

Autoreferát Tereza Kávová

Téma disertační práce: Populačně genetické aspekty rostlinných invazí: studie genetické a cytotypové variability u invazních a nativních populací *Phalaris arundinacea* L. a *Myriophyllum* sp.

Autor: Ing. Tereza Kávová

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Oponenti:

prof. RNDr. Hana Čížková, CSc.

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

České Budějovice

2019

Úvod

Jedna z hypotéz o příčinách invazního šíření chrastice rákosovité v USA je, že podobně jako u rákosu obecného, došlo k opakovaným introdukčním druhů z Evropy anebo hybridizaci introdukovaných genotypů s původními. Část tohoto mezikontinentálního genového toku je zesílen produkcí kultivarů *Phalaris* v Minnesotě. Důsledky těchto výměn mají významný dopad na řízení invazních plodin pocházejících z obou kontinentů. Předchozí studie potvrzují jen minimální morfologickou heterogenitu mezi pěstovanými a původními (divokými) formami chrastice rákosovité. U *Phalaris arundinacea* jsme analyzovali genetické podobnosti a rozdíly mezi populacemi v USA (Minnesota) a v České republice. Pomocí ISSR markerů byl porovnán rozsah genetické variability v nativních a invazních populacích. Ukázalo se, že komerční genotypy se vyskytují napříč celým spektrem invazivních genotypů, což poukazuje na poměrně častou výměnu genů mezi pícninářskými, okrasnými a původními populacemi v USA.

Rod *Myriophyllum* je významný hlavně kvůli svým invazním druhům, které měly vždy zvláštní postavení, protože na nich mohl být v reálném čase sledován průběh ekologických a evolučních změn. Ve střední Evropě je zastoupen třemi původními druhy (*M. spicatum* L., *M. alterniflorum* a *M. verticillatum*) a dvěma nepůvodními druhy severoamerickým *M. heterophyllum* a jihoamerickým *M. aquaticum*. *M. spicatum* spolu s *M. heterophyllum* a *M. aquaticum* patří mezi významné invazní rostliny, které svým agresivním růstem způsobují mnoho problémů především v Severní Americe. Disertační práce se zabývá hodnocením role polyploidizace v procesech vedoucích k invaznímu charakteru některých druhů rodu stolísteků (*Myriophyllum*) na území USA, cytologickým a populačně-genetickým srovnáním nativních (Eurasie) a invazních populací (USA) stolístku klasnatého (*M. spicatum*) a stanovením možných „poolů“ genetické a cytotypové variability invazních populací a zhodnocením využitelnosti jednoduchého stanovení velikosti genomu při taxonomickém určování klasickým morfologickým postupem nezařaditelných rostlin, čímž by došlo k výraznému zlevnění a zefektivnění biomonitoringu invazních stolístků a tedy i nároků na management jeho invazních populací.

Invazní chování

Invaze nastává, pokud je druh buď úmyslně, nebo náhodou zavlečen mimo původní oblast výskytu, a v novém prostředí se úspěšně šíří na úkor původních populací (Pyšek a Tichý 2001; Lockwood 2007). Invazní rostliny jsou tudíž nepůvodní druhy rostlin, které jsou po introdukci do nového prostředí schopné samostatné reprodukce (Schneider et al. 2010). Tyto rostliny jsou konkurenceschopné, mívají intenzivní fotosyntézu a metabolismus, vynikají většinou větším kořenovým systémem, větší listovou plochou, jsou úspěšnější v kompetici o zdroje, rychle se množí a vytlačují tak původní rostliny (Ehrenfeld 2003; Liao et al. 2008). Vedou k celkové biotické homogenizaci (Winter et al. 2009). Často jim také napomáhá skutečnost, že nejsou v novém prostředí predátoři či parazité, kteří by jejich růst a šíření přirozeně omezovali, chybí zde biotický odpor (Richardson et al. 2000; Simberloff a Von Holle 1999). Invaze mají výrazný dopad na rozšíření vnitrodruhové genetické diverzity nativních i impaktních organismů. Leger a Rice (2003) poukazují na to, že populace každého druhu je geneticky a fenotypově variabilní ve svém přirozeném arélu, nejsou neměnné a neustále se přizpůsobují prostředí, ve kterém se nacházejí. Tudíž se invazní úspěšnost rozhoduje na úrovni populace, nikoliv druhu. Velkoplošná invaze může také zapříčinit fragmentaci původního biotopu (Estades a Temple 1999; Schmidt a Whelan 1999). Vznikají tak menší izolované ostrůvky, které jsou nevhodné pro velké druhy, mohou hostit jen menší počet jedinců resp. druhů, a pokud jsou od sebe příliš vzdáleny, mohou vést k lokální extinkci některých (meta)populací nebo druhů (Estades a Temple, 1999, Schmidt a Whelan,

1999). Naproti tomu Spyreas et al (2009) zastává názor, že některé zavlečené druhy mohou zvýšit lokální druhovou diverzitu a vytvořit vhodné podmínky pro nové druhy. Interagující druhy spolu často existují v prostorově strukturovaných populacích, kde probíhá koevoluce různou rychlostí, vedoucí k různým druhům adaptací. Nepůvodní druh musí rychle reagovat na nové abiotické a biotické podmínky, stejně jako se u nativních vyvíjí odpověď na nově přichozí. Zdá se, že biotická rezistence by mohla určovat invazní úspěšnost či selhání (Simberloff a Von Holle 1999). Nelze opomenout i geografickou expanzi původních druhů, ke které může dojít v důsledku lidského působení na jejich původní habitat (Sakai et al 2001).

Invaze mají také souvislost s globálním oteplováním, které umožňuje druhům jižnějších oblastí přesouvat se do míst, kde by jinak neměly šanci přežít a rozmnožovat se tam (Dukes a Mooney 1999). Kvůli přesunům (rozšiřování areálu) druhů do vyšších nadmořských výšek a na sever, klesá hojnost těchto druhů na jihu a v níže položených oblastech (Kelly a Goulden 2008). Druhy, které se nerozšíří dál na sever či do vyšších poloh, jsou náchylnější k vymření v důsledku zmenšování jejich přirozeného areálu a jeho obsazování nově se šířícími druhy (Wilson et al. 2005). V souvislosti s invazemi by neměl být opomíjen i fakt, že kterému dochází sekundárně, v důsledku zavlečení primárního invazního organismu, tzv. „*invasion meltdown*.“ V tomto případě dochází ke snažší invazi následných impaktů v důsledku mutualistických interakcí s prvním zavlečeným a nárůstu tlaku na nativní ekosystém (Simberloff a Von holle 1999). Zároveň synergická interakce mezi „útočníky“ může vést k urychlení dopadů na původní ekosystémy.

Důležitá je však i klasifikace a hodnocení nepůvodních druhů, kde se často setkáváme s mylnými pojmy. Setkáváme se směřováním a záměnou pojmů jako neofyt, druh nepůvodní (s přirozeným rozšířením) a invazní (Pyšek et al. 2008). Problémem je i fakt, že termínem „invazní“ se někdy mylně označují i v současnosti se šířící druhy původní. Přestože mohou mít podobný negativní dopad jako druhy nepůvodní, zásadně se liší stabilními nikami historicky formovanými dlouhodobou rovnováhou s přirozenými nepřáteli. Navíc bývají někdy za invazní označovány jen ty druhy, které mají negativní dopad na biodiverzitu či hospodářskou činnost lidí (např. dle definice IUCN).

Populační genetika invazních druhů

Populace je soubor všech jedinců stejného druhu, kteří ve stejném čase existují na stejném místě a navzájem si vyměňují genetickou informaci. Dále uvažujeme, že jedinci se mezi sebou mohou volně křížit a pochází ze stejného předka. Ideální populace, je populace panmiktická (Snustad et al. 2009).

Jak již z předchozího vyplývá, v některých případech je lepší pohlížet na problematiku rostlinných invazí z nižší úrovně, protože biologické invaze sebou přinášejí přenos alel z invadujících druhů do druhů místních a obráceně, díky hybridizaci nám dávají vznik novým genotypům a fenotypovým variacím.

Prosperující invazní organismy přicházejí do nového habitatu již dobře připravené a je to dáno, buď podobností sekundárního areálu s primárním, či schopností rychlé reakce na podmínky a následnou rychlou adaptací na ně (Bock et al. 2015). Invazní úspěšnost definuje počet jedinců, kteří proniknou do nového prostředí a intenzita, s jakou se to děje (Lockwood et al. 2009). Zakládajících jedinců v nové populaci je jen malý počet a a převažuje u nich nízká genetická variabilita, která je způsobena „efektem zakladatele“ či „bottleneck efektem.“ Atraktivním paradoxem je, jak se tyto zdánlivě chudé populace mohou stát invazně úspěšnými? Odpověď hledejme v hybridizaci, polyploidizaci, změnách struktury a velikosti

genomu (Beck 2015). Mezi další aspekty měnící se různorodosti života, které populační genetika studuje, a které naopak variabilitu zvyšují, mohou patřit mutace, které v průběhu času vytváří nové alely, nebo tok genů. Takový tok může nastávat i mezi různými druhy (Hartl, 2010).

Dlugosh a Parker 2008 vycházejí z domněnky, že základní hnací silou invazí není diverzita sama o sobě, ale že důležitější roli hrají genotypové rekombinace vzniklé mezi zdrojovými genotypy. Tuto tezi potvrzuje ve své práci i Konečný et al. (2013), který myšlenku doplňuje o fakt, kdy potenciálně úspěšný genetický materiál vzniká nejčastěji smícháním odlišných zdrojových populací, mezidruhovým, či vnitrodruhovým křížením a právě tento pooling vede k vyššímu stupni diverzity. Avšak toto křížení může vést k homogenizacím populací a ztrátě lokálních adaptací (Stroffer 1999). Důležitou evoluční silou při invazích je tedy selekční tlak, způsobený například genetickým driftem, či hybridizací vedoucí ke genetickým změnám a změnám ve fenotypových projevech (Clegg et al. 2002).

Hybridizace a polyploidizace

a/ Hybridizace

Hlavními mikroevolučními mechanismy generujícími variabilitu v populacích jsou polyploidie a hybridizace. Spolu s diverzitou v reprodukčních mechanismech (a zejména apomixii) umožnily vzniknout celé řadě blízké příbuzných taxonů.

Ukazuje se, že hybridizace u rostlin je jednou z hybných sil evoluce biodiverzity na Zemi (Wissemann 2007). Dle Hegarty a Hiscock (2005) může hybridní speciace proběhnout dvěma způsoby: homoploidní speciace zahrnuje hybridizaci, kdy má vzniklý kříženec stejný počet chromozomů jako jeho rodičovské druhy, zatímco allopolyploidní speciace probíhá většinou v případě, když má kříženec lichý počet chromozomů a je tím ohrožen správný rozchod chromozomů do gamet. Hybrid tento problém řeší zdvojením chromozomové sádky, tedy polyploidizací nebo zpětným křížením s jedním z rodičovských druhů (tzv. introgrese).

Nově vzniklé křížence můžeme považovat za druhy až ve chvíli, kdy se reprodukčně izolují od rodičovských druhů – ať už ekologicky nebo geneticky (Ungerer et al. 1998). Tyto výhody mohou stát za evolučním úspěchem invazních rostlin (Ellstrand and Schierenbeck 2000).

Ellstrand and Schierenbeck (2000) se ve své práci zabývají myšlenkou, zda se invazní rostliny již invazními „rodí“ nebo se invazními teprve stávají. Hybridizace mohla podpořit vznik invazních rostlin několika způsoby: zvýšením genetické variability pomocí rekombinace, vznikem nových genotypů s novými kombinacemi alel, zbavením se genetického zatížení izolovaných či malých populací nebo zafixováním heterozního efektu (Ellstrand and Schierenbeck 2000). Pokud se hybridizace udála mezi druhy, které se dokáží množit klonálně, heterozní efekt může vést k rychlému šíření nepůvodních druhů na úkor rodičovských (Thum and Lennon 2006), jako je tomu u mnohých vodních rostlin (např. Ayres et al. 2004).

b/ Polyploidizace

Dalším možným nástrojem vzniku invazního chování je polyploidizace. Polyploidie je genomová multiplikace, kdy se v somatických buňkách určitého organismu nacházejí více než dvě identické sady chromozomů. Polyploidie je velice častá zejména v rostlinné říši, kde bývá považována za jednu z hlavních hnacích sil evoluce. Kvalifikované odhady ukazují, že 2–4 % veškerých speciálních událostí u kvetoucích rostlin je možné připsat právě genomové duplikaci (a jde tedy o vůbec nejčastější mechanismus sympatrické speciace. Podle způsobu

vzniku bývají tradičně rozlišovány dvě základní kategorie polyploidů: autopolyploidi vznikající zdvojením počtu chromozomů v rámci jednoho a téhož druhu a allopolyploidi, kteří kombinují genetický materiál minimálně dvou různých rodičovských druhů (v jejich evoluční historii tedy nezbytnou úlohu hraje mezidruhová hybridizace). Zdvojení počtu chromozomů se projevuje prakticky na všech úrovních biologické organizace. Univerzálním efektem bývá zvětšení buněk a s ním související změny povrchu a objemu. Ty se následně projevují změnami v intenzitě metabolických procesů. Polyploidi proto zpravidla bývají robustnější než jejich diploidní příbuzní. Vykazují však pomalejší ontogenetické procesy a pozdější kvetení. Zdvojení počtu chromozomů s sebou často přináší i změny v reprodukčních charakteristikách, např. polyploidi obecně vykazují větší podíl samoopylování a často se rozmnožují apomikticky (vytvářejí semena bez oplození a vzniklí potomci jsou geneticky zcela shodní s mateřským jedincem). Nezřídka polyploidi osidlují širší rozpětí ekologických podmínek, bývají konkurenčně zdatnější a odolnější vůči různým patogenům. Z genetického hlediska vykazují polyploidní druhy větší variabilitu (větší podíl polymorfních lokusů, více alel na lokus atd.) a jsou méně náchylní ke snižování genetické diverzity v důsledku příbuzenského křížení. Např. při samosprášení heterozygotního diploida bude plná polovina jeho potomků homozygotních, zatímco u tetraploida to bude jen o něco málo přes 5%. K poklesu původní genetické variability na 1% kvůli příbuzenskému křížení stačí u diploidních organismů 7 generací, naproti tomu u tetraploidů nastane stejný stav za 27 generací a u hexaploidů dokonce až za 46. Duplikované geny navíc mohou sloužit jako „experimentální“ materiál pro evoluci. Jedna část genů bude zajišťovat funkce nezbytné pro přežití organismu, zatímco u jejich kopií může docházet k mutacím, které nakonec mohou vést až k rozrůznění a specializaci pro nové funkce (Suda 2010).

Hypotézy a cíle disertační práce

Hypotézy:

- Liší se nativní a invazní populace chrastice a stolítků velikostí genomu a úrovní cytotypové variability?
- Je v invazních populacích menší rozsah genetické variability v důsledku „efektu zakladatele“?
- Je možné využít molekulární analýzu/markery pro hodnocení rozsahu genetické variability?

Cíle:

- Stanovit velikost genomu a polidní úroveň v populacích stolítku pomocí metody průtokové cytometrie.
- Provést analýzu molekulárních markerů a vyhodnotit rozsah genetické variability ve sledovaných populacích chrastice a stolítku.

Phalaris arundinacea L. jako významná invazní mokřadní rostlina v Severní Americe

Chrastice rákosovitá, *Phalaris arundinacea* L. je rozšířena po celém světě, s výjimkou Antarktidy a Grónska. Centrum rozmanitosti tohoto rodu je ve Středomoří. Zástupci rodu *Phalaris* se vyskytují na vlhkých stanovištích od nižších poloh až do alpských nadmořských výšek (Andersson, 1997). Celkem je známo asi 22 druhů, které najdeme hlavně v mírném pásu Evropy a v jižní Africe (Bělohávková, 2004). Mezi nejdůležitější druhy rodu *Phalaris* patří: *P. arundinacea*, *P. aquatica*, *P. canariensis*, *P. amethystina*, *P. angusta*, *P. brachystachys* a *P. minor* (Baldini, 1995).

Phalaris arundinacea je kultivovaná jako krmná a okrasná plodina v mírných oblastech, široce využívaná pro stabilizaci / sanaci půdy, v kořenových čistírnách a v poslední době i jako zdroj biomasy (Lavergne a Molofsky, 2004, Lewandowski et al., 2003; a Hansson, 2001; Rice a Pinkerton, 1993; Sheaffer a kol., 2008).

V posledních letech došlo k masivnímu šíření *P. arundinacea* po celé Severní Americe a v současné době se vyskytuje ve 43 státech USA a Kanady (Kercher & Zedler, 2004). *P. arundinacea* představuje významnou hrozbu pro původní mokřadní vegetaci a je klasifikována jako škodlivý činitel v devíti státech USA (Lavergne & Molofsky, 2004). Předpokládá se, že tyto agresivní populace pocházejí z Evropy (nebo jsou evropského původu).

Genetická variabilita planých a kultivovaných populací *Phalaris arundinacea* L. v USA a v České republice

Analyzovali jsme genetické podobnosti a rozdíly mezi populacemi v USA (Minnesota) a v České republice. Pomocí ISSR jsme stanovili potenciálního genový toku pro tuto rostlinu. Kultivary a divoké genotypy byly rozptýleny do dvou skupin, které se překrývají. Nejméně 4 sady divokých amerických genotypů se liší od evropských protějšků a mohou pocházet ze Severní Ameriky. Distribuce kultivarů, související s evropskými typy nebo pocházející z evropských typů, způsobuje míchání genetických informací severoamerickými druhy. Část tohoto mezikontinentálního toku a výměny je zesílena produkcí kultivarů *Phalaris* v Minnesotě. Důsledky těchto výměn mají významný dopad na řízení invazních plodin pocházejících z obou kontinentů.

Sběr rostlinného materiálu proběhl v roce 2012 na území Minnesoty (USA). Vzorky byly sbírány podél šesti řek. Čtyři z vybraných řek (St. Croix, Mississippi, Minnesota, Des Moines) patří k povodí Golského zálivu, dvě řeky (Red River of the North, Roseau) ústí do jezera Lake Winnipeg, patřícího do povodí Hudson Bay. Do pokusu jsme zahrnuli 13 severoamerických odrůd pořízených ve formě semen z Germplasm Resources Ministerstva zemědělství USA nebo USDA-GRIN. Pro simulaci stejných podmínek jsme využili 110 českých planých genotypů sesbíraných podél šesti hlavních řek České republiky (Berounka, Dyje, Labe, Lužnice, Orlice a Vltava). Další plané genotypy byly získány z výzkumného střediska Zubří. Do analýz byly zahrnuty i komerční okrasné kultivary České Republiky. Genetická variabilita byla hodnocena pomocí markerů ISSR. Genetická struktura byla vypočítána pomocí STRUCTURE verze 2.3.4, Bayesovského clusteringového algoritmu.

V populacích *Phalaris* v Minnesotě se kultivované a divoké genotypy se utvořily do oddělených skupin, které se významně překrývaly. Nejméně 4 sady divokých genotypů v USA jsou nejvíce odlišné od evropských protějšků a jako takové by mohly pocházet ze

Severní Ameriky. Budou zapotřebí další práce, které dokládají původ. Přesto prodej krmných odrůd, který souvisí s evropskými typy nebo pocházejí z evropských typů, nadále způsobuje genetické míchání s americkými druhy. Část tohoto mezikontinentálního toku a výměny se zhoršuje produkcí osiva krmiv *Phalaris* v Minnesotě, která se prodává jak v Severní Americe, tak v Evropě. Zatímco očekávání, že pěstování krmiv / okrasných rostlin by mělo mít podobnou genetickou úpravu s divokými populacemi napříč kontinenty (kvůli omezenému genetickému výběrovému tlaku u této krmné a okrasné plodiny). Dopady těchto zjištění mají významné důsledky pro producenty krmiva, manažery a chovatele.

Fenotypová a genotypová variabilita v českých pícninách, okrasných a divokých populacích *Phalaris arundinacea* L.

V původních studiích nebyly zjištěny žádné fenotypové rozdíly mezi rostlinami jednotlivých kontinentů; genetické analýzy byly kontroverzní. V rámci střední Evropy, zejména v České republice, není známo, zda jsou divoké genotypy a kultivary geneticky a fenotypicky podobné. Cílem této studie bylo srovnání komerčních krmných a okrasných kultivarů prodávaných v České republice s divokými genotypy pocházejícími z původních populací podél velkých českých řek a charakterizovat rozsah fenotypových a genetických variací.

V metodice jsme následovali postup uvedený v předchozím článku. Hodnotili jsme zde ještě fenotypovou varianci. Po zazimovací fázi jsme od každého pokusného vzorku oddělili 12 odnoží, které jsme rozmístili náhodně do kádí a udržovali jsme je takto ve venkovním prostředí. U všech rostlin pravidelně v týdenních intervalech měřili výšku rostlin (měřeno jako délka nejdelšího listu na nejdelším stéble v trsu) a šířku trsu (měřeno jako šířka trsu v nejširším místě a v místě kolmém na toto místo). Po zrobustnění odnožovaných rostlin jsme u všech rostlin zjišťovali v týdenních intervalech počet výhonů, abychom zjistili dynamiku růstu a expanze jednotlivých genotypů. Počet výhonů se určoval vlastním počítáním výhonů. U těch genotypů, které v době trvání kultivace vykvetly, jsme zjišťovali morfometrické charakteristiky kvetoucích stébel. Stébla byla odebrána ve fenologické fázi metání, postupně, jak vykvétala a to odstříhnutím na úrovni pěstebního substrátu. Na každém odebraném stéble byly zjišťovány tyto morfometrické charakteristiky: 1) bazální průměr, 2) celková délka (od báze až po vrchol květní laty), 3) počet kolének, 4) počet listů na stéble. Dále pak byla měřena délka a šířka laty (v jejím nejširším místě, kolmo na osu laty). Byla zjištěna i hmotnost sušiny. V polovině září jsme kultivaci ukončili. U všech rostlin byly vyhodnocena velikost listové plochy, hmotnost nadzemní a podzemní biomasy. Statisticky jsme vyhodnocovali za použití postupu obecného lineárního modelu (GLM) pro jednorozměrná nebo opakovaná měření ANOVA ve Statistical Package for the Social Sciences version 22 (SPSS; Universtiy of Chicago, 2013). Genotypová variance byla hodnocena pomocí markerů ISSR, Genetická struktura byla vypočtena pomocí algoritmu Bayesian cluster algoritm STRUCTURE, verze 2.3.4.

Při hodnocení fenotypových rozdílů mezi planými populaci ČR/ USA a kultivary ČR/USA nedošlo k významnému odlišení měřených znaků. Avšak při měření vzniklé biomasy, vykazovaly americké populace značný nárůst. U evropských genotypů byla detokovaná nižší podzemní část. U variant *Picta* (GFP-2) a *Luteopicta* (GFL-4), by měly téměř stejné poměry kořenů / výhonků. Mohlo by to znamenat společný sestup z jediného mutanta. Dva nerozlišené genotypy měly poměr kořenů / výhonků přibližně na úrovni 1,0 (BE-3 z Berounky, OR-1 z Orlice) - zachycené u variant *Picta* a *Luteopicta*. Vzhledem k tomu, že většina nerozrůzněných kultivarů vzácně kvete a roste pomaleji než nešifrované druhy, nadzemní i podzemní růst těchto čtyř genotypů je téměř totožný. Zatímco pomalejší tempo

růstu by bylo nežádoucí pro krmivo, mohlo by však být prospěšné pro nápravu s cílem snížit šíření. Hodnoty českých divokých a kultivovaných genotypů ukazují mnohem širší rozložení poměru kořenů / výhonků, což vede k domněnce, že evropské typy mohou produkovat větší biomasu než invazivní severoamerické typy. Některé další fenotypové znaky pro všechny rostliny nemohly být použity k významnému rozlišování mezi řekami nebo kultivary (populacemi), genotypy a jejich interakcí. Z těchto výše zmíněných důvodů je nutné začlenit molekulární markery za účelem diference genetických rozdílů a rozlišování klonálních směsí v centrální Evropě a USA. Pomocí přístupu ANOVA a STRUCTURE bylo možné odhalit genetickou strukturu analyzovaných genotypů, rozlišovat mezi kultivovanými a divokými genotypy a poprvé potvrdit fundamentální genetické rozdíly mezi českými kultivovanými a divokými genotypy. Na základě molekulárních analýz byly odmítnuty testované hypotézy, že nedošlo k významným genetickým rozdílům mezi populacemi českou divokou *Phalaris* na všech řekách a mezi českými kultivovanými různě pestrobarevnými typy. Jedinou hypotézou, kterou jsme nedokázali odmítnout, bylo, že mezi českými kultivovanými a divokými druhy nebyl žádný významný rozdíl. Interpopulační genetická variace je velmi vysoká, ale intrapopulační variabilita byla vyšší, což vedlo k neschopnosti rozpoznat genetické rozdíly mezi řekami. Česká *Phalaris* vykazuje významně vysoké úrovně genetické diverzity, přičemž většina z nich je v populaci, často připisovaná vysokým hladinám genového toku. Chrástava byla jedinou výjimkou z genetických rozdílů mezi českou kultivovanou a divokou populací, která se shluovala spolu s českými divokými genotypy shromážděnými podél řek. Je to překvapivé, protože tato odrůda se lišila pouze ve dvou fenotypových rysech, což naznačuje, že většina markerů ISSR nekóduje skryté fenotypové rysy. Genovou uniformitu prokazovali české okrasné kultivary, zřejmě v důsledku mezipopulačního klonování během doby, kdy v ČR byl nedostatek okrasných plodin.

Myriophyllum L., invazní vodní rostlina v Severní Americe

Jednou z významných skupin invazních rostlin zásadním způsobem ovlivňujících ekosystém sladkovodních toků a nádrží je rod *Myriophyllum*. Rod *Myriophyllum* L. (stolístek) zahrnuje přibližně 68 druhů vzájemně si velmi podobných vodních rostlin bylinného charakteru náležejících do čeledi *Haloragaceae* (zrnulovité). Tím se řadí k druhově nejbohatším rodům vodních *core eudicots*. Rod *Myriophyllum* je významný hlavně kvůli svým invazním druhům, které měly vždy zvláštní postavení, protože na nich mohl být v reálném čase sledován průběh ekologických a evolučních změn (Moody & Les 2007b; Moody & Les 2010). Ve střední Evropě je zastoupen třemi původními druhy (*M. spicatum* L., *M. alterniflorum* a *M. verticillatum*) a dvěma nepůvodními druhy, severoamerickým *M. heterophyllum* a jihoamerickým *M. aquaticum*. *M. spicatum* spolu s *M. heterophyllum* a *M. aquaticum* patří mezi významné invazní rostliny, které svým agresivním růstem způsobují mnoho problémů především v Severní Americe (Newman & Welling, 2004). Není to však pouze invaznost, která dělá tento rod tak pozoruhodným. Vykazuje velmi vysokou fenotypovou plasticitu, která značně znesnadňuje určování jeho zástupců do druhu. Poslední výzkumy navíc naznačují, že mezi některými druhy může probíhat křížení, které dává vzniknout hybridům v některých ohledech invaznějším než samotné rodičovské druhy. Nejen proto by měly být řádně studovány faktory ovlivňující úspěšnost invazních rostlin v obsazování nových lokalit. Jedním ze zásadních faktorů může být i polyploidie, která ve světle předchozích studií nabízí zcela nový pohled na problematiku stolístků. Díky užití kombinace metod průtokové cytometrie a genetických analýz je možné odhalit, jestli existují

smíšené populace jednotlivých druhů, zda mezi nimi probíhá hybridizace a jaké ekologické zákonitosti jsou s tím spojené.

Navzdory intenzivnímu výzkumu zaměřeného na invazní aspekty stolítků se jen naprosté minimum prací věnovalo problematice polyploidie a jejího vlivu na invaznost rostlin, přestože v jejich životě hraje polyploidie významnou roli. Velká část druhů je ploidně uniformní a celý rod *Myriophyllum* má zatím potvrzeno 5 ploidních úrovní (diploidní, triploidní, tetraploidní, hexaploidní a nonaploidní), variabilita ve velikosti genomu je značná a až na výjimky je i druhově specifická. Přesto však nebyl u těchto hybridních jedinců zkoumán potenciální vliv polyploidie na invaznost. Nejen proto představuje rod *Myriophyllum* ideální skupinu pro komplexní studium procesů hybridizace i polyploidizace a také dopadů těchto procesů na rozšíření a invazní potenciál jednotlivých druhů (Moody & Les 2002).

Genetická a cytogenetická variabilita evropských a severoamerických populací stolítků

Zjištěná variabilita velikosti genomu se pohybovala v rozmezí 0.41-2.66 pg. Nejmenší hodnota byla zjištěna u diploidního taxonu *M. humile* naopak největší velikost genomu byla zaznamenána u nonaploidního *M. sibiricum*. Tento rozdíl ve velikostech genomu je až 6.5 násobný, zatímco rozdíl ploidii je 4.5 násobný. U velikosti genomu přepočteného na jednu sádku chromozómů (monoploidní velikost genomu, 1Cx hodnota) se variabilita pohybuje v rozmezí od 0.16 pg u oktoploidního *M. aquaticum* po 0.32 pg u triploidního *M. ussuriense*, což činí dvojnásobný rozdíl. Jakkoliv by výše uvedený trend sváděl k závěru, že se zvyšující se ploidii klesá monoploidní velikost genomu (“genome downsizing”), ve skutečnosti jde spíše o výjimku druhu *M. aquaticum*, který má nejmenší genom. Je zřejmé, že se zvětšující se ploidní úrovní roste i velikost genomu, s výjimkou většiny oktoploidů a menší skupiny hexaploidů. Tyto odchylky jsou způsobeny právě enormně malou velikostí genomu obou cytotypů *M. aquaticum* ve srovnání s ostatními druhy.

M. spicatum z USA má signifikantně větší genom než evropské populace, tento fakt formuloval v roce 1996 Rejmánek, kdy tvrdil, že invazivní šíření může korelovat s rozdíly ve velikosti genomu. Pokud se podíváme na 1Cx hodnoty, podobný trend se dá vysledovat i u *M. sibiricum*. Zároveň je patrné, že *M. spicatum* je ve velikosti genomu značně variabilní jak v USA (kde to může být částečně způsobeno hybridizací s *M. sibiricum*, variabilita 11,6 %), tak i v Evropě, kde se patrně s ničím nekříží (variabilita 10,6 %).

Lze zatím jen spekulovat, co vedlo k tomu, že mají americké (introdukované) populace větší genom. *M. spicatum* bylo v USA poprvé zaznamenáno v r. 1881 (Couch a Nelson, 1985) při ústí řeky Potomac River do zátoky Chesapeake Bay ve Virginii. Dlouhou dobu se zde množilo, avšak nikam se nešířilo, až na přelomu 50. a 60. let 2. století druh zaznamenal raketový boom a během pár let byl druh zaznamenán prakticky všude (Prančl, pers. comm.). To jistě bude souviset s tím, že Američané začali více cestovat a používat motorové čluny ale i velmi silné hurikány, které obrátily proud řek.

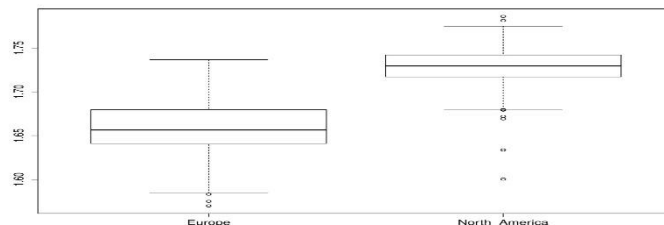
Domníváme se, že hybridizace *M. spicatum* s původním druhem *M. sibiricum* je natolik běžná, že čisté *M. sibiricum* je v hustěji zalidněných oblastech již vzácné, tyto naše domněnky potvrzuje i Moody & Les, 2002. V posledním roce se podařilo získat vzorky ze Švédska, kde byla nalezena smíšená populace 6x a 9x *M. sibiricum* společně s 6x *M. spicatum*. Tato oblast v Evropě se potenciálně jeví jako velmi zajímavá z pohledu možnosti většího výskytu takto smíšených populací a možnosti nálezu hybridů obou druhů.

Nelze však vyloučit možnost zavlečení hybridních rostlin z parapatrickým či sympatrickým výskytem obou druhů i na jihovýchod USA, a proto by bylo třeba ověřit tento

předpoklad také molekulárními metodami. Větší velikost genomu *M. spicatum* v Severní Americe může být způsobena introdukcí malého počtu rostlin z evropského areálu s vyšší velikostí genomu a jejich následným vegetativním šířením po celém severoamerickém kontinentu. Zuellig & Thum (2012) dokládají, že druh *M. spicatum* byl do Ameriky introdukovanán nejméně dvakrát, což znamená, že introdukované rostliny by musely pravděpodobně pocházet ze stejné geografické oblasti.

Domníváme se, stejně jako Moody & Les (2010), že hybridizace *M. spicatum* s původním druhem *M. sibiricum* je natolik běžná, že čisté *M. sibiricum* je v hustěji zalidněných oblastech již vzácné. Morfologicky nejčistší populace *M. sibiricum*, které měly (nepřekvapivě) také největší genomy ze všech, jsme viděli v odlehlých horských jezerech Washingtonu a Oregonu a na San Juan Islands (kde jako bariéra funguje moře a taky velmi členitý reliéf ostrovů). To byly morfologicky zcela odlišné rostliny, které by se *M. spicatum* šly splést jen stěží (Prančl, pers. comm.).

Na počátku projektu byla domněnka, že variabilita ve velikosti genomu rodu *M. sibiricum* je v USA dána hybridizací *M. spicatum* a *M. sibiricum*, kdy je již prakticky nemožné najít čisté *M. sibiricum*. Naproti tomu v Evropě, byl sledován obdobný trend, ale nebyla rozpoznána žádná populace s potenciálními hybridy. Díky rozšíření stávajícího datasetu o severské sběry se podařilo odhalit ploidní heterogenitu v evropských populacích stolítku sibiřského (*M. sibiricum*). Zatímco v předchozích analýzách byla detekována pouze ploidní variabilita mezi americkým a evropským *M. sibiricum*, kdy americký druh je hexaploid a evropský nonaploid. Nyní jsme odhalili evropskou populaci, kde se vyskytují oba tyto cytotypy. Již dříve se uvažovalo o potenciální hybridizaci druhů *M. spicatum* a *M. sibiricum*. Tato hybridizace s největší pravděpodobností ovlivňuje jak invazní trend rostliny, tak i evoluční změny ve velikosti genomu. Hybridizace těchto druhů byla zatím prokázána pouze na lokalitách Spojených států amerických (Sturtevant et al. 2009). Na základě cytometrických analýz jsme schopni nyní signifikantně odlišit zainteresované druhy v rámci jejich velikosti genomu, obsahu DNA v somatických buňkách.

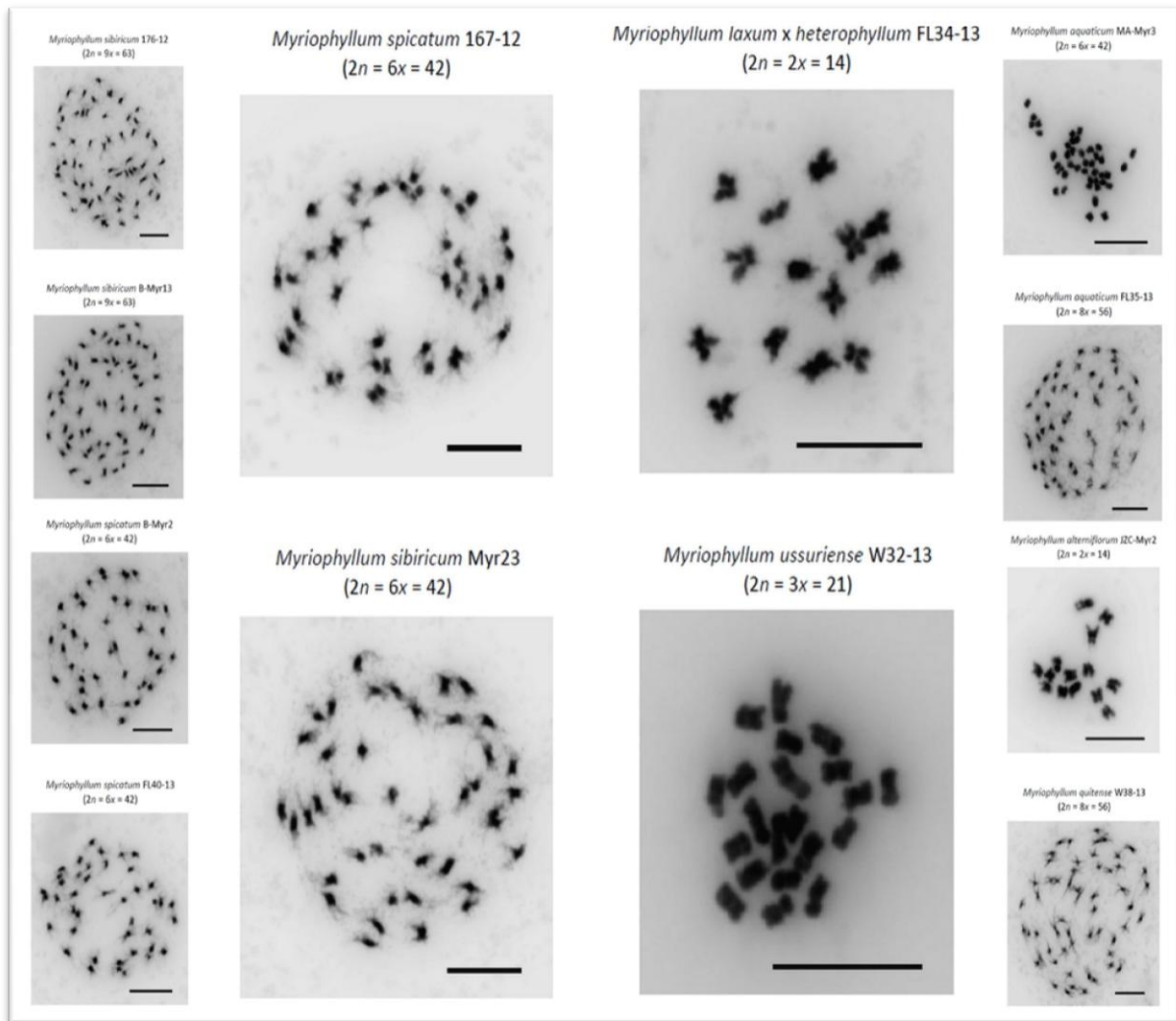


Krabicový diagram znázorňující rozdíly v 2C hodnotách velikosti genomu u *M. spicatum* (Evropské a Americké populace).

Hlavním přínosem cytometrických analýz je však fakt, že jsme na jejich základě schopni odlišit druhy *M. sibiricum* a *M. spicatum* ve všech detekovaných ploidních stupních a popř. rozpoznat i jejich hybridní formy. Druhy *M. sibiricum* a *M. spicatum* mají jednu z největších monoploidních velikostí genomu a zároveň největší rozsah zjištěných hodnot v evropských a severoamerických populacích; vymykají se tudíž pravidlu ohledně snižování Cx hodnot se zvyšující se ploidií (Leitch & Bennett, 2004).

Všechny předpokládané ploidní úrovně u všech taxonů byly potvrzeny počítáním chromozómů v roztlakových preparátech (provedeno Terezií Mandákovou, CEITEC, Masarykova univerzita, Brno) a cytometrické výstupy tak byly standardizovány. Na základě

těchto dat bylo stanoveno celkem 5 ploidních úrovní: diploidní ($2n = 14$), tetraploidní ($2n = 28$), hexaploidní ($2n = 42$), oktoidní ($2n = 56$) a nonaploidní ($2n = 63$).

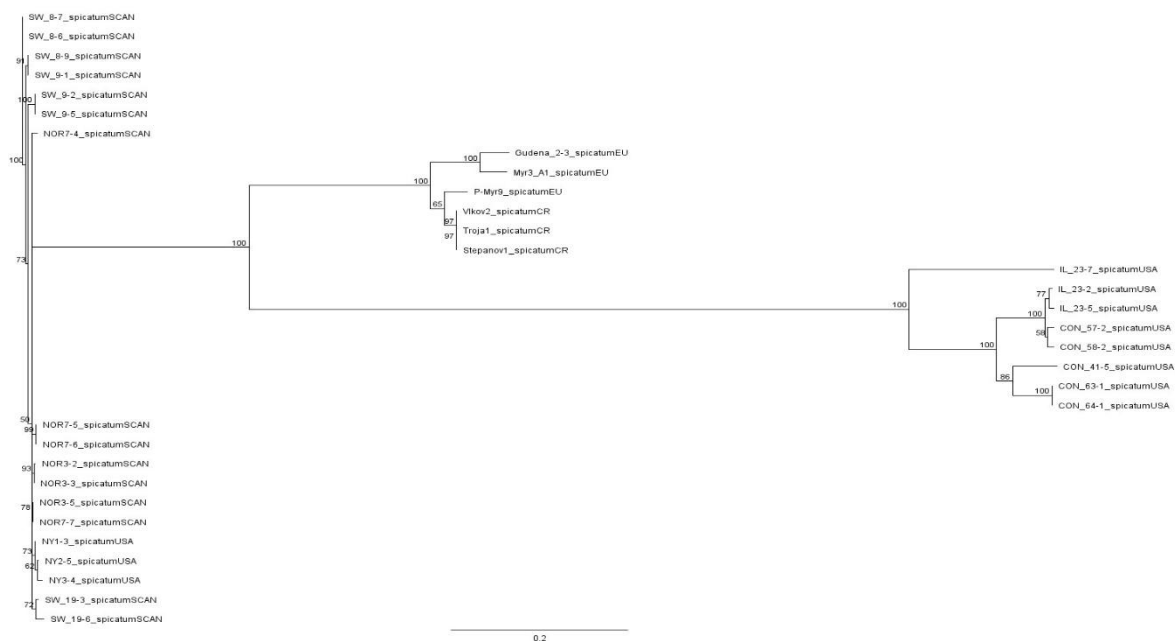


Mitotické chromozomy nabarvené DAPI, měřítko = 10 μ m

Vnitro a mezidruhová hybridizace byla sledována pomocí analýzy cp DNA a ITS analýzy. Byla provedena sekvenace vybraných úseků. Celkem vbylo sekvenováno 650 vzorků, přičemž 447 sekvencí (223 z Evropy a 234 z USA) bylo následně použito v alignmentech. Ostatní sekvence bylo nutné resekvenovat, kvůli špatné kvalitě čtení. Jako nejvariabilnější a nejvhodnější k rozlišení jednotlivých hybridů u chloroplastových úseků byl vybrán region trnL-F vymezený primery „c“ a „f“ (trnLc 5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3', trnLf 5' ATTTGAACTGGTGACACGAG 3') dle Taberlet et al. (1991), a další dva úseky podle Shaw et al. (2005, 2007). U jaderné DNA byl zvolen lokus ITS s univerzálními primery ITS1 a ITS4 (ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3', ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). U problematických vzorků byl použit namísto univerzálního primeru ITS1, specifický primer stolístků ITS1myrio (5' GCGGAAGGATCATTGTCGAA3') eliminující potenciální kontaminace podle Thum et al., 2011 a univerzální primer ITS4 dle Soltis and Kuzoff (1995).

Na koncenzu fylogenetického stromu pro Neighbour-joining analýzu pro druh *M. Spicatum* je jasné vylišení 3 skupin pomocí primeru pro jaderný lokus ITS1. Došlo zde

k celkovému vymezení izolovaných Severoamerických populací, např. jako v práci Wu et al., 2015. Ve středovém pásmu nalezneme střeoevropské populace. Třetí skupinou jsou vzorky z intakní zóny severovýchodní části USA, kde došlo k přiřazení vzorků ze Skandinávie. Toto zjištění nám zavdává domněnku o potencionálním prvním zanesení tohoto rodu do USA. Uvádí se, že *M. sibiricum* hybridizuje s *M. spicatum* (Moody & Les 2002), což dosud nebylo zkoumáno v souvislosti s ploidní heterogenitou a v takovém areálu, jaký jsme pokryli my spojením výsledků studovaných rostlin z dřívě získaného a této disertaci. Napovídá nám to o potencionální vnitro i mezidruhové hybridizace tohoto druhu, která může ovlivňovat invazní charakter rostlin. Moody & Les (2002) Tuto domněnku potvrdili, když v několika jezerech v severovýchodních Spojených státech odhalili křížence *M. spicatum* × *M. sibiricum*. Kříženci vykazovali morfologické znaky na pomezí rodičovských druhů. Moody & Les (2002) naznačili, že objevení tohoto křížence by mohlo ovlivnit budoucí management při boji s *M. spicatum*.



Konzenzus Neighbor-Joining tree for ITS locus of nuclear DNA in *M. spicatum*, genetic distance - Tamura Nei, 1000 replicates

Důležitým výstupem analýzy molekulárně-genetických analýz je zřetelné odlišení skupiny evropských a amerických populací; vnitřní diference skupiny evropských vzorků a skandinávských populací.

Závěr

Důležitým výstupem analýzy ISSR markerů *Phalaris arundinacea* je zjištění, že rozsah genetické variability u vzorků z Minnesoty (kultivarů i vzorků z invazních populací a extenzivních ploch) je o cca 10% nižší než- li je tomu u českého materiálů. U skupiny českého materiálů došlo ke zřetelnému odlišení skupiny planých genotypů a skupiny zahradnických kultivarů a pícninářských genotypů. V případě genotypů z Minnesoty nebylo patrné tak zřetelné odlišení pícninářských kultivarů od rostlin z populací chrastice podél řek. Jedním z důvodů je i menší celkový rozsah genetické variability ve srovnání s českými vzorky. Při celkovém porovnání českých a Minnesotských vzorků chrastice rákosovité došlo k rozlišení souboru genotypů do dvou hlavních shluků. První obsahuje zahradnické a pícninářské genotypy české. Do druhého byly přiřazeny genotypy z nativní a invazních populací včetně pícninářských kultivarů z Minnesoty. V rámci druhého shluku se pak genotypy z Minnesoty seskupily do jedné kompaktní skupiny v důsledku nízké genetické variability tohoto souboru.

Odrůda Chrastava byla jedinou výjimkou z genetických rozdílů mezi českou kultivovanou a divokou populací, která se shlukovala spolu s českými divokými genotypy shromážděnými podél řek. Je to překvapivé, protože tato odrůda se lišila pouze ve dvou fenotypových rysech, což naznačuje, že většina markerů ISSR nekóduje skryté fenotypové rysy. Genovou uniformitu prokazovali české okrasné kultivary, zřejmě v důsledku mezipopulačního klonování během doby, kdy v ČR byl nedostatek okrasných plodin.

Cytotypová heterogenita byla zjištěna u populací *M. heterophyllum*, kde byly determinovány dva cytotypy (ploidní úrovně): 2x a 3x. Sympatrický růst diploidních a triploidních cytotypů se vyskytl u jedné populace *M. pinnatum*. U dvou populací *M. aquaticum* v Evropě (Maďarsko) by také zaznamenán výskyt více cytotypů v populaci (6x a 8x), zatímco ostatní evropské a všechny populace v S. Americe byly oktaploidní. Cytotypová neuniformita byla zjištěná i u druhu *M. sibiricum*. Na počátku projektu byla postavena hypotéza, že variabilita ve velikosti genomu rodu *M. sibiricum* je v USA dána hybridizací *M. spicatum* a *M. sibiricum*, kdy je již prakticky nemožné najít čisté populace *M. sibiricum*. Naproti tomu v Evropě, byl sledován obdobný trend, ale nebyla rozpoznána žádná populace s potencionálními hybridy. Podařilo se odhalit ploidní heterogenitu v evropských populacích stolítku sibiřského (*M. sibiricum*). Zatímco v předchozích analýzách byla detekována pouze ploidní variabilita mezi americkým a evropským *M. sibiricum*, kdy americký druh je hexaploid a evropský nonaploid. Nyní jsme odhalili evropskou populaci, kde se vyskytují oba tyto cytotypy. Již dříve se uvažovalo o potenciální hybridizaci druhů *M. spicatum* a *M. sibiricum*. Tato hybridizace s největší pravděpodobností ovlivňuje jak invazní trend rostliny, tak i evoluční změny ve velikosti genomu. Hybridizace těchto druhů byla zatím prokázána pouze na lokalitách Spojených států amerických. Veškeré tyto zjištění podporují hypotézu o vyšší invaznosti polyploidů. Polyploidní druhy se mezi invazními druhy vyskytují častěji než druhy diploidní. Jejich vyšší úspěšnost může být dána větší variabilitou genů, získanou polyploidizací a případnými genovými subfunkcionalizacemi.

Velikost genomu (2C) se pohybovala v rozmezí od 0,41 pg u diploidního *M. humile* ($2n = 14$) do 2,66 pg u nonaploidního *M. sibiricum* ($2n = 63$). Tato zjištění svědčí o podrobné studii kompozice cytotypů. Pomocí karyologických analýz došlo k potvrzení počtu chromozomů ve všech zastoupených druzích.

Na základě molekulární analýzy jsme nyní schopni rozpoznat rozdíly mezi primární a sekundární oblastí výskytu. Kompletní diferenciacce nastala v případě hexaploidního *M. sibiricum* z jedné heterogenní populace shromážděné ve Švédsku. Vzorky ze Švédska dominují v rozdílu a jejich velikost genomu se překrývá s populacemi shromážděnými ve

Spojených státech. Tento náhled by nám mohl říci více o invazivním šíření této rostliny z Evropy. Toto zjištění nás přivádí na myšlenku teorie rozšíření tohoto rodu do USA ze střední Evropy.

Z dosavadních výsledků mé práce by nemělo být prisuzováno invazivní chování amerických populací rozdílům v kopiích genomu, ale spíše adaptaci na nové prostředí na úrovni genů. Navíc nepovažuji zřejmý rozdíl ve velikosti genomu za základní faktor masivního šíření, a to i přes určitý posun směrem k vyššímu množství DNA v invazivních populacích v Severní Americe. Budoucí výzkum bych směřovala spíše na roli enviromentálních a ekologických faktorů, které by mohly umožnit invazní růst stolítků/ či chrastice i jejich kříženců.

Seznam publikovaných prací:

Impaktové publikace:

Anderson, Neil O.; Kavova, Tereza; Bastlova, Dasa; et al. Phenotypic and Genotypic Variation in Czech Forage, Ornamental and Wild Populations of Reed Canarygrass. CROP SCIENCE ,Volume: 56, Issue: 5, Pages: 2421-2435, Published: SEP-OCT 2016.

Vědecké publikace:

Tereza Kávová, Barbora Kubátová, Vladislav Čurn and Neil O. Anderson. Genetic Variability of US and Czech Phalaris Arundinacea L. Wild and Cultivated Populations. Agricultural and Biological Sciences, New Perspectives in Forage Crops, ISBN 978-953-51-3721-4, , Published: January 17, 2018

Kávová T., Nix T., Tonka T., Čurn V. (2017): Identifikace viru šarky pomocí metody FISH. Úroda 12, roč. LXV, vědecká příloha, s. 311-313, ISSN 0139-6013

Účast na konferencích:

Bastlová, D., Kávová, T., Januš, V., Kubátová, B., Čurn, V., Edwards, K. R., Čížková, H., Květ, J. (2013) Do we really have aggressive native Czech genotypes of Phalaris arundinacea L. ? SWS Annual Meeting 2-6 June, 2013, Duluth, Minnesota

Bastlová, D., Kávová, T., Januš, V., Kubátová, B., Čurn, V., Edwards, K. R., Čížková, H., Květ, J. (2013) Existují agresivní původní české genotypy chřastice rákosovité (Phalaris arundinacea L.) ? Konference Ekologie 2013 v Brně 18.-20.10.2013 Anderson, N. O.

Bastlová, D., Kávová, T., Januš, V., Kubátová, B., Čurn, V., Edwards, K. R., Anderson, N. O., Čížková, H., Květ, J. (2014) Expansiveness of wild and ornamental European Phalaris arundinacea L. genotypes. "Wetlands 2014", International Wetlands Conference Huesca, Sept. 14-18,2014

Kubátová, B., Trávníček, P., Prančl, J., Kávová, T., Hrdinová, M., Mandáková, T., Anderson, N. O., (2015) Is invasiveness of Myriophyllum L. (Haloragaceae) triggered by

polyploidization? Ploidy Level Variation and Genome Size in the USA and Europe. SWS Annual Meeting 31.5-4.6, 2015, Providence, Rhodes Island, USA.

Kávová, T., Kubátová B. Trávníček, P. Prančl, J., Anderson, N.O. Ploidy Level Variation and Genome Size in genus *Myriophyllum*. PopBio, Halle/ Saale, Germany, 18-20.5.2017

Kávová, T., Kubátová B. Trávníček, P. Prančl, J., Anderson, N.O. Cytotype and molecular variability of *Myriophyllum* L. 2nd World Biotechnology Congress, Sao Paulo, Brazil, 4-5.12.2017.

Vědecké projekty:

AMVIS LH11039 „Srovnávací studie agresivních invazních amerických a původních agresivních a neagresivních evropských populací chřastice rákosovité (*Phalaris arundinacea*)“.
- člen řešitelského týmu.

LH - KONTAKT II 12099: Je polyploidizace spouštěcím mechanismem invazivního chování vodních rostlin? Příběh stolístků.
- člen řešitelského týmu

GAJU 109/2015/Z: Genetická a cytogenetická variabilita stolístku *Myriophyllum sibiricum*.
Odlíší se populace v nativním a invazním areálu druhu?
Hlavní řešitel

Certifikované metodiky

Čítek J., Večerek L., Hanusová L., Samková E., Hanuš O., Křížová Z., Kávová T., Jelínková I., Kala R. (2018): Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka. Certifikovaná metodika. ZF JU České Budějovic

Seznam použité literatury

- AIKEN, S.G. (1978) Counts on Haloragaceae p. 522 In: IOPB Chromosome Number Reports Taxon 27:519-535.
- AIKEN, S.G. (1981) A conspectus of Myriophyllum (Haloragaceae) in North America. *Brittonia* 33: p.57-69.
- AIKEN, S.G., NEWROTH, P.R., AND WILE, I. (1979) The biology of Canadian weeds. 34. *Myriophyllum spicatum* L. *Canadian Journal of Plant Science* 59: p.201-215.
- AINOUCHE, M., CHELAICHA, H., FERREIRA, J., BELLOT, S., SALMON, A. (2012) Polyploid evolution in *Spartina*: dealing with highly redundant hybrid genomes. Springer, Berlin, pp 225–243.
- AYRES, E., HEALTH, J., POSSELL, M., BLACK, KERSTIENS, H., BARDGETT, D. (2004) Tree physiological responses to above- ground herbivory directly modify below- ground processes of soil carbon and nitrogen cycling. *Ecology Letters*, 7, 469– 479.
- BOCK et al. (2015) What we still don't know about invasion genetics. *Mol Ecol.* 2015 May;24(9):2277-97. doi: 10.1111/mec.13032. Epub 2015 Jan 9.
- BALDWIN, BG., SANDERSON, MJ., PORTER, JM., CAMPBELL, CS., DONOGHUE, MJ. (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277
- BALLVORA, A., Hesselbach J., Niewohner J., Leister D., Salamini F., Gebhardt C. (1995) Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harboring the nematode resistance gene *Gro1*. *Molecular Genetics and Genomics*, 249: 82-90.
- CAMPBELL, CS et OGDEN, M. H. (1999) *Constructed Wetlands in the Sustainable Landscape*. New York: John Wiley & Sons.
- CEATANO-ANOLLÉS, G, GRESSHOFF, PM (1998) DNA markers. *Protocols, applications, and overviews*. 1-13.
- CILLIERS, C.J. (1999) *Lysathia* n. sp. (Coleoptera : Chrysomelidae), a host-specific beetle for the control of the aquatic weed *Myriophyllum aquaticum* (Haloragaceae) in South Africa. *Hydrobiologia* 415: p.271-276.
- CIRUJANO, S., AND MEDINA, L. (1997) *Myriophyllum heterophyllum* Michx. (Haloragaceae), naturalized in Spain. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 55: p.164-165.
- CLEGG, S. DEGNAN, S., KIKKAWA, J., MORITZ, C., ESTOUP, A., OWENS, I. (2002) Genetic consequences of sequential founder events by an island-colonizing bird. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11;99(12):8127-32. Epub 2002 May 28.
- COUCH, R. and NELSON, E. (1985). *Myriophyllum spicatum* in North America. *Proceedings of the first international symposium on watermilfoil (Myriophyllum spicatum) and related Haloragaceae species*. Aquatic Plant Management Society, Washington D.C.
- COOK, C.D.K. (1968) Haloragaceae. In T. G. Tutin [ed.], *Flora Europaea* 2. Cambridge. 311–312.
- COOK, C.D.K., B.J. GUT, E.M. RIX, J. SCHNELLER [ONLINE] (1974): *Water plants of the world*. Dr. W. Junk.
- DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., AND SUDA, J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: p.2233-2244.
- DUKES, J., MOONEY, H. (1999) Does global change increase the success of biological invaders? *Trends Ecol Evol.* 1999 Apr;14(4):135-139.
- EHRENFELD, J. G. (2003) Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. *Ecosystems*, 6, 503-523.
- ELLSTRAND, N.C. & K.A. SCHIERENBECK (2000): Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 7043–7050.
- ESTADES, C. F., TEMPLE, S. A. (1999). Deciduous-forest bird communities in a fragmented landscape dominated by exotic pine plantations. *Ecological Applications*, 9, 573-585.
- FELINER G., ROSSELÓ J. (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 911-91.
- GALOWITSCH, S. M., ANDERSON, N. O. & ASCHER, P. D. (1999) Invasiveness in wetland plants in temperate North America. *Wetlands*, 19, 733–755.
- GALOWITSCH, S. M., WHITES, D. C., LEHTINEN, R., HUSVETD, J. & SCHIK, K. (2000) The vegetation of wet meadows in relation to their land-use. *Environmental Monitoring and Assessment*, 60, 121–144.
- GARCÍA-BERTHOU et al. (2005). Introduction pathways and establishment rates of invasive aquatic species in Europe. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 62. 453-463. 10.1139/f05-017.
- GEIST, H. (Ed.). (2006) *Our Earth's Changing Land: an Encyclopedia of Land-use and Land-cover Change*. Westport: Greenwood.
- GUPTA, P.K. & R.K. Varshney. (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113: 163–185

- HANTULA J., Dusabenygasani, M., Hamelin, R.C. (1996) Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 26: 159-166.
- HEGARTY, M.J., AND HISCOCK, S.J. (2008) Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current Biology* 18: p.R435-R444.
- HOFSTRA, D.E., K.D. ADAM & J.S. CLAYTON (1995): Isozyme variation in New Zealand populations of hybridization with northern watermilfoil in North America. *Journal of Aquatic Plant Management*, 50.
- CHAKRABARTI, S.K., Pattanayak D., Sarmat D., Chimote V.P., Naik P.S. (2006) Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biologia Plantarum*, 50: 531-536.
- CHAMBERS, P.A., P. LACOUL, K.J. MURPHY & S.M. THOMAZ (2008): Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1): 9–26.
- CHEN, L.-Y., S.-Y. ZHAO, K.-S. MAO, D.H. LES, Q.-F. WANG, M.L. MOODY (2014) Historical biogeography of Haloragaceae: an out-of-Australia hypothesis with multiple intercontinental dispersals. *Mol Phylogenet Evol.* 2014 Sep;78:87-95. doi: 10.1016/j.ympev.2014.04.030. Epub 2014 May 17.
- JAKUBOWSKI, A. R., Casler, M. D. & Jackson, R.D. (2010) Landscape context predicts Reed Canarygrass invasion: implications for management. *Wetlands*, 30: 685-692.
- JAKUBOWSKI, A.R., Jackson, R., Johnson, R.C., Hu, J., Casler, M. (2011) Genetic diversity and population structure of Euroasian populations of reed canarygrass: cytotypes, cultivars, and interspecific hybrids. *Crop & Pasture Science*, 25: 445-498.
- JARNE, P. & LAGODA, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 424–429.
- KELLY, A. GOULDEN, M. (2008) Rapid shifts in plant distribution with recent climate change. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 19;105(33):11823-6. doi: 10.1073/pnas.0802891105. Epub 2008 Aug 12.
- KARP, A., EDWARDS, K.J. (1997) Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges. *Nature Biotechnology*. August 1997.
- KERCHER, S.M. & ZEDLER, J.B. (2004a) Multiple disturbances accelerate invasion of reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.) in a mesocosm study. *Oecologia*, 138: 455–464.
- KERCHER, S.M. & ZEDLER, J.B. (2004b) Flood tolerance in wetland angiosperms: a comparison of invasive and noninvasive species. *Aquatic Botany*, 80: 89-102. 56.
- KERCHER, S.M., HERR-TUROFF, A., & ZEDLER, J.B. (2007) Understanding invasion as a process: the case of *Phalaris arundinacea* in wet prairies. *Biological Invasions*, 9: 657- 665.
- KETTUNEN, M., GENOVESI, P., GOLLASH, S., et al. (2008) Technical support to EU strategy on invasive species (IAS) - Assessment of the impacts of IAS in Europe and the EU. Institute for European Environmental Policy (IEEP), Brussels, Belgium. 44 pp. + Annexes.
- KOC, C. (2008) The Influence of Drainage Projects on Environmental and Wetland Ecology. *American Institute of Chemical Engineers Environmental Progress* 27 (3): 353-364.
- KONEČNÝ, A., ESOUPE, A., DUPLANTIER, J., BRYJA, J., BA, K., GALAN, M. (2013) Invasion genetics of the introduced black rat (*Rattus rattus*) in Senegal, West Africa. *Mol Ecol.* 2013 Jan;22(2):286-300. doi: 10.1111/mec.12112. Epub 2012 Dec 3.
- KRAHULCOVÁ, A. (1998) Karyologie cévnatých rostlin při aplikaci metod klasického barvení chromozómů. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Průhonice.
- KRON, P., J. SUDA, AND B.C. HUSBAND. (2007) Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: p.847-876.
- LEGER, E. AND RICE, K. J. (2003) Invasive California poppies (*Eschscholzia californica* Cham.) grow larger than native individuals under reduced competition. *Ecology letters* 6 (3), 257-264.
- LAFUMA, L., K. BALKWILL, E. IMBERT, R. VERLAQUE & S. MAURICE (2003) Ploidy level and origin of the European invasive weed *Senecio inaequidens* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, 243(1–2): 59–72.
- LEITCH, I.J. & BENNETT, M.D. (2004) Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*. Volem82, Issue 4, pp651-663.
- LAVERGNE, S. & MOLOFSKY, J. (2007) Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *The Proceedings of National Academy of Science USA*, 104: 3883–3888.
- LAVERGNE, S. & MOLOFSKY, J. (2004) Reed canary grass (*Phalaris arundinacea*) as a biological model in the study of plant invasions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23: 415-429.

- LAVERGNE, S. & MOLOFSKY, J. (2006) Control strategies for the invasive reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.) in North American wetlands: The need for an integrated management plan. *Natural Areas Journal*, 26: 208-214.
- LERCETEAU, E., ROBERT, T., PÉTIARD V., GROUZILLAT, D. (1997). Evolution of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 10-19.
- LEWANDOWSKI, I. & SCHMIDT, U. (2006) Nitrogen, energy and land use efficiencies of miscanthus, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 112: 335–346.
- LEWANDOWSKI, I., SCURLOCK, J.M.O., LINDVALL, E. & CHRISTOU, M. (2003) The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe, *Biomass and Bioenergy*, 25: 335 – 361.
- LEWIS, R. SUTTER & A. MORTIMER (2009) Molecular characterization of Eurasian watermilfoil, northern milfoil, and the invasive interspecific hybrid in Michigan lakes. *J. Aquat. Plant Manage.* 47: 128-135.
- LIAO, C., PENG, R., LUO, Y., ZHOU, X., WU, X., FANG, C., CHEN, J., LI, B. (2008) Altered ecosystem carbon and nitrogen cycles by plant invasion: a meta- analysis. *New Phytologist*, 177, 706-714.
- LINDHOLM, T., E. RÖNNHOLM & K. HÄGGQVIST (2008) Changes due to invasion of *Myriophyllum sibiricum*, *Linnean Society*, 82: 651 – 663.
- LOCKWOOD, J., HOOPES, M., MARCHETTI, M. (2007) *Invasion Ecology*, 2nd Edition, Oxford.
- LÖVE, Á. (1954) Cytotaxonomical evaluation of corresponding taxa. *Vegetatio* 5: p.212-224.
- LÖVE, Á., AND LÖVE, D. (1961) Chromosome number of central and northwestern European plant species. *Almqvist & Wiksell*, Stockholm.
- LÖVE, Á., AND LÖVE, D. (1948) Chromosome numbers of northern plant species. *Inoólfsprent*, Reykjavík.
- MADSEN, J.D., J.W. SUTHERLAND, J.A. BLOOMFIELD, L.W. EICHLER, AND. BOYLEN, C.W. (1991) The decline of native vegetation under dense Eurasian watermilfoil canopies. *Journal of Aquatic Plant Management* 29: p.94-99.
- MAI, J.C., COLEMAN, A. (1997) The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants – *Journal of Molecular Evolution* 44: 258-271. *Management* 47: 128–135.
- MAURER, D. A. & ZEDLER, J. B. (2002) Differential invasion of a wetland grass explained by tests of nutrients and light availability on establishment and clonal growth. *Oecologia*, 131: 279-288.
- MITCH, W. J. et GOSSELING, J. G. (1993) *Wetlands*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- MOODY, M.L. & LES, D.H. (2007b) Phylogenetic systematics and character evolution in the angiosperm family Haloragaceae. *American Journal of Botany* 94: 2005-2025.
- MOODY, M.L. & LES, D.H. (2002) Evidence of hybridity in invasive watermilfoil (*Myriophyllum*) populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences Of the United States of America* 99: 14867-14871.
- MOODY, M.L. & LES, D.H.. (2010) Systematics of the aquatic angiosperm genus *Myriophyllum* (Haloragaceae). *Systematic Botany* 35: 121-139.
- NEWMAN, R.M., & WELLING, C.H.(2004) Biological control of Eurasian watermilfoil completion report for 2001-2004.
- NICHOLS, S.A. (1975) Identification and management of Eurasian water milfoil in Wisconsin. *Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts, and Letters* 63: p.116-128.
- NICHOLS, S.A., AND G. COTTAM. (1972) Harvesting as a control for aquatic plants. *Water Resources Bulletin* 8: p.1205-1210.
- OBORNÍK, M., KLÍČ, M., ŽIŽKA, L. (2000) Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany-revue Canadienne de Botanique*, 78: 1150-1155.
- PIMENTEL, D., LACH, J.L., ZUNIGA, R., AND MORRISON, D. (2000) Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. 50: p.53-65. *Polyploidy and genome evolution*. Springer, New York: 225–244.
- POGAN, E., JANKUN, A., AND SAWICKA, Z. (1989) Further studies in chromosome numbers of Polish angiosperms. *Acta Biologica Cracoviensia* 31: p.1-17.
- PYŠEK, P. AND TICHÝ, L. (2001): Rostlinné invaze. Principy rostlinných invazí a expanzí, jejich vliv na původní rostlinná společenstva a příklady našich invazních druhů. – Rezekvítek, Brno.
- REJMÁNEK, M. (1996) A theory of seed plant invasiveness: the first sketch. *Biological Conservation*, 78, 171– 181.
- REITER, R.S., WILIAMS J.G.K., FELDMANN K.A., RAFALSKI J.A., TINGEY S.D., SCOLNIK P.A. (1992) Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lined and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 1477-1481.
- RICHARDSON, D. M., BOND, W. J., RICHARD, W., DEAN, J., HIGGINS, S. I. Et al. (2000) Invasive alien species and global change: a South African perspective. 303–349. In: Mooney H. A., Hobbs, R. J. (Eds). *Invasive species in a changing world* (2000). Island Press, Washington D. C.

- SAAD, L., M-S. TIÉBRÉ, O.J. HARDY, G. MAHY & S. VANDERHOEVEN (2011) Patterns of hybridization and hybrid survival in the invasive alien *Fallopia* complex (Polygonaceae). *Plant Ecology and Evolution*, 144 (1): 12–18.
- SAKAI, A., ALLENDORF, F.W., HOLT, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Cabin, R.J., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C., McCauley, D.E., O'Neill, P., Parker, I.M., Thompson, J.N. & Weller, S.G. (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32: 305–332.
- SCOTT, M., Haymes M., Williams S.M. (1992) Parentage analysis using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res.* 20: 5493.
- SEIMON, A., S.R.P. HALLOY, and T.A. SEIMON (2007) Recent observation of a proliferation of *Ranunculus*. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32: 305–332.
- SHAW, J, LICKEY, E. B, BECK, J. T, FARMER, S. B et al. (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Bot.* Jan;92(1):142-66.
- SHEPPARD, A.W., SHAW, R.H., AND SFORZA, R. (2006) Top 20 environmental weeds for classical biological control in Europe : a review of opportunities, regulations and other barriers to adoption. *Weed Research* 46: p.93-117.
- SCHMIDT, K. A., NELIS, L. C., BRIGGS, N., OSTFELD, R. S. (2005). Invasive shrubs and songbird nesting success: effects of climate variability and predator abundance. *Ecological Applications*, 15, 258-265.
- SCHMIDT, K. A., WHELAN, C. J. (1999) Effects of exotic *Lonicera* and *Rhamnus* on songbird nest predation. *Conservation Biology*, 13, 1502–1506.
- SCHNEIDER, J., BUČEK, A., ŘEPKA, R., KUPEC, P., REBROŠOVA, K., MERTIN, T. (2010). Péče o chráněná území: Invazní a neofytní druhy a jejich management. Ústav tvorby a ochrany - 46 - krajiny, Mendelova Univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta.
- SIMBERHOFF D., VON HOLLE B. (1999) Positive Interactions of Nonindigenous Species: Invasional Meltdown? *Biological Invasions*, March 1999, Volume 1, Issue 1, pp 21–32.
- SPYREAS, G., WILM, B. V., PLOCHER, A. E et al. (2010) Biological consequences of invasion by Reed Canary Grass (*Phalaris arundinacea*). *Biological Invasions*, 12, 1253-1267.
- SOLTIS, D.E., KUZOFF, R.K.(1995) Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the *Heuchera* group (Saxifragaceae). *International journal of organic evolution*. August 1995, pp. 772-742.
- STROFER, A. (1999) gene flow and endangered species translocation, a topic revised. *Biological Conversation*, 87, 179-180.
- STURTEVANT, A.P. et al. (2009) Molecular characterization of Eurasian watermilfoil, Northern milfoil, and the invasive interspecific hybrid in Michigan lakes. *Journal of Aquatic Plant Management* 47: p.128-135.
- SUDA, J., AND PYŠEK, P. (2010) Flow cytometry in botanical research: introduction. *Preslia* 82: p.1-2.
- TABERLET, P. et al. (1991) Universal Primers For Amplification Of 3 Noncoding Regions Of Chloroplast Dna. *Plant Molecular Biology* 17(5):1105-9 · December 1991.
- THUM, R.A., AND LENNON, J.T. (2006) Is hybridization responsible for invasive growth of non-indigenous water-milfoils? *Biological Invasions* 8: p.1061-1066.
- THUM, R.A., AND LENNON, J.T. (2010) Comparative ecological niche models predict the invasive spread of variable-leaf milfoil (*Myriophyllum heterophyllum*) and its potential impact on closely related native species. *Biological Invasions* 12: p.133-143.
- THUM, R.A., ZUELLIG, M.P., JOHNSON, R.L., MOODY, M.L., AND VOSSBRINCK, C. (2011) Molecular markers reconstruct the invasion history of variable leaf watermilfoil (*Myriophyllum heterophyllum*) and distinguish it from closely related species. *Biological Invasions* 13: p.1687-1709.
- UNGERER, M.C., BAIRD, S.J.E., PAN, J., AND RIESEBERG, L.H. (1998) Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: p.11757-11762.
- UZUNOVA, M., ECKE W., WEISSELER K., RÖBBELN G. (1995) Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 194-204.
- VOSHELL, S., KHIDIR W. (2014) Canary grasses (*Phalaris*, Poaceae): biogeography, molecular dating and the role of floret structure in dispersal, Published 2014 in *Molecular ecology* DOI:10.1111/mec.12575.
- WILSON, JR, DORMONTT, EE ET AL. (2009) Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends Ecol Evol.* 2009 Mar;24(3):136-44. doi: 10.1016/j.tree.2008.10.007. Epub 2009 Jan 27.
- WISSEMANN, V. (2007) Plant evolution by means of hybridization. *Systematics and Biodiversity* 5: p.243- 253.
- WINTER ET AL., (2009) Plant extinctions and introductions lead to phylogenetic and taxonomic homogenization of the European flora, *Proceedings of the National Academy of Sciences* Dec 2009, 106 (51) 21721 21725; DOI:10.1073/pnas.0907088106.
- WERNER, K. J. & ZEDLER, J. B. (2002) How sedge meadow soils, microtopography, and vegetation respond to sedimentation. *Wetlands*, 22: 451-466.

- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE S., TAYLOR J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics – A Guide to Methods and Application, 315-322.
- WU, Z.-G., D. YU & X.-W. XU (2013) Development of microsatellite markers in the hexaploid aquatic. *Applications in Plant Sciences* 2013 1 (2): 1200230.
- YU, D., W. DONG, L. ZHEN-YU, AND M.M. FUNSTON. 2002. Taxonomic revision of the genus *Myriophyllum* (Haloragaceae) in China. *Rhodora* 104: p.396-421.
- ZIETKIEWICS, E., Rafalski A., Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase Chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.
- ZUELLIG, M. P., & THUM, R.A. (2012) Multiple introductions of invasive Eurasian watermilfoil and recurrent hybridization with northern watermilfoil in North America. *Journal of Aquatic Plant Management*, 50:1–19.