

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

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně, na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne 19.3.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou v první řadě poděkovala prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu pomoci, trpělivost, vstřícný a vždy laskavý přístup. Svě mentorce Ing. Barboře Kubátové, Ph.D. za celostudijní koučing, pevné vedení, které se převrátilo v pevné přátelství. Děkuji všem participantům grantových projektů, jmenovitě- Ing. Mgr. Pavlu Trávníčkovi Ph.D., Mgr. Honzovi Prančlovi, Mgr. Magdě Schafferové, RNDr. Janu (Honymu) Květovi, prof. RNDr. Haně Čížkové, CSc., Mgr. Dáše Bastlové, Ph.D. a prof. Neilovi Andersonovi, bez kterých by projekty nebyly tak úspěšné, jak byly. Děkuji své rodině za vytvoření láskyplného konkurenčního prostředí, kdy mě otec obhájením svého MBA v sedmdesáti letech donutil k sepsání disertační práce. Můj poslední dík patří mému partnerovi, který mne dočasně zbavil povinností, poskytl mi prostor pro psaní a byl absolutní nekončící emoční podporou.

Seznam publikovaných prací:

Impaktivní 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 stolítků.

- člen řešitelského týmu

GAJU 109/2015/Z: Genetická a cytogenetická variabilita stolítku *Myriophyllum sibiricum*. Odlišují 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 Budějovice.

Obsah

Seznam publikovaných prací:	4
Abstrakt.....	8
Abstract	10
Úvod	12
Literární přehled	15
Invazní chování.....	15
Mokřadní a vodní invazní druhy.....	17
Populační genetik a invazních druhů.....	19
Hybridizace a polyploidizace.....	21
a/ Hybridizace.....	21
b/ Polyploidizace	21
Molekulárně genetická analýza populací invazních druhů	23
Molekulární markery používané v populační genetice.....	24
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	24
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	24
Mikrosatelity (SSR, Simple Sequence Repeats)	24
ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)	25
Geny pro ribozomální DNA – ITS (Internal transcribed spacer).....	26
Chloroplastová DNA - nekódující oblasti cpDNA.....	26
Cytogenetické metody užívané v populační genetice	28
a/ Průtoková cytometrie	28
b/ Karyologické analýzy	28
Hypotézy a cíle disertační práce	30

<i>Phalaris arundinacea</i> L. jako významná invazní mokřadní rostlina v Severní Americe	31
Ekologie <i>P. arundinacea</i>	32
Variabilita <i>P. arundinacea</i>	33
a/ Cytologická variabilita	33
b/ Genetická variabilita	34
Publikované výsledky a komentář k získaným výsledkům	37
Genetická variabilita planých a kultivovaných populací <i>Phalaris arundinacea</i> L. v USA a v České republice	38
Fenotypová a genotypová variabilita v českých pícninách, okrasných a divokých populacích <i>Phalaris arundinacea</i> L.	40
<i>Myriophyllum</i> L., invazní vodní rostlina v Severní Americe	76
<i>Myriophyllum</i> L.	77
Ekologie	78
Invazní chování	79
Cytotypová variabilita <i>Myriophyllum</i> L.	80
Publikované výsledky a komentář k získaným výsledkům	81
Genetická a cytogenetická variabilita v populacích stolístků.....	82
Sampling.....	Chyba! Záložka není definována.
Cytometrické analýzy.....	84
Molekulární analýzy.....	84
Výsledky a diskuze cytogenetické variability a velikosti genomu.....	86
Výsledky a diskuze molekulárně-genetických analýz.....	96
Závěr	102
Použitá Literatura.....	115

Abstrakt

Jedna z hypotéz o příčinách invazního šíření chrastice rákosovité v USA je, že podobně jako u rákosu obecného, došlo k opakovaným introdukcím druhu 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 management 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 stolítků (*Myriophyllum*) na území USA, cytologickým a populačně-genetickým srovnáním nativních (Eurasie) a invazních populací (USA) stolítku 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 stolítků a tedy i nároků na management jeho invazních populací.

Klíčová slova: *Phalaris arundinacea*, molekulární variabilita, cytogenetická variabilita, ISSR markery, průtoková cytometrie, *Myriophyllum* L., SSR, ITS

Abstract

One of the hypotheses about the causes of invasive transmission of *Phalaris arundinacea* in the US is, that this species have repeatedly introduced from Europe or by hybridization of the introduced genotypes with the native species. This is the same situation as *Phragmites australis*. Part of this intercontinental gene flow is enhanced by the production of *Phalaris* cultivars in Minnesota. The consequences of these exchanges have a significant impact on the management of invasive crops from both continents. Previous studies confirm only minimal morphological heterogeneity between cultivated and native (wild) forms of *Phalaris arundinacea*. In *Phalaris arundinacea*, we analyzed genetic similarities and differences between the US populations (Minnesota) and population of the Czech Republic. The extent of genetic variation in native and invasive populations was compared using ISSR markers. The occurrence of commercial genotypes was observed across the full spectrum of invasive genotypes, which suggests a relatively frequent exchange of genes among forage, ornamental, and native US populations. The genus *Myriophyllum* is mainly significant because of its invasive species, which have always been in a special position as the course of ecological and evolutionary changes may be observed in real time. In Central Europe it is represented by three native species (*M. spicatum* L., *M. alterniflorum* and *M. verticillatum*) and two non-native species of North American *M. heterophyllum* and South American *M. aquaticum*. Species *M. spicatum*, together with *M. heterophyllum* and *M. aquaticum*, is one of the most important invasive plants that, due to their aggressive growth, cause many problems, especially in North America. The main theme of this Ph.D. is the evaluation of the role of polyploidization in processes leading to invasive character of some species of the genus *Myriophyllum* in the USA, cytological and population-genetic comparison of native (Eurasia) and invasive populations (US) of *Myriophyllum spicatum*. Moreover, possible "Pools" of genetic and cytotype variability of invasive populations and evaluation of usability of simple genome size were determined in taxonomic determination by classical morphological procedure of unclassifiable plants, which might reduce the cost and efficiency of invasive stool biomonitoring and thus the management of its invasive populations.

Key words: *Phalaris arundinacea*, molecular variability, cytogenetic variability, ISSR markers, flow cytometry, *Myriophyllum* L., SSR, ITS

Úvod

Introdukce nepůvodních druhů rostlin je všudypřítomný globálním problémem s negativními ekologickými i ekonomickými dopady. Zvyšující se počet invazních organismů je odpovědný za celou řadu negativních jevů jako například narušení funkce ekosystémů, lokálnímu potlačení až vymizení druhů, dopad do zemědělské výroby v podobě neúrody, snížení zásobování vodou a dokonce poškození průmyslových infrastruktur. Kromě dopadu na přírodu (biodiverzitu a ekologické procesy) mají nepůvodní druhy vliv na celé spektrum ekonomických aktivit (plevelé v zemědělství, přenašeči původců onemocnění a škůdců, šíření nových škodlivých agens, narušování infrastruktury atd.). Invazní druhy představují významnou a rychle narůstající hrozbu pro původní biologickou rozmanitost po celém světě.

Právě zhodnocení vlivu nepůvodních organismů je klíčové s ohledem na stanovení priorit ochrany přírody, managementu stanovišť, preventivních opatření a karanténních opatření např. v zemědělství. Důležité je proto včasné odhalení invazního chování daného druhu a preventivní opatření. Je daleko snazší a ekonomicky efektivnější zasáhnout proti nově přichozím druhům předtím, než v novém prostředí zdomácní a získají charakter invazního druhu. I z těchto důvodů, je třeba zvyšovat povědomí veřejnosti o invazivních druzích a nacházet techniky, kterými vymežíme nativní a invazní druhy. Pochopení mechanismů, které umožňují některým druhům stát se invazními, je nezbytné pro určení vhodného způsobu managementu, popřípadě likvidaci. Jednou z možností, která by mohla mít vliv na invazní úspěch druhu, je jeho genetická struktura a genetické založení znaků podmiňujících jeho invazní chování. Výzkum směřovaný do této oblasti by mohl pomoci odhalit příčiny invazního chování a předvídat šíření invazních druhů. Rozsah genetické variability a genetická determinace znaků invazního charakteru může mít vliv na to, zda se bude druh dále šířit. Druhy s velkou genetickou variabilitou či schopné hybridizace mohou být invazně úspěšné, protože mohou vykazovat vyšší míru plasticity, která jim nadále napomáhá přizpůsobit se různým prostředím a různým ekologickým podmínkám. Genetická struktura poskytuje náhled do historie druhu, jeho migrací nebo do vztahů mezi jednotlivými populacemi. Genetická variabilita, existující či nově vzniklá vnitrodruhovou nebo vzdálenou hybridizací, může přispět ke schopnosti druhu šířit se, zejména pokud je spojena s

fenotypovými změnami podporujícími fitness genotypu. Velká genotypová diverzita může invaznímu druhu propůjčit výhody. Díky nim může mít druh různé odpovědi na různé ekologické podmínky.

Pro studium genetické struktury invazních rostlin, determinaci znaků invazního charakteru jsou používány moderní přístupy a spektrum cytogenetických, molekulárních a ekologických technik. Tyto metodické nástroje pak mohou osvětlit jak celogenomové procesy (např. polyploidizace, změny obsahu DNA, hybridizace, strukturální přestavby genomu) ovlivňují vlastnosti, které podmiňují invazní chování zavlečených druhů rostlin.

Pro svou práci jsem si vybrala dvě modelové skupiny, zástupce mokřadních a vodních ekosystémů. *Phalaris arundinacea* jako zástupce mokřadní invazní flóry a *Myriophyllum* sp., jako zástupce vodních invazních druhů. Tyto druhy/rody mají společného jmenovatele ve formě nativního areálu v Evropě a invazního charakteru v sekundárním areálu výskytu, v Severní Americe.

Phalaris arundinacea L., chrastice rákosovitá, reedcanary grass, je invazivní a rychle se šířící druh, který zaujímá vhodná místa v přirozených ekosystémech a mění povahu vegetace v invadovaných oblastech. V Severní Americe se vyskytují jak ve velké míře invazní, tak i v omezeném rozsahu populace nativní. Předpokládá se, že invazivní americké genotypy ve skutečnosti vznikly z evropských okrasných a zemědělsky využívaných kultivarů, nebo došlo k hybridizaci mezi původními americkými populacemi a kultivovanými formami. *P. arundinacea* pochází z Evropy. Běžně se vyskytuje i v České republice, ale za určitých podmínek může být velmi agresivní a rychle se šíří po vlhkých loukách nebo okrajích vodních toků, což vede k tvorbě monodominantních specifických porostů. Není známo, zda se v agresivitě liší různé genotypy tohoto druhu. V posledních letech došlo k masivnímu rozšíření *P. arundinacea* v Severní Americe (v současné době se invazní populace vyskytují v 43 amerických státech) a Kanadě. Cílem disertační práce byla analýza genetické variability a porovnání populací nativních z České republiky a invazních z Minnesoty.

Myriophyllum sp. L., stolístek, watermilfoil, je největším rodem vodních rostlin čeledi *Haloragaceae*. Centrum diverzity a evoluce tohoto kosmopolitního rodu je Austrálie. Determinace a taxonomická klasifikace stolístků je značně problematická. Jedním ze zásadních faktorů je cytotypová variabilita populací a polyploidie, která ve světle předchozích studií nabízí zcela nový pohled na problematiku stolístků. Podle předběžných výzkumů lze na základě ploidie zjištěné za použití průtokové cytometrie jednoznačně rozlišit středoevropské druhy. Díky tomu je možné odhalit, jestli existují smíšené populace jednotlivých druhů, zda mezi nimi probíhá hybridizace a jaké ekologické zákonitosti jsou s tím spojené. Zástupci rodu *Myriophyllum* jsou i významnými invazními vodními rostlinami. Mezi druhy tohoto rodu zastoupenými v Severní Americe jsou tři z nich invazní: *M. spicatum*, pocházející z Evropy, Asie a severní Afriky je zde nejvíce agresivní. *M. heterophyllum* pocházející z východní části Severní Ameriky, invazivní v severovýchodní části USA. *M. aquaticum* je původem ze S. Ameriky, ale stejně jako jiné druhy rodu *Myriophyllum* se snadno šíří a tento druh se stal invazivním v mnoha oblastech Severní Ameriky.

Cílem disertační práce byla analýza velikosti genomu a ploidní heterogenity u nativních a invazních populací a vyhodnocení genetické variability v analyzovaných populacích.

Literární přehled

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 početné populace, 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 ani 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 ani fakt, ke kterému dochází sekundárně, v důsledku zavlečení primárního invazního organismu, tzv. „*invasion meltdown*.“ V tomto případě dochází ke snažší invazi 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).

Mokřadní a vodní invazní druhy

Mokřady je možné najít v aridních i humidních oblastech, chladném i teplém podnebí, podél řek a potoků (lužní lesy, nivní údolí, rašeliniště, mokřiny, slatiniště) nebo podél mořského pobřeží, jako jsou přímořská slaniska nebo mangrove (Geist 2006). Jsou biotopem druhů organismů se specifickými nároky na charakter prostředí – jak ptáků, savců, plazů, obojživelníků a ryb, tak i řady bezobratlých a také rostlin. Mokřady, společně s vodními lokalitami, patří mezi tři biotopy s největší biologickou aktivitou.

Mokřady tvoří 6% zemské souše. Mitsch a Gosselink (1993) uvádí, že 24% invazních rostlin, které jsou považovány za světově nejrozšířenější, tvoří druhy vyskytující se především v mokřadech (Zedler and Kercher 2004). Mokřady tedy patří mezi biotopy, které jsou velmi citlivé na invaze (Galotowitsch et al. 1999, Zedler and Kercher 2004, Lavergne and Molofsky 2004, Lavergne and Molofsky 2006). Invaze poté dokáží snížit počty původních druhů, změnit kvalitu a strukturu života v mokřadech a změnit cirkulaci vody (Galotowitsch et al. 1999; Zedler and Kercher 2004; Lavergne and Molofsky 2004; Lavergne and Molofsky 2006).

Mokřady hrají důležitou roli v eliminaci znečištění, ochraně před povodněmi a slouží jako úkryt a místo pro rozmnožování mnoha druhů živočichů (Koç 2008). Mezi hlavní funkce mokřadu patří zadržování vody v krajině, a tím ovlivnění malého vodního oběhu, tlumení průběhu povodní, podpora biodiverzity fauny a flóry, přenos živin, fixace uhlíku a ukládání uhlíku do sedimentů (Campbell 1999).

Sladkovodní ekosystémy jsou jedny z nejcitlivějších ekosystémů, které podléhají invazím. Důvodem je jejich ostrovní charakter v krajině, ale i časté podléhání atropogenním faktorům jako je např. odvodňování, regulace toků-tvorba jezů, spojování izolovaných stanovišť (kanály-lodní doprava), či jiné krajinné úpravy (García- Berthou et al. 2005). Invazemi jsou více postižené mokřady v blízkosti zemědělských ploch a měst v důsledku stékání vody a sedimentů právě z těchto míst (Galotowitsch 1999, Zedler and Kercher 2004). Mokřady, které nejsou primárně zásobeny tokem povrchové vody a nachází se ve vyšších polohách, mají obecně větší druhovou diverzitu a jsou téměř bez invazí (Zedler and Kercher

2004). Např. Dick et al. (2004) zjistili, že vodní ptactvo upřednostňuje mokřady, kde dominuje původní vegetace nad těmi, které ovládají invazivní rostliny.

K vytvoření monokultury invazních druhů vede zejména disturbance mokřadů, která vytvoří mezery (gapy) v dosavadním vegetačním krytu a ty mohou být obsazeny invazním druhem (Galowitsch 1999). Existuje několik možných způsobů, jakými se invazní rostliny šíří a rozptylují v nové oblasti. Patří mezi ně záměrné vysazování (na píce, medonosné rostliny, okrasné účely), regulace eroze či celosvětový obchod. Tyto všechny aspekty mohou poskytnout příležitost pro invazní druh rostlin (Lavergne and Molofsky 2004). Vysazený druh musí vykazovat dostatečnou genetickou variabilitu a fenotypovou plasticitu (Baker 1974). Změnou morfologické, reprodukční a fyziologických reakcí se mohou invazní druhy rozšířit. Morfologická plasticita invazních druhů přispívá k přežití náhlých změn v prostředí a přizpůsobení se novým podmínkám v sekundárním areálu výskytu (Lavergne and Molofsky 2004).

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. 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

hybridací 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 apomixií) umožnily vzniknout celé řadě blízce 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). Nežřídka 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).

Molekulárně genetická analýza populací invazních druhů

Pro studium různých aspektů biologických invazí se využívá řady metodických nástrojů a postupů. Morfologická a morfometrická analýza, analýza fyziologických parametrů, vitality, schopnosti šíření a přežívání. Umožňují nám testovat populačně specifické vlastnosti, mezipopulační interakce, geografickou variabilitu a např. mikroevoluční procesy. Kombinace více přístupů nám napomáhají lépe nahlédnout do dané problematiky. Velmi významné je hodnocení genetické a cytogenetické struktury populací, genetické variability a plasticity.

V následujícím přehledu jsou zmíněny dva okruhy metod analýzy populací invazních druhů – molekulární markery a cytogenetické metody.

Kvalitativní a kvantitativní informace týkající se úrovně genetické diverzity jsou nesmírně důležitým faktorem v mnoha oblastech biologického výzkumu, ať již základního nebo aplikovaného: evoluční biologii, taxonomii, šlechtění a ochraně genofundu. Pro „markerování“ diverzity, pro detekci polymorfismu na úrovni nukleových kyselin (zejména DNA) je možné použít celou řadu různých molekulárních technik. Většina molekulárních markerů spadá do jedné ze tří kategorií technik: techniky využívající hybridizaci; techniky založené na amplifikaci využívající náhodných primerů, multi-locus PCR); a techniky založené na amplifikaci známých cílových sekvencí, single-locus PCR. Některé techniky jsou navíc modifikacemi nebo kombinacemi dalších metodických postupů (Karp 1997). V následujícím textu budou uvedeny nejčastější metody používané v populačně - genetických studiích.

Různé genetické markery s heterogenní sekvencí jsou vhodné pro studium genetické odlišnosti na různých úrovních. Chloroplastovou, mitochondriální či nekódující úseky jaderné DNA využíváme při studiu historických procesů. Na studium recentních dějů aplikujeme hypervariabilní markery, jako např. studium mikrosatelitů.

Cytogenetika nám napomáhá v hodnocení ploidní variability a variability na úrovni velikosti genomu (množství DNA).

Molekulární markery používané v populační genetice

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD analýza je metoda založená na PCR technologii. Mezi její výhody patří rychlost (je použitelná pro rychlý screening a identifikaci vzorků) a potřeba jen velmi malého množství templátové DNA. RAPD detekuje polymorfismus v celém genomu (Oborník et al. 2000). Chakrabartiet al. (2006) upozorňuje na jednu z hlavních nevýhod této metody, a to nestabilitu poskytnutých spekter v rámci opakování, a rovněž zjistil rozdíly ve spektrech v závislosti na izolovaném pletivu a podmínkách kultivace (Scott et al. 1992). V současné době se tato metoda již řadí mezi zřídka využívané z důvodu výše zmíněných aspektů.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Technika AFLP kombinuje principy technik RFLP a PCR (VOS, et al., 1995). Vysokomolekulární genomická DNA (nebo v případě cDNA–AFLP získaná cDNA) se štěpí současně dvěma restričními endonukleázami. Na vzniklou populaci restričních fragmentů se ligují adaptory o známé sekvenci a provádí se preselektivní amplifikace. Primery pro tento amplifikační krok jsou komplementární k adaptorům s dalším selektivním nukleotidem na 3'-konci. Selektivní amplifikace se pak provádí s primery se třemi selektivními nukleotidy (v případě rostlin, resp. objektů s velkým genomem). U AFLP dochází ke kombinaci specifčnosti restričního štěpení se snadností PCR. Polymorfismus se pak zjišťuje na základě přítomnosti/nepřítomnosti a velikosti amplifikovaných fragmentů po separaci na PAGE nebo na genetickém analyzátoru (sekvenátoru). Oproti metodám RFLP a RAPD má technika AFLP řadu výhod, mezi nejdůležitější patří generování velkého množství dominantních markerů pokrývajících celý genom. Kromě využití pro identifikaci genotypů kulturních rostlin je cílena zejména pro účely mapování významných kvalitativních a kvantitativních znaků. Tato metoda nachází uplatnění také při studiu biodiverzity, přípravě markerů a genetickém mapování (Ballvora et al. 1995; Sakai et al. 2001).

Mikrosatelity (SSR, Simple Sequence Repeats)

Mikrosatelity jsou hojně využívaným populačně genetickým markerem. Jsou to kodominantní markery, krátké opakované sekvence (10-15 kopií) jedno -až

čtyřnukletidových motivů, např. (AT)_n nebo (CAG)_n, náhodně rozmístěných napříč genomem a dají se snadno amplifikovat. Detekují délkovou variabilitu – alelou je úsek o určité délce (s určitým počtem opakovaných krátkých sekvencí). K detekci těchto polymorfismů se využívá PCR amplifikace daného lokusu pomocí specifických primerů. Délka jednotlivých alel se ověřuje s využitím fluorescenčně značených primerů pomocí kapilární elektroforézy. Výhodou je vysoká variabilita a jejich kodominantnost. Jejich zvýšená mutační rychlost produkující vysoký stupeň polymorfismu je ideální při studiu vnitro a mezipopulačních struktur.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Technika ISSR markerů je modifikací techniky SSR markerů (Zietkiewics et al., 1994; Kantety et al. 1995). Kombinuje většinu výhod AFLP analýzy s univerzalitou RAPD (Gupta et al. 2000). Tato technika je založena na použití PCR amplifikace s náhodně ukotveným mikrosatelitovým motivem, založená na variabilitě v regiorech mezi mikrosatelity. Metoda využívá mikrosatelitové sekvence jako primery (16-25 bp) (Gupta et al. 2000; Wu et al.,

1994). Tyto repetitivní jednotky se vyskytují často, náhodně, v celém genomu u všech eukaryot a liší se počtem opakování. Během PCR dochází k amplifikaci úseků DNA mezi dvěma stejnými mikrosatelitovými repetitivními sekvencemi, které jsou umístěny v řetězci DNA v opačném směru. Výsledkem jsou různě dlouhé úseky DNA mezi mikrosatelity. Na rozdíl od techniky SSR není při ISSR nutná žádná předchozí znalost sekvence (Jarne and Lagoda 1996; Hantula et al. 1996). Charters et al. (1996); Zietkiewics et al., (1994) považují tuto metodu za přesnější a opakovatelnější než metodu RAPD, je však nutná optimalizace této metody. Metoda ISSR markerů zároveň poskytuje větší polymorfismus. ISSR markery jsou dominantní, ačkoli někteří autoři udávají i jejich kodominantní charakter (Fischer et al. 1996). Tato metoda má širokou škálu použití, včetně charakterizace genetické příbuznosti mezi populacemi, genetické screenování, genové značkování, zjišťování klonální variability, identifikace kultivarů, fylogenetické analýzy, detekce genomové nestability a hodnocení hybridizace (Jarne 1996).

Geny pro ribozomální DNA – ITS (Internal transcribed spacer)

Geny pro ribozomální DNA jsou nejrozšířenějšími markery v systematice. Jednou z velmi často využívanou DNA sekvencí sloužící k určení fylogenetických vztahů je u rostlin vnitřní transkribovaný mezerník (ITS) rDNA lokusu. ITS má několik jedinečných vlastností. Je to zejména dostupnost několika univerzálních nebo téměř univerzálních PCR primerů (White a kol., 1990). Malá velikost a velký počet kopií, což umožňuje přímé sekvenování PCR produktů. Úspěšná amplifikace je možná i z herbářových položek. Rychlá a souběžná evoluce a vysoká variabilita v porovnání se sousedními kódujícími oblastmi. Další výhodou je biparentální dědičnost ITS (ve srovnání s uniparentální dědičností organelové DNA). Srovnání primárních sekvencí ITS je vhodné k fylogenetickým analýzám na úrovni druhů a rodů (Baldwin and kol. 1995, Feliner and Rosselló 2007).

Jak bylo již uvedeno výše, sekundární struktura ITS je důležitá pro správné zpracování rRNA transkriptů. Na rozdíl od ITS1 jsou prostorové struktury ITS2 a 5.8S rRNA v rámci rostlin vysoce konzervované. Mai a Coleman (1997) navrhli prostorovou strukturu ITS2, která je společná všem krytosemenným rostlinám a zeleným řasám. Sekundární struktura ITS2 je konzervovaná mezi tak rozdílnými organismy, jako jsou obratlovci a kvasinky, nebo zelené řasy a vyšší rostliny. To naznačuje možnost využití ITS2 pro taxonomické analýzy i na vyšších úrovních než je druh či rod.

U hybridních druhů se může vyskytovat více typů ITS sekvence, a to především díky procesům spojených s hybridizací, polyploidizací a chromozomovou nebo genomovou duplikací. Všeobecně jsou ITS sekvence nejpoužívanějším markerem pro identifikaci na druhové úrovni.

Chloroplastová DNA - nekódující oblasti cpDNA

Chloroplastový genom nám propůjčuje několik výhod, díky kterým jsme schopni se v evolučních studiích posunout dále. Jednou z nich je, že je poměrně dobře popsán na molekulární úrovni, jeho mutační rychlost je nízká. Genom je stabilní a konzervativní a představuje značnou část celkové buněčné DNA. Jeho molekula je kruhová a chloroplasty obsahují více kopií jedné molekuly DNA.

Mnoho dřívějších studií se soustředilo na identifikaci fylogenetických vztahů na vyšších úrovních pomocí kódující oblasti velké podjednotky RuBiSCo-rbcL. Další

z využívaných kódujících oblastí je nejrychleji se rozvíjející kódující oblast pro maturázu - matK, která se používá v systematice na mezirodové a mezidruhové úrovni.

Mnohem variabilnější než kódující oblasti jsou nekódující oblasti cpDNA. Vykazují větší frekvenci mutací, tj. vyšší variabilitu. Osekvenování chloroplastového genomu krytosemenných rostlin umožnilo vytvořit univerzální primery pro tyto oblasti. Pro oblast intronů trnF a trnT existují tři typy univerzálních primerů, které fungují u většiny řas, mechorostů i vyšších rostlin. Proto jsou tyto tRNA geny vhodné pro systematiku na úrovni blízké příbuzných druhů (Feliner a Rosselló 2007; Taberlet et al. 1991).

S rozvojem molekulárních technik přichází nové metody i do populační genetiky. Jedná se o techniky založené na principu DNA barcodingu a identifikaci/kvantifikaci rostlinných druhů přímo ve společenstvu. Další technikou využívanou v populační genetice se stává paralelní celogenomové sekvenování, např. v podobě komparativní genomiky a porovnávání genomu na úrovni populací.

Cytogenetické metody užívané v populační genetice

a/ Průtoková cytometrie

Velmi efektivním nástrojem pro studování ploidní heterogenity a ke stanovení absolutní velikosti genomu v populačních studiích se jeví průtoková cytometrie. Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) měří a zároveň analyzuje několik parametrů (fluorescence, rozptyl světla, atd.) jednotlivých částic (např. buněk, jader a chromozomů). Částice jsou označeny fluorescenční značkou a jsou hnány vysokou rychlostí skrze průtokovou komůrku cytometru, kde laserový paprsek (či jiný vhodný zdroj světla) zapříčiní emisi fluorescenčního signálu rozdílné vlnové délky. Tento signál je následně převeden na digitální výstup vhodný pro zpracování počítačem, kde se výsledky zobrazují ve formě histogramu, který je dále analyzován vhodným softwarem (Kron et al. 2007; Suda and Pyšek 2010). V závislosti na použité fluorescenční značce lze měřit obsah DNA v relativních či absolutních hodnotách, a to buď jako absolutní hmotnost v pikogramech či v megapárech bazí, nebo jako relativní vyjádření vůči určitému standardu. Takto je možné zjistit u zkoumaného druhu buď velikost genomu (hodnoty 2C pro somatické buňky či 1C pro haploidní buňky bez ohledu na jejich ploidii) nebo relativní velikost genomu vztaženou ke zvolenému standardu, z které je možné dedukovat ploidní variabilitu zkoumaného druhu (Doležel et al. 2007).

b/ Karyologické analýzy

Už pouhá informace o počtu chromozómů může být cenným vodítkem v těch případech, kdy se v rámci celé skupiny příbuzných taxonů vyskytuje více stupňů ploidie, které někdy tvoří celé polyploidní řady (komplexy). Diploidní taxony jsou pokládány za původnější, polyploidní za odvozenější, vzniklé často hybridizací taxonů s nižší ploidní úrovní. Proto se pro ověření ploidních úrovní přistupuje ke zjištění karyotypu karyosystematickou analýzou, tj. absolutní metodou. Karyotypem rozumíme chromozómovou sadu jedince (nebo skupiny příbuzných jedinců) definovanou počtem, velikostí a tvarem chromozómů obvykle tak, jak se tyto jeví v metafázi mitotického dělení. Počet, tvar a velikost chromozómů lze využít spolu s ostatními znaky (např. morfologickými, fytogeografickými, ekologickými, chemickými) jako charakteristiku určité taxonomické skupiny a k definování rozdílů mezi takovými skupinami. Většinu karyologických znaků lze spíše využít k

charakteristice skupin na úrovni druhové a nižší. Karyosystematika věnuje pozornost i uspořádání homologních chromozómů při redukčním dělení, které odráží míru vývojové příbuznosti rodičovských genomů. Pravidelný průběh meiózy při gametogenezi má totiž zásadní význam pro životaschopnost gamet a tedy i pro schopnost produkovat životaschopné potomstvo. U polyploida hybridního původu se mohou přednostně párovat chromozómy v rámci rodičovských sad, třebaže genetické rozdíly mezi sadami párování „homologních“ chromozómů neumožňují. Polyploidizace ve spojení s hybridizací má proto obrovský význam v evoluci vyšších rostlin, protože v mnoha případech obnovuje plodnost hybridů, kteří by jinak zůstali sterilní (Krahulcová 1998).

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, než v nativních populacích 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 vhodnosti různých molekulárních markerů a vyhodnotit rozsah genetické variability ve sledovaných populacích chrastice a stolítku.

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



Obr. 1.: *Phalaris Arundinacea*

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 (Bělohlávková, 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).



Obr. 2.: Rozšíření *P. Arundinacea* v USA a v Evropě

Ekologie *P. arundinacea*

K vytvoření monokultury invazních druhů vede zejména disturbance mokřadů, která vytvoří gapy v dosavadní vegetaci a ty mohou být obsazeny invazním druhem (Galowitsch, 1999). *P. arundinacea* nejlépe klíčí právě po takovýchto disturbancích, kdy dojde k uvolnění místa, které rychle obsadí (Lindig & Zedler, 2002). Při disturbancích je patrné snížení počtů domácích druhů, které umožní přístup světlu a tím také růst chrastice (Zedler & Kercher, 2004). Disturbance sice umožňují *P. arundinacea* rozšiřovat porost, ale neexistují důkazy o tom, že potřebuje disturbance k úspěšné invazi (Lavergne & Molofsky, 2004). *P. arundinacea* právě tyto podmínky vyhovují. Dlouhodobější zaplavení sice zpomalí její růst a vegetativní šíření, ale po opadu vodní hladiny je schopná se znovu šířit (Lavergne & Molofsky, 2004).

P. arundinacea vyniká svým fyziologickým přizpůsobením k invazím a přežíváním v nepříznivých podmínkách. Dominuje velká fyziologická tolerance k různým vodním režimům (Lavergne & Molofsky, 2004). Kořeny jsou z velké části tvořené aerenchymem, který jí napomáhá tolerovat zaplavení (Lavergne & Molofsky, 2004; Miller & Zedler, 2003). Díky energii uložené v oddencích je chrastice schopná zahájit růst velmi brzy na jaře, což jí poskytuje konkurenční výhodu oproti ostatním druhům (Regal, 1953; Lavergne & Molofsky, 2004; Zedler & Kercher, 2004). Další konkurenční výhodou je rychlý růst a větší tvorba biomasy, ke které přispívá vyšší průměrná rychlost fotosyntézy (Brodersen et al., 2008).

P. arundinacea je schopná rychlé adaptace na nadzemní i podzemní konkurenci (Brodersen et al., 2008; Lavergne & Molofsky, 2004). Tyto rozdíly mohou sice pomoci invazním druhům zvítězit nad domácími druhy, ale není jasné, jestli vybavení těmito fyziologickými vlastnostmi přispělo ke schopnosti invaze zavlečeného druhu (Brodersen et al., 2008).

Variabilita *P. arundinacea*

Pochopení mechanismů, které umožňují některým druhům stát se invazními, je nezbytné pro určení vhodné kontroly, popřípadě likvidace těchto rostlin. Jednou z možností, která by mohla mít vliv na invazní úspěch druhu, je jeho genetická konstituce a genetické založení znaků podmiňujících jeho invazní chování.

Přirozené populace se obvykle vyznačují velkou genetickou variabilitou, která je vyjádřena rozmanitostí na fenotypové úrovni. Zaměříme-li se na jeden znak, pak často pozorujeme, že jeho fenotyp může mít několik forem. Takový znak se označuje jako polymorfní (na rozdíl od znaku monomorfního – s jedinou formou). Podstatou fenotypové variability je variabilita genetická – genetické rozdíly mezi organismy u vymezeného souboru jedinců (populace).

a/ Cytologická variabilita

Carlson et al. (1996), uvádí, že *P. arundinacea* L. má dva cytotypy: $2n=4x=28$, který zaujímá majoritní část populací a $2n=6x=42$, který je soustředěn do teplých oblastí, kvůli

nepřizpůsobivosti na zimní období. Baldini (1995) popisuje tři ploidní úrovně u *P. arundinacea*: diploid *P. rotgesii* Husn. $2n=2x=14$, tetraploid *P. arundinacea* L. a hexaploid *P. caesia* Nees $2n=6x=42$. Diploid ($2n=4x=28$) *P. rotgesii*, na základě morfologických studií a hodnocení ploidie, je s největší pravděpodobností potomkem jednoho z předků tohoto komplexu. V současné době je endemitem ostrova Sardinie a Korsika. *P. arundinacea* a *P. aquatica* vznikly na základě hybridizace mezi dvěma ze tří diploidních předků, respektive ze spojení dvou sad $2n$ gamet, nebo sdružení n gamet s následujícím zdvojením (Harlan et al., 1975). Tetraploid *P. arundinacea* je allopolyploid se čtrnácti chromozomovými páry preferující severní oblasti boreálního pásu (Baldini, 1995). Hexaploid *P. caesia* má 21 chromozomových párů a je omezen na Iberský poloostrov, jihozápadní část Asie, Afriku a mírné pásmo Severní Ameriky. Volně se kříží s tetraploidem *P. arundinacea* a *P. aquatica*. Tento hybrid je poté funkčně sterilní pentaploid ($2n=5x=35$) (McWilliam, 1962). K tomuto hybridnímu křížení dochází zřejmě na Iberském poloostrově, kde všechny tyto druhy koexistují (Baldini, 1995). Toto křížení bylo testováno i v laboratoři, úspěšné oplození bylo bohužel jen u jedné z 1000 rostlin (Jenkin, 1932; McWilliam, 1962). Ramse (1998) a Soltis et al. (2004) se spíše přiklánějí k teorii hybridizace tří druhů diploidních předků za vzniku hybridního druhu *P. caesia* Nees.

b/ Genetická variabilita

Genetické složení poskytuje náhled do historie druhu, jeho migrací nebo do vztahů mezi jednotlivými populacemi (Sakai et al., 2001). Genetická variabilita může přispět ke schopnosti druhu šířit se, pokud je spojena s fenotypovými změnami podporujícími fitness genotypu. Velká genotypová diverzita může invaznímu druhu poskytnout výhody. Díky nim může mít druh různé odpovědi na různé ekologické podmínky (Gifford et al., 2002).

V posledním století nahradily invazní genotypy *P. arundinacea* původní genotypy ve Spojených státech amerických (Saltonstall, 2002). Existují příklady vnitrodruhové invaze (Daehler, 1996) a vnitrodruhového křížení, které může vyústit v křížence s ještě větší vitalitou (Antilla et al., 2000) a může vést k vytvoření agresivních kříženců nebo k vymizení původních genotypů (Vila et al. 2000; Pooler et al., 2002; Ayeres et al., 2008). U chrastice

došlo k mnohonásobnému zavlečení, což vedlo k vyšší genetické variabilitě v jejím invazním areálu oproti oblastem jejího původního výskytu (Lavergne & Molofsky, 2007). Vícenásobné zavlečení a křížení vždy nevede k vytvoření fyziologicky dokonalejšího genotypu. Rozdíly mezi genotypy a zvýšená genetická variabilita nemusí vždy vést ke zvýšené agresivitě rostliny (Brodersen et al., 2008; Lavergne & Molofsky, 2007). Chrastice je v Severní Americe původní, takže formálně by se mělo hovořit o expanzi chrastice rákosovité. Existují předpoklady, že v Severní Americe jsou invazní populace zavlečených evropských genotypů (Merigliano, 1998; Lavergne & Molofsky, 2004; Lavoie et al., 2005). Jde tedy vlastně o invazi na úrovni genotypů.

Původní a zavlečené populace spolu v Severní Americe koexistovaly více než sto let, takže došlo ke křížení genotypů a k migracím. Předpokládá se, že evropské druhy a jejich hybridy jsou agresivnější (Mauer et al., 2002; Lavergne & Molofsky, 2004). Casler et al. (2009) ve své práci zjišťovali genetické rozdíly mezi evropskými a americkými genotypy. Zjistili, že na základě jaderné DNA můžeme genotypy rozdělit na dvě oddělené skupiny: skupinu 1 tvořily tři blízké příbuzné genotypy ze Severní Ameriky a skupinu 2 ostatní genotypy. Výrazné oddělení severoamerických genotypů od všech evropských genotypů naznačuje rozdílný původ těchto tří genotypů. Zdá se, že tyto genotypy jsou nejspíše zdrojem původního severoamerického genofondu (Casler et al., 2009a). Tyto tři genotypy mají také výrazně nižší genetickou variabilitu oproti ostatním severoamerickým a evropským genotypům. Casler et al. (2009a) tak našli dostatek podpory pro působení efektu zakladatele (founder effect), který vyplývá z migrace chrastice z Evropy nebo Asie v několika posledních meziledových obdobích. Tyto genotypy jsou tedy považovány za původní severoamerické přesto, že doba jejich výskytu v Severní Americe je kratší, než doba jejich dřívějšího výskytu v Evropě. Zakládající populace v Severní Americe tedy zřejmě prošla mnoha mutacemi, které vedly k vytvoření genotypů odlišných od evropských. Tyto mutace měly jen malý vliv na fitness a morfologii rostliny-rostlina zůstává fenotypově zcela nezměněna. Důsledkem je jejich menší genetická variabilita, která je důsledkem „bottleneck efektu“ (Casler et al., 2009a).

V roce 2012 prezentoval Jakubowski (2012) svou práci, ve které pomocí SSR markerů odlišil nativní severoamerické populace *P. arundinacea* od euroasijských populací pocházející z Iberského poloostrova. Identifikaci pomocí molekulárních markerů sledává

jako jedinou možnou identifikaci. Jakubowski (2011) se také zabýval odlišením kultivarů od nativních populací. Metodou SSR se mu podařilo signifikantně odlišit nativní populace. Zároveň odlišil kultivary americké od evropských. Tuto teorii podporuje i ve své práci z roku 2012 (Jakubowski, 2012).

Populační genetikou *P. arundinacea* se zabývali i Lavergne & Molofsky (2004), kteří vycházeli z předpokladu, že invazní genotypy budou obsahovat podmnožinu genotypů agresivnějších, než jsou nativní druhy. Nicméně Jakubowski (2012) tento teoretický předpoklad vyvrátil a nebyl prokázán rozdíl v genetické variabilitě invazních a nativních populací. Lavergne & Molofsky (2004) poukázali na odlišnosti mezi volně rostoucími nativními populacemi a pícními kultivary, ale nezjistili rozdíly mezi pěstovanými pícními kultivary a invazními populacemi chrastice z mokřadních poloh. Rovněž předpokládají vyšší rozsah vnitropopulační genetické variability a malé rozdíly mezi populacemi (nízkou úroveň mezipopulační variability).

Publikované výsledky a komentář k získaným výsledkům

Práce týkající se genetické, cytogenetické a morfologické variability evropských a severoamerických populací chrastice byly publikovány v příspěvku v Crop Science a zpracovány do formy kapitoly ve vědecké monografii.

Anderson N.O., Kávová T., Bastlová D., Čurn V., Kubátová B., Edwards K.R., Januš V., Květ J. (2016): Phenotypic and Genotypic Variation in Czech Forage, Ornamental and Wild Populations of Reed Canarygrass. Crop Science 56: 2421-2435. (IF=1.550)

Kávová T., Kubátová B., Čurn V., Anderson N. O. (2018): Genetic Variability of US and Czech Phalaris Arundinacea L. Wild and Cultivated Populations. In: New Perspectives in Forage Crops, Edvan R. L. (ed.), IntechOpen, U.K., p. 169-186.

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 chrastice 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

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 markerů jsme stanovili potenciální genový tok pro tuto rostlinu. Kultivary a divoké genotypy byly rozřazeny do dvou skupin, které se překrývají. Nejméně 4 sady divokých amerických genotypů se liší od evropských protějšků a mohou pocházet ze Severní Ameriky.

Sběr rostlinného materiálu proběhl v roce 2012 na území Minnesoty (USA). Vzorby byly sbírány podél šesti řek. Čtyři z vybraných řek (St. Croix, Mississippi, Minnesota, Des Moines) patří k povodí Golfského 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 utvořily do skupin, které se významně překrývaly. Nejméně 4 sady divokých genotypů v USA jsou odlišné od evropských protějšků a jako takové by mohly pocházet ze Severní Ameriky. Budou zapotřebí další práce, které doloží jejich původ. Přesto prodej krmných odrůd, nadále způsobuje genetické míchání s americkými druhy. Část tohoto mezikontinentálního genového zesiluje produkce osiva *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 *Phalaris arundinacea* L. v českých pícninářských kultivarech, okrasných a divokých populacích

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 jsme 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 rostli, jsme u všech 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 odebírána 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 byla 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 morfometrických rozdílů mezi planými populacemi ČR/ USA a kultivary ČR/USA nedošlo k významnému odlišení měřených znaků. Avšak při měření vzniklé biomasy, vykazovaly americké populace větší hodnoty. U evropských genotypů byla detekovaná nižší podzemní část. Varianty Picta (GFP-2) a Luteopicta (GFL-4) měly téměř stejné poměry kořenů / výhonků. Mohlo by to napovídat něco o společné historii těchto variant. Dva podobné genotypy měly poměr kořenů / výhonků přibližně na úrovni 1,0 (BE-3 z Berounky, OR-1 z Orlice). Zachytili jsme u variant Picta a Luteopicta. Vzhledem k tomu, že většina nerozrůzněných kultivarů vzácně kvete a roste pomaleji, nadzemní i podzemní růst těchto čtyř genotypů je téměř totožný. Zatímco pomalejší tempo růstu by bylo nežádoucí pro krmivo, mohlo by 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. Další společné fenotypové znaky nemohly být použity k významnému rozlišování mezi řekami nebo kultivary (populacemi), genotypy a jejich interakcemi. Z těchto výše zmíněných důvodů je nutné začlenit molekulární přístupy 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 detekci významného genetického rozdílu mezi českými populacemi divoké *Phalaris* na všech řekách a mezi českými kultivovanými různě pestrobarevnými typy. Jedinou hypotézou, kterou jsme nedokázali odmítnout, bylo, že v rámci českých kultivovaných a divokých druhů zde 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 je v populaci, často připisovaná vysokým hladinám genového toku. Chrastava byla jedinou výjimkou, 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 prokazovaly 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



Obr.3.: *Myriophyllum spicatum*

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 stolítků. 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.

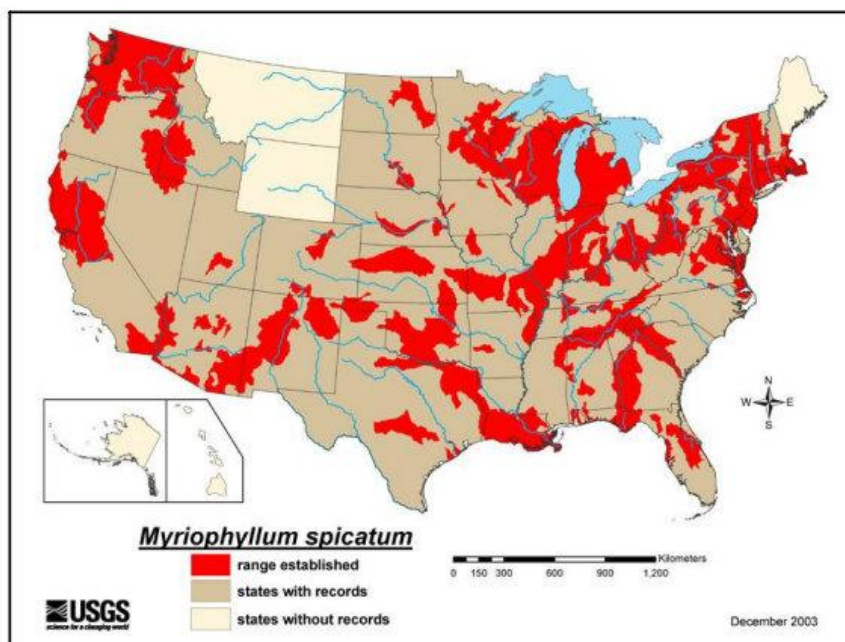
Navzdory intenzivnímu výzkumu zaměřeného na invazní aspekty stolítků se jen naprosté minimum prací věnovalo problematice polyploidie a jejího vlivu na invaznost rostlin, přestože v jejich životě hraje polyploidie významnou roli. Velká část druhů je ploidně uniformní a celý rod *Myriophyllum* má zatím 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).

Myriophyllum L.

Zástupci rodu *Myriophyllum* L. jsou řazeni do čeledi *Haloragaceae* R. Tato čeleď je kosmopolitní čeleď, která v současnosti obsahuje 8 rodů a přibližně 120 druhů. Zástupci čeledi jsou morfologicky velmi diverzifikováni – od malých stromů po submerzní vodní rostliny. Zástupce čeledi *Haloragaceae* lze nalézt v širokém rozmezí biotopů – s vyjimkou a aridních oblastí. Původní je v Evropě, Asii, severní Africe. Zdomácnělý v Makronésii, v Severní Americe (USA, Kanada), v tropických částech Jižní Ameriky. V ČR se vyskytuje roztroušeně, místy i hojně, od nížin do podhůří. Centrum druhové diverzity toho rodu se nachází v Austrálii, kde se vyskytují 4 endemické rody a nachází se zde 70 % celkového druhového bohatství čeledi *Haloragaceae* (Moody & Les 2007b). Ve Spojených státech amerických je považován za nejrozšířenější vodní plevel.

Většina druhů stolítků je vodních nebo obojživelných a roste v široké škále biotopů (Cook et al., 1974). Některé druhy mohou zasahovat až do hloubek pěti, vzácněji i deseti metrů (Aiken, Newroth & Wile, 1979), ale existují i druhy vázané spíše na bažinaté okraje vodních ploch (např. *M. lophatum* a *M. voitschii*; Moody & Les, 2010). Druhy *Myriophyllum* se vyskytují obvykle ve sladkých vodách, ale byly pozorovány také ve slabě brakických

vodách (Lindholm, Rönnholm & Häggqvist, 2008). Rod *Myriophyllum* spolu s několika dalšími rody (např. *Potamogeton*, *Isoëtes* a *Zannichelia*) byl zaznamenán v nejvyšších nadmořských výškách u vodních rostlin vůbec (Chambers et al., 2008), konkrétně *M. cf. elatinoides* Gaud. (tj. *M. quitense* H.B.K.) se v Peru vyskytovalo ve výškách 4 600– 5 244



m.n.m. (Seimon, 2007)

Obr. 4.: Příklad rozšíření *M. spicatum* v USA. Červeně označeny invadující oblasti.

Ekologie

Rod *Myriophyllum* má téměř kosmopolitní rozšíření. Nevyskytuje se pouze na Antarktidě. Největší druhová diverzita je soustředěna do Austrálie (42 druhů, 37 endemických). Následuje Asie (16 druhů, 8 endemických) a Severní Amerika (14 druhů, 7 endemických). Afrika (4 druhy, 2 endemické) a Jižní Amerika (4 druhy, 1 endemický) jsou druhově nejchudší (Moody & Les 2010). V Evropě roste 6 druhů, žádný ovšem není endemický – *M. alterniflorum*, *M. spicatum* L., *M. sibiricum*, *M. verticillatum* L., *M. aquaticum* a *M. heterophyllum* (Moody & Les 2010)

Stolístek roste ve stojatých až mírně tekoucích vodách. Vyskytuje se spíše v zásaditější oligotrofní až mírně eutrofní vodě (Dostál 1989; Madsen 1998; Nichols 1975). Může růst také v písku, kyselé rašelině a dokonce i ve velmi zásaditém prostředí (pH = 9–10) (Aiken et al. 1979). Maximální hloubka, kde můžeme stolístek nalézt je až 10 m, ale nejvíce

mu vyhovuje hloubka 2–3 m, odkud pak invaduje do větších hloubek i na mělčiny. Jakmile stonek dosáhne vodního povrchu, vytvoří se pomocí větvení stonků tlustý polštář, naopak spodní větve mají tendenci se odlamovat. Takto *stolístek* zaujme správný tvar pro optimální získávání světla. Roste-li v 5metrových hlubších vodách, nedosahuje už k vodní hladině a tvoří jen submerzní porost (Aiken et al. 1979; Grace & Wetzel 1978). V místech, kde se voda začne pomalu vypařovat, tvoří *M. spicatum* terestrickou formu. Listy jsou menší, tužší a mají méně úkrojků. Pokud se takovéto rostliny dostanou opět do vody, do 7–10 dnů se začnou tvořit nové listy vodní formy.

Invazní chování

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 (Ellstrand & Schierenbeck 2000). Nepůvodní vodní rostliny však mají velký dopad na místní biodiverzitu a fungování ekosystému. Z čistě ekonomického hlediska stojí ve Spojených státech kontrola nepůvodních vodních rostlin více než 100 milionů dolarů za rok (Pimentel et al. 2000). Přibližně 19 druhů stolítků je považováno za škodlivé rostliny, z toho 3 jsou přítomné i ve střední Evropě (Sheppard et al. 2006). Evropský *M. spicatum* a jihoamerický *M. aquaticum* se vyskytují na většině kontinentů (Moody & Les 2010). *M. spicatum* je v Severní Americe mnohem agresivnější než všechny tamní původní stolítky (Aiken et al. 1979; Thum & Lennon 2006). Severoamerický *M. heterophyllum* zdomácněl v Evropě a v Asii (Cirujano & Medina 1997; Yu et al. 2002); v severovýchodních a severozápadních Spojených státech, mimo svůj původní areál, je také považován za invazní druh (Moody & Les 2002). Jeho agresivita vede k vytlačování původních vodních makrofyt a zároveň negativně ovlivňuje hospodářské a rekreační aktivity v místech výskytu (Aiken, Newroth & Wile, 1979). Velké obavy vzbuzuje zvláště jeho schopnost křížit se s holarktickým druhem *M. sibiricum*. (s. severní; Moody & Les, 2002; Thum et al., 2011); zejména pak zjištění, že se hybridní jedinci v určitých případech chovají ještě agresivněji než invazní rodičovský druh (Roley & Newman, 2006). Hybridizace mezi nativními a invazní rostlinami mohou vést k introgresi (způsobující extirpaci přirozené druhů prostřednictvím kontaminace genů) a heterosou nebo hybridní intenzitou, která vede k lepším konkurenčním fenotypům (Moody and Les 2002). Moody a Les (2002) zjistili, že agresivita těchto hybridů vzrůstala s tvorbou monokulturních porostů.

Jedním z potencionálních spouštěcích mechanismů invazního chování může být hybridizace s následnou polyploidizací (Ainouche et al., 2010; Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Lafuma et al., 2003; Saad et al., 2011). U polyploidů lze sledovat vyšší potenciál stát se invazními druhy (Bennett, Leitsch & Hanson, 1998). I u druhu *Myriophyllum* může hrát proces polyploidizace v invaznosti skutečně svou roli, jelikož je v literatuře udáváno více polyploidních chromozomových počtů (Harada, 1952; Májovský, Murín & Feráková, 1987; Měsíček & Javůrková-Jarolímová, 1992; Probatova & Sokolovskaya, 1995).

Pokud se stolítky vyskytují ve vysoké hustotě na jednom místě, způsobují vytěsnění původních druhů. Snižují biodiverzitu obsazených vodních ploch a toků a redukují tak dostupnou potravu nejen pro vodní ptactvo (Cilliers 1999; Madsen et al. 1991; Moody & Les 2002; Sturtevant et al. 2009). Omezují rekreační i komerční aktivity ve vodě i v okolí – plavání, rybaření, říční plavbu, využití pláží apod. (Cilliers 1999). Vytváří biotopy vhodné pro vývoj bodavého hmyzu (Aiken et al. 1979; Sheppard et al. 2006). Negativně ovlivňují odvodňovací i zavlažovací systémy a dodávky pitné vody (Aiken et al. 1979; Sheppard et al. 2006). Části rostlin zanášejí vodní elektrárny a zařízení měřící průtok v kontrolních povodňových tunelech (Aiken et al. 1979; Cilliers 1999) a tím se snižuje i rychlost proudění vody (Cilliers 1999).

Nicméně stolítek může být v určitých ohledech i přínosný. Okysličuje vodní prostředí, funguje jako filtr živin v eutrofních vodách, stabilizuje dno, poskytuje vhodný úkryt pro jikry ryb a výjimečně může sloužit i jako potrava vodních ptáků (Madsen 1998; Nichols 1975).

Cytotypová variabilita *Myriophyllum* L.

Rod *Myriophyllum* má základní chromozomové číslo $x = 7$ (Löve, 1982), popř. $x = 6$ (Löve & Löve 1961). U stolítku klasnatého byly pozorovány 3 cytotypové variace $2n = 28$, $2n = 36$ a $2n = 42$. *M. sibiricum* má počet chromozomů $2n = 42$. U *M. alterniflorum* byl popsán jen jeden cytotyp $2n = 14$. U *M. verticillatum* se pravděpodobně vyskytuje pouze cytotyp $2n = 28$. Údaje o chromozomových počtech *M. aquaticum* a *M. heterophyllum* v literatuře chybí. V polyploidní formě, při základním chromozomovém čísle $x = 7$, má *M. spicatum*, *M. sibiricum* $2n = 42$ *M. alterniflorum* $2n = 14$; *M. verticillatum* $2n = 28$. *M. alterniflorum* je diploid, *M. verticillatum* tetraploid a *M. spicatum* hexaploid (Pogan et al. 1989).

Publikované výsledky a komentář k získaným výsledkům

Práce týkají se genetické a cytogenetické variability evropských a severoamerických populací stolítků byly prezentovány na konferencích.

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.

Genetická a cytogenetická variabilita evropských a severoamerických populací stolístků

Rostlinné sběry

Za pomoci zahraničních databází o invazních a nativních druzích jednotlivých zemí bylo vytipováno přes 2048 lokalit s potencionálním výskytem *Myriophyllum*, popř. dalších atraktivních druhů daného rodu. Zmapovány byly jak zóny intaktní na severo-východním pobřeží Spojených států amerických, tak i lokality potencionálně izolovaných populací na západním pobřeží USA (viz Obr. 6). V Evropě jsme se věnovali jak samplingu v domovině, v České republice, tak i Polsku, Německu, Francii a lokalitám možného transferu do sekundárního areálu výskytu – Španělsku. Dalším cílem rostlinného samplingu byly izolované lokality v Evropě - Dánsko, Švédsko a Norsko (vše viz Obr. 5).

Jelikož jsou stolítky převážně klonálně se rozmnožující se rostliny, snažili jsme se zajistit minimálně 50 km rozsah mezi jednotlivými lokalitami stejného druhu. U morfologicky homogenních populací probíhal odběr 20 rostlin. Na každé lokalitě byl kromě odběru rostlin pro cytometrické analýzy též odebrán rostlinný materiál pro extrakci DNA. Vzorky byly odebírány a označovány tak, aby byla zachována kontinuita informací o daném vzorku, tzn. cytometrické zjištění ploidní úrovně, případně velikosti genomu, probíhá na stejném jedinci jako extrakce DNA a následné molekulární analýzy. Počet rostlin odebraných do silikagelu se odvíjel od velikosti navštívené populace a od její morfologické heterogenity, případně zastoupení druhů. U populací morfologicky homogenních a početně rozsáhlých (řádově 10-100 jedinců na populaci) bylo odebíráno minimálně 20 rostlin pro cytogenetické a molekulární analýzy. V případě, že se na navštívené lokalitě nacházely rostliny morfologicky heterogenní nebo rostliny různých druhů, byl materiál odebrán od všech morfotypů/druhů opět v počtu minimálně 20 rostlin od každé skupiny. Na lokalitách početně chudých (řádově výskyt jedinců) byl odebrán materiál u všech nalezených rostlin do maximálního počtu 20 rostlin na populaci. U morfologicky rozdílných populací, probíhal odběr 20 rostlin od každého morfotypu. Materiál byl po dobu odběru rozdělen, část každé rostliny byla zaslána v čerstvém stavu do laboratoře průtokové cytometrie a část byla dokonale vysušena v silikagelu, ve kterém byla uchována až do převezení do laboratoře, kde byla následně uložena v -20°C až do doby extrakce DNA.

Cytometrické analýzy

Cytometrické analýzy probíhaly na pracovišti Laboratoře průtokové cytometrie, Akademie věd, Průhonice. Pomocí cytogenetických analýz, byl u každé populace zjištěn jaderný obsah DNA a stanovena ploidní úroveň. Pro screening ploidní úrovně bylo vždy použito 10 rostlin z dané populace v jednom vzorku. Pokud byla populace ploidně uniformní, vyhodnocovala jsem jaderný obsah DNA ze tří rostlin na populaci. V případech, kdy byla detekována vnitropopulační ploidní variabilita, byl tento postup realizován pro všechny zjištěné cytotypy.

Laboratorní postup probíhal dle Doležal et al., 2007. Rostlinný materiál byl zhomogenizován v roztoku OTTO II spolu se standartem o známe velikosti genomu a ploidní úrovně (*Bellis perennis* L), přefiltrován přes uhelon do samostatné kyvety. K roztoku jader bylo přidáno 500 µl fluorescenčního barviva. Pro zjištění celkové velikosti genomu použito interkalační barvivo PI Propidium iodid (20 ml Otto II buffer + 1 ml PI + 1 ml RNase + 40 µl β-mercaptoethanol). Při analýze ploidní úrovně bylo využito AT selektivního fluorochromu DAPI (25 ml Otto II buffer + 1 ml DAPI + 50 µl β-mercaptoethanol). Analýzy probíhaly na cytometru Partec CyFlow. Vyhodnocování výstupů ve formě histogramů probíhalo v programu FlowLogic.

Molekulární analýzy

Na každé lokalitě byl kromě odběru rostlin pro cytometrické analýzy též odebrán rostlinný materiál pro extrakci DNA. Materiál byl po odběru v terénu dokonale vysušen v silika gelu a po převezení do laboratoře byl v -20°C uchováván do doby extrakce DNA. Molekulární analýzy probíhaly na pracovišti Katedry speciální produkce rostlinné, Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích. Extrakce rostlinné DNA probíhala pomocí izolačního protokolu CTAB-PVP. Rostlinný materiál byl zhomogenizován, přidáno 500 µl roztoku 2x CTAB-PVP s 1% merkaptoethanolu na vzorek. Inkubace 45 min/65°C. Následná centrifugace 5min/14000rpm. Přenesení supernatantu do nových kolon. Přidáno 500 µl Chloroformu IAA 24:1. Centrifugace 5min/14000rpm. Přenesení supernatantu do nových kolon. Přidání 1/5 objemu 5% CTAB, vortexace, opět přidání 500 µl chloroform IAA 24:1, 10 min. promíchání. Centrifugace 5min/14000 rpm. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme supernatant, přidáme 2/3 objemu vychlazeného Isopraponalu. Ponecháme přes noc v mrazáku při min. -20°C. Dále centrifugujeme 5 min při 4°C/ 14000rpm. Odstraníme supernatant, přidáme 300 µl 1x TE pufr a necháme 45 minut inkubovat při 37°C. K roztoku přidáme 2 objemy ledového 96 % ethanolu, promícháme a ponecháme v mrazáku minimálně na 30

minut, kvůli větší výtěžnosti DNA. 10 minut cetrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. Odstraníme supernatant. Přidáme 1 ml ledového 70% ethanolu a stáčíme 2min/14000 rpm. Odstraníme supernatant a pro dokonalé vyčištění peletu opakujeme 2x. Vzorčky vysušíme. Podle množství peletu resuspendujeme v 20-200 µl 1xTE pufru při 37°C.

Vnitro a mezidruhová hybridizace *M. sibiricum*, respektive *M. sibiricum* x *M. spicatum* byla sledována pomocí analýzy cp DNA a ITS analýzy. Byla provedena sekvenace vybraných úseků. 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'). U jaderné DNA byl zvolen lokus ITS s univerzálními primery ITS1 a ITS 4 (ITS 1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3', ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). U problematických vzorků byl použit namísto univerzálního primeru ITS1, specifický primer stolítků ITS1myrio (5'GCGGAAGGATCATTGTCGAA 3') eliminující potenciální kontaminace. Všechny PCR reakce obsahovaly 10 µl LA Hot Star Master Mix (Top Bio), 0,6 µl Forwarde/Reverse primer, 6,8 µl sterilní/deionizované H₂O, 2 µl DNA. Teplotní profil u amplifikace jaderného úseku: denaturace 94°C/min., následně 25 cyklů 94°C/15 sec., 56°C/30sec., 72°C/1min. Finální extenze při 72°C/7min. U chloroplastového úseku vypadal teplotní profil následovně: denaturace 94°C/min., následně 25 cyklů 94°C/15 sec., 55°C/1min., 72°C/1min. Finální extenze při 72°C/8min. Amplifikovaná DNA byla vizualizována na 2% agarose pomocí horizontální elektroforézy při 90V/1,5 hod. Vyseparované fragmenty, o délce jaderného úseku 700bp, u chloroplastového regionu 1000bp., byly purifikovány a následně osekvenovány. Vzorčky byly purifikovány enzymaticky (Exosap), 2 µl Exosap/vzorek, 37°C/15 min, 80°C/15 min. Sekvenování proběhlo formou služby firmou Macrogen.

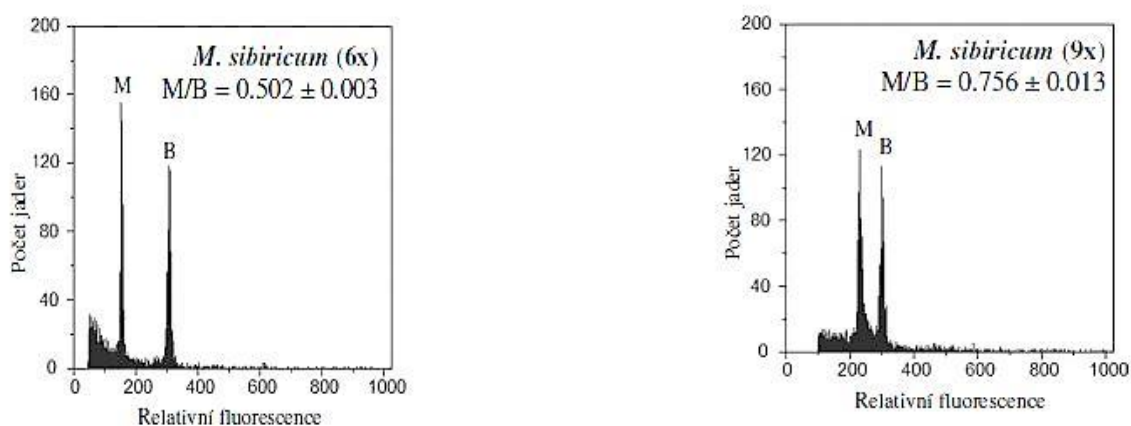
Na základě nově publikované práce Wu et al. 2013, která se zabývá vývojem mikrosatelitových primerů pro asijské *M. spicatum*, bylo všech 20 publikovaných primerových párů amplifikováno na zástupcích taxonů získaných v rámci našich terénních sběrů. Deset primerových párů se jeví jako polymorfní pět z nich jsme optimalizovali.

Při studiu mikrosatelitních oblastí genomu jsme produkty amplifikace separovali elektroforetickou metodou pomocí kapilární elektroforézy na genetickém analyzátoru ABI 3500 (Applied Biosystems) pro stanovení jejich délky. Jako interní velikostní standard jsme použili LIZ 500 pro kombinaci primerů fluorescenčně značených (6-FAM, VIC, NED). Po

kontrole jsme vyhodnocovali ve specializovaného programu GeneMapper v 3.7. Primární data jsme dále převedli do binární matice a statisticky se zpracovali pro odhad diverzity v programech DARwin a MVSP.

Výsledky a diskuze cytogenetické variability a velikosti genomu

Uskutečnili celou řadu terénních sběrů jednak v Evropě a v USA. Podařilo se nám vytvořit zcela unikátní sbírku vzorků, která v námi studovaných oblastech dosud nemá obdoby. Povedlo se sebrat všechny druhy rodu *Myriophyllum* L. udávané z Evropy a všechny druhy udávané ze Severní Ameriky s výjimkou *M. alterniflorum*.



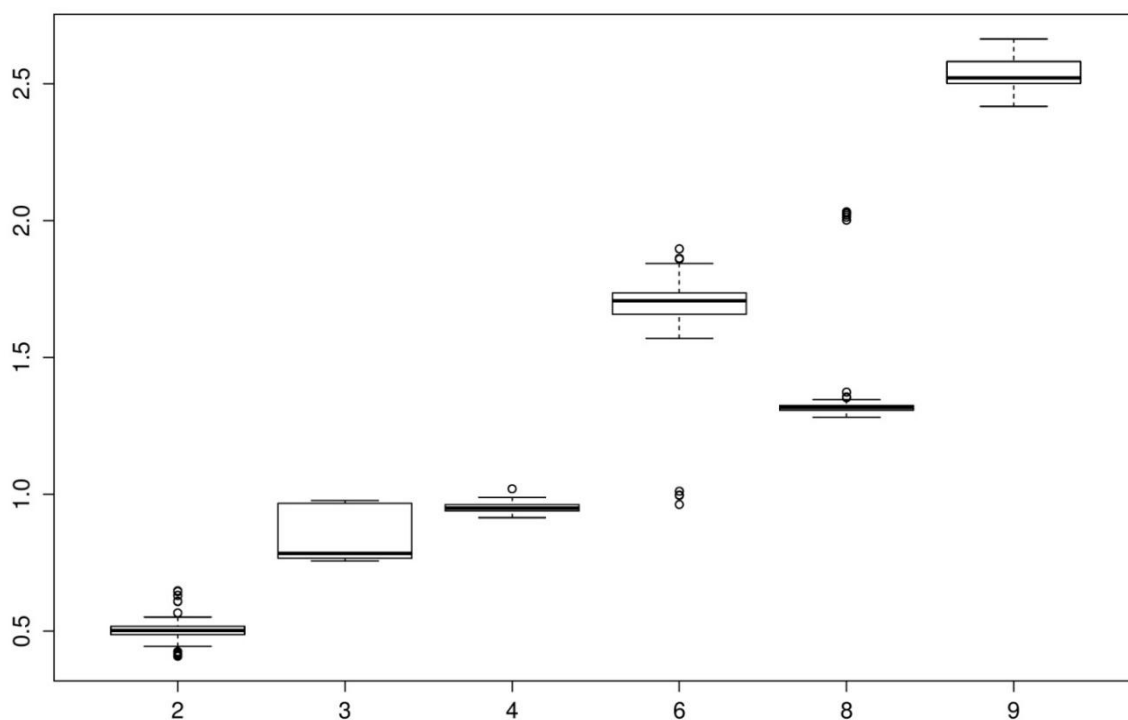
Obr. 7.: Ilustrační grafické výstupy cytometrických analýz pro druhy *M. sibiricum* při analýze velikosti genomu pomocí barviva propidium jodid za použití standartu *Bellis parrensis*.

Cílem bylo stanovení velikosti genomu u většiny zástupců rodu *Myriophyllum* L., jak v Evropě, tak v USA. Celkem bylo změřeno na 1700 jedinců z 540 populací. Jedná se o 766 jedinců z 247 populací (20 států Evropy) a 943 jedinců z 268 populací (25 federálních států USA). U dalších cca 2650 jedinců z výše uvedených populací byla zjištěna DNA-ploidie, kvůli stanovení vnitropopulační variability. Až na výjimky (*M. pinnatum* a *M. sibiricum*) se u rodu *Myriophyllum* L. nevyskytuje vnitropopulační ploidní variabilita. Souhrnné výsledky udává Tabulka 1.

Taxon	Origin	number (2n)	level	pop. (samples)	(pg DNA)	(pg DNA)	(max/min, %)	value (pg DNA)
<i>M. alterniflorum</i>	Europe	14	2x	34 (93)	0.497 ± 0.007	0.483 – 0.511	5.80	0.249
<i>M. aquaticum</i> 6x	Europe	42	6x	1 (4)	0.992 ± 0.021	0.963 – 1.011	4.98	0.165
<i>M. aquaticum</i> 8x	EU+USA	56	8x	36 (106)	1.317 ± 0.015	1.282 – 1.374	7.18	0.165
	Europe	56	8x	1 (3)	1.287 ± 0.005	1.282 – 1.291	0.70	0.161
	USA	56	8x	35 (103)	1.318 ± 0.014	1.296 – 1.374	6.02	0.165
<i>M. farwellii</i>	USA	14	2x	3 (8)	0.631 ± 0.019	0.608 – 0.648	6.58	0.315
<i>M. heterophyllum</i>	EU+USA	14	2x	50 (143)	0.510 ± 0.017	0.483 – 0.543	12.42	0.255
	USA-Connecticut	14	2x	24 (70)	0.504 ± 0.010	0.487 – 0.523	7.39	0.252
	USA-Middle East	14	2x	14 (38)	0.514 ± 0.012	0.483 – 0.543	12.42	0.257
	USA-West	14	2x	2 (6)	0.520 ± 0.006	0.512 – 0.531	3.71	0.265
	Europe	14	2x	10 (28)	0.519 ± 0.008	0.501 – 0.536	6.99	0.260
	USA	21	3x	1 (3)	0.763 ± 0.006	0.757 – 0.767	1.32	0.254
<i>M. hippuroides</i>	USA	14?	2x	5 (16)	0.536 ± 0.015	0.512 – 0.551	7.62	0.268
<i>M. humile</i>	USA	14	2x	7 (19)	0.415 ± 0.005	0.409 – 0.425	3.91	0.208
<i>M. laxum</i>	USA	14	2x	46 (46)	0.458 ± 0.007	0.444 – 0.478	7.66	0.229
<i>M. pinnatum</i>	USA	14	2x	1 (2)	0.534 ± 0.003	0.532 – 0.537	0.94	0.267
<i>M. pinnatum</i> 3x	USA	21	3x	1 (1)	0.784	–	–	0.261
<i>M. quitense</i>	USA	56	8x	6 (6)	2.020 ± 0.011	2.002 – 2.032	1.50	0.253
<i>M. sibiricum</i>	USA	42	6x	15 (39)	1.800 ± 0.051	1.744 – 2.000	14.68	0.300
<i>M. sibiricum</i> 9x	Europe	63	9x	9(35)	2.558 ± 0.049	2.494 – 2.663	6.78	0.284
<i>M. sibiricum</i> 6x	Europe	7	6x	1(4)	1.732 ± 0.050	1.724 – 1.895	14.1	0.288
<i>M. spicatum</i>	EU+USA	42	6x	330 (882)	1.693 ± 0.044	1.570 – 1.786	13.76	0.282
	Europe	42	6x	181 (464)	1.658 ± 0.031	1.570 – 1.736	10.57	0.276
	USA	42	6x	149 (418)	1.728 ± 0.020	1.600 – 1.786	11.63	0.288
<i>M. tenellum</i>	USA	14	2x	4 (9)	0.505 ± 0.017	0.477 – 0.527*	10.48	0.253
<i>M. ussuriense</i>	USA	21	3x	1 (3)	0.971 ± 0.009	0.961 – 0.978	1.77	0.324
<i>M. verticillatum</i>	EU+USA	28	4x	59 (166)	0.950 ± 0.017	0.915 – 1.020	11.48	0.237
	Europe	28	4x	47 (133)	0.953 ± 0.017	0.918 – 1.020	11.11	0.238
	USA	28	4x	12 (33)	0.935 ± 0.012	0.918 – 0.963	4.90	0.234
<i>hybrids</i>								
<i>M. heterophyllum-laxum</i> Florida	USA	14	2x	1 (26)	0.484 ± 0.008	0.476 – 0.495	3.99	0.242
<i>M. heterophyllum-laxum</i> Connecticut	USA	14	2x	7 (21)	0.531 ± 0.008	0.513 – 0.548	6.82	0.266
<i>M. spicatum-sibiricum</i>	EU+USA	42	6x	25 (70)	1.749 ± 0.016	1.705 – 1.779	4.34	0.291

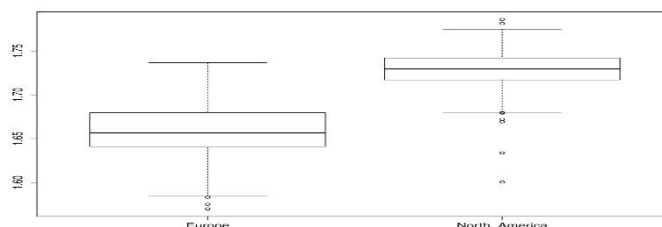
Tab. 1.: Přehled výsledků průtokové cytometrie

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 Obr. 7.. 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.



Obr. 8.: Krabicový diagram znázorňující velikost genomu somatických buněk (2C hodnota) vztaženou vůči ploidnímu stupni.

M. spicatum z USA má signifikantně větší genom než evropské populace (Obrázek 9.), 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 %).



Obr. 9.: Krabicový diagram znázorňující rozdíly v 2C hodnotách velikosti genomu u *M. spicatum* (Evropské a Americké populace).

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 20. 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.

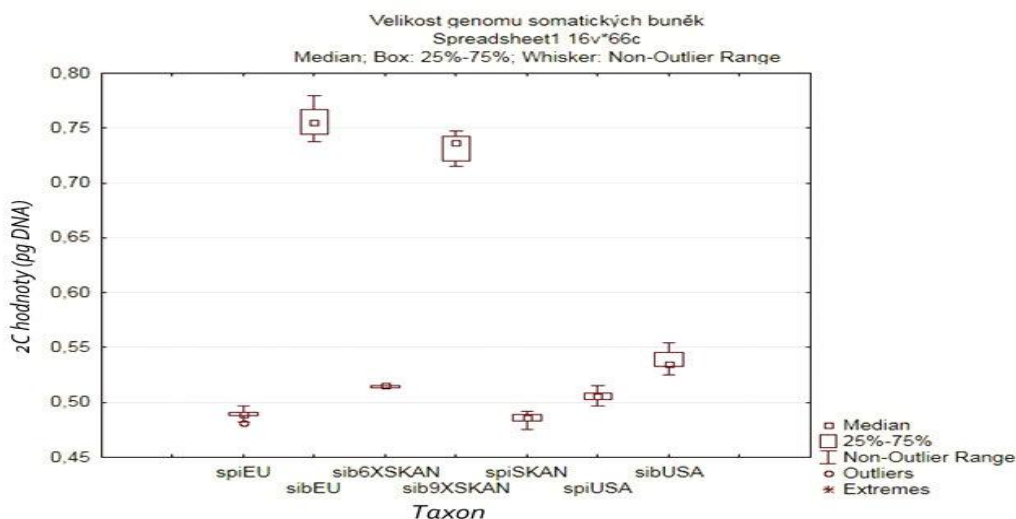
Domníváme se, že hybridizace *M. spicatum* s původním druhem *M. sibiricum* je natolik běžná, že čisté *M. sibiricum* je v hustěji zalidněných oblastech již vzácné, tyto naše domněnky potvrzuje i Moody & Les (2002). V posledním roce se podařilo získat vzorky ze Švédska, kde byla nalezena smíšená populace 6x a 9x *M. sibiricum* společně s 6x *M. spicatum*. Tato oblast v Evropě se potencionálně 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 introdukovan nejmeně 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 také velmi členitý reliéf ostrovů). To byly morfologicky zcela odlišné rostliny, které by se s *M. spicatum* šly zaměnit 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 potencionálními 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 cytomerických analýz jsme schopni nyní signifikantně odlišit tyto zainteresované druhy v rámci jejich velikosti genomu, obsahu DNA v somatických buňkách (Graf 1.).



Graf 1.: Krabicový diagram obsahu jaderné DNA v somatických buňkách (2C hodnoty). Zkratky: *sib6XSKAN*-hexaploidní *M. sibiricum* Skandinávie, *sib9XSKAN*- nonaploidní *M. sibiricum* Skandinávie, *spiSKAN*-*M. spicatum* Skandinávie, *spiUSA*- *M. spicatum* USA, *sibUSA*- *M. sibiricum* USA, *spiEU*- *M. spicatum* Evropa, *SibEU*- *M. sibiricum* Evropa

V grafu je patrný i rozdíl v obsahu DNA mezi Evropou a USA. Z Tab. 2 je patrné, že variabilita v obsahu jaderné DNA (2C hodnota bez ohledu na ploidní stupeň) se pohybuje v rozmezí 1,728-2,558 pg, což představuje variabilitu v 1,5 násobku. Při porovnání velikostí genomu mezi areály, severoamerické populace měly v průměru o 3.8 % větší genom než evropské. Náhled na 1Cx hodnoty (přepočteno na monoploidní sádku), se pak pohybuje od

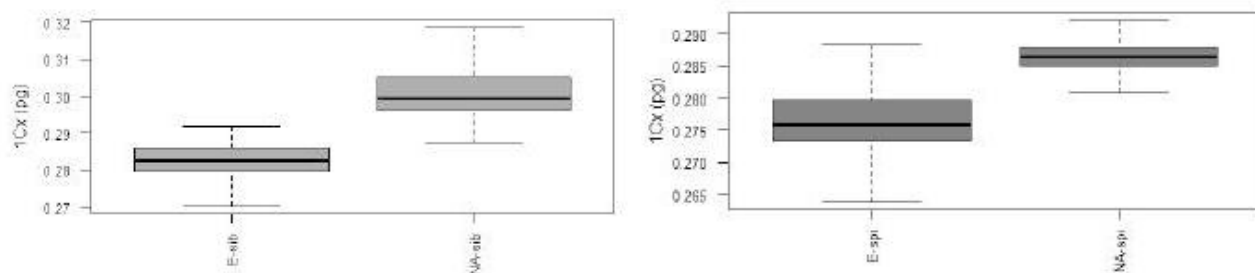
0,27-0,300 pg DNA. Tato hodnota si je blízce příbuzná (ovlivněno stejným ploidním stupněm), jelikož se jedná o blízce příbuzné a hybridizující druhy. Můžeme pozorovat i trend ve zvyšování obsahu jaderné DNA v porovnání amerických a evropských vzorků. Rozdíl ve velikostech genomu může být ovlivněn geografickou separovaností Severní Ameriky od zániku pevninského mostu v Beringově úžině (Chen et al., 2014).

Taxon	Ploidie	Počet chromosomů	GS \pm sd [pg]	1Cx[pq]
<i>M. spicatum</i> USA	6x	42	1,728 \pm 0,020	0,276
<i>M. Spicatum</i> EU	6x	42	1,658 \pm 0,044	0,288
<i>M. Sibiricum</i> USA	6x	42	1,8000 \pm 0,051	0,300
<i>M. sibiricum</i> EU	9x	63	2,558 \pm 0,049	0,284
<i>M. sibiricum</i> Skandinávie	6x	Musí být ověřeno karyologicky	1,732\pm0,050	0,288
<i>M. sibiricum</i> Skandinávie	9x	Musí být ověřeno karyologicky	2,446\pm0,053	0,27

Tab. 2.: Základní cytometrické charakteristiky z analýzy velikosti genomu. GS \pm sd- 2C velikost genomu a její standardní odchylka. 1Cx- velikost genomu v pikogramech přepočtená na monoploidní chromosomovou sádku.

Zatímco nízká variabilita uvnitř populací může být dána klonálním charakterem saných populací, kdy to může být do jisté míry dáno také způsobem sběru materiálu (Hofstra, Adam & Clayton, 1995). Zatímco Wu (2013) ve svých pracech došli k opačnému názoru a to, že vnitropopulační variabilita je u rodu *Myriophyllum* L. vysoká.

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) (viz Obrázek 10).



Obr. 10.: Párové porovnání 1Cx hodnot jedinců ze Severní ameriky a Evropy. Druhy *M. sibiricum* (6x; sib), *M. spicatum* (6x; spi).

Všechny předpokládané ploidní úrovně u všech taxonů byly potvrzeny počítáním chromozómů v roztlakových preparátech (provedeno Terezií Mandákovou, CEITEC,

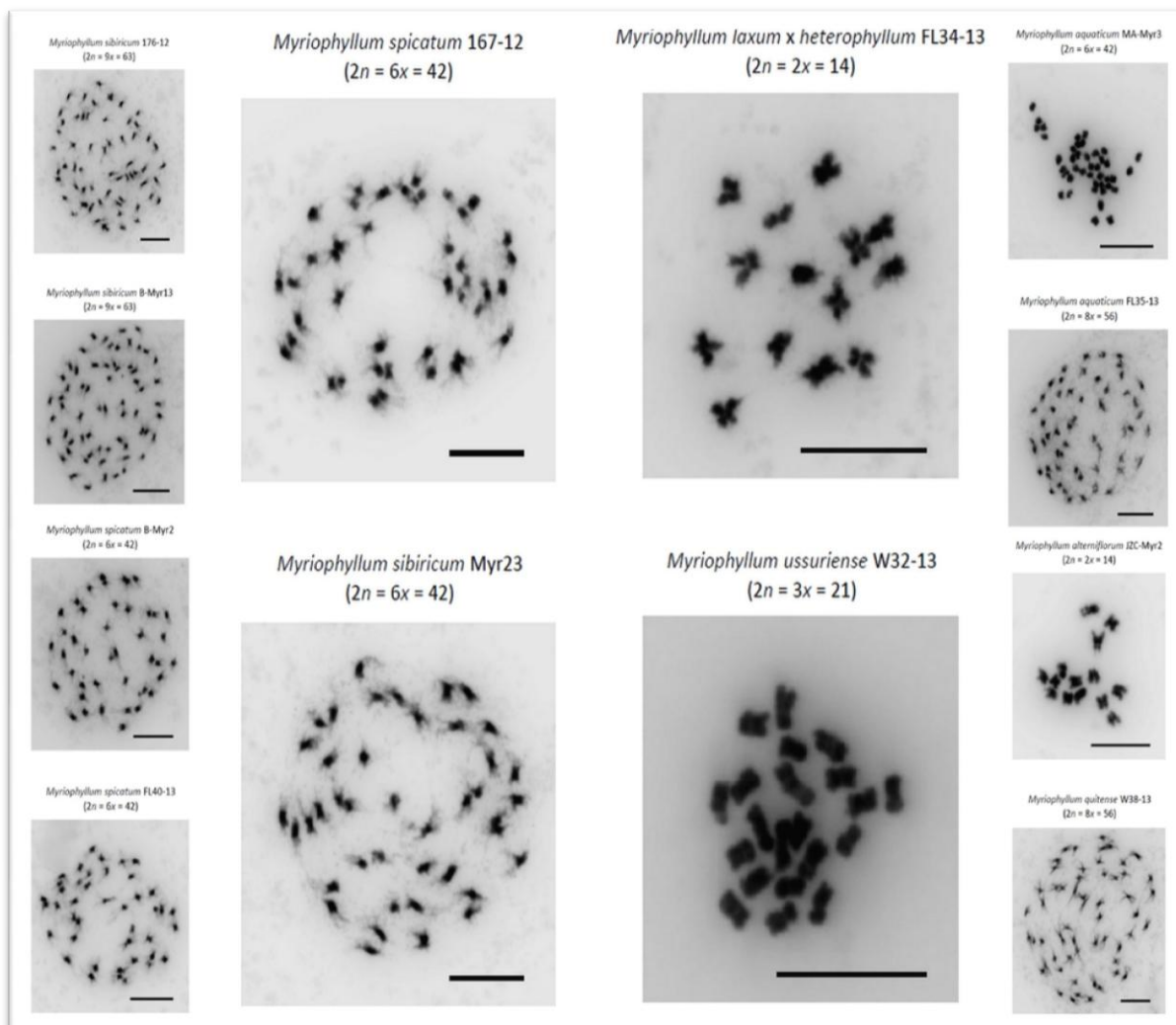
Masarykova univerzita, Brno) a cytometrické výstupy tak byly standardizovány. Na základě těchto dat bylo stanoveno celkem 5 ploidních úrovní: diploidní ($2n = 14$), tetraploidní ($2n = 28$), hexaploidní ($2n = 42$), oktoploidní ($2n = 56$) a nanoploidní ($2n = 63$) (viz Tabulka 3).

Species	Overall distribution	2n	Ploidy level	References
<i>M. alterniflorum</i>	Canada, NE USA, Europe, W and N Europe, N Africa, China	14	2x	Löve 1982a (Canada: Manitoba)
<i>M. sibiricum</i>	Canada, USA (except of SE part), boreal Europe and Asia	28	4x	Probatova et al. 2008, Chepinoga et al. 2012
		42	6x	Löve and Ritchie 1966 (Canada: Manitoba; ut <i>M. exalbescens</i>), Aiken 1978 (USA: Minnesota; ut <i>M. exalbescens</i>), Löve and Löve 1982a (Canada: Manitoba; ut <i>M. spicatum</i> ssp. <i>exalbescens</i>), this study
		63	9x	this study
<i>M. spicatum</i>	Europe, N Africa, boreal and temperate Asia, naturalized elsewhere	28	4x	Probatova and Sokolovskaya 1995, Aquaro et al. 2004
		36	5x+	–
		42	6x	Aiken 1978 (USA: Alabama), Aiken 1979 (Canada: British Columbia), this study
<i>M. quitense</i>	South America, North American Cordillera northwards to British Columbia	42	6x	Ceska et al. 1986 (Canada: British Columbia)
		56	8x	this study
<i>M. verticillatum</i>	boreal and temperate regions of northern hemisphere	14	2x	Chepinoga et al. 2012
		28	4x	Taylor and Mulligan 1968 (Canada: British Columbia; ut <i>M. spicatum</i> , see Aiken 1981), Aiken 1978 (USA: Minnesota), this study
		42	6x	Harada 1952
<i>M. aquaticum</i>	South America, naturalized elsewhere	56	8x	this study
<i>M. tenellum</i>	NE of North America	14	2x	Löve and Löve 1982b (Canada: Québec), this study
<i>M. farwellii</i>	Alaska, Canada, NE USA	14	2x	this study
<i>M. humile</i>	Canada (E), USA (NE)	14	2x	this study
<i>M. laxum</i>	SE USA	14	2x	this study
<i>M. pinnatum</i>	Canada (S parts), USA (middle, E)	14	2x	this study
		21?*	2x	this study
<i>M. hippuroides</i>	Canada (British Columbia), USA (W), Mexico, Central America	14?*	2x	this study
<i>M. heterophyllum</i>	Canada (SE – introduced?), USA (certainly native in central and SE part), naturalized elsewhere	14	2x	this study
		21	3x	this study
<i>M. ussuriense</i>	E Asia, Canada (British Columbia), USA (Washington, Oregon)	14	2x	–
		21	3x	Ceska et al. 1986 (Canada: British Columbia), this study

Tab.

vykazující nově určené ploidy u rodu *Myriophyllum* L.

3.:



Obr. 11.: Mitotické chromozomy nabarvené DAPI, měřítko = 10 μ m

Výsledky a diskuze molekulárně-genetických analýz

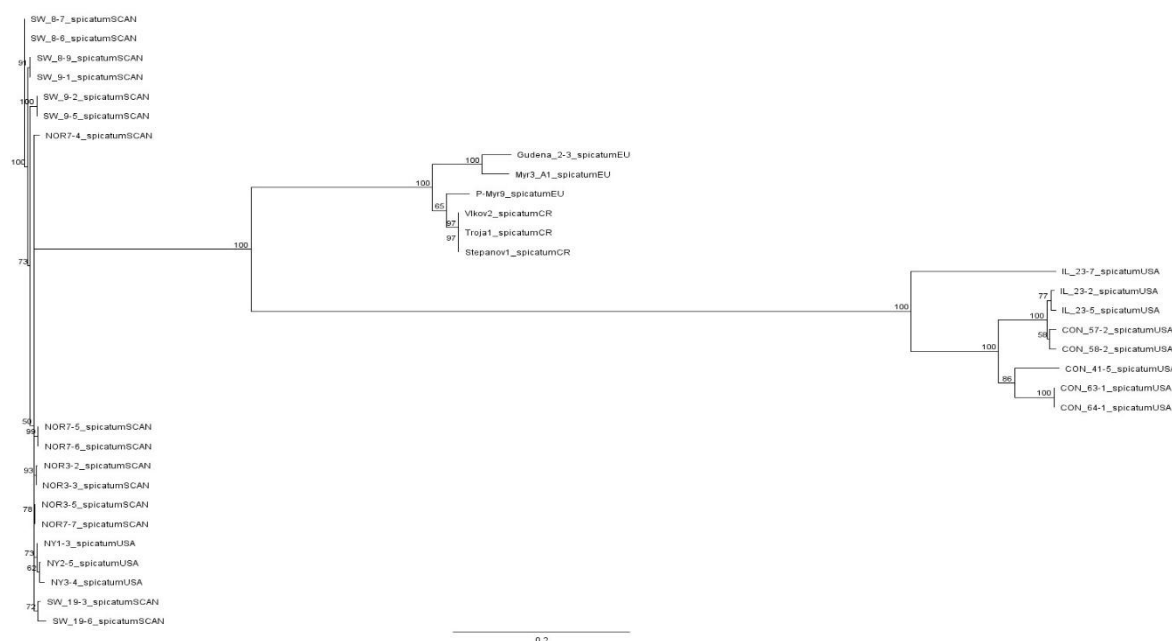
Podařilo se nám celkem získat celkem přes šest tisíc vzorků (1050 odběrů v Evropě a 5242 odběrů v USA) rostlinného materiálu určeného pro extrakce DNA. Odběr vzorků pro extrakci DNA probíhal vždy tak, aby byla zachována kontinuita informací o daném vzorku, tzn. cytometrické zjištění ploidní úrovně, případně velikosti genomu, probíhalo na stejném jedinci jako extrakce DNA a následné molekulární analýzy.

Celkem byla DNA extrahována z 1994 vzorků, přičemž 436 vzorků pocházelo z Evropy a 1508 vzorků bylo z USA.

Vnitro a mezidruhová hybridizace byla sledována pomocí analýzy cp DNA a ITS analýzy. Byla provedena sekvenace vybraných úseků. Celkem bylo sekvenováno 650 vzorků, přičemž 447 sekvencí (223 z Evropy a 234 z USA) bylo následně použito v alignmentech. Ostatní sekvenace 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 stolítků ITS1myrio (5'GCGGAAGGATCATTGTCGAA3') eliminující potenciální kontaminace podle Thum et al., 2011 a univerzální primer ITS4 dle Soltis and Kuzoff (1995).

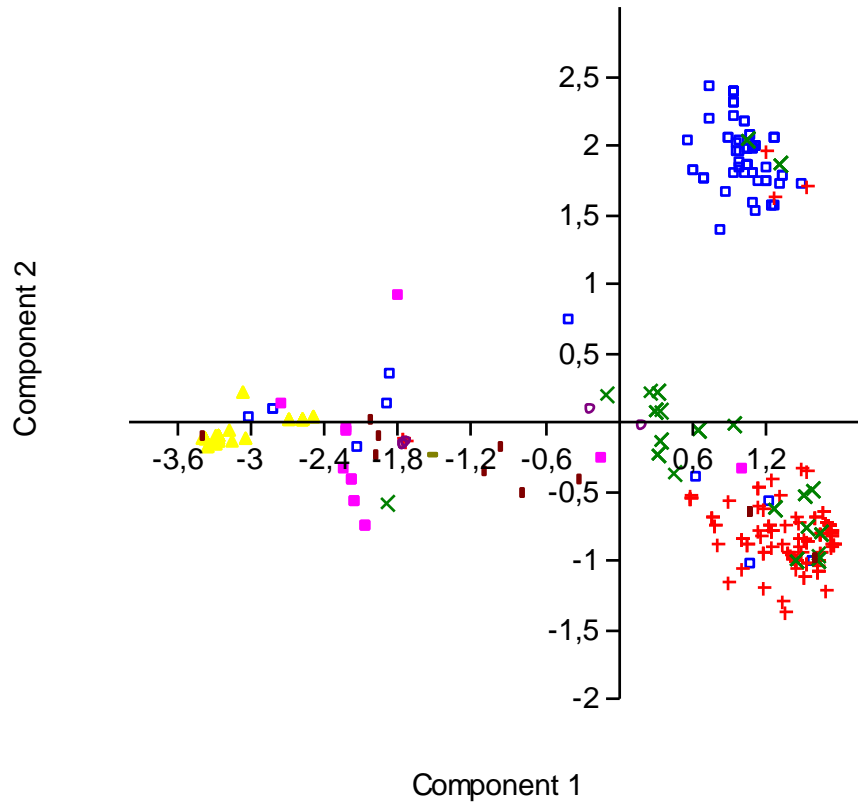
Na fylogenetickém stromu (Obr. 12) pro Neighbour-joining analýzu pro druh *M. Spicatum* je jasné vylišení 3 skupin pomocí primeru pro jaderný lokus ITS1. Došlo zde k celkovému vymezení izolovaných severoamerických populací, např. jako v práci Wu et al. (2015). Ve středovém pásmu nalezneme středoevropské populace. Třetí skupinou jsou vzorky z intaktní 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 dříve získaného výzkumu a této disertaci. Napovídá nám to o potencionální vnitro i mezidruhové hybridizace těchto druhů,

kteřá 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*.

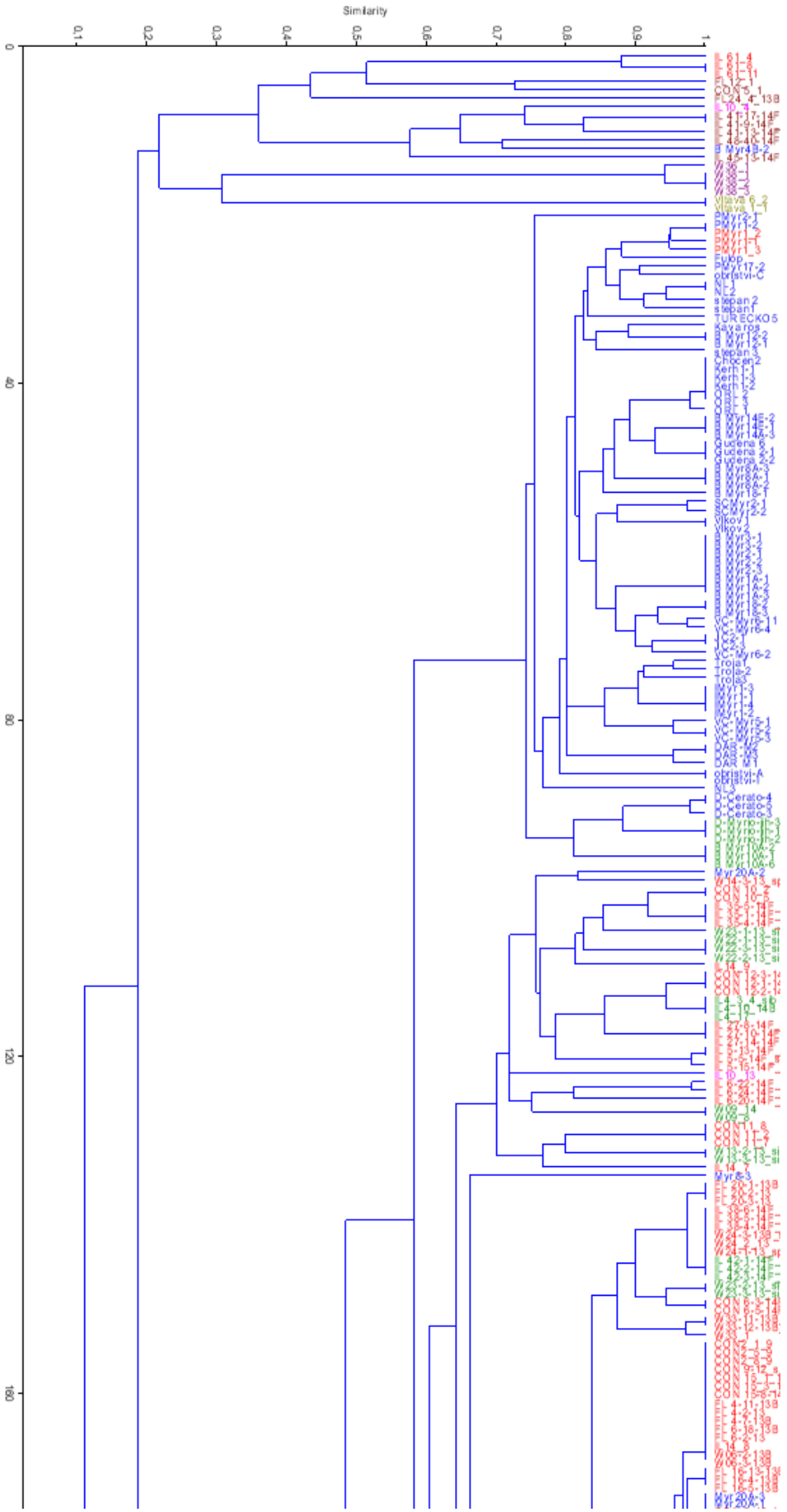


Obr. 12.: Konzensus Neighbor-Joining analýzy ITS lokusu jaderné DNA pro *M. spicatum*, genetická distance - Tamura Nei, 1000 opakování

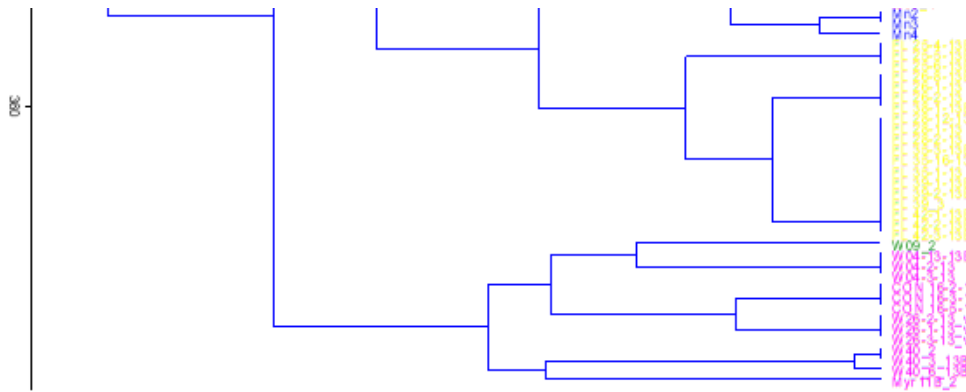
Z výsledků PCoA kombinace pěti mikrosatelitových primerů (Obr. 13) je patrné odlišení jedinců *M. aquaticum*. Stejně jako při sekvenování jaderného ITS úseku i analýza mikrosatelitů nasvědčuje, že se jedná o jedince klonálního původu. Jako nejvariabilnější se zdá být *M. verticillatum*, jehož jedinci jsou nejvíce rozprostřeni. Markantní rozdíl ukazují jedinci *M. spicatum* pocházející z Evropy a USA, obě skupiny jsou jednoznačně odlišené. Částečný překryv *M. spicatum* a *M. sibiricum* naznačuje na možnost hybridizace jmenovaných druhů (Wu et al., 2015). Kříženci, které detekovali ve své práci pomocí morfologických znaků Moody & Les (2007a) stáli v těchto znacích někde uprostřed a překrývali se často s oběma rodičovskými druhy, které byly pomocí morfologických analýz snadno rozeznatelné. Je transparentní, že vhodný výběr primerů a cílových oblastí vede ke zjednodušení determinace.



Obr. 13.: PCoA analýza mikrosatelitových analýz. Evropa - *M. spicatum* USA - *M. spicatum*, *M. aquaticum*, *M. sibiricum*, *M. verticilatum* *M. heterophyllum* *M. quitense* *M. alteriflorum*







Obr. 13.: UPGMA shluková analýza – použitý koeficient podobnosti: Dice **Evropa -M. spicatum, USA**
-M. spicatum, M. aquaticum, M. sibiricum, M. verticilatum, M. heterophyllum, M. quitense,
M.alteriflorum

Na výsledku shlukové analýzy Obr. 13 je patrné téměř jasné vylišení *M.spicatum* versus *M.sibiricum*. Kompaktní ucelení zde tvoří *M. aquaticum*.

Přesto, že vzorky *M. aquaticum* zahrnuté do výsledného stromu pocházejí z různých velmi vzdálených oblastí USA, může se jednat o klony. Je tomu tak pravděpodobně proto, že se tento druh výborně klonálně množí a byl do USA nejspíše zavlečen neopatrnými akvaristy či milovníky zahradních jezírek, kdy se do volné přírody dostalo pár importovaných rostlin, které se dále rozšířily (Aiken 1981; Sheppardet al. 2006).

Důležitým výstupem analýzy molekulárně-genetických analýz je zřetelné odlišení skupiny evropských a amerických populací; vnitřní diferenciace 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 je tomu u českého materiálu. U skupiny českého materiálu 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 nativních 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 prokazovaly 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 zjištěna i u druhu *M. sibiricum*. Na počátku projektu byla navržena 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 stolistku 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 nanoploid.

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. Veškerá tato 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 diferenciace nastala v případě hexaploidního *M. sibiricum* z jedné heterogenní populace shromážděné ve Švédsku. Vzorok 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 environmentálních a ekologických faktorů, které by mohly umožnit invazní růst stolístků/ či chrastice i jejich kříženců.

Přílohy

Podrobná tabulka sběrů.

1	Evropa	Belgie	B-Myr1	294	Severní Amerika	New York	CON67
2	Evropa	Belgie	B-Myr10	295	Severní Amerika	Vermont	CON68
3	Evropa	Belgie	B-Myr2	296	Severní Amerika	Vermont	CON69
4	Evropa	Belgie	B-Myr3	297	Severní Amerika	Vermont	CON70
5	Evropa	Belgie	B-Myr4	298	Severní Amerika	Vermont	CON71
6	Evropa	Belgie	B-Myr5	299	Severní Amerika	Vermont	CON72
7	Evropa	Belgie	B-Myr6	300	Severní Amerika	Vermont	CON73
8	Evropa	Belgie	B-Myr7	301	Severní Amerika	New Hampshire	CON74
9	Evropa	Belgie	B-Myr8	302	Severní Amerika	Maine	CON75
10	Evropa	Belgie	B-Myr9	303	Severní Amerika	Maine	CON76
11	Evropa	Česká republika	5309	304	Severní Amerika	Florida	FL01-13
12	Evropa	Česká republika	006-08	305	Severní Amerika	Florida	FL02-13
13	Evropa	Česká republika	007-08	306	Severní Amerika	Florida	FL03-13
14	Evropa	Česká republika	013-12 (Hořín- 1. túň)	307	Severní Amerika	Florida	FL04-13
15	Evropa	Česká republika	015-12 (Hořín- 2. túň)	308	Severní Amerika	Florida	FL05-13
16	Evropa	Česká republika	023-08	309	Severní Amerika	Florida	FL06-13
17	Evropa	Česká republika	025-11	310	Severní Amerika	Florida	FL07-13
18	Evropa	Česká republika	026-12 (Kamenné Žehrovice, Tuchlovice)	311	Severní Amerika	Florida	FL08-13
19	Evropa	Česká republika	040-12 (Troja)	312	Severní Amerika	Florida	FL09-13
20	Evropa	Česká republika	042-12	313	Severní Amerika	Florida	FL10-13
21	Evropa	Česká republika	047-12	314	Severní Amerika	Florida	FL11-13
22	Evropa	Česká republika	059-09	315	Severní Amerika	Florida	FL12-13
23	Evropa	Česká republika	075-12 (Lápek- vert)	316	Severní Amerika	Florida	FL13-13
24	Evropa	Česká republika	088-12 (Vidlák - vert)	317	Severní Amerika	Florida	FL14-13
25	Evropa	Česká republika	091-12 (Křčák- spicatum)	318	Severní Amerika	Florida	FL15-13
26	Evropa	Česká	111-10	319	Severní Amerika	Florida	FL16-13

		republika			Amerika		
27	Evropa	Česká republika	113-12 (Karviná-Darkov-kanál)	320	Severní Amerika	Florida	FL17-13
28	Evropa	Česká republika	121-12 (Darkovské M.-Laguna)	321	Severní Amerika	Florida	FL18-13
29	Evropa	Česká republika	132-12 (spic-Štěpán)	322	Severní Amerika	Florida	FL19-13
30	Evropa	Česká republika	141-11	323	Severní Amerika	Georgia	FL20-13
31	Evropa	Česká republika	142-12 (spic-Doly/spic-Karviná-Doly)	324	Severní Amerika	Georgia	FL21-13
32	Evropa	Česká republika	144-11	325	Severní Amerika	Alabama	FL22-13
33	Evropa	Česká republika	150-12 (ALTER1)	326	Severní Amerika	Alabama	FL23-13
34	Evropa	Česká republika	151-12 (ALTER2)	327	Severní Amerika	Alabama	FL24-13
35	Evropa	Česká republika	155-12 (ALTER3)	328	Severní Amerika	Alabama	FL25-13
36	Evropa	Česká republika	156-12 (ALTER4)	329	Severní Amerika	Alabama	FL26-13
37	Evropa	Česká republika	158-12 (ALTER5)	330	Severní Amerika	Alabama	FL27-13
38	Evropa	Česká republika	161-12 (ALTER6)	331	Severní Amerika	Florida	FL28-13
39	Evropa	Česká republika	182-12 (KERHARTICE)	332	Severní Amerika	Florida	FL29-13
40	Evropa	Česká republika	188-12 (G88 Ohře)	333	Severní Amerika	Florida	FL30-13
41	Evropa	Česká republika	Beroun	334	Severní Amerika	Alabama	FL31-13
42	Evropa	Česká republika	BRANDÝS N. O.	335	Severní Amerika	Alabama	FL32-13
43	Evropa	Česká republika	spic-Orlice-Brandys	336	Severní Amerika	Alabama	FL33-13
44	Evropa	Česká republika	Bukovany	337	Severní Amerika	Mississippi	FL34-13
45	Evropa	Česká republika	Bukovina	338	Severní Amerika	Mississippi	FL35-13
46	Evropa	Česká republika	Buškovice	339	Severní Amerika	Louisiana	FL36-13
47	Evropa	Česká republika	Hraštice	340	Severní Amerika	Louisiana	FL37-13
48	Evropa	Česká republika	CHOCEŇ 2	341	Severní Amerika	Louisiana	FL38-13
49	Evropa	Česká republika	JC - 1	342	Severní Amerika	Louisiana	FL39-13
50	Evropa	Česká republika	JC - 2	343	Severní Amerika	Louisiana	FL40-13
51	Evropa	Česká republika	JC - 3	344	Severní Amerika	Louisiana	FL41-13
52	Evropa	Česká republika	JC - 4	345	Severní Amerika	Louisiana	FL42-13
53	Evropa	Česká republika	JC - 5	346	Severní Amerika	Louisiana	FL43-13

54	Evropa	Česká republika	JC - 6	347	Severní Amerika	Illinois	IL 01
55	Evropa	Česká republika	JC - 7	348	Severní Amerika	Wisconsin	IL 02
56	Evropa	Česká republika	JC - 8	349	Severní Amerika	Illinois	IL 03-1
57	Evropa	Česká republika	JC - 9	350	Severní Amerika	Illinois	IL 03-2
58	Evropa	Česká republika	JM-Myr1	351	Severní Amerika	Wisconsin	IL 04
59	Evropa	Česká republika	JM-Myr2	352	Severní Amerika	Wisconsin	IL 05
60	Evropa	Česká republika	JM-Myr3	353	Severní Amerika	Wisconsin	IL 06
61	Evropa	Česká republika	JM-Myr4	354	Severní Amerika	Wisconsin	IL 07
62	Evropa	Česká republika	JM-Myr5	355	Severní Amerika	Wisconsin	IL 08
63	Evropa	Česká republika	JM-Myr6	356	Severní Amerika	Wisconsin	IL 09
64	Evropa	Česká republika	JM-Myr7	357	Severní Amerika	Wisconsin	IL 10
65	Evropa	Česká republika	JM-Myr8	358	Severní Amerika	Wisconsin	IL 11
66	Evropa	Česká republika	JZC-Myr1	359	Severní Amerika	Wisconsin	IL 12
67	Evropa	Česká republika	JZC-Myr2	360	Severní Amerika	Wisconsin	IL 13
68	Evropa	Česká republika	Káranice	361	Severní Amerika	Wisconsin	IL 14
69	Evropa	Česká republika	Karlovy Vary	362	Severní Amerika	Wisconsin	IL 15
70	Evropa	Česká republika	Lety	363	Severní Amerika	Wisconsin	IL 16
71	Evropa	Česká republika	Lutovnick	364	Severní Amerika	Wisconsin	IL 17
72	Evropa	Česká republika	MS-Myr1	365	Severní Amerika	Wisconsin	IL 18
73	Evropa	Česká republika	MS001	366	Severní Amerika	Illinois	IL 20
74	Evropa	Česká republika	MS002	367	Severní Amerika	Illinois	IL 21
75	Evropa	Česká republika	Myr 1 Capkovo jezírko	368	Severní Amerika	Illinois	IL 22
76	Evropa	Česká republika	Myr 2-Choltice-Jedousov	369	Severní Amerika	Illinois	IL 23
77	Evropa	Česká republika	Myr3 - Klára Kabátová	370	Severní Amerika	Indiana	IL 24
78	Evropa	Česká republika	Ohře-Loket (Bára)	371	Severní Amerika	Indiana	IL 25
79	Evropa	Česká republika	Olomouc cihelna	372	Severní Amerika	Indiana	IL 26
80	Evropa	Česká republika	Pasohlávky	373	Severní Amerika	Indiana	IL 27
81	Evropa	Česká republika	Písečný	374	Severní Amerika	Indiana	IL 28
82	Evropa	Česká republika	Ráček II	375	Severní Amerika	Indiana	IL 29

83	Evropa	Česká republika	Rybenský mlýn	376	Severní Amerika	Indiana	IL 30
84	Evropa	Česká republika	SC-Myr1	377	Severní Amerika	Indiana	IL 31
85	Evropa	Česká republika	SC-Myr2	378	Severní Amerika	Indiana	IL 32
86	Evropa	Česká republika	SC-Myr3	379	Severní Amerika	Indiana	IL 33
87	Evropa	Česká republika	SC-Myr4	380	Severní Amerika	Indiana	IL 34
88	Evropa	Česká republika	Srbsko	381	Severní Amerika	Indiana	IL 35
89	Evropa	Česká republika	STC-Myr1	382	Severní Amerika	Illinois	IL 36
90	Evropa	Česká republika	STC-Myr2	383	Severní Amerika	Illinois	IL 37
91	Evropa	Česká republika	STC-Myr3	384	Severní Amerika	Illinois	IL 38
92	Evropa	Česká republika	STC-Myr4	385	Severní Amerika	Missouri	IL 39
93	Evropa	Česká republika	STC-Myr5	386	Severní Amerika	Missouri	IL 40
94	Evropa	Česká republika	Týn nad Bečvou	387	Severní Amerika	Missouri	IL 41
95	Evropa	Česká republika	v.n. Sedlec	388	Severní Amerika	Missouri	IL 42
96	Evropa	Česká republika	VC-Myr1	389	Severní Amerika	Missouri	IL 43
97	Evropa	Česká republika	VC-Myr2	390	Severní Amerika	Missouri	IL 44
98	Evropa	Česká republika	VC-Myr3	391	Severní Amerika	Missouri	IL 45
99	Evropa	Česká republika	VC-Myr4	392	Severní Amerika	Missouri	IL 46
100	Evropa	Česká republika	VC-Myr5	393	Severní Amerika	Missouri	IL 47
101	Evropa	Česká republika	VC-Myr6	394	Severní Amerika	Missouri	IL 48
102	Evropa	Česká republika	Výrovka	395	Severní Amerika	Missouri	IL 50
103	Evropa	Česká republika	Zátluky	396	Severní Amerika	Tennessee	IL 51
104	Evropa	Česká republika	ZC-Myr1	397	Severní Amerika	Alabama	IL 52
105	Evropa	Česká republika	ZC-Myr2	398	Severní Amerika	Alabama	IL 53
106	Evropa	Česká republika	Žalhostice	399	Severní Amerika	Alabama	IL 54
107	Evropa	Česká republika	Žernoseky	400	Severní Amerika	Alabama	IL 55
108	Evropa	Česká republika	ZK3105	401	Severní Amerika	Mississippi	IL 56
109	Evropa	Česká republika	ZK3108	402	Severní Amerika	Mississippi	IL 57
110	Evropa	Dánsko	167-12 (D-CERATO)	403	Severní Amerika	Mississippi	IL 58
111	Evropa	Dánsko	168-12 (D-CERATO)	404	Severní Amerika	Alabama	IL 59

112	Evropa	Dánsko	170-12 (GUDENÁ2)	405	Severní Amerika	Alabama	IL 60
113	Evropa	Dánsko	171-12 (GUDENÁ4)	406	Severní Amerika	Alabama	IL 61
114	Evropa	Dánsko	172-12 (GUDENÁ5)	407	Severní Amerika	Alabama	IL 62
115	Evropa	Dánsko	173-12 (GUDENÁ6)	408	Severní Amerika	Alabama	IL 63
116	Evropa	Dánsko	174-12 (GUDENÁ7)	409	Severní Amerika	Alabama	IL 64
117	Evropa	Dánsko	175-12 (D- VERTICIL)	410	Severní Amerika	Wisconsin	IL19
118	Evropa	Dánsko	176-12 (D MYRIO_JIH)	411	Severní Amerika	Minnesota	Myr 001
119	Evropa	Dánsko	177-12 (MYRIO_JIH2)	412	Severní Amerika	Minnesota	Myr 002
120	Evropa	Finsko	ZK2981	413	Severní Amerika	Minnesota	Myr 003
121	Evropa	Finsko	ZK2991	414	Severní Amerika	Minnesota	Myr 004
122	Evropa	Finsko	Helsinky 1-1	415	Severní Amerika	Minnesota	Myr 005
123	Evropa	Finsko	Helsinky 2-1	416	Severní Amerika	Minnesota	Myr 006
124	Evropa	Finsko	Helsinky 3-1	417	Severní Amerika	Minnesota	Myr 007
125	Evropa	Finsko	Helsinky 4-1	418	Severní Amerika	Minnesota	Myr 008
126	Evropa	Finsko	Helsinky 5-1	419	Severní Amerika	Minnesota	Myr 009
127	Evropa	Finsko	Helsinky 6-1	420	Severní Amerika	Minnesota	Myr 010
128	Evropa	Finsko	Helsinky 7-1	421	Severní Amerika	Minnesota	Myr 011
129	Evropa	Finsko	Helsinky- Konala	422	Severní Amerika	Minnesota	Myr 012
130	Evropa	Itálie	I-Myr1	423	Severní Amerika	Minnesota	Myr 013
131	Evropa	Itálie	IT2	424	Severní Amerika	Minnesota	Myr 014
132	Evropa	Itálie	IT3	425	Severní Amerika	Minnesota	Myr 015
133	Evropa	Litva	P-Myr10	426	Severní Amerika	Minnesota	Myr 016
134	Evropa	Litva	P-Myr6	427	Severní Amerika	Minnesota	Myr 017
135	Evropa	Litva	P-Myr7	428	Severní Amerika	Minnesota	Myr 018
136	Evropa	Litva	P-Myr8	429	Severní Amerika	Minnesota	Myr 019
137	Evropa	Litva	P-Myr9	430	Severní Amerika	Minnesota	Myr 020
138	Evropa	Maďarsko	Fülöpsálás	431	Severní Amerika	Minnesota	Myr 021
139	Evropa	Maďarsko	MA-Myr1	432	Severní Amerika	Minnesota	Myr 022
140	Evropa	Maďarsko	MA-Myr2	433	Severní Amerika	Minnesota	Myr 023

141	Evropa	Maďarsko	MA-Myr3	434	Severní Amerika	Minnesota	Myr 024
142	Evropa	Německo	178-12 (D ÖRTZE)	435	Severní Amerika	Minnesota	Myr 101
143	Evropa	Německo	B-Myr14	436	Severní Amerika	Minnesota	Myr 102
144	Evropa	Německo	B-Myr15	437	Severní Amerika	Minnesota	Myr 103
145	Evropa	Německo	B-Myr16	438	Severní Amerika	Washington	W01-13
146	Evropa	Německo	B-Myr17	439	Severní Amerika	Washington	W02-13
147	Evropa	Německo	B-Myr18	440	Severní Amerika	Washington	W03-13
148	Evropa	Německo	JN-01	441	Severní Amerika	Washington	W04-13
149	Evropa	Německo	JN-02	442	Severní Amerika	Washington	W05-13
150	Evropa	Německo	JN-03	443	Severní Amerika	Washington	W06-13
151	Evropa	Německo	JN-04	444	Severní Amerika	Washington	W07-13
152	Evropa	Německo	JN-05A	445	Severní Amerika	Washington	W08-13
153	Evropa	Německo	JN-05B	446	Severní Amerika	Washington	W09-13
154	Evropa	Německo	JN-06	447	Severní Amerika	Washington	W10-13
155	Evropa	Německo	JN-07	448	Severní Amerika	Washington	W11-13
156	Evropa	Německo	JN-08	449	Severní Amerika	Washington	W12-13
157	Evropa	Německo	JN-09	450	Severní Amerika	Washington	W13-13
158	Evropa	Německo	JN-10	451	Severní Amerika	Washington	W14-13
159	Evropa	Německo	JN-11	452	Severní Amerika	Washington	W15-13
160	Evropa	Německo	JN-12	453	Severní Amerika	Washington	W16-13
161	Evropa	Německo	JN-13	454	Severní Amerika	Washington	W17-13
162	Evropa	Německo	JN-14	455	Severní Amerika	Washington	W18-13
163	Evropa	Německo	JN-15	456	Severní Amerika	Washington	W19-13
164	Evropa	Německo	JN-16	457	Severní Amerika	Washington	W20-13
165	Evropa	Nizozemí	B-Myr11	458	Severní Amerika	Washington	W21-13
166	Evropa	Nizozemí	B-Myr12	459	Severní Amerika	Washington	W22-13
167	Evropa	Nizozemí	B-Myr13	460	Severní Amerika	Washington	W23-13
168	Evropa	Norsko	N4	461	Severní Amerika	Washington	W24-13
169	Evropa	Polsko	075-11 (spic Polsko)	462	Severní Amerika	Washington	W25-13

170	Evropa	Polsko	P-Myr1	463	Severní Amerika	Washington	W26-13
171	Evropa	Polsko	P-Myr11	464	Severní Amerika	Washington	W27-13
172	Evropa	Polsko	P-Myr12	465	Severní Amerika	Washington	W28-13
173	Evropa	Polsko	P-Myr13	466	Severní Amerika	Washington	W29-13
174	Evropa	Polsko	P-Myr14	467	Severní Amerika	Washington	W30-13
175	Evropa	Polsko	P-Myr15	468	Severní Amerika	Washington	W31-13
176	Evropa	Polsko	P-Myr16	469	Severní Amerika	Washington	W32-13
177	Evropa	Polsko	P-Myr17	470	Severní Amerika	Oregon	W33-13
178	Evropa	Polsko	P-Myr2	471	Severní Amerika	Oregon	W34-13
179	Evropa	Polsko	P-Myr3	472	Severní Amerika	Washington	W35-13
180	Evropa	Polsko	P-Myr4	473	Severní Amerika	Oregon	W36-13
181	Evropa	Polsko	P-Myr5	474	Severní Amerika	Oregon	W37-13
182	Evropa	Rakousko	R01	475	Severní Amerika	Oregon	W38-13
183	Evropa	Rakousko	R02	476	Severní Amerika	Oregon	W39-13
184	Evropa	Rakousko	R03	477	Severní Amerika	Oregon	W40-13
185	Evropa	Rakousko	R04	478	Severní Amerika	Oregon	W41-13
186	Evropa	Rakousko	R05	479	Severní Amerika	Oregon	W42-13
187	Evropa	Rakousko	R06	480	Severní Amerika	Oregon	W43-13
188	Evropa	Rakousko	R07	481	Severní Amerika	Oregon	W44-13
189	Evropa	Rakousko	R08	482	Severní Amerika	Oregon	W45-13
190	Evropa	Rakousko	R09	483	Severní Amerika	Oregon	W46-13
191	Evropa	Rakousko	R10	484	Severní Amerika	Oregon	W47-13
192	Evropa	Rakousko	R11	485	Severní Amerika	Oregon	W48-13
193	Evropa	Rakousko	R12	486	Severní Amerika	Oregon	W49-13
194	Evropa	Rakousko	R13	487	Severní Amerika	Kalifornie	W50-13
195	Evropa	Rakousko	R14	488	Severní Amerika	Kalifornie	W51-13
196	Evropa	Rakousko	R15	489	Severní Amerika	Kalifornie	W52-13
197	Evropa	Rakousko	R16	490	Evropa	Česká republika	Karlštejn
198	Evropa	Rakousko	ZK3140	491	Evropa	Lotyšsko	Lotyšsko - Myr1

199	Evropa	Slovensko	077-11 (spic-Orava)	492	Evropa	Česká republika	Švihov
200	Evropa	Slovensko	080-11 (vertic Orava, 2 kytky)	493	Evropa	Slovensko	Šírava
201	Evropa	Slovensko	099-11 (spic Kúty)	494	Evropa	Česká republika	Lhotecký rybník (/Lhotka)
202	Evropa	Slovensko	Kl'účovec	495	Evropa	Česká republika	Kersko
203	Evropa	Slovensko	Klátovské rameno	496	USA	Massachusetts	NY1
204	Evropa	Slovensko	Lom Nezbud	497	USA	New York	NY2
205	Evropa	Slovensko	MS-Myr10	498	USA	New York	NY3
206	Evropa	Slovensko	MS-Myr11	499	USA	Pennsylvania	NY4
207	Evropa	Slovensko	MS-Myr12	500	Evropa	Dánsko	DK1
208	Evropa	Slovensko	MS-Myr2	501	Evropa	Dánsko	DK2
209	Evropa	Slovensko	MS-Myr3	502	Evropa	Dánsko	DK3
210	Evropa	Slovensko	MS-Myr4	503	Evropa	Dánsko	DK4
211	Evropa	Slovensko	MS-Myr5	504	Evropa	Dánsko	DK5
212	Evropa	Slovensko	MS-Myr6	505	Evropa	Švédsko	SW1
213	Evropa	Slovensko	MS-Myr7	506	Evropa	Švédsko	SW2
214	Evropa	Slovensko	MS-Myr8	507	Evropa	Švédsko	SW3
215	Evropa	Slovensko	MS-Myr8	508	Evropa	Švédsko	SW4
216	Evropa	Slovensko	MS-Myr9	509	Evropa	Švédsko	SW5
217	Evropa	Slovensko	MS-Myr9	510	Evropa	Švédsko	SW6
218	Evropa	Slovensko	Nezbudská Lúčka	511	Evropa	Švédsko	SW7
219	Evropa	Švédsko	M1	512	Evropa	Švédsko	SW8
220	Evropa	Švédsko	M2	513	Evropa	Švédsko	SW9
221	Evropa	Švédsko	M3	514	Evropa	Švédsko	SW10
222	Evropa	Švýcarsko		515	Evropa	Švédsko	SW11
223	Evropa	Velká Británie	UK01	516	Evropa	Švédsko	SW12
224	Evropa	Velká Británie	UK02	517	Evropa	Švédsko	SW13
225	Evropa	Velká Británie	UK03	518	Evropa	Švédsko	SW14
226	Evropa	Velká Británie	UK04	519	Evropa	Švédsko	SW15
227	Evropa	Velká Británie	UK05	520	Evropa	Švédsko	SW16-1
228	Severní Amerika	Virginia	CON01	521	Evropa	Švédsko	SW16-2
229	Severní Amerika	Maryland	CON02	522	Evropa	Švédsko	SW17
230	Severní Amerika	Maryland	CON03	523	Evropa	Švédsko	SW18
231	Severní Amerika	New Jersey	CON04	524	Evropa	Švédsko	SW19
232	Severní Amerika	New Jersey	CON05	525	Evropa	Švédsko	SW20
233	Severní Amerika	New Jersey	CON06	526	Evropa	Švédsko	SW21

234	Severní Amerika	Pennsylvania	CON07	527	Evropa	Švédsko	SW22
235	Severní Amerika	Pennsylvania	CON08	528	Evropa	Švédsko	SW23
236	Severní Amerika	New York	CON09	529	Evropa	Švédsko	SW24
237	Severní Amerika	New York	CON10	530	Evropa	Švédsko	SW25
238	Severní Amerika	New York	CON11	531	Evropa	Švédsko	SW26
239	Severní Amerika	New York	CON12	532	Evropa	Švédsko	Stavre
240	Severní Amerika	New York	CON13	533	Evropa	Česká republika	Bukovec
241	Severní Amerika	New York	CON14	534	Evropa	Česká republika	Černošice [Berounka (9-8,5km)]
242	Severní Amerika	New York	CON15	535	Evropa	Česká republika	Druztová
243	Severní Amerika	Massachusetts	CON16	536	Evropa	Česká republika	Spálený mlýn
244	Severní Amerika	Connecticut	CON17	537	Evropa	Česká republika	Bezpráví
245	Severní Amerika	Connecticut	CON18	538	Evropa	Česká republika	Boletice nad Labem
246	Severní Amerika	Connecticut	CON19	539	Evropa	Česká republika	Aldašín
247	Severní Amerika	Connecticut	CON20	540	Evropa	Česká republika	Svádov
248	Severní Amerika	Connecticut	CON21	541	Evropa	Česká republika	Sudislav
249	Severní Amerika	Connecticut	CON22	542	Evropa	Česká republika	Sedlečko
250	Severní Amerika	Connecticut	CON23	543	Evropa	Česká republika	Blešno
251	Severní Amerika	Connecticut	CON24	544	Evropa	Česká republika	Železnice
252	Severní Amerika	Connecticut	CON25	545	Evropa	Česká republika	ZK2341
253	Severní Amerika	Connecticut	CON26	546	Evropa	Česká republika	ZK2342
254	Severní Amerika	New York	CON27	547	Evropa	Česká republika	ZK2343
255	Severní Amerika	Connecticut	CON28	548	USA	Vermont	ZK2927
256	Severní Amerika	Connecticut	CON29	549	USA	New Hampshire	ZK2947
257	Severní Amerika	Connecticut	CON30	550	USA	New Hampshire	ZK2954
258	Severní Amerika	Connecticut	CON31	551	Evropa	Norsko	NOR1
259	Severní Amerika	Connecticut	CON32	552	Evropa	Norsko	NOR2
260	Severní Amerika	Connecticut	CON33	553	Evropa	Norsko	NOR3
261	Severní Amerika	Connecticut	CON34	554	Evropa	Norsko	NOR4

262	Severní Amerika	Connecticut	CON35	555	Evropa	Norsko	NOR5
263	Severní Amerika	Connecticut	CON36	556	Evropa	Norsko	NOR6
264	Severní Amerika	Connecticut	CON37	557	Evropa	Norsko	NOR7
265	Severní Amerika	Connecticut	CON38	558	Evropa	Norsko	NOR8
266	Severní Amerika	Connecticut	CON39	559	Evropa	Norsko	NOR9
267	Severní Amerika	Connecticut	CON40	560	Evropa	Norsko	NOR10
268	Severní Amerika	Massachusetts	CON41	561	Evropa	Norsko	NOR11
269	Severní Amerika	Massachusetts	CON42	562	Evropa	Norsko	NOR12
270	Severní Amerika	Connecticut	CON43	563	Evropa	Norsko	NOR13
271	Severní Amerika	Connecticut	CON44	564	Evropa	Norsko	NOR14
272	Severní Amerika	Rhode Island	CON45	565	Evropa	Norsko	NOR15
273	Severní Amerika	Massachusetts	CON46	566	Evropa	Norsko	NOR16
274	Severní Amerika	Massachusetts	CON47	567	Evropa	Norsko	NOR17
275	Severní Amerika	Massachusetts	CON48	568	Evropa	Norsko	NOR18
276	Severní Amerika	New Hampshire	CON49	569	Evropa	Norsko	NOR19
277	Severní Amerika	New Hampshire	CON50	570	Evropa	Norsko	NOR20
278	Severní Amerika	Maine	CON51	571	Evropa	Norsko	NOR21
279	Severní Amerika	New Hampshire	CON52	572	Evropa	Norsko	NOR22
280	Severní Amerika	New Hampshire	CON53	573	Evropa	Norsko	NOR23
281	Severní Amerika	Vermont	CON54	574	Evropa	Norsko	NOR24
282	Severní Amerika	Vermont	CON55	575	Evropa	Norsko	NOR25
283	Severní Amerika	Vermont	CON56	576	Evropa	Norsko	NOR26
284	Severní Amerika	New York	CON57	577	Evropa	Norsko	NOR27
285	Severní Amerika	New York	CON58	578	Evropa	Norsko	NOR28
286	Severní Amerika	New York	CON59	579	Evropa	Norsko	NOR29
287	Severní Amerika	New York	CON60	580	Evropa	Norsko	NOR30
288	Severní Amerika	New York	CON61	581	Evropa	Norsko	NOR31
289	Severní Amerika	New York	CON62	582	Evropa	Norsko	NOR32
290	Severní Amerika	New York	CON63	583	Evropa	Norsko	NOR33

291	Severní Amerika	New York	CON64	584	Evropa	Norsko	NOR34
292	Severní Amerika	New York	CON65	585	Evropa	Norsko	NOR35
293	Severní Amerika	New York	CON66	586	Evropa	Norsko	NOR36

Použitá Literatura

- 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 S.J. HISCOCK. (2005) Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist* 165: p.411-423.
- 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*. Volume 82, 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 northwes 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, JC., 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 complection 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) Harvesing 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, 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., WILLIAMS 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 Conservation*, 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., WEISSLEDER K., RÖBBELEN 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., & R.A. THUM (2012) Multiple introductions of invasive Eurasian watermilfoil and recurrent hybridization with northern watermilfoil in North America. *Journal of Aquatic Plant Management*, 50:1–19.