al. 2007, Thum et al. 2011, Kaplan & Marhold 2012).

### 1.1. Charakteristika skupiny

Lakušníky jsou bíle kvetoucí vodní rostliny z čeledi Ranunculaceae (pryskyřníkovité). Je jich okolo 30 druhů a rostou převážně na severní polokouli. Centrem druhové diverzity je Evropa s počtem 14–18 druhů. Najdeme je především v oblastech mírného pásu severní polokoule, ale i v Jižní Americe, na jihu Afriky, jihovýchodě Austrálie, v Tasmánii a na Novém Zélandu (Cook 1963, Cook 1966, Wiegand et al. 2017).

Lakušníky patří mezi vyšší dvouděložné rostliny (Eudicots). Zařazují se do řádu Ranunculales (pryskyřníkotvaré) a v rámci tohoto řádu náleží do čeledi Ranunculaceae (pryskyřníkovité) (Angiosperm Phylogeny Group 2016).

Pojetí skupiny lakušníků se v historii měnilo. V minulosti byla vnímána jako sekce v rámci rodu pryskyřník, později však byla klasifikována i jako samostatný rod či podrod. Ani dnes není názor úplně jednotný a v různých částech světa je tato skupina vnímána odlišně. V české

literatuře bývají lakušníky někdy označovány za samostatný rod, jako je tomu např. u prvního vydání Klíče ke květeně České republiky (Kubát et al. 2002), Květeny České republiky (Hejný & Slavík 1997) či Seznamu cévnatých rostlin České republiky (Danihelka et al. 2012). V druhém vydání Klíče ke květeně České republiky je naopak lakušník vnímán jako sekce v rámci rodu *Ranunculus* (Kaplan et al. 2019a).

Když se zaměříme na znaky, které oddělují lakušníky od ostatních pryskyřníků, je to zejména absence škrobu v korunních lístcích, redukce nektárií, přítomnost blanitých palistů a nažky s příčnými žebry a se zobánkem kratším, než je délky nažky (Cook 1963, Hörandl & Emadzade 2012). Tyto znaky se však mohou vyskytovat i u jiných druhů pryskyřníků (Cook 1966). Ani barva květů není znakem jedinečným pro lakušníky, neboť existují i bílé kvetoucí druhy pryskyřníků, jako např. *R. platanifolius*, *R. glacialis* či *R. alpestris*. Přizpůsobení vodnímu prostředí také není unikátní, jelikož nalezneme i vodní pryskyřníky, např. *R. sceleratus*, *R. gmelinii* a *R. flabellaris* (Hörandl et al. 2005).

Molekulární data ukazují, že lakušníky jsou monofyletickou skupinou, která je vnořena do rodu pryskyřník (Hörandl & Emadzade 2012). V současnosti je tedy skupina lakušníků většinou uznávána jako sekce v rámci tohoto rodu (*Ranunculus* sect. *Batrachium* DC.).

## 1.2. Polyploidizace

Polyploidizace je proces znásobení sad chromozomů a dochází při ní k duplikaci genomu (Briggs & Walters 2001). Prošly jí pravděpodobně všechny krytosemenné rostliny a je zodpovědná za jejich značnou variabilitu (Soltis et al. 2009, Wood et al. 2009, Weiss-Schneeweiss et al. 2013, Wendel 2015, Wendel et al. 2016). Některé rostliny mají i navzdory dávné polyploidizaci pouze dvě sady chromozomů (Leitch & Leitch 2008). Počet chromozomů je v takových případech zredukován a dochází k diploidizaci. Rostliny se tak chovají jako diploidi, ale v minulosti u nich došlo k znásobení a opětovnému zredukování sad chromozomů. Jsou označovány jako paleopolyploidi (Renny-Byfield et al. 2015, Wendel 2015). Polyploidizace však neprobíhala pouze dávno v minulosti. K duplikaci genomu dochází neustále a vznikají tak neopolyploidi (Ramsey & Schemske 2002).

Mezi nově vzniklým cytotypem a jeho rodičovským taxonem může dojít k vytvoření reprodukční bariéry, tudíž i ke vzniku nového druhu (Otto & Whitton 2000, Rieseberg & Willis 2007).

Polyploidizace může hrát velkou roli při hybridizaci. Nově vzniklí kříženci jsou často neplodní, ale díky znásobení sad chromozomů může dojít k obnově plodnosti. Z takového hybrida může vzniknout i plnohodnotně se rozmnožující nový druh (Webster 1988). Tento případ je znám i u lakušníků, např. u druhu *Ranunculus penicillatus*. Jedná se v podstatě o komplex vzniklý hybridizací *R. fluitans* s dalšími druhy a následnou polyploidizací (Webster 1988, Dahlgren 1993, Zalewska-Gałosz et al. 2015).

U lakušníků je polyploidizace velmi častá. Je známo 5 ploidních úrovní od diploidů ( $2n = 16$ ) až po hexaploidy ( $2n = 48$ ) (Prančl et al. 2018).

### 1.3. Hybridizace

Křížení druhů je u lakušníků běžné a jedná se o další z procesů, které přispívají ke komplikovanosti celé skupiny. Hybridizace jsou zřejmě schopné všechny taxony a dochází k ní i mezi různými ploidními úrovněmi (Cook 1966, Dahlgren 1991, Prančl et al. 2018). Hybridi se často rozmnožují vegetativně nebo autogamií a jsou tak fixováni v přírodě (Cook 1966). Nově vzniklí hybridi mohou být i fertillní. Míra plodnosti záleží na počtu chromozomových sad. Diploidní hybridi jsou nejčastěji sterilní, nebo jen částečně plodní. Se zvyšováním počtu sad chromozomů se zvyšuje i míra fertility. Hexaploidní hybridi jsou pak většinou alespoň částečně plodní (Cook 1970). Jak již bylo zmíněno (viz. kapitola 1.1.), následná polyploidizace může kladně ovlivňovat fertilitu hybridů.

### 1.4. Fenotypová plasticita

Fenotypová plasticita je schopnost organismů měnit svůj fenotyp v závislosti na změně podmínek prostředí. Rostliny se stejným genotypem pak vypadají rozdílně podle toho, kde rostou (Bradshaw 1965). Vodní prostředí je často proměnlivé a v průběhu sezóny dochází ke změnám množství živin, kyslíku, slunečního záření či teploty. Rostliny tak mění svou morfologii v závislosti na těchto změnách.

Lakušníky obývají široké spektrum habitatů od eutrofních rybníků a jezer až po vysokohorská oligotrofní jezera. Najdeme je ve stojatých i tekoucích vodách (Prančl et al. 2018). Některé druhy se vyskytují pouze v určitém typu vod, např. *R. fluitans* obývá výhradně rychle tekoucí toky. Jiné druhy mají rozmanitější ekologii, např. *R. peltatus* roste v tekoucích i stojatých vodách. U takových rostlin je pak fenotypová plasticita velmi výrazná.

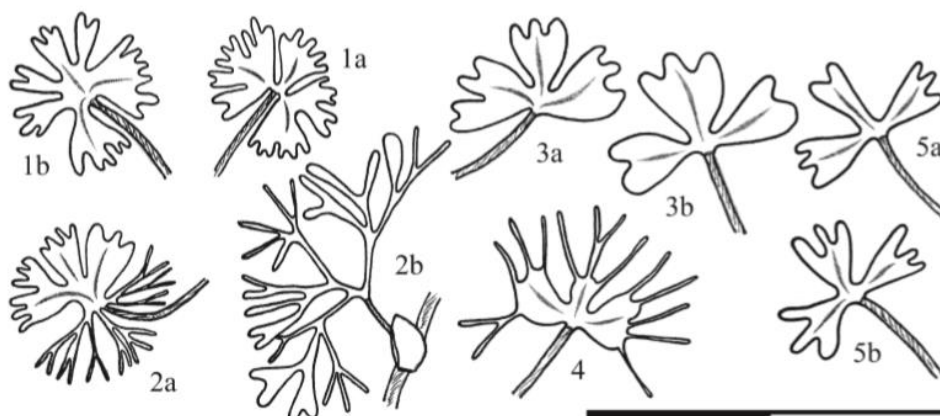


Mnoho druhů také osidluje vysychající habitaty (Kaplan et al. 2019b). Při poklesu vodní hladiny a přechodu na souš lukušníky tvoří terestrické formy, které jsou výrazně menší než formy vodní a liší se tvarem listů i dalšími znaky (Englmaier 2016).

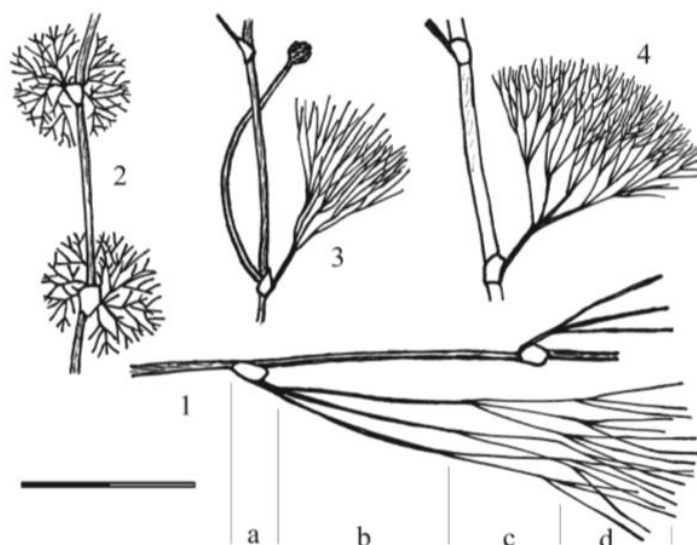
## 1.5. Morfologie a určovací znaky

### 1.5.1. Listy

Lakušníky mají listovou heterofylii, což znamená, že mohou tvořit různé typy listů. Jsou to listy lupenité a nit'ovité. Lupenité listy jsou široké a plavou na vodní hladině, kdežto nit'ovité listy jsou členěny do tenkých úkrojků a rostou pod vodou. Kromě těchto dvou typů mohou vznikat přechodné typy listů, tzv. listy mozaikovité. K jejich vzniku dochází nejčastěji při kolísání vodní hladiny (Cook 1969).



Obr. 1 – Lupenité a mozaikovité listy: 1) *Ranunculus aquatilis* (lupenitý list); 2) *R. aquatilis* (mozaikovitý list); 3) *R. peltatus* (lupenitý list); 4) *R. peltatus* (mozaikovitý list); 5) *R. baudotii* (lupenitý list). Měřítko: 50 mm. Převzato (Englmaier 2016).



Obr. 2 – Niťovité listy: 1) *Ranunculus fluitans*; 2) *R. circinatus*; 3) *R. trichophyllus*; 4) *R. penicillatus*; a) – d) segmenty listu. Měřítko: 50 mm. Převzato (Englmaier 2016).

Niťovité listy umí efektivněji využívat sluneční záření potřebné k fotosyntéze. Ve vodě je světlo nedostatkovým zdrojem a rostliny s niťovitými listy jsou tomu dobře přizpůsobeny. Mají tenkou kutikulu, chloroplasty jsou i v epidermis a v listovém mezofylu se jich naopak tolik nevyskytuje. Díky tomu mohou světlo využívat lépe než jiné typy listů. Na rozdíl od lupenitých listů umí využít  $\text{HCO}_3^-$  z vody, za což je nejspíš zodpovědná jejich anatomie a morfologie (Nielsen & Sand-Jensen 1993). Průduchy u ponořených listů nejsou vůbec nebo jsou nefunkční (Cook 1969). Niťovité listy mohou mít i další benefity. Např. druhu *R. fluitans* poskytuje jejich mechanická odolnost výhodu v rychle tekoucích vodách.

Nejen niťovité, ale i lupenité listy se uplatňují při kompetici o světlo. Mohou zastínit listy jiných druhů a tím jim zabránit v přístupu slunečních paprsků (Cook 1966). Jejich další funkcí je pravděpodobně nadnášení květu, aby rostlina mohla být opylena nad vodou, a příjem  $\text{CO}_2$  ze vzduchu (Nielsen & Sand-Jensen 1993).

Heterofylie není u všech lukušníků. Přítomnost obou typů listů se uvádí jen asi u 9 druhů, 2 druhy mají pouze lupenité listy a zbytek tvoří jen listy niťovité (Cook 1963). Schopnost tvořit dva typy listů je výhodná hlavně v proměnlivém prostředí, ve kterém lukušníky rostou (Wells & Pigliucci 2000).

Dalším znakem, který slouží k determinaci lakušníků, jsou palisty. Pro tyto účely jsou nejlepší palisty prvního rozvinutého listu, neboť příliš mladé palisty nemusí být ještě zcela vyvinuté a starší palisty bývají potrhané. Pro determinaci se posuzuje tvar palistů a míra srůstu s řapíkem (Cook 1966). V praxi se ale tento znak příliš nevyužívá, jelikož se špatně studuje z herbářových položek. Palisty jsou malé a při lisování se většinou nezachovají. Ani studování tohoto znaku na čerstvé rostlině není úplně spolehlivé. U většiny listů jsou palisty buď příliš mladé, nebo potrhané.

### 1.5.2. Květ

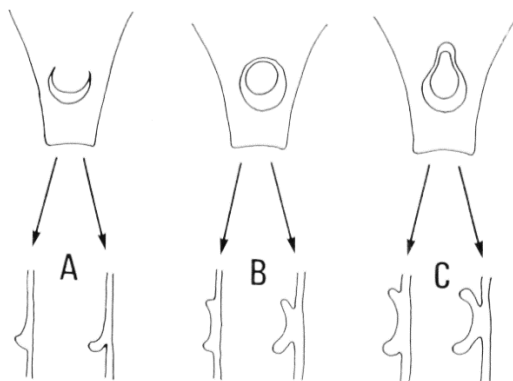
Velikost květů se liší mezi druhy a závisí na ní způsob reprodukce. Druhy s malými květy jsou často autogamní, či dokonce kleistogamní (k oplození dochází v poupěti nebo v trvale uzavřeném květu). Naopak u druhů s velkými květy převažuje alogamie (Cook 1966, Turała-Szybowska 1978, Hong 1991, Dahlgren 1992). Velikost květů se může měnit v závislosti na prostředí. Například při přechodu na souš se květy obvykle zmenší (Englmaier 2016).

Kališní lístky jsou kratší než korunní (Englmaier 2016). U většiny druhů jsou zelené až hnědé (podle stáří jedince). Existují však i druhy, které mají modré špičky lístků, či celý namodralý kalich (Cook 1966).

Korunní lístky jsou téměř u všech druhů bílé se žlutou skvrnou na bázi. Najdeme ovšem i výjimky – *Ranunculus ololeucos* má korunní lístky celé bílé a *R. flavidus* nažloutlé (Cook 1966). Korunních lístků bývá nejčastěji pět. Není ale výjimkou, když jich u některých druhů najdeme větší počet. Např. *R. fluitans* jich má často šest nebo i sedm (Englmaier 2016).

U všech druhů najdeme na bázi korunních lístků nektária. Jsou velmi nenápadná a patří k nejredukovanějším v rámci rodu *Ranunculus*. Množství jimi vyprodukovaného nektaru se mezi druhy liší (Dahlgren 1992). Cook ve své monografii popsal tři typy nektárií – poloměsíčitě, okrouhlé a hruškovité (Cook 1966). Určení tvaru nektária však není vždy jednoznačné, protože existují i přechodné typy (Wiegand 1988). Dahlgren proto ve své studii z roku 1992 navrhla podrobnější rozdělení na osm typů, které se však reálně nepoužívá. Pro správnou determinaci je potřeba nektária určovat u plně vyvinutých květů. U příliš mladých květů by mohlo dojít k záměně s jinými typy kvůli nedostatečně

vyvinutému tvaru a u starších může docházet k deformaci nektária (Cook 1966). Příliš se nedoporučuje ani determinace z herbářových položek, jelikož nektária mohou vypadat odlišně než před vylisováním (Cook 1966, Englmaier 2016).

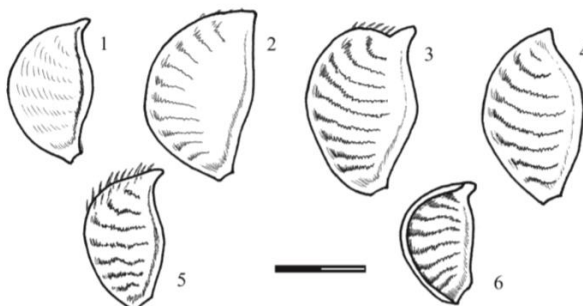


Obr. 3 – Tvary nektárií: a) poloměsíčitě; b) okrouhlé; c) hruškovité. Převzato (Cook 1966).

Dalším determinačním znakem je délka květní stopky, která je pro každý druh unikátní. U jedinců rostoucích v hlubokých vodách se však její délka může měnit, což může správné určení zkomplikovat (Cook 1966).

### 1.5.3. Plody

Plodem lakušníků je nažka. Počet nažek v jednom souplodí se pohybuje nejčastěji v rozmezí mezi 15 a 80. Druhy se liší v míře chlupatosti nažek, jejich tvaru a rýhování (Englmaier 2016).



Obr. 4 – Tvar nažek: 1) *Ranunculus aquatilis*; 2) *R. peltatus*; 3) *R. penicillatus* s. str.; 4) *R. fluitans*; 5) *R. trichophyllus* 6) *R. baudotii*. Měřítko: 1 mm. Převzato (Englmaier 2016).

#### **1.5.4. Květní lůžko**

Květní lůžko je nejlepší studovat po opadání nažek (Englmaier 2016). Posuzuje se tvar květního lůžka a míra chlupatosti. Mohou být lysá, řídce chlupatá či hustě chlupatá (Cook 1966, Englmaier 2016).

#### **1.6. Rozmnožování**

Lakušníky se rozmnožují pohlavně i nepohlavně. V tekoucích vodách převažuje vegetativní šíření fragmenty lodyh, díky čemuž se ve vodě mohou udržet neplodní hybridy i desítky let. Ve stojatých vodách je naopak častější pohlavní rozmnožování (Cook 1966).

Lakušníky jsou schopny cizosprášení (alogamie) i samosprášení (autogamie). K opylení často dochází za pomoci větru (anemogamie) či hmyzu (entomogamie) (Cook 1966, Hong 1991, Dahlgren 1992). Druhy s většími květy mají tendenci spíše k cizosprášení, kdežto u malokvětých druhů převažuje samosprášení. K takovým druhům patří například i *R. trichophyllus*, který je schopný opylení vlastním pylem v poupěti nebo v trvale uzavřeném květu (kleistogamie). Mnoho jedinců tohoto druhu kvete i plodí pod vodou a vznikají výhradně kleistogamní populace (Dahlgren 1992).

Semena lakušníků se rozšiřují pomocí vody (hydrochorie) či jsou přenášena ptáky (zoochorie). Mají velkou životnost a tvoří semennou banku, ve které přečkávají nepříznivé podmínky (Carta et al. 2012). To jim pomáhá při osidlování dočasných stanovišť, například v místech s kolísající hladinou či periodicky se měnící kvalitou vody (O'Donnell et al. 2014).

#### **1.7. Ekologie a rozšíření**

Lakušníků je okolo třiceti druhů. Vyskytují se hlavně na severní polokouli, konkrétně v arktické, boreální, temperátní a mediteránní zóně. Areál výskytu zasahuje kromě severní polokoule i do Jižní Ameriky, na jih Afriky, jihovýchod Austrálie, do Tasmánie a na Nový Zéland. Centrem diverzity je Evropa, kde najdeme 14–18 druhů. Za centrum druhové diverzity je považována atlantská a středozemní Evropa. Nejseverněji se lakušníky vyskytují v Kanadě a Grónsku, nejjižněji v oblasti jihovýchodní Austrálie a Nového Zélandu (Cook 1963, Cook 1966, Wiegand et al. 2017).

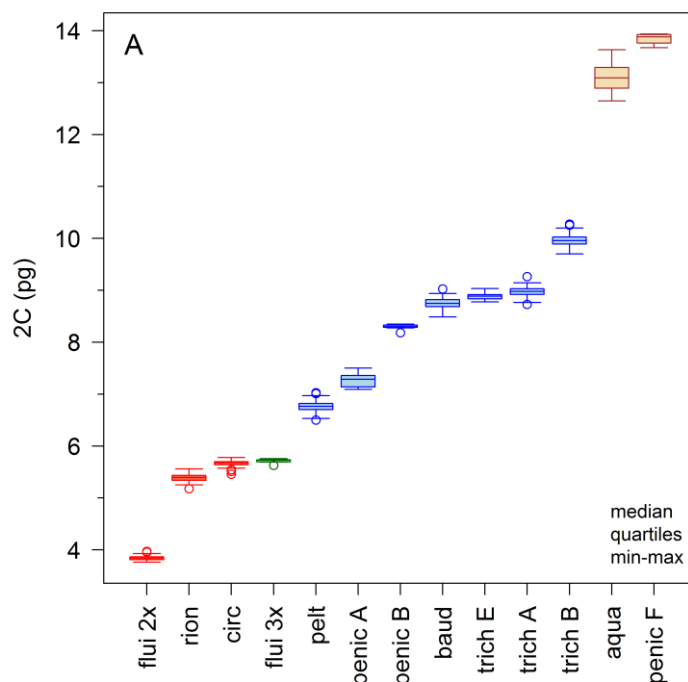
Lakušníky najdeme v širokém spektru vodních habitatů. Osidlují tekoucí i stojaté vody a najdeme je v eutrofních nádržích i v oligotrofních vysokohorských jezerech. Některé druhy jsou schopné růst i v brakických vodách, z našich zástupců je to *R. baudotii*. Lakušníky často osidlují místa s kolísající hladinou vody. Při poklesu vodní hladiny pak přetrvávají v terestrické formě na obnažených dnech (Cook 1966).

V České republice se vykytuje osm druhů – *Ranunculus aquatilis*, *R. baudotii*, *R. circinatus*, *R. fluitans*, *R. peltatus*, *R. penicillatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* (Prančl et al. 2018, Kaplan et al. 2019a, Kaplan et al. 2019b).

### 1.8. Velikost genomu

Základní chromozomové číslo u lakušníků je  $x = 8$  (Cook 1966). Je známo pět polyploidních úrovní od diploidní ( $2n = 16$ ) až po hexaploidní ( $2n = 48$ ). Tradiční rozlišení druhů je založeno na morfologii (Prančl et al. 2018). Nedávné studie však odhalují značnou variabilitu v rámci druhů, což napovídá tomu, že toto pojetí nemusí vždy odrážet skutečné evoluční vztahy (Zalewska-Gałosz et al. 2015, Prančl et al. 2018). Zalewska-Gałosz et al. (2015) se zabývali druhem *R. penicillatus*. Sekvenace jaderných a chloroplastových úseků DNA potvrdila hybridogenní původ tohoto taxonu. Prančl et al. (2018) popisují variabilitu cytotypů v rámci různých taxonů, která byla odhalena pomocí průtokové cytometrie a počítání chromozomů. Např. v rámci *R. trichophyllus* byly nalezeny dva cytotypy a u *R. penicillatus* jich bylo rozpoznáno dokonce šest.

Většina střeoevropských druhů lakušníků se liší velikostí genomu a dá se proto rozeznat pomocí průtokové cytometrie. Jediný překryv je u dvojic druhů *R. circinatus* s triploidním cytotypem *R. fluitans* a *R. baudotii* s *R. trichophyllus* (viz. Obr. 5). I mezi těmito druhy je ovšem rozdíl statisticky signifikantní ( $p < 0.05$ ). Druhy, jejichž velikosti genomu se překrývají, mají navíc odlišnou ekologii i morfologii. Průtoková cytometrie je tedy spolehlivý nástroj k určování jednotlivých druhů lakušníků (Prančl et al. 2018).



Obr. 5 – Box-and-whisker plot pro porovnání velikostí genomů u 13 různých cytotypů lakušníků. Zkratky cytotypů: aqua – *R. aquatilis*; baud – *R. baudotii*; circ – *R. circinatus*; flui – *R. fluitans* (diploidní a triploidní cytotyp); pelt – *R. peltatus*; penic – *R. penicillatus* (cytotypy A, B a F); rion – *R. rionii*; trich – *R. trichophyllus* (cytotypy A a B; E = subsp. *eradicatus*). Červeně jsou znázorněni diploidi, zeleně triploidi, modře tetraploidi a hnědě hexaploidi. 2C (pg) – průměrná velikost genomu v pg. Převzato (Prančl et al. 2018).

Díky genetickým studiím byla objevena variabilita v rámci některých taxonů. Například *R. penicillatus* je ve skutečnosti komplexem nejméně šesti různých cytotypů, které vznikly hybridizací *R. fluitans* s dalšími druhy a následnou polyploidizací (Wiegleb & Herr 1983, Webster 1988, Dahlgren 1993, Zalewska-Gałosz et al. 2015).

U druhu *R. trichophyllus* byly zaznamenány dva rozdílné cytotypy, které jsou v grafu nazvány *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B. Oba cytotypy jsou si morfologicky velmi podobné, neliší se však pouze ve velikosti genomu, ale i ekologií (viz. kapitola 1.10.) (Prančl et al. 2018, Kaplan et al. 2019b).

Ve své bakalářské práci se budu zabývat určováním terestrických forem. Pro otestování metodiky i kvůli dostupnosti lokalit byl materiál sbírán zejména v jižních Čechách, kde jsou nejčastější druhy *Ranunculus peltatus* a *R. trichophyllus* (na jihu Čech se vyskytuje cytotyp A). Jejich velikosti genomu se průkazně liší, a proto lze druhy spolehlivě determinovat pomocí

průtokového cytometru (viz. Obr. 5). Druhy se na některých lokalitách vyskytují společně a mohou se křížit. Velikost genomu hybridů leží mezi oběma druhy, zpětní kříženci se ale mohou podobat rodičovským druhům, a to častěji druhu *R. peltatus* (Prančl et al. 2018).

### **1.9. *Ranunculus peltatus***

*Ranunculus peltatus* je vytrvalá bylina. Její vegetativní lodyhy dosahují délky do 100 cm, generativní lodyhy v době květu dorůstají mezi 0.5 až 3 metry. Pro tento druh je typická heterofylie, tedy přítomnost nitřovitých i lupenitých listů. Výjimkou jsou hluboké vody a dna rychle tekoucích toků, kde lupenité listy často netvoří. U terestrických forem lupenité listy být mohou i nemusí. Ponořené listy jsou dlouhé 20–50 mm a jsou kratší než internodia. Palisty jsou vejčité až trojúhelníkovité a měří přes 5 mm (Englmaier 2016, Wiegler et al. 2017, Kaplan et al. 2019a).

Květy jsou mezi lakušníky jedny z největších. Jejich velikost se pohybuje mezi 18 a 25 (vzácněji 30) mm v průměru. Nektárium je hruškovitého tvaru. Tyčinek je obvykle mezi 10 a 30. Nažky dosahují velikosti 1.8–2 (2.2) mm a jejich počet se pohybuje mezi 30 a 40 (Englmaier 2016, Wiegler et al. 2017).

*Ranunculus peltatus* je převážně evropský druh, který se vyskytuje na celém kontinentu s výjimkou nejsevernějších oblastí. Je znám i ze severní Afriky a jihozápadní Asie (Kaplan et al. 2019b). Roste v různých nádržích, na obnažených rybničních dnech i v tekoucích vodách. Najdeme ho při břehu i v hloubce několika metrů a často osidluje vody s kolísající hladinou. Nedaří se mu ve vodách s vyšší koncentrací minerálních živin a nikdy neroste na vápencích. Často ho najdeme naopak ve vodách s křemičitým podložím (Englmaier 2016, Kaplan et al. 2019b). Jedná se o náš nejběžnější lakušník a vyskytuje se téměř po celé České republice s výjimkou nížin. Tam se mu nedaří zřejmě z toho důvodu, že tyto oblasti mají podloží bohaté na minerální živiny (Kaplan et al. 2019b).

Dominantním, a v České republice také jediným, cytotypem je tetraploidní cytotyp ( $2n = 32$ ). Jinde v Evropě se však vyskytují i diploidi ( $2n = 16$ ) a hexaploidi ( $2n = 48$ ) (Prančl et al. 2018).



### 1.10. *Ranunculus trichophyllus*

Jedná se o vytrvalou, vzácně jednoletou rostlinu. Vegetativní stádium dosahuje velikosti až 100 cm. Během vegetační sezóny mohou být jeho kvetoucí lodyhy 0.5 až 3 metry dlouhé. *Ranunculus trichophyllus* tvoří jen nitřovité listy, jejichž velikost se pohybuje mezi 20 a 50 mm. Listy jsou obvykle kratší než internodia. Palisty jsou malé, protáhle vejčité a nikdy nepřesahují 4 mm (Englmaier 2016, Wiegleb et al. 2017).

Květy jsou obvykle otevřené a plavou nad vodní hladinou, ale mohou být i submerzní. Pak dochází ke kleistogamii (opelení uvnitř poupěte nebo i trvale uzavřeného květu). Velikost květu se pohybuje v rozmezí mezi 8–12 mm v průměru (Wiegleb et al. 2017). Tvar nektária je poloměsíčitý. Tyčinek je nejčastěji 10–15. Počet nažek se pohybuje mezi 15 a 30 a jsou 1.5–1.7 mm dlouhé (Englmaier 2016).

*Ranunculus trichophyllus* se vyskytuje poměrně hojně. Najdeme ho v celé Eurasii s výjimkou Japonska, v Severní a Jižní Americe, v Grónsku, na severu a na jihu Afriky, v Austrálii, Tasmánii a na Novém Zélandu (Wiegleb et al. 2017). Roste v tekoucích i ve stojatých vodách, od nížin do hor, v mělké (od 0.1 m) i hlubší vodě (do 3 m). Toleruje i zvýšený obsah minerálních živin (Englmaier 2016).

Tento druh tvoří diploidy ( $2n = 16$ ), tetraploidy ( $2n = 32$ ) i hexaploidy ( $2n = 48$ ), z nichž jsou nejpočetnější tetraploidy. Vznikají i trioploidy a pentaploidy, kteří sice mohou tvořit dobře rostoucí, případně i kvetoucí kolonie, nikdy však nejsou fertillní (Englmaier 2016). Na území České republiky jsou známy pouze tetraploidní cytotypy (Prančl et al. 2018).

Jak již bylo zmíněno (viz. kapitola 1.9.), *R. trichophyllus* má dva cytotypy, které se označují A a B (prozatím nebyly formálně popsány jako taxony). Oba cytotypy jsou tetraploidní a jejich průměrné velikosti genomů se liší o 11 %. *Ranunculus trichophyllus* A má menší genom než *R. trichophyllus* B (viz. Obr. 5). Oba cytotypy jsou plně fertillní. Morfologie těchto dvou typů je velmi podobná. Cytotyp B má však větší květy, silnější lodyhy, delší listy i internodia a je celkově robustnější. Lze je rozlišit i díky odlišné ekologii. *R. trichophyllus* A se vyskytuje ve středních a vyšších nadmořských výškách a v nížinách chybí. Většina jeho lokalit na území České republiky se nachází v oblasti jižních Čech. *R. trichophyllus* B roste naopak hlavně v nížinách a v teplejších oblastech, jako je například

okolí Labe či oblast střední a jižní Moravy. Existují i lokality, kde se vyskytují společně, ale není to časté (Prančl et al. 2018, Kaplan et al. 2019b).

### **1.11. Terestrické formy**

Lakušníky často rostou na místech s proměnlivou hladinou vody. Při přechodu do terestrických podmínek vytvářejí formy odlišné od obvyklých vodních forem. O vytvoření klíče k určování terestrických forem lakušníků se pokusil dosud jen Peter Englmaier (2016). Podle jeho určovacího klíče sterilní jedince určit nelze. Ve své práci poukazuje na to, že ani u kvetoucích či plodících rostlin není determinace snadná.

Když se rostliny dostanou do terestrických podmínek, změní celou svou morfologii a nápadně se zmenší. Lakušníky, které ve vodě tvoří i lupenité listy, mají na suchu často jen listy nit'ovité (Englmaier 2016). U nit'ovitých listů se změna projeví v barvě a velikosti. Listy jsou obvykle menší než u vodních forem a mezi druhy jsou mnohem uniformnější, takže se špatně rozeznávají. Dochází také ke změně velikosti květu (Cook 1966).

Ponořené nit'ovité listy jsou tmavší než listy u terestrických forem. Jejich epidermis obsahuje velké množství chloroplastů, kdežto v mezofylu je jich značně méně. Při změně z vodního prostředí na terestrické chloroplastů v epidermis ubyde, což je provázeno změnou barvy. Chloroplasty naopak přibudou v listovém mezofylu. (Cook 1966, Cook 1969).

Průduchy jsou u ponořených nit'ovitých listů nefunkční, nebo se netvoří vůbec. U terestrických forem mají listy funkční průduchy, které jsou hlavně na adaxiální straně (Cook 1966, Cook 1969).

## 1.12. Cíl práce

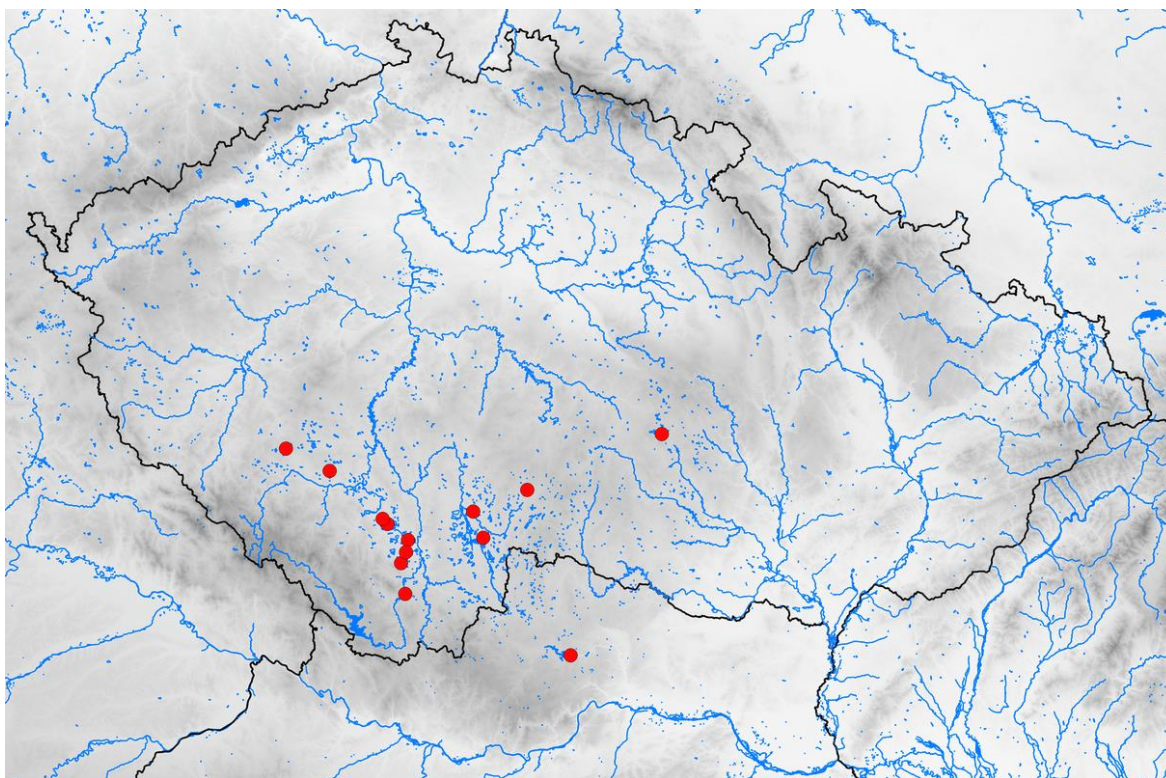
V mé bakalářské práci se budu zabývat určováním terestrických forem druhů *Ranunculus peltatus* a *R. trichophyllus*. Oba tyto druhy rostou v oblasti jižních Čech a na mnohých lokalitách se vyskytují společně. V terestrickém prostředí vypadají velmi podobně, a proto není jednoduché je odlišit. Cílem této práce je zjistit, zda lze terestrické formy obou druhů odlišit, stanovit rozmezí variability jednotlivých znaků pro tyto druhy a výsledky porovnat s literaturou.

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Terénní sběr

V terénu bylo nasbíráno celkem 136 vzorků ze 13 různých lokalit (viz Tab. 1, Obr. 6). Z každé populace bylo náhodně odebráno 2–10 jedinců podle velikosti populace. Všechny rostliny rostly na obnažených substrátech, převážně na rybníčních dnech. Na některých lokalitách se vyskytovaly společně oba sbírané druhy *R. peltatus* a *R. trichophyllus*. Většina míst sběru leží v oblasti jižních Čech, ale byly zařazeny i lokality z oblasti Moravy a severního Rakouska. Z každé rostliny byly otrhány korunní lístky pinzetou a uloženy do malé obálky vytvořené z přehnutého papíru. Zbytek rostliny byl vylisován. Malá část z každého jedince byla odebrána na průtokovou cytometrii pro ověření určení druhu.

Mapu s vyznačenými lokalitami (Obr. 6) mi poskytl Petr Koutecký a je vytvořena v QGIS 3.10.3 (QGIS Development Team 2020). Jako podklad jsou použita SRTM data (Jarvis et al. 2020).



Obr. 6 – Lokality sběru (červeně), podrobnější popis viz. Tab. 1.

Tab. 1 – Seznam lokalit.

Lokalita	GPS souřadnice	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
Česká republika; okres České Budějovice; Zliv: rybník Bezdrev	49°2'52"N, 14°23'9"E	<i>R. peltatus</i>	10	Vlčková L., Koutecký P.	15. 5. 2018
Česká republika; okres České Budějovice; Zliv: rybník Bezdrev	49°2'52"N, 14°23'9"E	<i>R. trichophyllus</i>	8	Vlčková L., Koutecký P.	15. 5. 2018
Česká republika; okres České Budějovice; Habří: Haberský Mlýnský rybník	48°57'24"N, 14°20'37"E	<i>R. trichophyllus</i>	10	Koutecký P., Koutecká E.	9. 9. 2018
Česká republika; okres Pelhřimov; Nová Včelnice: rybník Chochol	49°14'43"N, 15°6'12"E	<i>R. peltatus</i>	6	Dolejšek V., Koutecký P.	13. 6. 2019
Česká republika; okres Klatovy; Olšany: Jámský rybník	49°24'26"N, 13°39'4"E	<i>R. peltatus</i>	7	Vlčková L., Koutecký P.	20. 6. 2019
Česká republika; okres Prachatice; Malovice: rybník Jezero	49°6'41"N, 14°15'42"E	<i>R. trichophyllus</i>	10	Vlčková L., Koutecký P.	29. 5. 2018
Česká republika; okres Strakonice; Leskovice: rybník Malduchy	49°19'12"N, 13°54'51"E	<i>R. peltatus</i>	3	Koutecký P.	10. 7. 2014
Česká republika; okres Strakonice; Leskovice: rybník Malduchy	49°19'12"N, 13°54'51"E	<i>R. trichophyllus</i>	8	Koutecký P.	10. 7. 2014
Česká republika; okres České Budějovice; Čejkovice: rybník Malý Machovec	49°0'1"N, 14°22'25"E	<i>R. peltatus</i>	7	Koutecký P., Koutecká E.	12. 5. 2018
Česká republika; okres České Budějovice; Čejkovice: rybník Malý Machovec	49°0'1"N, 14°22'25"E	<i>R. trichophyllus</i>	7	Koutecký P., Koutecká E.	12. 5. 2018

Lokalita	GPS souřadnice	Taxon	Počet vzorků	Sběratel	Datum
Česká republika; okres Strakonice; Čičenice – Strpí: rybník Nový u Strpí	49°07'53"N, 14°13'59"E	<i>R. peltatus</i>	10	Vlčková L., Koutecký P.	29. 5. 2018
Česká republika; okres Strakonice; Čičenice – Strpí: rybník Nový u Strpí	49°07'53"N, 14°13'59"E	<i>R. trichophyllus</i>	10	Vlčková L., Koutecký P.	29. 5. 2018
Česká republika, okres Jindřichův Hradec; Novosedly nad Nežárkou: rybník Oběšený	49°3'25"N, 14°50'18"E	<i>R. peltatus</i>	7	Vlčková L., Koutecký P.	14. 6. 2018
Česká republika, okres Jindřichův Hradec; Novosedly nad Nežárkou: rybník Oběšený	49°3'25"N, 14°50'18"E	<i>R. trichophyllus</i>	10	Vlčková L., Koutecký P.	14. 6. 2018
Rakousko; okres Zwettl; Rudmanns: rybník Rudmannser Teich	48°35'28"N, 15°21'52"E	<i>R. peltatus</i>	4	Koutecký P.	6. 6. 2017
Rakousko; okres Zwettl; Rudmanns: rybník Rudmannser Teich	48°35'28"N, 15°21'52"E	<i>R. trichophyllus</i>	5	Koutecký P.	6. 6. 2017
Česká republika; okres Tábor; Drahov: rybník Smíchov II	49°09'37"N, 14°46'41"E	<i>R. peltatus</i>	2	Koutecký P.	2. 6. 2014
Česká republika; okres Tábor; Drahov: rybník Smíchov II	49°09'37"N, 14°46'41"E	<i>R. trichophyllus</i>	2	Koutecký P.	2. 6. 2014
Česká republika; okres Žďár nad Sázavou; Znětínek: Staroborský rybník	49°27'51"N, 15°54'47"E	<i>R. peltatus</i>	3	Ekrt L.	Květen 2013
Česká republika; okres Český Krumlov; Černice: Vltava (náplavy pod ústím Jíleckého potoka, 0.9 km JZ od kostela)	48°50'6"N, 14°22'8"E	<i>R. peltatus</i>	7	Koutecký P.	13. 7. 2018

## 2.2. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie sloužila k určení druhu podle velikosti genomu (viz kapitola 1.9.). Rostliny s velikostí genomu 6.50–7.03 pg (resp. poměrem vzorku ku standardu 1.92–2.07) byly klasifikovány jako *R. peltatus*, zatímco *R. trichophyllus* má rozmezí 8.73–9.26 pg (poměr 2.58–2.74) (Prančl et al. 2018). Jako standard byla použita sedmikráska (*Bellis perennis*), jelikož má podobnou velikost genomu jako lakušníky ( $2C = 3.38$  pg, Schönswetter et al. 2007), která se však nepřekrývá se studovanými vzorky.

Nejprve bylo do Petriho misky pipetováno 0.4 ml v ledu vychlazeného pufru Otto I (0.1M kyselina citrónová, 0.5% Tween 20). V ní bylo nasekáno asi 0.25 cm<sup>2</sup> vzorku společně s přibližně stejným množstvím standardu (*Bellis perennis*). Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes 42- $\mu$ m filtr (tkanina Uhelon 130T) a inkubována na 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 0.8 ml pufru Otto II (0.4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O a 2-merkaptoethanol (2  $\mu$ l/ml)). Dále byl přidán buď propidium jodid (PI) a RNáza IIA (finální koncentrace obou 50  $\mu$ g/ml), nebo 4.6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) s koncentrací 4  $\mu$ g/ml. Asi po jedné minutě byly vzorky vloženy do průtokového cytometru. Vzorky s fluorescenčním barvivem DAPI byly analyzovány pomocí průtokového cytometru Partec CyFlow Space (Partec GmbH, Münster, Německo, nyní Sysmex) se zdrojem světla UV-LED (365 nm) a s fluorescencí 3000 – 5000 částic. Vzorky s PI byly analyzovány cytometrem Partec CyFlow SL. Zdrojem záření byl zelený laser (Cobolt Samba, 532 nm, 100 mW). Zaznamenána byla fluorescence 5000 částic. Následně byly vytvořeny histogramy pomocí programu FloMax, ver. 2.4d (Partec GmbH).

## 2.3. Morfometrika

### 2.3.1. Morfometrické znaky

Na vylisovaných vzorcích bylo měřeno 17 znaků, které byly vybrány na základě určovacích klíčů (např. Englmaier 2016) a zkušeností z terénu (viz Tab. 2).

Tab. 2 – Morfometrické znaky.

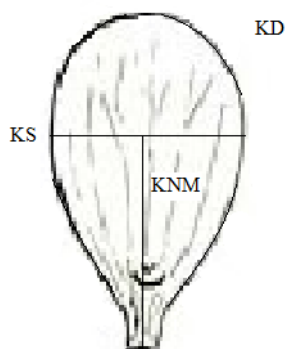
Zkratka znaku	Znak	Popis
LoD	Délka lodyhy	Měřeno pravítkem v mm
LP	Počet listů na lodyze	
RD	Délka řapíku	Měřeno pravítkem v mm
CD	Délka čepele	Měřeno pravítkem v mm
UD	Délka úkrojku posledního řádu	Měřeno pravítkem v mm
US	Šířka úkrojku posledního řádu	Měřeno na binolupě s přesností 0.05 mm
UP	Počet úkrojků	
PIL	Přítomnost lupenitých listů	0 – nepřítomny 1 – přítomny
KSD	Délka květní stopky	Měřeno pravítkem v mm
KD	Délka korunního lístku (viz. Obr. 7)	Měřeno na binolupě s přesností 0.05 mm
KS	Šířka korunního lístku (viz. Obr. 7)	Měřeno na binolupě s přesností 0.05 mm
Kpo	Poměr délky a šířky korunního lístku	KD/KS
KNM	Vzdálenost od báze až po nejširší místo korunního lístku (viz. Obr. 7)	Měřeno na binolupě s přesností 0.05 mm
PSD	Délka plodní stopky	Měřeno pravítkem v mm
NP	Počet nažek	
ND	Délka nažky	Měřeno na binolupě s přesností 0.05 mm
NCh	Chlupatost nažek	0 – bez chlupů 1 – řídce ochlupené 2 – hustě ochlupené

Znaky RD, CD, UD, US a UP byly měřeny na listu, v jehož paždí vyrůstá květní stopka (resp. na listu, v jehož paždí vyrůstá první květní stopka směrem od báze lodyhy, pokud měl jedinec více květů). Pokud byl tento list zdeformován, byl vybrán jiný list odpovídající velikosti.

Znak NCh byl zaznamenán, ale nebyl použit v analýze dat. Většina rostlin měla nažky ochlupené, tudíž by znak neměl při analýzách velký význam. Navíc nažky postupně olysávají a chlupatost tedy závisí na jejich stáří, které se mezi jednotlivými populacemi lišilo.



Původně byl určován i tvar nektárií, ale nakonec od toho bylo upuštěno. Jedná se o znak, který se s přechodem do terestrického prostředí nemění, a navíc je jeho určování z herbářových položek náročné a mohlo by tedy dojít k chybám.



Obr. 7. – Znaky měřené na korunním lístku: KS – šířka, KD – délka, KNM – vzdálenost od báze po nejširší místo korunního lístku. Převzato a upraveno (Ross-Craig 1948).

### 2.3.2. Srovnání s vodními formami

Naměřené znaky byly srovnány s hodnotami pro vodní formy. *Ranunculus peltatus* měřil Vojtěch Dolejšek a data pochází ze souboru 45 jedinců. Znaky na *R. trichophyllus* měřila Johana Hanzlíčková na 68 vzorcích. Získaná data byla porovnána v programech R (verze 3.5.2) (R Core Team 2018) a v RStudio (RStudio Team 2016) t-testem. Následně byla vytvořena tabulka pro srovnání rozmezí hodnot, které dosahují znaky pro terestrické a pro vodní formy.

## 2.4. Analýza dat

Analýza dat byla provedena v programu R pomocí skriptů MorphoTools (Koutecký 2015). Nejprve byla ověřena normalita rozdělení. Jelikož normální rozdělení neměly žádné znaky a většina byla pozitivně šikmá, byly všechny zlogaritmovány. Dále byly spočteny popisné statistiky taxonů (z netransformovaných znaků). Pro zjištění korelace znaků byl stanoven Spearmanův koeficient. Dvojice znaků s koeficientem vyšším než  $|0.9|$  byly považovány za korelované a jeden znak z takové dvojice byl vždy z dalších analýz vyloučen. Dále byla provedena Analýza hlavních komponent (PCA), což je metoda zobrazující

podobnost mezi vzorky. Technika nahrazuje původní soubor pozorovaných znaků souborem nových, vzájemně nekorelovaných znaků. První osa (PC1) je vedena ve směru největší variability mezi objekty, druhá osa (PC2) je kolmá na PC1 a vede ve směru druhé největší variability, atd. Relativní pozice objektů v původním prostoru a v prostoru, který je dán hlavními komponenty, zůstává stejná. Další analýzou byla lineární diskriminační analýza, která rozděluje objekty do předem definovaných skupin a zjišťuje, které znaky se na odlišení objektů podílejí nejvíce. Za účelem zjištění spolehlivosti zařazení do druhů byla provedena klasifikační diskriminační analýza. Výsledkem je procentuální vyjádření úspěšnosti zařazení objektů do správných skupin podle znaků (Marhold & Suda 2001); byla použita kros-validace (tj. postupně je každý jedinec klasifikován podle pravidel založených na analýze všech ostatních jedinců). Zařazení vzorků do druhů (pro diskriminační analýzy a vizualizaci výsledků PCA) je založeno na měření velikosti genomu průtokovou cytometrií.

Všechny tyto analýzy byly provedeny čtyřikrát pro různé kombinace znaků. Nejprve pro všechny znaky, poté jen pro vegetativní znaky, dále pro kombinace vegetativních znaků se znaky měřenými na květu a vegetativních znaků se znaky měřenými na plodu. Důvodem je to, že u některých jedinců nebyly k dispozici všechny znaky, takže každá analýza pracuje s jiným počtem jedinců. Dále toto uspořádání umožňuje porovnat úspěšnost určování v závislosti na tom, jaké znaky jsou k dispozici (zda můžeme spolehlivěji určit vegetativní, kvetoucí, či plodné rostliny).

## **2.5. Sekvenování morfologicky nejasných jedinců**

Jedinci, kteří z analýz vyšli morfologicky velmi podobní druhému druhu, byli osekvenováni. Ověřilo se tak, že se nejedná o zpětné hybridy, které pomocí průtokového cytometru nelze poznat, ale vzácně se u lakušníků vyskytují (Prančl et al. 2018). Jednalo se o dohromady o 9 vzorků, které byly pomocí průtokového cytometru určeny jako *R. peltatus*, ale podle výsledků analýzy hlavních komponent a diskriminační analýzy se podobali *R. trichophyllus*.

### 2.5.1 Izolace DNA

Nejprve byla DNA ze všech vzorků izolována pomocí NaOH. U některých vzorků však izolace neproběhla úspěšně kvůli stavu materiálu, a tak byla provedena CTAB metoda. Použity byly listy vysušené v silikagelu, pokud nebyly k dispozici, tak herbářové položky.

Při izolaci pomocí NaOH bylo ke vzorku tkáně (velmi malé množství, přibližně 2–3 úkrojky ponořených listů nebo cca 1 mm<sup>2</sup> lupenitého listu) v 1.5 ml eppendorfce přidáno 20 µl 0.5M NaOH. Poté byla tkáň rozdracena pomocí homogenizátorku a sterilního písku. V případě potřeby bylo přidáno dalších 20 µl 0.5M NaOH a pokračovalo se v drcení. Poté byly vzorky vloženy do centrifugy na 2 min při 13 000 rpm. Do PCR stripu bylo napipetováno po 30 µl 100mM Tris-HCl pufru, pH 8.3. Poté byly z centrifugovaných vzorků odebrány 3 µl supernatantu (ředění 1 : 10) a byly přepipetovány do připravených stripů s pufrem 100mM Tris-HCl. Pokud byly vzorky výrazně zbarveny, byly dále ředěny roztokem 100mM Tris-HCl pufru. Vzorky byly skladovány v mrazáku při -20°C.

Při izolaci pomocí CTAB metody bylo použito asi 0.5 cm<sup>2</sup> listu, které se vložilo společně s dvěma kovovými kuličkami do 1.5 ml eppendorfky s rovným víčkem. Eppendorfky byly upnuty do nástavců mlýnku Retsch 400MM. Byla nastavena základní doba homogenizace – 1 min na maximální rychlost. K rozdracnému materiálu bylo v digestoři přidáno 700 µl zásobního roztoku CTAB (2% (w/v) CTAB, 0.1M Tris, 0.02M Na<sub>2</sub>-EDTA, 1.4M NaCl, 2% (w/v) PVP-40) a 10 µl 2-merkptoethanolu. Poté byly zkumavky uzavřeny, promíchány proklepáním a 30 min inkubovány na třepačce při 50 °C. Následně byly vzorky krátce stočeny na stolní centrifuze (2–3 s) a roztoky byly přeneseny do nových 1.5 ml eppendorfek. Kuličky byly přesunuty do Petriho misky, propláchnuty vodou a osušeny buničinou. V digestoři bylo do zkumavek přidáno 500 µl směsi chloroform : isoamylalkohol v poměru 24 : 1. Poté byly zkumavky několikrát převráceny a ponechány v klidu. Po pěti minutách byly vloženy do centrifugy na 10 min při 10 000 rpm. Po centrifugaci byla v digestoři přepipetována horní vodná fáze (cca 500 µl) do nových označených 1.5 ml eppendorfek a k tomu bylo přidáno 500 µl vychlazeného isopropanolu. Tyto zkumavky byly po několika převráceních nechány cca 30 min stát v -20 °C. Po uplynutí této doby byly vzorky centrifugovány 5 min při 13 000 rpm. Po centrifugaci byl na dně zkumavky vidět drobný bílý pelet DNA. Supernatant byl v digestoři odpipetován a do zkumavek s DNA bylo přidáno 400 µl vychlazeného 96% ethanolu. Zkumavky byly promíchány proklepnutím. Poté byly

vzorky inkubovány 15 min v termobloku při 37 °C. Následně byly opět stočeny na centrifuze po dobu 5 min při 13 000 rpm. Zbylý supernatant byl opět odpipetován. Do každé zkumavky bylo přidáno 200 µl vychlazeného 70% ethanolu a vzorky byly promíchány proklepnutím. Poté byly ponechány 5 min v pokojové teplotě. Po 5 minutách byly opět vloženy do centrifugy na 5 min při 13 000 rpm. Supernatant byl opět odpipetován a otevřené zkumavky zůstaly otevřené 15 min při pokojové teplotě, aby se pelet DNA vysušil. Následně bylo k peletu přidáno 30 µl sterilní vody. Vzorky byly ponechány přes noc v ledničce, aby se DNA zcela rozpustila.

### 2.5.2 PCR

Vyizolovaná DNA byla použita pro PCR amplifikaci úseku ITS (Internal transcribed spacer) jaderné DNA a jednoho chloroplastového úseku. K amplifikaci ITS byly použity primery ITS-F (King et al. 2001) a ITS4 (White et al. 1990). Další amplifikovanou oblastí byl chloroplastový úsek 3'*rps16*–5'*trnK* pomocí primerů *rps16x2-a* a *trnKx1-a* (Shaw et al. 2007). Sekvence všech primerů jsou vypsány v tabulce 3.

Objem jedné reakce byl 7.5 µl a skládal se z 3.75 µl PP Master Mix (Top-Bio, Česká republika), 0.45 µl každého primeru (koncentrace 5 µM), 2.35 µl H<sub>2</sub>O a 0.5 µl DNA. Celá směs kromě DNA byla nejprve namíchána do jedné zkumavky a postupně rozdělena do stripů. Poté byla přidána DNA, jeden vzorek byl bez DNA a sloužil jako kontrola. Takto připravené vzorky byly krátce stočeny na centrifuze a vloženy do přístroje. PCR probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace při 94 °C po dobu 5 minut, dále 35 cyklů po 30 s při 94 °C, poté 30 s při teplotě 53 °C a 1 min při 72 °C. Závěrečná extenze trvala 10 min a probíhala při 72 °C.

Tab. 3 – Sekvence primerů.

Název primeru	Sekvence primeru	Citace
ITS-F	CTC CTT CCT CTA AAT GAT A	King et al. 2001
ITS4	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA	White et al. 1990
<i>rps16x2-a</i>	GAA AGT GGG TTT TTA TGA TCC	Shaw et al. 2007
<i>trnKx1-a</i>	TAA AAG CCG AGT ACT CTA CC	Shaw et al. 2007

### 2.5.3 Elektroforéza

Pro kontrolu, zda u všech vzorků proběhla PCR, byla použita elektroforéza. Bylo smícháno 1.5  $\mu$ l PCR produktu s 0.5  $\mu$ l nanášecího pufru, který obsahuje fluorescenční barvivo GelRed. Směs vzorků a barviva byla spolu s ladderem (100 bp) přenesena na 1.5% agarózový gel v pufru TBE. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V. Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyfocen v UV světle pomocí programu Scion VisiCapture. U vzorků, u kterých nebyl viditelný jeden intenzivní proužek amplifikované DNA, byla izolovaná DNA zředěna sterilní vodou v poměru 1 : 10 a PCR byla opakována se zředěnými vzorky i s původním izolátem.

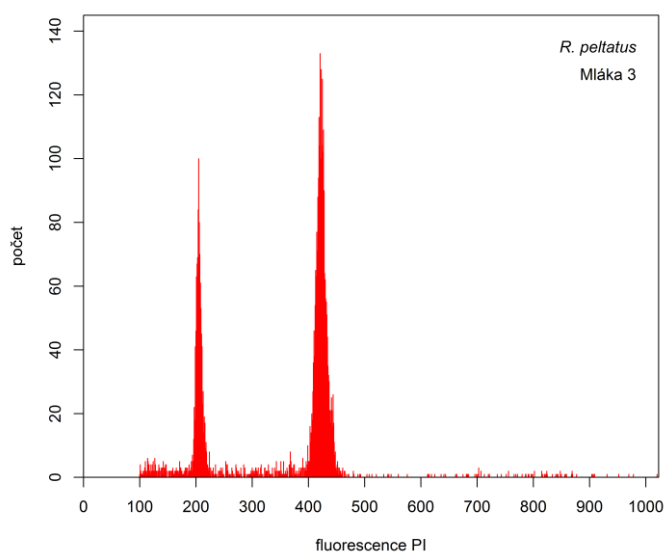
### 2.5.4. Sekvence vzorků

PCR produkty byly enzymaticky přečištěny (směs ExoSAP). Byly smíchány vždy 2  $\mu$ l PCR produktu s 0.7  $\mu$ l enzymů a takto připravené vzorky byly krátce stočeny centrifugou a vloženy do cycleru (15 min 37°C, 15 min 85°C). Poté byla do nových eppendorfek připravena sekvenační směs. Na jeden vzorek bylo použito 2.5  $\mu$ l forward primeru (ITS-F nebo rps 16x2-a), 4.8  $\mu$ l vody a 2.7  $\mu$ l PCR produktu po přečištění. Takto připravené vzorky byly poslány na sekvenaci do firmy GATC Biotech (součást Eurofins Genomics). Poté byla data otevřena a upravena v programu Finch TV 1.4 software (Geospiza, USA). Byly vymazány nečitelné začátky a konce sekvencí a pozice s mnohonásobnými píky (kdy nižší pík dosahoval alespoň čtvrtinu výšky vyššího píku) byly upraveny podle IUPAC kódů. Výsledné sekvence byly seřazeny v programu BioEdit 7.2.0 (Hall 1999) a srovnány se vzorovou sekvencí. V programu FaBox (Villesen 2007) byly sekvence rozděleny do haplotypů (skupin identických sekvencí).

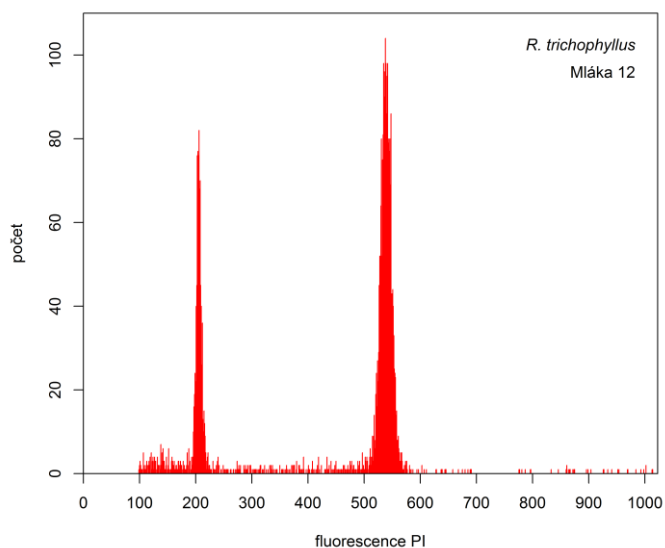
### 3. Výsledky

#### 3.1. Průtoková cytometrie

Příklady typických histogramů z průtokové cytometrie pro druhy *R. peltatus* (Obr. 8) a *R. trichophyllus* (Obr. 9) se standardem *Bellis perennis* při měření s barvivem PI.



Obr. 8 – Histogram fluorescence jader *R. peltatus* a standardu *Bellis perennis* (rybník Oběšený, Mláka). Pík standardu je umístěn cca na kanálu 200.



Obr. 9 – Histogram fluorescence jader *R. trichophyllus* a standardu *Bellis perennis* (rybník Oběšený, Mláka). Pík standardu je umístěn cca na kanálu 200.

Pro všechny analýzy byl vypočten poměr vzorku a standardu. Analýzy provedené s fluorescenčním barvivem DAPI byly později přepočteny, aby poměry odpovídaly analýzám s barvivem PI. Poměr vzorek / standard pro *R. peltatus* vychází s DAPI v průměru 1.227x menší než s PI (hodnota je získaná z porovnání 34 populací, Koutecký et al., nepubl. data). Tyto poměry byly tedy vynásobeny, aby odpovídaly hodnotám získaných s barvivem PI. Pro *R. trichophyllus* je koeficient přepočtu 1.266 (data pro přepočet pochází ze souboru 14 populací).

Rostliny s rozmezím poměru vzorku a standardu 1.94–2.14 byly klasifikovány jako *R. peltatus* a rostliny s poměrem 2.56–2.70 jako *R. trichophyllus* (viz. Tab. 4). Dříve zjištěné rozmezí pro *R. peltatus* je 1.92–2.07 a pro *R. trichophyllus* 2.58–2.74 (Prančl et al. 2018). Do těchto rozmezí nezapadají dva vzorky. Vzorek 4 z Jámského rybníku měl poměr 2.14 a byl klasifikován jako *R. peltatus*. Velikost poměru u F1 hybridů obou druhů je výrazně vyšší (okolo 2.35). Tento jedinec byl později osekvenován. Vzorek 5 z Rudmannser Teich, který byl klasifikován jako *R. trichophyllus*, měl poměr 2.56, což je jen o málo méně, než teoretické rozmezí.

Tab. 4 – Cytometrická analýza. Průměr – průměrná fluorescence, počet – počet jader, CV % – koeficient variance v procentech, poměr – poměr vzorku a standardu s PI a s DAPI.

	<i>Ranunculus</i>			<i>Bellis</i>				
Vzorek	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %	Poměr DAPI	Poměr PI
<b><i>Ranunculus peltatus</i> 4x</b>								
Chochol 1–4	377,3	2407	2,1	184,9	287	2,4		2,04
Chochol 5–7	402,5	2872	2,0	200,2	844	2,3		2,01
Jámský 1	338,6	2328	1,3	207,0	682	1,6	1,64	2,01
Jámský 2	335,7	1022	1,2	205,2	992	1,3	1,64	2,01
Jámský 3	336,5	2348	1	201,8	806	1,3	1,67	2,05
Jámský 4	354,9	764	1,0	204,0	292	1,6	1,74	2,14
Jámský 5–7	331,6	3348	1,6	202,2	640	1,4	1,64	2,01
Bezdrev 1–5	402,5	2545	2,9	200,7	1074	3,1		2,01
Bezdrev 6–10	419,8	2418	3,3	209,7	367	3,7		2,00
Bezdrev 11–14	428,5	2173	3,1	215,1	698	3,2		1,99
Malý Machovec 8–11	405,4	3267	2,5	203,2	534	2,8		2,00
Malý Machovec 12–14	411,5	3056	2,8	208,7	537	2,7		1,97
Vltava 1–4	419,1	2742	2,4	209,3	502	2,8		2,00

Vzorek	<i>Ranunculus</i>			<i>Bellis</i>			Poměr DAPI	Poměr PI
	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %		
Vltava 5–7	405,1	2299	2,7	201,9	649	2,6		2,01
Oběšený 1	419,3	2919	2,6	211,4	841	2,6		1,98
Oběšený 2	409,7	2332	2,1	205,5	1645	2,9		1,99
Oběšený 3	421,8	2327	1,9	204,8	947	2,5		2,06
Oběšený 4	411,4	2169	2,3	203,6	1416	2,2		2,02
Oběšený 6	409,1	2603	2,1	203,9	1238	2,5		2,01
Oběšený 7	413,9	2746	2,3	205,1	1093	2,6		2,02
Oběšený 8	421,8	2372	2,1	206,1	1565	2,6		2,05
Oběšený 9	408,1	3324	2,0	207,1	818	2,3		1,97
Nový 11	416,7	1887	2,9	202,4	813	3,7		2,06
Nový 12, 14–16	424,0	2748	3,1	211,6	445	3,1		2,00
Nový 13	388,9	2641	2,7	196,3	725	3,3		1,98
Nový 17, 18, 20, 22	401,6	2753	2,9	199,0	484	3,0		2,02
Nový 19	411,7	2229	3,1	204,7	880	3,6		2,01
Nový 21	421,8	2207	3,2	210,3	490	2,8		2,01
Malduchy 1	411,4	2205	4,4	210,2	1051	4,8		1,96
Malduchy 4	406,3	2844	3,2	206,3	682	3,9		1,97
Malduchy 6	418,9	2975	3,5	214,1	628	3,7		1,96
Rudmannser Teich 5	404,5	2528	2,9	204,4	810	3,4		1,98
Rudmannser Teich 6	415,0	2680	3,1	210,4	859	3,3		1,97
Rudmannser Teich 12	405,2	3098	2,7	206,0	520	3,2		1,97
Rudmannser Teich 13	400,8	2564	2,8	202,3	539	3,1		1,98
Smíchov II 3	428,1	1058	2,5	211,3	1079	2,7		2,03
Smíchov II 4	427,2	712	2,4	208,2	1201	2,8		2,05
Staroborský 1	411,9	842	2,8	212,5	568	2,6		1,94
Staroborský 2	413,3	1296	2	212,3	938	2,9		1,95
Staroborský 3	417,3	1520	2,7	214,1	1179	2,9		1,95
<b><i>Ranunculus trichophyllus</i> A</b>								
Bezdrev 1–4	541,1	1781	2,2	207,8	473	2,9		2,60
Bezdrev 5–8	546,9	1180	2,6	210,6	767	3,4		2,60
Malý Machovec 1–4	550,5	3160	2,2	207,8	581	2,9		2,65
Malý Machovec 5–7	547,9	3255	2,2	207,6	490	2,9		2,64
Oběšený 1–5	538,9	2359	1,5	205,5	514	2,1		2,62
Oběšený 6–8	550,6	2923	2,0	206,9	565	2,2		2,66
Oběšený 9–11	548,0	2666	2,1	206,4	740	2,5		2,66
Oběšený 12	539,2	2395	1,8	205,2	814	2,3		2,63
Jezero 1–5	533,8	2488	3,1	201,7	891	3,2		2,65
Jezero 6–10	536,6	2247	2,8	199,0	665	3,4		2,70



Vzorek	<i>Ranunculus</i>			<i>Bellis</i>			Poměr DAPI	Poměr PI
	Průměr	Počet	CV %	Průměr	Počet	CV %		
Jezero 11	533,0	1176	1,5	203,5	1438	2,6		2,62
Jezero 12	543,7	1677	1,9	205,7	1293	2,8		2,64
Jezero 13	530,7	1513	2,4	204,9	941	3,3		2,59
Jezero 14–16	557,7	1648	3,1	210,8	974	3,6		2,65
Nový 1	568,6	2371	3,3	212,4	851	3,7		2,68
Nový 2–5	548,6	2812	2,2	203,8	388	2,5		2,69
Nový 6, 8, 9	558,5	2108	2,9	210,4	535	3,2		2,66
Nový 7	570,7	1952	2,3	212,4	591	3,7		2,69
Nový 10	557,6	1475	1,7	209,5	1164	3,1		2,66
Haberský Mlýnský 1	557,1	1931	2,0	210,9	1308	2,9		2,64
Haberský Mlýnský 2, 3, 5–7	539,7	2578	2,0	202,7	1301	2,9		2,66
Haberský Mlýnský 4	546,6	2564	1,6	208,0	992	2,6		2,63
Haberský Mlýnský 9–13	543,7	3043	2,2	203,9	563	2,8		2,67
Malduchy 1	560,6	2417	3,0	212,9	702	5,0		2,63
Malduchy 2	580,5	2118	2,6	219,1	477	2,5		2,65
Malduchy 3	577,7	1987	3,0	215,0	670	3,2		2,69
Malduchy 4	560,5	2665	2,7	208,2	549	2,9		2,69
Malduchy 5	591,5	2493	2,2	223,8	611	3,2		2,64
Malduchy 6–10	422,0	2803	1,8	194,4	500	1,6	2,17	2,66
Rudmannser Teich 1	521,5	2440	2,1	196,0	704	2,6		2,66
Rudmannser Teich 2	511,0	1821	2,8	195,1	892	3,0		2,62
Rudmannser Teich 3	531,6	2001	2,9	202,4	760	3,4		2,63
Rudmannser Teich 4	524,9	2032	2,4	200,5	969	2,9		2,62
Rudmannser Teich 5	513,5	2124	3,0	200,9	979	4,4		2,56
Smíchov II 1	602,1	1863	2,1	224,9	1464	2,9		2,68
Smíchov II 2	552,1	905	2,4	205,8	736	3,4		2,68

### 3.2. Morfometrické analýzy

#### 3.2.1. Popisná statistika taxonů

Jako první analýza byla spočtena popisná statistika taxonů (viz. Tab. 5). Pro každý znak byl vypočten aritmetický průměr, směrodatná odchylka (SD) a medián. Dále byla zaznamenána nejnižší a nejvyšší hodnota pro daný znak, z nichž bylo vytvořeno rozmezí pro srovnání s literaturou.

Tab. 5 – Popisná statistika taxonů. N – počet vzorků, SD – směrodatná odchylka, Min – nejnižší naměřená hodnota, Max – nejvyšší naměřená hodnota. Znak PIL byl kódován jako přítomnost/nepřítomnost, ve sloupci průměr je tedy uveden podíl jedinců s plovoucími listy, ostatní statistiky nemají pro tento znak smysl.

Znak	Taxon	N	Průměr	SD	Min	Medián	Max
LoD	Pelt	66	60.15	30.29	18	50	132
LoD	Trich	69	28.78	12.71	6	30	57
LP	Pelt	66	5.65	1.96	2	5	9
LP	Trich	69	4.52	1.59	2	5	8
RD	Pelt	65	8.72	4.44	2	8	20
RD	Trich	70	7.24	4.08	3	6	31
CD	Pelt	65	10.81	3.89	5	10	21
CD	Trich	70	7.69	2.94	1	7	17
UD	Pelt	65	2.65	1.03	1	2.5	5.5
UD	Trich	70	2.76	1.19	1	2.5	8
US	Pelt	65	0.31	0.14	0.1	0.3	0.95
US	Trich	70	0.39	0.18	0.15	0.35	1.5
UP	Pelt	64	66.39	31.46	16	63	195
UP	Trich	70	18.21	6.36	8	17	39
PIL	Pelt	66	0.41				
PIL	Trich	70	0				
KSD	Pelt	57	32.74	10.31	17	31	60
KSD	Trich	65	15.95	6.019	2	15	32
KD	Pelt	54	8.31	1.67	3.75	8.45	11.65
KD	Trich	65	4.08	0.92	1.55	4	6.15
KS	Pelt	54	5.74	1.46	3.1	5.78	8.75
KS	Trich	65	2.33	0.69	0.9	2.1	4.5
Kpo	Pelt	54	1.48	0.26	1.03	1.49	2.42
Kpo	Trich	65	1.80	0.29	1.23	1.78	2.69
KNM	Pelt	54	5.85	1.40	2	5.75	8.5
KNM	Trich	65	2.86	0.69	1	2.75	4.5
PSD	Pelt	42	33.74	10.12	16	33	60
PSD	Trich	41	15.86	4.72	6	15	28
NP	Pelt	42	25.67	7.32	10	25	47
NP	Trich	41	19.80	6.31	10	20	40
ND	Pelt	42	1.11	0.24	0.45	1.18	1.45
ND	Trich	41	1.14	0.25	0.75	1.15	2

### 3.2.2. Srovnání s vodními formami lukušníků

Naměřené hodnoty pro terestrické formy lukušníků byly srovnány s hodnotami pro vodní formy (viz. Tab. 6, 7). Některé znaky, které jsem měřila ve své bakalářské práci, nebyly pro vodní formy změřeny, proto jsou z tabulky vynechány.

Pro porovnání, zda se tyto dvě formy lukušníků liší, byl použit t-test, který srovnával jednotlivé znaky pro vodní a terestrické formy. U hodnot p byla provedena korekce False discovery rate. Výsledky t-testů jsou zaznamenány v tabulkách 6 a 7. Většina znaků se podle analýz mezi vodními a terestrickými formami průkazně liší. U druhu *R. peltatus* vyšel neprůkazně pouze počet nažek a u *R. trichophyllus* poměr délky a šířky korunního lístku ( $p > 0.05$ ).

Tab. 6 – Srovnání znaků pro terestrické a vodní formy u *Ranunculus peltatus*.

Znak	Terestrické formy		Vodní formy		t	df	p
	Rozmezí	Průměr	Rozmezí	Průměr			
Délka řapíku nitřovitého listu	2–20 mm	8.8 mm	15–63 mm	34.3 mm			
Délka čepele nitřovitého listu	5–21 mm	10.8 mm					
Délka úkrojku posledního řádu	1–5.5 mm	2.7 mm	4–19 mm	7.8 mm	-11.03	51.8	$2.68 \times 10^{-14}$
Délka korunního lístku	3.8–11.7 mm	8.3 mm	6–12.2 mm	10 mm	-4.93	94.39	$5.63 \times 10^{-06}$
Šířka korunního lístku	3.1–8.75 mm	5.7 mm	4.5–12.8 mm	7.7 mm	-5.88	86.03	$1.51 \times 10^{-07}$
Poměr délky a šířky korunního lístku	1.03–2.42	1.5	0.95–1.7	1.32	3.64	91.88	0.0005
Vzdálenost od báze až po nejširší místo korunního lístku	2–8.5 mm	5.9 mm	4–9.5 mm	7 mm	-4.35	94.9	$4.64 \times 10^{-05}$
Délka plodní stopky	15–60 mm	34 mm	25–90 mm	51 mm	-7.03	61.69	$5.17 \times 10^{-09}$
Počet nažek	10–47	26	1–57	23	0.05	35.35	0.9631
Délka nažky	0.45–1.45 mm	1.11 mm	1.25–2.1 mm	1.64 mm	-8.38	42.02	$6.7 \times 10^{-10}$

Tab. 7 – Srovnání znaků pro terestrické a vodní formy u *Ranunculus trichophyllus*.

Znak	Terestrické formy		Vodní formy		t	df	p
	Rozmezí	Průměr	Rozmezí	Průměr			
Délka řapíku	3–31 mm	7.2 mm	1.7–7 mm	3.6 mm	7.07	80.83	1.65x10 <sup>-9</sup>
Délka čepele	1–17 mm	7.7 mm	8.1–32.5 mm	21.3 mm	-16.7	96.54	1.10x10 <sup>-15</sup>
Počet úkrojků	8–39	18	20–99	39	-11.8	95.05	1.10x10 <sup>-15</sup>
Délka korunního lístku	1.6–6.2 mm	4.1 mm	1.6–5.8 mm	3.5 mm	3.42	125.54	0.0011
Šířka korunního lístku	0.9–4.1 mm	2.3 mm	0.7–3.6 mm	1.9 mm	3.84	123.32	0.0003
Poměr délky a šířky korunního lístku	1.2–2.7	1.8	1.34–3.43	1.88	-1.3	123.19	0.1746
Vzdálenost od báze až po nejširší místo korunního lístku	1–4.5 mm	2.9 mm	1.1–4 mm	2.5 mm	2.18	87.01	0.0354
Délka plodní stopky	6–28 mm	15.9 mm	10–44 mm	24 mm	-6.69	97.33	2.82x10 <sup>-9</sup>
Počet nažek	10–40	20	18–41	28	-7.05	75.06	1.84x10 <sup>-9</sup>
Délka nažky	0.75–2 mm	1.14 mm	1.03–1.73 mm	1.43 mm	-6.97	57.26	5.90x10 <sup>-9</sup>

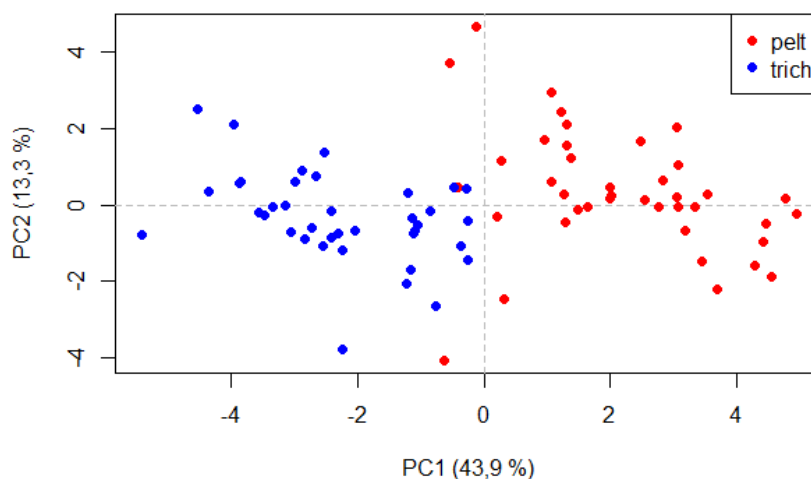
### 3.2.3. Korelační analýza

Dále byla provedena Spearmanova korelace. Za úzce korelované byly považované znaky s korelačním koeficientem vyšším než |0.9|. Znaky KNM (vzdálenost od báze až po nejširší místo korunního lístku) a KS (šířka korunního lístku) byly oba korelovány se znakem KD (délka korunního lístku). Na základě těchto výsledků byly znaky KNM a KS vynechány z dalších analýz.

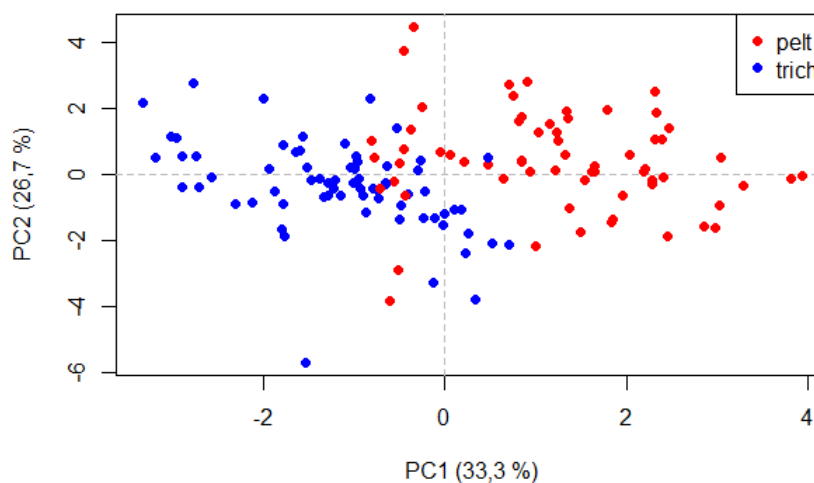
### 3.2.4. Analýza hlavních komponent

Analýza hlavních komponent (PCA) byla provedena pro různé kombinace znaků (všechny znaky – Obr. 10, Obr. 14, vegetativní znaky – Obr. 11, Obr. 15, vegetativní znaky a znaky měřené na květu – Obr. 12, Obr. 16, vegetativní znaky a znaky na plodu – Obr. 13, Obr. 17). U všech kombinací byly vzorky rozděleny do dvou skupin podle první osy.

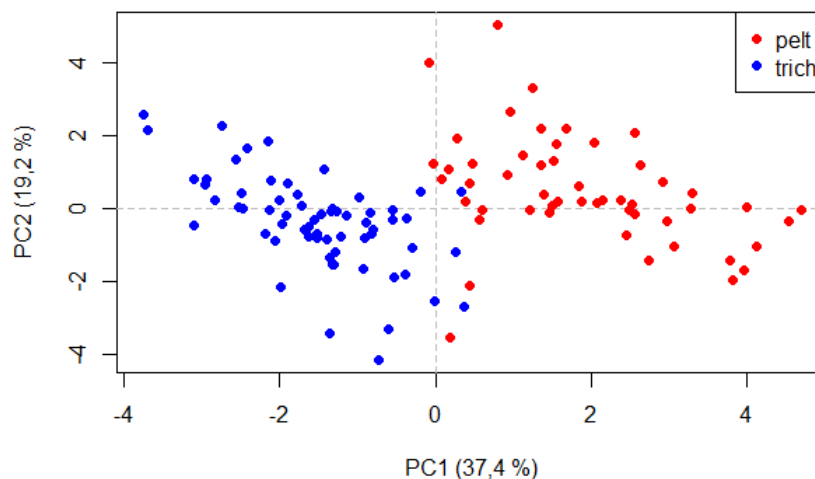
Na základě PCA bylo vybráno 9 jedinců (z populací rostoucích na rybnících Bezdrev, Oběšený, Jámský a Nový), kteří byli podle průtokové cytometrie určeni jako *R. peltatus*, ale v analýze vyšli jako velmi podobní *R. trichophyllus*. Tito jedinci byli osekvenováni, aby mohla být vyloučena možnost, že se jedná o zpětné křížence. Vzorky, u kterých byl potvrzen hybridní původ, byly z dalších analýz vynechány.



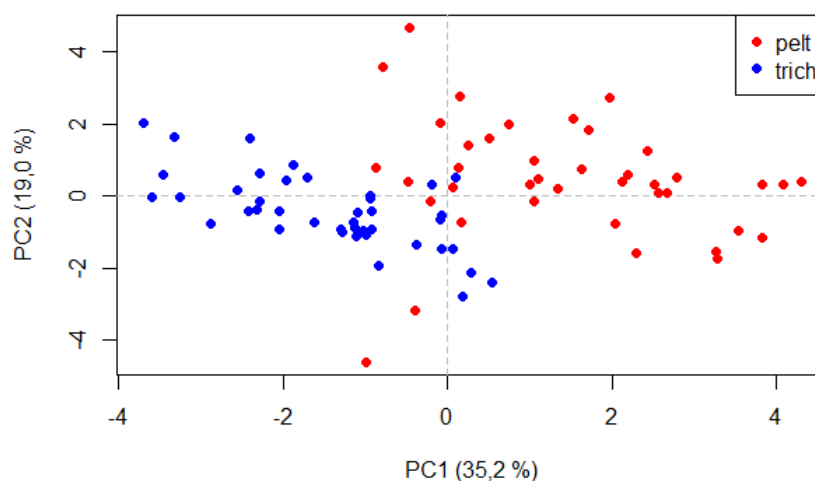
Obr. 10 – Analýza hlavních komponent pro kombinaci všech znaků. První osa vysvětluje 43.9 % variability, druhá 13.3 %.



Obr. 11 – Analýza hlavních komponent pro vegetativní znaky. První osa vysvětluje 33.3 % variability, druhá 26.7 %.

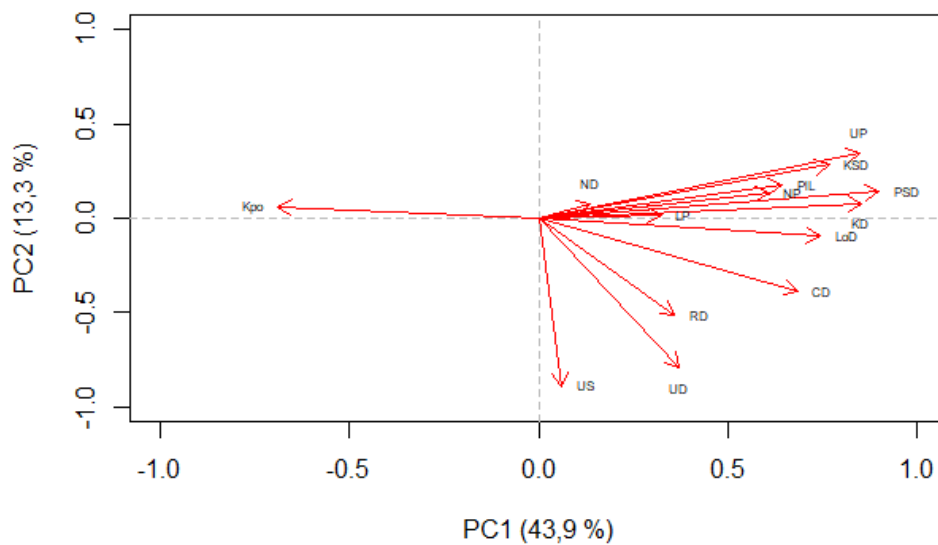


Obr. 12 – Analýza hlavních komponent pro kombinaci vegetativních znaků a znaků měřených na květu. První osa vysvětluje 37.4 % variability, druhá vysvětluje 19.2 %.

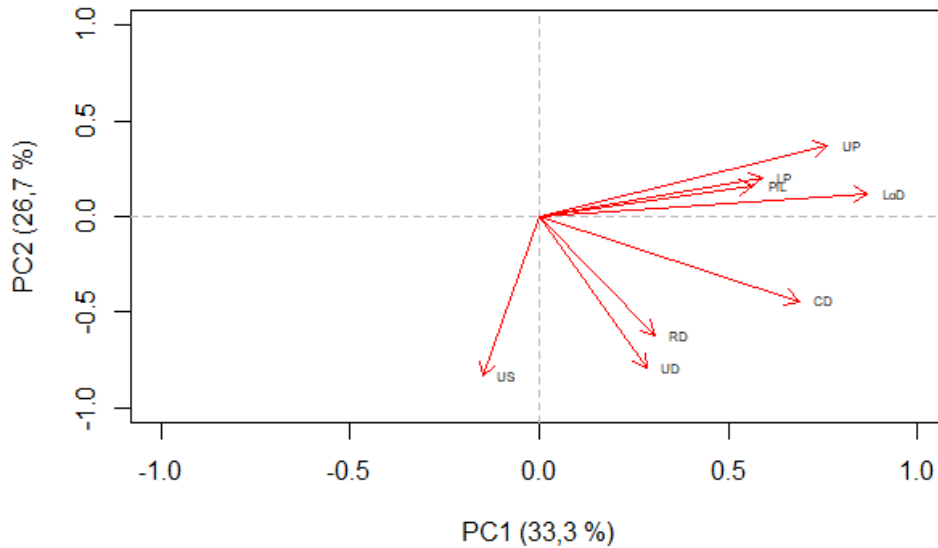


Obr. 13 – Analýza hlavních komponent pro kombinaci vegetativních znaků a znaků měřených na plodu. První osa vysvětluje 35.2 % variability, druhá 19.0 %.

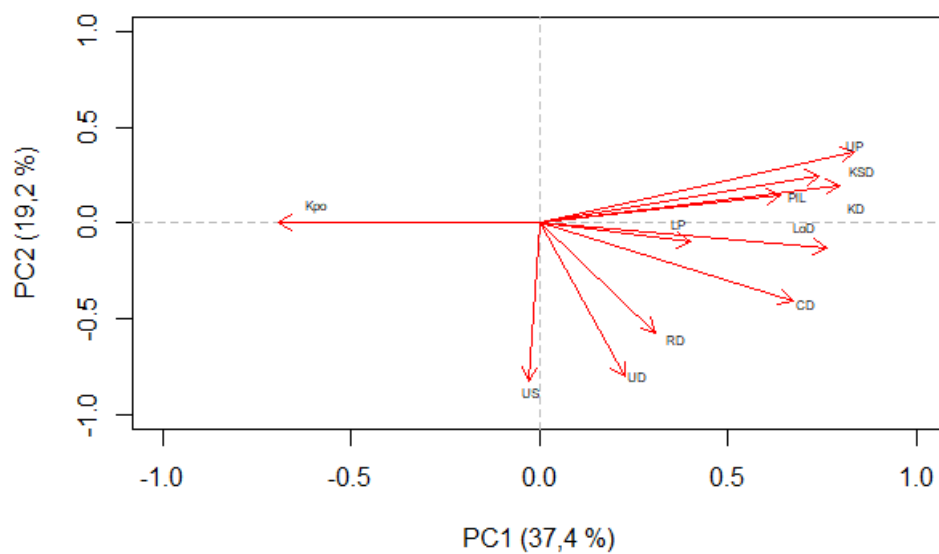
U analýzy, která zahrnovala všechny znaky, byly s první osou nejvíce korelovány znaky PSD (délka plodní stopky), KD (délka korunního lístku), UP (počet úkrojků) (viz. Obr. 14). U analýzy pro vegetativní znaky to byly převážně LoD (délka lodyhy) a UP (viz. Obr. 15). Znaky nejvíce korelované s první osou u kombinace zahrnující vegetativní znaky a květy byly LoD, UP a KD (viz. Obr. 16). Pro kombinaci vegetativních znaků s plody se jednalo o znaky PSD, LoD a UP (viz. Obr. 17).



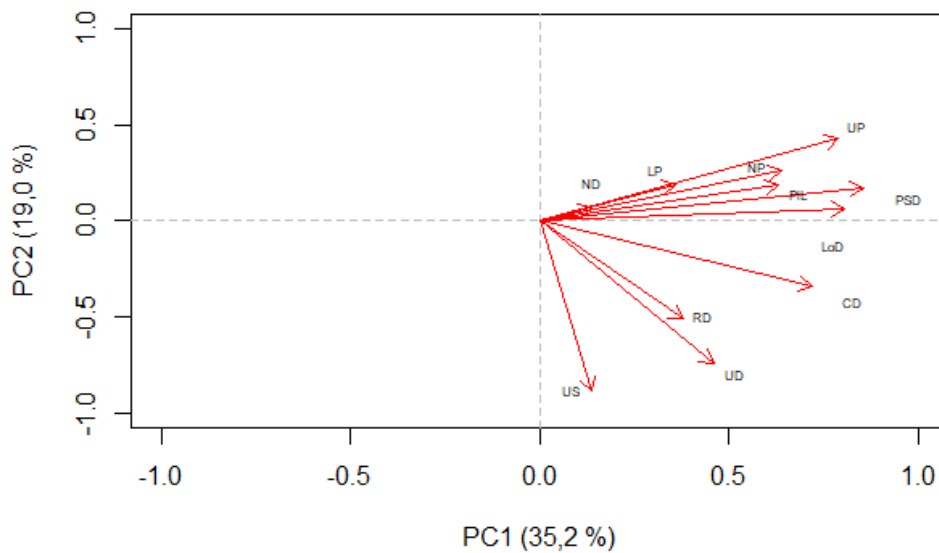
Obr. 14 – Analýza hlavních komponent pro kombinaci všech znaků – korelace znaků s osami. První osa vysvětluje 43.9 % variability, druhá 13.3 %.



Obr. 15 – Analýza hlavních komponent pro vegetativní znaky – korelace znaků s osami. První osa vysvětluje 33.3 % variability, druhá 26.7 %.



Obr. 16 – Analýza hlavních komponent pro kombinaci vegetativních znaků a znaků měřených na květu – korelace znaků s osami. První osa vysvětluje 37,4 % variability, druhá vysvětluje 19,2 %.



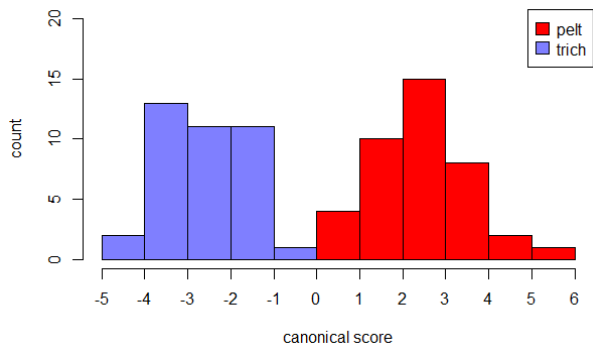
Obr. 17 – Analýza hlavních komponent pro kombinaci vegetativních znaků a znaků měřených na plodu – korelace znaků s osami. První osa vysvětluje 35,2 % variability, druhá 19,0 %.



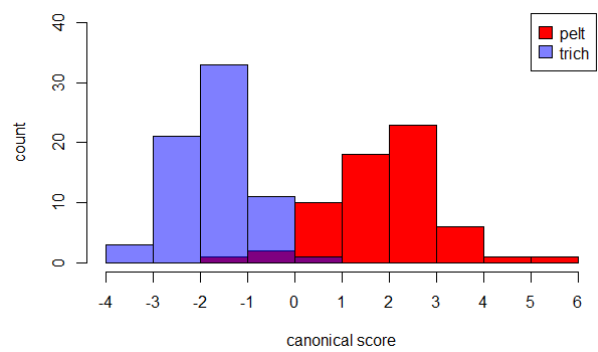
### 3.2.5. Lineární diskriminační analýza

Na základě cytometrických měření byly vzorky klasifikovány do dvou skupin. Lineární diskriminační analýza odhalila znaky, které takto vymezené skupiny nejlépe odlišují.

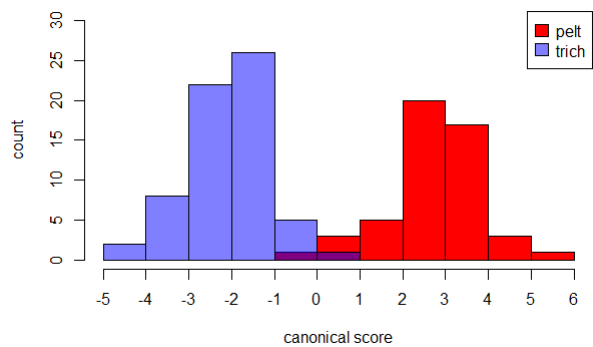
Nejprve jsou uvedeny histogramy lineární klasifikační analýzy (Obr. 18–21). Na ose x je uvedeno kanonické skóre a na ose y počet jedinců. V analýze všech znaků se skóre skupin nepřekrývají, u ostatních analýz je mezi skupinami překryv, ale velmi malý. Následuje tabulka, která ukazuje, jakou výpovědní hodnotu mají jednotlivé znaky při klasifikaci (Tab. 8). První část tabulky vždy uvádí výsledky analýzy pro jednotlivé znaky (bez ohledu na ostatní znaky). Druhá část tabulky vyjadřuje unikátní příspěvek znaku. V této analýze jsou nejprve použity všechny ostatní znaky a pak je posuzován příspěvek testovaného znaku. Jelikož znaky mohou být vzájemně korelované, mohou samy o sobě průkazně odlišovat skupiny, ale jejich unikátní příspěvek může být malý. Znaky s hodnotou  $p < 0.05$  jsou významné pro oddělení skupin. V prvním případě vyšlo, že většina znaků nese určitou výpovědní hodnotu a je zásadní pro oddělení skupin. Jako znaky s  $p > 0.05$ , a tedy nepříliš vypovídající o správné klasifikaci, byly při kombinacích pro různé znaky často UD a NP, tedy délka úkrojku a počet nažek. Dále se v některých analýzách objevily jako znaky s vysokou hodnotou  $p$  RD a US (délka řapíku a šířka úkrojku). Naproti tomu v druhém typu analýzy, kdy byl zjišťován unikátní příspěvek znaku, vyšla většina znaků neprůkazně. Jako znaky s  $p < 0.05$ , a tedy nesoucí unikátní informaci, se často objevovaly UP, UD, RD a další (počet úkrojků, délka úkrojku a délka řapíku).



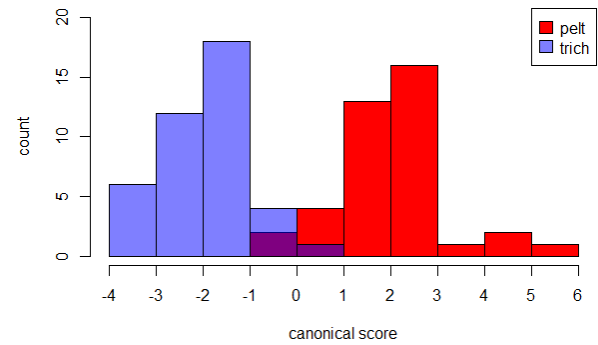
Obr. 18 – Lineární diskriminační analýza pro všechny znaky.



Obr. 19 – Lineární diskriminační analýza pro vegetativní znaky.



Obr. 20 – Lineární diskriminační analýza pro vegetativní znaky a znaky měřené na květu.



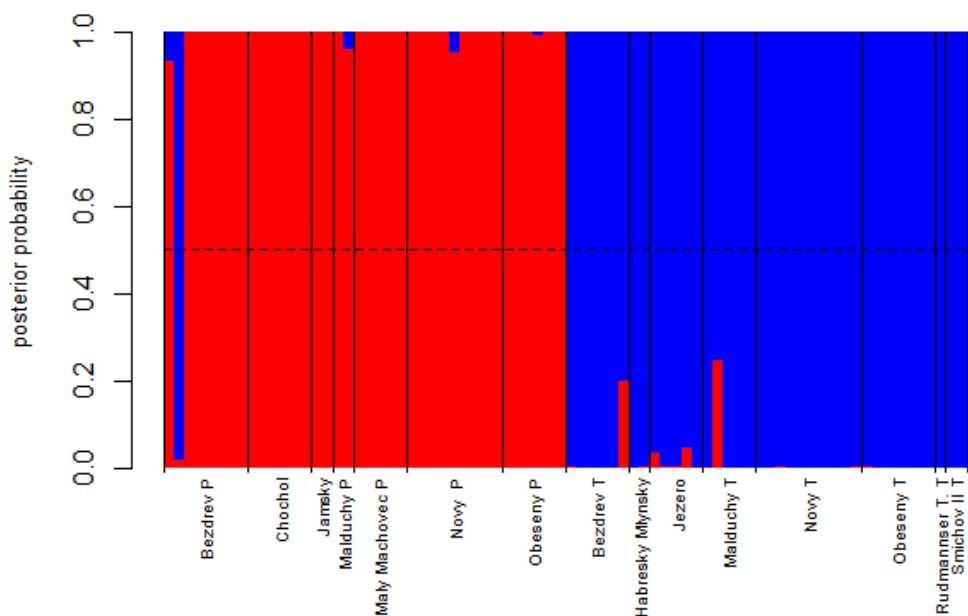
Obr. 21 – Lineární diskriminační analýza pro vegetativní znaky a znaky měřené na plodu.

Tab. 8 – Morfologické znaky testované lineární diskriminační analýzou.

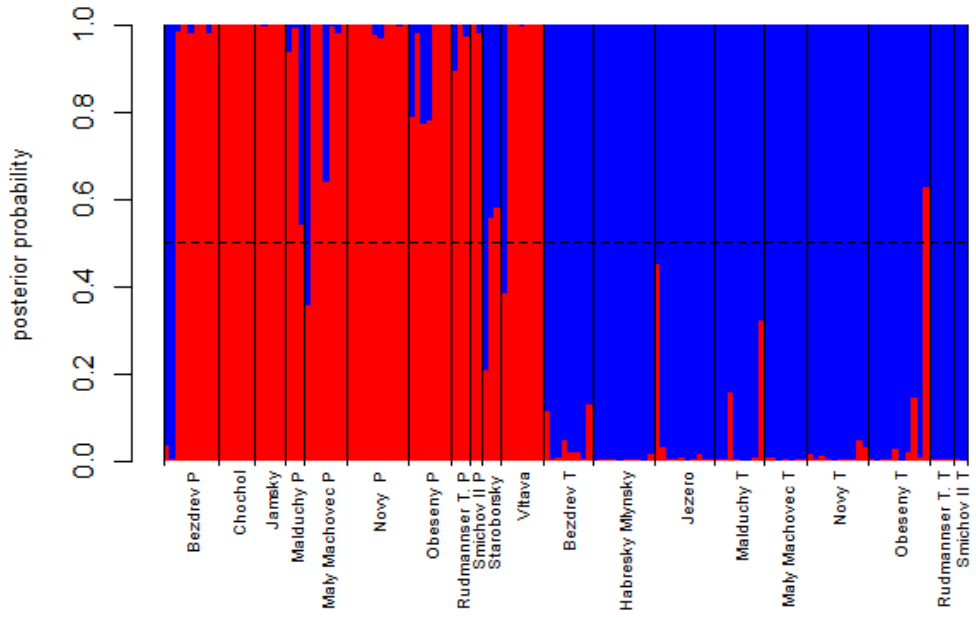
Znak	Všechny znaky				Vegetativní znaky				Vegetativní znaky a znaky na květu				Vegetativní znaky a znaky na plodu			
	Znaky samostatně		Unikátní příspěvek		Znaky samostatně		Unikátní příspěvek		Znaky samostatně		Unikátní příspěvek		Znaky samostatně		Unikátní příspěvek	
	F	p	F	P	F	p	F	P	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>PIL</b>	37.03	<b>0.005</b>	46.50	<b>0.005</b>	46.50	<b>0.005</b>	9.04	<b>0.003</b>	49.88	<b>0.005</b>	3.35	0.081	42.00	<b>0.005</b>	3.50	0.071
<b>LoD</b>	35.28	<b>0.005</b>	66.46	<b>0.005</b>	66.46	<b>0.005</b>	1.63	0.216	52.73	<b>0.005</b>	1.68	0.215	38.53	<b>0.005</b>	0.86	0.365
<b>LP</b>	4.07	0.05	12.28	<b>0.005</b>	12.28	<b>0.005</b>	0.09	0.752	9.14	<b>0.005</b>	0.16	0.692	3.49	0.05	0.01	0.938
<b>RD</b>	5.82	<b>0.015</b>	3.63	<b>0.03</b>	3.63	<b>0.03</b>	9.24	<b>0.004</b>	3.71	0.05	3.99	0.05	5.42	<b>0.035</b>	3.85	0.056
<b>CD</b>	13.04	<b>0.005</b>	26.74	<b>0.005</b>	26.74	<b>0.005</b>	0.01	0.922	21.19	<b>0.005</b>	0.28	0.602	14.17	<b>0.01</b>	1.33	0.258
<b>UD</b>	0.22	0.6	0.66	0.43	0.66	0.43	1.11	0.303	0.79	0.34	2.66	0.117	0.29	0.62	1.48	0.233
<b>US</b>	1.85	0.2	14.73	<b>0.005</b>	14.73	<b>0.005</b>	0.14	0.71	5.92	<b>0.025</b>	0.54	0.45	2.26	0.205	0.21	0.658
<b>UP</b>	143.66	<b>0.005</b>	306.39	<b>0.005</b>	306.39	<b>0.005</b>	70.70	<b>0.001</b>	265.54	<b>0.005</b>	16.50	<b>0.001</b>	149.94	<b>0.005</b>	14.46	<b>0.001</b>
<b>KSD</b>	79.27	<b>0.005</b>	2.75	0.115					111.42	<b>0.005</b>	1.83	0.161				
<b>KD</b>	164.63	<b>0.005</b>	26.14	<b>0.001</b>					262.69	<b>0.005</b>	40.35	<b>0.001</b>				
<b>Kpo</b>	30.51	<b>0.005</b>	6.86	0.015					44.75	<b>0.005</b>	1.96	0.16				
<b>PSD</b>	121.04	<b>0.005</b>	0.05	0.813									129.12	<b>0.005</b>	14.40	<b>0.001</b>
<b>NP</b>	13.94	<b>0.005</b>	1.53	0.216									16.01	<b>0.005</b>	1.08	0.31
<b>ND</b>	0.80	0.375	15.02	<b>0.001</b>									0.40	0.49	3.27	0.066

### 3.2.6. Klasifikační diskriminační analýza

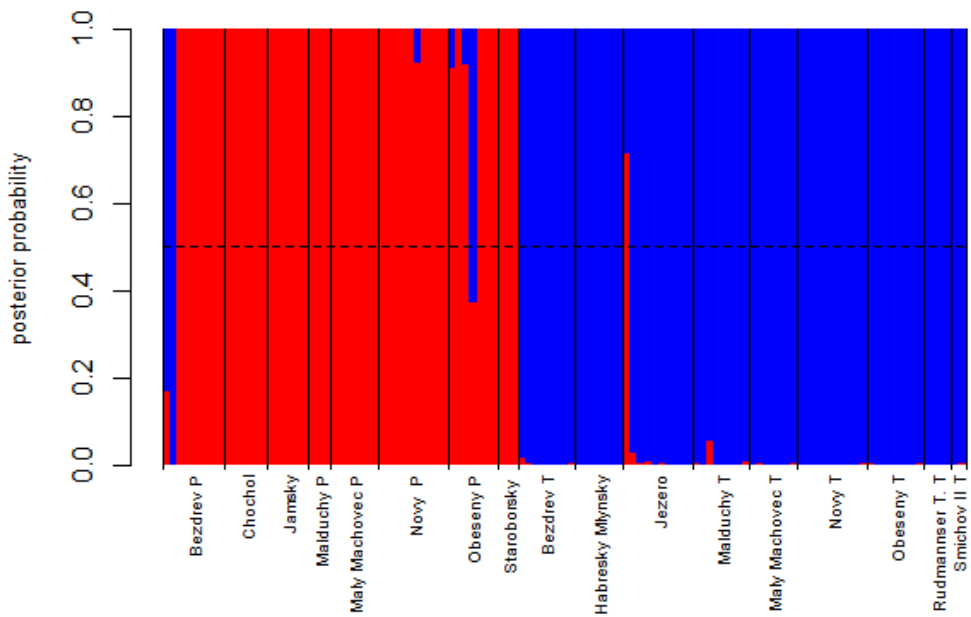
Klasifikační diskriminační analýza určila procento správně zařazených jedinců a populací do druhů. Analýza byla opět opakována čtyřikrát pro různé kombinace znaků (viz. Obr. 22–25). Na ose x jsou znázorněny jednotlivé populace a na ose y je pravděpodobnost klasifikace (posterior probability). V tabulkách 9–12 jsou uvedena procenta správně zařazených vzorků do druhů. Hodnoty *posterior probability* ukazují, že většina jedinců je klasifikována do jedné ze skupin s vysokou pravděpodobností, u některých (zejména u vegetativních znaků, ale někdy i u generativních) je ale klasifikace poměrně nejistá (tj. pravděpodobnosti pro obě skupiny jsou v řádu desítek procent). Nejčastěji docházelo k záměnám na rybníku Bezdrev, kde nebyly zařazeny všechny vzorky správně ani u jedné z provedených klasifikačních diskriminačních analýz. K dalším záměnám nebo nejistým klasifikacím došlo u vzorků z rybníků Malý Machovec, Staroborský, Oběšený, Malduchy a z Vltavy.



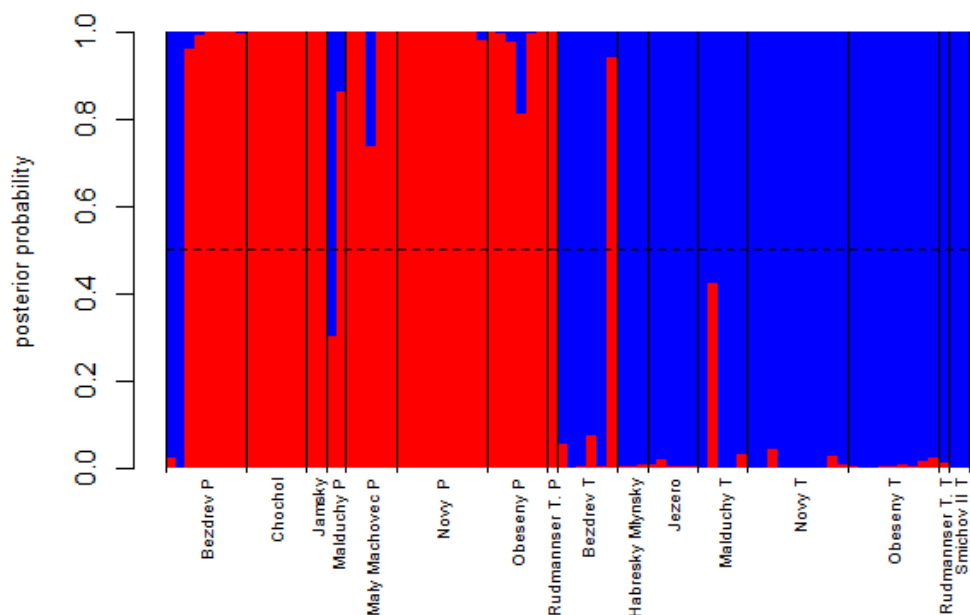
Obr. 22 – Klasifikační diskriminační analýza pro všechny znaky. Červeně pravděpodobnost klasifikace jako *R. peltatus*, modře *R. trichophyllus*.



Obr. 23 – Klasifikační diskriminační analýza pro vegetativní znaky. Červeně pravděpodobnost klasifikace jako *R. peltatus*, modře *R. trichophyllus*.



Obr. 24 – Klasifikační diskriminační analýza pro vegetativní znaky v kombinaci se znaky měřenými na květu. Červeně pravděpodobnost klasifikace jako *R. peltatus*, modře *R. trichophyllus*.



Obr. 25 – Klasifikační diskriminační analýza pro vegetativní znaky společně se znaky měřenými na plodu. Červeně pravděpodobnost klasifikace jako *R. peltatus*, modře *R. trichophyllus*.

Tab. 9 – Počty a procenta správně zařazených vzorků do druhů na základě klasifikační diskriminační analýzy všech znaků.

Taxon	<i>R. peltatus</i>	<i>R. trichophyllus</i>	Počet jedinců (N)	Správně určení jedinci (v %)
<i>R. peltatus</i>	38	1	39	97.44
<i>R. trichophyllus</i>	0	37	37	100
<b>Celkem</b>	<b>38</b>	<b>38</b>	<b>76</b>	<b>98.68</b>

Tab. 10 – Počty a procenta správně zařazených vzorků do druhů na základě klasifikační diskriminační analýzy vegetativních znaků.

Taxon	<i>R. peltatus</i>	<i>R. trichophyllus</i>	Počet jedinců (N)	Správně určení jedinci (v %)
<i>R. peltatus</i>	57	5	62	91.94
<i>R. trichophyllus</i>	1	68	69	98.55
<b>Celkem</b>	<b>58</b>	<b>73</b>	<b>131</b>	<b>95.42</b>

Tab. 11 – Počty a procenta správně zařazených vzorků do druhů na základě klasifikační diskriminační analýzy vegetativních znaků a znaků měřených na květu.

Taxon	<i>R. peltatus</i>	<i>R. trichophyllus</i>	Počet jedinců (N)	Správně určení jedinci (v %)
<i>R. peltatus</i>	47	3	50	94
<i>R. trichophyllus</i>	1	63	64	98.44
Celkem	48	66	114	<b>96.49</b>

Tab. 12 – Počty a procenta správně zařazených vzorků do druhů na základě klasifikační diskriminační analýzy vegetativních znaků a znaků měřených na plodu.

Taxon	<i>R. peltatus</i>	<i>R. trichophyllus</i>	Počet jedinců (N)	Správně určení jedinci (v %)
<i>R. peltatus</i>	36	3	39	92.31
<i>R. trichophyllus</i>	1	40	41	97.56
Celkem	37	43	80	<b>95</b>

### 3.2.7. Sekvence morfologicky nejasných jedinců

K ověření, zda se nejedná o zpětné hybridy, bylo osekvenováno dohromady 9 vzorků. Byly vybrány vzorky č. 15 a 16 z populace Bezdrev, vzorky č. 1, 3 a 4 z rybníku Oběšený, vzorek č. 6 z Jámského rybníku a č. 11 z Nového rybníku. Hybridní původ se potvrdil u jedince z Jámského rybníku, proto byly pro kontrolu osekvenovány další dva vzorky z této populace. Byl vybrán vzorek 4, který dle výsledků PCA vycházel také blízko druhu *R. trichophyllus* a měl velikost genomu mimo obvyklé rozmezí. Druhým vybraným vzorkem byl vzorek č. 2, který z analýz vyšel jasně jako *R. peltatus* a byl osekvenován pro ujištění, že celá populace není složena ze zpětných kříženců.

V jaderném úseku ITS studovaných vzorků byly nalezeny 4 haplotypy (viz. Tab. 13), v chloroplastovém úseku *3'rps16–5'trnK* byly nalezeny 2 (viz. Tab. 14). Jako vzorové sekvence pro *R. peltatus* byly použity vzorky z lokalit Chanovice, Bohdaneč, Lipno a Žemlička, pro *R. trichophyllus* byly vybrány vzorky z lokalit Vlkov, Chanovice a Žehrov (P. Koutecký, J. Prančl et al., nepublikovaná data; vybrané sekvence reprezentují nejčastější varianty u obou druhů ve střední Evropě).

Sekvence rostlin č. 4 a 6 z populace Jámský se v chloroplastovém úseku shodovaly se sekvencí pro *R. trichophyllus*, ačkoliv velikost genomu a ITS sekvence odpovídaly *R. peltatus*, a proto byli tito jedinci určeni jako zpětní hybridy. U ostatních testovaných rostlin molekulární data potvrzují určení jako *R. peltatus*.

Tab. 13 – Polymorfismy v úseku ITS jaderné DNA. Vzorové sekvence jsou označeny modrou barvou. Polymorfismy jsou označeny IUPAC kódy a nukleotidy identické s první sekvencí pro daný druh jsou znázorněny tečkami.

Taxon, vzorek	Haplotyp	Pozice							
		36	63	86	94	103	155	200	604
<i>R. trichophyllus</i>									
Vlkov	A	C	A	C	T	C	G	T	C
Chanovice trich.	B	Y	R	.	Y	.	R	Y	.
Žehrov	C	T	G	.	C	.	A	C	.
<i>R. peltatus</i>									
Lipno	D	C	G	C	T	C	G	C	C
Bohdaneč 4	E	.	G	Y	.	Y	.	C	.
Bohdaneč 1	F	.	R	Y	.	Y	.	C	.
Bezdrev 15	F	.	R	Y	.	Y	.	C	.
Bezdrev 16	F	.	R	Y	.	Y	.	C	.
Mláka 1	F	.	R	Y	.	Y	.	C	.
Nový 11	F	.	R	Y	.	Y	.	C	.
Žemlička	G	.	G	.	.	Y	.	C	.
Jámský 2	G	.	G	.	.	Y	.	C	.
Jámský 4	G	.	G	.	.	Y	.	C	.
Jámský 6	G	.	G	.	.	Y	.	C	.
Chanovice pelt.	H	.	G	.	.	T	.	C	.
Mláka 3	H	.	G	.	.	T	.	C	.
Mláka 4	I	.	G	.	.	Y	.	C	Y



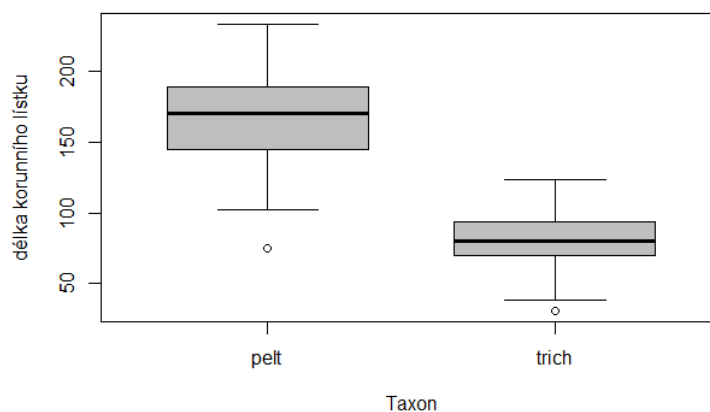
Tab. 14 – Polymorfismy v chloroplastovém úseku 3'*rps16*–5'*trnK*. Vzorové sekvence jsou znázorněny modrou barvou. Chybějící nukleotidy jsou znázorněny pomlčkami a nukleotidy identické se vzorovými sekvencemi jsou znázorněny tečkami.

Taxon, vzorek	Haplotyp	Pozice			
		287–288	299	304	549–554
<i>Ranunculus trichophyllus</i>					
Vlkov	A	TT	-	T	-----
Jámský 4	A	..	.	.	.....
Jámský 6	A	..	.	.	.....
<i>Ranunculus peltatus</i>					
Chanovice pelt.	B	--	G	C	AATTTT
Bezdrev 15	B	.	.	.	.....
Bezdrev 16	B	.	.	.	.....
Mláka 1	B	.	.	.	.....
Mláka 3	B	.	.	.	.....
Mláka 4	B	.	.	.	.....
Nový 11	B	.	.	.	.....
Jámský 2	B	.	.	.	.....

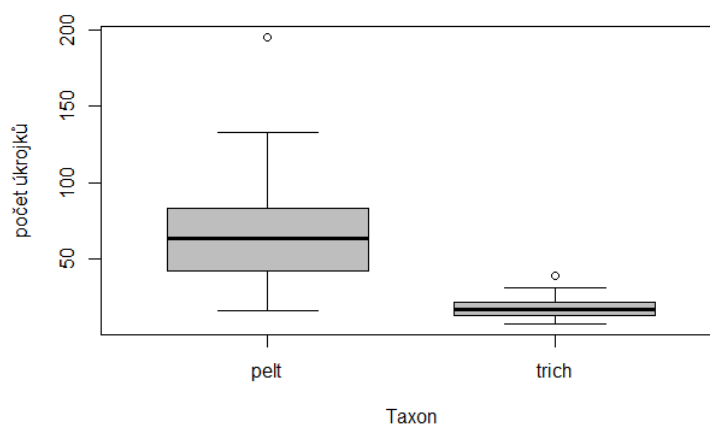
## 4. Diskuze

Na základě provedených analýz bylo zjištěno, že od sebe druhy *R. peltatus* a *R. trichophyllus* lze odlišit, a to dokonce i ve sterilním stavu. Nejlepší jsou pro determinaci jednoznačně rostliny s vyvinutými květy i plody, naopak nejhůře v analýzách dopadlo určování pouze podle vegetativních znaků a podle rostlin s plody. Určováním terestrických forem lakušníků podle vegetativních znaků se dosud nikdo nezabýval a tato bakalářská práce dokazuje, že u druhů *R. peltatus* a *R. trichophyllus* je takové odlišení možné. Výsledky analýz pro kombinaci vegetativních znaků se znaky květů a vegetativních znaků s plody jsou podobné, ale květy se zdají být pro determinaci spolehlivější.

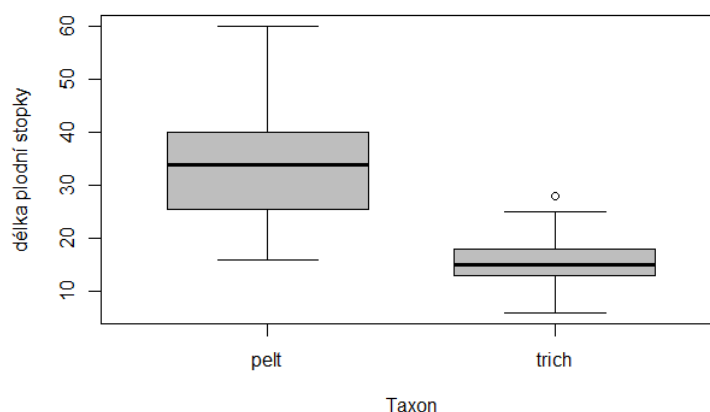
Znaků, které od sebe odlišují oba druhy, je mnoho (viz. kapitola 3.1.5., Tab. 8). Z těch nejdůležitějších je to např. délka korunního lístku, počet úkrojků nit'ovitých listů, délka plodní stopky či přítomnost lupenitých listů. Pro ilustraci jsou níže uvedeny krabicové diagramy pro první tři znaky s největší vysvětlující silou (určené na základě hodnot F). Jde o délku korunního lístku, počet úkrojků nit'ovitého listu a délku podní stopky (viz. Obr. 26–28). Jako spolehlivý znak jistě poslouží i tvar nektária, který se při přechodu do terestrických podmínek nemění, ale já jsem ho ve své bakalářské práci neurčovala. *R. peltatus* může mít výrazně delší lodyhu (18–132 mm) než *R. trichophyllus* (6–57 mm). Často má také větší čepel listů a větší počet listových úkrojků (16–195) než *R. trichophyllus* (8–39). Ten může mít naopak delší a širší úkrojky i delší řapíky. Rozdíly mezi těmito znaky však nejsou příliš velké a většina rozmezí naměřených hodnot se překrývá. Větší rozdíl je v délce květní stopky (17–60 mm u *R. peltatus* a 2–32 mm u *R. trichophyllus*) a velikosti květu. *R. peltatus* má korunní lístky delší (*R. pelt.* 3.75–11.65 mm, *R. trich.* 1.55–6.15 mm), s čímž jsou spojené i vyšší naměřené hodnoty pro šířku korunního lístku. Plodní stopka je stejně jako květní stopka delší u *R. peltatus* (*R. pelt.* 16–60 mm, *R. trich.* 6–28 mm). V počtu nažek není tak znatelný rozdíl, i když *R. peltatus* má trochu větší rozmezí. Důležitější se zdá být velikost nažek, které jsou u *R. trichophyllus* delší (0.75–2 mm) než u *R. peltatus* (0.45–1.45 mm). Z uvedených rozmezí znaků vyplývá, že jediný znak pro správnou determinaci nestačí, jelikož se hodnoty z velké části překrývají. Obecně lze ale říci, že *R. trichophyllus* dosahuje často nižšího vzrůstu, má menší květy a kratší květní i plodní stopky.



Obr. 26 – Krabicový diagram pro délku korunního lístku. Pelt – *Ranunculus peltatus*, trich – *R. trichophyllus*. Střední část diagramu je ohraničena 1. a 3. kvartilem, černá linie vymezuje medián; spojnice pod 1. kvartilem a nad 3. kvartilem vyjadřují variabilitu a tečky zázorňují odlehlé hodnoty.



Obr. 27 – Krabicový diagram pro počet úkrojků niťovitého listu. Pelt – *Ranunculus peltatus*, trich – *R. trichophyllus*. Střední část diagramu je ohraničena 1. a 3. kvartilem, černá linie vymezuje medián; spojnice pod 1. kvartilem a nad 3. kvartilem vyjadřují variabilitu a tečky zázorňují odlehlé hodnoty.



Obr. 28 – Krabicový diagram pro délku plodní stopky. Pelt – *Ranunculus peltatus*, trich – *R. trichophyllus*. Střední část diagramu je ohraničena 1. a 3. kvartilem, černá linie vymezuje medián; spojnice pod 1. kvartilem a nad 3. kvartilem vyjadřují variabilitu a tečky zázorňují odlehlé hodnoty.

V klasifikační diskriminační analýze bylo nejvíce jedinců zařazeno do druhu správně mezi rostlinami, které měly květy i plody zároveň. Analýza identifikovala jedince bezchybně v 98.68 % případů. Druhá nejúspěšnější byla kombinace vegetativních znaků společně se znaky květu (96.49 %). Třetí v pořadí byla analýza provedená pouze s vegetativními znaky (95.42 %) a jako nejméně úspěšná byla vyhodnocena kombinace vegetativních znaků s plody (95 %). Procentuální úspěšnost v klasifikační diskriminační analýze byla tedy pro všechny kombinace znaků vysoká a získané hodnoty předčily počáteční očekávání. Obecně byli častěji zaměňováni zástupci *R. peltatus* za *R. trichophyllus* než naopak (viz. Tab. 9–12).

V rámci některých populací docházelo k záměnám častěji než v jiných, z čehož vyplývá, že vzorky z těchto lokalit se více podobaly opačnému druhu. Jedná se o rostliny z rybníků Bezdrev, Malý Machovec, Staroborský, Oběšený, Malduchy a z řeky Vltavy (viz. Obr. 20–23). Mohlo by to být způsobeno podmínkami vnějšího prostředí, jako je např. množství dostupných živin. Na živinami chudých stanovištích mohou být jedinci druhu *R. peltatus* menšího vzrůstu než jedinci rostoucí na bohatých substrátech, a tím se morfologicky přibližovat druhu *R. trichophyllus*. Zároveň může morfologii rostlin ovlivňovat i množství dostupné vody. Jedinci rostoucí na rychle vysychajících obnažených dnech tak dorostou menších rozměrů než ti, kteří mají dostatek vláhy po celou dobu růstu. Vliv na velikost a celkovou morfologii má i stáří rostlin. Na některých rybnících se vhodné podmínky k růstu naskytou brzy (např. v dubnu) a tito jedinci se pak mohou plně vyvinout, kdežto na jiných lokalitách mohou být vhodné podmínky až koncem jara. Tyto rostliny pak nestihnou narůst velkých rozměrů, jelikož jejich růst potlačí konkurenčně silné letní druhy.

Na všech zmíněných lokalitách s výjimkou Staroborského rybníku a lokality na Vltavě se vyskytovaly oba druhy zároveň. Nabízela by se tak hypotéza, že se jedná o hybridy. Tato možnost ale může být vyloučena, jelikož problematičtí jedinci, kteří byli vybráni na základě PCA, byli osekvenováni. Byly vybrány 2 vzorky z rybníku Bezdrev, 3 z rybníku Oběšený, 1 z Nového a 1 z Jámského rybníku. Na základě velikosti genomu byly všechny tyto vzorky určeny jako *R. peltatus*. Z výsledků sekvenace vyplývá, že pouze vzorek z Jámského rybníku (Jámský 6) je ve skutečnosti zpětným křížencem. Pro kontrolu, že se nejedná o populaci skládající se ze samých zpětných kříženců, byly osekvenovány další dva vzorky z tohoto rybníku. Sekvenace potvrdila, že i v případě vzorku Jámský 4 se jedná o dalšího zpětného křížence, tento vzorek byl i morfologicky posunutý k *R. trichophyllus* a měl velikost genomu na horní hranici rozmezí *R. peltatus*, zatímco další testovaný vzorek (Jámský 2) vychází

jednoznačně jako *R. peltatus*. Na této lokalitě se zrovna, na rozdíl od mnoha dalších, nevyskytovaly oba druhy společně. Výskyt hybridů jen s jedním z rodičů nebo i samostatně je ale u lakušníků známý (Prančl et al. 2018, Kaplan et al. 2019b). Mnoho z jedinců, kteří byli sekvenováni, navíc vycházelo podle analýzy hlavních komponent jako ještě podobnější *R. trichophyllus* než tito hybridy, ale ve skutečnosti patří k *R. peltatus*, jak se původně předpokládalo. Zpětné hybridy od ostatních rostlin tedy jasně morfologicky vymezit nelze.

Tabulky 15 a 16 ukazují srovnání mých výsledků s dostupnou literaturou. Uvedené hodnoty se týkají vodních forem lakušníků. Obecně lze říci, že terestrické formy mají často mnohem kratší lodyhu a o trochu menší listy i květy, přičemž délka korunního lístku se mění více u *R. peltatus* než u *R. trichophyllus*, který má korunní lístky menší i ve vodním prostředí. Květní stopka může být velice krátká, a to i u *R. peltatus*, není to však pravidlem a často dosahuje podobné velikosti, jako se uvádí v literatuře. Při přechodu na sucho dochází i ke zkrácení plodní stopky, což má velký význam pro správnou determinaci, jelikož druhy *R. peltatus* a *R. trichophyllus* se odlišují mimo jiné délkou květní a plodní stopky. Velikost nažek byla u některých jedinců podobná, jinde se ale výrazně lišila a nažky dosahovaly mnohem menších velikostí. Jejich počet byl často podobný, jako se uvádí v literatuře.

Tab. 15 – Srovnání naměřených znaků druhu *R. peltatus* s literaturou.

<i>Ranunculus peltatus</i>						
Znak	Naměřené znaky u terestrických forem	Klíč ke květeně České republiky (Kaplan et al. 2019a)	Květena České republiky (Hejný & Slavík 1997)	Flóra Slovenska (Futák et al. 1982)	Klíč pro Rakousko, Lichtenštejnsko a jižní Tyrolsko (Fisher et al. 2008)	Klíč pro Německo (Jäger et al. 2011)
Délka lodyhy	18–132 mm		0.3–1.5 (2) m		0.5–2 m	0.2–2 m
Délka řapíku	2–20 mm	délka niťovitého listu 10–80 mm (vč. řapíku)	do 25 mm	do 25 mm		do 80 mm
Délka čepele	5–21 mm					
Přítomnost lupenitých listů	ano	ano	ano	ano	ano	ano
Délka květní stopky	14–60 mm		do 50 mm (nebo o trochu více)			
Délka korunního lístku	3.8–11.7 mm	(6) 8–15 mm	5–17 (20) mm	9–17 mm		(9) 12–15 (23) mm
Délka plodní stopky	15–60 mm	delší než 50 mm				delší než 50 mm
Počet nažek	10–47		(20) 30–40 (80)	25 (30)–40 (80)		(25) 30–40 (80)
Délka nažky	0.45–1.45 mm		1.6–2.2 mm	1.8–2.2 mm		1.8–2.3 mm

Tab. 16 – Srovnání naměřených znaků druhu *R. trichophyllus* s literaturou.

<i>Ranunculus trichophyllus</i>						
Znak	Naměřené znaky u terestrických forem	Klíč ke květeně České republiky (Kaplan et al. 2019a)	Květena České republiky (Hejný & Slavík 1997)	Flóra Slovenska (Futák et al. 1982)	Klíč pro Rakousko, Lichtenštejnsko a jižního Tyrolsko (Fisher et al. 2008)	Klíč pro Německo (Jäger et al. 2011)
Délka lodyhy	6–57 mm		až přes 1 m		0.1–1.5 m	0.1–2 m
Délka řapíku	3–31 mm	listy měří do 70 mm ve stojatých vodách a až 40 cm v rychle tekoucích vodách	2–35 mm	Do 40 mm		do 80 mm
Délka čepele	1–17 mm					
Přítomnost lupenitých listů	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Délka květní stopky	2–32 mm		do 50 mm	do 50 mm		do 40 mm
Délka korunního lístku	1.6–6.2 mm	2–5 mm	3.5–6 (10) mm	(3.5) 5–10 mm	3.5–5 mm	3.5–5.5 (8) mm
Délka plodní stopky	6–28 mm	10–30 mm			10–40 mm	
Počet nažek	10–40	10–30	15–40	15–40	méně než 40	15–33
Délka nažky	0.75–2 mm	1–1.5 mm	více než 1mm	1–2 mm	(1.1) 1.2–1.5 (1.7) mm	více než 1.5 mm

Při srovnání terestrických forem s vodními vyšel mezi většinou znaků průkazný rozdíl. U druhu *R. peltatus* se liší všechny srovnávané znaky kromě počtu nažek. Průměr tohoto znaku byl pro oba druhy velmi podobný, u vodních forem bylo však naměřeno větší rozmezí počtu nažek (1–57) než u terestrických forem (10–47). Některé nažky, které byly při měření terestrických forem započítány, nebyly zcela dovyvinuté (na většině rotlin bylo pouze jedno souplodí, tudíž byla omezená velikost výběru). Proto byl naměřen nejnižší počet nažek 10, kdežto u vodních forem 1. Mezi velikostí nažek naopak signifikantní rozdíl je – nažky se při přechodu na sucho zmenšují. I tento znak však mohl být ovlivněný nedozrálostí nažek. U *R. trichophyllus* se neliší jen poměr délky a šířky korunního lístku, což vypovídá o stejném tvaru koruny u obou forem. S přechodem do terestrického prostředí se však koruna zvětšuje. Data získaná pro vodní formy potvrzují rozdíly mezi oběma druhy uváděné v literatuře, jako je např. delší plodní stopka a větší velikost květů u *R. peltatus*. Tyto znaky zároveň slouží jako dobré identifikátory i v případě terestrických forem.

Peter Englmaier se ve své studii zabývá i terestrickými formami a vytvořil klíč pro jejich určování (Englmaier 2016). Zaměřuje se však pouze na determinaci fertálních jedinců a nezabývá se znaky jako je např. délka lodyhy, počet a délka listů či počet úkrojků. Podle jeho klíče tedy není možné sterilní jedince určit. Poukazuje i na to, že ani fertální lakušníky často nelze podle běžných určovacích klíčů bezpečně identifikovat, jelikož květy mohou být mnohem menší než u vodních forem a zkracuje se i délka květní a plodní stopky. Terestrické formy se podle Englmaiera dají určit na základě některých znaků, které se při přechodu na sucho nemění, jako je tvar květního lůžka či typ nektárií. Zaměřil se ovšem i na znaky, které mohou být pozměněné, jako je např. velikost květu či délka nažek a ve své studii uvádí jejich naměřené hodnoty.

*R. peltatus* má podle jeho určovacího klíče polokulovité až mírně vejcovité květní lůžko, květy měří 15–20 (25) mm v průměru a korunní lístky přetrvávají po celou dobu květu. Tyčinek je 15–25 a tvar nektárií je hruškovitý. Nažky jsou výrazně žebrované a jejich délka přesahuje 1.7 mm. Úkrojky nitřovitých listů jsou u terestrických forem zaoblené a nesesychají. Jediným znakem, který jsem ve své práci měřila také, je délka nažek. Dle mých poznatků nažky mohou dosahovat velikosti mezi 0.45 a 1.45 mm, tedy výrazně méně, než uvádí P. Englmaier.



Listy *R. trichophyllus* se při přechodu na sucho přizpůsobují terestrickému prostředí a jejich úkrojky na rozdíl od úkrojků *R. peltatus* působí seschle. Tvar květního lůžka je stejný jako u *R. peltatus*. Korunní lístky brzy opadávají, tyčinek je pouze 10–15. Průměr květů je znatelně menší, dosahuje velikosti 8–12 mm. Tento znak jsem ve své práci sice neměřila, ale korunní lístky *R. trichophyllus* také dosahovaly menší velikosti než u *R. peltatus*, což svědčí o celkově drobnějších květech.

Přechodem do terestrických podmínek se nezabýval pouze Peter Englmaier. Hans van Veen a Rashmi Sasidhara zkoumali změnu anatomie a morfologie listů rostlin rostoucích na místech s kolísající hladinou vody. Ve své studii zmiňují i změnu listů u *Ranunculus trichophyllus* (Veen & Sasidhara 2019). Při hledání dalších článků zabývajících se terestrickými formami jsem nebyla příliš úspěšná.

Tato bakalářská práce ověřila, že terestrické formy druhů *R. peltatus* a *R. trichophyllus* od sebe lze odlišit, a to i ve sterilním stavu. Ukázalo se tak, že tato metoda funguje a bylo by vhodné pomocí ní zjistit, zda od sebe lze odlišit i suchozemské formy jiných, mnohdy podobnějších druhů. Do budoucna bych se chtěla zaměřit na určování terestrických forem dalších druhů lakušníků rostoucích na území České republiky.

## 5. Závěr

Terestrické formy lakušníků jsou na rozdíl od svých vodních forem značně redukované. Mají výrazně kratší lodyhu, menší květy i plodní stopky. Může docházet i ke zkrácení květní stopky či ztrátě lupenitých listů. I přes takto pozměněnou morfologii lze od sebe druhy *Ranunculus peltatus* a *Ranunculus trichophyllus* rozeznat. Kromě přítomnosti lupenitých listů, která hned vyloučí druh *R. trichophyllus*, jsou dalšími významnými znaky pro determinaci např. délka korunního lístku, počet úkrojků či délka plodní stopky. Spolehlivým znakem pro určování je také tvar nektária, který je však náročné správně rozpoznat z herbářových položek. Určování sterilních jedinců je jistě náročnější, ale z analýz vyplývá, že i vzorky bez květů a plodů lze determinovat.

Druhy se vzájemně kříží a vzniklé hybridy lze těžko rozpoznat. Morfologicky vycházejí mezi oběma druhy, stejně tak i ve velikosti genomu. Nelze vyloučit ani přítomnost zpětných hybridů, které nelze rozeznat ani pomocí průtokového cytometru a jsou odhaleni pouze sekvenací.

Metoda určování vzorků pomocí průtokové cytometrie, následné měření jejich morfologických znaků a analýza získaných dat se ukázala jako dobrý postup k zjištění, zda a jak od sebe lze odlišit různé druhy. Do budoucna by bylo vhodné zaměřit se i na další druhy lakušníků rostoucí na území České republiky a zjistit, zda lze od sebe takto odlišit všechny druhy.

## 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.
- Barrett S. C. H., Eckert C. & Husband B. C. (1993): Evolutionary processes in aquatic plant populations. – *Aquatic Botany* 44: 105–145.
- Bickford D., Lohman D. J., Sodhi N. S., Ng P. K. L., Meier R., Winker K., Ingram K. K. & Das I. (2007): Cryptic species as a window on diversity and conservation. – *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.
- Bradshaw A. D. (1965): Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants. – *Advances in Genetics* 13: 115–155.
- Briggs D. & Walters S. M. (2001): *Proměnlivost a evoluce rostlin*. Ed. 3. – Univerzita Palackého, Olomouc.
- 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 Science and Technology* 40: 11–20.
- 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.

- Dahlgren G. (1992): *Ranunculus* subgenus *Batrachium* on the Aegean islands and adjacent areas: nectary types and breeding system. – *Nordic Journal of Botany* 12: 299–310.
- Dahlgren G. (1993): *Ranunculus penicillatus* in Norden. – *Nordic Journal of Botany* 13: 593–605.
- Danihelka J., Chrtek J. & Kaplan Z. (2012): Checklist of vascular plants of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 647–811.
- Englmaier P. (2016): *Ranunculus* sect. *Batrachium* (Ranunculaceae): Contribution to an excursion flora of Austria and the Eastern Alps. – *Neireichia* 8: 97–125.
- Fischer M. A., Oswald K. & Adler W. (2008): Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. Ed. 3. – Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, Linz.
- Futák J., Bertová L., Hlavaček A., Hostička M., Chrtek J., Jasičová M., Kmet'ová E., Křisa B., Osvačilová V., Zahradníková K. & Zelený V. (1982): Flóra Slovenska III. – VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava.
- Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucleic Acids Symposium* 41: 95–98.
- 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.
- Hörandl E., Paun O., Johansson J. T., Lehnebach C., Armstrong T., Chen L., & Lockhart P. (2005): Phylogenetic relationships and evolutionary traits in *Ranunculus* s.l. (Ranunculaceae) inferred from ITS sequence analysis. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 305–327.

- Jarvis A., Reuter H. I., Nelson A., Guevara E. (2020): Hole-filled seamless SRTM data V4. International Centre for Tropical Agriculture (CIAT), <http://srtm.csi.cgiar.org>.
- Jäger E. J. (2011): Rothmaler, Exkursionsflora von Deutschland. Ed. 20. – Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Kaplan Z. (2002): Phenotypic plasticity in *Potamogeton*. – *Folia Geobotanica* 37: 141–170.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. Jr., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds) (2019a): Klíč ke květeně České republiky. Ed. 2. – Academia, Praha.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. Jr., Zázvorka J., Koutecký P., Ekrt L., Řepka R., Štěpánková J., Jelínek B., Grulich V., Prančl J. & Wild J. (2019b): Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 8. – *Preslia* 91: 257–368.
- Kaplan Z., Jarolímová V. & Fehrer J. (2013): Revision of chromosome numbers of Potamogetonaceae: a new basis for taxonomic and evolutionary implications. – *Preslia* 85: 421–482.
- Kaplan Z. & Marhold K. (2012): Multivariate morphometric analysis of the *Potamogeton compressus* group (Potamogetonaceae). – *Botanical Journal of the Linnean Society* 170: 112–130.
- King R. A., Gornall R. J., Preston C. D. & Croft M. (2001): Molecular confirmation of *Potamogeton* × *bottnicus* (*P. pectinatus* × *P. vaginatus*, Potamogetonaceae) in Britain. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 135: 67–70.
- Koutecký P. (2015): MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. – *Plant Systematics and Evolution* 301: 1115–1121.
- Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. (eds) (2002): Klíč ke květeně České republiky, Ed. 1. – Academia, Praha.
- Leitch A. & Leitch I. (2008): Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. – *Science* 320: 481–483.

- Marhold K. & Suda J. (2001): Analýza multivariačních dat v taxonomii (Fenetické metody), verze 0.2. – Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra Botaniky, Praha.
- Nielsen S. L. & Sand-Jensen K. (1993): Photosynthetic implications of heterophylly in *Batrachium peltatum* (Schrank) Presl. – *Aquatic Botany* 44: 361–371.
- O'Donnell J., Fryirs K. & Leishman M. R. (2014): Digging deep for diversity: riparian seed bank abundance and species richness in relation to burial depth. – *Freshwater Biology* 59: 100–113.
- Otto S. P. & Whitton J. (2000): Polyploid incidence and evolution. – *Annual Review of Genetics* 34: 401–437.
- Prančl J., Koutecký P., Trávníček P., Jarolímová V., Lučanová M., Koutecká E. & Kaplan Z. (2018): Cytotype variation, cryptic diversity and hybridization in *Ranunculus* sect. *Batrachium* revealed by flow cytometry and chromosome numbers. – *Preslia* 90: 195–223.
- QGIS Development Team (2020): QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. URL <http://qgis.osgeo.org>.
- R Core Team (2018): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramsey J. & Schemske D. W. (2002): Neopolyploidy in flowering plants. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 589–639.
- Renny-Byfield S., Gong L., Gallagher J. P., Wendel J. F. (2015): Persistence of Subgenomes in Paleopolyploid Cotton after 60 My of Evolution. – *Molecular Biology and Evolution* 32: 1063–1071.
- Rieseberg L. H. & Willis J. H. (2007): Plant speciation. – *Science* 317: 910–914.
- Ross-Craig S. (1948): Drawings of British plants. Part I. Ranunculaceae. – G. Bell & Sons, London.

RStudio Team (2016): RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>.

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.

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

Soltis D. E., Albert V. A., Leebens-Mack J., Bell C. D., Paterson A. H., Zheng C., Sankoff D., de Pamphilis C. W., Wall P. K. & Soltis P. S. (2009): Polyploidy and angiosperm diversification. – *American Journal of Botany* 96: 336–348.

Thum R. A., Zuellig M. P., Johnson R. L., Moody M. L. & Vossbrinck C. (2011): Molecular markers reconstruct the invasion history of variable leaf watermilfoil (*Myriophyllum heterophyllum*) and distinguish it from closely related species. – *Biological Invasions* 13: 1687–1709.

Turała-Szybowska K. (1978): Cyto-embryological studies in self-incompatible populations of *Ranunculus penicillatus* (Dumort.) Bab. from Poland. – *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 21: 9–21.

Veen H. & Sasidhara R. (2019): Shape shifting by amphibious plants in dynamic hydrological niches. – *New Phytologist*, in press.

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

Webster S. D. (1988): *Ranunculus penicillatus* (Dumort.) Bab. in Great Britain and Ireland. – *Watsonia* 17: 1–22.

- Weiss-Schneeweiss H., Emadzade K., Jang T. S., Schneeweiss G. M. (2013): Evolutionary Consequences, Constraints and Potential of Polyploidy in Plants – Cytogenetic and Genome Research 140: 137–150.
- Wells C. L. & Pigliucci M. (2000): Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. – Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 3: 1–18.
- Wendel J. F. (2015): The wondrous cycles of polyploidy in plants. – American Journal of Botany 102: 1753–1756.
- Wendel J. F., Jackson S. A., Meyers B.C. & Wing R. A. (2016): Evolution of plant genome architecture. – Genome Biology 17: 37.
- White T. J., Bruns T. D., Lee S. & Taylor J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. & White T. J. (eds), PCR protocols: a guide to methods and applications, 315–322, Academic Press, New York.
- Wiegleb G. (1988): Notes on Japanese *Ranunculus* subgenus *Batrachium*. – Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 39: 117–132.
- Wiegleb G., Bobrov A. A. & Zalewska-Gałosz J. (2017): A taxonomic account of *Ranunculus* section *Batrachium* (Ranunculaceae). – Phytotaxa 319: 1–55.
- Wiegleb G. & Herr W. (1983): Taxonomie und verbreitung von *Ranunculus* subgenus *Batrachium* in niedersächsischen Fließgewässern unter besonderer Berücksichtigung des *Ranunculus penicillatus* Komplexes. – Göttinger Floristische Rundbriefe 17: 101–150.
- Wood T. E., Takebayashi N., Barker M. S., Mayrose I., Greenspoon P. B. & Rieseberg L. H. (2009): The frequency of polyploid speciation in vascular plants. – Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 13875–13879.
- 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*. Aquatic Botany 120: 160–168.