

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Botanika



**Bc. Johana Hanzlíčková**

Zhodnocení kryptické diverzity ve skupině lakušníku niťolistého  
(*Ranunculus trichophyllus* agg.)

Evaluation of cryptic diversity in the group of thread-leaved water-crowfoot  
(*Ranunculus trichophyllus* agg.)

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Jan Prančl, Ph.D.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Plzni, 25. 4. 2021

Podpis



## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podporovali při tvorbě této diplomové práce. Můj velký dík patří školiteli Honzu Prančlovi za cenné rady, připomínky i neutuchající nadšení pro lakušníky, ale především za velkou ochotu a trpělivost během celého vedení práce. Děkuji také Petrovi Kouteckému a Zdeňku Kaplanovi, a to za předání cenných zkušeností s vodními rostlinami, zapůjčení herbářového materiálu i bezvadnou společnost při terénních sběrech. Zuzi Chumové a Pavlu Trávníčkovi děkuji za podporu a pomoc v cytometrické laboratoři. Na závěr bych chtěla poděkovat svým přátelům a rodině, že mi byli oporou během celé etapy mého studia botaniky.

## Abstrakt

Okruh lakušníku nit'olistého (*Ranunculus trichophyllus* agg.) představuje taxonomicky komplikovanou skupinu vodních cévnatých rostlin, u níž byla recentně prokázána existence několika významně odlišných genetických linií a variabilita ve velikosti genomu. Výsledky dosavadních studií naznačují existenci kryptických druhů, které byly dosud přehlíženy kvůli značné morfologické redukci a vysoké míře fenotypové plasticity.

V této práci byla za použití kombinace současných biosystematických metod (průtoková cytometrie, přímé sekvenování DNA, morfometrické analýzy) kriticky zhodnocena variabilita v rámci čtyř morfologicky podobných homofylních druhů lakušníků na území střední Evropy, se zvláštním zřetelem na *R. trichophyllus* agg.. Analýza velikosti genomu byla potvrzena jako spolehlivá metoda pro determinaci zájmových druhů a prokázala také výskyt několika různých hybridních kombinací; recentní mezidruhová hybridizace však není ve studovaném okruhu vysloveně častým jevem. Výsledky genetických analýz poukazují na význam hybridizačních událostí v evoluci sekce *Batrachium*: všechny studované polyploidní taxony jsou pravděpodobně allopolyploidního původu. Byla potvrzena existence dvou kryptických tetraploidních taxonů v rámci tradičně pojímaného druhu *R. trichophyllus*, provizorně označených jako *R. trichophyllus* cytotyp A a *R. trichophyllus* cytotyp B. Oba odhalené taxony se liší velikostí genomu, morfologicky i geneticky, proto by měly být hodnoceny jako dva samostatné druhy. Cytotyp B pravděpodobně vznikl nejméně dvěma nezávislými hybridizačními událostmi. Třetí linie v rámci agregátu, arкто-alpinský taxon *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus*, není na základě velikosti genomu odlišitelný od cytotypu A druhu *R. trichophyllus*. Vykazuje sice jisté genetické a morfologické rozdíly, avšak ke zhodnocení jeho taxonomického statutu je třeba dalšího studia. Na základě výsledků morfometrických analýz byly identifikovány diagnostické znaky studovaných taxonů a sestaven určovací klíč homofylních zástupců sekce *Batrachium* na území střední Evropy. Morfologický překryv mezi cytotypem B druhu *R. trichophyllus* a homofylními jedinci druhu *R. aquatilis* odráží hybridogenní původ a společnou evoluční historii těchto linií. V současném stavu poznání ponechávám oba taxony na druhové úrovni, neboť je lze vymezit na základě odlišné ploidie i monoploidní velikosti genomu; zároveň se *R. aquatilis* liší schopností tvořit za určitých podmínek lupenité listy.

**Klíčová slova:** *Ranunculus trichophyllus* agg., kryptická variabilita, hybridizace, průtoková cytometrie, přímé sekvenování, morfometrické analýzy

## Abstract

*Ranunculus trichophyllus* agg. (thread-leaved water crowfoot) represents a taxonomically challenging group of aquatic plants in which the presence of several significantly different genotypes and the genome size variation have been recently revealed. The results of previous studies suggest that cryptic taxa occur in this group, being so far overlooked due to considerable morphological reduction and extensive phenotypic plasticity.

In this thesis, the variation and genetic relationships of four morphologically similar homophyllous water-crowfoot species was critically assessed in the area of Central Europe, using a combination of modern biosystematic methods (flow cytometry, direct DNA sequencing, morphometric analyses), specially focusing on the complex of *R. trichophyllus*. The genome size analysis via flow cytometry was confirmed as a suitable method for determining the studied species; further, several hybrid combinations were revealed using this approach. However, recent interspecific hybridization is rather infrequent in the interest group. The results of DNA analyses indicate an importance of hybridization events in the evolution of sect. *Batrachium*: all the polyploid taxa studied are probably of allopolyploid origin. Two cryptic taxa within the traditionally recognized species *R. trichophyllus* have been confirmed, tentatively designated as *R. trichophyllus* cytotype A and *R. trichophyllus* cytotype B. Both revealed taxa differ in genome size, morphology as well as in genetic analyses, and should be classified as two separate species. Cytotype B probably originated from at least two independent hybridization events. The third lineage within the aggregate, *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus*, possesses overlapping genome size values with *R. trichophyllus* cytotype A. While it shows some genetic and morphological differences, further study is needed to evaluate its taxonomic status. Based on the results of multidimensional morphometric analyses, the diagnostic characteristics of the studied taxa were determined and the key for identification of homophyllous water-crowfoots in Central Europe is provided. The morphological overlap between *R. trichophyllus* cytotype B and homophyllous individuals of *R. aquatilis* reflects the hybridogenous origin and interconnected evolutionary history of both lineages. In the current state of knowledge, I prefer to evaluate both taxa at the species level, as they can be distinguished on the basis of different ploidy level and distinct monoploid genome size; moreover, *R. aquatilis* is different in its ability to form laminar leaves under certain environmental conditions.

**Key words:** *Ranunculus trichophyllus* agg., cryptic variation, hybridization, flow cytometry, direct sequencing, multivariate statistical methods

## Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>3</b>
2.1.	Zdroje kryptické diverzity u vodních rostlin .....	3
2.2.	<i>Ranunculus</i> sect. <i>Batrachium</i> DC.....	5
2.2.1.	Zařazení v systému cévnatých rostlin .....	5
2.2.2.	Ekologická charakteristika a rozšíření .....	5
2.2.3.	Morfologická charakteristika .....	6
<b>2.2.4.</b>	<b>Reprodukční biologie</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.5.</b>	<b>Karyologická charakteristika, polyploidie</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.6.</b>	<b>Hybridizace</b> .....	<b>11</b>
2.3.	Studované taxony .....	13
2.3.1.	<i>Ranunculus aquatilis</i> L. ....	17
2.3.2.	<i>Ranunculus baudotii</i> Godr. ....	17
2.3.3.	<i>Ranunculus rionii</i> Lager .....	18
2.3.4.	<i>Ranunculus trichophyllus</i> agg.....	18
2.4.	Principy použitých metod .....	22
2.4.1.	Průtoková cytometrie .....	22
2.4.2.	Molekulární analýzy – sekvenování DNA.....	22
2.4.3.	Morfometrická analýza .....	23
<b>3.</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>25</b>
3.1.	Sběr materiálu .....	25
3.2.	Průtoková cytometrie.....	27
3.3.	Molekulární analýzy – sekvenování DNA .....	28
3.3.1.	Izolace DNA, PCR a sekvenování .....	28
3.3.2.	Fylogenetické analýzy .....	30
3.4.	Morfometrické analýzy.....	30

<b>4.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>41</b>
4.1.	Průtoková cytometrie.....	41
4.2.	Molekulární analýzy – sekvenování DNA .....	46
4.2.1.	Chloroplastová DNA .....	46
4.2.2.	Ribozomální DNA – úsek ITS.....	48
4.2.3.	Kombinace chloroplastové DNA a ITS .....	51
4.3.	Morfometrická analýza.....	54
4.3.1.	Dataset I: Celková variabilita skupin a znaků .....	54
4.3.2.	Dataset II: Vegetativní znaky .....	59
4.3.3.	Dataset III: Generativní znaky.....	63
4.3.4.	Dataset IV: Molekulární skupiny komplexu <i>R. trichophyllus</i> agg. ....	68
4.4.	Diagnostické znaky studovaných taxonů .....	74
4.4.1.	<i>Ranunculus aquatilis</i> L. – lukušník vodní .....	74
4.4.2.	<i>Ranunculus baudotii</i> Godr. – lukušník Baudotův .....	75
4.4.3.	<i>Ranunculus rionii</i> Lager – lukušník Rionův .....	75
4.4.4.	<i>Ranunculus trichophyllus</i> Chaix – lukušník niťolistý.....	76
4.5.	Klíč k určování homofylních lukušníků na území střední Evropy .....	77
<b>5.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>80</b>
5.1.	Cytotypová variabilita .....	80
5.2.	Genetická struktura a evoluční vztahy.....	81
5.3.	Morfologická diferenciacce.....	83
5.4.	Ekologické nároky .....	84
5.5.	Taxonomické zhodnocení.....	84
<b>6.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>88</b>
<b>8.</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>97</b>

# 1. Úvod

Kryptická diverzita představuje existenci geneticky odlišných taxonů, které kvůli morfologické podobnosti nebyly dosud odhaleny. Kryptické taxony, třebaže obtížně odhalitelné, mohou představovat zásadní zdroje nových adaptací, spouštěče mnohých evolučních mechanismů a významně tak ovlivňovat evoluci celých skupin (Bickford et al., 2007). Díky tomu přináší výzkum kryptických taxonů zásadní poznatky v oblastech evoluční biologie, biogeografie a ochrany přírody (Witt et al., 2006).

Ve skupinách organismů, jako jsou např. rozsivky a koryši (Lundholm et al., 2012; Witt et al., 2006), je kryptická diverzita dobře známým a studovaným fenoménem. Její významnou roli u cévnatých rostlin podporují výsledky četných recentních studií, ve kterých byly kryptické taxony odhaleny s využitím moderních biosystematických metod, zejména díky analýze DNA (Hedenäs, 2017; Okuyama & Kato, 2009; Shneyer & Kotseruba, 2015). Mezi nejvýznamnější mikroevoluční procesy podílející se na vzniku kryptických taxonů u cévnatých rostlin patří polyploidní speciace a hybridizace. Tyto vzájemně do značné míry provázané procesy zároveň představují nejvýznamnější mechanismy sympatrické speciace u rostlin (Rieseberg & Willis, 2007; te Beest et al., 2012).

U vodních rostlin se vlivem specifického prostředí můžeme setkat se značnou morfologickou redukcí a zároveň s vysokou mírou fenotypové plasticity. Oba tyto fenomény přispívají k obtížné determinaci jednotlivých taxonů pouze na základě morfologických znaků. Jelikož je habitus vodních rostlin často daleko více ovlivněn environmentálními faktory než vlastním genotypem, mají tyto rostliny silné predispozice ke vzniku kryptické, morfologicky velmi obtížně rozeznatelné genetické variability (Barrett et al., 1993, Bickford et al., 2007).

Mezi taxonomicky a determinačně kritické skupiny vodních rostlin, u kterých můžeme očekávat častý výskyt kryptických druhů, nepochybně patří lakušníky (*Ranunculus* sect. *Batrachium*). U lakušníků byla dosud zdokumentována jak značná ploidní variabilita na vnitrodruhové úrovni, tak zároveň i častá mezidruhová hybridizace (Hörandl et al., 2005). K vysoké diverzitě skupiny v neposlední řadě přispívá také rozrůzněnost opylovacích systémů (Cook, 1966, Hong, 1991, Dahlgren, 1992).

Pravděpodobně nejobtížnější a dosud nedostatečně probádanou skupinou v rámci celé sekce *Batrachium* tvoří komplex taxonů uváděných pod souborným jménem *Ranunculus*

*trichophyllus* (lakušník niťolistý). Studium této skupiny je velmi komplikované kvůli silné redukci tělní stavby, tradovanému výskytu několika ploidních úrovní, očekávané hybridizaci a pravděpodobně i kvůli existenci ekologicky determinované genetické variability (Cook, 1966; Wiegleb et al., 2017; Prancł et al., 2018). Zároveň můžeme skupinu *R. trichophyllus* označit za jednu z nejzajímavějších modelových skupin pro studium evoluce vodních rostlin.

Diplomová práce se soustředí na diverzitu skupiny *R. trichophyllus* agg. na území střední Evropy a důležité mikroevoluční procesy, které se v její evoluci uplatňují. Cílem práce je zodpovědět následující okruhy otázek:

- 1) Kolik genetických linií / cytotypů se dá rozlišit mezi zástupci okruhu *R. trichophyllus* agg. ve střední Evropě? Jsou zástupci skupiny na tomto území ploidně variabilní? Jaké jsou vztahy mezi zjištěnými liniemi? Je výskyt jednotlivých evolučních linií *R. trichophyllus* agg. sympatrický? Liší se tyto linie ve svých ekologických nárocích?
- 2) Jak časté je křížení mezi jednotlivými kryptickými liniemi *R. trichophyllus* agg.? Existuje nějaký převažující směr tohoto křížení? Jsou sympaticky rostoucí linie dotčeny introgresí? Interagují jednotlivé linie okruhu *R. trichophyllus* agg. s dalšími, bezprostředně nepříbuznými druhy sekce *Batrachium*?
- 3) Jakým způsobem koreluje genetická a cytotypová variabilita v rámci *R. trichophyllus* agg. s morfologickými znaky rostlin? Jaké morfologické znaky je možné použít pro odlišení taxonů okruhu *R. trichophyllus* agg. a jiných přímo nepříbuzných homofylních druhů lakušníků?

## 2. Teoretická část

### 2.1. Zdroje kryptické diverzity u vodních rostlin

Termínem kryptická diverzita je označován fenomén, kdy jsou dva nebo více geneticky odlišných taxonů rozlišovány jako jediný na základě morfologické podobnosti. Kryptické druhy vznikají několika způsoby: i) recentním oddělením a blízce příbuzných taxonů, ii) evoluční stáží u příbuzenské skupiny, která si pak udržuje si ancestrální znaky po delší časové období, iii) mechanismem konvergentní nebo paralelní evoluce, kdy u bezprostředně nepříbuzných taxonů dochází k nezávislému vývoji podobných znaků (Struck et al. 2018).

U cévnatých rostlin se setkáváme s několika evolučními procesy, které mohou vést ke vzniku nových genetických linií a reprodukční izolaci. Jedním z nich je polyploidizace, která je zřejmě nejčastějším nástrojem sympatrické speciace v rostlinné říši (Wood et al., 2009). Jedná se o jev, při němž dochází ke zmnožení sad chromozomů, a může tedy vést k okamžitému vzniku reprodukční bariéry mezi polyploidem a rodičovským taxonem (Otto & Whitton, 2000, Rieseberg & Willis, 2007). Polyploidizaci lze dále rozdělit na autopolyploidizaci a allopolyploidizaci. Při autopolyploidizaci dochází ke znásobení chromozomové sady v rámci jednoho druhu. Allopolyploidizace je potom mezidruhovou hybridizací kombinovaná se zmnožením chromozomové sady. Autopolyploidi ve srovnání s allopolyploidy často nejsou rozlišovány od svého rodičovského taxonu, jelikož na rozdíl od nich nekombinují morfologické znaky více druhů (Soltis et al., 2007). Podle některých zdrojů autopolyploidi vznikají podstatně častěji než allopolyploidi, kteří ke svému vzniku potřebují kontakt a křížení více druhů, ale daleko častěji nejsou vůbec rozeznáni kvůli morfologické podobnosti s rodičovským druhem, a méně často přežívají dlouhodobě (Barker et al. 2016).

Dalším fenoménem, který u cévnatých rostlin umožňuje saltační speciaci, je hybridizace. Hybridizací mohou vznikat nové druhy prostřednictvím allopolyploidizace (viz výše) nebo homoploidní hybridní speciace (Mallet, 2007; Abbott et al., 2010). Křížením vzniklí hybridy mohou mít odlišné spektrum vlastností než rodiče, často jsou v daném prostředí úspěšnější, nebo naopak mají jiné ekologické nároky a dokáží osidlovat nové niky (Cook, 1970; Les & Philbrick, 1993; Wisseman, 2007). Přítomnost dvou genomů může také allopolyploidům přinést výhodu ve formě větší schopnosti adaptace. Díky odlišné genové expresi se totiž vlastnosti rodičovských taxonů mohou u hybridů uplatňovat v různé míře (Wolf et al., 2014). Zároveň nezávislé hybridizační události v některých případech vedou ke

vzniku jedinců s podobným fenotypovým projevem. Tento evoluční paralelismus přispívá rovněž k existenci kryptické diverzity (Les & Philbrick, 1993; Kaplan & Fehrer, 2011).

U vodních makrofytů se v závislosti na přizpůsobení vodnímu prostředí vyvinula celá řada specifických adaptací. Vliv teploty je ve vodě oproti terestrickým ekosystémům značně upozaděn, oproti tomu vystává řada odlišných problémů: snížené pronikání světla, pomalejší difuze rozpuštěných plynů, potřeba nadnášení orgánů, silné disturbance (proud, vlny...), fluktuace vodní hladiny a mnoho dalších. Většina vodních rostlin vykazuje nezávisle na svém fylogenetickém zařazení značnou morfologickou redukci a zároveň fenotypovou plasticitu. Seleční tlak prostředí často vedl u vodních rostlin k paralelnímu vývoji obdobných znaků u nepříbuzných taxonů (Barrett et al., 1993; Bickford et al., 2007; Sculthorpe, 1967). Tyto procesy přispívají k obtížné determinaci jednotlivých taxonů na základě morfologických znaků, díky čemuž patří mnohé vodní makrofyty mezi taxonomicky značně komplikované skupiny (Barrett et al., 1993).

Pro vodní rostliny je typické časté klonální rozmnožování. Vegetativní úlomky se ve vodě šíří snáze i na větší vzdálenosti, než tomu bývá v terestrickém prostředí. Klonální reprodukce proto u většiny vodních rostlin převažuje nad pohlavním rozmnožováním (Philbrick & Les, 1996; Barrett et al., 1993). Schopnost udržet se vegetativní cestou je pro vodní rostliny charakteristická a hraje v jejich evoluci klíčovou roli, umožňuje totiž mimo jiné přežívání a šíření vzniklých hybridů a polyploidů. Zejména v tekoucích vodách, kde vegetativní šíření převažuje, mohou hybridy (případně různé introgresanti) tvořit i dominantní složku vegetace. Existence sterilních hybridů dlouhodobě rostoucích samostatně bez přítomnosti svých rodičů je dokumentována např. u rodu *Potamogeton*, u něhož je mezidruhová hybridizace intenzivně zkoumána (Kaplan et al., 2009), nebo u rodu *Callitriche* (Prančl et al. 2014). V některých případech se mohou ve stabilním prostředí i sterilní hybridy udržet stovky až tisíce let (Preston et al., 1998; Kaplan & Fehrer 2011).

Lakušníky (*Ranunculus* sect. *Batrachium*) jsou v mnoha ohledech jedinečnou skupinou vodních rostlin. U lakušníků byla zdokumentována jak značná ploidní variabilita na vnitrodruhové úrovni, tak zároveň i častá mezidruhová hybridizace (Hörandl et al., 2005). V kombinaci se značnou morfologickou redukcí, častým klonálním rozmnožováním a výraznou fenotypovou plasticitu lze proto u této skupiny očekávat častý výskyt kryptických druhů.

## 2.2. *Ranunculus* sect. *Batrachium* DC.

### 2.2.1. Zařazení v systému cévnatých rostlin

Oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné)

Třída: *Rosopsida* (vyšší dvouděložné)

Řád: *Ranunculales* (pryskyřníkotvaré)

Čeleď: *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité)

(Angiosperm Phylogeny Group, 2016)

Lakušníky jsou na základě nejnovější fylogenetické studie rodu *Ranunculus* (Hörandl & Emadzade, 2012) vymezeny jako monofyletická skupina v ranku sekce. Klasifikace byla nicméně donedávna velmi nejednotná. Díky morfologické a ekologické odlišnosti byla skupina regionálně zařazována i na úroveň podrodu (např. Rich & Jermy, 1998) či dokonce samostatného rodu (Husák et al., 1988; Nasir & Riedl, 1991). V jedné z předchozích fylogenetických studií rodu *Ranunculus* také vyšlo najevo, že druhy sekce *Batrachium* vykazují retikulátní vztahy jak mezi sebou, tak s druhy z příbuzných sekcí *Xanthobatrachium* a *Hecatonia* (Hörandl et al., 2005). Je třeba také zmínit, že příbuzná sekce *Hecatonia*, do níž z našich domácích druhů patří *R. sceleratus*, se při oddělení monofyletických lakušníků stává parafyletickou skupinou (Hörandl 2014).

### 2.2.2. Ekologická charakteristika a rozšíření

Celkový areál výskytu sekce *Batrachium* je poměrně rozsáhlý, zahrnuje většinu mírného pásu severní polokoule, temperátní oblasti Jižní Ameriky, jih Afriky, jihovýchod Austrálie, Tasmánii a Nový Zéland (viz Tab. 1). Za vývojové centrum druhové a morfologické diverzity sekce je považována atlantská a středozemní Evropa (Cook, 1963; Cook, 1966). Na území Evropy se vyskytuje devatenáct z celkového počtu třiceti druhů, které jsou nyní rozlišovány (Wiegleb, 2017). Výsledky dosud publikovaných genetických studií nicméně naznačují existenci dalších kryptických druhů a celková diverzita skupiny může být podstatně vyšší (Bobrov et al., 2015; Lambertini et al., 2017; Lumbreras et al., 2014; Telford et al., 2011; Zalewska-Gałosz et al., 2015).

Značná fenotypová plasticita umožňuje lakušníkům pružně reagovat na dynamicky se měnící prostředí a osidlovat širokou škálu typů vodních biotopů. Zástupce sekce nalezneme ve vodách stojatých i rychle tekoucích, sladkých i brakických, na stanovištích oligotrofních i eutrofních. Nároky na chemismus vody se značně liší u jednotlivých taxonů, což je

považováno za jeden hlavních faktorů ovlivňující druhové rozšíření lakušníků (Lumbreras et al., 2009; Kaplan et al., 2019). Patrně všechny druhy jsou obojživelné, schopné tvořit subterestrické formy na vlhkých obnažených substrátech. Většina druhů lakušníků tudíž často osidluje stanoviště s kolísajícím vodním sloupcem.

### 2.2.3. Morfologická charakteristika

Lakušníky jsou jednoleté nebo vytrvalé rostliny, vodní nebo na vlhkém substrátu rostoucí. Mezi morfologické znaky, které jsou apomorfiemi sekce *Batrachium* v rámci rodu *Ranunculus*, patří zejména absence škrobu v korunních lístcích, listy s blanitými palisty, redukovaný typ nektárií a tvar nažek s příčnými žebry a se zobánkem kratším délky nažky (Benson, 1940, Cook, 1963, Hörandl & Emadzade, 2012). Korunní lístky jsou u většiny druhů bílé se žlutou skvrnou při bázi. Výjimkou je druh *R. ololeucos*, jehož některé populace mají květy čistě bílé, a také *R. flavidus*, u něhož jsou naopak celé korunní lístky bledě žluté (Cook, 1966).

Významným fenoménem této skupiny je heterofylie, tzn. schopnost vytvářet různé typy listů v rámci jednoho jedince. S jejími projevy se v rámci sekce můžeme setkat u dvanácti druhů (viz Tab. 1). Listy lakušníků lze rozdělit do dvou základních typů: i) listy lupenité, s plochou čepelí, nejčastěji plovoucí na hladině, ale někdy přítomné i u subterestrických rostlin, ii) listy niťovité, členěné na množství jemných úkrojků, které se utvářejí jak pod hladinou, tak i v terestrickém prostředí.

Niťovité listy jsou několikanásobně dlanitosečné s niťovitými až čárkovitými úkrojky. Na niťovitých listech v subterestrickém prostředí jsou vytvořeny funkční průduchy. U niťovitých ponořených listů jsou průduchy nefunkční, nebo vytvořeny vůbec nejsou. Z hlediska vnější morfologie jsou úkrojky ponořených listů zpravidla delší, na průřezu okrouhlé, zatímco terestrické rostliny mají listové úkrojky kratší, zploštělé, na průřezu eliptické (Cook 1966; Cook, 1969).

Druhým základním typem listů jsou listy lupenité. Tyto listy jsou obligátně přítomny pouze u dvou druhů, které nemají schopnost tvorby niťovitých listů (Tab. 1); u heterofylních druhů se vyvíjejí zpravidla pouze u kvetoucích rostlin. Jejich čepel je plochá, dlanitolaločná až dlanitosečná v úkrojky, které mohou být na vrcholu ještě různým způsobem vroubkované až zubaté (Husák et al., 1988; Štech et al., 2019). V rámci celkového tvaru lupenitých listů existuje výrazná vnitrodruhová proměnlivost ovlivněná environmentálními faktory. Projevuje

se například změnou hloubkou zářezů mezi jednotlivými laloky nebo různými deformacemi (např. u rostlin z tekoucích vod).

Můžeme se také setkat s přechodnými typy listů, které jsou kombinací charakterů listů lupenitých a nit'ovitých. Mohou být mozaikovitě – s ± ostře oddělenými částmi lupenitého a nit'ovitého charakteru, nebo vykazovat charakter plynulého přechodu mezi oběma typy (Englmaier, 2016). Jejich tvorba může být podmíněna změnou hladiny vodního sloupce, zároveň se však také často vytvářejí u recentních hybridů vzniklých křížením homofylních a heterofylních taxonů (Cook, 1963; Cook, 1966; Butkuvienė et al., 2020).

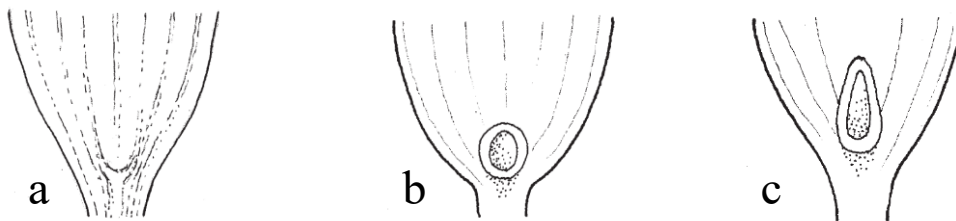
Fenomén heterofylie je u vodních rostlin považován za jeden ze základních projevů adaptivní fenotypové plasticity a přináší rostlinám zásadní výhodu zejména v proměnlivém prostředí (Wells & Pigliucci, 2000). Fenotypová plasticita je tedy genetického základu a její rozsah se různí mezi jednotlivými taxony (Bradshaw, 1965; Wells & Pigliucci, 2000). Projevy heterofylie se u jednotlivých druhů disponujících touto schopností liší, například *R. peltatus* vytváří lupenité listy za květu téměř vždy, není-li v terestrickém prostředí nebo v proudící vodě. Oproti tomu druhy *R. baudotii* a *R. aquatilis* najdeme za květu častěji bez lupenitých listů a u druhu *R. penicillatus* jsou dokonce známy populace rostlin, jež stabilně tvoří pouze nit'ovité listy (Hong, 1991; Englmaier, 2016; Wiegler et al., 2017).

**Tab. 1 – Výčet druhů sekce *Batrachium*, seřazený podle typu jejich olistění. Podle Wiegler et al., 2017. Počet chromozomů (2n) udává nejčastěji publikované ploidní úrovně.**

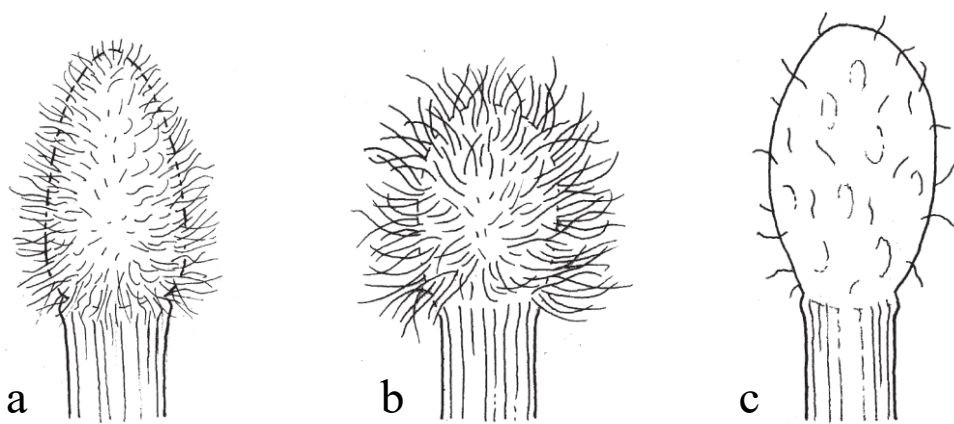
Taxon	2n	Typ listů	Rozšíření
<i>Ranunculus hederaceus</i> L.	16	lupenité	Evropa (od jihu Švédska po Iberský poloostrov včetně Britských ostrovů), atlantské pobřeží Severní Ameriky
<i>Ranunculus omiophyllus</i> Ten.	16, 32	lupenité	západní Evropa (Britské ostrovy, Francie až jih Španělska), dále v oblasti západního Středomoří (Alžírsko, Sardinie, Sicílie)
<i>Ranunculus aquatilis</i> L.	32, 48	lupenité nit'ovité	celá Evropa až po západní oblasti evropského Ruska, severní Afrika a západní Mediterán (Jordánsko, Palestina, Sýrie a Turecko)
<i>Ranunculus baudotii</i> Godr.	16, 32	lupenité nit'ovité	Evropa, severní Afrika
<i>Ranunculus bungei</i> Steud.	16, 24	lupenité nit'ovité	Čína (Peking, Chu-pej, Liao-ning)
<i>Ranunculus lobbii</i> (Hiern) A. Gray	není známo	lupenité nit'ovité	pacifické pobřeží Severní Ameriky (od Kalifornie po Britskou Kolumbii)
<i>Ranunculus mongolicus</i> (Krylov) Serg.	32	lupenité nit'ovité	Sibiř, východ Ruska, Kyrgyzstán, Afghánistán, Mongolsko, Čína, Nepál, pacifické pobřeží Severní Ameriky

<i>Ranunculus nipponicus</i> Nakai	32	lupenité nit'ovité	Japonsko a východ Ruska (Chabarovsk, Magadan, Sachalin)
<i>Ranunculus ololeucos</i> J. Lloyd	16	lupenité nit'ovité	oceánská část pevninské západní Evropy, od severozápadního Německa jižně až po Portugalsko
<i>Ranunculus peltatus</i> Schrank	16, 32, 48	lupenité nit'ovité	celá Evropa východně až po pobaltské státy, Bělorusko a Ukrajinu, severní Afrika
<i>Ranunculus penicillatus</i> (Dumort.) Bab.	32, 48	lupenité nit'ovité	Evropa od Pyrenejského poloostrova až k oblasti Baltu a Černého moře
<i>Ranunculus saniculifolius</i> Viv.	16, 32	lupenité nit'ovité	oblast Středomoří, jižní Německo a Velká Británie
<i>Ranunculus schmalhauseni</i> Luferov	32	lupenité nit'ovité	Skandinávie, Finsko a evropská část Ruska severně od 60° severní šířky
<i>Ranunculus tripartitus</i> DC.	32, 48	lupenité nit'ovité	atlantská část Evropy od Nizozemí a Britských ostrovů po Maroko, Balkán
<i>Ranunculus ashibetsuensis</i> Wiegleb	48	nit'ovité	Kurilské ostrovy, Hokkaidó, Sachalin a Kamčatka
<i>Ranunculus circinatus</i> Sibth.	16	nit'ovité	většina Evropy až po pohoří Ural, severní Afrika a západní Asie
<i>Ranunculus codyanus</i> B. Boivin	není známo	nit'ovité	oblast Beringovy úžiny od Aljašky po Čukotku
<i>Ranunculus confervoides</i> (Fr.) Fr.	32	nit'ovité	severní Evropa v oblastech posledního zalednění
<i>Ranunculus flavidus</i> (Hand.-Mazz.) C. D. K. Cook	16	nit'ovité	vysokohorské oblasti střední Asie (Čína, Tibet, Indie, Pákistán)
<i>Ranunculus fluitans</i> Lam.	16, 24, 32	nit'ovité	Evropa od Irska po Bělorusko, latitudinálně od Švédska a Litvy po oblast Pyrenejí a severní Itálii
<i>Ranunculus kadzusensis</i> Makino	není známo	nit'ovité	Japonsko, Korea
<i>Ranunculus kauffmannii</i> Clerc	32	nit'ovité	severní část východní Evropy přes Rusko až po Bajkalské jezero
<i>Ranunculus longirostris</i> Godr.	16	nit'ovité	Severní Amerika od Skalístých hor až po oblast Velkých jezer
<i>Ranunculus porteri</i> Britton	není známo	nit'ovité	podél Skalístých hor od Mexika po Britskou Kolumbii
<i>Ranunculus pseudofluitans</i> (Syme) Newbould ex Baker & Foggitt	32, 48	nit'ovité	Většina území Evropy, na východ po pobaltské státy, Bělorusko a Ukrajinu
<i>Ranunculus rionii</i> Lager	16	nit'ovité	Evropa, severní Afrika, západní a střední Asie
<i>Ranunculus sphaerospermus</i> Boiss. & C.I. Blanche	16	nit'ovité	Maroko, východní Mediterán, západní až střední Asie (po Himálaj a Čínu), jižní Afrika
<i>Ranunculus subrigidus</i> W. B. Drew	16	nit'ovité	boreální oblasti Severní Ameriky, Skalisté hory od S Mexika po Aljašku, boreální oblasti Eurasie od evropské části Uralu po Dálný východ, na jih po Mongolsko a Čínu
<i>Ranunculus trichophyllus</i> Chaix	32, 48	nit'ovité	Severní a Jižní Amerika, Grónsko, Evropa, Asie kromě Japonska, severní a jižní Afrika, Austrálie, Tasmánie a Nový Zéland
<i>Ranunculus vertumnus</i> (C. D. K. Cook) Luferov	48	nit'ovité	Evropa od Velké Británie po Balkán

Kvůli morfologické redukci a značné plasticitě vegetativních částí jsou pro určování lakušníků využívány i některé specifické drobné znaky na generativních orgánech, jakými jsou tvar nektária a charakter květního lůžka. Nektária jsou umístěná těsně nad bází na líci korunních lístků. Na rozdíl od ostatních zástupců rodu *Ranunculus* mají lakušníky velmi jednoduchý typ nektária nekrytý šupinou, který je tvořen jamkou a vyvýšeným valem kolem ní; tvar tohoto valu může být druhově specifický. Základní rozeznávané typy nektárií jsou tři: poloměsíčitě, okrouhlé a hruškovité (viz Obr. 1; Cook, 1966). Existují však i přechodné typy a tento znak rovněž jeví určitou variabilitu v rámci jedinců i populací (Wiegleb, 1988). Znaky na květním lůžku se nejlépe posuzují po opadání zralých nažek. Květní lůžko běžně bývá rozlišováno podle tvaru na kulovité, vejcovité a kuželovité viz Obr. 2 a dle pokrytí trichomy na lysé, řídce chlupaté a hustě chlupaté (Cook, 1966; Englmaier, 2016, Štech et al., 2019).



**Obr. 1 – Typy nektárií: a) poloměsíčitě, b) okrouhlé, c) hruškovité. Převzato z Štech et al., 2019.**



**Obr. 2 – Květní lůžka: a) kuželovité, chlupaté b) kulovité, hustě chlupaté c) vejcovité, řídce chlupaté. Převzato z Štech et al., 2019.**

#### 2.2.4. Reprodukční biologie

Velikost květů u jednotlivých druhů lakušníků může významně ovlivnit jejich genetickou diverzitu a evoluční potenciál. Obecně lze říci, že u malokvětých druhů převažuje autogamie, naopak u druhů s větší velikostí květů je očekávána vyšší frekvence cizosprášení (Dahlgren, 1992). Velikost květů pravděpodobně ovlivňuje i směr hybridizace mezi druhy, které jsou v tomto znaku výrazně rozdílné: druh s většími květy bude častěji donorem pylu, zatímco druh s menšími květy bude častěji mateřským rodičem hybridů (Prančl et al., 2018).

Samosprášení je u lakušníků běžné, nezřídka se objevuje i kleistogamie (opylení v trvale uzavřeném květu). Poměr mezi autogamickým a alogamickým způsobem reprodukce může zásadním způsobem ovlivnit genetickou strukturu jednotlivých druhů. Preference samosprášení může přispět ke snížené genetické diverzitě v rámci populace a naopak vysoké míře rozdílnosti mezipopulační (Wang et al., 2010). Malé disjunktní populace navíc snadněji podléhají efektu genetického driftu, který dále přispívá ke zvýšení genetické vzdálenosti mezi populacemi (Husband & Barrett, 1992; Butkuvienė et al., 2017). Na druhou stranu přináší samosprášení také četné výhody: opylení v poupěti nebo tvorba kleistogamických květů umožňuje úspěšnou tvorbu semen i v nepříznivých podmínkách, např. u ponořených květů.

Vedle pohlavního rozmnožování je u lakušníků obecná také vegetativní reprodukce pomocí fragmentů lodyh. Díky klonálnímu rozmnožování mohou v přírodě vytrvat dlouhodobě populace sterilních hybridů (Mallet, 2007).

#### 2.2.5. Karyologická charakteristika, polyploidie

Pro celou sekci *Batrachium* je společné základní chromosomové číslo  $n = 8$  (Cook, 1962). U lakušníků je známo pět ploidních úrovní od diploidů po hexaploidy, celkově převládá zastoupení polyploidů nad diploidy (viz Tab. 1), přičemž identita ancestrálních diploidních předků většiny polyploidních taxonů není v současnosti známa. Výjimku tvoří hybridogenní komplex *R. penicillatus*, který představuje několik různých allopolyploidních taxonů vzniklých hybridizací diploidního druhu *R. fluitans* s dalšími druhy sekce (Cook, 1966; Zalewska-Gałosz et al., 2015; Prančl et al., 2018; viz také níže). U dalších polyploidních druhů nebyl dosud jejich evoluční původ zcela objasněn ani za použití molekulárních metod, je však patrné, že často půjde o allopolyploidy (Bobrov et al., 2015). Vztahy mezi jednotlivými druhy lakušníků jsou silně retikulární a lze i uvažovat možnost vzniku

allopolyploidních taxonů hybridizací z již allopolyploidních předků (Hörandl & Emadzade, 2012; Bobrov et al., 2015; Koutecký et al., unpubl.).

### 2.2.6. Hybridizace

Mezidruhová hybridizace je zásadním procesem v evoluci sekce (Cook, 1996; Hörandl et al., 2005, Wiegleb et al., 2017.). Výsledky experimentálních hybridizací potvrdily, že většina druhů je schopná mezidruhového křížení. Diploidní hybridi jsou uváděni jako sterilní, naproti tomu hybridi tetraploidní, pentaploidní či hexaploidní mohou být částečně plodní a následně vytvářet i potomstvo dalších filiálních generací (Cook, 1970). Výčet přirozeně se vyskytujících hybridních kombinací udávaných v literatuře je uveden v Tab. 2.

U více druhů lakušníků je předpokládán hybridogenní původ. Skupina *R. penicillatus* s. l. je polyfyletickým agregátem, který patrně sdružuje primární hybridy, allopolyploidy i linie vzniklé zpětným křížením mezi *R. fluitans* a dalšími druhy; v literatuře jsou jako pravděpodobné rodičovské druhy považovány *R. aquatilis*, *R. baudotii*, *R. peltatus* a *R. trichophyllus* (Cook, 1966; Dahlgren, 1993; Wiegleb & Herr, 1983; Zalewska-Gałosz, 2015), avšak pouze jediná předpokládaná hybridní kombinace byla prokázána molekulárními metodami (*R. fluitans* × *R. peltatus*; Zalewska-Gałosz, 2015 na rostlinách z Polska). Druhým prokázaným allopolyploidním lakušníkem je *R. schmalhauseni*, jehož vznik zahrnuje nejméně dvě nezávislé hybridizační události, a který zřejmě vznikl křížením několika rodičovských taxonů (Bobrov et al., 2015).

Při zpětném křížení fertlních hybridů s rodičovskými taxony dochází k introgresi. Hybridizace a případná introgrese může probíhat náhodně v obou směrech, ale může být i více či méně jednosměrná. Směr křížení je přitom kromě frekvence jedinců daných druhů ovlivněn zřejmě i množstvím pylu, který rostliny produkují (viz kapitolu 2.2.4.). Evolučním fenoménem, jenž se s takovýmto jednosměrným transferem pylu pojí, je tzv. *chloroplast capture* – jev, kdy po několika generacích opakovaného zpětného křížení nalézáme jedince s jadernou DNA typu jednoho rodičovského taxonu a chloroplastovou DNA taxonu druhého (Rieseberg & Soltis, 1991). U lakušníků bylo takové genetické pattern pozorováno u dvou vzorků ve studii Bobrov et al.(2015), což naznačuje, že introgrese může mít v evoluci lakušníků významnou roli. V cytometrické studii středoevropských lakušníků (Prančl et al., 2018) bylo odhaleno 16 různých cytotypů s předpokládaným hybridním původem; nejčastější hybridní kombinace *R. peltatus* × *R. trichophyllus* vykazovala variabilní velikost genomu, nicméně velikost genomu hybridních jedinců byla vychýlena směrem k *R. peltatus*. To

naznačuje, že zpětná hybridizace mezi oběma druhy probíhá převážně jednosměrně (hybridní jedinci jsou častěji opyleni velkokvětým druhem *R. peltatus* než malokvětým druhem *R. trichophyllus*).

**Tab. 2 – Přehled zdokumentovaných přirozených hybridů u lakušníků (*Ranunculus* sect. *Batrachium*)**

hybrid	zdroj
<i>R. aquatilis</i> × <i>R. peltatus</i>	Prančl et al., 2018
<i>R. aquatilis</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x lutzii</i> A. Félix]	Cook, 1966; Prančl et al., 2018; Turała & Wołek, 1971
<i>R. baudotii</i> × <i>R. aquatilis</i> [ <i>R. x lamberti</i> A. Félix]	Cook, 1966
<i>R. baudotii</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x segretii</i> A. Félix in schaed.]	Cook, 1966
<i>R. circinatus</i> × <i>R. rionii</i>	Prančl et al., 2018
<i>R. circinatus</i> × <i>R. trichophyllus</i>	Prančl et al., 2018
<i>R. fluitans</i> × <i>R. aquatilis</i>	Cook, 1966
<i>R. fluitans</i> × <i>R. circinatus</i>	Wiegleb, 2017
<i>R. fluitans</i> × <i>R. peltatus</i> [ <i>R. x kelchoensis</i> S.D. Webster]	Cook, 1966, Rich & Jeremy, 1998, Zalewska-Gąsosz et al., 2015
<i>R. fluitans</i> × <i>R. penicillatus</i>	Wiegleb, 2017
<i>R. fluitans</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x bachii</i> Wirtgen]	Cook, 1966; Englmaier, 2016; Rich & Jeremy, 1998
<i>R. kauffmannii</i> × <i>R. circinatus</i>	Wiegleb, 2017
<i>R. kauffmannii</i> × <i>R. mongolicus</i> [ <i>R. x algidus</i> Kapitonova]	Wiegleb, 2017
<i>R. kauffmannii</i> × <i>R. schmalhauseni</i>	Bobrov et al., 2015
<i>R. omiophyllus</i> × <i>R. ololeucos</i> [ <i>R. x preauberti</i> A. Félix]	Wiegleb, 2017
<i>R. omiophyllus</i> × <i>R. peltatus</i> [ <i>R. x hiltonii</i> H. Groves et J. Groves]	Cook, 1966
<i>R. omiophyllus</i> × <i>R. tripartitus</i> [ <i>R. x novae-forestae</i> S.D. Webster]	Rich & Jeremy, 1998
<i>R. peltatus</i> × <i>R. penicillatus</i>	Prančl et al., 2018
<i>R. peltatus</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x grovesiana</i> Druce, nom.nud.]	Prančl et al., 2018; Wiegleb, 2017
<i>R. rionii</i> × <i>R. trichophyllus</i>	Prančl et al., 2018
<i>R. trichophyllus</i> × <i>R. circinatus</i> [ <i>R. x gluckii</i> A. Félix in schaed.]	Cook, 1966; Englmaier, 2016
<i>R. trichophyllus</i> × <i>R. mongolicus</i>	Wiegleb, 2017
<i>R. trichophyllus</i> × <i>R. schmalhauseni</i>	Bobrov et al., 2015
<i>R. tripartitus</i> × <i>R. aquatilis</i>	Cook, 1975
<i>R. tripartitus</i> × <i>R. ololeucos</i> [ <i>R. x felixii</i> Segret]	Cook, 1966

### 2.3. Studované taxony

Homofylní druhy lakušníků, tj. takové, které vytvářejí pouze nitřovité listy, jsou determinačně zpravidla obtížnější než druhy heterofylní, vzhledem k výrazně omezenému počtu znaků použitelných k determinaci. Mezi homofylními druhy je ve středoevropském prostoru evolučně nejzajímavější a taxonomicky nejsložitější skupinou agregát lakušníku nitřolistého (*R. trichophyllus* agg.). Doposud publikované výsledky naznačují, že morfologický druh *R. trichophyllus* ve skutečnosti zahrnuje větší počet kryptických taxonů, které dosud nebyly rozlišovány. Svědčí pro to několik skutečností:

1) V rámci druhu byly publikovány čtyři ploidní úrovně, všechny se vyskytující na území Evropy, ale lišící se svým rozšířením (viz Tab. 3).

2) Přestože se výzkumem lakušníků do dnešní doby zabýval pouze malý počet molekulárních studií, většinou zahrnující nepříliš reprezentativní počet jedinců, hned tři z nich odhalily u *R. trichophyllus* na území Evropy několik odlišných variant úseku ITS, naznačujících polyfyletický charakter tohoto taxonu (Bobrov et al., 2015, Telford et al., 2011, Zalewska-Gałosz et al., 2015). Žádná z těchto studií ovšem u studovaných rostlin nezkoumala karyologickou ani morfologickou variabilitu.

3) Taxony z okruhu *R. trichophyllus* agg. se patrně poměrně často kříží s dalšími druhy sekce *Batrachium* (viz Tab. 2). Zejména v tekoucích vodách, kde vegetativní šíření převažuje, mohou potom hybridy (případně různí introgresanti) tvořit i dominantní složku vegetace. Hybridizace může být následována polyploidizací a vznikem nových allopolyploidů, kteří se rovněž mohou úspěšně šířit vegetativně i generativně pomocí samosprášení.

4) Ke vzniku kryptických taxonů může napomoci i silná reprodukční a ekologická specializace některých linií. Například populace označované jako *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus*, jsou obligátně kleistogamické a poupata se u nich vůbec neotevírají. Zmiňovaný taxon má význačně arкто-alpinské rozšíření, přičemž v alpské oblasti osidluje vysokohorská jezera – tedy prostředí unikátní svou izolovaností, kde pravděpodobně dochází jen k omezenému toku genů (Englmaier, 2016).

Do řešení této práce jsou kromě okruhu *R. trichophyllus* agg. zahrnuty i další tři druhy lakušníků vyskytující se ve střední Evropě; tyto druhy bývají s *R. trichophyllus* běžně

zaměňovány na základě morfologické podobnosti. První z nich, *R. rionii*, je stejně jako *R. trichophyllus* homofylní. Další dva druhy, *R. aquatilis* a *R. baudotii*, mají sice schopnost tvorby lupenitých listů, ale někteří jedinci či celé jejich populace kvetou a plodí i bez přítomnosti heterofylie (Hong, 1991; Englmaier, 2016; Wiegler et al., 2017).

Morfologické znaky udávané pro jednotlivé zájmové druhy jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 4). Údaje se vztahují k rostlinám rostoucím ve vodním prostředí, u terestrických forem se podoba jednotlivých znaků může lišit.

**Tab. 3 – Chromozomové počty studovaných taxonů**

druh	2n	ploidie	oblast	zdroj
<i>R. aquatilis</i>	32	4x	Dánsko, Česká republika	Dahlgren, 1993, Měsíček & Jarolímová, 1992
	48	6x	Anglie, Německo, Polsko, Česká republika	Cook, 1962, Prančl et al., 2018, Turała, 1969
<i>R. baudotii</i>	16	2x	Španělsko	Diosdado et al., 1993
	32	4x	Anglie, Rakousko, Finsko, Egejské ostrovy, Česká republika, Švédsko, Polsko	Cook, 1962, Dahlgren, 1991, Dvořák & Dadáková, 1984, Hong, 1991, Prančl et al., 2018, Turała, 1969,
<i>R. rionii</i>	16	2x	Rakousko, Irák, Turecko, Řecko	Cook, 1962, Dahlgren, 1991, Prančl et al., 2018
<i>R. trichophyllus</i>	16	2x	Egejské ostrovy, Španělsko	Dahlgren, 1991, Diosdado et al., 1993
	32	4x	Anglie, Německo, Egejské ostrovy, Mongolsko, Polsko, Česká republika	Cook, 1962, Dahlgren, 1991, Měsíček & Soják, 1995, Turała, 1969, Prančl et al., 2018
	40	5x	Egejské ostrovy	Dahlgren, 1991
	48	6x	Egejské ostrovy, Česká republika, Rakousko, Polsko	Dahlgren, 1991, Měsíček & Jarolímová, 1992; Turała, 1969
<i>R. trichophyllus</i> subsp. <i>eradicatus</i>	32	4x	Grónsko, Island, Německo, Rakousko, Španělsko	Cook 1966, Löve & Kjellqvist 1974, Prančl et al., 2018

**Tab. 4 – Přehled morfologických znaků studovaných taxonů. Zpracováno dle následujících zdrojů: Cook, 1966; Rich & Jeremy, 1998; Englmaier, 2016; Wiegleb, 2018 a Štech et al., 2019.**

	<i>R. aquatilis</i> L.	<i>R. baudotii</i> Godr.	<i>R. rionii</i> Lager	<i>R. trichophyllus</i> Chaix	<i>R. trichophyllus</i> subsp. <i>eradicatus</i> (Laest) C. D. K. Cook
<b>typ listů</b>	niťovité i lupenité, lupenité listy se vytvářejí pouze někdy	niťovité i lupenité, lupenité listy za květu častěji chybějí	pouze niťovité	pouze niťovité	pouze niťovité
<b>niťovité listy</b>	20–60 mm dlouhé, zpravidla kratší než příslušné internodium lodyhy, řapík do 25 mm dlouhý	čepel je členěna v relativně tuhé úkrojky, řapík 5–20 mm dlouhý	10–30 mm dlouhé, čepel členěna v polotuhé zploštělé úkrojky, řapík do 20 mm dlouhý	kratší než příslušné internodium, čepel členěna v řídké a jemné úkrojky, řapík (5–) 20–60 mm dlouhý	10–35 mm dlouhé, čepel členěná na jemné, do široka rozprostřené úkrojky, řapík 3–18 mm dlouhý

<b>lupenité listy</b>	čepel široká do 30 mm, ledvinitá až okrouhlá, členěná obvykle alespoň do 2/3 délky na (3–) 5 (–7) úkrojků, úkrojky široce klínovité, na okraji zubaté, řapík do 90 mm dlouhý	čepel široká do 30 mm, ledvinitá až okrouhlá, na bázi často uřatá, hluboce členěná alespoň ze 2/3 délky na 3, výjimečně 5 úkrojků, úkrojky obvykle zakončeny (7–) 14 zuby, řapík do 80 mm dlouhý	chybějí	chybějí	chybějí
<b>palisty</b>	trojúhelníkovité, přirostlé k řapíku alespoň ze 3/4 jejich délky	zaokrouhlené až okrouhlé přirostlé k řapíku zhruba z 1/2 jejich délky	lysé, vejčité až okrouhlé, přirostlé k řapíku zhruba ze 2/3 jejich délky	eliptické až vejčité, přirostlé k řapíku alespoň ze 2/3 jejich délky	zaokrouhlené, vejčité až trojúhelníkovité, přirostlé k řapíku alespoň z 2/3 jejich délky
<b>plodní stopky</b>	do 50 mm dlouhé, obvykle kratší než řapík příslušného listu	35–180 mm dlouhé, delší než řapík příslušného lupenitého listu, často silně nazpět ohnuté	(10–) 30–50 mm dlouhé, nazpět ohnuté	11–30 (–50) mm dlouhé, často mírně nazpět ohnuté	10–30 (–50) mm dlouhé, tenké, nazpět ohnuté
<b>kališní lístky</b>	3–5 mm dlouhé, obvejčité až eliptické	2–4,5 mm dlouhé, obvejčité až eliptické, často odstálé až nazpět ohnuté a od vrcholu modravě zbarvené	2–2,5 mm dlouhé, většinou jen o málo kratší než lístky příslušné koruny	2,5–3,5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité, opadavé	2–3 mm dlouhé, vejčité, někdy od vrcholu modravě zbarvené
<b>korunní lístky</b>	(4–) 5–10 (–12) mm dlouhé, široce obvejčité, během kvetení se překrývají	(4–) 5–10 mm dlouhé, široce obvejčité a zpravidla se během kvetení překrývají	(2–) 3,5–5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité tvar, během kvetení se zpravidla nepřekrývají	2–7,5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité, během kvetení se nepřekrývají	2–4,5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité, během kvetení se nepřekrývají
<b>val kolem jamky nektária</b>	okrouhlý	poloměsíčitý, okrouhlý či hruškovitý	poloměsíčitý, zřídka hruškovitý	poloměsíčitý	poloměsíčitý
<b>tyčinky</b>	v počtu (14–) 15–22 (–25)	v počtu 10–20 (–25)	v počtu (10–) 12–25	v počtu 9–15	v počtu 4–10 (–14)
<b>květní lůžko</b>	chlupaté, za plodu zpravidla kulovité až široce vejcovité	hustě chlupaté, za plodu prodloužené vejcovité až kuželovité	chlupaté, za plodu prodloužené, dlouze kuželovité	chlupaté, za plodu zaokrouhlené až kulovité	hustě chlupaté, za plodu kulovité
<b>nažky</b>	v počtu 20–68, 1,2–1,8 mm dlouhé, nezralé chlupaté, za zralosti chlupaté až olysalé	v počtu (16–) 33–39 (–60), 1,2–1,5 (–1,8) mm dlouhé, lysé, ve zralosti s úzkým křídlatým lemem	v počtu (3–) 25–70 (–100), 0,8–1,3 mm dlouhé, i zamlada lysé	v počtu 10–35, 1–1,5 mm dlouhé, nezralé chlupaté, zralé mohou olysávat	v počtu 5–15 (–25), 1,5–1,7 mm dlouhé, s trichomy podél kýlu nebo lysé

### 2.3.1. *Ranunculus aquatilis* L.

#### **Taxonomická problematika**

*Ranunculus aquatilis* (lakušník vodní) je převážně hexaploidní (viz Tab. 4). Druh je značně polymorfní a je u něj předpokládán allopolyploidní původ. Rozsah fenotypické variability *R. aquatilis* zahrnuje i homofylní formy s menší velikostí květů, které se podobají *R. trichophyllus* (Wiegleb, 2017). Mezidruhová hybridizace viz Tab. 2.

#### **Ekologie:**

*R. aquatilis* preferuje přirozeně eutrofní, až mezotrofní, bázemi bohaté vody rybníky a tůň v nižších polohách. Často roste také v dočasných nádržích nebo nádržích s klesajícím vodním sloupcem do hloubky až 2 m. Najdeme jej i terestricky na obnažených dnech (Cook, 1966; Kaplan et al., 2019).

#### **Rozšíření:**

Tento druh osidluje celou Evropu vyjma nejsevernějších oblastí, dále zasahuje do severní Afriky a západní části Ruska. Přesná východní hranice rozšíření je nejasná v důledku záměn s druhem *R. mongolicus* (Wiegleb, 2017). Rostliny z pacifického pobřeží J Ameriky byly hodnoceny jako introdukovaný *R. aquatilis* (Lumbreras et al., 2014), Wiegleb et al., 2017 však předpokládá jejich taxonomickou příslušnost spíše k druhu *R. mongolicus*. Na území České republiky roste roztroušeně až vzácně v oblastech nížin až pahorkatin (Kaplan et al., 2019). V Červeném seznamu cévnatých rostlin ČR je řazen do kategorie C4b (vzácnější taxon vyžadující pozornost – nedostatečně prostudovaný; Grulich, 2017).

### 2.3.2. *Ranunculus baudotii* Godr.

#### **Taxonomická problematika**

Variabilitu a ekologická specifika tohoto druhu se někteří taxonomové snažili zhodnotit rozčleněním druhu na další variety a formy (Cook, 1966). Robustní exempláře z brakických vod v přímořských oblastech byly někdy dokonce vymezovány jako *R. marinus* (Englmaier, 2016). Na území střední Evropy je *R. baudotii* tetraploidní (viz Tab. 4). Mezidruhová hybridizace je známá s taxony *R. aquatilis* [*R.* × *lambertii* A. Félix] a *R. trichophyllus* (Cook, 1966).

### **Ekologie:**

V přímořských oblastech osidluje druh zejména brakické vody, pobřežní mokřady, periodické nádrže a nížinné řeky. Ve vnitrozemí jej najdeme minerálně bohatých stojatých, vzácněji i tekoucích vodách.

### **Rozšíření:**

*R. baudotii* je rozšířen v přímořských oblastech Evropy po 65° s. š. a v severozápadní Africe. Výskyt byl zaznamenán také v několika vnitrozemských státech (Rakousko, Maďarsko, Slovensko, Česká republika). Na našem území roste vzácně, zejména v oblasti Podbořanska a Polabí, dále na jižní Moravě (Cook, 1966; Štech et al., 2019). V Červeném seznamu cévnatých rostlin ČR je řazen do kategorie C1b (kriticky ohrožený druh) (Grulich, 2017).

### **2.3.3. *Ranunculus rionii* Lagger**

Z karyologického hlediska je *Ranunculus rionii* (lakušník Rionův) jako jeden z mála druhů lakušníku invariabilní, je známý pouze jako diploid (viz Tab. 4).

### **Ekologie:**

*R. rionii* roste v mělkých, stojatých, minerálně bohatých, eutrofních vodách. Osidluje tůň, rybníky a často také periodické vodní plochy (Englmaier, 2016; Štech et al., 2019).

### **Rozšíření:**

Druh je rozšířen v Evropě od Rýna dále na východ, přes východ Asie až k její centrální části. Dále v severní Africe (Wiegleb, 2017). Na našem území byl udáván vzácně až roztroušeně z teplejších oblastí jižní a střední Moravy a severní poloviny Čech, v současné době se však zřejmě šíří zejména díky postupné eutrofizaci vodních biotopů (Kaplan et al., 2019). V celkovém areálu je jeho výskyt zřejmě často přehlížen a bývá taktéž zaměňován za *R. trichophyllus* (Englmaier, 2016). V Červeném seznamu cévnatých rostlin ČR je druh řazen do kategorie C2b (silně ohrožený druh) (Grulich, 2017).

### **2.3.4. *Ranunculus trichophyllus* agg.**

*Ranunculus trichophyllus* agg. označuje soubornou skupinu lakušníku s téměř kosmopolitním výskytem mimo oblasti Japonska a následující morfologickou

charakteristikou: rostliny jednoleté nebo vytrvalé, s lodyhou do 150 cm dl., homofylní (vyvinuty pouze níťovité listy), koncové úkrojky níťovitých listů < 1 cm dl., květy malé, korunní lístky < 5(6) mm dl., bílé se žlutou ostruhou při bázi, val kolem jamky nektária poloměsíčitý, nažky obvykle v počtu < 30.

#### 2.3.4.1 *Ranunculus trichophyllus* Chaix

##### **Taxonomická problematika**

Pravděpodobně nejobtížnější a dosud nedostatečně probádanou skupinou v rámci celé sekce *Batrachium* je komplex taxonů uváděných pod souborným jménem *Ranunculus trichophyllus*. V rámci druhu byly publikovány čtyři ploidní úrovně (viz Tab. 4) Ze severní Evropy je naopak udáván hexaploidní cytotyp, který je ale vzácně udáván i z území střední Evropy (Měsíček & Jarolímová, 1992; Turała, 1969). Oba cytotypy se zřejmě mohou v této oblasti setkávat, což přináší otázku, zda a jakým způsobem spolu různé ploidní úrovně tohoto druhu interagují. V mediteránu byl některými zdroji zaznamenán i diploidní cytotyp (Dahlgren, 1991; Diosdado et al., 1993). Molekulární studie odhalily u *R. trichophyllus* na území Evropy několik odlišných variant úseku ITS, naznačujících polyfyletický charakter tohoto taxonu (Bobrov et al., 2015; Telford et al., 2011; Zalewska-Gałosz et al., 2015). Kolik kdo popsal ribotypů a jak se výsledky prací mezi sebou liší (Bobrov 5, Zalewska 4 – 2 shodné, Telford 2)

Ke vzniku kryptických taxonů zde může napomoci i silná reprodukční a ekologická specializace některých linií. Zatímco některé populace *R. trichophyllus* bohatě kvetou nad vodní hladinou a může se u nich (alespoň částečně) uplatňovat cizosprašení, jiné populace rozkvétají pod vodou a proces opylení se uskuteční v plynové bublině, jež vznikne v poupěti; tyto populace jsou tedy obligátně autogamické (Cook, 1966; Englmaier, 2016). Populace, označované některými autory jako samostatný druh *R. confervoides*, nebo v ranku poddruhu jako *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus*, jsou dokonce obligátně kleistogamické a poupata se u nich většinou vůbec neotevírají. Zmiňovaný taxon má význačně arкто-alpinské rozšíření, přičemž v alpské oblasti osidluje vysokohorská jezera, tedy prostředí unikátní svou izolovaností, kde pravděpodobně dochází jen k omezenému toku genů (Englmaier, 2016). Nejnovější cytometrické výsledky z rakouských Alp odhalily u rostlin morfologicky přiřaditelných k *R. trichophyllus* existenci dalšího cytotypu odlišitelného jako *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* (Prančl et al., 2018).

Taxony z okruhu *R. trichophyllus* agg. se patrně poměrně často kříží s dalšími druhy sekce *Batrachium* (viz Tab. 5). Hybridy mohou být v přírodě poměrně dobře rozeznatelní v případě, že druhý z rodičovských druhů tvoří pravidelně plovoucí lupenité listy. Potom tvoří plovoucí listy často i hybrid, tyto listy však bývají velmi nápadně nepravidelně ostře zubaté a různě deformované (Cook, 1966). Dobrým příkladem takto nápadného křížence je *R. peltatus* × *R. trichophyllus*, který je zdaleka nejčastěji dokumentovaných hybridem lakušníků na území ČR (Kaplan et al., 2019; Prančl et al., 2018). Daleko větší problém však představuje rozeznání hybridů s jinými homofylními druhy. Tito kříženci jsou velmi pravděpodobně v přírodě značně přehlíženi. Ve Švédsku byla takto zaznamenána téměř neomezená hybridizace hexaploidního cytotypu *R. trichophyllus* s rovněž hexaploidním druhem *R. aquatilis* a tvorba hybridních rojů, tvořící plynulou škálu morfotypů od jednoho druhu ke druhému (Hong, 1991).

**Tab. 5 – Přehled zdokumentovaných přirozených hybridů *R. trichophyllus***

hybrid	zdroj
<i>R. baudotii</i> × <i>R. trichophyllus</i>	Cook, 1966
<i>R. fluitans</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x bachii</i> Wirtgen]	Cook, 1966, Englmaier, 2016, Rich & Jeremy, 1998
<i>R. trichophyllus</i> × <i>R. circinatus</i> [ <i>R. x gluckii</i> A. Félix in schaed.]	Cook, 1966, Englmaier, 2016
<i>R. aquatilis</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x lutzii</i> A. Félix]	Cook, 1966, Štech et al., 2019, Turata & Wołek, 1971
<i>R. peltatus</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x grovesiana</i> Druce in schaed.]	Štech et al., 2019, Wiegler, 2017
<i>R. trichophyllus</i> × <i>R. mongolicus</i>	Wiegler, 2017
<i>R. trichophyllus</i> × <i>R. schmalhauseni</i>	Bobrov et al., 2015
<i>R. circinatus</i> × <i>R. trichophyllus</i>	Prančl et al., 2018
<i>R. penicillatus</i> × <i>R. trichophyllus</i>	Prančl et al., 2018

Na území střední Evropy byly objeveny pomocí průtokové cytometrie dva odlišné cytotypy *R. trichophyllus* v rámci jedné ploidní úrovně (oba tetraploidní): cytotyp s menší velikostí genomu, provizorně označovaný jako *R. trichophyllus* A, a cytotyp s větší velikostí genomu, označovaný jako *R. trichophyllus* B (Prančl et al., 2018).

### **Ekologie:**

*R. trichophyllus* v širokém pojetí osidluje široké spektrum biotopů od nížin po velehory a vyskytuje se jak ve stojatých, tak v tekoucích vodách. Najdeme jej i terestricky na obnažených dnech a v periodických vodních plochách. Rostliny tolerují eutrofní i oligotrofní prostředí (Englmaier, 2016; Štech et al., 2019; Rich & Jeremy, 1998). Jednotlivé cytotypy se

liší svými nároky. Cytotyp A je nalézán mezotrofních až eutrofních vodách na kyselém substrátu, zatímco cytotyp B preferuje přirozeně eutrofní bázemi bohaté vody nížin (Kaplan et al., 2019).

#### **Rozšíření:**

Areál výskytu druhu *R. trichophyllus* v širokém pojetí je poměrně rozsáhlý, pokrývá téměř celou Evropu, severní Asii, severovýchodní Čínu, jihovýchodní Austrálii, Tasmánii a Severní Ameriku (Cook, 1966; Rich & Jermy, 1998; Englmaier, 2016). Na našem území se takto široce pojatý taxon vyskytuje roztroušeně ve středních polohách, zejména v rybníčních oblastech, kde může být místy až hojný (Štech et al., 2019). Jednotlivé cytotypy potom vykazují v České republice rozdílné rozšíření. (Kaplan et al., 2019). V Červeném seznamu cévnatých rostlin ČR je řazen do kategorie C4a (vzácnější taxon vyžadující další pozornost)

#### **2.3.4.2 *Ranunculus trichophyllus* subsp. *eradicatus* (Laest) C. D. K. Cook**

##### **Taxonomická problematika**

Pro populace *R. trichophyllus* z oligotrofních horských jezer, s plazivým vzrůstem a silnou tendencí ke kleistogamii, uznával ve své monografii C. D. K. Cook (Cook, 1966) rank poddruhu a klasifikoval je jako *R. trichophyllus* subsp. *lutulentus*. Později byl ovšem tento taxon (Cook, 1967) zařazen jako *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* a některými dalšími autory (např. Englmaier, 2016) je zahrnován jako samostatný druh *R. confervoides*. Wiegleb et al., 2017 uznává za samostatný taxon (*R. confervoides*) pouze

#### **Rozšíření:**

*Ranunculus trichophyllus* subsp. *eradicatus* má arкто-alpínský typ rozšíření. Jeho areál zahrnuje severní Evropu přes Švédsko, Finsko až po severovýchodní část Ruska a oblast Alp (Cook, 1996).

#### **Ekologie:**

Tento taxon je vázán na oligotrofní vody. Preferuje stabilní biotopy. (Wiegleb et al., 2017). V Alpách osidluje horská jezera až do 2500 m. n m (Englmaier, 2016) *Ranunculus trichophyllus* subsp. *eradicatus* má zcela specifický typ rozšíření. Obývá vysokohorská jezera a zároveň vodní plochy ve Skandinávii (Cook, 1966). Tyto geograficky vzdálené biotopy však spojují podobné ekologické faktory: stabilita prostředí, chladná a čistá voda, a značná

prostorová izolovanost od jiných vodních ploch. Tento typ rozšíření může souviset i s historií krajiny od dob posledního glaciálu. Příklady prokázaných glaciálních reliktních v rámci vodních rostlin jsou velmi vzácné, například *Isoetes lacustris* a *Isoetes echinospora* (Břízová, 2011.) nebo *Stuckenia × fennica* (Bobrov, 2007).

## 2.4. Principy použitých metod

### 2.4.1. Průtoková cytometrie

Metoda průtokové cytometrie (flow cytometry, FCM) je využívána v botanice zejména ke stanovení relativního či absolutního obsahu jaderné DNA v buňce (Doležel et al., 2007b). Principem této techniky je optická analýza rostlinných jader (Shapiro, 2005). Zkoumaný vzorek je spolu s vhodným rostlinným standardem rozsekán a smísen s pufrem pro odstranění sekundárních metabolitů. V této fázi dojde k uvolnění buněčných jader z rostlinných buněk. Následně je přidán fluorochrom (fluorescenční barvivo), jež se váže k nukleové kyselině. Takto obarvené částice jsou v průtokovém cytometru unášeny proudem kapaliny úzkou kapilárou (hydrodynamická fokusace) a po jejich osvětlení barvivo na ně navázané emituje záření. Fluorescenci přístroj detekuje a zaznamená relativní intenzitu fluorescence, která odpovídá množství DNA v jádrech (Suda, 2011). Kvůli rozdílné barvitelnosti jednotlivých částic, přístrojovým chybám a dalším faktorům dochází k rozptylu hodnot fluorescence. Tuto variabilitu vyjadřuje variační koeficient (coefficient of variation, CV) jako podíl směrodatné odchylky a střední hodnoty pozice píku. Tento koeficient vypovídá o rozlišovací schopnosti daného měření a zpravidla nabývá 1–10 %. Nicméně pro relevantní analýzy by neměl přesáhnout 3 %. Pomocí průtokové cytometrie lze na základě odlišné velikosti genomu identifikovat jednotlivé kryptické taxony, polyploidy a hybridy (Suda, 2011). Metoda však poskytuje informaci pouze o celkovém množství jaderné DNA, nikoli o počtu chromozomů, proto je vhodné před stanovením ploidní úrovně část vzorků nejprve karyologicky ověřit (Suda, 2011).

### 2.4.2. Molekulární analýzy – sekvenování DNA

Ze široké škály metod molekulární genetiky je tou nejdéle používanou klasické (Sangerovské) sekvenování. Principem je detekce přesné pozice jednotlivých nukleotidů v řetězci studované DNA. Studované jedince pak můžeme srovnávat na základě přítomnosti polymorfismů mezi jejich DNA, jako jsou bodové mutace, čili záměny jednotlivých

nukleotidů (SNP – single nucleotid polymorphism) a délkové polymorfismy (INDEL – insertion, deletion), způsobené vložením nebo vystřížením nukleotidů (Krak, 2011).

Hojně využívaným molekulárním markerem ve fylogenetice rostlin je ribozomální jaderná DNA, a to zejména úsek ITS (Internal Transcribed Spacer – prepisovaný mezerník mezi geny pro velkou a malou ribozomální podjednotku), jež vykazuje dostatečnou variabilitu pro studium na druhové úrovni (Soltis et al., 1998). Díky sekvenování tohoto úseku byla již u lakušníků odhalena určitá diverzita (Hörandl et al., 2005; Telford et al., 2011; Emadzade, 2012; Hörandl & Lumberras, 2014; Bobrov et al., 2015 a Zalewska-Gałosz et al., 2015). Úsek ITS může podléhat koncertované evoluci (concerted evolution), kdy dochází k homogenizaci sekvencí DNA v genomech vzniklých hybridizací (Bailey et al., 2003). V takovém hybridogenním genomu dokáže sekvence jednoho rodiče zcela nahradit tu druhou, případně koexistují v genomu obě sekvence, ale rekombinují se do podoby tzv. chiméry. Homogenizace zároveň probíhá u jednotlivých organismů různou rychlostí. Nehomogenizovaná jaderná ribozomální DNA se tedy může uchovat i u starých hybridogenních linií a naopak homogenizované sekvence mohou vzniknout již po několika generacích recentních hybridů (Krak, 2011).

Chloroplastová DNA je do značné míry konzervativní. Její nekódující úseky však disponují dostatečnou variabilitou na mezidruhové úrovni (Soltis et al., 1998). Díky haploidnímu charakteru navíc nepodléhá rekombinaci a můžeme díky ní sledovat evoluci po mateřské linii, tedy i směr případné hybridizace (Soltis et al., 1998). V molekulárních analýzách sekce *Batrachium* byl již vyžit např. úsek *matK* (úsek kódující geny pro protein intronová maturáza, jež se účastní splicingu intronů; Koga et al., 2008, Zalewska-Gałosz et al., 2015) nebo nekódující úseky *rpl32-trnL* a *psbE-petL* (Bobrov et al., 2015). Chloroplastová DNA je obecně konzervativnější než jaderná DNA a díky jejímu haploidnímu charakteru v ní dochází k rychlejší fixaci alel, přesto v ní můžeme najít dostatečně variabilní úseky i na mezidruhové úrovni (Soltis et al., 1998). Jelikož je chloroplastová DNA maternálně dědičná a nedochází v ní k rekombinaci, je zde malá variabilita v rámci jedince, zároveň ale neposkytuje informace o hybridizaci, a proto je nutno analýzy chloroplastové DNA porovnávat s výsledky sekvenace úseků jaderné DNA (Krak, 2011).

### **2.4.3. Morfometrická analýza**

Morfometrická analýza slouží ke zhodnocení variability fenotypových znaků využitelná zejména na druhové a vnitrodruhové úrovni. Tento přístup se s úspěchem uplatňuje

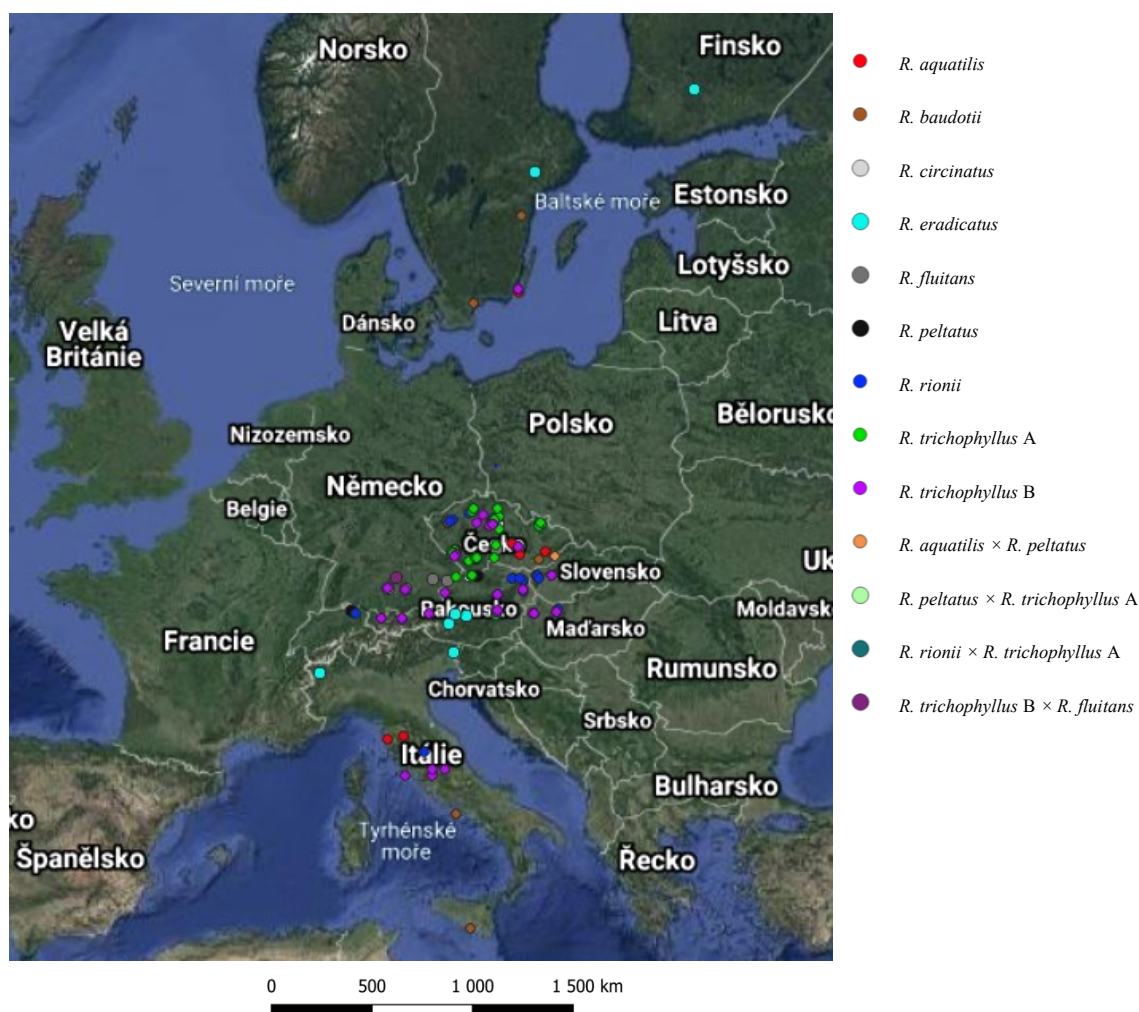
pro morfologickou delimitaci taxonů a zjištění rozdílů mezi jednotlivými cytotypy. Kritický je při tom výběr studovaného materiálu a hodnocených znaků. Do analýz by měly být zahrnuty také znaky, které jsou běžně používány k odlišení jednotlivých taxonů pro pozdější ověření jejich relevance. Vyloučeny by naopak měly být znaky, které jsou silně ovlivněny ekologickými podmínkami, či takové, jež jsou patrné pouze na orgánech v určité fázi vývoje (Marhold 2011).

Tradiční morfometrické přístupy (*distance-based morphometrics*) jsou založeny hlavně na kvantitativních analýzách měřených struktur. Získaná multivariační data jsou analyzována prostřednictvím mnohorozměrných statistických metod. Tyto metody mohou sloužit jak k tvorbě taxonomických hypotéz, tak k jejich testování. K prvně jmenovanému účelu se používají shlukovací analýzy a ordinační metody jako jsou například PCA (analýza hlavních komponentů) nebo PCoA (analýza hlavních koordinát), které ukazují strukturu v pozorovaných datech. K testování hypotéz se potom využívají diskriminační analýzy. Ty testují příslušnost vzorků do předem stanovených skupin (Henderson, 2006; Marhold 2011).

### 3. Metodika

#### 3.1. Sběr materiálu

Na základě literárních pramenů, údajů floristů, herbářových položek, dat z databází PLADIAS a GBIF a podle satelitních snímků byly vybrány lokality rozmístěné na území střední Evropy. Sběr byl soustředěn převážně na území ČR a doplněn o některé další oblasti sousedních zemí. Menší část vzorků tvoří také sběry ze Skandinávie a Itálie (viz Obr. 3). První ze jmenovaných oblastí byla zahrnuta s ohledem k nejasné taxonomii taxonu *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* (viz kapitolu 2.3.4.2) a také kvůli záznamu hexaploidních jedinců *R. trichophyllus* (Hong, 1991). Itálie jakožto oblast mediteránu byla zahrnuta do sběrů této práce pro potenciální výskyt ancestrálních diploidů (Dahlgren, 1991). Celkem bylo nasbíráno 123 populací vybraných taxonů (viz Přílohu 1). Převážnou část sběrů tvořila skupina *R. trichophyllus* agg., morfologicky vymezená jako malokvěté homofylní rostliny s chlupatými nažkami (viz kapitolu 2.3.4.). Dále byly zahrnuty druhy *R. aquatilis* a *R. baudotii* které jsou v homofylním stavu morfologicky podobné některým liniím skupiny *R. trichophyllus* a ze stejných důvodů také homofylní druh *R. rionii* i případní homofylní hybridy jmenovaných taxonů.



**Obr. 3 – Mapa lokalit sběru vzorků jednotlivých taxonů.**

Na každé lokalitě byly zaznamenány přesné GPS souřadnice (souřadnicový systém WGS 84). Následně bylo ke studiu vybráno ideálně 5–10 jedinců sbíraných v dostatečných rozestupech (alespoň 2 m), se zvláštním zřetelem na zachycení celé morfologické variability populace. S ohledem na velikost populace byl však na některých lokalitách počet sbíraných jedinců i nižší. U rostlin vykazujících specifické morfologické znaky nasvědčující např. hybridnímu původu byl naopak počet sebraných rostlin proporcionálně navýšen tak, aby byla pokryta celá pozorovatelná škála znaků. Pro následné analýzy bylo z každého jedince odebráno čerstvé listové pletivo na analýzu velikosti genomu. Dále bylo odebráno listové pletivo do silikagelu na molekulární analýzy. Poté byla z každého jedince zhotovena herbářová položka. Květy rostlin byly na položce zafixovány menším kouskem papíru, jelikož korunní lístky mají tendenci se krabatit a opadávat. Všechny položky budou uloženy v herbáři Katedry botaniky PřF UK (PRC), v herbáři Botanického ústavu AV ČR (PRA), případně v herbáři katedry botaniky PřF JU (ČBFS).

Podle potřeby byli na vybraných lokalitách odebráni živí jedinci na následnou kultivaci a karyologickou analýzu, tak aby byly zahrnuty všechny zjištěné cytotypy.

Diplomová práce navazuje na aktivity výzkumné skupiny pro studium vodních makrofyt pod vedením Zdeňka Kaplana (GAČR 17-06825S Kryptická variabilita vodních rostlin způsobená mezidruhovou hybridizací a polyploidizací). Jelikož populace druhu *R. trichophyllus* se často na lokalitách vyskytují jen v určitých letech a sběr materiálu je proto obtížný, bylo z toho důvodu využito i poměrně velké množství materiálu ze sběrů Jana Prančla (BÚ AV ČR) a Petra Kouteckého (PřF JU). U těchto vzorků již byla provedena cytometrická analýza (Prančl et al., 2018), zatímco já jsem vzorky zpracovala molekulárními a morfometrickými metodami. Dále jsem u 277 vzorků zařazených do diplomové práce provedla izolaci DNA. Pro analýzy jsem také vybrala a použila některé dříve vyizolované vzorky Jana Prančla a Petra Kouteckého. Zpracování a vyhodnocení získaných dat a stejně tak veškeré morfometrické analýzy jsem provedla sama.

### 3.2. Průtoková cytometrie

Pro stanovení velikosti genomu byla použita standardní dvoustupňová metodika k přípravě vzorků (Otto 1990, upraveno dle Doležel et al., 2007). Jako interní standard byla zvolena *Bellis perennis* ( $2C = 3,38$  pg; Schönswetter et al., 2007). Do Petriho misky s 0,5 ml vychlazeného pufru Otto I (0,1M monohydrát kyseliny citronové, 0,5% Tween 20; Otto 1990) bylo odebráno přibližně 0,25 cm<sup>2</sup> listového pletiva vzorku a vhodné množství listového pletiva standardu (s ohledem na odhadovanou plovidii vzorku). Nasekáním žiletkou byla vytvořena suspenze, která byla následně přefiltrována přes nylonový filtr (průměr ok 42 μm) do zkumavky. Po inkubaci (cca 5 minut) byl ke vzorku přidán 1 ml barvicího roztoku skládajícího se z pufru Otto II (0,4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; Otto 1990), RNázy A (50 μg/ml, Sigma), antioxidantu β-merkapt ethanolu (2 μl/ml, Sigma) a fluorescenčního barviva propidium jodid (50 μg/ml, Sigma). Takto připravené vzorky byly analyzovány na přístroji Partec CyFlow (Partec, Münster, Germany, zelený [532 nm] solid state laser jako excitační zdroj). Počet analyzovaných částic byl nastaven na 5000. Vzorky byly analyzovány alespoň třikrát v různých dnech, aby byla zajištěna eliminace náhodných odlehlých měření. Materiál byl po dobu nutnou pro zpracování uchováván ve vlhčených igelitových sáčkách v chladničce. Pro výpočty byla použita pouze měření s koeficienty variance pod 3 %. Analyzováno bylo celkem 799 jedinců. K vyhodnocení výsledných histogramů byl použit program FloMax veR. 2.4d (Partec GmbH).

### 3.3. Molekulární analýzy – sekvenování DNA

#### 3.3.1. Izolace DNA, PCR a sekvenování

Molekulární analýzy byly provedeny na 288 vzorcích. Pro lepší pochopení evoluční historie zájmových taxonů jsem využila k fylogenetickým analýzám i několik sekvencí jiných taxonů sekce *Batrachium*, které se vyskytují na území střední Evropy (*R. circinatus*, *R. fluitans*, *R. peltatus*; v grafických výstupech vyznačeny šedě).

V rámci této práce byl sekvenován úsek ITS a dva úseky chloroplastové DNA (*rpl32-trnL* a *3'rps16-5'trnK*). Ty byly pro lakušníky vybrány z deseti různých úseků, jež byly publikovány jako nejvariabilnější úseky chloroplastové DNA (Shaw et al., 2007).

Izolace celkové DNA byla provedena podle modifikovaného protokolu pro sorbitolovou extrakci (Štorchová et al., 2000; viz protokol v Příloze 2). Kvalita vyizolované DNA byla ověřena horizontální elektroforézou na 0,8% agarózovém TAE gelu v TAE pufru s použitím žebříčku Hind III. DNA na gelu byla vizualizována v UV transluminátoru (Herolab UVT-20M) pomocí dokumentačního systému Kodak Gel Logic 100 a softwaru 1D Image Analysis (Kodak). Následně byla změřena koncentrace získané DNA na přístroji Nanodrop (Thermo Scientific) a vzorky byly naředěny na pracovní koncentraci 10 ng/μl v množství 100 μl pro použití v PCR (Polymerase chain reaction).

Vybrané úseky DNA byly amplifikovány pomocí PCR, informaci o primerech pro jednotlivé úseky shrnuje Tab. 6. Reakční směs byla odpipetována do mikrokumavek a vložena do termocykleru (Eppendorf Mastercycler Pro). Složení reakční směsi uvádí Tab. 7. Teplotní cykly programu shrnuje Tab. 8.

**Tab. 6 – vybrané úseky DNA a primery pro jejich amplifikaci**

Úsek	Primer F	Primer R	Sekvence
<i>rpl32-trnL</i>	trnL <sup>(UAG)</sup> (Shaw et al. 2007)	rpL32-F (Shaw et al. 2007)	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT  CAGTTCCAAAAAACGTA CTTC
<b>3' rps16-5' trnK</b>	rps16x2-a (Shaw et al. 2007)	trnKx1-a (Shaw et al. 2007)	GAAAGTGGGTTTTTATGATCC  TAAAAGCCGAGTACTCTACC
<b>ITS</b>	ITSF (King et al. 2001)	ITS4Z(White et al. 1990)	TATCATTTAGAGGAAGGAG  TCCTCCGCTTATTGATATGC

**Tab. 7 – složení reakční směsi pro PCR**

Reakční směs (master mix) pro celkový objem 20 µl	
složka	objem
ddH <sub>2</sub> O	14 µl
MyTaq pufr	4 µl
primer F	0,4 µl
primer R	0,4 µl
My Taq polymeráza	0,2 µl
DNA vzorek	2 µl

**Tab. 8 – Teplotní cyklus PCR reakce**

fáze cyklu	teplota	čas	opakování
<b>počáteční denaturace</b>	95°	1 min	1x
<b>denaturace</b>	95°	0,5 min	35x
<b>annealing</b>	52° (cpDNA) 53° (ITS rDNA)	0,5 min	
<b>elongace</b>	72°	1 min	
<b>finální elongace</b>	72°	15 min	1x

Pro kontrolu úspěšnosti PCR reakce byla provedena elektroforéza s použitím žebříčku O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus a vizualizace v dokumentačním systému Kodak Gel Logic 100. Následně byly vzorky přečištěny pomocí octanu sodného a ethanolu (viz protokol). Po purifikaci byla změřena koncentrace DNA na přístroji Nanodrop. Do mikrozkušavek byl napipetován 1 µl primeru a 7 µl směsi přečištěné DNA vzorku a dd H<sub>2</sub>O v takovém poměru, aby výsledná koncentrace DNA ve směsi byla 30 ng/µl. Úseky chloroplastové DNA byly vždy sekvenovány s F (forward) primerem. V případě posunu čtecího rámce a nečitelných konců byla sekvenace provedena obousměrně, tedy i s R (reverse) primerem. Úsek ITS byl obvykle sekvenován pouze z jedné strany, tedy pouze s F primerem. Vlastní sekvenace byla provedena Laboratoří sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

### 3.3.2. Fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly manuálně zkontrolovány a upraveny v programu Chromas v2.6.2 (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Qld, AU). Nukleotidový alignment byl vytvořen pomocí softwaru Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999). Alignment úseku ITS zahrnoval 295 sekvencí a byl dlouhý 614 nukleotidů. Alignment úseku *rpl32-trnL* zahrnoval 295 sekvencí a byl dlouhý 858 nukleotidů. Alignment úseku 3'*rps16*-5'*trnK* zahrnoval 295 sekvencí a byl dlouhý 555 nukleotidů. Fylogenetické stromy byly získány pomocí metody Parsimonické analýzy v programu PAUP (Swofford, 1998). Jelikož lze v rámci skupiny očekávat retikulární evoluci způsobenou hybridizací, byly rovněž zkonstruovány fylogenetické sítě za použití NeighborNet metody v programu SplitsTree v4.10 (Huson & Bryant 2006). Bootstrapové podpory sítí byly stanoveny s 1000 replikacemi

### 3.4. Morfometrické analýzy

Zkoumání morfologické variability bylo provedeno na vegetativních i generativních orgánech. Do morfometrických analýz bylo celkem zahrnuto 354 rostlin. Rostliny byly přiřazeny ke skupinám definovaným na základě velikosti genomu a molekulárních analýz. Byl použit tradiční morfometrický přístup (distance-based morphometrics). Znakový soubor byl vybrán na základě publikovaných determinačních klíčů (Kaplan & Pránčl, 2019; Englmaier, 2016; Rich & Jeremy, 1998), morfologických studií (Cook, 1963, 1966; Wiegleb, 1988; Dahlgren, 1992) a vlastních terénních pozorování. Celkem bylo měřeno 44 znaků na vegetativních i generativních částech rostlin (viz Tab. 9 a Obr.4–12). Všechny znaky byly měřeny na suchých (herbarizovaných) položkách. K měření většiny kvantitativních znaků

bylo použito digitální posuvné měřítko (přesnost 0,01 mm) a pro kvantitativní znaky v14, v15, v31, v32, v38, v39, v41 vestavěné měřítko ve stereomikroskopu. Pro hodnocení kvalitativních znaků tvar valu kolem jamky nektária, prohnutí plodní stopky, esovitě prohnutí plodní stopky, chlupatost květního lůžka za plodu a chlupatost nažek byly stanoveny škály popsané na Obr. 7, 8, 10 a 12. Kvalitativní znaky byly následně převedeny do soustavy fingovaných binárních znaků (*dummy variables*). Ze soustavy binárních znaků byl vždy vyloučen stav kvalitativního znaku s nejvyšší četností (tvar valu kolem jamky nektária: okrouhlý; prohnutí plodní stopky nazpět: mírné; esovitě prohnutí plodní stopky: rovná; chlupatost plodního lůžka: chlupaté; chlupatost nažky: lysá). Znaky v14 a v15 byly měřeny u každé rostliny na pěti korunních lístcích a dále zprůměrovány. Znaky v20 až v29 byly měřeny u až tří (s ohledem na stav rostliny) zralých souplodí různých větví lodyhy téže rostliny a jejich hodnota byla stanovena jako průměr těchto měření. Znak chlupatost květního lůžka za plodu byl taktéž skórován až u tří různých souplodí, nicméně s ohledem na kvalitativní charakter znaku byl místo průměrné hodnoty vybrán vždy stav s nejvyšší četností. Na každém z vybraných souplodí byly dále měřeny vždy tři nažky. Hodnota znaků v40, v41 a v43 byla vypočtena jako průměr měření všech nažek téže rostliny. Pro znak chlupatost nažky byl vždy vybrán stav s nejvyšší četností. Šířka lodyhy byla stanovena jako průměr z až pěti měření (s ohledem na stav rostliny). Měřeno bylo vždy internodium dva články pod plodní stopkou prvního zralého souplodí od vrcholu lodyhy směrem k její bázi, a to v polovině délky (viz Obr. 4).

Dále byly vytvořeny čtyři datasey, které se lišily zastoupením taxonů a znaků, v rámci nichž byly separátně prováděny jednotlivé morfologické analýzy. Získaná data byla zpracována v prostředí software R 3.3.2 s rozšiřujícími balíčky *ade4*, *class*, *permut*, *scatterplot3d* a *vegan* (R Team, 2016) pomocí sady funkcí *MorphoTools* (Koutecký, 2015). Ze vstupní matice byly nejprve spočítány základní popisné statistiky. Poté bylo testováno normální rozdělení dat pro jednotlivé znaky pomocí Shapiro-Wilk testu. Použité znaky neměly normální rozdělení, proto byly následně jejich hodnoty transformovány s použitím dekadického logaritmu. Pro zjištění korelace znaků byl stanoven Pearsonův koeficient. Dvojice znaků s koeficientem vyšším než  $|0,95|$  byly považovány za těsně korelované a jeden znak z takové dvojice byl vždy z dalších analýz vyloučen. Pro diskriminační analýzy také byly vyloučeny znaky, jež se ukázaly být v některé ze skupin konstantní. Ke zjištění základní struktury v datech byla provedena analýza hlavních komponent (PCA). Ke stanovení znaků, které nejvíce přispívají k odlišení skupin, byla využita kanonická diskriminační analýza

(CDA), skupiny byly pro tuto analýzu předefinovány na základě velikosti genomu a sekvenční podobnosti. Za účelem zjištění míry úspěšnosti správného určení při použití daných znaků byla také provedena klasifikační diskriminační analýza.

Dataset I zahrnoval všechny měřené jedince s kompletním měřením všech morfologických znaků. Z datasetu byly pro analýzy vyloučeny těsně korelované znaky: délka listu protistojného plodní stopce prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny, průměrná délka listu a průměrný poměr počet úkrojků/délka listu. Pro diskriminační analýzy byly vyloučeny znaky: délka listu protistojného plodní stopce prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny, průměrná délka listu, průměrný poměr počet úkrojků/délka listu, tvar valu kolem jamky nektária hruškovitý, tvar valu kolem jamky nektária okrouhlý, prohnutí plodní stopky nazpět – prohnutá, prohnutí plodní stopky nazpět – rovná, prohnutí plodní stopky esovité – prohnutá, prohnutí plodní stopky esovité – mírné, chlupatost květního lůžka za plodu – lysé, chlupatost květního lůžka za plodu – řídce chlupaté, chlupatost květního lůžka za plodu – hustě chlupaté, délka zobánku nažky, chlupatost nažky – hustě chlupatá, chlupatost nažky – chlupatá, chlupatost nažky – řídce chlupatá.

Dataset II zahrnoval všechny měřené jedince se zahrnutím pouze vegetativních znaků. Z datasetu II byly pro analýzy vyloučeny těsně korelované znaky: poměr délka čepele/délka listu – list č. 1, průměrný poměr délka čepele/délka listu.

Dataset III zahrnoval všechny měřené jedince se zahrnutím pouze generativních znaků. V datasetu II nebyly přítomny žádné těsně korelované znaky. Pro diskriminační analýzy byly vyloučeny znaky: tvar valu kolem jamky nektária hruškovitý, tvar valu kolem jamky nektária okrouhlý, prohnutí plodní stopky nazpět – prohnutá, prohnutí plodní stopky nazpět – rovná, prohnutí plodní stopky esovité – prohnutá, prohnutí plodní stopky esovité – mírné, chlupatost květního lůžka za plodu – lysé, chlupatost květního lůžka za plodu – řídce chlupaté, chlupatost květního lůžka za plodu – hustě chlupaté, délka zobánku nažky, chlupatost nažky – hustě chlupatá, chlupatost nažky – chlupatá a chlupatost nažky – řídce chlupatá.

Dataset IV zahrnoval jedince z molekulárně definovaných skupin *R. trichophyllus* agg. s kompletním zahrnutím všech morfometrických znaků. Z datasetu IV byly pro analýzy vyloučeny těsně korelované znaky: poměr délka čepele/délka listu – list č. 1, průměrná délka listové čepele, průměrný poměr počet úkrojků/délka listu, délka listu protistojného plodní stopce prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny a invariabilní znak prohnutí plodní stopky

esovité – prohnutá. Pro diskriminační analýzy byly vyloučeny znaky: tvar valu kolem jamky nektária hruškovitý, tvar valu kolem jamky nektária okrouhlý, prohnutí plodní stopky nazpět – prohnutá, prohnutí plodní stopky nazpět – rovná, prohnutí plodní stopky esovité – prohnutá, prohnutí plodní stopky esovité – mírné, chlupatost květního lůžka za plodu – lysé, chlupatost květního lůžka za plodu – řídce chlupaté, chlupatost květního lůžka za plodu – hustě chlupaté, délka zobánku nažky, chlupatost nažky – hustě chlupatá, chlupatost nažky – chlupatá a chlupatost nažky – řídce chlupatá.

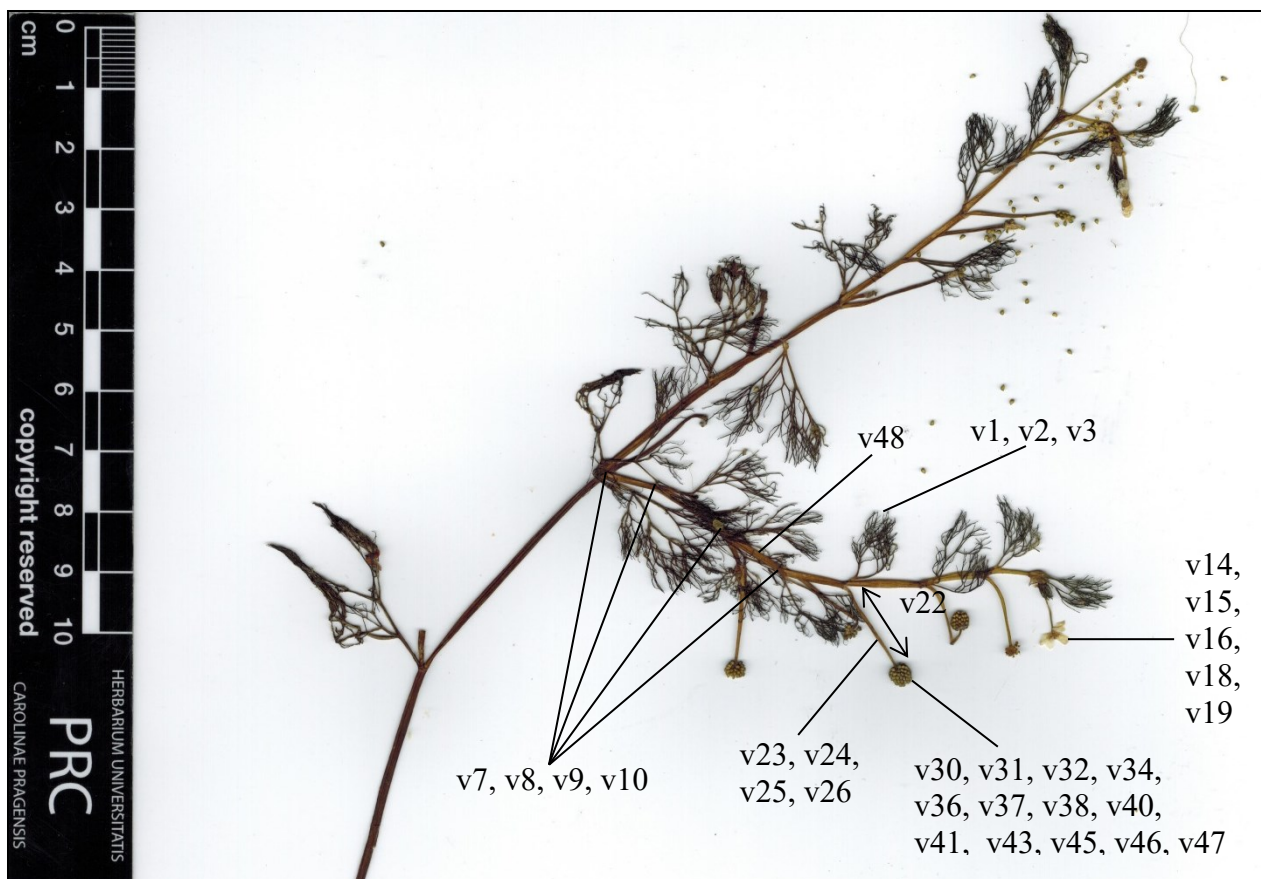
**Tab. 9 – Soubor měřených a odvozených znaků.**

číslo znaku	kód znaku	znak	jednotky	vzorec odvozeného znaku
v1	DRI	délka řapíku – list č. 1 *	mm	
v2	DCI	délka listové čepele – list č. 1 *	mm	
v3	PUI	počet úkrojků – list č. 1 *	počet	
v4	pRLI	poměr délka řapíku/délka listu – list č. 1 *	poměr	$v1/(v1+v2)$
v5	pCLI	poměr délka čepele/délka listu – list č. 1 *	poměr	$v2/(v1+v2)$
v6	pPULI	poměr počet úkrojků/délka listu – list č. 1 *	poměr	$v3/v2$
v7	DR	průměrná** délka řapíku	mm	
v8	DC	průměrná** délka listové čepele	mm	
v9	PU	průměrný** počet listových úkrojků	počet	
v10	DL	průměrná** délka listu	mm	$v7+v8$
v11	pRL	průměrný** poměr délka řapíku/délka listu	poměr	$v7/(v7+v8)$
v12	pCL	průměrný** poměr délka čepele/délka listu	poměr	$v8/(v7+v8)$
v13	pPUL	průměrný** poměr počet úkrojků/délka listu	poměr	$v9/v8$
v14	DK	délka korunního lístku	mm	
v15	SK	šířka korunního lístku	mm	
v16	mSK	poměr vzdálenost nejširšího místa korunního lístku od báze/délka korunního lístku	poměr	
v17	pSKDK	poměr šířka/délka korunního lístku	poměr	$v15/v14$
v18	TVH	tvar valu kolem jamky nektária hruškovitý	0;1	
v19	TVO	tvar valu kolem jamky nektária okrouhlý	0;1	
v20	DI	délka internodia pod plodní stopkou prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny	mm	
v21	DLI	délka listu protistožného plodní stopce prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny	mm	
v22	DS	délka plodní stopky prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny	mm	
v23	prP	prohnutí plodní stopky nazpět – prohnutá	0;1	
v24	prR	prohnutí plodní stopky nazpět – rovná	0;1	
v25	prsM	prohnutí plodní stopky esovitě – mírné	0;1	
v26	prsP	prohnutí plodní stopky esovitě – prohnutá	0;1	
v27	pSI	poměr délky plodní stopky/internodia pod plodní stopkou prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny	poměr	$v22/v20$

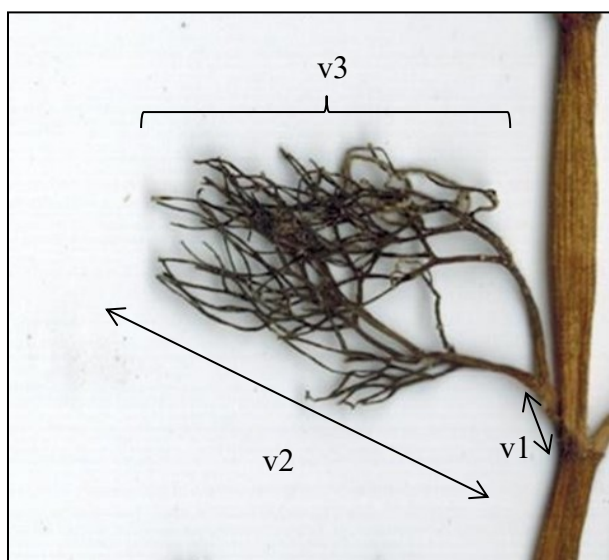
v28	pLII	poměr délky příslušného listu/internodia příslušného plodní stopce prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny	poměr	v21/v20
v29	pLIS	poměr délky příslušného listu/plodní stopky prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny	poměr	v21/v22
v30	CHL	chlupatost květního lůžka za plodu – lysé	0;1	
v31	CHR	chlupatost květního lůžka za plodu – řídce chlupaté	0;1	
v32	CHH	chlupatost květního lůžka za plodu – hustě chlupaté	0;1	
v33	DLU	délka květního lůžka za plodu	mm	
v34	SLU	šířka květního lůžka za plodu	mm	
v35	pSDLU	poměr šířka/délka květního lůžka za plodu	poměr	v30/v29
v36	VN	počet vyvinutých nažek v souplodí	počet	
v37	NN	počet nevyvinutých nažek v souplodí	počet	
v38	N	počet všech nažek v souplodí	počet	v36+v37
v39	pNNN	počet nevyvinutých nažek/počet nažek	poměr	v33/v32
v40	DN	délka nažky včetně zobánku	mm	
v41	Z	délka zobánku nažky	mm	
v42	pZDN	poměr délka zobánku nažky/délka nažky	poměr	v37/v36
v43	SN	šířka nažky	mm	
v44	pSDN	poměr šířka/délka nažky	poměr	v36/v35
v45	CHNH	chlupatost nažky – hustě chlupatá	0;1	
v46	CHN	chlupatost nažky – chlupatá	0;1	
v47	CHNR	chlupatost nažky – řídce chlupatá	0;1	
v48	SLO	šířka lodyhy	mm	

\* List č. 1 je list protistojný plodní stopce prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny.

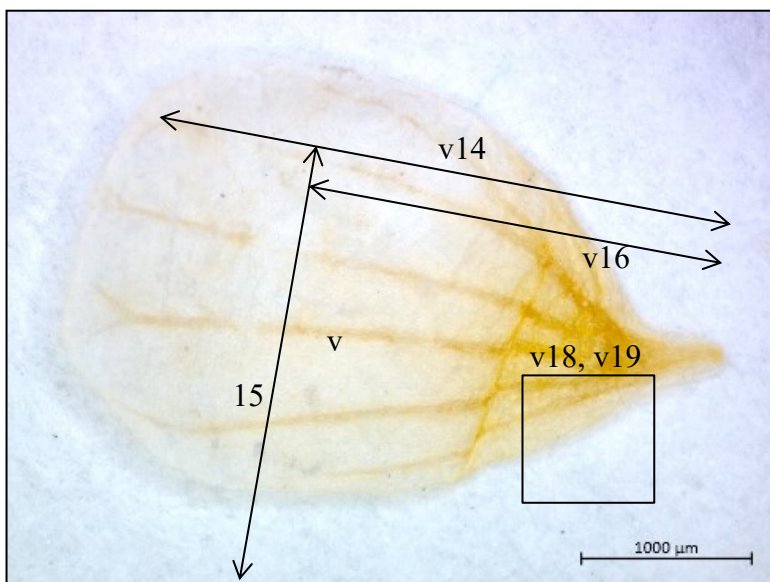
\*\* Průměr hodnot naměřených pro list č. 1 a další až čtyři listy směrem k bázi lodyhy (s ohledem na počet listů na rostlině).



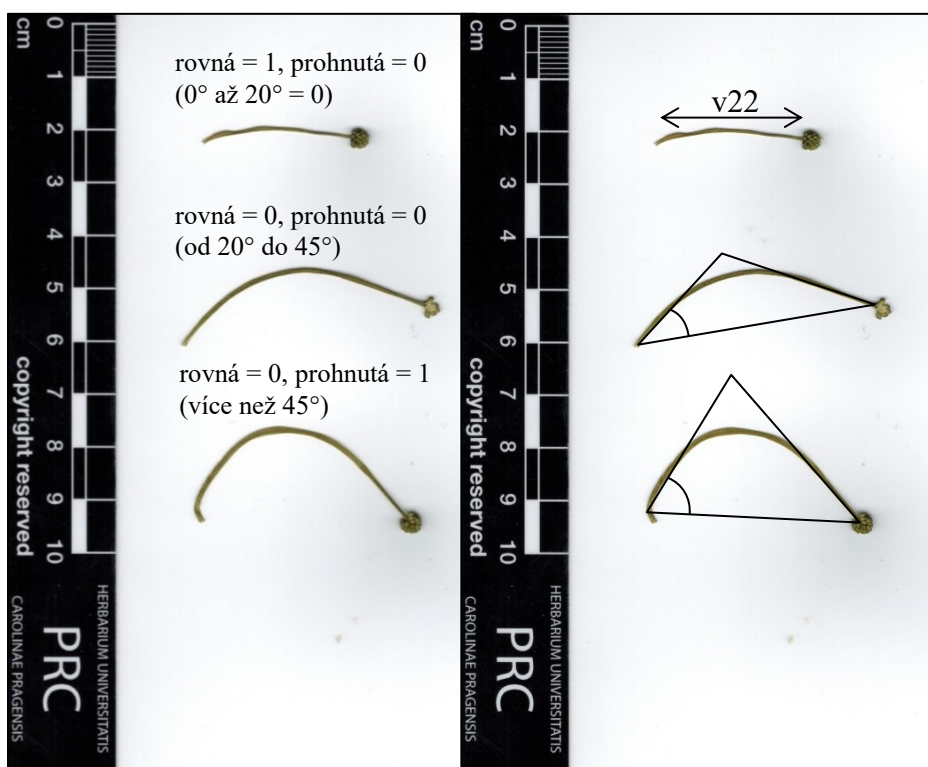
Obr. 4 – Přehled měřených znaků na herbářové položce.



Obr. 5 – Přehled znaků měřených na listech: délka řapíku, délka listové čepele a počet úkrojků.



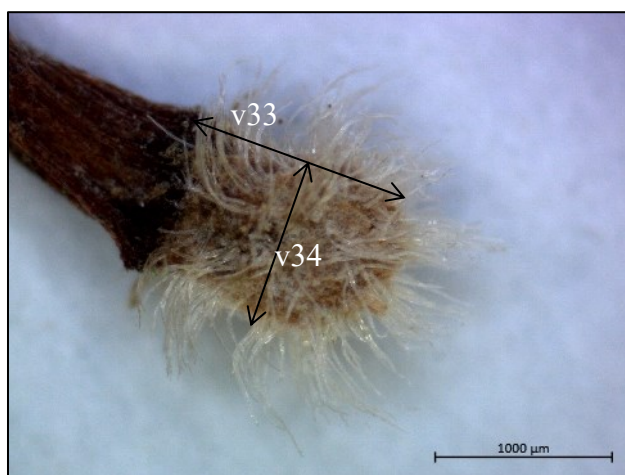
Obr. 6 – Přehled znaků na korunních lístcích: délka a šířka korunního lístku, vzdálenost nejširšího místa korunního lístku od báze a tvar valu kolem jamky nektária.



Obr. 7 – Škála znaku prohnutí plodní stopky nazpět (v23, v24) a způsob měření znaku v22 (délka plodní stopky prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny).



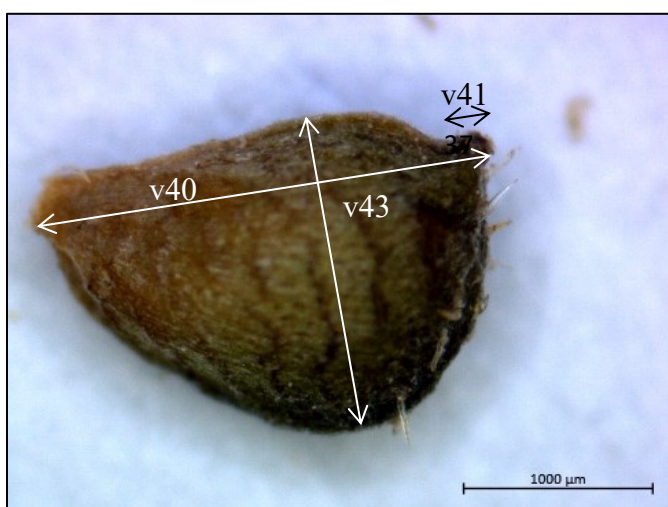
Obr. 8 – Škála znaku prohnutí plodní stopky esovité (v25, v26).



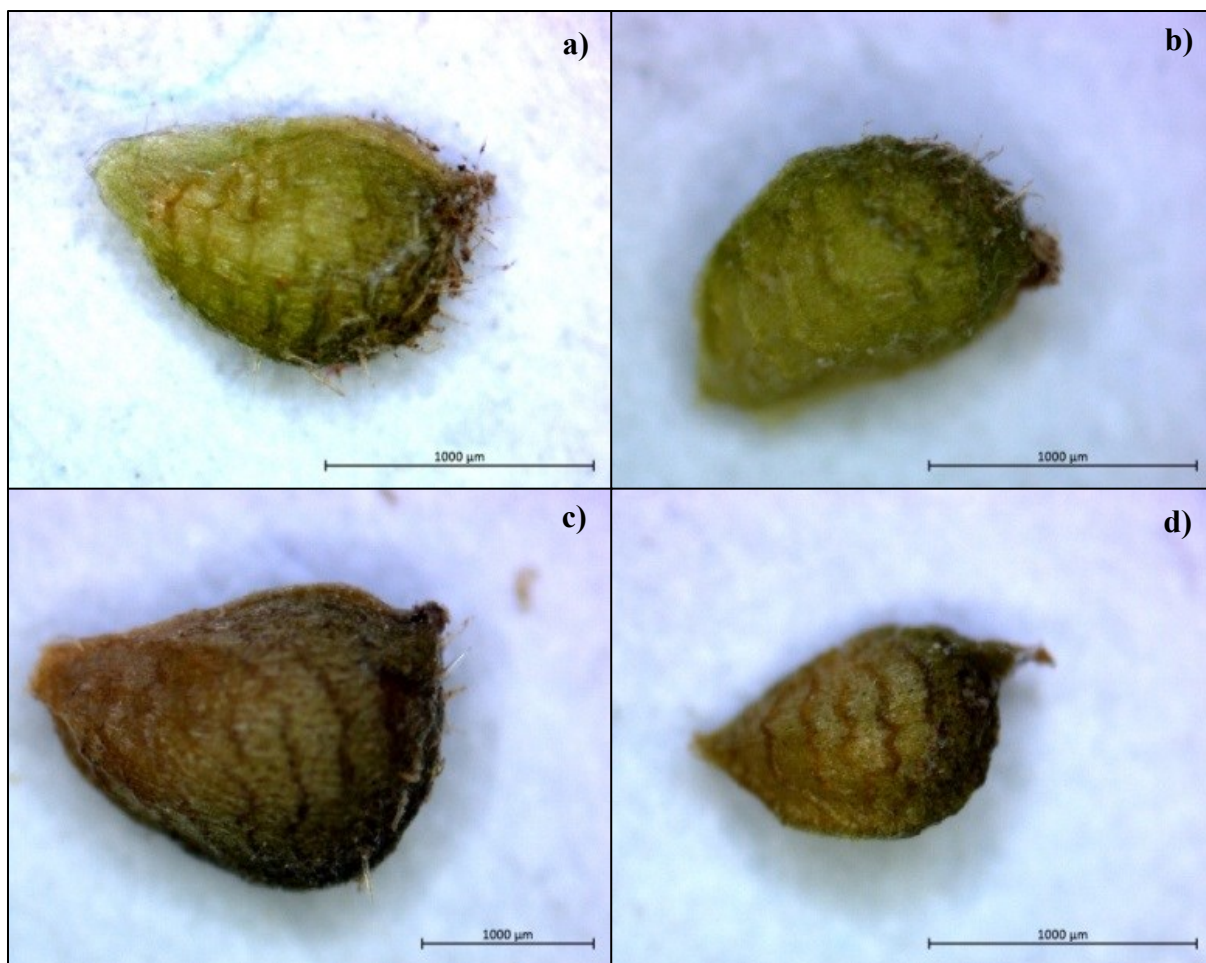
Obr. 9 – Přehled znaků měřených na květním lůžku za plodu: délka a šířka.



**Obr. 10 – Škála znaku chlupatost květního lůžka za plodu: a) řídce chlupaté, b) chlupaté, c) hustě chlupaté.**



**Obr. 11 – Přehled znaků měřených na nažkách: délka nažky, šířka nažky a délka zobánku nažky.**













**Obr. 12 – Škála znaku chlupatost nažky: a) hustě chlupatá, b) chlupatá, c) řídkce chlupatá, d) lysá.**

## 4. Výsledky

Počty jedinců pro jednotlivé typy analýz jsou uvedeny v Tab. 10 a jejich lokality v tabulce v Příloze 1 (Souhrnná tabulka). Jednotlivé taxony byly definovány na základě kombinace morfologie a velikosti genomu – viz následující kapitoly.

**Tab. 10 – Přehled studovaných taxonů s počtem jejich populací a s počtem rostlin použitých pro metodu průtokové cytometrie (počet jedinců FCM), morfometrické (počet jedinců morfometrika) a molekulární analýzy (počet jedinců DNA analýzy).**

Označení	Taxon	Ploidie	Počet populací	Počet jedinců FCM	Počet jedinců morfometrika	Počet jedinců DNA analýzy
	<i>R. aquatillis</i>	6x	15	115	47	36
	<i>R. baudotii</i>	4x	11	84	28	13
		2x	1	1	1	-
	<i>R. rionii</i>	2x	18	143	71	36
	<i>R. trichophyllus</i> cytotyp A	4x	32	237	91	102
	<i>R. trichophyllus</i> cytotyp B	4x	32	174	99	70
	<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	4x	8	26	11	9
	<i>R. aquatilis</i> × <i>R. peltatus</i>	5x?	1	3	1	2
	<i>R. trichophyllus</i> cytotyp A × <i>R. peltatus</i>	4x	2	8	4	6
	<i>R. trichophyllus</i> cytotyp A × <i>R. rionii</i>	3x	1	7	-	3
	<i>R. trichophyllus</i> cytotyp B × <i>R. fluitans</i> ?	3x?	1	1	-	-
<b>Celkem</b>			<b>122</b>	<b>799</b>	<b>353</b>	<b>277</b>

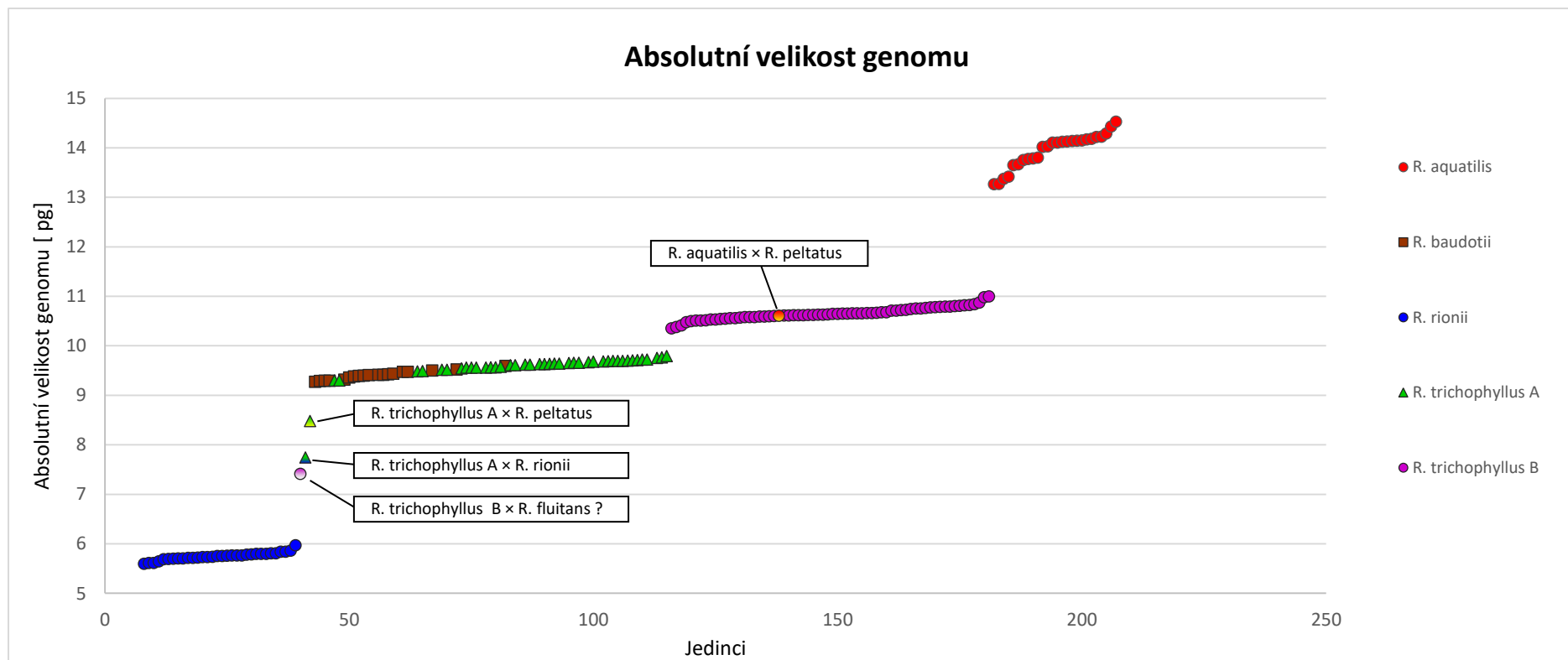
### 4.1. Průtoková cytometrie

Výsledky analýz jsou shrnuty v Tab. 11 a graficky znázorněny na Obr. 13 a 14. Zjištěná data se v zásadě shodují s článkem Prančl et al. 2018, proto jsem k jednotlivým cytotypům převzala ploidní úrovně, které byly ve článku zjištěny klasickými karyologickými metodami (Prančl et al., 2018). Na základě těchto dat bylo stanoveno celkem 5 ploidních úrovní: diploidní ( $2n = 16$ ) až hexaploidní ( $2n = 48$ ). Na základě absolutní velikosti genomu bylo nalezeno pět hlavních nezávislých skupin ( $Pr = <2e-16$ ), (Obr. 14 a Příloha 3). Rostliny morfologicky definované jako *R. aquatilis* a *R. rionii* jsou jednoznačně vymezené velikostí genomu, zatímco pro zbytek taxonů je situace složitější. V rámci taxonu *R. trichophyllus* se jasně vymezipily dvě skupiny

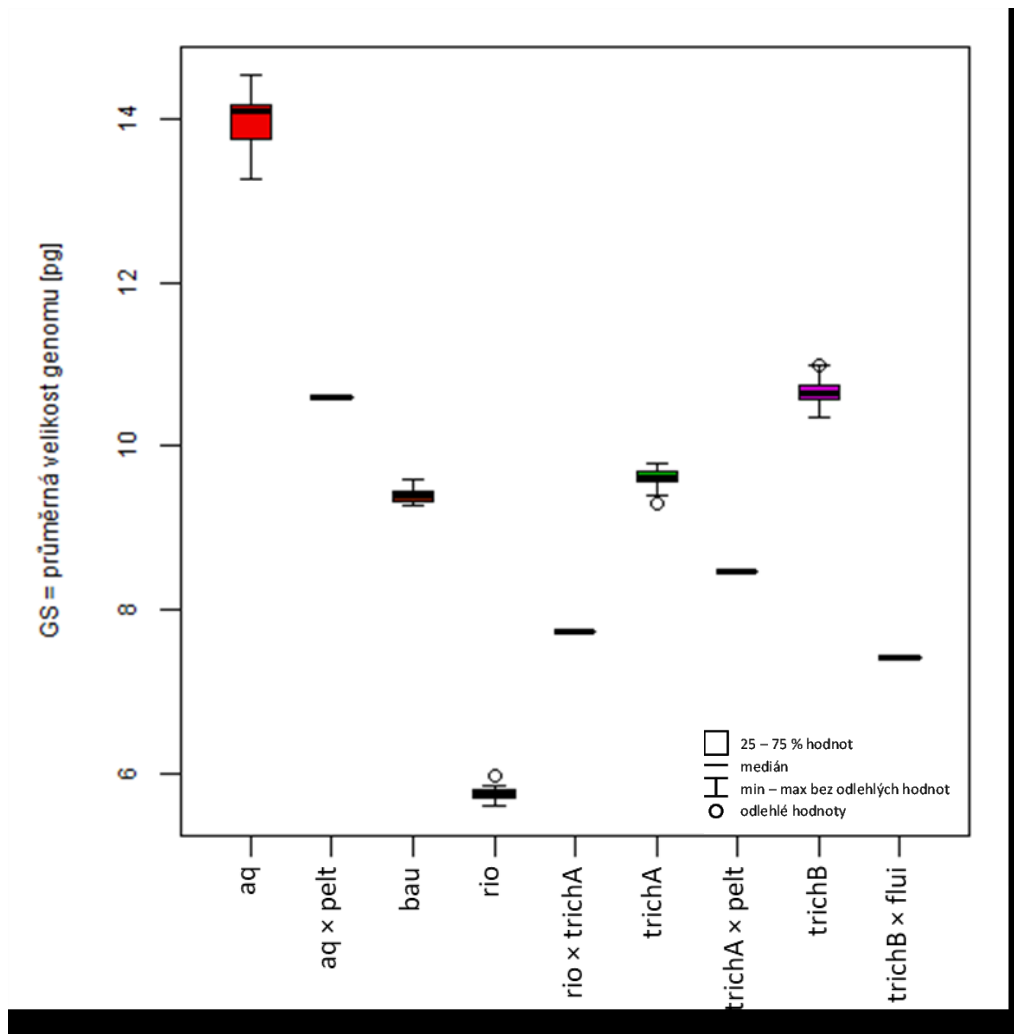
(obě tetraploidní): cytotyp A a cytotyp B, rozdíl v jejich průměrné velikosti genomu činí 10,7 % (viz Obr. 15). *R. trichophyllus* ssp. *eradicatus*, zde definován v tradičním smyslu na základě plazivého růstu po dně, se velikostí genomu překrývá se skupinou *R. trichophyllus* cytotyp A. Jedinci druhu *R. baudotii* nabývali velikostí genomu v mírném překryvu s *R. trichophyllus* (cytotyp A), nicméně rozdíl velikostí je mezi těmito skupinami stále statisticky signifikantní (hodnota Tukey testu:  $p = 0.002$ , viz Přílohu 3). Kromě dominantních cytotypů základních taxonů byly také zaznamenány čtyři minoritní cytotypy u jedinců s pravděpodobným hybridním původem. Na základě intermediární velikosti genomu mezi domnělými rodiči byly všechny tyto cytotypy označeny jako  $F_1$  hybridi. Nejčtenějším z nich byl tetraploidní hybrid *R. peltatus* × *R. trichophyllus* A. Několik rostlin ze směsné populace obou druhů vykazovalo velikost genomu v rozmezí velikosti *R. peltatus* a  $F_1$  hybridů *R. peltatus* × *R. trichophyllus* A. Tyto rostliny pravděpodobně představují zpětné hybridy ve směru k *R. peltatus* (viz Obr. 16).

**Tab. 11 – Průměrné absolutní velikosti genomu [pg] se směrodatnou odchylkou (SD) jednotlivých taxonů. Měřeno s interním standardem *Bellis perennis* (2C = 3,38 pg; Schönswetter et al., 2007).**

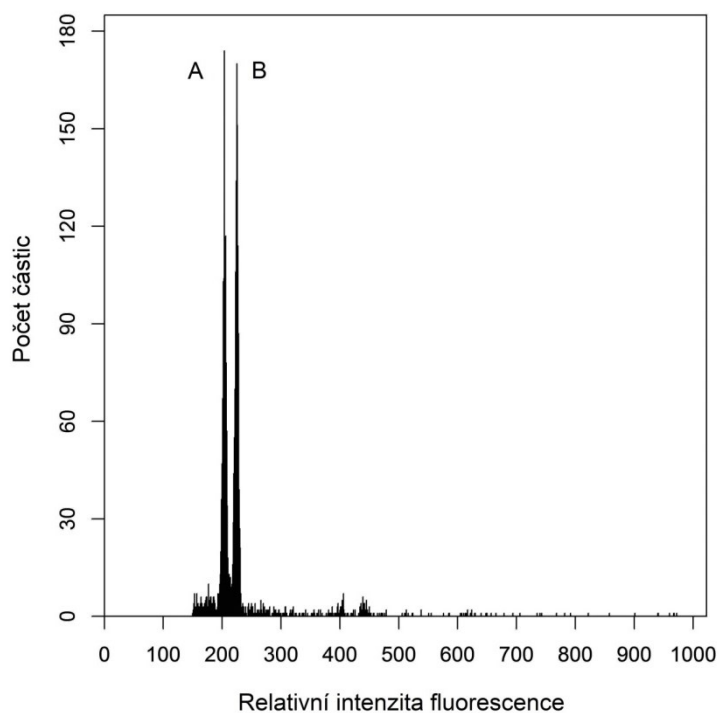
Taxon	Počet jedinců	Ploidie	Průměrná hodnota 2C [pg] ± SD	Rozsah hodnot 2C [pg]	Průměrná hodnota 1Cx [pg] ± SD	Variabilita [%]
<i>R. aquatilis</i>	26	6x	13,153 ± 0,229	12,74–13,57	2,192 ± 0,038	1,74
<i>R. baudotii</i>	19	4x	8,752 ± 0,062	8,44–8,66	2,188 ± 0,016	0,71
<i>R. rionii</i>	32	2x	5,373 ± 0,075	5,24–5,58	2,686 ± 0,037	1,39
<i>R. trichophyllus</i> cytotyp A	41	4x	8,991 ± 0,082	8,71–9,14	2,248 ± 0,021	0,91
<i>R. trichophyllus</i> cytotyp B	65	4x	9,944 ± 0,101	9,73–10,21	2,486 ± 0,025	1,02
<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	26	4x	8,929 ± 0,077	8,78–9,04	2,232 ± 0,019	0,87
<i>R. aquatilis</i> × <i>R. peltatus</i>	1	5x	9,903	-	1,980	-
<i>R. trichophyllus</i> cytotyp A × <i>R. peltatus</i>	8	4x	7,919 ± 0,033	7,86–7,96	1,980 ± 0,008	0,42
<i>R. trichophyllus</i> cytotyp A × <i>R. peltatus</i> (introrese)	4	4x	6,948 ± 0,084	6,84–7,07	1,737 ± 0,021	1,20
<i>R. trichophyllus</i> cytotyp A × <i>R. rionii</i>	1	3x	7,233	-	2,411	-
<i>R. trichophyllus</i> cytotyp B × <i>R. fluitans</i> ?	1	3x?	6,922	-	2,307	-



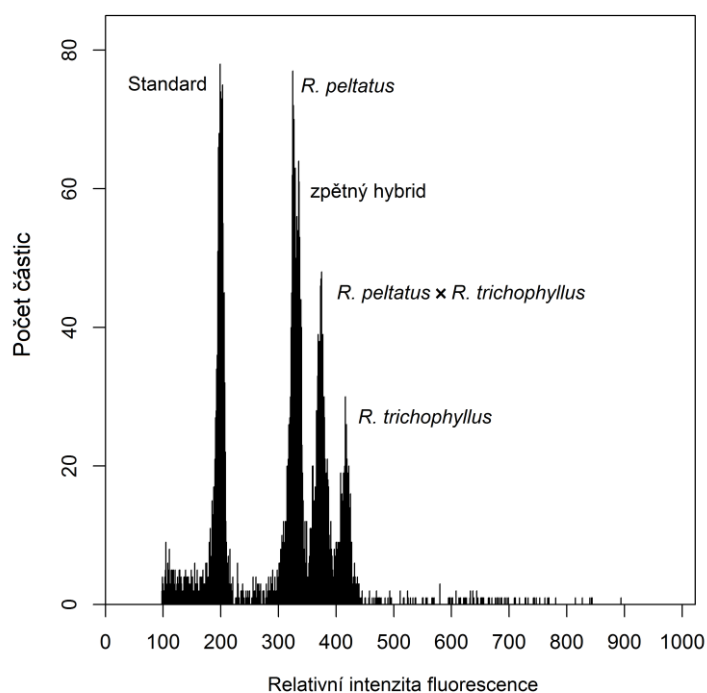
**Obr. 13 – Variabilita v absolutní velikosti genomu studovaných taxonů a jejich hybridů.**



Obr. 14 – Variabilita ve velikosti genomu (2C hodnoty). Srovnání velikosti genomu [pg DNA] studovaných taxonů (aq – *R. aquatilis*; aq × pelt – *R. aquatilis* × *R. peltatus*; bau – *R. baudotii*; rio – *R. rionii*; rio × trichA – *R. rionii* × *R. trichophyllus* A; trichA – *R. trichophyllus* A; trichA × pelt – *R. trichophyllus* A × *R. peltatus*; trichB – *R. trichophyllus* B; trichB × flui – *R. trichophyllus* B × *R. fluitans*).



**Obr. 15 – Histogram relativní intenzity fluorescence dvou tetraploidních cytotypů taxonu *R. trichophyllus* (cytotypy A a B), rozdíl v jejich průměrné velikosti genomu činí 10,7 %.**



**Obr. 16 – Histogram relativní intenzity fluorescence směsné populace B16-015 druhů *R. peltatus* a *R. trichophyllus* z lokality Raputovský rybník. Rodičovské druhy, jejich primární hybrid a pravděpodobný produkt zpětného křížení směrem k druhu *R. peltatus*.**

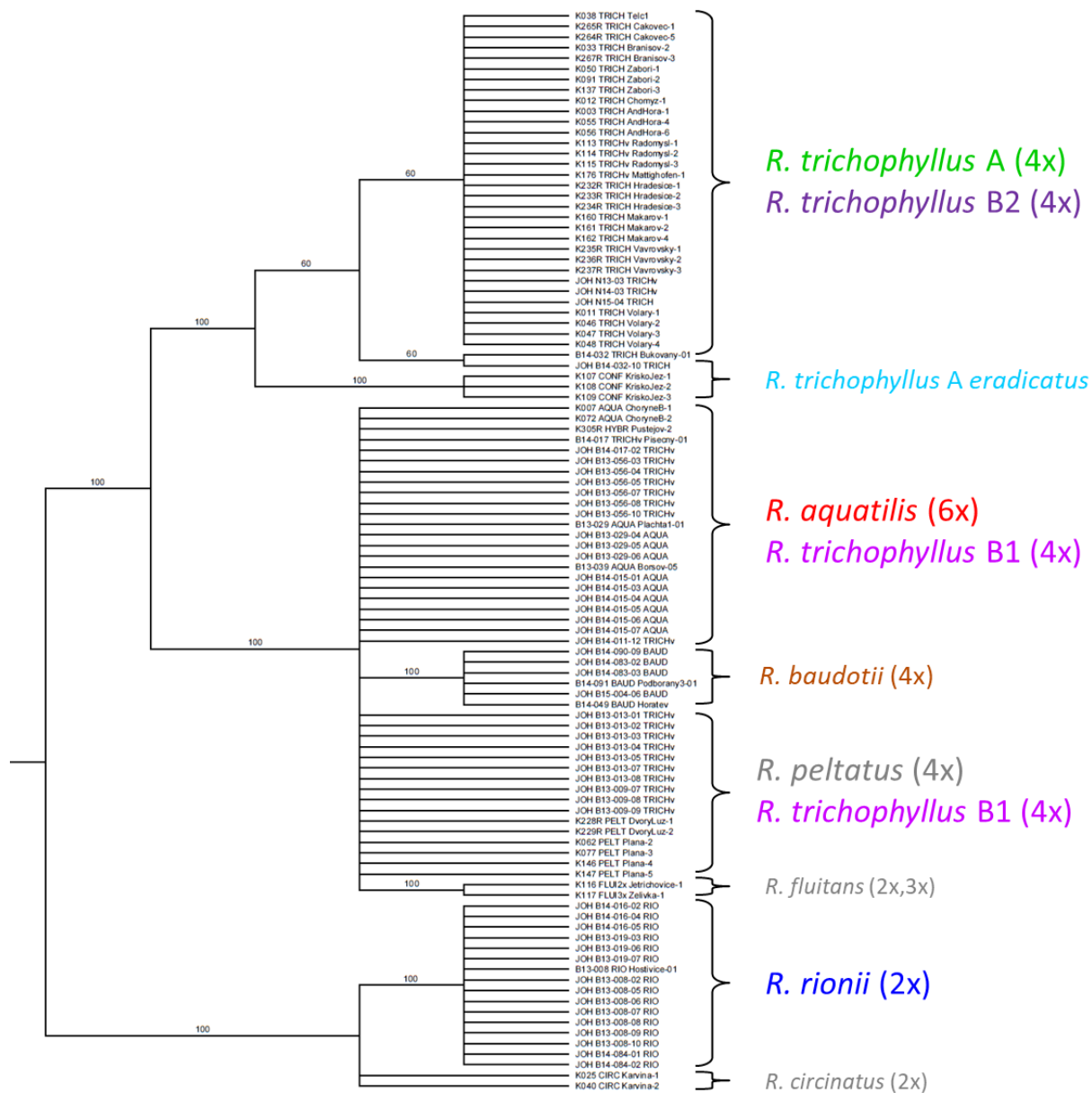
## 4.2. Molekulární analýzy – sekvenování DNA

### 4.2.1. Chloroplastová DNA

Alignment úseku *rpl32-trnL* dosahoval délky 858 nukleotidů a zahrnoval 25 substitucí a 7 indelů. Alignment úseku 3'*rps16*-5'*trnK* dosahoval délky 555 nukleotidů a zahrnoval 6 substitucí a 10 indelů. Jejich konkatenací byl vytvořen alignment s celkovou délkou 1413 nukleotidů. Variabilní místa úseků jsou shrnuta v Tab. 13.

*Parsimonická analýza* aplikovaná na konkatenované sekvence dvou úseků chloroplastové DNA ukazuje existenci tří hlavních skupin s vysokou podporou (viz Obr. 17). První z nich je haplotypová skupina *R. circinatus*, která kromě tohoto taxonu zahrnuje také *R. rionii*. Druhou skupinu tvoří haplotypy *R. trichophyllus*, zahrnující jedince cytotypu *R. trichophyllus* A (včetně *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus*) a část jedinců cytotypu *R. trichophyllus* B (zejména ITS linii B2, viz následující kapitole). Třetí hlavní skupinou je haplotypová skupina *R. peltatus*, který zahrnuje vzorky taxonů *R. peltatus*, *R. aquatilis*, *R. fluitans*, *R. baudotii* a část jedinců cytotypu *R. trichophyllus* B (zejména ITS linii B1).

Na základě chloroplastové DNA lze od ostatních zájmových taxonů jednoznačně odlišit pouze taxony *R. rionii*, *R. baudotii* a *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus*. Oproti tomu *R. aquatilis* s částí jedinců cytotypu *R. trichophyllus* B (zejména ITS linii B1) mají shodnou chloroplastovou DNA, přestože nejsou shodné cytometricky; s nimi je shodný ještě haplotyp druhu *R. peltatus*. Také drtivá většina vzorků *R. trichophyllus* A a část jedinců cytotypu *R. trichophyllus* B (ITS linie B2) sdílejí stejný haplotyp, ačkoliv se liší velikostí genomu.

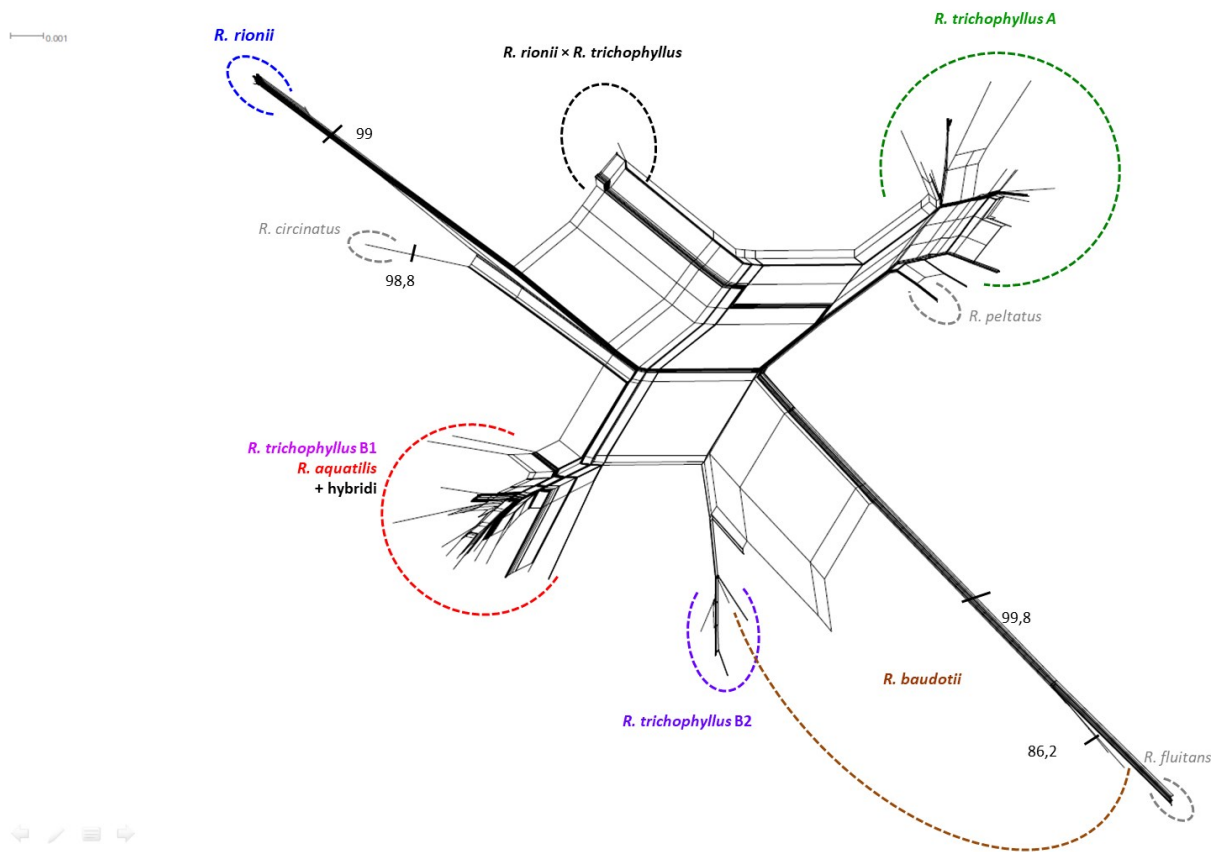


Obr. 17 – Fylogenetický strom konkaténovaných sekvencí úseků *rpl32-trnL* a *3'rps16-5'trnK* chloroplastové DNA vytvořený metodou parsimonické analýzy v programu PAUP.

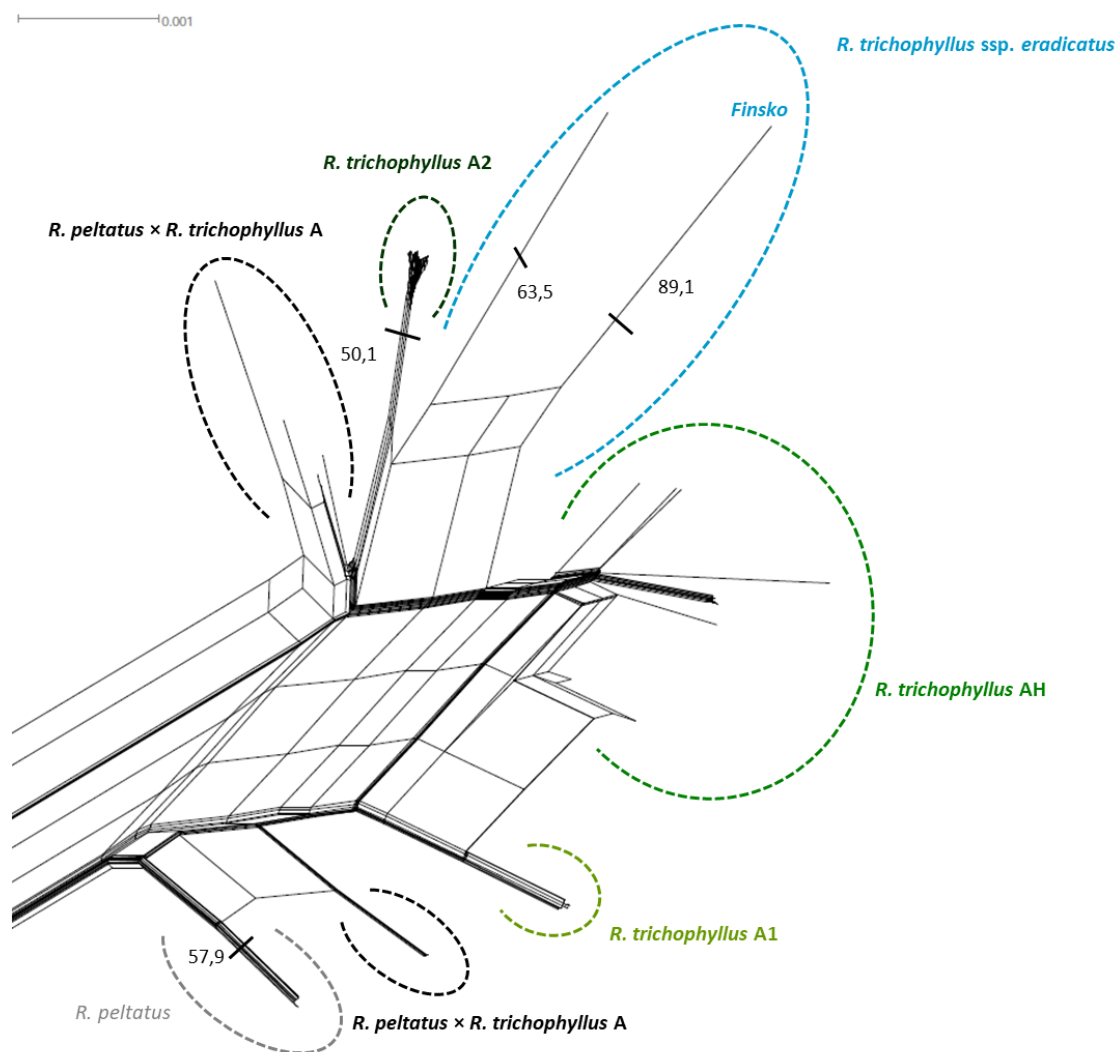
#### 4.2.2. Ribozomální DNA – úsek ITS

Alignment úseku ITS dosahoval délky 614 nukleotidů a zahrnoval 39 substitucí a 1 indel. Variabilní místa úseku jsou shrnuta v Tab. 14.

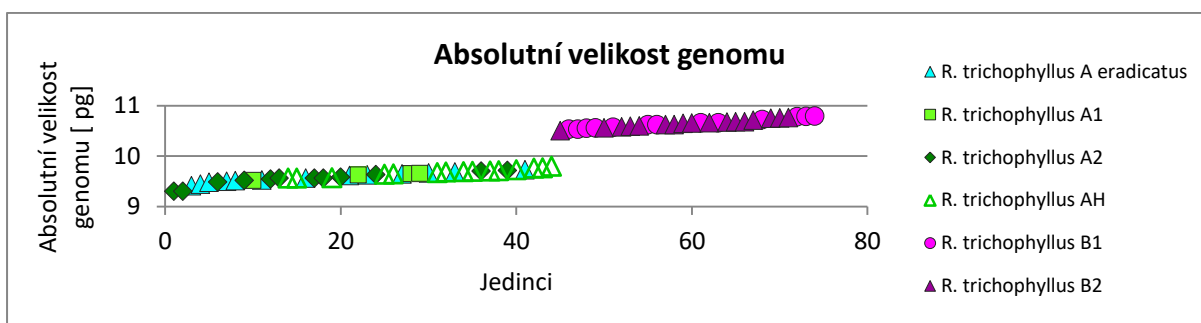
Fylogenetická síť úseku ITS vykazuje silně retikulární strukturu, což je způsobeno početným zastoupením aditivních polymorfismů v sekvencích některých taxonů (Obr. 18). Jediný ze zájmových druhů, *R. rionii*, je v ITS invariabilní a bez polymorfismů (Tab. 14). Naopak čtyři ostatní zkoumané druhy obsahují dvě nebo více odlišných ribotypových linií. *R. trichophyllus* cytotyp A tvoří klastr blízký druhu *R. peltatus*. Uvnitř této skupiny se dají rozeznat dva „čisté“ ribotypy neobsahující polymorfismy (A1, A2) a dále hybridní ribotypy (AH) vykazující víceméně až zcela aditivní pattern mezi skupinami A1 a A2 (Obr. 19). Rostliny označované jako *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* tvoří linii blízkou skupině A2, přičemž rostliny z Finska se v síti vymezily oproti ostatním vzorkům z této skupiny. *R. trichophyllus* cytotyp B je v ITS výrazně odlišen od cytotypu A a shlukuje se do dvou základních skupin. Zatímco první z nich (B2) je tvořena ribotypy obsahujícími žádné nebo jen ojedinělé polymorfismy, druhá skupina (B1) obsahuje ribotypy s četnými aditivními polymorfismy kombinujícími sekvence skupiny B2 a sekvence neznámého taxonu podobného, ale nikoli shodného s druhem *R. circinatus* (Tab. 14). *R. aquatilis* má velmi podobný až shodný hybridní pattern ITS se skupinou *R. trichophyllus* B2 (Tab. 14), oba taxony se proto shlukují do jednoho klastru (Obr. 18). *R. baudotii* zahrnuje jednak „čistý“ ribotyp s ITS velmi podobnou až shodnou se skupinou *R. trichophyllus* B2, a dále sekvence hybridního charakteru kombinující sekvence skupiny B2 s neznámým taxonem podobným, ale nikoli shodným s *R. fluitans* (Obr. 18, Tab. 14).



**Obr. 18 –** Fylogenetická síť sekvencí úseku ITS vytvořená metodou NeighborNet v programu SplitsTree. Vyznačeny hodnoty >70%.



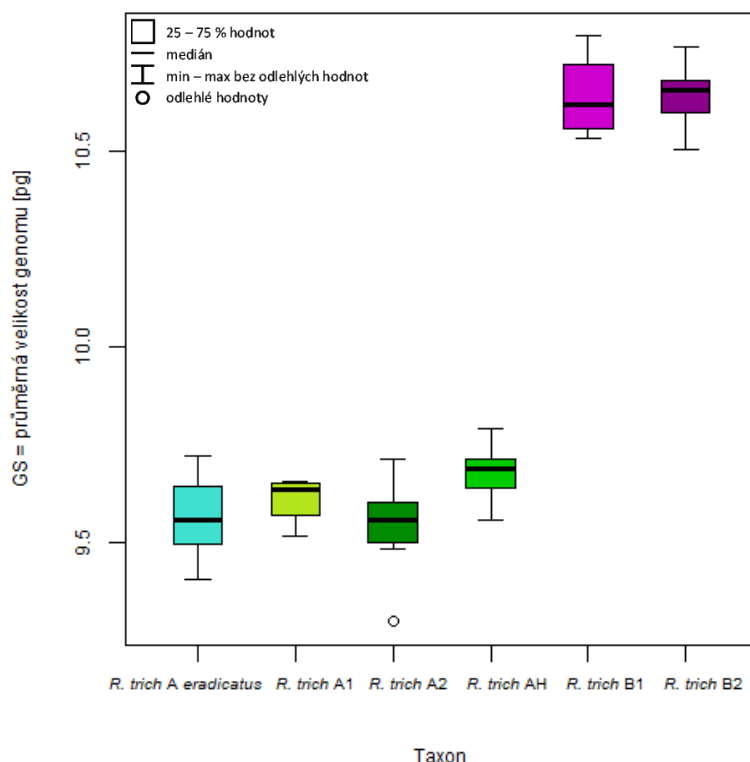
**Obr. 19 – Detail fylogenetické sítě sekvencí úseku ITS vytvořené metodou NeighborNet v programu SplitsTree. Vyznačeny hodnoty >50%.**



**Obr. 20 – Variabilita v absolutní velikosti genomu jednotlivých genetických linií taxonu *R. trichophyllus* definovaných na základě DNA sekvenace úseku ITS.**

U skupin, které byly definovány uvnitř komplexu *R. trichophyllus* agg. na základě sekvencí ITS (A1, A2, AH, B1, B2), byla opětovně zhodnocena variabilita ve velikosti

genomu (viz Obr. 20 a 21). Velikost genomu jednotlivých skupin v rámci cytotypů A a B je však velmi podobná a statisticky neprůkazná. Pouze *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* v porovnání s ostatními ribotypovými skupinami v rámci cytotypu A vykazuje trend k nižší velikosti genomu, nicméně ani zde není rozdíl mezi jednotlivými liniemi statisticky významný (viz Přílohu 3).



**Obr. 21 – Variabilita ve velikosti genomu. Srovnání velikosti genomu [pg DNA] jednotlivých genetických linií taxonu *R. trichophyllus* definovaných na základě sekvenace úseku ITS.**

#### 4.2.3. Kombinace chloroplastové DNA a ITS

Na základě sekvencí ITS i chloroplastové DNA je jediným jednoznačně definovaným druhem ze zájmových cytometricky stanovených taxonů *R. rionii*, *R. eradicatus*, který není definovaný cytometricky, nýbrž morfologicky dle plazivého růstu, je taktéž možno mezi ostatními taxony vymezit dle sekvencí ITS a chloroplastové DNA. *R. baudotii* lze vymezit na základě sekvenování chloroplastové DNA, ale pouze část jedinců je rozpoznatelná na základě úseku ITS. Zbylé cytotypy nejsou jednoznačně definované ani na základě sekvencí chloroplastové DNA, ani úseku ITS.

Všechny tři ribotypy (A1, A2, AH) cytotypu *R. trichophyllus* A mají shodný vlastní haplotyp chloroplastové DNA (trich A). Oproti tomu cytotyp *R. trichophyllus* B vykazuje různé kombinace ITS and cpDNA sekvencí (Tab. 12). Část vzorků *R. trichophyllus* B (ribotyp B2) má haplotyp trich B, který se od haplotypu trich A liší pouze v počtu opakování bazí v rámci poly A/T regionu. Zbylé rostliny tohoto ribotypu včetně druhé skupiny (ribotyp B1) mají haplotyp shodný s taxony *R. peltatus* a *R. aquatilis*.

Mezidruhová hybridní zpravidla disponují v úseku ITS kombinací sekvencí obou rodičů, přičemž v chloroplastové DNA nesou kopii haplotypu pouze jednoho z těchto taxonů. U hybridů *R. peltatus* × *R. trichophyllus* A je čtenější *R. trichophyllus* A haplotyp, což v křížení může poukazovat na preferenci *R. trichophyllus* A jakožto maternálního taxonu.

**Tab. 12 – Porovnání variability v sekvencích úseku ITS a cp DNA.**

Cytotyp + ribotyp	Haplotyp	baudotii	fluitans	eradicatus	peltatus	trich A	trich B	circinatus	riionii
<i>R. aquatilis</i>		-	-	-	33	-	-	-	-
<i>R. baudotii</i>		10	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. circinatus</i>		-	-	-	-	-	-	1	-
<i>R. eradicatus</i>		-	-	9	-	-	-	-	-
<i>R. fluitans</i>		-	5	-	-	-	-	-	-
<i>R. peltatus</i>		-	-	-	4	-	2	-	-
<i>R. rionii</i>		-	-	-	-	-	-	-	38
<i>R. trichophyllus</i> A		-	-	-	-	100	-	-	-
<i>R. trichophyllus</i> B1		-	-	-	27	-	-	-	-
<i>R. trichophyllus</i> B2		-	-	-	10	-	29	-	-
<i>R. aquatilis</i> × <i>R. peltatus</i>		-	-	-	2	-	-	-	-
<i>R. peltatus</i> × <i>R. trichophyllus</i> A		-	-	-	5	8	-	-	-
<i>R. rionii</i> × <i>R. trichophyllus</i> A		-	-	-	-	2	-	-	3

**Tab. 13 – Variabilní místa sekvenovaných úseků chloroplastové DNA.**

Haplotyp	<i>rpl32-trnL</i>																			<i>3'rps16-5'trnK</i>																			
	44	100	110	120	170	171	181	193	235	246	257	258	318	326	337	371	396	408	434	435-441	443	464	493	615-618	671	680	766	806-814	822	153	161	245-255	257	262	373	409	485-492	499-504	505
baudotii	G	C	C	C	C	C	C	G	G	T	T	C	G	<b>G</b>	C	C	G	C	C	A(6)	T	T	G	ATAT	G	<b>A</b>	G	A(8)	A	A	C	T(9)	G	C	A	A	A(7)	<b>AATTTT</b>	A
fluitans	G	C	C	C	C	C	C	G	G	T	T	C	G	<b>G</b>	C	C	G	C	C	A(6)	T	T	G	ATAT	G	G	G	A(8)	A	<b>G</b>	C	T(9)	G	C	A	A	A(7)	<b>AATTTT</b>	A
peltatus	G	C	C	C	C	C	C	G	G	T	T	C	G	<b>G</b>	C	C	G	C	C	A(6)	T	T	G	ATAT	G	G	G	A(8)	A	A	C	T(9)	G	C	A	A	A(7)	<b>AATTTT</b>	A
trich-A	G	C	C	C	C	C	<b>C</b>	G	T	T	C	G	T	<b>T</b>	C	G	C	C	A(6)	T	<b>G</b>	G	ATAT	G	G	G	A(8)	A	A	C	<b>T(11)</b>	-	<b>T</b>	A	A	A(7)	-----	A	
trich-B	G	C	C	C	C	C	<b>C</b>	G	T	T	C	G	T	<b>T</b>	C	G	C	C	A(6)	T	<b>G</b>	G	ATAT	G	G	G	A(8)	A	A	C	<b>T(10)</b>	-	<b>T</b>	A	A	A(7)	-----	A	
circinatus	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	G	<b>T</b>	<b>G</b>	T	<b>A</b>	<b>A</b>	T	C	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	-	<b>A(7)</b>	<b>A</b>	T	<b>A</b>	----	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A(8)	A	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T(11)</b>	G	C	A	<b>C</b>	<b>A(8)</b>	-----	<b>T</b>
rionii	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	G	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	T	C	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	-	<b>A(7)</b>	<b>A</b>	T	<b>A</b>	----	<b>A</b>	G	<b>T</b>	<b>A(9)</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T(11/10)</b>	G	C	A	<b>C</b>	<b>A(8)</b>	-----	<b>T</b>

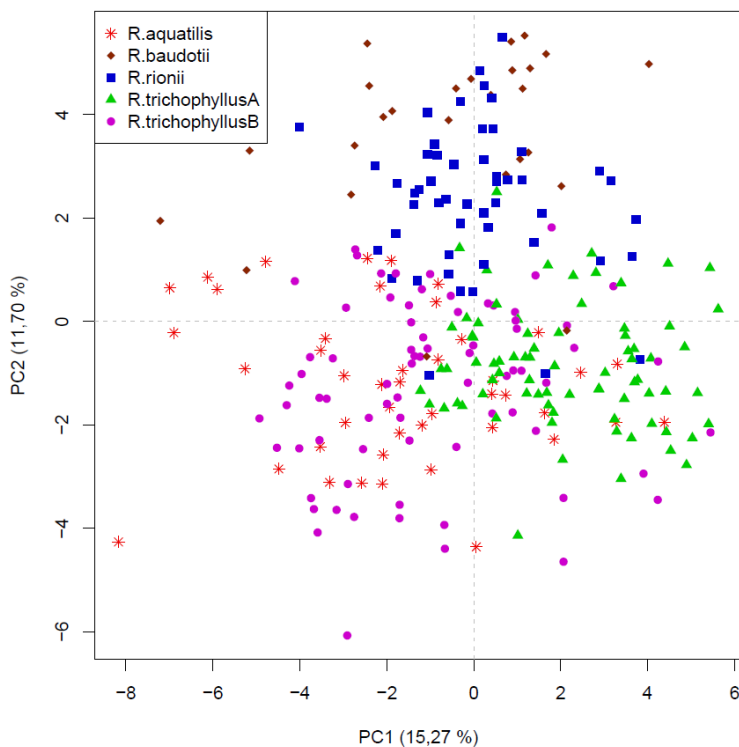
**Tab. 14 – Variabilní místa úseku ITS.**

Skupina	35	43	59	60	62	65	73	86	79	84	85	86	90	93	94	97	102	106	108	115	127	128	133	154	199	221	229	231	232	443	444	448	510	475	490	506	526	537	539	552	554	560	584	
trich A2	<b>T</b>	T	G	-	G	T	G	T	A	C	C	G	C	<b>C</b>	C	C	C	T	G	C	T	T	T	<b>A</b>	C	C	C	G	T	G	C	G	C	<b>C</b>	C	<b>A</b>	C	T	C	C	A	C	C	
trich AH	<b>Y</b>	T	G	-	<b>R</b>	T	G	T	A	C	C	G	C	<b>Y</b>	C	C	C	T	G	C	T	T	T	<b>R</b>	<b>Y</b>	C	C	G	T	G	C	G	C	<b>C</b>	C	<b>A</b>	C	T	C	C	A	C	C	
trich A1	C	T	G	-	<b>A</b>	T	G	T	A	C	C	G	C	T	C	C	C	T	G	C	T	T	T	G	<b>T</b>	C	C	G	T	G	C	G	C	<b>C</b>	C	<b>A</b>	C	T	C	C	A	C	C	
pelt × trich A	<b>Y</b>	T	G	-	G	T	G	T	A	C	C	G	C	<b>Y</b>	C	C	<b>Y</b>	T	G	C	T	T	T	<b>R</b>	C	C	C	G	T	G	C	G	C	<b>C</b>	C	<b>A</b>	C	T	C	C	A	C	C	
pelt × trich A	C	T	G	-	<b>R</b>	T	G	T	A	C	<b>Y</b>	G	C	T	C	C	<b>Y</b>	T	G	C	T	T	T	G	C	C	C	G	T	G	C	G	C	<b>C</b>	C	<b>A</b>	C	T	C	C	A	C	C	
peltatus	C	T	G	-	G	T	G	T	A	C	C/Y	G	C	T	C	C	<b>Y</b>	T	G	C	T	T	T	G	C	C	C	G	T	G	C	G	C	<b>C</b>	C	<b>A</b>	C	T	C	C	A	C	C	
peltatus	C	T	G	-	G	T	G	T	A	C	C	G	C	T	C	C	<b>T</b>	T	G	C	T	T	T	G	C	C	C	G	T	G	C	G	C	<b>C</b>	C	<b>A</b>	C	T	C	C	A	C	C	
peltatus	C	T	G	-	G	T	G	T	A	C	C	G	C	T	C	C	C	T	G	C	T	T	T	G	C	C	C	G	T	G	C	G	C	<b>C</b>	C	<b>A</b>	C	T	C	C	A	C	C	
baudotii, trich B2	C	T	G	-	G	T	G	T	<b>G</b>	C	C	G	C	T	<b>T</b>	<b>T</b>	C	T	G	<b>T</b>	T	T	T	G	C	C	C	G	T	G	C	G	C	T	<b>T</b>	G	C	T	C	C	A	C	C	
trich B2	C	T	G	-	G	T	G	T	<b>G</b>	C	C	G	C	T	<b>T</b>	<b>T</b>	C	T	G	<b>T</b>	T	T	T	G	C	C	C	G	T	G	C	G	C	T	<b>T</b>	G	<b>T</b>	T	C	C	A	C	C	
trich B2	C	T	G	-	G	T	G	T	<b>G</b>	<b>Y</b>	C	G	C	T	<b>T</b>	<b>T</b>	C	T	G	<b>T</b>	T	T	T	G	C	C	C	G	T	G	C	G	C	T	<b>T</b>	G	C	T	C	<b>Y</b>	A	<b>Y</b>	C	
aqua, trich B1	C	T	G	-	G	T	G	T	<b>G</b>	C	C	G	C	T	<b>Y</b>	<b>Y</b>	C	T	G	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	G	C	<b>Y</b>	C	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	G	C	T	<b>Y</b>	G	<b>Y</b>	<b>W</b>	C	C	A	C	C	
aquatilis	C	T	G	-	G	T	G	T	<b>G</b>	C	C	G	C	T	<b>Y</b>	<b>Y</b>	C	T	G	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	G	C	<b>Y</b>	C	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	G	C	T	<b>Y</b>	G	C	<b>W</b>	C	C	A	C	C	
circinatus	C	T	G	-	G	T	G	T	<b>G</b>	C	C	G	C	T	C	C	C	T	G	C	<b>A</b>	<b>C</b>	T	G	C	<b>T</b>	C	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	G	<b>T</b>	T	C	G	C	<b>A</b>	<b>A</b>	C	C	A	C	C
rionii	C	T	G	-	G	T	G	T	A	C	C	<b>T</b>	C	T	<b>T</b>	C	C	T	G	C	<b>A</b>	<b>C</b>	T	G	C	C	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	T	C	G	C	<b>A</b>	<b>A</b>	C	A	C	C		
fluitans	C	<b>C</b>	G	<b>G</b>	G	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	A	C	C	G	<b>T</b>	T	C	C	C	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	T	T	T	G	C	C	C	<b>A</b>	<b>C</b>	G	C	G	C	T	C	G	C	T	C	<b>G</b>	C	<b>T</b>		

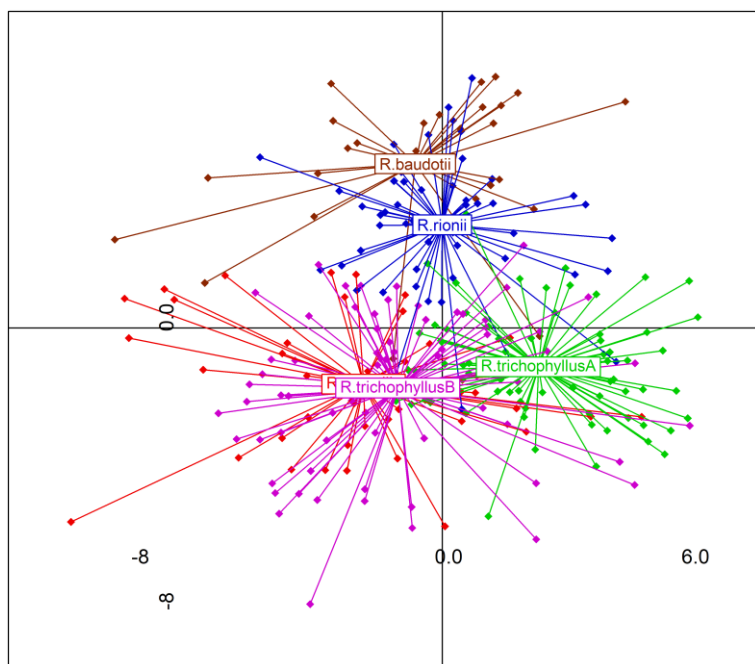
### 4.3. Morfometrická analýza

#### 4.3.1. Dataset I: Celková variabilita skupin a znaků

Analýza hlavních komponent (PCA, 274 jedinců, 45 znaků, Obr. 22 a 23) relativně dobře vymezila skupiny druhů *R. rionii* a *R. baudotii*, odlišuje od sebe také cytotypy *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B. Naproti tomu linie *R. trichophyllus* B vykazuje překryv s druhem *R. aquatilis*. K rozdělení jedinců do skupin podle první osy (zejména pro oddělení druhů *R. rionii* a *R. baudotii*) nejvíce přispívá znak počet vyvinutých nažek v souplodí. Pro rozdělení jedinců do skupin podél druhé osy (hlavně k odlišení linií *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B) jsou významné hlavně znaky šířka květního lůžka za plodu, šířka lodyhy, délka listové čepele – list č. 1 a průměrná délka listové čepele (viz Tab. 15 a Přílohu 4). Malé celkové procento variability vyjádřené prvními dvěma osami je ovlivněno také vysokým počtem použitých znaků.



**Obr. 22 – Analýza hlavních komponent zobrazující celkovou morfologickou variabilitu studovaných taxonů pro jednotlivce (počty jedinců pro jednotlivé skupiny viz Tab. 10) za využití 45 znaků. Skupiny byly vymezeny podle velikosti genomu na základě výsledků získaných metodou průtokové cytometrie. Osa PC1 vysvětluje 18,67 % variability, osa PC2 12,23 % variability.**



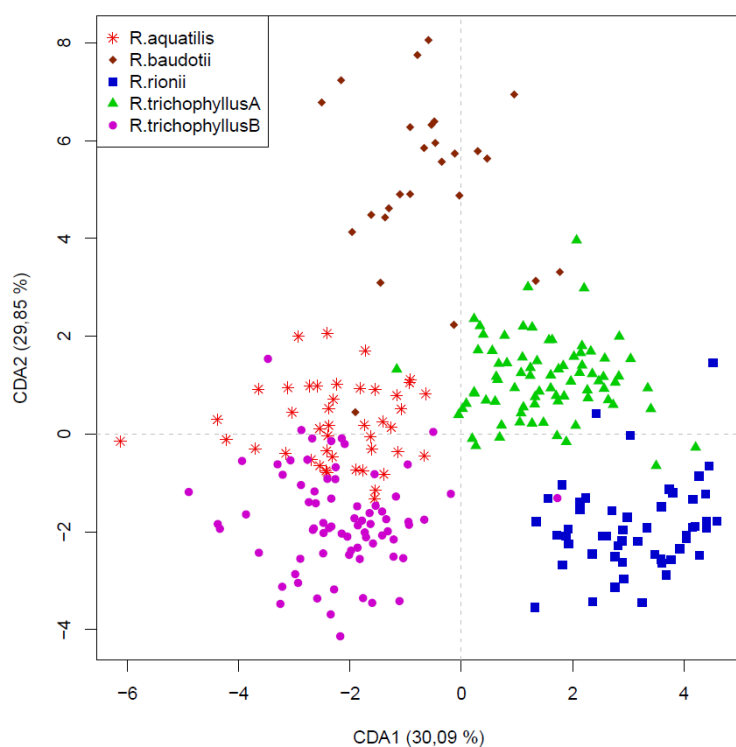
Obr. 23 – Spider diagram zobrazující oddělování jednotlivých taxonů. Název taxonu je umístěn v jeho centroidu. Taxon *R. aquatilis* v překryvu za *R. trichophyllus* B.

Tab. 15 – Příspěvky jednotlivých znaků k příslušným komponentám PCA jedinců testující celkovou variabilitu studovaných taxonů. Šedou barvou jsou označeny znaky s nejvyššími hodnotami.

Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2
DRI	-0,203	<b>-0,604</b>	TVH	-0,046	0,432	DLU	-0,647	0,444
DCI	<b>-0,742</b>	-0,407	TVO	-0,046	-0,123	SLU	<b>-0,778</b>	0,186
PUI	<b>-0,673</b>	-0,070	DI	-0,541	-0,464	pSDLU	-0,172	-0,312
pRLI	0,378	-0,274	DPLI	<b>-0,692</b>	<b>-0,509</b>	VN	-0,349	<b>0,663</b>
pCLI	-0,360	0,267	DS	-0,451	0,177	NN	0,013	-0,106
pPULI	-0,214	0,265	prP	0,112	0,135	N	-0,459	<b>0,569</b>
DR	-0,301	<b>-0,572</b>	prR	-0,199	-0,006	pNNN	0,088	-0,395
DC	<b>-0,761</b>	-0,287	prsP	-0,042	0,234	DN	-0,328	-0,466
PU	<b>-0,656</b>	0,032	prsM	0,099	0,206	SN	-0,286	-0,385
pRL	0,284	-0,399	pSI	0,201	<b>0,578</b>	Z	-0,074	-0,219
pCL	-0,268	0,402	pPLI	0,230	0,243	pSDN	-0,018	-0,068
DK	-0,605	0,106	pPLS	-0,102	-0,469	CHNH	0,105	-0,193
SK	-0,584	0,237	CHL	0,118	-0,008	CHN	0,200	-0,230
mSK	-0,254	-0,176	CHR	-0,067	<b>0,543</b>	CHNR	-0,045	-0,011
pSKDK	-0,256	0,361	CHH	-0,096	-0,132	SLO	<b>-0,777</b>	0,196

Z výsledků kanonické diskriminační analýzy (CDA, 274 jedinců, 32 znaků, Obr. 24) je zřejmá morfologická diference všech skupin kromě cytotypu *R. trichophyllus* B a druhu

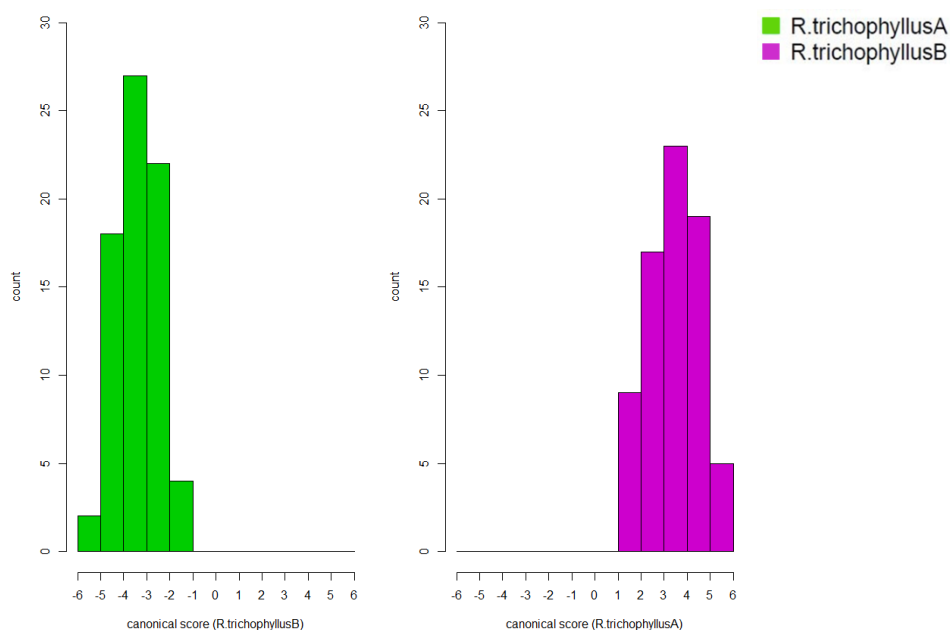
*R. aquatilis*, mezi nimiž dochází k překryvu. Znaky, které nejvíce přispívají k odlišení podle 1. kanonické osy jsou délka nažky včetně zobánku a šířka nažky. Podle 2. kanonické osy, se výrazně oddělila skupina *R. baudotii*, k tomu přispívají zejména znaky poměr délky plodní stopky/internodia pod plodní stopkou prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny a délka plodní stopky prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny (viz Tab. 16). Boxploty významně korelovaných znaků viz Přílohu 4. Grafické výstupy diskriminační analýzy provedené samostatně pro dvě dvojice taxonů demonstrují kompletní oddělení cytotypů *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B (Obr. 25) a naopak překryv u *R. trichophyllus* B a *R. aquatilis* (Obr. 26).



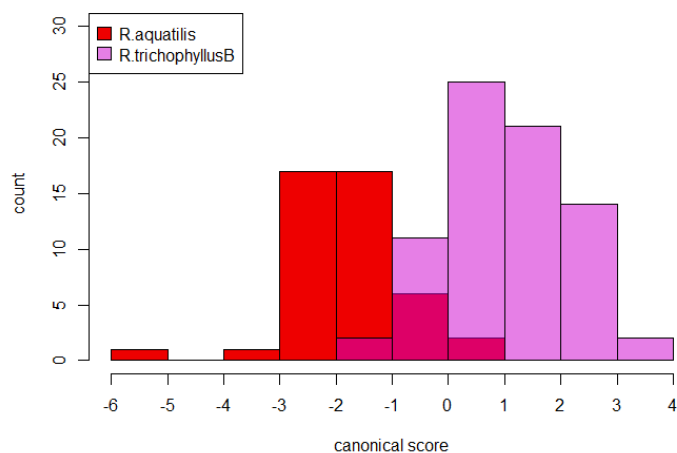
**Obr. 24 – Kanonická diskriminační analýza provedená v programu R pro jednotlivce, za využití 32 znaků. Skupiny byly vymezeny podle velikosti genomu na základě výsledků získaných metodou průtokové cytometrie. Osa CDA1 vysvětluje 30,09 % variability, osa CDA2 29,85 % variability.**

**Tab. 16 – Příspěvky jednotlivých znaků k příslušným komponentám CDA jedinců testující celkovou variabilitu studovaných taxonů. Šedou barvou jsou označeny znaky s nejvyššími hodnotami.**

Znak	CDA1	CDA2	Znak	CDA1	CDA2	Znak	CDA1	CDA2
DK	-0,309	-0,277	pSI	-0,111	-0,639	N	0,289	-0,389
SK	-0,299	-0,425	DLU	0,086	-0,300	pNNN	-0,009	0,116
mSK	-0,060	0,141	SLU	-0,128	-0,201	DN	-0,641	0,117
pSKDK	-0,075	-0,368	pSDLU	-0,220	0,097	SN	-0,510	0,058
DI	-0,109	0,175	VN	0,270	-0,378	pSDN	-0,072	-0,008
DS	-0,277	-0,520	NN	0,126	-0,019			

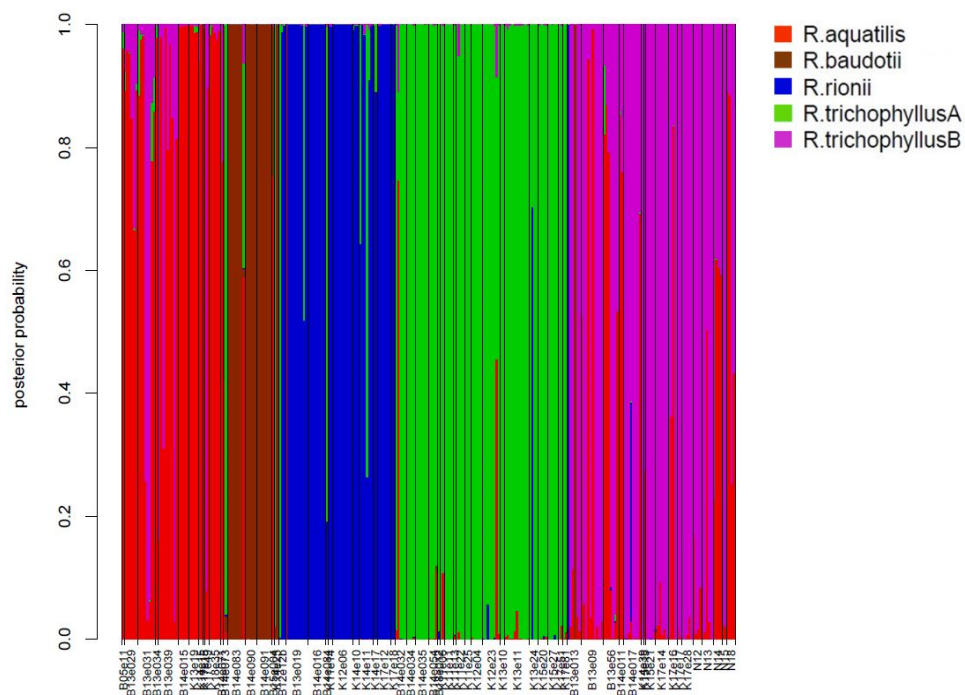


**Obr. 25 – Kanonická diskriminační analýza pro dvojici cytotypů *R. trichophyllus* A (zeleně) a *R. trichophyllus* B (fialově).**



**Obr. 26 – Kanonická diskriminační analýza pro cytotyp *R. trichophyllus* B a taxon *R. aquatilis*.**

Výsledky z klasifikační diskriminační analýzy (Obr. 27, Tab. 17) ukazují, že užitím všech 32 znaků bylo určeno správně 97 % měřených jedinců cytotypu *R. trichophyllus* A, přičemž celková úspěšnost určení rostlin byla více jak 86 %. Problematickým se ukázal naopak taxon *R. trichophyllus* B, který byl často zaměňován za *R. aquatilis*.



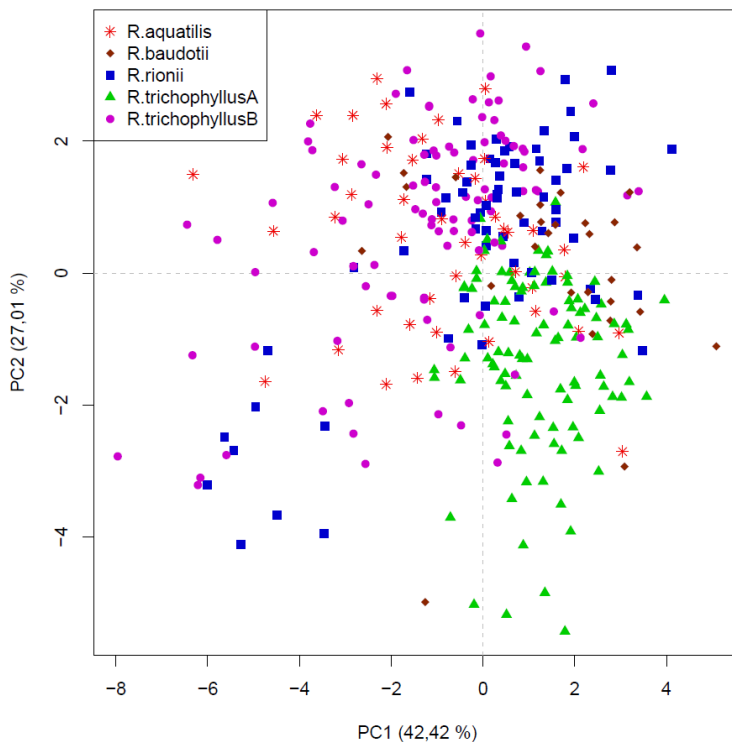
Obr. č. 27 – Klasifikační diskriminační analýza „one-leave-out classification“ (počty jedinců pro jednotlivé skupiny viz Tab. 17), za využití 32 znaků.

Tab. 17 – Klasifikační diskriminační analýza „one-leave-out classification“ za využití 32 znaků.

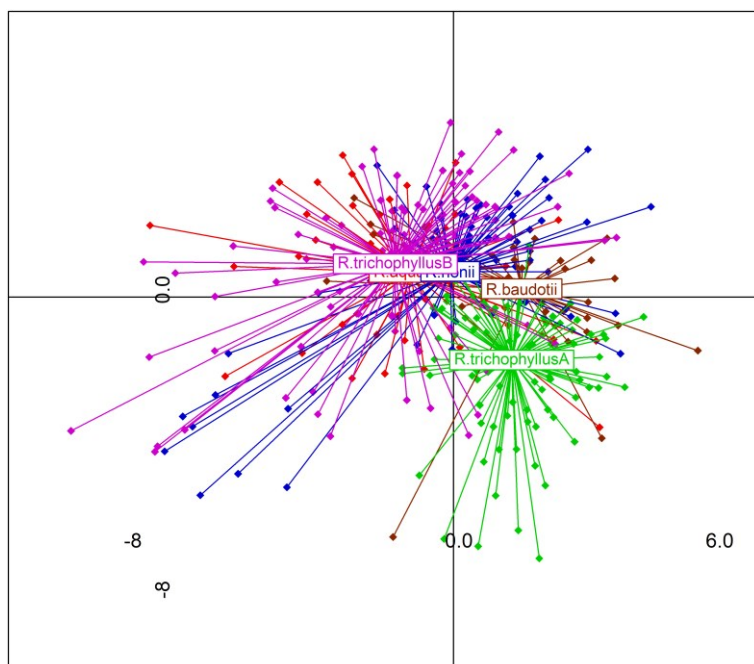
Taxon	<i>R. aquatilis</i>	<i>R. baudotii</i>	<i>R. rionii</i>	<i>R. trichophyllus</i> A	<i>R. trichophyllus</i> B	Počet zařazených rostlin	Správně zařazených (%)
<i>R. aquatilis</i>	37	0	0	0	7	44	84,09
<i>R. baudotii</i>	3	21	0	2	0	26	80,77
<i>R. rionii</i>	1	0	48	3	0	52	92,31
<i>R. trichophyllus</i> A	1	0	1	75	0	77	97,40
<i>R. trichophyllus</i> B	16	1	1	1	56	75	74,67
Rostlin celkem	58	22	50	81	63	274	86,50

#### 4.3.2. Dataset II: Vegetativní znaky

Z výsledků analýzy hlavních komponent (PCA, 345 jedinců, 13 znaků, Obr. 28 a 29) je vidět, že nedochází k jasnému oddělení skupin, ale je patrná tendence k vytvoření shluků. K odlišení podle osy PC1 přispívají nejvíce znaky délka listu protistojného plodní stopce prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny a průměrná\*\* délka listu. Podle osy PC2 je částečně vymezena linie *R. trichophyllus* A Pro rozdělení jedinců do skupin podél druhé osy jsou významné hlavně znaky poměr délka řapíku/délka listu – list č. 1 a průměrný poměr délka řapíku/délka listu (viz Tab. 18).



**Obr. 28 – Analýza hlavních komponent datasetu II provedená v programu R pro jednotlivce za využití 13 vegetativních znaků. Skupiny byly vymezeny podle velikosti genomu na základě výsledků získaných metodou průtokové cytometrie. Osa PC1 vysvětluje 42,42 % variability, osa PC2 27,01 % variability.**

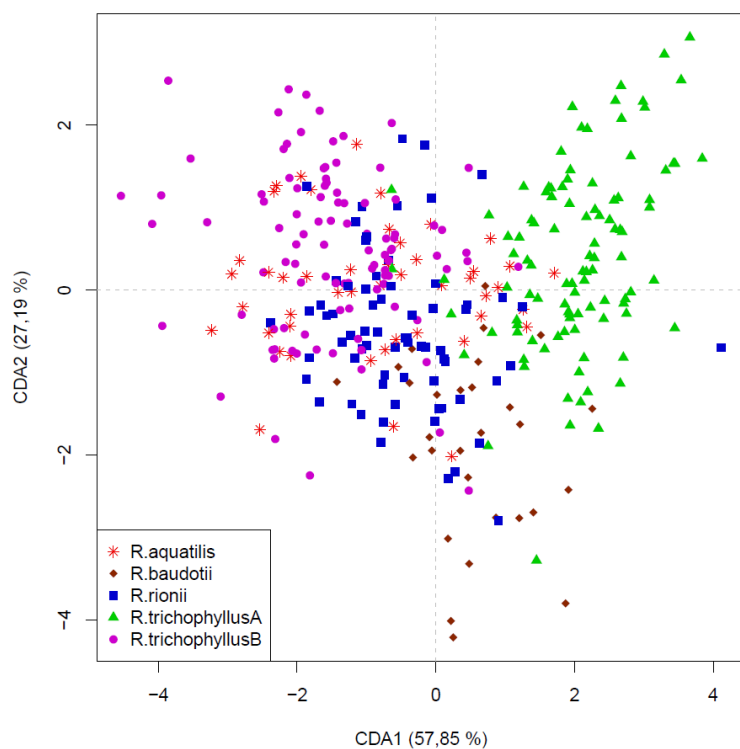


**Obr. 29 – Spider diagram zobrazující oddělování jednotlivých taxonů. Název taxonu je umístěn v jeho centroidu. Taxony *R. aquatilis* a *R. rionii* v překryvu za *R. trichophyllus* B.**

**Tab. 18 – Příspěvky jednotlivých znaků k příslušným komponentám PCA jedinců datasetu II. Šedou barvou jsou označeny znaky s nejvyššími hodnotami.**

Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2
DRI	-0,712	-0,608	pRLI	-0,162	<b>-0,737</b>	DL	<b>-0,880</b>	0,025
DCI	-0,783	0,127	pPULI	-0,097	0,647	pRL	-0,362	<b>-0,682</b>
PUI	-0,685	0,571	DR	-0,794	-0,462	SLO	-0,584	0,488
<b>DLI</b>	<b>-0,878</b>	-0,088	PU	-0,627	0,610			

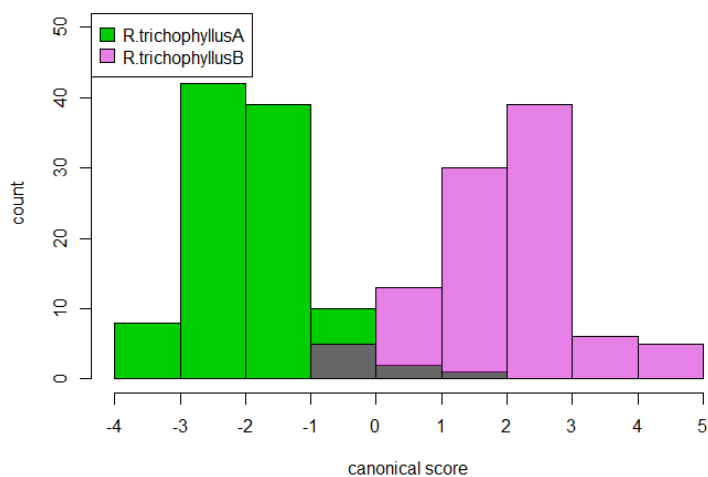
Výsledek kanonické diskriminační analýzy (CDA, 345 jedinců, 13 znaků, Obr. 30) je lepší než při provedení předchozí PCA, ale k oddělení dalších skupin vyjma *R. trichophyllus* A nedochází. Znaky, které nejvíce korelují s 1. kanonickou osou a nejvíce přispívají k rozložení objektů, jsou počet úkrojků – list č. 1 a průměrný\*\* počet listových úkrojků. K pozici podle osy CDA2 přispívá nejvíc znak šířka lodyhy (viz Tab. 19). Grafické výstupy diskriminační analýzy provedené samostatně pro dvě dvojice taxonů demonstrují mírný překryv cytotypů *R. trichophyllus* A a B (Obr. 31) a výrazný překryv u *R. trichophyllus* B a *R. aquatilis* (Obr. 32).



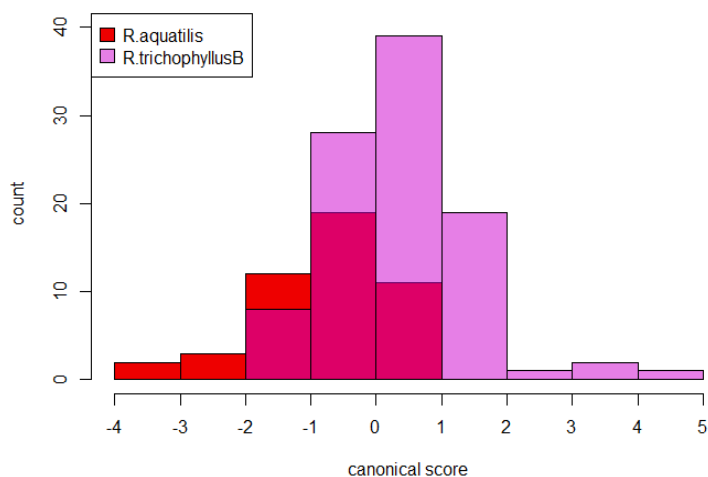
**Obr. č. 30 – Kanonická diskriminační analýza jednotlivců za využití 13 vegetativních znaků. Osa CDA1 vysvětluje 57,85 % variability, osa CDA2 27,19 % variability.**

**Tab. 19 – Příspěvky jednotlivých znaků k příslušným komponentám CDA jedinců datasetu II. Šedou barvou jsou označeny znaky s nejvyššími hodnotami.**

Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2
DRI	-0,076	0,339	pRLI	0,034	0,162	DL	-0,157	0,245
DCI	-0,142	0,248	pPULI	-0,578	0,052	pRL	-0,043	0,186
PUI	<b>-0,790</b>	0,322	DR	-0,140	0,288	SLO	-0,501	<b>-0,471</b>
DLI	-0,160	0,234	PU	<b>-0,891</b>	0,143			

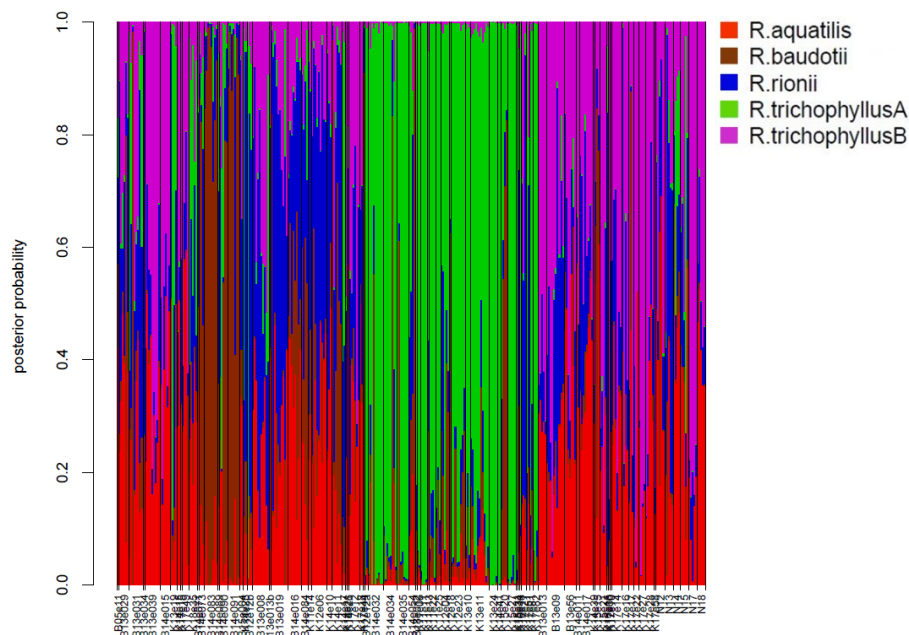


**Obr. 31 – Kanonická diskriminační analýza datasetu II pro dvojici cytotypů *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B.**



**Obr. 32 – Kanonická diskriminační analýza datasetu II pro cytotyp *R. trichophyllus* B a taxon *R. aquatilis*.**

Výsledky z klasifikační diskriminační analýzy (Obr. 33, Tab. 20) ukazují, že užitím 13 vegetativních znaků bylo správně určeno 86 % měřených jedinců cytotypu *R. trichophyllus* A; pro zbylé zkoumané taxony se vegetativní znaky ukázaly jako nespolehlivé. Celková úspěšnost určení rostlin byla 62 %.



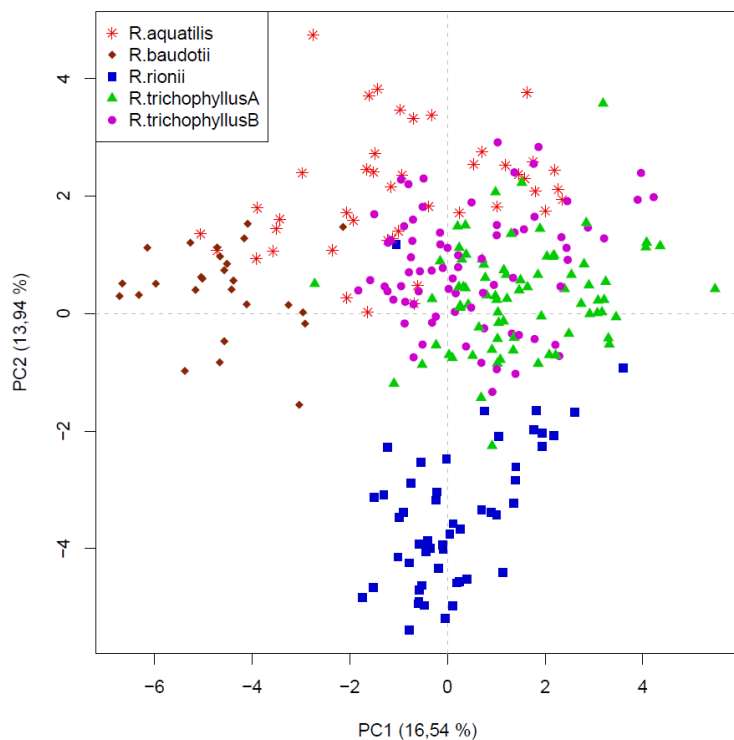
**Obr. 33 – Klasifikační diskriminační analýza „one-leave-out classification“ provedená v programu R za využití 13 vegetativních znaků.**

**Tab. 20 – Klasifikační diskriminační analýza „one-leave-out classification“ za využití 13 vegetativních znaků.**

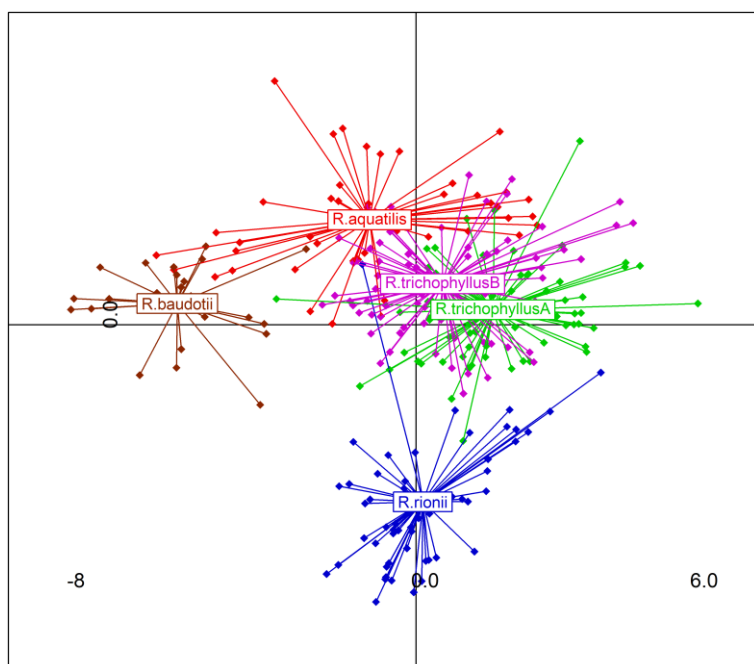
Taxon	<i>R. aquatilis</i>	<i>R. baudotii</i>	<i>R. rionii</i>	<i>R. trichophyllus A</i>	<i>R. trichophyllus B</i>	Počet zařazených rostlin	Správně zařazených (%)
<i>R. aquatilis</i>	16	2	4	7	18	47	34,04
<i>R. baudotii</i>	0	20	6	2	1	29	68,97
<i>R. rionii</i>	15	9	31	4	10	69	44,93
<i>R. trichophyllus A</i>	0	8	5	88	1	102	86,27
<i>R. trichophyllus B</i>	24	2	11	2	59	98	60,20
<b>Rostlin celkem</b>	<b>55</b>	<b>41</b>	<b>57</b>	<b>103</b>	<b>89</b>	<b>345</b>	<b>62,03</b>

#### 4.3.3. Dataset III: Generativní znaky

Analýza hlavních komponent (PCA, 274 jedinců, 30 znaků, Obr. 34 a 35) vymezila zejména druhy *R. rionii* a *R. baudotii*. K rozdělení jedinců do skupin podle první osy nejvíce přispívá znak šířka korunního lístku. Pro rozdělení jedinců do skupin podél druhé osy jsou významné hlavně znaky délka nažky včetně zobánku a šířka nažky (viz Tab. 21). Malé celkové procento variability vyjádřené prvními dvěma osami je ovlivněno velkým počtem použitých znaků.



**Obr. 34 –** Analýza hlavních komponent datasetu III provedená v programu R pro jednotlivce za využití 30 generativních znaků. Skupiny byly vymezeny podle velikosti genomu na základě výsledků získaných metodou průtokové cytometrie. Osa PC1 vysvětluje 16,54 % variability, osa PC2 13,94 % variability.

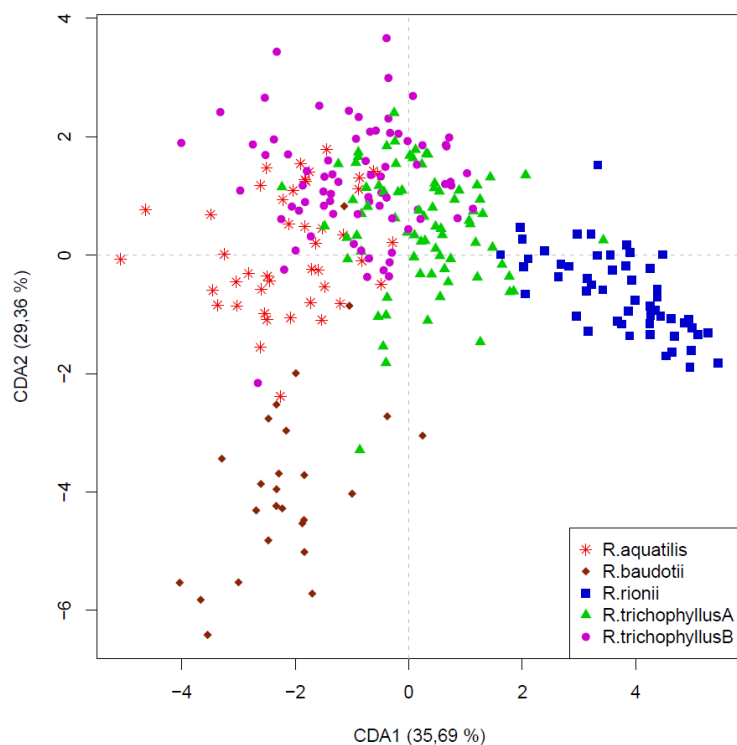


**Obr. 35 –** Spider diagram zobrazující oddělování jednotlivých taxonů. Název taxonu je umístěn v jeho centroidu.

**Tab. 21 – Příspěvky jednotlivých znaků k příslušným komponentám PCA jedinců datasetu II. Šedou barvou jsou označeny znaky s nejvyššími hodnotami.**

Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2
DK	<b>-0,733</b>	0,345	prsP	-0,341	0,088	NN	0,132	-0,050
SK	<b>-0,845</b>	0,257	prsM	-0,259	-0,009	N	-0,521	<b>-0,639</b>
mSK	0,016	0,210	pSI	-0,518	-0,090	pNNN	0,285	0,311
pSKDK	-0,622	-0,044	CHL	0,034	0,050	DN	-0,290	<b>0,795</b>
TVH	-0,038	<b>-0,672</b>	CHR	-0,597	-0,075	SN	-0,297	<b>0,793</b>
TVO	0,084	0,149	CHH	-0,063	0,209	Z	-0,032	0,485
DI	-0,019	0,368	DLU	-0,632	-0,397	pSDN	-0,081	0,271
DS	<b>-0,734</b>	0,306	SLU	<b>-0,710</b>	-0,052	CHNH	0,283	0,201
prP	-0,175	0,300	pSDLU	-0,093	0,420	CHN	0,293	0,248
prR	0,037	-0,219	VN	-0,512	<b>-0,719</b>	CHNR	-0,200	0,091

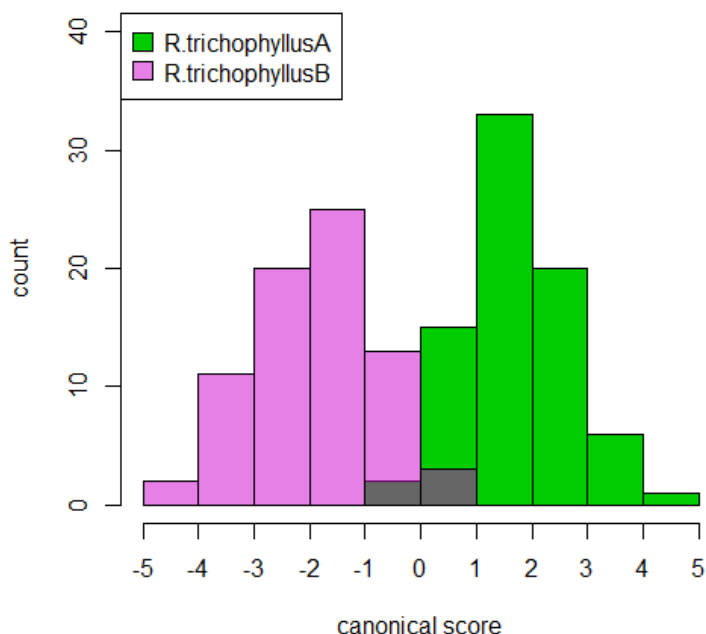
Výsledek kanonické diskriminační analýzy (CDA, 274 jedinců, 17 znaků, Obr. 36) ukazuje oddělení druhů *R. rionii* a *R. baudotii*, u ostatních skupin dochází k překryvu shluků. S osou CDA1 nejvíce korelují znaky délka nažky včetně zobánku a šířka nažky. K rozložení objektů podle osy CDA2 přispívají nejvíce znaky délka plodní stopky prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny a poměr délky plodní stopky/internodia pod plodní stopkou prvního zralého souplodí od vrcholu rostliny (viz Tab. 22). Grafické výstupy diskriminační analýzy provedené samostatně pro dvě dvojice taxonů demonstrují mírný překryv cytotypů *R. trichophyllus* A a B (Obr. 37) a výraznější překryv u *R. trichophyllus* B a *R. aquatilis* (Obr. 38).



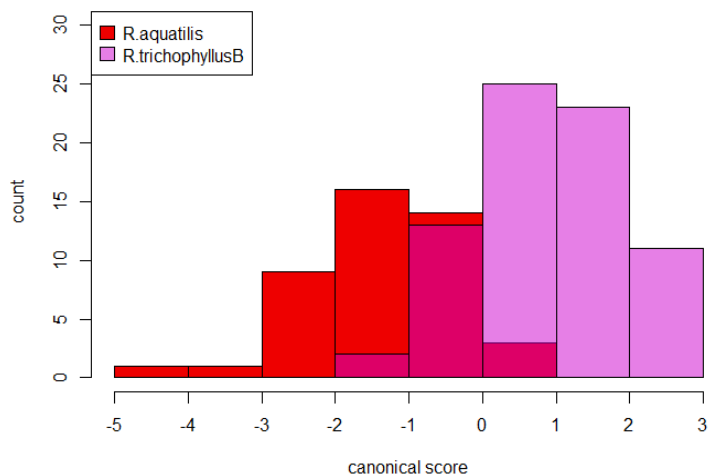
**Obr. 36 – Kanonická diskriminační analýza jednotlivců za využití 30 generativních znaků. Skupiny byly vymezeny podle velikosti genomu na základě výsledků získaných metodou průtokové cytometrie. Osa CDA1 vysvětluje 35,69 % variability, osa CDA2 29,36 % variability.**

**Tab. 22 – Příspěvky jednotlivých znaků k příslušným komponentám CDA jedinců datasetu III. Šedou barvou jsou označeny znaky s nejvyššími hodnotami.**

Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2
DK	-0,309	-0,277	pSI	-0,111	<b>-0,639</b>	N	0,289	-0,389
SK	-0,299	-0,425	DLU	0,086	-0,300	pNNN	-0,009	0,116
mSK	-0,060	0,141	SLU	-0,128	-0,201	DN	<b>-0,641</b>	0,117
pSKDK	-0,075	-0,368	pSDLU	-0,220	0,097	SN	<b>-0,510</b>	0,058
DI	-0,109	0,175	VN	0,270	-0,378	pSDN	-0,072	-0,008
DS	-0,277	<b>-0,520</b>	NN	0,126	-0,019			



**Obr. 37 – Kanonická diskriminační analýza datasetu III pro dvojici cytotypů *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B.**

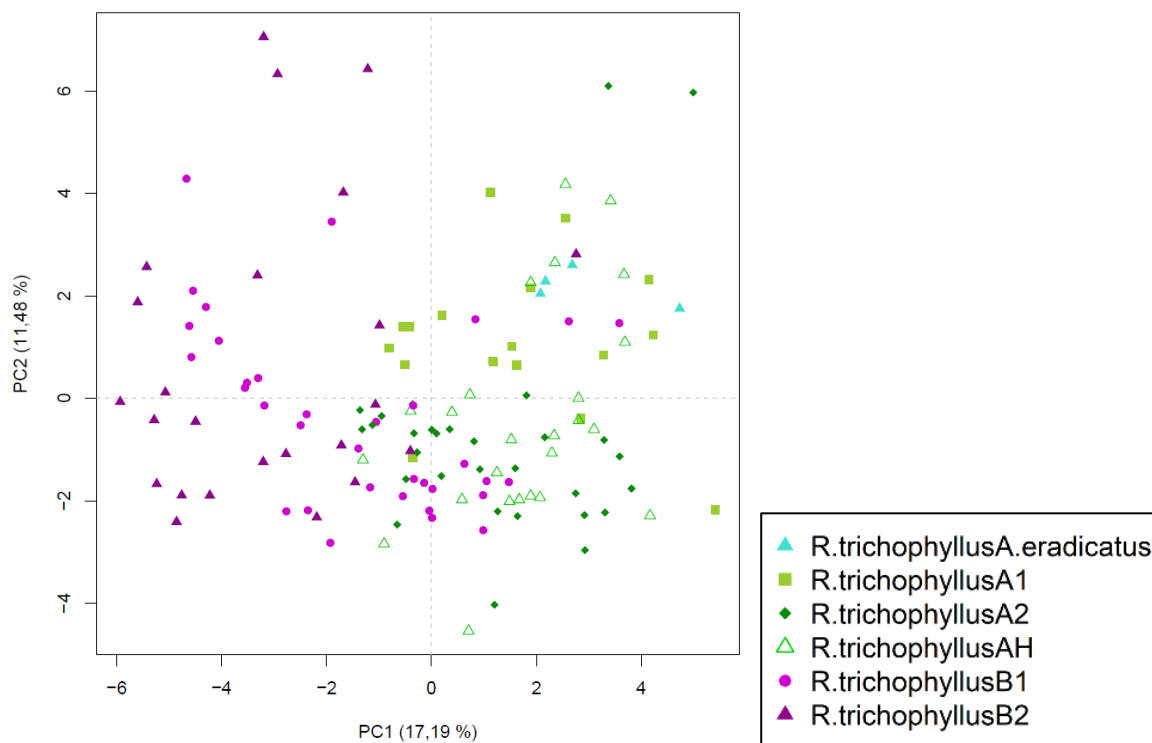


**Obr 38 – Kanonická diskriminační analýza datasetu III pro cytotyp *R. trichophyllus* B a taxon *R. aquatilis*.**

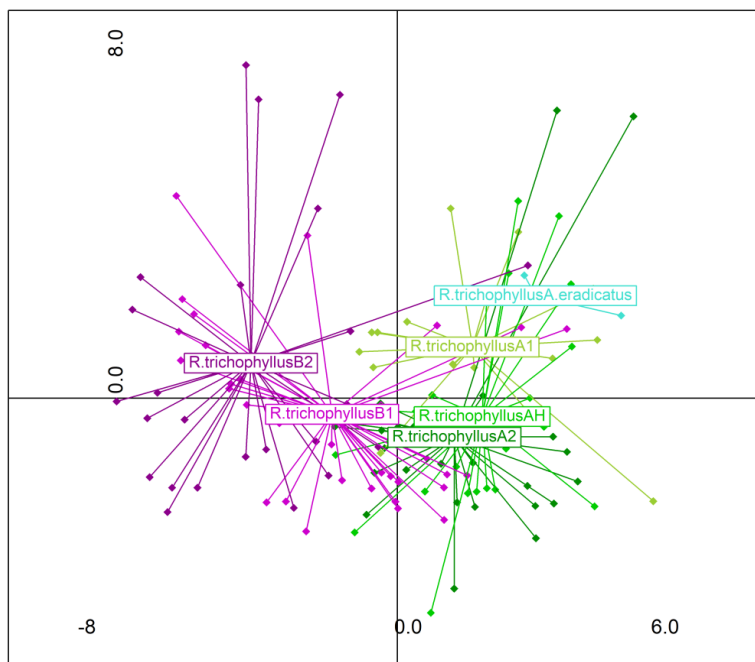
Klasifikační diskriminační analýza (Obr. 39, Tab. 23) ukazuje, že užitím pouze generativních znaků lze poměrně dobře odlišit druhy *R. baudotii* a *R. rionii* (oba 89 % správně zařazených jedinců). Problematické jsou naopak *R. aquatilis* a *R. trichophyllus* B, jež byly vzájemně zaměňovány. Celková úspěšnost určení rostlin pak nabývala 83 %.



významné hlavně znaky průměrný poměr délka řapíku/délka listu a průměrný poměr délka čepel/délka listu (viz Tab. 24).



**Obr. 40 – Analýza hlavních komponent zobrazující variabilitu molekulárně definovaných linií jednotlivce, za využití 42 znaků (skupiny byly vymezeny podle výsledků analýzy úseku ITS). Osa PC1 vysvětluje 17,19 % variability, osa PC2 11,48 % variability.**



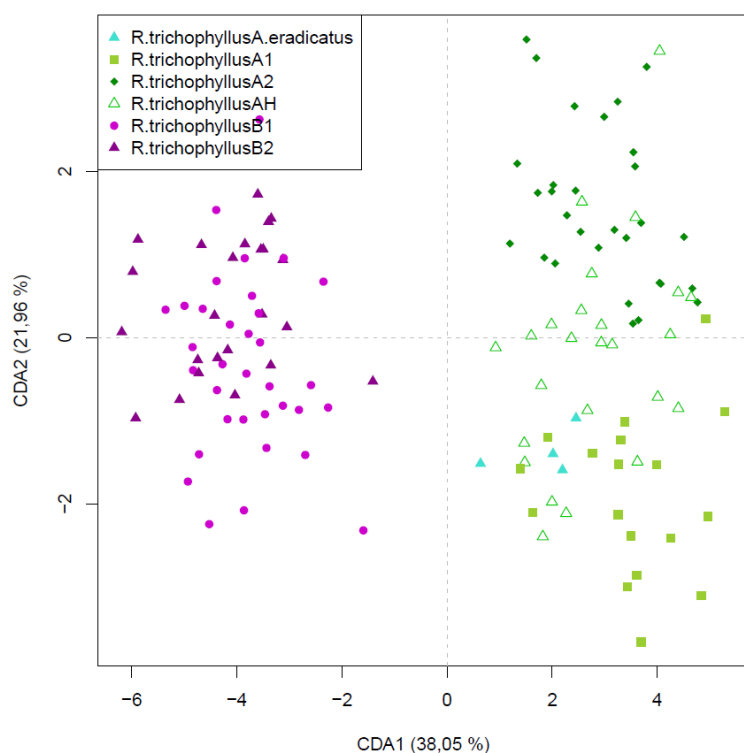
Obr. 41 – Spider diagram zobrazující oddělování jednotlivých molekulárně definovaných linií. Název linie je umístěn v centroidu shluku.

Tab. 24 – Příspěvky jednotlivých znaků k příslušným komponentám PCA jedinců datasetu IV. Šedou barvou jsou označeny znaky s nejvyššími hodnotami.

Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2	Znak	PC1	PC2
DRI	-0,219	<b>0,726</b>	TVH	0,067	0,081	SLU	<b>-0,847</b>	0,191
PUI	<b>-0,780</b>	-0,084	TVO	-0,357	-0,004	pSDLU	-0,184	0,057
DLI	-0,659	0,009	DI	-0,535	-0,435	VN	-0,402	-0,012
pRLI	0,275	<b>0,790</b>	DS	-0,276	0,148	NN	0,006	-0,008
pPULI	-0,353	-0,096	prP	0,222	-0,199	N	-0,481	0,004
DR	-0,302	<b>0,719</b>	prR	-0,262	-0,168	pNNN	0,111	0,032
PU	<b>-0,749</b>	-0,072	prsM	0,118	0,139	DN	-0,501	0,176
DL	-0,661	0,028	pSI	0,381	0,517	SN	-0,553	0,331
pRL	0,205	<b>0,827</b>	pPLI	0,226	0,481	Z	0,049	-0,379
pCL	-0,186	<b>-0,829</b>	pPLS	-0,317	-0,082	pSDN	-0,129	0,287
DK	-0,618	0,179	CHL	0,109	0,130	CHNH	-0,029	-0,399
SK	-0,563	0,283	CHR	-0,006	-0,112	CHN	0,235	-0,173
mSK	-0,371	-0,211	CHH	0,041	-0,054	CHNR	-0,006	0,300
pSKDK	-0,084	0,237	DLU	<b>-0,805</b>	0,136	SLO	<b>-0,739</b>	0,012

Pro diskriminační analýzy byly vyloučeny znaky: TVH, TVO, prP, prR, prsM, CHL, CHR, CHH, Z, CHNH, CHN, CHNR.

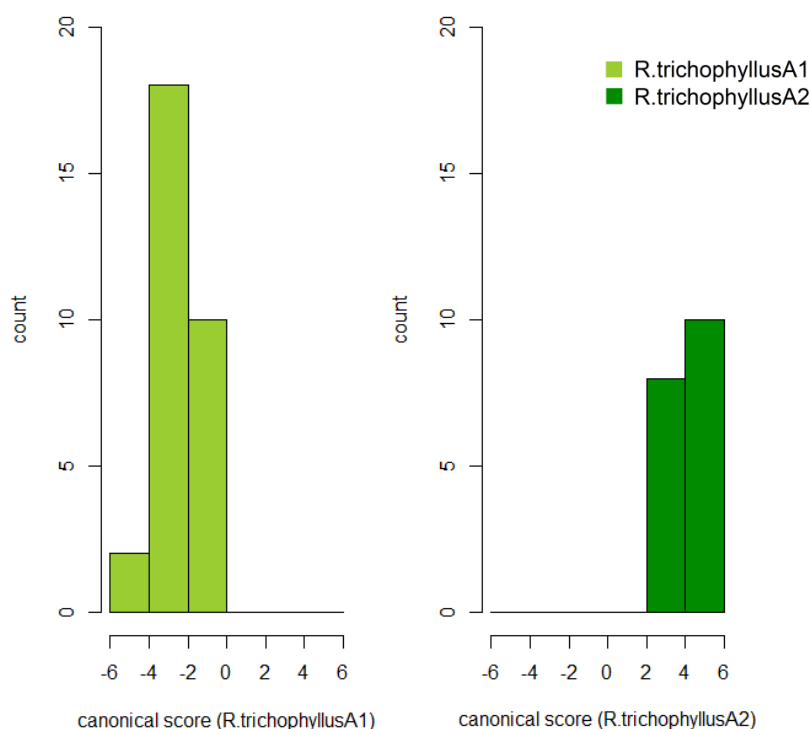
Kanonická diskriminační analýza (CDA, 135 jedinců, 30 znaků, Obr. 42) ukázala kromě oddělení cytotypů *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B také trend k odlišení linií *R. trichophyllus* A1 A2. K pozici objektů podle osy CDA1 přispívá nejvíce znak průměrný počet listových úkrojků. Pro pozici objektů podle osy CDA2 jsou významné hlavně znaky průměrný poměr délka řapíku/délka listu a průměrný poměr délka čepele/délka listu (viz Tab. 25). Ve výstupu diskriminační analýzy provedené samostatně pro dvojici linií *R. trichophyllus* A1 a *R. trichophyllus* A2 je patrné jejich jednoznačné oddělení (viz Obr. 43).



**Obr. 42 – Kanonická diskriminační analýza datasetu IV pro jednotlivce. Skupiny byly vymezeny podle výsledků analýzy úseku ITS. Osa CDA1 vysvětluje 38,05 % variability, osa CDA2 21,96 % variability.**

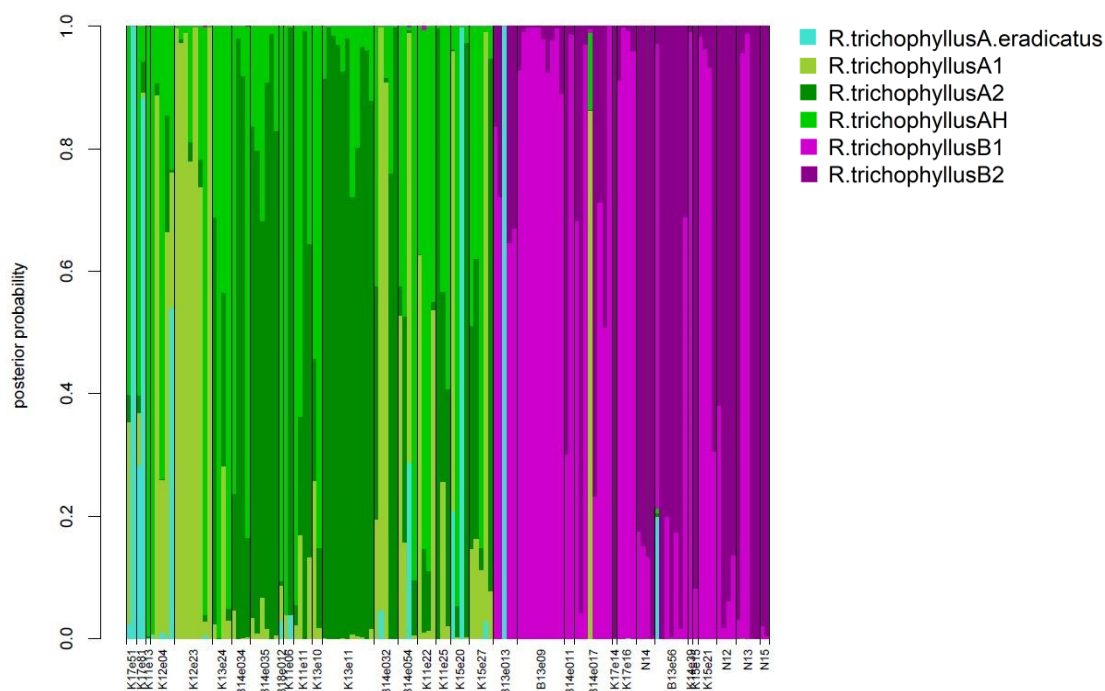
**Tab. 25 – Příspěvky jednotlivých znaků k příslušným komponentám CDA jedinců datasetu IV. Šedou barvou jsou označeny znaky s nejvyššími hodnotami.**

Znak	CDA1	CDA2	Znak	CDA1	CDA2	Znak	CDA1	CDA2
DRI	-0,020	-0,082	DK	-0,114	-0,005	SLU	<b>-0,263</b>	0,047
PUI	<b>-0,486</b>	-0,013	SK	-0,076	-0,106	pSDLU	-0,032	0,011
DLI	-0,062	<b>0,202</b>	mSK	-0,142	0,184	VN	0,015	0,089
pRLI	0,012	<b>-0,213</b>	pSKDK	0,031	-0,186	NN	0,013	-0,038
pPULI	<b>-0,340</b>	<b>-0,203</b>	DI	-0,068	0,051	N	-0,010	0,005
DR	-0,056	-0,108	DS	0,054	-0,161	pNNN	-0,003	-0,081
PU	<b>-0,507</b>	0,042	pSI	0,087	-0,130	DN	-0,103	0,165
DL	-0,049	0,190	pPLI	0,038	0,101	SN	-0,201	0,107
pRL	-0,021	<b>-0,246</b>	pPLS	-0,085	<b>0,217</b>	pSDN	-0,090	-0,142
pCL	0,025	<b>0,229</b>	DLU	<b>-0,257</b>	0,061	SLO	<b>-0,214</b>	-0,098



**Obr. 43 – Kanonická diskriminační analýza dvojice molekulárně definovaných linií *R. trichophyllus* A1 a *R. trichophyllus* A2.**

Podle klasifikační diskriminační analýzy (Obr. 44, Tab. 26) jednotlivé molekulárně definované linie uvnitř cytotypů A a B dobře morfologicky vymezené. S použitím všech měřených znaků bylo správně klasifikováno pouze 62,2 % jedinců; nejlépe morfologicky vymezené jsou linie B1 a A2 (73,53, resp. 73,33 % správně určených jedinců), zatímco nejméně správně zařazených rostlin bylo u linie s hybridní ITS *R. trichophyllus* AH (40 %).



Obr. 44 – Klasifikační diskriminační analýza „one-leave-out classification“ datasetu IV provedená v programu R za využití 30 znaků.

Tab. 26 – Klasifikační diskriminační analýza „one-leave-out classification“ datasetu IV za využití 30 znaků.

Taxon	<i>R. trichophyllus A eradicatus</i>	<i>R. trichophyllus A1</i>	<i>R. trichophyllus A2</i>	<i>R. trichophyllus AH</i>	<i>R. trichophyllus B1</i>	<i>R. trichophyllus B2</i>	Počet zařazených rostlin	Správně zařazených (%)
<i>R. trichophyllus A eradicatus</i>	2	0	0	2	0	0	4	50
<i>R. trichophyllus A1</i>	1	9	1	7	0	0	18	50
<i>R. trichophyllus A2</i>	0	0	22	8	0	0	30	73,33
<i>R. trichophyllus AH</i>	1	8	6	10	0	0	25	40
<i>R. trichophyllus B1</i>	1	1	0	0	25	7	34	73,53
<i>R. trichophyllus B2</i>	0	0	0	0	8	16	24	66,67
Rostlin celkem	5	18	29	27	33	23	135	62,22

#### 4.4. Diagnostické znaky studovaných taxonů

Na základě výsledků morfometrických analýz a vlastního pozorování byly sestaveny morfologické popisy jednotlivých taxonů. Hodnoty kvantitativních znaků se vztahují na suché (herbarizované) rostliny a jsou uvedeny jako: (minimum–)dolní kvantil–horní kvantil(–maximum).

*Kurzívou* značené části textu obsahují charakteristiku znaků, jež nebyly v rámci této práce měřeny, proto byly v rámci úplnosti popisu taxonů jejich charakteristiky přejaty z citovaných literárních zdrojů.

##### 4.4.1. *Ranunculus aquatilis* L. – lakušník vodní

*Ranunculus aquatilis* LINNAEUS Sp. Pl. 556, 1753.

Jednoleté nebo vytrvalé vodní až subterestrické byliny. V terestrické ekofázi nízké kompaktní formy s plazivým růstem a pevnými listovými úkrojky. Lodyhy ve vodě až 200 cm dl., v terestrické ekomorfóze zkrácené, plazivé a kořenující v uzlinách; šířka lodyhy ve střední části článku pod zralými souplodími (0,8)–1,1–2,3(–2,6) mm. Listy podepřeny blanitými palisty; niťovité listy vždy přítomny, 12–42(–67) mm dl., zpravidla kratší než příslušný lodyžní článek; řapík (1,6–)3,2–5,5(–26) mm dl., čepel (7–)18–26(–64) mm dl., koncové úkrojky čepele v počtu (25–)63–112(–180); *lupenité listy jen někdy vyvinuté, s řapíkem až 90 mm dl. a čepelí až 30 mm širokou, ledvinitou až okrouhlou, členěnou obvykle alespoň do 2/3 délky na (3–)5–(7) úkrojků se 17–26 koncovými zuby* (Wiegleb, 2017; Štech et al., 2019). Květní stopky ve vstřícném postavení k řapíkům listů; *kališní lístky 3–5 mm dl., obvejčité až eliptické* (Cook, 1966); korunní lístky (3,5–)4,7–6,7(–9) mm dl., (1,8–)2,7–4(–6,5) mm šir., obvejčité, se žlutou skvrnou při bázi; val kolem jamky nektária okrouhlý či poloměsíčitý; květní lůžko chlupaté, za plodu kulovité až široce vejcovité, 1–2,5(–3,5) mm dl., 0,6–1,3(–2) mm šir. *Tyčinky v počtu (14–)15–22(–25)* (Cook, 1966). Plodní stopky obvykle kratší nebo nanejvýš zdéli příslušného niťovitého listu a lodyžního článku, (19,5)–26–44(–118) mm dl., obvykle mírně obloukovitě nazpět prohnuté; vyvinuté nažky v souplodí v počtu (8–)13–44(–52); zralé nažky chlupaté až hustě chlupaté, bez křídlatého lemu, (1,4)–1,5–1,8(–2,3) mm dl., 0,9–1,1(–1,4) mm široké, s 0,1–0,3 mm dl. zobánkem. V–VIII. Hf. 2n = 48.

#### 4.4.2. *Ranunculus baudotii* Godr. – lakušník Baudotův

*Ranunculus baudotii* GODRON Mém. Soc. Roy. Nancy 1839: 21, 1840.

Jednoleté až vytrvalé vodní až subterestrické byliny. V terestrické ekofázi nízké kompaktní formy s plazivým růstem a pevnými listovými úkrojky.. Šířka lodyhy ve střední části článku pod zralými souplodími (0,9)–1,2–1,7(–2,1) mm. Ve vodní ekofázi lodyha bledavá, často masitě dužnatá. Listy podepřeny blanitými palisty; niťovité listy vždy přítomny, (7–)13–20,8(–54) mm dl., mohou být i delší než lodyžní článek; řapík (1–)2–3,2(–7) mm dl., čepel (6,2–)11–18(–49) mm dl., koncové úkrojky čepele v počtu (12–)40–60(–85); lupenité listy mohou u jedinců či dokonce celých populací chybět, a to i u fertilních rostlin; řapík lupenitých listů až 90 mm dl. (Cook, 1966), čepel až 30 mm široká, ledvinitá až okrouhlá, členěná obvykle alespoň do 2/3 délky na (3–)5–(7) úkrojků se 17–26 koncovými zuby (Wiegleb, 2017; Štech et al., 2019). Květy ve vstřícném postavení k listům; kališní lístky 2–4,5 mm dlouhé, obvejčité až eliptické, často odstálé až nazpět ohnuté a od vrcholu modravě zbarvené (Cook, 1966); korunní lístky (2,6–)5,3–7(–8,6) mm dl., (1,7–)3,5–5(–7,2) mm šir., široce obvejčité, se žlutou skvrnou při bázi; val kolem jamky nektária poloměsíčitý; květní lůžko řídké chlupaté, za plodu prodloužené vejcovité až kuželovité, (1,5–)1,8–2,6 mm dl., (0,8–)1,1–1,6(–2,5) mm šir. Tyčinky v počtu 10–20(–25) (Cook, 1966). Plodní stopky obvykle delší než řapík příslušného niťovitého listu, silně nazpět ohnuté až mírně esovitě prohnuté, (10,5–)56–82(–142) mm dl.; vyvinuté nažky v souplodí v počtu (20–)34–44(–61); zralé nažky lysé, s úzkým křídlatým lemem, (1,3)–1,5–1,7(–1,9) mm dl., (0,7)–1–1,1 mm široké, s 0,1–0,3 mm dl. zobánkem. V–VIII (–IX). Hf. 2n=32.

#### 4.4.3. *Ranunculus rionii* Lager – lakušník Rionův

*Ranunculus rionii* LAGGER, Flora (Regensburg) 31: 49, 1848.

Jednoleté vodní až subterestrické byliny. Vodní forma dosahuje celkové délky prýtu 0,5–1 m. V terestrické ekofázi nízké kompaktní formy s plazivým růstem a pevnými listovými úkrojky. Šířka lodyhy ve střední části článku pod zralými souplodími (0,8)–1,2–1,6(–2) mm. Listy podepřeny blanitými palisty; niťovité listy vždy přítomny, (10,4–)19–25(–65) mm dl., řapík (1,4–)2,5–4,5(–11) mm dl., čepel (8–)16,3–21,1(–62) mm dl., koncové úkrojky čepele v počtu (14–)63–90(–123). Květy ve vstřícném postavení k listům; kališní lístky 2–2,5 mm dlouhé, většinou jen o málo kratší než korunní lístky (Cook, 1966); korunní lístky (1,7–)3,2–4,1(–5,5) mm dl., (1–)1,8–2,4(–3,2) mm šir., vejčité až obvejčité, se žlutou skvrnou při bázi;

val kolem jamky nektária poloměsíčitý nebo hruškovitý; květní lůžko chlupaté, za plodu kulovité až vejcovitě prodloužené, (0,8–)1,5–2,5(–3) mm dl., (0,4–)0,9–1,2(–1,4) mm šir. *Tyčinky v počtu (10–)12–25 (Cook, 1966)*. Plodní stopky obvykle kratší nebo nanejvýš zděli příslušného niťovitého listu, (11,4)–19–25,2(–36,5) mm dl., obvykle mírně obloukovitě nazpět prohnuté; vyvinuté nažky v souplodí v počtu (12–)38–68(–85); zralé nažky lysé, bez křídlatého lemu, 0,9–1,1 mm dl., 0,5–0,7 mm široké, s 0,1 mm dl. zobánkem. (IV–)V–VIII. Hf. 2n=16.

#### 4.4.4. *Ranunculus trichophyllus* Chaix – lakušník niťolistý

*Ranunculus trichophyllus* CHAIX in VILLARS., Hist. Pl. Dauphiné 1: 335. 1786.

##### 4.4.4.1 *Ranunculus trichophyllus* cytotyp A

Jednoleté až vytrvalé vodní až subterestrické byliny. V terestrické ekofázi nízké kompaktní formy s plazivým růstem a pevnými listovými úkrojky. Šířka lodyhy ve střední části článku pod zralými souplodími (0,4)–0,7–1(–1,8) mm. Listy podepřeny blanitými palisty; niťovité listy vždy přítomny, (9–)19–28(–37) mm dl., zpravidla kratší nebo nanejvýš zděli příslušného lodyžního článku; řapík (1,6–)2,8–4,4(–8) mm dl., čepel (7–)15–23(–34) mm dl., koncové úkrojky čepele v počtu (20–)30–46(–76). Květy ve vstřícném postavení k listům; *kališní lístky 2,5–3,5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité, opadavé (Cook 1966; Wiegleb, 2017)*; korunní lístky (1,7–)2,9–4,2(–5,8) mm dl., (0,7–)1,6–2,3(–3) mm šir., vejčité až obvejčité, se žlutou skvrnou při bázi; val kolem jamky nektária poloměsíčitý; květní lůžko chlupaté, za plodu kulovité až široce vejcovité, (0,5–)0,9–1,2(–1,7) mm dl., (0,3–)0,6–0,8(–1) mm šir. *Tyčinky v počtu 9–15 (Wiegleb, 2017)*. Plodní stopky (10)–20–30(–46) mm dl., obvykle mírně obloukovitě nazpět prohnuté; vyvinuté nažky v souplodí v počtu (10–)19–27(–37); zralé nažky chlupaté, bez křídlatého lemu, (1,1)–1,3–1,5(–1,7) mm dl., 0,7–0,9(–1,1) mm široké, s 0,1–0,4 mm dl. zobánkem. IV–VIII. Hf. 2n=32.

##### 4.4.4.2 *Ranunculus trichophyllus* cytotyp B

Jednoleté až vytrvalé vodní až subterestrické byliny. V terestrické ekofázi nízké kompaktní formy s plazivým růstem a pevnými listovými úkrojky. Šířka lodyhy ve střední části článku pod zralými souplodími (0,8)–1,1–1,6(–2,1) mm. Listy podepřeny blanitými palisty; niťovité listy vždy přítomny, (10–)21–32(–50) mm dl., řapík (1,5–)2,9–5,5(–19,5) mm dl., čepel (8–)17–27(–42) mm dl., koncové úkrojky čepele v počtu (35–)82–114(–210). Květy ve vstřícném postavení k listům; *kališní lístky 2,5–3,5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité,*

*opadavé* (Cook 1966; Wiegleb, 2017); korunní lístky (2,6–)3,6–5(–6,6) mm dl., (1,2–)1,8–2,7(–4) mm šir., obvykle obvejčité, se žlutou skvrnou při bázi; val kolem jamky nektária poloměsíčitý, zřídka okrouhlý; květní lůžko chlupaté, za plodu kulovité až široce vejcovité, (0,7–)1,3–2,1(–2,9) mm dl., (0,5–)0,9–1,4(–2,1) mm šir. *Tyčinky v počtu 9–15* (Wiegleb, 2017). Plodní stopky (8,5)–17–29(–52) mm dl., obvykle mírně obloukovitě nazpět prohnuté; vyvinuté nažky v souplodí v počtu (8–)16–29(–63); zralé nažky chlupaté, bez křídlatého lemu, (1,3)–1,4–1,6(–2) mm dl., 0,9–1(–1,2) mm široké, s 0,1–0,3 mm dl. zobánkem. IV–VIII. Hf.  $2n=32$ .

#### 4.4.4.3 *Ranunculus trichophyllus* subsp. *eradicatus* (Laest.) C. D. K. Cook

*Ranunculus trichophyllus* subsp. *eradicatus* (LAESTADIUS) C.D.K.COOK, Mitt. Bot. Staatssamml. München, 6: 622, 1967.

Jednoleté nebo vytrvalé vodní až subterestrické byliny. V terestrické ekofázi nízké kompaktní formy s plazivým růstem a pevnými listovými úkrojky. Lodyhy plazivé, křehké, světle zelené. Šířka lodyhy ve střední části článku pod zralými souplodími (0,5)–0,7–0,8 mm. Listy podepřeny blanitými palisty; niťovité listy vždy přítomny, 13–17,5(–18) mm dl., řapík (2,1–)3–3,7(–4,5) mm dl., čepel (9,4–)11–13,6(–14) mm dl., koncové úkrojky čepele v počtu (35–)38–42(–55). Květy ve vstřícném postavení k listům, často ponořené a kleistogamické; *kališní lístky 2–4,5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité, během kvetení se nepřekrývají* (Cook 1966; Wiegleb, 2017); korunní lístky 3,9–4,3 mm dl., (2,2–)2,4–2,5 mm šir., široce obvejčité, se žlutou skvrnou při bázi; val kolem jamky nektária poloměsíčitý, zřídka hruškovitý; květní lůžko chlupaté až lysé, za plodu kulovité, (0,5–)0,6–0,9 mm dl., 0,4–0,6 mm šir. *Tyčinky v počtu 4–10(–14)* (Wiegleb, 2017). Plodní stopky obvykle kratší než příslušný list a zároveň delší než příslušný lodyžní článek, (24)–25,5–29,5(–31) mm dl., obvykle silně nazpět prohnuté; vyvinuté nažky v souplodí v počtu (10–)14–18(–22); zralé nažky chlupaté pouze v oblasti kýlu nebo lysé, bez křídlatého lemu, (1,4)–1,5–1,7 mm dl., 0,9–1,1 mm široké, s 0,1 mm dl. zobánkem. V–IX. Hf.  $2n=32$

### 4.5. Klíč k určování homofylních lakušníků na území střední Evropy

*Kurzívou* značené části textu obsahují charakteristiky taxonů, jež nebyly v rámci této práce studovány, proto byly v rámci úplnosti jejich charakteristiky přejaty z Klíče ke květeně České republiky (Štech et al., 2019). Klíč je dichotomický, s uvedením dalších důležitých

znaků (bez protiznaků) za pomlčkou. Hodnoty kvantitativních znaků se vztahují na suché (herbarizované) rostliny, délka nažek je uvedena bez zobánku.

- 1a Niťovité listy v obrysu okrouhlé, půlkruhovitě n. vějířovitě rozestálé, s úkrojky tuhými, paprskovitě rozloženými v jedné rovině, i po vytažení z vody zachovávajícími tvar; lodyžní články ve stř. části lodyhy 2–5× delší než příslušné listy. – Niťovité listy 8–20(–32) mm v průměru; C lístky (5–)6–10 mm dl., val kolem jamky nektária ± poloměsíčitý, méně často ± okrouhlý..... **R. circinatus** Sibth., **l. okrouhlý**
- b Niťovité listy v obrysu nepravidelného tvaru s úkrojky ± chabými (řidčeji, zejména v minerálně bohatých vodách, tuhými), do mnoha směrů rozloženými; lodyžní články ve stř. části lodyhy obvykle kratší n. nanejvýš 2× delší než příslušné listy .....2
- 2a Plodní stopky zpravidla více než 55 mm dl., obvykle delší než řapík příslušného niťovitého listu, silně nazpět ohnuté až mírně esovitě prohnuté. Zralé nažky lysé, s úzkým křídlatým lemem (patrným zejména v suchém stavu). – Lodyhy nápadně světlé, často masitě dužnaté. Niťovité listy mohou být i delší než příslušný lodyžní článek. Korunní lístky široce obvejčité; val kolem jamky nektária poloměsíčitý, zřídka okrouhlý n. hruškovitý. Květní lůžko řídce chlupaté, za plodu prodloužené, vejcovité až kuželovité.. ..... **R. baudotii** Godr., **l. Baudotův**
- b Plodní stopky kratší než 55 mm, vz. delší, ale pak nanejvýš mírně obloukovitě ohnuté. Nažky za zralosti bez křídlatého lemu. ....3
- 3a Rostliny proudících vod, většinou v řekách. Niťovité listy zpravidla stejně dlouhé n. delší než příslušný lodyžní článek, 5–40 cm dl. ....4
- b Rostliny stojatých n. tekoucích vod. Niťovité listy zpravidla kratší nebo nanejvýš zděli příslušného lodyžního článku, 1,2–4,2 cm dl. ....5
- 4a Květní lůžko řídce chlupaté až lysé; niťovité listy ± tuhé, s úkrojky 2–5× větvenými. C lístky v počtu 5–13; rostliny většinou netvoří nažky ..... **R. fluitans** Lam., **l. vzplývavý** (l. říční)
- b Květní lůžko hustě chlupaté; niťovité listy ± měkké, s úkrojky 4–8× větvenými, plně vyvinuté letní listy 5–20 cm dl.; C lístky v počtu 5; nažky se po odkvětu zpravidla vyvíjejí. .... **R. penicillatus** (Dumort.) Bab., **l. štětíčkový**
- 5a Lodyhy i ve vodě plazivé, alespoň v dolních uzlinách kořenující. Internodia fertálních lodyh zpravidla do 20 mm dl., kratší než příslušný list. – Lodyhy křehké, světle zelené. Listy 13–17,5(–18) mm dl. Květy u rostlin rostoucích ve vodě zpravidla ponořené, často zcela uzavřené (kleistogamické). Korunní lístky 3,9–4,3 mm dl., (2,2–)2,4–2,5 mm šir., val kolem jamky nektária poloměsíčitý, zřídka hruškovitý; květní lůžko chlupaté až lysé, za plodu kulovité. Vyvinuté nažky v souplodí v počtu (10–)14–18(–22); zralé nažky chlupaté v oblasti kýlu až lysé..... **R. trichophyllus** subsp. **eradicatus** (Laest.) C. D. K. Cook

- b** Lodyhy ve vodě volně vzplývavé, v uzlinách nekořenující. Internodia fertálních lodyh zpravidla více než 20 mm dl., delší než příslušný niťovitý list .....6
- 6a** Vyvinuté nažky v souplodí v počtu (12–)38–68(–85); nažky lysé, 0,9–1,1 mm dl., 0,5–0,7 mm široké, s velmi krátkým, ca 0,1 mm dl. zobánkem – Val kolem jamky nektária, poloměsíčitý nebo hruškovitý. . ..... **R. rionii** Lager, **I. Rionův**
- b** Vyvinuté nažky v souplodí v počtu 13–29(–52); zralé nažky chlupaté n. alespoň s ojedinělými chlupy, (1,1–)1,3–1,8(–2,3) mm dl., 0,7–1,1(–1,4) mm široké, s 0,1–0,4 mm dl. zobánkem .....7
- 7a** Šířka lodyhy ve střední části článku pod zralými souplodími (0,4–) 0,7–1(–1,8) mm. Listy (9–)19–28(–37) mm dl., koncové úkrojky čepele v počtu (20–)30–46(–76). Korunní lístky (1,7–)2,9–4,2(–5,8) mm dl., (0,7–)1,6–2,3(–3) mm šir. Květní lůžko za plodu ± kulovité, (0,5–)0,9–1,2(–1,7) mm dl., (0,3–)0,6–0,8(–1) mm šir. Zralé nažky (1,1–) 1,3–1,5(–1,7) mm dl., 0,7–0,9(–1,1) mm široké. – Subtilní rostliny s jemnými a řídkými úkrojky. Val kolem jamky nektária poloměsíčitý.  
..... **R. trichophyllus** agg., **I. niťolistý** cytotyp A
- b** Šířka lodyhy ve střední části článku pod zralými souplodími (0,8)–1,1–2,3(–2,6) mm. Listy (10–)12–42(–67) mm dl., koncové úkrojky čepele v počtu (25–)63–114(–210). Korunní lístky (2,7–)3,6–6,7(–9) mm dl., (1,8–)2,7–4(–6,5) mm šir. Květní lůžko za plodu kulovité až široce vejcovité. Zralé nažky (1,3–) 1,4–1,8(–2,3) mm dl., 0,9–1,1(–1,4) mm široké ..... 8
- 8a** Rostliny někdy vytvářejí plovoucí listy. – Val kolem jamky nektária poloměsíčitý, zřídka okrouhlý. .... **R. aquatilis** L., **I. vodní**
- b** Rostliny nikdy netvoří plovoucí listy. – Val kolem jamky nektária okrouhlý, řídkěji poloměsíčitý.  
..... **R. trichophyllus** agg., **I. niťolistý** cytotyp B

## 5. Diskuze

### 5.1. Cytotypová variabilita

Velikost genomu a cytotypová struktura jednotlivých taxonů zjištěná v této práci (viz Tab. 11, Obr. 13) se dobře shoduje s výsledky článku Prančl et al. (2018). Průtoková cytometrie byla potvrzena jako vhodná metoda pro spolehlivé určování střeoevropských homofylních lakušníků. U rostlin, které morfologicky odpovídají tradičnímu vymezení druhu *R. trichophyllus* (sensu Wiegleb et al., 2017), byla potvrzena vnitrodruhová variabilita ve velikosti genomu. Dva hlavní cytotypy *R. trichophyllus* A a B se zároveň liší velikostí genomu od ostatních druhů této sekce na našem území. Pro druh *R. trichophyllus* byly dosud publikovány čtyři ploidní úrovně (viz kapitolu 2.3.4), včetně hexaploidního cytotypu ze severní Evropy (Hong, 1991) a diploidního cytotypu z mediteránu (Dahlgren, 1991; Diosdado et al., 1993). Všechny mnou analyzované vzorky tohoto taxonu jsou však s největší pravděpodobností tetraploidní, neboť u obou potvrzených cytotypů byl v předchozí studii zjištěn tetraploidní počet chromozomů (Prančl et al., 2018).

Na základě údajů o časté hybridizaci v literatuře (viz kapitolu 2.2.6) a silné morfologické redukci v rámci *R. trichophyllus* agg. bylo možné očekávat ve zkoumané skupině výskyt dosud přehlížených hybridů. Cytometrie se skutečně ukázala být dobrou metodou pro rychlé odlišení recentních mezidruhových hybridů od rodičovských druhů. V rámci této práce byly potvrzeny čtyři mezidruhové hybridní kombinace, nicméně v rámci homofylních zástupců skupiny ve střední Evropě není frekvence výskytu hybridů vysoká. Četněji se vyskytovali pouze hybridi tetraploidních rodičů *R. peltatus* × *R. trichophyllus* (cytotyp A), dle vlastních terénních zkušeností jsou však rostliny tohoto hybrida většinou heterofylní. Ostatní hybridní kombinace byly pouze raritní (viz Tab. 10).

Část hybridů *R. peltatus* × *R. trichophyllus* (cytotyp A) dosahovala velikostí genomu nikoli intermediárních mezi oběma rodiči, ale více či méně vychýlených směrem k *R. peltatus* (odkaz na obrázek, tabulku). Může se jednat o zpětné hybridy směrem k prvnímu z rodičovských taxonů, ale i o případné F2 a následné generace hybridů segregované směrem k větší velikosti genomu. Jelikož F1 hybridi bývají i částečně plodní (Cook, 1966, 1970), nelze vyloučit ani jednu ze jmenovaných možností.

## 5.2. Genetická struktura a evoluční vztahy

Zjištěná genetická struktura podporuje zásadní vliv opakovaných hybridizačních událostí jakožto jednoho z nejdůležitějších speciálních mechanismů v rámci sekce *Batrachium*. Tyto evoluční události vedou k výsledné retikulární struktuře při snahách o rekonstrukci fylogeneze lakušníků jak naznačují již např. Butkuvienė et al., 2020; Horandl et al., 2017 a Wiegleb et al., 2017.

Fylogenetické analýzy dokazují, že i morfologicky podobné taxony, jakými jsou *R. rionii* a *R. trichophyllus* agg., mohou být evolučně poměrně vzdálené. Zároveň z výsledků vyplývá existence několika kryptických linií v rámci druhého ze jmenovaných tradičně rozlišovaných druhů. Pro *R. trichophyllus* agg. byla již v minulosti odhalena určitá diverzita naznačující polyfyletický charakter tohoto taxonu (Telford et al., 2011; Bobrov et al., 2015; Zalewska-Gałosz et al., 2015). V rámci mnou studovaných vzorků byla prokázána odlišnost cytotypů A a B jakožto dvou různých genetických linií, v nichž lze dále na základě sekvenování úseku ITS vymezit celkem 5 ribotypů: pro cytotyp A ribotypy A1, AH a A2 a pro cytotyp B ribotypy B1 a B2. Při porovnání mnou získaných sekvencí a sekvencí dostupných v GenBank jsem zjistila, že mnou zjištěné genotypy v rámci cytotypu A odpovídají některým publikovaným genotypům polských rostlin (Zalewska-Gałosz et al., 2015 a navazující práce Bobrov et al. 2015, do značné míry využívající sekvence z prvně jmenovaného článku): ribotyp A1 odpovídá genotypu „*R. trichophyllus* ribotype 2“ a ribotyp A2 odpovídá genotypu „*R. trichophyllus* ribotype 1“ publikovaných v práci Bobrov et al. (2015). Rovněž *rpl32-trnL* sekvence těchto ribotypů víceméně odpovídají sekvencím zjištěných u cytotypu A v této práci. Zajímavé je, že ani jeden ze zmíněných článků nedokumentuje ribotyp AH, jenž vykazuje hybridní pattern mezi těmito dvěma skupinami. Ribotyp *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* (publikovaný pod jménem *R. confervoides*; Bobrov et al., 2015) se dle očekávání shoduje se sekvencemi, které jsem získala z vzorku z téže lokality (populace SK16, Finsko). Mnou zjištěné ITS ribotypy se dále shodují s ribotypy dříve publikovanými pro *R. rionii* (Bobrov et al., 2015) a *R. aquatilis* (Zalewska-Gałosz et al., 2015). Naopak ribotyp *R. trichophyllus* z Chile (Lumbreras et al., 2014) je velmi vzdálený jak od tohoto, tak i od jiných taxonů ze střední Evropy.

Dle zjištěných sekvencí *R. trichophyllus* cytotypu A lze uvažovat o dvou alternativních možnostech jeho evolučního původu. První z nich je vznik dvou nezávislých linií A1 a A2 a jejich recentní hybridizace za vzniku linie AH. Jelikož úsek ITS podléhá procesu tzv. koncertované evoluce (Álvarez & Wendel, 2003; Koch et al., 2003), je druhým možným

způsobem proběhnuvší allopolyploidizace následovaná homogenizací sekvencí směrem k tomu či onomu z rodičovských taxonů v různém stupni. Jelikož jednotlivé ribotypy byly nalézány výhradně samostatně a nikoli ve smíšených populacích, kloním se osobně právě ke druhé ze jmenovaných variant.

U *R. trichophyllus* cytotypu B je genetické pattern komplikovanější. Nalézáme zde dvě ribotypové varianty: „čistou“ linii B2 a hybridogenní B1 linii shodující se s *R. aquatilis*. Linie B2 vykazuje zároveň přítomnost dvou různých haplotypů. Dle této struktury by se mohlo jednat o nejméně dvakrát nezávisle vzniklého allopolyploida. Mechanismus vzniku by potom vypadal následovně:

- Hybridizací samičího jedince taxonu s haplotypem *peltatus* a samčího jedince taxonu s ribotypem z rodiny *R. trichophyllus* vznikají jedinci s haplotypem *peltatus* a hybridním ribotypem B1, homogenizací k otcovské variantě potom vzniká linie s „čistým“ ribotypem B2. Jelikož pouze část sekvení ITS s tímto haplotypem je homogenizovaná a zbytek vykazuje hybridní pattern, jedná se zřejmě o mladšího hybrida či pomalejší průběh koncertované evoluce.
- Hybridizací v opačném směru vznikají jedinci s haplotypem *trich* B. Sekvence ITS s tímto haplotypem jsou již celkově homogenizované („čistý“ ribotyp *trich* B2), lze usuzovat na starší vznik hybrida či rychlejší průběh koncertované evoluce.

Této teorii přispívá skutečnost, že u allopolyploidních taxonů byl již mnohokrát dokumentován polytopický vznik (Lihová et al., 2006) a je předpokládán i u komplexu *R. penicillatus* (Cook, 1966; Webster, 1988). V případě vzniku *R. trichophyllus* cytotypu B nelze zatím určit, zda k jeho vzniku došlo polyploidizací z diploidních taxonů, nebo hybridizací již polyploidních taxonů.

Hybridogenní charakter a neustálené sekvence taxonů *R. aquatilis* a *R. baudotii* naznačují jejich allopolyploidní původ. *R. aquatilis* vykazuje podobný až shodný hybridní pattern ITS jako *R. trichophyllus* B1, stejně jako on má zároveň cpDNA s haplotypem *peltatus*. *R. baudotii* disponuje vlastním unikátním haplotypem, který se však u něj zároveň kombinuje s ITS velmi podobnou až shodnou s „čistým“ ribotypem *R. trichophyllus* B2, anebo s ribotypem hybridního charakteru kombinujícím znaky skupiny B2 s neznámým taxonem majícím podobný, ale nikoli shodný ribotyp s *R. fluitans*.

### 5.3. Morfologická diferenciace

Morfologickými analýzami byla potvrzena významná odlišnost dvou kryptických taxonů v rámci *R. trichophyllus* agg., cytotypů A a B, a ověřena existence znaků vymezujících *R. trichophyllus* agg. od druhů *R. rionii* a *R. baudotii*. Jistá morfologická diferenciace se ukazuje i uvnitř cytotypu A (ribotypy A1 a A2). Jedná se však zejména o kvantitativní rozdíly v rámci vegetativních znaků, kde lze obecně předpokládat větší vliv fenotypové plasticity. Navíc vzorky s ribotypem A1 pocházejí pouze z několika málo specifických lokalit v oblasti jižních Čech. Proto je nutno vzít v potaz vliv stanovištních podmínek, které mohou být v tomto případě ovlivnit výsledek analýz.

Morfologický překryv mezi *R. trichophyllus* (cytotyp B) a druhem *R. aquatilis* není zcela překvapivý, protože odráží jejich hybridogenní původ a společnou evoluční historii. Zároveň je však nutno vzít v úvahu, že nezanedbatelná část populací *R. aquatilis* tvoří lupenité listy, které umožňují jednoznačné odlišení od *R. trichophyllus* agg. Mnou provedené analýzy potvrzují, že pokud se u *R. aquatilis* nevyvine zásadní znak, je určování zmíněných taxonů skutečně problematické.

*R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* je omezen svým výskytem na velmi specifické geografické oblasti a biotopy, často také roste na obtížně dostupných místech (např. ve velkých hloubkách při dně horských jezer), jeho sběr je tedy značně náročnější. Z toho důvodu byl do morfologických analýz zařazen pouze v malém počtu vzorků. Materiál, který byl k dispozici, je morfologicky výrazně odlišný od všech ostatních analyzovaných taxonů. Určitá diferenciace se projevuje i na základě molekulární analýzy, není však nikterak výrazná a může při ní hrát roli i rozrůznění na základě geografické izolace populací. Nelze proto vyloučit, že pozorovaná odlišnost je způsobena hlavně vlivem specifického prostředí.

V této práci byly měřeny znaky na herbářovém materiálu. Po vysušení mohou rostlinné orgány projít ztrátou objemu i deformací. Tento fakt je nutno zohlednit při porovnávání hodnot znaků měřených na čerstvých rostlinách. Pro lepší možnosti determinace v terénu by bylo vhodné doplnit údaje o měření živých rostlin, to je však prakticky poměrně obtížně proveditelné.

#### 5.4. Ekologické nároky

Detailní studium ekologických nároků nebylo přímým cílem této práce, nicméně z mého pozorování vyplývá existence jistých rozdílů v ekologii jednotlivých taxonů, což může mít i zásadní vliv na jejich rozšíření.

Obecně přijímaným stanoviskem ohledně rozšíření vodních rostlin jsou jejich rozsáhlé areály bez výrazných fytogeografických tendencí (Santamaría, 2002). Oproti tomuto předpokladu se jednotlivé druhy lakušníků zásadně liší na základě preference minerální bohatosti substrátu (Wiegand et al., 2017), což se jednoznačně odráží i v jejich rozšíření na území ČR (Kaplan et al., 2019). Dle vlastního pozorování se od sebe ekologicky liší také jednotlivé cytotypy v rámci komplexu *R. trichophyllus*: cytotyp B oblibuje zejména vody bohaté na vápník, zatímco cytotyp A se vyskytuje zejména na minerálně chudých podkladech. Díky tomu jsou oba cytotypy zřejmě do značné míry vzájemně vikariantní.

#### 5.5. Taxonomické zhodnocení

Agregát lakušníku nit'olistého zahrnuje tři hlavní linie. Jsou to *R. trichophyllus* cytotyp A, *R. trichophyllus* cytotyp B a *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus*. *R. trichophyllus* cytotyp A je linie s menší velikostí genomu, u níž byly dále objeveny dvě různé ITS linie a jejich hybridní typ. *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* je linie geneticky příbuzná s cytotypem A a velikostí genomu od něj neodlišitelná, osidlující vysokohorská a skandinávská jezera. *R. trichophyllus* cytotyp B je linie s větší velikostí genomu, ekologicky je spíše bazofilní a má geneticky komplikovanější hybridní pattern, naznačující polytopní vznik.

Kryptické linie *R. trichophyllus* cytotyp A a *R. trichophyllus* cytotyp B jsou výrazně odlišné ve všech studovaných parametrech, z čehož vyplývá, že dále zasluhují být klasifikovány jako dva odlišné druhy. Skutečná identita taxonu, který byl popsán pod jménem *Ranunculus trichophyllus* Chaix, je však nejasná. Typová položka nebyla nikdy nalezena; autor jména Dominique Chaix neudal k druhu vlastní diagnózu, ale pouze odkázal na práci Albrechta von Hallera (Cook, 1966). Monograf Cook proto určil jako neotyp položku z Hallerovy pozůstalosti, jež je dostupná v herbáři v Ženevě (viz Přílohu 5). Jedná se však o terestrickou formu. Tento jedinec vykazuje morfologický charakter *R. trichophyllus* agg., z jeho morfologie se však nedá usuzovat, zda náleží ke konkrétnímu cytotypu A či B.

Linie *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* oproti tomu vykazuje poměrně blízkou příbuznost k taxonu *R. trichophyllus* cytotyp A a k objasnění toho, zda se jedná o dobře

odlišný taxon nebo pouhou stanovištní modifikaci, bude v budoucnu třeba dalšího studia na větším množství vzorků. Jméno taxonu *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* (Laest.) C. D. K. Cook je založeno na rostlinách ze Skandinávie. Cook (1966) tento taxon považuje za arktickoalpínský, s širokým (sub)arktickým areálem v Evropě a v Severní Americe s výsady v jižněji položených pohořích (Alpy, Pyreneje, Kavkaz). Oproti tomu Wiegleb et al., 2017 považuje tento taxon za samostatný druh *R. confervoides*, který je v jeho pojetí skandinávský endemit; všechny rostliny z Alp a jiných neseverských pohoří řadí Wiegleb pod *R. trichophyllus*. Pro další taxonomické hodnocení bude klíčové zjistit, zda jsou alpské populace přímo příbuzné se skandinávskými (a mohly by tudíž představovat potenciální glaciální relikty), nebo se vyvinuly nezávisle v obdobných ekologických podmínkách. Třebaže mnou analyzovaná populace z Finska byla geneticky poněkud odlišná od rostlin pocházejících z Alp, malý počet vzorků zatím nedovoluje objektivně zhodnotit vztahy mezi těmito populacemi.

Druh *R. aquatilis* a některé genotypy *R. trichophyllus* agg. (cytotyp B, ribotyp B1) jsou navzájem molekulárně neodlišitelné, zároveň rostliny patřící k cytotypu B vykazují značný morfologický překryv s homofylními jedinci *R. aquatilis*. Jedno z možných řešení by tedy bylo oba taxony považovat za jediný druh. Obdobné řešení je přijato např. ve Flora Nordica (Dahlgren & Jonsell, 2001, kde je *R. trichophyllus* hodnocen pouze v ranku variety jako *R. aquatilis* var. *diffusus*). V současném stavu poznání se však zatím příkláním k hodnocení obou taxonů na druhové úrovni. Oba taxony lze odlišit nejen na základě rozdílné ploidie, ale i na základě odlišné monoploidní velikosti genomu, což vylučuje „jednoduchý“ jednokrokový vznik hexaploidního *R. aquatilis* z tetraploidního *R. trichophyllus* B. Na území střední Evropy jsou navíc oba taxony reprodukčně dobře izolované. Hybridi patrně vznikají pouze vzácně, jsou pentaploidní a téměř sterilní. V neposlední řadě se *R. aquatilis* liší schopností tvořit za určitých podmínek plovoucí listy. Pro determinační účely je tedy vhodné kombinovat znak absolutní velikosti genomu se znalostí morfologických znaků sledovaných v rámci celé populace.

Zůstává otázkou, jaká je identita rostlin ze severní Evropy, které byly označovány jako hexaploidní *R. trichophyllus* a které měly běžně hybridizovat a vytvářet hybridní roje s *R. aquatilis* (Hong 1991). Je možné, že všechny tyto rostliny ve skutečnosti patří pod jediný hexaploidní taxon (snad identický s *R. aquatilis*), bude ale nutné toto v budoucnu potvrdit či vyvrátit studiem severských populací.

Z výsledků porovnání sekvenace úseku ITS se vzorky klasifikovanými v rámci tohoto taxonu jinými autory je patrná jeho značná diverzita a evoluční komplexita a je zřejmé, že *R. trichophyllus* agg. vyžaduje revizi v celém svém areálu.

## 6. Závěr

Práce přináší první komplexní zhodnocení diverzity v rámci *R. trichophyllus* agg. na území střední Evropy. U rostlin, které morfologicky odpovídají tradičnímu vymezení druhu *R. trichophyllus* (sensu Wiegleb et al., 2017), byla potvrzena vnitrodruhová variabilita ve velikosti genomu. Dva hlavní cytotypy *R. trichophyllus* A a B se liší velikostí genomu jak navzájem, tak i od ostatních střeoevropských druhů sekce *Batrachium*. Zástupci *R. trichophyllus* agg. ve studovaném území zároveň s největší pravděpodobností nejsou ploidně variabilní, jelikož u obou potvrzených cytotypů byl v předchozí studii (Prančl et al., 2018) karyologickou analýzou zjištěn tetraploidní počet chromozomů.

Zjištěná genetická struktura naznačuje zásadní vliv opakovaných hybridizačních událostí jakožto jednoho z nejdůležitějších speciálních mechanismů v rámci sekce *Batrachium*. Celkově agregát na území střední Evropy zahrnuje tři hlavní genetické linie: *R. trichophyllus* cytotyp A, *R. trichophyllus* cytotyp B a *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus*.

Morfologickými analýzami bylo následně potvrzeno dobré oddělení kryptických taxonů *R. trichophyllus* cytotyp A a *R. trichophyllus* cytotyp B, a ověřena existence znaků vymezujících *R. trichophyllus* agg. od homofylních jedinců nepříbuzných druhů *R. rionii* a *R. baudotii*. Znaky homofylních rostlin druhu *R. aquatilis* vykazují morfologický překryv s *R. trichophyllus* cytotyp B. Zmíněnou dvojici taxonů však lze odlišit pomocí průtokové cytometrie díky rozdílné velikosti genomu.

Kryptické linie *R. trichophyllus* cytotyp A a *R. trichophyllus* cytotyp B jsou dobře diferencované morfologicky, geneticky, velikostí genomu a pravděpodobně i ekologicky, což podporuje jejich taxonomické hodnocení na úrovni dvou samostatných druhů. Oprávněnost statutu *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* jakožto samostatného poddruhu zůstává otázkou, k jejímuž zodpovězení bude v budoucnu třeba dalšího studia na větším množství vzorků.

Na základě morfologických analýz byly sestaveny diagnostické znaky studovaných taxonů a určovací klíč homofylních zástupců sekce *Batrachium* na území střední Evropy. Agregát lakušníku nitřolistého každopádně v budoucnu zasluhuje revizi v rámci celého areálu svého výskytu.

## 7. Použitá literatura

Álvarez, I. J. F. W., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29, 417–434.

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.

Bailey, C. D., Carr, T. G., Harris, S. A., & Hughes, C. E. (2003). Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(3), 435–455.

Barker, M. S., Arrigo, N., Baniaga, A. E., Li, Z., & Levin, D. A. (2016). On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. *New Phytologist*, 210, 391–398.

Barrett, S. C., Eckert, C. G., & Husband, B. C. (1993). Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquatic Botany*, 44, 105–145.

Benson, L. (1940). The North American subdivisions of *Ranunculus*. *American Journal of Botany*, 27, 799–807.

Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 22, 148–155.

Bobrov, A. A. (2007). *Potamogeton* × *fennicus* (*P. filiformis* × *P. vaginatus*, *Potamogetonaceae*) in East Europe. *Komarovia*, 5, 1–23.

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

Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in genetics*, 13, 115–155.

Břízová E. (2011). Quillwort (*Isoëtes*), a mysterious plant from the Czech Republic. *Sborník Národního muzea v Praze, Series B – Historia Naturalis*, 67, 25–34.

- Butkuvienė, J., Sinkevičienė, Z., Naugžemys, D., Patamsytė, J., & Žvingila, D. (2017). Genetic diversity of *Batrachium* (*Ranunculaceae*) species reveals the necessity of their protection in Lithuanian rivers. *Aquatic Botany*, 142, 61–70.
- Butkuvienė, J., Sinkevičienė, Z., Naugžemys, D., Žvingila, D., Skridaila, A., & Bobrov, A. A. (2020). Genetic diversity of aquatic *Ranunculus* (*Batrachium*, *Ranunculaceae*) in one river basin caused by hybridization. *Plants*, 9, 1455.
- Cook, C. D. K. (1962). Studies on *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. I. Chromosome numbers. *Watsonia*, 5, 123–126.
- Cook, C. D. K. (1963). Studies in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. II. General morphological considerations in the taxonomy of the subgenus. *Watsonia*, 5, 294–303.
- Cook, C. D. K. (1966). A monographic study of *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 6, 47–237.
- Cook, C. D. K. (1967) Emendations to a monographic study of *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 6, 621–622.
- 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*, 161–166.
- Cook, C. D. K. (1975). Subg. *Batrachium* (DC.) A. Gray. In: Stace C.A. (Ed.) *Hybridization and the flora of the British Isles*, 125–129.
- 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.

- Dahlgren, G. & Jonsell, B. (2001) 13. *Ranunculus hederaceus* L.–19. *Ranunculus penicillatus* (Dumort.) Bab. In: Jonsell, B. (Ed.) *Flora Nordica*. Vol. 2. *Chenopodiaceae to Fumariaceae*. the Bergius Foundation, Stockholm, 229, 259–269.
- Diosdado, J. C., Pastor, J. E., & Valdés, B. (1993). Contributions to the karyological study of the genus *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray from the Iberian Peninsula. *Botanical journal of the Linnean Society*, 112, 75–87.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007a). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, 2, 2233–2244.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007b). *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Weinheim: Wiley.
- Dvořák, F., & Dadáková, B. (1984). Chromosome counts and chromosome morphology of some selected species. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 19, 41–70.
- Englmaier, P. (2016). *Ranunculus* sect. *Batrachium* (Ranunculaceae): Contribution to an excursion flora of Austria and the Eastern Alps. *Neulreichia*, 8, 97–125.
- Grulich V. (2017): Červený seznam cévnatých rostlin ČR. – *Příroda* 35, 75–132.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.
- Hedenäs, L. (2017). Scandinavian *Oncophorus* (Bryopsida, *Oncophoraceae*): species, cryptic species, and intraspecific variation. *European Journal of Taxonomy*, 315.
- Henderson, A. (2006). Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151, 103–111.
- Hong, D. Y. (1991). A biosystematic study on *Ranunculus* subgenus *Batrachium* in S Sweden. *Nordic J. Bot*, 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.

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

Husband, B. C., & Barrett, S. C. (1992). Effective population size and genetic drift in tristylous *Eichhornia paniculata* (*Pontederiaceae*). *Evolution*, 46, 1875–1890.

Husband, B. C., Baldwin, S. J., & Suda, J. (2013). The incidence of polyploidy in natural plant populations: major patterns and evolutionary processes. *Plant genome diversity volume 2013*, 2, 255–276.

Huson, D. H., & Bryant, D. (2005). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23, 254–267.

Kaplan Z. & Pránčl J. (2019). *Batrachium* (DC.) S. F. Gray. In: Kaplan, Z. (ed.), *Klíč ke květeně České republiky*, 363–367, Praha: Academia.

Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. Jr., Zázvorka J., Koutecký P., Ekrt L., Řepka R., Jelínek B., Grulich V., Pránčl J. & Wild J. (2019). Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 8. *Preslia*, 91, 257–368.

Kaplan, Z., & Fehrer, J. (2011). Erroneous identities of *Potamogeton* hybrids corrected by molecular analysis of plants from type clones. *Taxon*, 60, 758–766.

Kaplan, Z., Fehrer, J., & Hellquist, C. B. (2009). New hybrid combinations revealed by molecular analysis: The unknown side of North American pondweed diversity (*Potamogeton*). *Systematic Botany*, 34, 625–642.

Koch, M. A., Dobeš, C., & Mitchell-Olds, T. (2003). Multiple hybrid formation in natural populations: concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (*Brassicaceae*). *Molecular Biology and Evolution*, 20, 338–350.

Koga, K., Kadono, Y., & Setoguchi, H. (2008). Phylogeography of Japanese water crowfoot based on chloroplast DNA haplotypes. *Aquatic Botany*, 89, 1–8.

- Koutecký, P. (2015). MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 1115–1121.
- Krak, K. (2011). Využití sekvencí DNA při studiu evoluce rostlin. In Mandák B., Krahulec F., & Hroudová Z. (eds.), *Zprávy České botanické společnosti*, 25, 21–42.
- Lambertini, C., Gustafsson, M. H., Baattrup–Pedersen, A., & Riis, T. (2017). Genetic structure of the submersed *Ranunculus baudotii* (sect. *Batrachium*) population in a lowland stream in Denmark. *Aquatic Botany*, 136, 186–196.
- Les, D. H., & Philbrick, C. T. (1993). Studies of hybridization and chromosome number variation in aquatic angiosperms: evolutionary implications. *Aquatic Botany*, 44, 181–228.
- Lihová, J., Shimizu, K. K., & Marhold, K. (2006). Allopolyploid origin of *Cardamine asarifolia* (*Brassicaceae*): incongruence between plastid and nuclear ribosomal DNA sequences solved by a single-copy nuclear gene. *Molecular phylogenetics and evolution*, 39, 759–786.
- Lumbreras, A., Molina, J. A., Benavent, A., Marticorena, A., & Pardo, C. (2014). Disentangling the taxonomy and ecology of South American *Ranunculus* subgen. *Batrachium*. *Aquatic Botany*, 114, 21–28.
- Lumbreras, A., Olives, A., Quintana, J. R., Pardo, C., & Molina, J. A. (2009). Ecology of aquatic *Ranunculus* communities under the Mediterranean climate. *Aquatic Botany*, 90, 59–66.
- Lundholm, N., Bates, S. S., Baugh, K. A., Bill, B. D., Connell, L. B., Léger, C., & Trainer, V. L. (2012). Cryptic and pseudo-cryptic diversity in diatoms—with descriptions of *Pseudo-nitzschia hasleana* sp. nov. and *P. fryxelliana* sp. nov. *Journal of Phycology*, 48, 436–454.
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279–283.
- Marhold, K. (2011). Multivariate morphometrics and its application to monography at specific and infraspecific levels. In Stuessy T. F. & Lack H. W., *Monographic plant systematics: Fundamental assessment of plant biodiversity*, 73–99. Ganter, Ruggell.
- Měsíček, J., & Jarolímová, V. (1992). *List of chromosome numbers of the Czech vascular plants*. Praha: Academia.

- Měsíček, J., & Soják, J. (1995). Chromosome numbers of Mongolian Angiosperms. III. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 30, 445–453.
- Nasir, Y. J., & Riedl, H. (1991). *Flora of Pakistan* [online][cit. 12.5.2020], dostupné z: [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=5&taxon\\_id=10757](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=10757)
- Okuyama, Y., & Kato, M. (2009). Unveiling cryptic species diversity of flowering plants: successful biological species identification of Asian *Mitella* using nuclear ribosomal DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 1–16.
- Otto, F. (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In *Methods in cell biology*, 33, 105–110. Academic Press.
- Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics*, 34, 401–437.
- Philbrick, C. T., & Les, D. H. (1996). Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *Bioscience*, 46, 813–826.
- Prančl, J., Kaplan, Z., Trávníček, P., & Jarolímová, V. (2014). Genome size as a key to evolutionary complex aquatic plants: polyploidy and hybridization in Callitriche (Plantaginaceae). *PloS one*, 9.
- 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.
- Preston, C. D., Hollingsworth, P. M., & Gornall, R. J. (1998). *Potamogeton pectinatus* L. × *P. vaginatus* Turcz. (*P. × bottnicus* Hagstr.), a newly identified hybrid in the British Isles. *Watsonia*, 22, 69–82.
- Rich, T. C., & Jermy, A. C. (1998). *Plant crib 1998*. London: Botanical Society of the British Isles (BSBI).
- Rieseberg, L. H., & Soltis, D. E. (1991). Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants*, 5, 65–84.
- Rieseberg, L. H., & Willis, J. H. (2007). Plant speciation. *Science*, 317, 910–914.

Santamaría, L. (2002). Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. *Acta oecologica*, 23, 137–154.

Sculthorpe C. D. (1967): The biology of aquatic vascular plants. – Edward Arnold, London.

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.

Shapiro, H. M. (2005). Practical flow cytometry. John Wiley & Sons.

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.

Shneyer, V. S., & Kotseruba, V. V. (2015). Cryptic species in plants and their detection by genetic differentiation between populations. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 5, 528–541.

Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1998). Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In *Molecular systematics of plants II*, 1–42. Springer, Boston, MA. [online][cit. 12.5.2020], dostupné z:

<https://books.google.cz/books?id=xwfTBwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>

Soltis, D. E., Soltis, P. S., Schemske, D. W., Hancock, J. F., Thompson, J. N., Husband, B. C., & Judd, W. S. (2007). Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species?, *Taxon*, 56, 13–30.

Štech M., Prančl J. & Kaplan Z. (2019). *Ranunculus* – pryskyřník, lakušník. In Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds), *Klíč ke květeně České republiky* Ed. 2: 363–373, Academia, Praha.

Štorchová, H., Hrdličková, R., Chrtek Jr, J., Tetera, M., Fitze, D., & Fehrer, J. (2000). An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon*, 79–84.

- Struck, T. H., Feder J. I., Bendiksby M., Birkeland S., Cerca J., Gusarov V. I., Kistenich S., Larsson K.-H., Liow L. H., Nowak M. D., Stedje B., Bachmann L. & Dimitrov D. (2018). Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. *Trends in Ecology & Evolution*, 33, 153–163.
- Suda, J. (2011). Průtoková cytometrie a její využití v botanice. In Mandák B., Krahulec F., & Hroudová Z. (eds.), *Zprávy České botanické společnosti*, 25, 21–42.
- Swofford, D. L. (1998). *Phylogenetic analysis using parsimony*.
- Te Beest, M., Le Roux, J. J., Richardson, D. M., Brysting, A. K., Suda, J., Kubešová, M., & Pyšek, P. (2012). The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of botany*, 109, 19–45.
- Telford, A., O’Hare, M. T., Cavers, S., & Holmes, N. (2011). Can genetic bar-coding be used to identify aquatic *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC) A. Gray? A test using some species from the British Isles. *Aquatic Botany*, 95, 65–70.
- Turała K. (1969). Cyto-taxonomical studies in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray from Poland. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 12, 9–20.
- Turała K., & Wołek J. (1971). A natural tetraploid hybrid of *Ranunculus* subgenus *Batrachium* from the Nowy Targ Basin (Poland). *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 14, 153–157.
- Wang, Y. H., Chen, J. M., Xu, C., Liu, X., Wang, Q. F., & Motley, T. J. (2010). Population genetic structure of an aquatic herb *Batrachium bungei* (*Ranunculaceae*) in the Hengduan Mountains of China. *Aquatic Botany*, 923, 221–225.
- Watson, J. V. (2004). *Introduction to flow cytometry*. Cambridge University Press.
- Webster, S. D. (1988). *Ranunculus penicillatus* (Dumort.) Bab. in Great Britain and Ireland. *Watsonia*, 17, 1–22.
- 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.
- Wiegleb, G. (1988). Notes on Japanese *Ranunculus* subgenus *Batrachium*. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 39, 117–132.

- 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
- Wiegleb, G., Bobrov, A. A., & Zalewska-Gałosz, J. (2017). A taxonomic account of *Ranunculus* section *Batrachium* (*Ranunculaceae*). *Phytotaxa*, 319, 1–55.
- Wissemann, V. (2007). Plant evolution by means of hybridization. *Systematics and Biodiversity*, 5, 243–253.
- Witt, J. D., Threlloff, D. L., & Hebert, P. D. (2006). DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular ecology*, 15, 3073–3082.
- Wolf, J. B., Oakey, R. J., & Feil, R. (2014). Imprinted gene expression in hybrids: perturbed mechanisms and evolutionary implications. *Heredity*, 113, 167–175.
- 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.

## 8. Přílohy

### Příloha 1 – Souhrnná tabulka

Iniciály sběratelů: JH = J. Hanzlíčková, JL = J. Lepš, JP = J. Prančl, JR = J. Rydlo, KK = K. Kabátová, MH = M. Hrdinová, MKo = M. Kotilínek, MK = M. Křístková, ML = M. Lepší, MŠ = M. Štech, OL = O. Lepšová, PE = P. Englmaier, PK = P. Koutecký, PKú = P. Kúr, PT = P. Trávníček, TH = T. Hauer, VR = V. Rybka, ZK = Z. Kaplan.

N = celkový počet rostlin, poměr k Bellis = poměr fluorescence vzorku ke standardu zprůměrovaný pro danou populaci, Ploidie FCM = stupeň ploidie podle absolutního obsahu DNA, GS = průměrná velikost genomu [pg], Morfo = počet rostlin z populace užitý na morfometrické analýzy. Šedě vyznačená data byla již publikována ve článku Prančl et al., 2018.

Populace	Taxon	Stát	Lokalita	Stanoviště	Rok	Sbíral	N	poměr k Bellis	Ploidie FCM	GPS N	GPS E	GS	Morfo
B13-029	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Hradec Králové, Na Plachtě, tůň cca 350 m ZSZ od SZ břehu rybníka Češík	tůň	2013	JP a MK	17	3,808	6x	50°11'21.6"	15°51'28.9"	12,871	6
B13-039	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Boršov, rybníček u silnice ZSZ obce	rybníček	2013	JP a ZK	16	3,873	6x	49°44'47.5"	16°35'41.1"	13,091	9
B14-015	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Vracov, tůň v periodickém vodním příkopu v lesním komplexu Seče	příkop, stojatá voda	2014	JP	7	3,799	6x	48°58'17.7"	17°10'23.3"	12,841	6
B13-031	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Hradec Králové, Na Plachtě, tůň cca 400 m ZSZ od SZ břehu rybníka Češík	tůň	2013	JP a MK	15	3,770	6x	50°11'21.6"	15°51'28.9"	12,743	8
B11-005	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Loučeň, r. Lutovnik	rybníček se zbytkem vody po prasknutí hráze	2011	JP	14	3,867	6x	50°17'34.6"	15°0'9.0"	13,070	1
B13-034	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Hradec Králové, Na Plachtě, velká kaluž cca 390 m SV-VSV od SV břehu rybníka Plachta	hlubší kaluž	2013	JP a MK	7	3,813	6x	50°11'21.6"	15°51'28.9"	12,888	1
K13-19	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Choryně, PR Choryňský mokřad, asi 2,5 km S od obce	tůň	2013	PK	4	3,930	6x	49°31'03"	17°54'25"	13,283	4
K14-15	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Lanzhot: Soutok, Dědova pískovna (Dědova louka), asi 10,1 km J od kostela	zatopená pískovna	2014	PK a ZK	8	3,918	6x	48°37'59"	16°57'34"	13,243	2
K17-15	<i>R. aquatilis</i>	AT	Marchegg: potok Mühlbach (původní dolní tok Weidenbachu), západně od centra obce Marchegg, u mostu silnice B49	potok	2017	PK a PE	3	3,926	6x	48°16'39"	16°53'44"	13,270	1
K17-49	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Nové Hrady (distr. Ústí nad Orlicí): jezírko pod pramenem Kapalice, asi 1,5 km JZ od kostela v obci	jezírko	2017	ML	5	4,014	6x	49°50'45"	16°07'21"	13,567	4
K18-35	<i>R. aquatilis</i>	ČR	Blansko: řeka Svitava, proudný úsek pod jezem V od želeniční stanice	proudící řeka	2018	PK	5	3,986	6x	49°21'07"	16°38'59"	13,473	5
SK07	<i>R. aquatilis</i>	SE	region Kalmar, Öland; Vickleby: jezírko na vápencové plošině (alvar) asi 7 km JV od obce	tůň na alvaru	2017	JH, JP a PK	3	3,909	6x	56°31'38.1"	16°31'18.3"	13,212	0
SK08	<i>R. aquatilis</i>	SE	region Kalmar, Öland; Skogsby: jezírko asi 1,8 km VJV od obce	malá pískovna	2017	JH, JP a PK	1	3,948	6x	56°37'24.7"	16°32'28.9"	13,344	0
IT44	<i>R. aquatilis</i>	IT	Fucecchio: Lago delle Docce	rybník s lekníny	2018	JH, PK a ZK	5	3,908	6x	43°47'53.2"	10°45'45.8"	13,209	0

IT45	<i>R. aquatilis</i>	IT	San Piero a Sieve: rybník 300 m JV od kláštera Bosco ai Frati	rybník	2018	JH, PK a ZK	5	<b>3,901</b>	6x	43°59'03.7"	11°18'23.8"	<b>13,185</b>	0
K15-10	<i>R. aquatilis</i> × <i>R. peltatus</i>	ČR	Pustějov, tůň v nivě Odry, asi 1,9 km JV od kostela	tůň	2015	PK	3	<b>2,930</b>	5x	49°14'05"	18°01'17"	<b>9,903</b>	1
B14-073	<i>R. baudotii</i>	ČR	Buškovice, sádkové rybníčky na Doláneckém potoce u Rybnického mlýna	sádky na kaolinovém podkladu	2014	ZK, KK a JR	14	<b>2,596</b>	4x	50°13'41.0"	13°20'43.5"	<b>8,774</b>	3
B14-090	<i>R. baudotii</i>	ČR	Buškovice, zatopený kaolinový lom Velký Olpram, Z břeh	zatopený kaolinový lom	2014	JP	12	<b>2,573</b>	4x	50°13'17.6"	13°22'44.4"	<b>8,697</b>	5
B14-091	<i>R. baudotii</i>	ČR	Buškovice, zatopený kaolinový lom cca 1,0 km JJZ od kostela v obci	nedávno zatopený kaolinový lom	2014	JP	10	<b>2,600</b>	4x	50°13'6.8"	13°22'8.6"	<b>8,788</b>	7
B14-083	<i>R. baudotii</i>	ČR	Sedlec u Radonic, vodní nádrž Sedlec	mírně eutrofní nádrž	2014	JP	10	<b>2,586</b>	4x	50°16'12.7"	13°14'41.4"	<b>8,741</b>	8
B14-089	<i>R. baudotii</i>	ČR	Podbořany, zatopený kaolinový lom Malý Olpram	zatopený kaolinový lom	2014	JP	1	<b>2,561</b>	4x	50°13'7.1"	13°23'20.7"	<b>8,656</b>	1
K14-25	<i>R. baudotii</i>	ČR	Jevišovice: poloprázny rybníček asi 0,45 km JJZ od kostela	rybník (mělký, bahnitý)	2014	PK	16	<b>2,568</b>	4x	48°49'53"	16°09'14"	<b>8,680</b>	2
B14-071	<i>R. baudotii</i>	ČR	Nepomyšl, Nepomyšlský rybník J obce	rybník	2014	JR	1	<b>1,666</b>	2x	50°12'41"	13°18'48"	<b>5,631</b>	1
B15-004	<i>R. baudotii</i>	ČR	Ostrožská Nová Ves (okr. Uherské Hradiště), J okraj severovýchodní pískovny u obce, cca 1,1 km SZ od železniční stanice	zatopená pískovna	2015	JP	10	<b>2,566</b>	4x	49°0'59.4"	17°25'31.7"	<b>8,673</b>	2
SK04	<i>R. baudotii</i>	SE	region Skåne; Valje: V břeh mořského zálivu asi 1 km JJV od obce	mořský záliv	2017	JH, JP a PK	2	<b>2,612</b>	4x	56°03'24.5"	14°32'58.5"	<b>8,829</b>	0
SK09	<i>R. baudotii</i>	SE	region Östergötland; Valdemarsvik: mořský záliv u samoty Engelholm, asi 13 km SV od obce	mořský záliv	2017	JH, JP a PK	2	<b>2,614</b>	4x	58°17'02.5"	016°46'03.0"	<b>8,835</b>	0
IT04	<i>R. baudotii</i>	IT	Castel Volturno: Oasi dei Variconi: mokřady u ústí řeky Volturno	kanál v přímořské bažině	2018;	JH, JP a PK	2	<b>2,604</b>	4x	41°01'23.9"	13°56'00.2"	<b>8,802</b>	0
IT17	<i>R. baudotii</i>	IT	Sicílie, Gela, bažiny u továrny	kanál ústící do bažiny	2018	JH, JP a PK	5	<b>2,602</b>	4x	37°03'37.4"	14°16'51.0"	<b>8,795</b>	0
B16-007	<i>R. circinatus</i>	ČR	Lázně Bohdaneč, mělké laguny při V břehu Bohdanečského rybníka (2 roky po odbahnění)	mělké laguny při březích rybníka	2016	JH a JP	2	<b>1,693</b>	2x	50°05'42"	15°41'13"	<b>5,722</b>	0
B16-040	<i>R. fluitans</i>	ČR	Pohledští Dvořáci, řeka Sázava ca 1,1 km JV železniční zastávky	proudící řeka	2016	KŠ	2	<b>1,151</b>	2x	49°36'22"	15°37'41"	<b>3,890</b>	0
N11	<i>R. fluitans</i>	DE	Bavaria, Hebertshausen, řeka Amper pod ústím říčky Wurm	proudící řeka	2018	JH a JP	8	<b>1,126</b>	2x	48°17'7.0"	11°28'32.2"	<b>3,806</b>	0
N15	<i>R. fluitans</i>	DE	Bavaria, Inningen, řeka Wertach nad mostem u Z okraje obce	proudící řeka	2018	JH a JP	5	<b>1,142</b>	2x	48°18'51.7"	10°50'50.2"	<b>3,860</b>	0
N7	<i>R. fluitans</i>	DE	Bavaria, Plattling, řeka Isar u železničního mostu	vodnatá rychle tekoucí řeka	2018	JH a JP	5	<b>1,124</b>	2x	48°46'20.3"	12°53'8.1"	<b>3,799</b>	0
N9	<i>R. fluitans</i>	DE	Bavaria, Seining, potok Gaißa cca 750 m SSV od S okraje vsi	mělký kamenitý potok	2018	JH a JP	5	<b>1,144</b>	2x	48°40'9.2"	13°19'57.9"	<b>3,867</b>	0
B16-015	<i>R. peltatus</i>	ČR	Hvoždany, Leletice, Raputovský rybník 700 m S od návsi	rybník	2016	JP a ZK	4	<b>2,033</b>	4x	49°31'55"	13°50'33"	<b>6,872</b>	0
B16-006	<i>R. peltatus</i>	ČR	Lázně Bohdaneč, mělké laguny při břehu Bohdanečského rybníka (2 roky po odbahnění)	rybník	2016	JH a JP	4	<b>2,033</b>	4x	49°31'55"	13°50'33"	<b>6,872</b>	0
B17-009	<i>R. peltatus</i>	ČR	Hamr: rybník Vizír ca 2.1 km SV od železniční stanice Majdalena	rybník	2017	JH	1	<b>2,028</b>	4x	48°57'49.8"	14°53'22.0"	<b>6,855</b>	0

<b>N21</b>	<i>R. peltatus</i>	DE	Baden-Württemberg, Titisee, obnažené pobřeží jezera Titisee v kempu Weierhof, poblíž ústí potoka Seebach do jezera	obnažené pobřeží jezera	2018	JH a JP	5	<b>2,031</b>	4x	47°53'15.0"	8°8'6.2"	<b>6,865</b>	0
<b>K13–23a</b>	<i>R. peltatus</i>	ČR	Vlkov, Vlkovská pískovna	zatopená pískovna	2013	PK	3	<b>2,034</b>	4x	49°09'43"	14°42'55"	<b>6,875</b>	0
<b>B16–015–01</b>	<i>R. peltatus</i> × <i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Hvoždany, Leletice, Raputovský rybník 700 m S od návsi	rybník	2016	JP a ZK	4	<b>2,093</b>	4x	49°31'55"	13°50'33"E	<b>7,074</b>	0
<b>B16–016</b>	<i>R. peltatus</i> × <i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Hvoždany, Leletice, Raputovský rybník 700 m S od návsi	rybník	2016	JP a ZK	4	<b>2,343</b>	4x	49°31'55"	13°50'33"E	<b>7,919</b>	0
<b>B14–016</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Milotice, Milotický rybník v PR Písečný rybník SV obce	čistý rybník	2014	JP	10	<b>1,591</b>	2x	48°57'48.7"	17°8'59.7"	<b>5,378</b>	8
<b>B13–019</b>	<i>R. rionii</i>	SR	Komoča, osada Pačerok, vodní plocha při S okraji osady	rybník? tůň? byly povodně	2013	JP a MH	17	<b>1,601</b>	2x	47°56'9.9"	18°1'21.4"	<b>5,411</b>	11
<b>B13–008</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Hostivice, PP Hostivické rybníky, v JV části rybníka Kala	rybník	2013	JP	25	<b>1,575</b>	2x	50°4'12.5"	14°15'20.3"	<b>5,324</b>	10
<b>K14–11</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Moravský Písek: mělká umělá tůňka v lokalitě Vypálenky, asi 2,0 km JJZ od kostela	umělá tůň	2014	PK	3	<b>1,590</b>	2x	48°58'24"	17°19'28"	<b>5,374</b>	6
<b>K14–10</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Bzenec: tůň v S části lokality Vlčí hrdlo, asi 3,5 km JV od kostela	tůň	2014	PK	2	<b>1,550</b>	2x	48°57'19"	17°18'29"	<b>5,239</b>	3
<b>K14–17</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Lanžhot: Soutok, Dědova pískovna (Dědova louka), asi 10,1 km J od kostela	pískovna	2014	PK a ZK	2	<b>1,650</b>	2x	48°42'30"	16°55'23"	<b>5,577</b>	1
<b>K11–14</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Radějov, přítoková část nádrže Lučina	rekreační nádrž	2011	MŠ	20	<b>1,593</b>	2x	48°51'47"	17°23'42"	<b>5,384</b>	2
<b>K14–21</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Lenešice: malý rybník S od silnice Lenešice–Břvany, asi 1,9 km SV od kostela	rybník	2014	TH	2	<b>1,571</b>	2x	50°23'22"	13°44'33"	<b>5,310</b>	1
<b>K17–18</b>	<i>R. rionii</i>	AT	Tadten: groundwater channel Herrschaftsgraben", SSE of the village	kanál	2017	PK a PE	2	<b>1,581</b>	2x	47°42'48"	17°02'12"	<b>5,344</b>	2
<b>K17–44</b>	<i>R. rionii</i>	SR	Komárno (okr. Komárno): vysychající mrtvé rameno na pravém břehu Váhu 0,5 km S od městské části Nová Osada na S okraji města	mrtvé rameno řeky	2017	ZK	6	<b>1,620</b>	2x	47°47'52"	18°06'04"	<b>5,476</b>	1
<b>K17–12</b>	<i>R. rionii</i>	AT	Markthof an der March: ancient stretch of river Morava named Lüßsarm at the bridge of the cyclists route between Schlosshof and Devinska Nova Ves	slepé rameno	2017	PK a PE	7	<b>1,604</b>	2x	48°12'42"	16°57'38"	<b>5,422</b>	6
<b>K14–26</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Vrbovec: Vrbovecký rybník, asi 2,8 km VJV od kostela, u hráze	rybník	2014	PK	1	<b>1,583</b>	2x	48°47'30"	16°08'18"	<b>5,351</b>	1
<b>K12–06</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Sedlec, Dolní Mušlovský ryb., SZ od obce	rybník	2012	MŠ a PKú	20	<b>1,601</b>	2x	48°47'41"	16°41'03"	<b>5,411</b>	9
<b>B14–084</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Podbořany–Mory (okr. Louny), severní ze dvou rybníků cca 550 m JJZ od kostela v obci	rybník	2014	KK a JR	4	<b>1,576</b>	2x	50°16'31.6"	13°24'29.9"	<b>5,327</b>	4
<b>B12–012b</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Žehrov, Dolní rybník v soustavě rybníků Z obce	rybník	2012	JP a PT	7	<b>1,556</b>	2x	50°32'0.6"	15°5'15.7"	<b>5,259</b>	3
<b>B13–013</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Kněžičky, rybníček v oboře Kněžičky cca 700 m SSZ od hotelu v oboře	zarostlý rybníček	2013	JP	8	<b>2,909</b>	4x	50°09'12.6"	15°20'07.2"	<b>9,832</b>	1
<b>B16–003</b>	<i>R. rionii</i>	ČR	Jičíněves, rybník u fotbalového hřiště v obci, cca 280 m JJZ od zámku	mělký rybník	2016	JP a JH	5	<b>1,600</b>	2x	50°22'15"	15°20'23"	<b>5,408</b>	0
<b>N19</b>	<i>R. rionii</i>	DE	Baden-Württemberg, Markelfingen, obnažené pobřeží jezera Bodensee u mola při ústí potoka	obnažený písčité břeh jezera, eutrofní	2018	JP a JH	5	<b>1,579</b>	2x	47°44'15.4"	9°0'8.3"	<b>5,337</b>	0

## Mühlbach

<b>IT41</b>	<i>R. rionii</i>	IT	Magione: Lago Trasimeno, S. Arcangelo, bahnitá postupně vysychající tůň asi 200 m od břehu jezera	bahnitá vysychající tůň	2018	JH, JP a PK	5	<b>1,590</b>	2x	43°05'27.4"	12°11'09.7"	<b>5,374</b>	0
<b>B16-004-05</b>	<i>R. rionii</i> × <i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Kovač, rybník Strašidlo cca 1,15 km Z-ZSZ od železniční zastávky	lesní rybníček	2016	JP a JH	1	<b>2,140</b>	3x	50°23'41.8"	15°27'15.2"	<b>7,233</b>	0
<b>B14-032</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Bukovany, Kachní rybník cca 650 m JV od autobusové zastávky v obci	rybník	2014	JP	14	<b>2,705</b>	4x	50°42'40.0"	14°35'4.4"	<b>9,143</b>	9
<b>B14-034</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Volfartice, Černý rybník cca 1,7 km Z od tvrze v obci	rybník, mezo- až eutrofní	2014	JP	15	<b>2,641</b>	4x	50°43'53.0"	14°25'29.5"	<b>8,927</b>	8
<b>B14-035</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Krásná Lípa, rybníček na S okraji města, cca 540 m SV od železniční stanice	čistý rybníček	2014	JP	20	<b>2,641</b>	4x	50°55'17.5"	14°31'8.7"	<b>8,927</b>	7
<b>B14-054</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Bezděkov, bezejmenný rybníček cca 900 m ZJZ od kostela v obci	zarostlý rybníček	2014	JP	10	<b>2,641</b>	4x	49°24'49.2"	13°43'43.9"	<b>8,927</b>	4
<b>B12-012a</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Žehrov, Dolní rybník v soustavě rybníků Z obce	rybník	2012	JP a PT	5	<b>2,576</b>	4x	50°32'0.6"	15°5'15.7"	<b>8,707</b>	2
<b>B16-017</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Hvoždňany, Leletice, Raputovský rybník 700 m S od návsi	rybník	2016	JP a ZK	1	<b>2,645</b>	4x	49°31'55"	13°50'33"	<b>8,940</b>	0
<b>K13-10</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Krnov, osada Chomýž ZSZ od města, rybník Rusák J od osady	rybník	2013	PK	10	<b>2,679</b>	4x	50°06'29"	17°38'45"	<b>9,055</b>	1
<b>K11-11</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Čakovec, Podvesný rybník, asi 400 m SSV od obce	rybník	2011	PK	16	<b>2,683</b>	4x	48°58'20"	14°19'22"	<b>9,069</b>	4
<b>K11-13</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Branišov, Návesný ryb., S od obce	rybník	2011	PK	20	<b>2,666</b>	4x	48°59'16"	14°23'48"	<b>9,011</b>	1
<b>K11-06</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Telč, malý ryb. na okraji lesa V od S zátoky Roštejnského ryb., SZ od města	rybník	2011	LE	5	<b>2,646</b>	4x	49°12'00"	15°26'52"	<b>8,943</b>	2
<b>K11-25</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Běstvína, ryb. Hlubošský	rybník	2011	PK	15	<b>2,674</b>	4x	49°49'59"	15°35'02"	<b>9,038</b>	3
<b>K11-22</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Záboří, rybník Hůrka, 1,7 km JV od kostela v obci	rybník	2011	PK	10	<b>2,671</b>	4x	49°22'21"	13°50'45"	<b>9,028</b>	4
<b>B18-012</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Dolní Podluží (okr. Děčín), rybník na pravém břehu Lesenského potoka pod Lesenskou přehradou	rybník	2018	JH a ZK	4	<b>2,674</b>	4x	50°52'22.8"	14°35'12.9"	<b>9,038</b>	1
<b>K13-11</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Andělská Hora, rybník-koupaliště na SZ okraji obce	rybník	2013	PK	10	<b>2,661</b>	4x	50°03'51"	17°23'38"	<b>8,994</b>	10
<b>K15-27</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	České Budějovice: Velký Vávrovský rybník, na S okraji města	rybník	2015	PK	5	<b>2,677</b>	4x	48°59'35"	14°26'16"	<b>9,048</b>	5
<b>K15-20</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Klatovy; Hradešice: rybník Strašný, ca 1.6 km ZJZ od kostela	rybník	2015	PK	5	<b>2,680</b>	4x	49°19'02"	13°34'33"	<b>9,058</b>	4
<b>K17-21</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	AT	Neuberg an der Mürz: ústí řeky Mürz v nádrži vodní elektrárny Krampen u silničního mostu Riesbrücke	ústí řeky do jezera	2017	PK a PE	5	<b>2,668</b>	4x	47°40'22"	15°33'34.7"	<b>9,018</b>	3
<b>K16-18</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	České Budějovice; Strýčice: rybník ca 0.9 km JZ od kostela	rybník	2016	PK	1	<b>2,621</b>	4x	49°02'27"	14°15'21"	<b>8,859</b>	1
<b>K13-24</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Vlkov, Vlkovská pískovna	zatopená pískovna	2013	PK	6	<b>2,629</b>	4x	49°09'43"	14°42'55"	<b>8,886</b>	5
<b>K12-04</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Hamr, rybník Hluboký u Hamru, SV od obce	rybník, po letnění	2012	PK	15	<b>2,668</b>	4x	49°09'34"	14°46'21"	<b>9,018</b>	5
<b>K12-23</b>	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Volary, Volarský potok, v asi 500 m úseku Z od siln. mostu u osady Planerův Dvůr	potok, hlavně rychlý proud na náplavech	2012	PK	20	<b>2,658</b>	4x	48°53'24"	13°53'35"	<b>8,984</b>	8

K12-18	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Město Albrechtice, sev. ze dvou rybníků u silnice do Třemešné, S od města	rybník	2012	PK	4	2,654	4x	50°10'46"	17°34'53"	8,971	1
B16-004	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Kovač, rybník Strašidlo cca 1,15 km Z-ZSZ od železniční zastávky	lesní rybníček	2016	JP a JH	4	2,632	4x	50°23'41.8"	15°27'15.2"	8,896	0
B16-008	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Lázně Bohdaneč, mělké laguny při V břehu Bohdanečského rybníka (2 roky po odbahnění)	mělké laguny při březích rybníka	2016	JP a JH	3	2,649	4x	50°5'42"	15°41'13"	8,954	0
B16-030	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Nepomuk, Písařovský rybník cca 2,2 km Z od náměstí Augustina Němejce	rybník	2016	JP, ZK a JH	1	2,658	4x	49°29'14"	13°33'3"	8,984	0
B16-024	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Kvášňovice, Jámský rybník cca 750 m JV od kostela v obci	rybník	2016	JP, ZK a JH	3	2,667	4x	49°24'27"	13°39'4"	9,014	0
B16-026	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Pačejov, Pačejov-nádraží, SZ cíp rybníka Buxín, cca 380 m SSV od nádraží	rybník	2016	JP, ZK a JH	1	2,681	4x	49°23'41"	13°38'18"	9,062	0
B16-032	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Chanovice, Újezd u Chanovic, rybník Prostřední Újezd cca 900 m JZ od kaple v Újezdu	rybník	2016	JP, ZK a JH	1	2,686	4x	49°23'42"	13°41'26"	9,079	0
B16-034	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Chanovice, Újezd u Chanovic, rybník Hladoměř cca 890 m JZ(-ZJZ) od kaple v Újezdu	rybník	2016	JP, ZK, JH a VR	1	2,664	4x	49°23'49"	13°41'19"	9,004	0
B16-028	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Pačejov, JV okraje rybníka Velký Blýskota, 1,18 km SSV od kostela Panny Marie Sněžné v obci	rybník	2016	JP, ZK a JH	5	2,693	4x	49°22'54"	13°38'9"	9,102	0
B16-029	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Velký Bor, rybník Benátka cca 1,5 km SZ od kostela sv. Jana Křtitele v obci	rybník	2016	JP, ZK a JH	1	2,678	4x	49°22'7"	13°41'4"	9,052	0
B17-008	<i>R. trichophyllus</i> A	ČR	Rodvínov: Davidův fishpond ca 2.4 km ESE of railway station	rybník	2017	JH	1	2,655	4x	49°9'27.8"	15°4'57.1"	8,974	0
K16-16	<i>R. trichophyllus</i> A × <i>R. peltatus</i>	ČR	Křemže: Křemžský potok, asi 400 m JV od kostela v centru obce, u lávky se žlutou turistickou značkou	větší potok, klidný úsek	2016	PK	7	2,343	4x	48°54'08"	14°18'30"	7,919	4
B14-017	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Milotice, Milotický rybník v PR Písečný rybník SV obce	čistý rybník	2014	JP	10	2,920	4x	48°57'48.7"	17°8'59.7"	9,870	8
B13-013	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Kněžičky, rybníček v oboře Kněžičky cca 700 m SSZ od hotelu v oboře	zarostlý rybníček	2013	JP	8	2,909	4x	50°09'12.6"	15°20'07.2"	9,832	5
B13-009	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Klipec, umělá tůň v NPP V Jezírkách, cca 1,15 km Z od SZ okraje obce	tůň	2013	JP	21	2,933	4x	50°04'58.0"	15°06'44.7"	9,914	9
B13-056	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Litoměřice-Pokratice, rybníček u Štampova mlýna cca 300 m S od S okraje Pokratic	rybník	2013	JP	23	2,925	4x	50°33'18.5"	14°7'44.2"	9,887	7
B14-011	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Holasice, tůň Ludmila cca 1,1 km J od náměstí Rudé armády	obnovená tůň	2014	JP	7	2,959	4x	49°41'6"	16°36'23.9"	10,001	2
K14-39	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Radomyšl: rybník nad koupalištěm, asi 1,3 km J od kostela v centru obce	rybník	2014	PK	10	2,934	4x	49°18'20"	13°55'47"	9,917	1
K15-21	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Pracejovice, osada Makarov: rybník / koupaliště JV od osady	rybník / koupaliště	2015	PK	5	2,959	4x	49°14'33"	13°48'43"	10,001	4
K15-15	<i>R. trichophyllus</i> B	AT	Oberösterreich, Innviertel; Mattighofen: potok Kühbach v obci	zastružený potok	2015	PK a JP	5	2,901	4x	48°06'11"	13°08'53"	9,805	3
N12	<i>R. trichophyllus</i> B	DE	Bavaria, Mittenwald, náhon Mühlbach spojující potok Leutascher Ache a řeku Isar, podél ulice Am Köberl	rychle tekoucí náhon, studená vápnitá voda	2018	JH a JP	5	2,945	4x	48°17'7.0"	11°28'32.2"	9,954	5
N13	<i>R. trichophyllus</i> B	DE	Bavaria, Mittenwald, potok Lainbach poblíž Z vyústění ulice Am Fischweiher	malý zastružený potok	2018	JH a JP	5	2,944	4x	47°27'11.1"	11°16'15.7"	9,951	5

<b>N14</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	DE	Bavaria, Untergrainau, potok Krepbach u mostku cca 630 m VSV od hlavní křižovatky v obci	proudící potok s vápnitou vodou	2018	JH a JP	5	<b>2,913</b>	4x	47°28'47.9"	11°1'51.7"	<b>9,846</b>	4
<b>N15</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	DE	Bavaria, Inningen, řeka Wertach nad mostem u Z okraje obce	proudící řeka	2018	JH a JP	5	<b>2,939</b>	4x	48°18'51.7"	10°50'50.2"	<b>9,934</b>	5
<b>K17-14</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	AT	Marchegg: potok Mühlbach (původní dolní tok Weidenbachu), západně od centra obce Marchegg, u mostu silnice B49	potok	2017	PK a PE	6	<b>2,980</b>	4x	48°16'39"	16°53'44"	<b>10,072</b>	6
<b>K17-16</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	AT	Tadten: podzemní vodní kanál JJV od obce	kanál	2017	PK a PE	3	<b>2,981</b>	4x	47°43'29"	17°00'51"	<b>10,076</b>	4
<b>K17-17</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	AT	Tadten: podzemní vodní kanál Herrschaftsgraben, JJV od obce	kanál	2017	PK a PE	3	<b>2,945</b>	4x	47°42'48"	17°02'12"	<b>9,954</b>	3
<b>K17-22</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	AT	St. Aegydt am Neuwalde: boční rameno regulované řeky Unrecht–Traisen uvnitř obce	rameno řeky	2017	PK a PE	3	<b>2,903</b>	4x	47°51'10.5"	15°33'31.8"	<b>9,812</b>	3
<b>K17-27</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	AT	Außerhalbach: údolí řeky Halbach, Engelschärmühle, JV od obce, proti proudu kanálu malé vodní elektrárny	kanál	2017	PK a PE	3	<b>2,931</b>	4x	48°00'48.3"	15°43'59.3"	<b>9,907</b>	4
<b>K17-28</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	AT	St. Veit an der Gölsen: kanál vodní elektrárny východně od středu vesnice	kanál	2017	PK a PE	5	<b>2,926</b>	4x	48°02'37.3"	15°41'03.7"	<b>9,890</b>	5
<b>K17-57</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	AT	Schwarzau im Gebirge: kanál k vodní elektrárně řeky Schwarzau u obce, u ústí malého potoka Schottererbach	kanál	2017	PE	2	<b>2,903</b>	4x	47°48'18.8"	15°42'27.9"	<b>9,812</b>	1
<b>K17-58</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	AT	Rohr im Gebirge: Krumbach, blízko vesnice, proti proudu kanálu malé vodní elektrárny	kanál	2017	PE	2	<b>2,984</b>	4x	47°52'54.3"	15°42'33.7"	<b>10,086</b>	1
<b>K17-45</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	SR	Komárno (okr. Komárno): vysychající mrtvé rameno na pravém břehu Váhu 0,5 km S od městské části Nová Osada na S okraji města	mrtvé rameno	2017	ZK	1	<b>2,978</b>	4x	47°47'52"	18°06'04"	<b>10,066</b>	1
<b>K17-10</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Klipec, umělá tůň v NPP V Jezírkách, cca 1,15 km Z od SZ okraje obce	tůň	2013	JP	1	<b>2,986</b>	4x	50°04'58.0"	15°06'44.7"	<b>10,093</b>	1
<b>K17-06</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Lysá nad Labem (distr. Nymburk): umělá tůň v JZ cípu Hrabanovské černavy, asi 1,5 km SSZ od kostela v obci	tůň	2017	TH	2	<b>2,963</b>	4x	50°12'48.8"	14°49'43.6"	<b>10,015</b>	1
<b>K16-15</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	DE	Bavorsko, Ruhpolding: jezero Förchensee, asi 6,5 km JJZ od středu obce	horské jezero (740 m)	2016	MKo	1	<b>2,912</b>	4x	47°42'29"	12°37'11"	<b>9,843</b>	1
<b>N17</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	DE	Bavaria, Au, potok Taufachbach na J okraji obce	pomalou tekoucí potůček	2018	JH a JP	5	<b>2,942</b>	4x	47°27'34.5"	10°16'57.9"	<b>9,944</b>	5
<b>N18</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	DE	Bavaria, Altstädten, potok Fishbach u mostu ulice Zur Mühle	menší studený potok	2018	JH a JP	5	<b>2,941</b>	4x	47°29'3.1"	10°16'43.2"	<b>9,941</b>	5
<b>B16-001</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	ČR	Radovesnice II, bahnitá strouha v lese J od PR Dománovický les, 420 m JJZ od hájovny Píska	vysychající strouha	2016	JP a JH	5	<b>2,961</b>	4x	50°06'18"	15°20'37"	<b>10,008</b>	0
<b>SK08</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	SE	region Kalmar, Óland; Skogsby: na vlhkém bahně v obnoveném mokřadu 1,9 km VJV od obce	malá pískovna + terestricky na břehu sousední pískovny	2017	JH, JP a PK	2	<b>2,956</b>	4x	56°37'26.5"	016°32'28.4"	<b>9,991</b>	0
<b>IT36</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	IT	Capalbio: Lago orientale dei Lagaccioli	rybník	2018	JH, PK a ZK	3	<b>2,933</b>	4x	42°28'39.1"	11°27'35.8"	<b>9,914</b>	0
<b>IT37</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	IT	Rieti: Lago di Ventina, kaluž v louce na břehu jezera	kaluž v louce na břehu jezera	2018	JH, PK a ZK	4	<b>2,937</b>	4x	42°30'34.2"	12°45'20.1"	<b>9,927</b>	0

<b>IT40</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	IT	Corciano–Pigge: Fiume Clitunno	čistá studená řeka	2018	JH, PK a ZK	4	<b>2,880</b>	4x	42°50'57.2"	12°45'00.0"	<b>9,734</b>	0
<b>IT39</b>	<i>R. trichophyllus</i> B	IT	Norcia: Fiume Sordo	podhorský potok, čistý, studený	2018	JH, PK a ZK	5	<b>3,022</b>	4x?	42°47'40.9"	13°04'27.1"	<b>10,214</b>	0
<b>N16</b>	<i>R. trichophyllus</i> B × <i>R. fluitans</i> ?	DE	Bavaria, Pleß, potok Memminger Ach cca 850 m JZ od kostela v obci	proudící velký potok s vápnitou vodou	2018	JH a JP	1	<b>2,048</b>	3x?	48°5'13.7"	10°8'47.5"	<b>6,922</b>	0
<b>K14–41</b>	<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	SI	Julské Alpy, Trenta: Spodnje Kriško jezero, asi 4,1 km SV od obce	vysokohorské jezero (1900 m)	2014	PK	5	<b>2,659</b>	4x	46°23'56"	13°48'07"	<b>8,987</b>	1
<b>K15–34</b>	<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	CH	Zermatt, jezero Schwarzsee, JZ od obce	vysokohorské jezero (2570 m)	2015	OL	1	<b>2,655</b>	4x	45°59'27"	07°42'24"	<b>8,974</b>	1
<b>K15–31</b>	<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	AT	Salzburg, Wald, Riedinstal, jezero Ilgsee asi 7 km Z od obce	vysokohorské jezero (2100 m)	2015	OL	1	<b>2,599</b>	4x	47°11'32"	13°20'50"	<b>8,785</b>	1
<b>K17–51</b>	<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	AT	Totes Gebirge, Tauplitzalm: Steirersee, S coast	horské jezero (1450 m)	2017	LJ a LO	2	<b>2,641</b>	4x	47°35'54"	14°01'57"	<b>8,927</b>	2
<b>K17–82</b>	<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	AT	Totes Gebirge, Wildensee, 9.5 km SSV od kostela ve vesnici Grundlsee	horské jezero (1540 m)	2017	ML	5	<b>2,655</b>	4x	47°42'44"	13°51'14"	<b>8,974</b>	3
<b>K17–81</b>	<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	AT	Totes Gebirge, Henarsee, 8 km SSV od kostela ve vesnici Grundlsee	horské jezero (1700 m)	2017	ML	5	<b>2,630</b>	4x	47°41'42"	13°52'53"	<b>8,889</b>	2
<b>SK11</b>	<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	SE	region Södermanland, Mariefred: Z břeh jezera Södra Kärrlängen, asi 5,5 km SZ od obce	zazemňující se jezero	2017	JH, JP a PK	3	<b>2,675</b>	4x	59°17'24.7"	17°08'28.0"	<b>9,042</b>	0
<b>SK16</b>	<i>R. trichophyllus</i> ssp. <i>eradicatus</i>	FI	provincie Kanta–Häme; Hattula: J břeh jezera Lehijärvi, JZ od obce	písečné okraje jezera	2017	JH, JP a PK	4	<b>2,620</b>	4x	61°01'57.7"	24°19'42.3"	<b>8,856</b>	0

## **Příloha 2 – Protokol extrakce DNA ze sušeného rostlinného materiálu (CTAB metoda)**

### **Příprava vzorků před extrakcí**

- cca 0.5 mg suchého materiálu (ze silikagelu) vložíme do 2 ml eppendorfek (s kulatým dnem) a přidáme 2 wolfram-karbidové kuličky
- vždy 5+5 zkumavek vložíme do plastových držáků mlýnku Retsch Mixer Mill 200 (nebo MM 400), upevníme a utáhneme pojistku, přiklopíme plastový kryt, nastavíme požadovaný čas (např. 2 min) a frekvenci 30 ot./s a zmáčkneme „start“
- po nastaveném čase se mlýnek sám zastaví, zkontrolujeme zkumavky; drcení je hotovo, pokud jsou veškerá listová pletiva rozmělněna na prach, v opačném případě drtíme dalších několik minut, případně přidáme kuličky

### **Vlastní extrakce DNA - CTAB metoda**

- k rozdrčenému materiálu přidáme 700 ml roztoku CTAB (případně s 2% merkaptoethanolem), pracujeme v digestoři
- přidáme 5 ml RNasy A
- zkumavky uzavřeme, krátce promícháme na vortexu a inkubujeme 30 min. na termomixeru při 60 °C a 1,400 rpm
- během prvních minut inkubace přidáme ke každému vzorku PVP
- centrifugujeme (se zavřeným víčkem centrifugy!) 6 min. při 13,200 rpm
- supernatant přepipetujeme do nových eppendorfek
- původní zkumavky ponecháme uzavřené ve stojánku v digestoři (po skončení práce je třeba vyjmout kuličky, očistit a nechat vyklávkovat)
- v digestoři přidáme 500 ml směsi chloroform:isoamylalkohol (24:1)
- dobře uzavřené zkumavky 2-3' převrátíme a necháme cca 5 min stát
- centrifugujeme 6 min. při 13,200 rpm
- supernatant (cca 500 ml) opatrně přepipetujeme do nových popsaných eppendorfek (1.5 ml), je třeba dát pozor, abychom pipetovali jen průhledný supernatant (!), pracujeme stále v digestoři a kontaminované špičky a 2ml eppendorfky vyhazujeme do zvláštní nádoby
- přidáme 500 ml vychlazeného isopropanolu (z mrazáku)
- 1-2 x převrátíme a necháme cca 30 min. stát v -20 °C
- centrifugujeme 3 min. při 13,200 rpm

- supernatant opatrně slijeme do kádinky (v digestoři), na dně eppendorfky lze vidět drobný matně bílý pellet DNA, otevřené eppendorfky převrátíme dnem nahoru na filtrační papír (ubrousek)
- přidáme 400 ml vychlazeného 96% ethanolu (z mrazáku)
- inkubujeme 15 min. na termobloku při 37 °C a 1,200 rpm
- centrifugujeme 3 min. při 13,200 rpm
- supernatant opět opatrně slijeme do kádinky (už nemusíme v digestoři)
- přidáme 200 ml vychlazeného 70% ethanolu (z mrazáku) a necháme cca 5 min. stát
- centrifugujeme 3 min. při 13,200 rpm
- supernatant opět opatrně slijeme do kádinky a eppendorfky necháme cca 10-15 min stát a vyschnout
- cca 1-2 min vysušíme pellet v otevřených eppendorfkách na termobloku při 90 °C, sušení ukončíme ve chvíli, kdy lze pellet poklepem (cvrnknutím) na uzavřenou (!) eppendorfku oddělit od stěny
- vysušený pellet rozpustíme ve 100ml TE pufru
- uzavřené eppendorfky inkubujeme 30 min. na termobloku při 37 °C a 600 rpm
- krátce promícháme na vortexu a krátce zcentrifugujeme
- DNA uchovááme v ledničce nebo dlouhodobě při -20 (-80) °C
- kvalitu DNA otestujeme nanesením 5µl na 0.8% TAE agarosový gel

dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/struktura/laborator-dna/protokoly-a-manualy/izolace-dna/extrakce-dna-ze-suseneho-rostlinneho-materialu-ctab-metoda>

### Příloha 3 – Výsledky ANOVA

**one-way ANOVA: Konfidenční interval 95%, hodnota Pr (>F) = <2e-16\*\*\***

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Taxon	4	1027.3	256.82	6769	<2e-16 ***
Residuals	191	7.2	0.04		

Signif. codes: 0 ‘\*\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*\*’ 0.01 ‘\*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

**Tukey multiple comparisons of means**

	diff	lwr	upr	p adj
R.baudotii–R.aquatilis	–4,5866258	–4,74853585	–4,4247158	0,0000000
R.rionii–R.aquatilis	–8,2206060	–8,36224510	–8,0789668	0,0000000
R.trichophyllus.A–R.aquatilis	–4,3920260	–4,52007977	–4,2639722	0,0000000
R.trichophyllus.B–R.aquatilis	–3,3375311	–3,46201357	–3,2130486	0,0000000
R.rionii–R.baudotii	–3,6339801	–3,78934909	–3,4786112	0,0000000
R.trichophyllus.A–R.baudotii	0,1945998	0,05150674	0,3376929	0,0021977
R.trichophyllus.B–R.baudotii	1,2490948	1,10918850	1,3890010	0,0000000
R.trichophyllus.A–R.rionii	3,8285800	3,70890363	3,9482563	0,0000000
R.trichophyllus.B–R.rionii	4,8830749	4,76722779	4,9989220	0,0000000
R.trichophyllus.B– R.trichophyllus.A	1,0544949	0,95571904	1,1532708	0,0000000

**one-way ANOVA: Konfidenční interval 95%, hodnota Pr (>F) = <2e–16\*\*\***

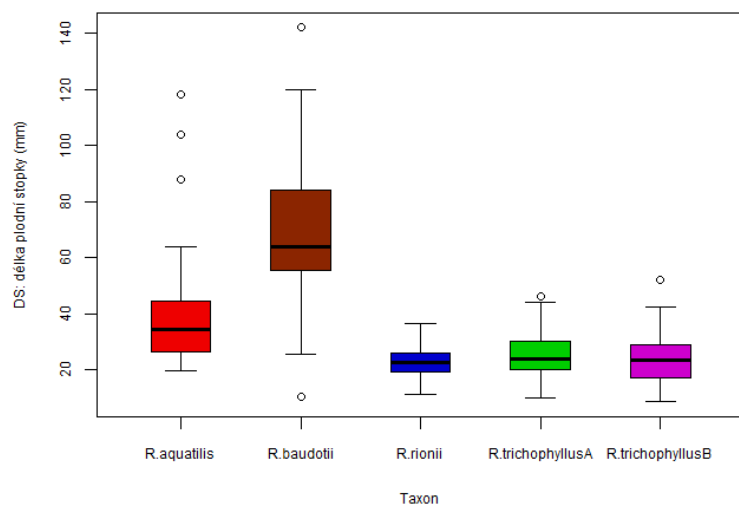
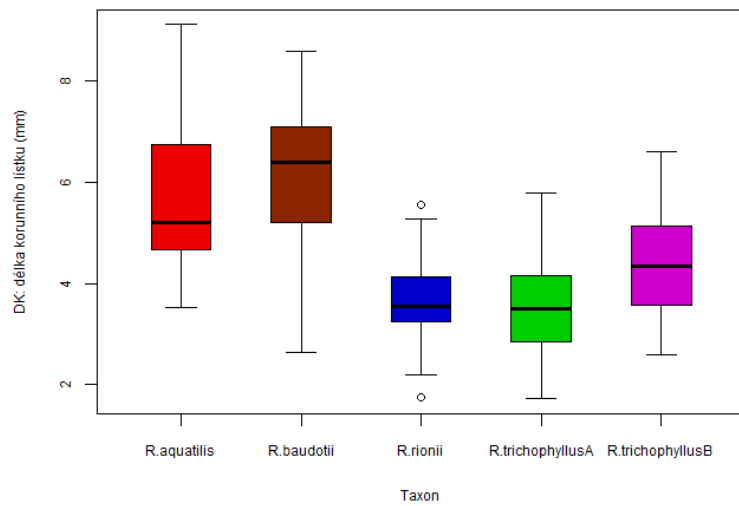
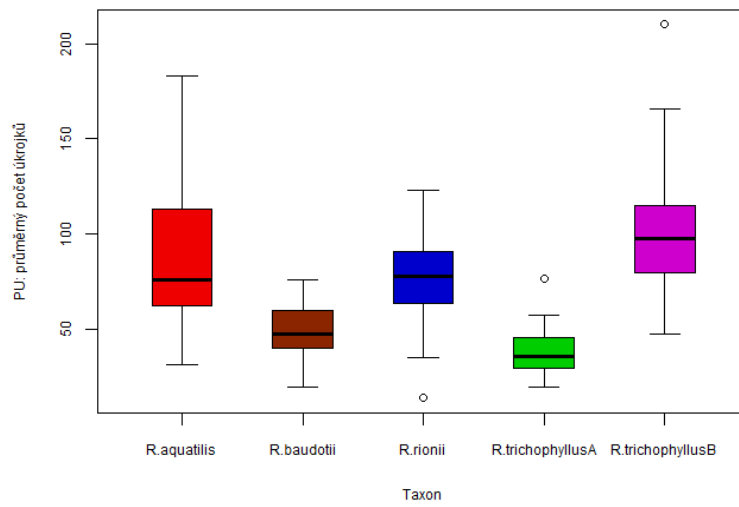
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Taxon	5	19.932	3.986	153.6	<2e–16 ***
Residuals	68	1.765	0.026		

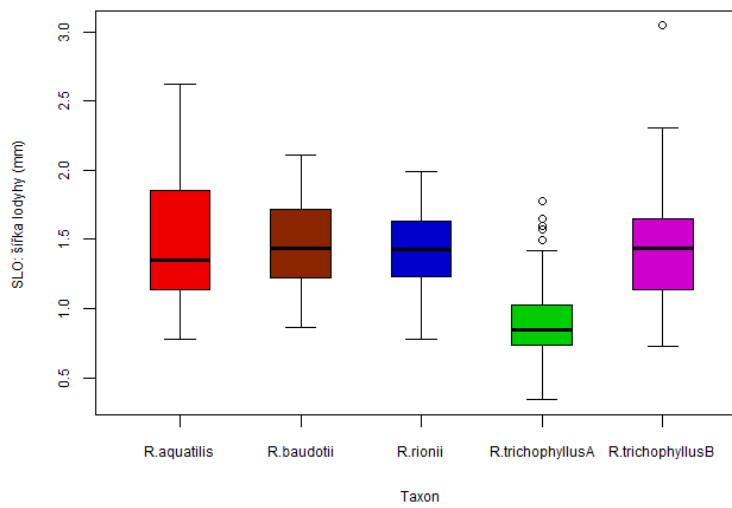
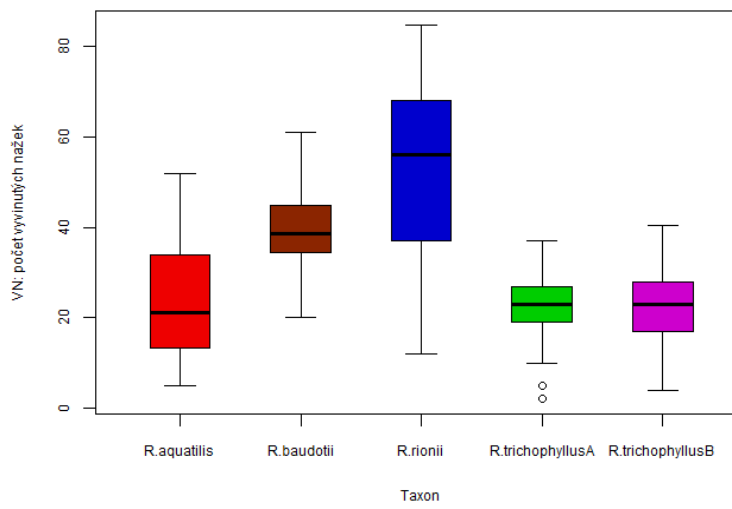
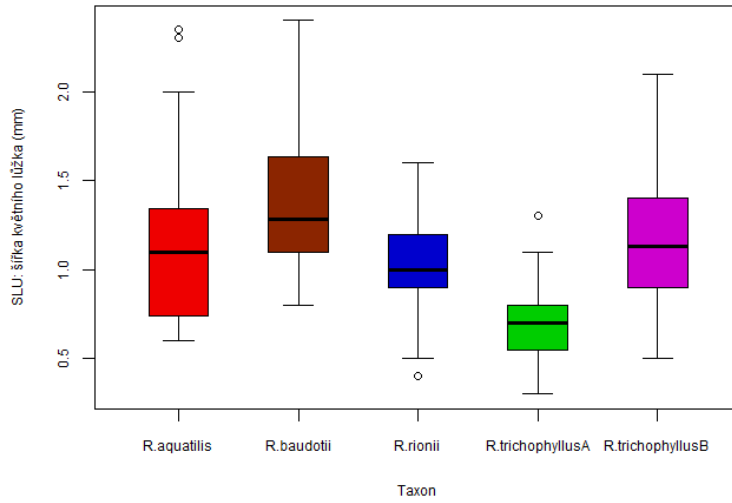
Signif. codes: 0 ‘\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*’ 0.01 ‘\*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

### Tukey multiple comparisons of means

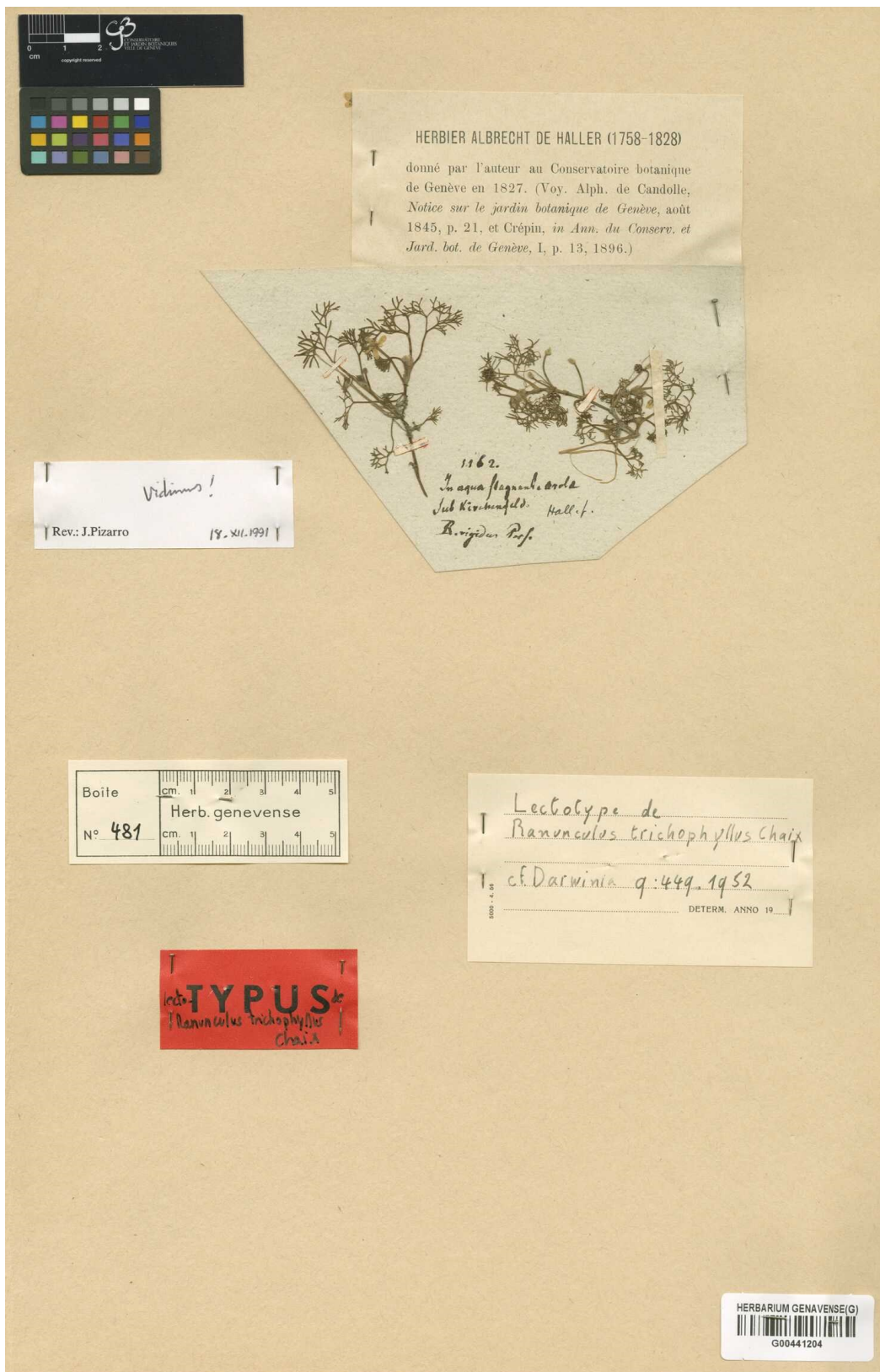
	diff	lwr	upr	p adj
R.trichophyllus.A1– R.trichophyllus.A.eradicatus	0,11943577	-0,15066854	0,3895401	0,7858028
R.trichophyllus.A2– R.trichophyllus.A.eradicatus	0,04132466	-0,14778618	0,2304355	0,9874392
R.trichophyllus.AH– R.trichophyllus.A.eradicatus	0,13708721	-0,04191996	0,3160944	0,2309733
R.trichophyllus.B1– R.trichophyllus.A.eradicatus	1,10461000	0,91931997	1,2899000	0,0000000
R.trichophyllus.B2– R.trichophyllus.A.eradicatus	1,13486548	0,96081580	1,3089151	0,0000000
R.trichophyllus.A2– R.trichophyllus.A1	-0,07811111	-0,35085065	0,1946284	0,9588944
R.trichophyllus.AH– R.trichophyllus.A1	0,01765144	-0,24818217	0,2834851	0,9999595
R.trichophyllus.B1– R.trichophyllus.A1	0,98517423	0,71506992	1,2552785	0,0000000
R.trichophyllus.B2– R.trichophyllus.A1	1,01542971	0,75290879	1,2779506	0,0000000
R.trichophyllus.AH– R.trichophyllus.A2	0,09576256	-0,08719669	0,2787218	0,6432712
R.trichophyllus.B1– R.trichophyllus.A2	1,06328534	0,87417450	1,2523962	0,0000000
R.trichophyllus.B2– R.trichophyllus.A2	1,09354082	0,91542904	1,2716526	0,0000000
R.trichophyllus.B1– R.trichophyllus.AH	0,96752279	0,78851561	1,1465300	0,0000000
R.trichophyllus.B2– R.trichophyllus.AH	0,99777826	0,83043292	1,1651236	0,0000000
R.trichophyllus.B2– R.trichophyllus.B1	0,03025548	-0,14379420	0,2043051	0,9956342

## Příloha 4 – Morfometrická analýza: boxploty významně korelovaných znaků





**Příloha 5 – Neotypová položka *Ranunculus trichophyllus* Chaix**



Catalogue des herbiers de Genève (CHG). Conservatoire & Jardin botaniques de la Ville de Genève. 11-04-2021 <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/chg>