



JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Genetická variabilita v populacích

chrastice rákosovité

(Phalaris arundinacea L.)

Autor:

Bc. Tereza Kávová

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Barbora Kubátová, Ph.D.

Konzultant práce:

Ing. Katřina Šimáčková, Ph.D.

Speciální konzultant práce:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice

2013

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

I hereby declare that this thesis has been fully completed by myself with use of the cited references.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 26. 4. 2013

.....

Bc. Tereza Kávová

PODĚKOVÁNÍ

Můj velký dík patří vedoucí mé diplomové práce Ing. Barboře Kubátové, Ph.D. za udávání směru mé práce, podporu, pohodový přístup a za předání mnoha cenných informací. Ráda bych poděkovala prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za pevné nervy při konzultacích se mnou a neocenitelné rady. Ing. Kateřině Šimáčkové, Ph.D. za oporu a neustálé povzbuzování do psaní této práce. Poděkování patří i celé skupině účastníků se pilotního pokusu, za trpělivost, odborné vedení a kreativitu, jmenovitě: Mgr. Dáša Bastlová, Ph.D., doc. RNDr. Hana Čížková, CSc., RNDr. Jan Květ, CSc. Nemalý dík patří také studentovi Vojtěchu Janušovi, který se se mnou na pokusu velkou měrou podílel. Dále chci poděkovat celé své velké rodině za to, že mne dočasně zbavila povinností a poskytla mi prostor pro psaní této práce a svému příteli, který tyto povinnosti za mě převzal.

Děkuji.

Diplomová práce byla řešena v rámci projektu AMVIS LH11039 „Srovnávací studie agresivních invazních amerických a původních agresivních a neagresivních evropských populací chrastice rákosovité (*Phalaris arundinacea*)“.

OBSAH

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	1
1.1 Lipnicovité	1
1.2 Rod Chrastice (<i>Phalaris</i>)	3
1.2.1 Chrastice rákosovitá (<i>Phalaris arundinacea</i> L.)	3
1.2.2 Rozšíření <i>P. arundinacea</i>	6
1.2.3 Rozšíření <i>P. arundinacea</i> v České republice	8
1.2.4 Ekologie <i>P. arundinacea</i>	9
1.2.5 Využití <i>P. arundinacea</i>	11
1.3 Populační genetika.....	12
1.3.1 Variabilita <i>P. arundinacea</i>	13
1.3.2 Cytologická variabilita	13
1.3.3 Genetická variabilita	14
1.3.4 Populačně- genetické studie <i>P. arundinacea</i>	16
1.3.5 Molekulární markery používané v populační genetice.....	17
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	17
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	18
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	18
Mikrosatelity (SSR- Simple Sequence Repeats).....	19
ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)	19
2. MATERIÁL A METODIKA.....	22
2.1 Sběr vzorků a pilotní pokus	22
2.1.1 Odběr rostlinného materiálu v ČR	22
2.1.2 Odběr rostlinného materiálu v Minnesotě	23

2.1.3 Pilotní pokus v BÚ Třeboň	24
Měření pokusných rostlin v průběhu vegetační sezony	25
Měření a odběry pokusných rostlin na konci vegetační sezony	26
2.2 Laboratorní část.....	27
2.2.1 Rostlinný materiál použitý pro DNA analýzu.....	27
2.2.2 Pěstování vzorků v laboratoři	29
2.2.3 Izolace DNA.....	29
2.2.4 PCR reakce	30
2.2.6 Separace amplifikovaných fragmentů	31
2.2.7 Detekce amplifikovaných fragmentů.....	32
2.2.8 Vyhodnocování dat	33
3. VÝSLEDKY	34
3.1 Genetická variabilita vzorků <i>P. arundinacea</i> z ČR	34
3.2 Genetická variabilita vzorků <i>P. arundinacea</i> z Minnesoty, USA	39
3.3 Porovnání genetické variability vzorků <i>P. arundinacea</i> z České republiky a Minnesoty	42
4. DISKUZE.....	46
4.1. Izolace DNA	46
4.2. Optimalizace PCR.....	46
4.3 Výsledky	47
5. ZÁVĚR.....	50
6. POUŽITÁ LITERATURA	52
7. POUŽITÉ INTERNETOVÉ ZDROJE.....	62

KÁVOVÁ, T. (2013) Genetická variabilita v populacích chrastice rákosovité (*Phalaris arundinacea* L.), [Diplomová práce] – 61 s., Zemědělská fakulta, Jihočeská Univerzita, České Budějovice, Česká Republika.

ABSTRAKT

Šíření invazních druhů rostlin v přírodních stanovištích je všudypřítomný celosvětový problém s negativními ekologickými i ekonomickými dopady. Zvyšující se počet invazivních organismů je odpovědný za vymírání druhů, neúrody, snížení zásobování vodou a poškození průmyslových infrastruktur (KERCHER et al., 2007).

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 vysokohorských nadmořských výšek (ANDERSSON, 1997).

Chrastice má nepřeberné množství využití. Mezi nejfrekventovanější patří použití v kořenových čističkách odpadních vod, pěstuje se jako krmivo pro hospodářská zvířata a je využívána i jako okrasná tráva. V poslední době se začíná zvažovat její pěstování jako zdroje biomasy.

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). *Phalaris* 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).

Cíle práce:

1. Zhodnocení genetické variability komerčních pícninářských a okrasných kultivarů a původních populací chrastice rákosovité s různou mírou expansivity v ČR.
2. Porovnání rozsahu genetické variability v přirozených/původních populacích z ČR a v populacích z Minnesoty, reprezentujících agresivní a invazivní genotypy.
3. Posoudit vhodnost ISSR techniky pro odlišení komerčních kultivarů a rostlin z nativních a invazních populací v ČR a Minnesotě.

Klíčová slova: *Phalaris*, genetická variabilita, populační genetika, ISSR, rostlinné invaze

KÁVOVÁ, T. (2013) Genetic variation in populations of reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*), [ING. Thesis, in Czech] – 61 pp., Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ABSTRACT

The spread of invasive plant species in natural habitats has become a worldwide problem with negative environmental and economic impacts. An increasing number of invasive organisms are responsible for adverse environmental and economic impacts worldwide, including species extinction, crop failures, reduced water supply, and damage to industrial infrastructures (KERCHER et al., 2007).

Phalaris arundinacea L. is widespread throughout the world, except Antarctica and Greenland. Center of diversity of this genus is in the Mediterranean. Members of the genus *Phalaris* occurs in moist habitats from lower to alpine altitudes (ANDERSON, 1997).

Phalaris has a plethora of uses. Its most frequent use is as the root wastewater treatment plants. *Phalaris* grown as feed for livestock and is also used as an ornamental grass. *Phalaris* have recently received a lot of attention as a new biomass source for the production of renewable energy in USA.

In recent years there has been a massive spread of *P. arundinacea* across North America (currently occurs in 43 states) and Canada (ZEDLER & KERCHER, 2004). *Phalaris* represents a significant threat to its original wetland vegetation and is classified as a harmful agents in nine state of U.S. states (LAVERGNE & MOLOFSKY, 2004). It is believed that these aggressive population have European origin.

Objectives of the Thesis:

1. Evaluation of the genetic variability of commercial forage production and ornamental cultivars and native populations of *P. arundinacea* with varying degrees of expansivity in the country.
2. Comparison of the extent of genetic variability in natural/native populations from the Czech Republic and populations from Minnesota, representing aggressive and invasive genotypes.
3. Assess the possibility of ISSR approach for discrimination of commercial cultivars and genotypes from native and invasive populations from the Czech Republic and Minnesota.

Kew words: *Phalaris*, genetic variability, population genetics, ISSR, plant invasion

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Lipnicovité

Lipnicovité (*Poaceae*) je čeleď jednoděložných rostlin z řádu Lipnicotvaré (*Poales*). Pro čeleď je používán alternativní název *Gramineae*. V češtině jsou obecně označovány jako trávy. Všechny pravé trávy patří do této čeledi, travám podobné rostliny z jiných čeledí lze označovat jako graminoidy (HROUDA, 2010).

Trávy jsou nejčastěji jednoleté, dvouleté či vytrvalé byliny, ale někdy to mohou být i netypické dřeviny (bambus, liány). Výška kolísá mezi několika málo centimetry až po desítky metrů. Mezi travami je mnoho druhů výrazně xerofytních či mezofilních, ale je i řada bahenních a vodních druhů kořenících ve dně. Stébla jsou často dutá, v nodech bývají výrazná kolénka. Vytrvalé druhy mívají často oddenky, vzácně hlízy. Některé druhy jsou výrazně trsnaté, jiné rozvolněné s dlouhými výběžky (GRAU, 2002).

Listy tvoří přizemní růžice, jsou jednoduché, střídavé, skoro vždy dvouřadě uspořádané, většinou přisedlé, řidčeji řapíkaté (nepravý řapík) s listovými pochvami. Čepele jsou celokrajné, nejčastěji čárkovité, někdy štětinovité či jehlovité, řidčeji až kopinaté nebo až obvejčité. Žilnatina je převážně souběžná, zřídka dlanitá či zpeřená. Čepele mohou být ploché, někdy jsou žlábkovitého tvaru či svinuté, zřídka oblé. Na rozhraní pochvy a čepele je přítomen jazýček různého tvaru či délky, který může být brvitý, chlupatý či lysý, roztřepený či celokrajný. Někdy může být redukován na věneček chlupů (rákos) nebo může být celkově zakrnělý, vzácně chybí (HROUDA, 2010).

Trávy jsou převážně jednodomé rostliny s oboupohlavnými květy, někdy mohou mít květy jednopohlavné, v některých případech se mohou vytvářet jednopohlavné klásky, někdy se tvoří jednopohlavná květenství (kukuřice), řidčeji to jsou i dvoudomé rostliny (GRAU, 2002).

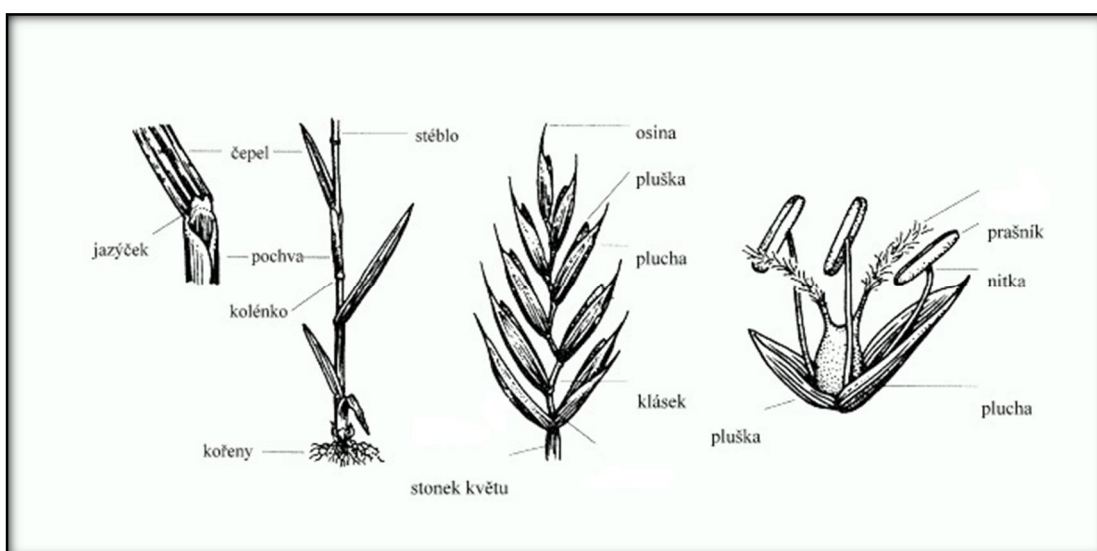
Květy jsou uspořádané v květenstvích. Pro čeleď je typickým základním květenstvím tzv. klásek, který může být jednokvětý (např. psineček) nebo vícekvětý, některé květy však mohou být sterilní. Klásek je v typickém případě podepřen 2 plevami, což je vlastně zvláštní typ listenu, které jsou buď přibližně stejné, nebo

různé. Plevy jsou uspořádány střídavě (i když blízko sebe a mohou se zdát vstřícné), proto rozlišujeme dolní a horní plevu. Klásky většinou skládají další složená květenství, hlavně laty, hrozny, klasy, popř. stažené laty napodobující klas (např. bojínek) (GRAU, 1998).

Okvětí je u trav velmi redukované a nenápadné. Dva vnější okvětní lístky jsou srostlé a přeměněny v plušku, ta je však někdy považována za listenovitého původu. Vnitřní okvětní lístky jsou přeměněny v plenky, které jsou nejčastěji 2, vzácněji 3, někdy chybí. Květ je podepřen pluchou, což je útvar listenovitého původu. Plucha může být někdy osinatá, řidčeji může být osin i více. Tyčinky, gyneceum a plenky se nachází mezi pluchou a pluškou. Někdy může být pluška redukovaná nebo chybí (HROUDA, 2010).

Tyčinky jsou nejčastěji 3, méně často 1, 2 nebo 6, zřídka 4, u některých zástupců z podčeledi *Bambusoideae* dokonce mnoho. Tyčinky jsou většinou volné, zřídka nitkami srostlé nebo srostlé s plenkami. Opylení probíhá skoro vždy anemogamicky. Gyneceum je srostlé ze 2, řidčeji 3 plodolistů, je synkarpní, semeník je svrchní. Blizny a čnělky jsou většinou 2, řidčeji 3 nebo 1.

Plodem je převážně obilka. Ta může být okoralá, za zralosti obalená pluchou a pluškou, nebo neokoralá (nahá). Zřídka zde může být i jiný typ plodu, např. bobule nebo oříšek (HROUDA, 2010).



Obr. 1. Detail stébla, klásku a květenství u Poaceae

<http://www.vplants.org/plants/glossary/poaceae.html>. Upraveno T. Kávová

1.2 Rod Chrastice (*Phalaris*)

Chrastice (*Phalaris*) je rod trav, z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Jedná se o jednoleté nebo vytrvalé byliny. Jsou trsnaté nebo s oddenky, stébla jsou poléhavá. Stébla dorůstají výšek zpravidla 10-200 cm. Čepele listů jsou většinou ploché, 2-20 mm široké, na vnější straně listu se při bázi čepele nachází jazýček, 2-12 mm dlouhý. Květy jsou v kláscích, které tvoří latu, která je klasovitě, hlávkovitě, nepravidelně či do vejčitého tvaru stažená, vzácněji je rozložitá, někdy jsou klásky v lichoklasu. Klásky jsou silně zboku smáčklé, vícekvěté (zpravidla 2-3 květy), dolní 1-2 květy jsou však sterilní, pouze vrchní květ je oboupohlavný. Na bázi klásku jsou 2 plevy, které jsou přibližně stejné, bez osin. Pluchy jsou bez osin. Plušky jsou bez kýlu, bez osin. Plodem je obilka, která je okoralá (Obr.1). Celkově je známo asi 22 druhů, které najdeme hlavně v mírném pásu Evropy a v jižní Africe, místy i adventivně (BĚLOHLÁVKOVÁ, 2004).

Celkově je známo asi 22 druhů tohoto rodu. Mezi nejvýznamnější druhy rodu *Phalaris* patří *P. arundinacea*, *P. aquatica*, *P. canariensis*, *P. amethystina*, *P. angusta*, *P. brachystachys*, *P. minor* (BALDINI, 1995).

1.2.1 Chrastice rákosovitá (*Phalaris arundinacea* L.)

Říše:	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	Cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	Krytosemenné rostliny (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	Jednoděložné rostliny (<i>Liliopsida</i>)
Řád:	Lipnicotvaré (<i>Poales</i>)
Čeleď:	Lipnicovité (<i>Poaceae</i>)
Rod:	Chrastice (<i>Phalaris</i>)
Druh:	Chrastice rákosovitá (<i>Phalaris arundinacea</i> L.)



Obr. 1. *Phalaris arundinacea* L.

<http://spuds.agron.ksu.edu/ksgrasskey/images/Phalarisarundinacea.html>

Chrastice rákosovitá (*Phalaris arundinacea* L., syn. *Baldigera arundinacea* L. Dumort., *Phalaroides arundinacea* L.). Rauschert, anglicky „reed canarygrass“, je vlhkomilná tráva patřící do čeledi *Poaceae*. Vyskytuje se nejvíce v inundačních oblastech okolo vodních toků a nádrží, na zamokřených loukách, v lužních lesích, v mělkých vodách společně s rákosem a někdy i u moře. Roste jak v těžkých, tak i v humózních, písčitohlinitých půdách s pH 4 až 7,5, může se vyskytovat i na skalistých pobřežích, snáší i zastínění. Rostlině prospívají jarní záplavy přinášející nové živiny, na které je náročná, naopak letní záplavy ji mohou mechanicky poškodit (LINDIG-CISNEROS & ZEDLER, 2002).

Má sivozelený plazivý, článkovitý oddenek. Stébla jsou přímá, 0,5-2 m dlouhá. Listy jsou ploché a dlouze zašpičatělé. Pochvy listů jsou hladké, úzké, dolní někdy drsné, bíle lemované. Lata je úzce podlouhlá, laločnatá, často načervenalá, zřetelně větvená. Kvete v červnu až červenci, až druhý rok po vyklíčení. Plodem chrastice jsou obilky (DOSTÁL, 1989).

Semena potřebují ke klíčení dostatek volného místa a dostatečný přísun světla. Nesnesou většinou žádný jiný hospodářský zásah. K tomu, aby se semenáčky uchytily, je nutná jedna vegetační sezóna (LINDIG-CISNEROS & ZEDLER, 2001).

Po uchycení semenáčku je růst chrastice rychlý. Schopnost rychle znovu obrůst přispívá k tomu, že je *Phalaris arundinacea* řazena mezi nejvýnosnější trávy (GALATOWITSCH et al., 1999). Chrastice vytváří dlouhé podzemní oddenky, které jsou rozprostřeny těsně pod povrchem půdy (WEBER, 2003). Kořenový systém je mohutný, jdoucí do značné hloubky (30-40 cm) (SVOBODA, 2006). Šíří se také vegetativně pomocí plazivých oddenků (LAVERGNE & MOLOFSKY, 2004).

Chrastice má několik vlastností, které ji v sekundárním areálu výskytu zvýhodňují oproti původním druhům a umožňují jí agresivní šíření. Jedná se například o její schopnost šířit se buď semeny nebo oddenky a dalšími částmi rostlin, včetně přesunu a následného zakořenění celé rostliny (GRAU et al., 1998, LAVERGNE & MOLOFSKY, 2004). Vykazuje výraznou morfologickou plasticitu, nemá téměř žádné herbivory (LAVERGNE & MOLOFSKY, 2004), využívá ve svůj prospěch kolísání živin (KERCHER, 2007; JAKUBOWSKI et al., 2010), produkuje velké množství biomasy (LEWANDOWSKI et al., 2003) a stárne později než ostatní druhy rostlin (MAUER, 2002; WERNER, 2002). Právě díky jejímu pozdějšímu stárnutí je možné její porosty mapovat pomocí satelitních snímků (BERNTHAL, 2004).

Rostlina je pro hospodářská zvířata špatně stravitelná díky vysoké koncentraci alkaloidů odvozených od tryptaminu, karbolinu, graminu a fenylethylaminu (WEBER, 2003). V současné době je ve šlechtění snaha o snížení koncentrace alkaloidů za účelem zvýšení chutnosti této plodiny. K lepší stravitelnosti přispívají i moderní šlechtitelské postupy (LEWANDOWSKI et al., 2006).

Chrastice je vzhledem k obsahu halucinogenu DMT (dimethyltryptamin) velmi diskutovanou ve všech světových legislativách a její pěstování bylo k 1. 1. 2010 v ČR trestné, pod větší pokutou, než pěstování konopí. S ohledem na značné rozšíření přírodních porostů chrastice po celé ČR a prakticky po celé severní polokouli se tento čin jeví jako velmi nesmyslný a aplikace této legislativy byla v praxi nemožná. Navíc, doposud není znám ani jeden fakt zneužití této plodiny pro výrobu a prodej drog. Proto bylo původní ustanovení nařízení vlády č. 455/2009 Sb. účinností od 5. 1. 2012

novelizováno nařízením vlády č. 3/2012 Sb. a pěstování chrastice rákosovité není dále omezeno (UŠŤAK et al., 2012).

Chrastice je využívána pro pícninářské i okrasné účely, v ČR byla šlechtěna pro pícninářské využití (odrůda Chrastava) a nynější šlechtění je zaměřeno i na její využití pro účely kořenových čistíren odpadních vod a pro produkci biomasy. Většího významu má šlechtění a pěstování chrastice v USA a v EU. V zemích EU se považuje za standard odrůda Palaton (USA), dalšími významnými odrůdami jsou Luba syn. Motycka (POL), Motterwizer (D), Pervenec (SUN), Peti, Szarvasi 50, Szarvasi 60, Keszthelyi 52 (H), Lara (NOR), Vantage, Venture (USA), Belevue, Rival (Canada) (STRAŠIL, 2000).

1.2.2 Rozšíření *P. arundinacea*

P. arundinacea je druh s velmi rozsáhlým cirkumpolárním areálem. Roste skoro v celé Evropě, na jihu kontinentu je vzácnější. Vyskytuje se i v severozápadní Africe, přes evropskou část Ruska a Turecko, zasahuje na Blízký východ (Sýrie, Irák, Írán) a na Kavkaz. Dále areál pokračuje přes Sibiř (zde se nevyskytuje jen v nejsevernějších oblastech) až na Kamčatku, Sachalin a do Přímoří. Zasahuje do Střední Asie (kromě pouštních oblastí), Mongolska a Číny (od severu Mandžuska až po jihočínský Yunnan), roste i na Korejském poloostrově, Tchaj-wanu a v Japonsku. V Severní Americe roste v Kanadě (kromě nejsevernějších oblastí), USA (chybí jen v Atlantské nížině na jihovýchodě země). Byla zavlečena do Jihoafrické republiky, objevila se v jihozápadní i jihovýchodní Austrálii a na Novém Zélandu, na Havaji, ve Střední a Jižní Americe (GRAU et al., 1998; WEBER, 2003).

Chrastice rákosovitá se invazivně šíří v USA, Kanadě, Austrálii a na Aljašce (LAVERGNE & MOLOFSKY, 2004). V USA ve Wisconsinu je chrastice dominantní (více než 80 % porostu) na 40 000 ha mokřadů (BERNTHAL, 2004; ZEDLER, 2004). V Illinois je chrastice nejdominantnější rostlinou v 74 % mokřadů (SPYREAS et al., 2010). Podle botanického průzkumu prováděného v Minnesotě, Washingtonu a Québecu, je chrastice dominantní na 50 – 100% plochy dotčeného území (GALATOWITSCH et al., 1999).

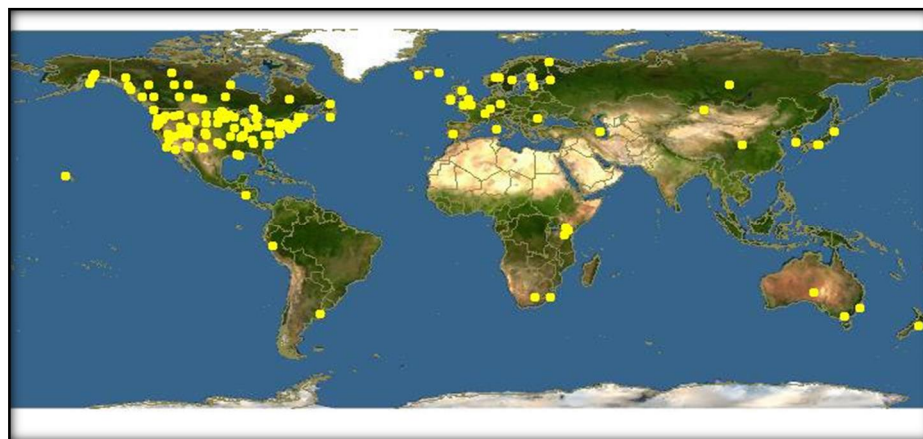
HOLM et al. (1991) dále uvádí tyto země, kde se chrastice více či méně intenzivně šíří: Afganistán, Argentina, Belgie, Česká republika, Čína, Anglie, Turecko,

Švédsko, Polsko, Finsko, Německo, Maďarsko, Korea, Kolumbie, Portoriko, Nový Zéland, Indonésie, Portugalsko, Mauritánie.

Oblastmi, kam byla chrastice zavléčena, ale není tam invazivní, jsou Jižní Afrika, tropická Asie, Nový Zéland, západ USA, Jižní Amerika, Hawaii a souostroví Maskarény v Indickém oceánu (WEBER, 2003).

P. arundinacea má 3 cytotypy s odlišným areálem výskytu. Diploid *P. arundinacea* subsp. *rotgesii* a *P. aquatica* L., se vyskytuje pouze na ostrově Korsika a Sardinie (BALDINI & JARVIS, 1991; KERGULÉN, 1993). Tetraploid *P. arundinacea* subsp. *arundinacea*, je nejrozšířenější díky velké toleranci k prostředí. Vyskytuje se v temperátních oblastech Evropy a Asie (BALDINI & JARVIS, 1991; KERGULÉN, 1993). Hexaploid *P. arundinacea* subsp. *oehlerii*, v literatuře nyní uváděna jako *P. caesia* Nees (JAKUBOWSKI et al., 2011), je více adaptován na teplejší prostředí. Omezeně se vyskytuje na Iberském poloostrově a v Severní Africe (KERGULÉN, 1993).

Na následujících obrázcích je zobrazeno rozšíření *P. arundinacea* po celém světě (Obr. 3), výskyt nativních a invazních druhů v Evropě a USA (Obr.4).



Obr. 3. Výskyt *P. arundinacea*- celý svět

<http://pick4.pick.uga.edu/20/q?search=Phalaris+arundinacea>

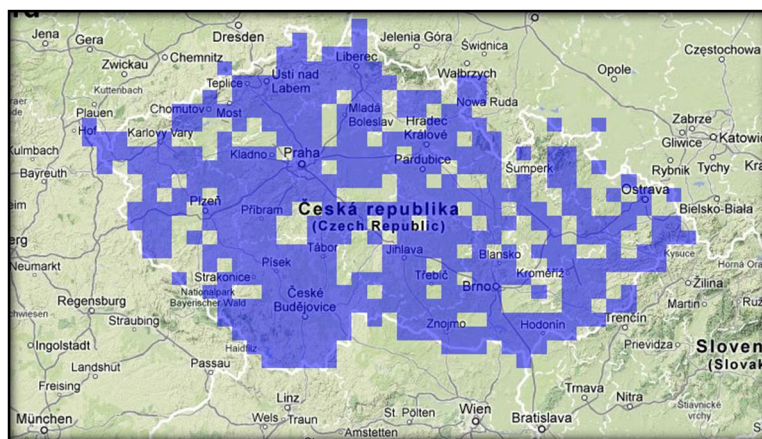


Obr. 4. Rozšíření *P. arundinacea*- invazivní Severní Amerika a nativní v Evropě
LAVERGNE & MOLOFSKY (2004)

1.2.3 Rozšíření *P. arundinacea* v České republice

V České republice je *P. arundinacea* běžným druhem v biotopech podél vodních toků, od 1. dubovéhoho do 5. smrko-jedlo-bukového vegetačního stupně (AMBROS & ŠTYKAR, 1999). Rozšíření chrastice v České republice je uvedeno na Obr. 5.

P. arundinacea je typická pro nivy velkých řek, kde osídluje jak říční břehy v místech, kde jsou zachovány mělčiny a pozvolný sklon břehu (např. zátočiny a chráněná místa u jezů a zdymadel), tak i říční ramena, tůňe, menší toky a kanály v říční nivě (HROUDOVÁ et al., 2009). Optimálně roste v hloubce 20–80 cm, v mírně tekoucí nebo stojaté vodě, zejména tam, kde stav vody kolísá a břeh bývá periodicky obnažen. Vzácně byla u nás společenstva s podobným druhovým složením nalezena i na stanovištích mimo říční nivy, a to v prohlubních polí poblíž rybníků. Tyto porosty pravděpodobně vznikly po vyvezení rybníčního sedimentu na pole (HROUDOVÁ et al., 2009).



Obr. 5. Výskyt *P. arundinacea* v České republice

Nálezová data pocházejí z České národní fytoecnologické databáze (ČNFD), spravované Ústavem botaniky a zoologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity (botzool.sci.muni.cz) k datu 30. duben 2011.

1.2.4 Ekologie *P. arundinacea*

Mokřadní invazní druhy, mají většinou několik vlastností, které je zvýhodňují oproti nativním druhům (GALLOWITSCH, 1999). Invazemi jsou více postižené mokřady v blízkosti zemědělských ploch a měst, protože do nich stéká voda a sedimenty právě z těchto míst (GALLOWITSCH, 1999; ZEDLER & 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 & KERCHER, 2004).

K vytvoření monokultury invazních druhů vede zejména disturbance mokřadů, která vytvoří mezery (gapy) v dosavadním vegetačním krytu a ty mohou být obsazeny invazním druhem (GALLOWITSCH, 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 & MOLOFSKY, 2004). Vysazený druh musí vykazovat dostatečnou genetickou variabilitu a fenotypovou plasticitu (BAKER, 1974). Změnou morfoloické, reprodukční a fyziologické reakce se mohou invazní druhy rozšířit. Morfoloická plasticita invazních druhů přispívá k přežití náhlých změn v prostředí a přizpůsobení se novým podmínkám v sekundárním areálu výskytu (LAVERGNE & MOLOFSKY, 2004). *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,

keré 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).

Vodní režim a hladinu vody v mokřadech ovlivňuje člověk. Na polích a ve městech je omezená savost půdy a dešťová voda z povrchu stéká. Rozvoj stavebnictví má za příčinu zvýšení množství nepropustných povrchů, které kromě přitékající vody a živin způsobuje také množství přinášených a usazovaných sedimentů a erozi (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). ZEDLER & KERCHER (2004) tuto teorii potvrdili pokusem, kdy po čtyřech týdnech zaplavení se porost v inundační oblasti snížil o 2/3, což podpořilo růst *P. arundinacea* díky zvýšenému přístupu světla a její šíření, díky uvolněnému místu. Disturbance způsobené záplavami, potlačují druhovou diverzitu v mokřadech a způsobují narůstající počet zavlečených druhů, mimo jiné také *P. arundinacea* (ZEDLER & KERCHER, 2004).

Blízkost zemědělských ploch u mokřadů způsobuje jejich větší citlivost na větší přísun živin. Při vysoké hladině živin je *P. arundinacea* schopna konkurovat nativním druhům (JAKUBOWSKI et al., 2010). Tento jev v kombinaci s jarními záplavami vede ke zdvojnásobení produkce biomasy *P. arundinacea* a zároveň snížení produkce biomasy ostatních druhů (ZEDLER & KERCHER, 2004). Její šíření poblíž toků může v extrémních případech vést až v rozšíření chrastice rákosovité do koryta řeky a přerušení toku nebo změny cirkulace toku (LEFOR, 1987).

P. arundinacea vyniká svým fyziologickým přizpůsobením k invazím a přežíváním v nepříznivých podmínkách. Dominuje velká fyziologická tolerance k různým vodním režimům. Za období sucha nebo období chudé na živiny soustředí tvorbu biomasy do podzemní části (LAVERGNE & MOLOFSKY, 2004). Kořeny jsou z velké části tvořené aerenchymem, který ji 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).

1.2.5 Využití *P. arundinacea*

V současné době je hlavně v zemích EU zřejmé zvýšení zájmu o alternativní plodiny, které by zčásti měly postupně nahrazovat plodiny pro potravinářské využití. V obnovitelných zdrojích by měla hrát prim biomasa, kde se uvažuje, že více než 80 % celkového přírůstku množství obnovitelných zdrojů energie by pocházelo právě z biomasy. Proto je pěstování alternativních plodin cíleně zaměřováno na jejich pěstování pro průmyslové a energetické využití. Jednou z těchto alternativních plodin, o jejímž rozšířeném pěstování pro průmyslové využití se uvažuje, a to hlavně v SRN, Dánsku ale i severovýchodních Evropských státech jako je Finsko, Švédsko, je *P. arundinacea* (HUTLA, 2004).

Vedle využití chrastice pro přímé spalování na výrobu tepla nebo na výrobu elektřiny, lze její fytomasy využít v zeleném stavu jako krmivo (čerstvá píce, seno, siláž). Chrastici lze využít i pro výrobu bioplynu. Zcela nově se začíná chrastice zavádět jako energetická surovina i v pobaltských zemích, kde jí dávají přednost před rychle rostoucími dřevinami. Např. ve Švédsku má chrastice sloužit jako zdroj pro výrobu buničiny (obsah ligninu je kolem 14%, obsah celulózy 30-36%) nebo jako potenciální energetický zdroj (KUNCOVÁ, 2004).

Při použití chrastice pro lisování topných pelet mají tyto produkty nejenom poměrně dobré vlastnosti pro použití v automatických kotlích, ale i mechanické vlastnosti charakterizující možnosti dopravy a skladování.

V České republice byla vyšlechtěna odrůda Chrastava. Podle STRAŠILA (2000) je Chrastava první českou odrůdou trávy určenou na energetické účely, hlavně pro přímé spalování. Porovnání výnosu a výhřevnosti biomasy vybraných energetických plodin je uvedeno v následující tabulce (Tab.1).

	Výnos z celé rostliny (t/ha)	Výhřevnost (MJ/kg)
Chrastice rákosovitá	9	17
Ozdobnice čínská	13	17
Topol japonský	12,1	12,3

Tab. 1. Porovnání výnosu s výhřevností.

Vyňato z SVOBODA (2006)

Chrastice rákosovitá se také často využívá v kořenových čističkách odpadních vod. Tyto čističky se používají na čištění takzvané šedé odpadní vody, to je voda z dřezů, umyvadel, sprch, myček a praček. Jedná se v podstatě o umělé mokřady. V České republice byla první kořenová čistička uvedena do provozu v roce 1989 a podle průzkumů v roce 2003 u nás bylo 155 kořenových čističek. Dodnes vzniklo v ČR asi 250 kořenových čističek. V Evropě je kolem 50 000 těchto zařízení (SVOBODA, 2006; VYMAZAL, 2004). Nevýhodou používání chrastice v čističkách je opět riziko jejího úniku a šíření (SVOBODA, 2006; VYMAZAL, 2004).

1.3 Populační genetika

Populační genetika je nauka o změnách zastoupení alel jednotlivých genů v populaci. Tyto změny mohou být důsledkem jak přirozeného výběru, tak genetického driftu. Oba tyto mechanismy zpravidla omezují genetickou variabilitu populace: 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, což je přenos dědičné informace z populace do populace (HARTL, 2010). Takový tok může nastávat i mezi různými druhy. Základy populační genetiky byly vystavěny v první polovině dvacátého století a rozhodujícím způsobem přispěly k všeobecnému uznání Darwinovy evoluční teorie, jelikož ukázaly, jak jsou tyto myšlenky dobře slučitelné s mendelovskou genetikou. Spojením těchto myšlenek vznikla v současnosti všeobecně uznávaná Nová syntéza v evoluční teorii (RELICHOVÁ, 1997).

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

1.3.1 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. 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 mohou být invazně úspěšné, protože genetická variabilita může mít vliv na přizpůsobení se různým prostředím a různým ekologickým podmínkám (SAKAI et al., 2001).

Přírodní 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). Genetická variabilita se může projevovat na několika úrovních. Nejznámější je úroveň morfologická. U velkého počtu druhů byla pozorována také variabilita cytologická, tedy variabilita ve struktuře chromozomů (delece, duplikace, inverze) (SAKAI et al., 2001).

1.3.2 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. ceasia* 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). RAMSEY (1998) a SOLTIS et al. (2004) se spíše přiklání k teorii hybridizace tří druhů diploidních předků za vzniku hybridního druhu *P. caesia* Nees.

1.3.3 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 propůjčit 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; AYRES 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. Porovnávali 205 rostlin z 15 genotypů (vyšlechtěné genotypy, genotypy z přírody, evropské genotypy). Zjistili, že na základě jaderné DNA můžeme genotypy rozdělit na dvě oddělené skupiny: skupinu 1 tvořily tři blízce příbuzné genotypy ze Severní Ameriky a skupinu 2 ostatní genotypy. Genotypy první skupiny pocházející z Oregonu, Alabamy a Arkansasu, by mohly být potomky zástupců původního severoamerického genofondu. Tyto genotypy samozřejmě mohou pocházet z evropských genotypů, které byly do Severní Ameriky během 19. a 20. století dovezeny. Výrazné oddělení severoamerických genotypů od všech evropských genotypů naznačuje rozdílný původ těchto tří genotypů. Této teorii také nahrává skutečnost, že v Alabamě a v Arkansasu je chrastice mnohem méně běžná v mokřadech, na pastvinách i ve šlechtitelských programech než v severnějších oblastech USA. 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) našli dostatek podpory pro působení efektu zakladatele (*foundereffect*), 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). Migrace způsobené například člověkem nebo větrem, vyústilo v křížení evropských a amerických genofondů (CASLER et al., 2009). Toto tvrzení podporuje hypotézu, že imigrace evropských kultivarů pomohla americké chřastici překonat *bottleneck* efekt působící při jejím prvním osídlení Severní Ameriky a dopomohla k rozšíření genofondu (LAVERGNE & MOLOFSKY, 2007).

Pokud dojde k potvrzení této teorie, původní severoamerické genotypy by se mohly stát cenným materiálem pro výzkum chřastice před zavlečením evropských genotypů (CASLER et al., 2009).

Předpoklad, že invaze chřastice je způsobená genotypy z Evropy se zatím nepotvrdil, proto je nutný další výzkum příčiny agresivity zavlečených genotypů.

1.3.4 Populačně- genetické studie *P. arundinacea*

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. Velký potenciál vidí v nativních populacích v odlehlých oblastech Aljašky, které nejsou ovlivněny euroasijskými. Tyto oblasti nejsou ve styku se zemědělstvím, tudíž zavlečení evropských genotypů by tam mělo být minimální. Identifikaci pomocí molekulárních markerů shledává 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. V experimentu vykazovaly variabilitu více druhů uvnitř populace, než populace mezi sebou. Jako centrum diverzity shledává mediteránní oblasti, kde dochází ke křížení několika druhů rodu *Phalaris*. 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 druhy 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 pěstovanými 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). Důležité výsledky přinesl CASLER et al. (2009), který ve své práci zjišťovali genetické rozdíly mezi evropskými a americkými genotypy. Tyto dvě skupiny genotypů se mu podařilo pomocí AFLP markerů odlišit. Dále uvádí, že v porovnání amerických a evropských genotypů se neprokázaly žádné rozdíly v potencionální schopnosti invaze.

1.3.5 Molekulární markery používané v populační genetice

Kvalitativní a kvantitativní informace týkající se úrovně diverzity jsou nesmírně důležitým faktorem v mnoha oblastech biologického výzkumu, ať již základního nebo aplikovaného: evoluční biologii, taxonomii, šlechtění a ochraně genofondu. 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: (1) techniky využívající hybridizaci; (2) techniky založené na PCR reakci (amplifikace využívající náhodných primerů, *multi-locus PCR*); a (3) techniky založené na PCR reakci (amplifikace známých cílových sekvencí, *single-locus PCR*). Některé techniky jsou navíc modifikacemi nebo kombinacemi dalších metodických postupů (KARP, 1997).

V následujícím textu jsou uvedeny nejčastější metody používané v populačně-genetických studiích.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Jedinci se mohou lišit v přítomnosti/nepřítomnosti restrikčních míst určitého úseku DNA, což se projeví na délce DNA fragmentů vzniklých po působení restriktáz na danou DNA. Tyto fragmenty variabilní délky jsou skutečnými alelami s Mendelovskou dědičností a RFLP markery jsou kodominantní. Metoda zachycuje variabilitu na úrovni DNA (detekce i neutrálních změn), je náročná na množství DNA, relativně drahá a také časově náročná (ZIETKIEWICS et al., 1994).

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. Vzhledem k tomu, že při RAPD analýze jsou využívány náhodně generované primery, není pro její provedení vyžadována znalost cílových sekvencí a studovaného genomu. RAPD detekuje polymorfismus v celém genomu (OBORNÍK et al., 2000). RAPD markery byly úspěšně používány v genetickém fingerprintingu při analýze odrůd, dále jsou využitelné při analýze původů (SCOTT et al., 1992; LERCETAU et al., 1997) a genetickém mapování (REITER et al. 1992; UZUNOVA et al., 1995). CHAKRABARTI et 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).

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 specifičnosti 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; MEKSEM et al., 1995; VAN ECK et al., 1995).

Mikrosatelity (SSR- Simple Sequence Repeats)

SSR jsou krátké opakované sekvence (10-15 kopií), sestávající z jedno- až čtyřnukletidových sekvencí, např. (AT)_n nebo (CAG)_n, náhodně rozmístěných v genomu. Detekují délkovou variabilitu – alelou je úsek o určité délce (s určitým počtem opakovaných krátkých sekvencí). Výhody jsou ve vysoké variabilitě a jejich kodominantnosti. Vývoj Mikrosatelitů je relativně drahý a časově náročný (WILLIAMS, 1990).

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Pro naši studii jsme se rozhodli uplatnit metodu ISSR, proto se ji nyní budu věnovat rozsáhleji, než metodám předešlým.

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 regionech 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 & 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). Další výhodou je také nižší cena oproti AFLP, RAPD a malé požadavky na vybavenost laboratoře.

Vlastní postup zahrnuje běžnou PCR za využití obvykle jednoho primeru. Méně často se používá kombinace dvou ISSR primerů. Produkty PCR amplifikace jsou vizualizovány na běžném agarózovém gelu. Výsledná sada vzniklých fragmentů odráží variabilitu v distribuci a délce mikrosatelitů v genomu. Analýzu každého vzorku je nutné provést ve dvou nezávislých PCR a do statistického hodnocení zahrnout pouze fragmenty, které se objeví v obou těchto nezávislých opakováních (GODWIN et al., 1997). Produkty jsou dlouhé od 200-2000bp (REDDY, 2001).

Evoluční změny v mikrosatelitech jsou považovány za vyšší, než u většiny ostatních typů DNA, takže pravděpodobnost polymorfismu těchto sekvencí je větší (REDDY, 2001). ISSR je důležitým nástrojem pro charakterizaci genofondu a zjištění totožnosti odrůd/kříženců/rodičovského zdroje (CHARTERS, 2000). Stejně tak by měla odlišit planě rostoucí druhy od kultivarů (CHEN et al., 1998). ISSR napomáhá při řešení mezidruhových postavení a odlišností druhů v rámci rodiny (JOSHI et al., 2000). Tato metoda ukázala také dostatečný polymorfismus, aby byly rozlišeny různé kultivary (WOLF et al., 1995). Metoda identifikuje mikrosporově odvozené kultury od těch, které pochází ze somatické tkáně již ve fázi sazenic (CHEN et al., 1998). Metoda byla úspěšně použita při odhadu rozsahu genetické rozmanitosti na inter- a intra-specifické úrovni, například u rýže (JOSHI et al., 2000) a pšenice (NAGAOKA et al., 1997).

Technika ISSR je vhodnější pro analýzu rozmanitosti z hlediska kvality a kvantity datových výstupů ve srovnání s RFLP a RAPD (SALIMATH et al., 1995). Bylo prokázáno, že úroveň segregace zkruslení ISSR je nižší než u RAPD (WANG et al., 1998). Technikou lze charakterizovat odrůdovou úroveň druhu. Například pět ukotvených primerů rozlišilo 20 kultivarů *Brassica napus* (CHARTERS et al., 1996). Podobně bylo rozlišeno 37 kultivarů brambor čtyřmi primery (PREVOST et al., 1999), 3 primery identifikovaly 16 genotypů rybízu (LANHAM et al., 1998).

Technika ISSR markerů zasahuje až do oblasti molekulární ekologie, kde je využívána na detekci druhů v čeledích. Čeledi, na kterých byla tato technika použita, jsou *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Hippocastanaceae*, *Orchideaceae* a *Poaceae*. Variabilita v rámci a mezi populacemi může být porovnávána pomocí multilokusových markerů,

jakými jsou právě ISSR. Potenciál této techniky je viděn v zajištění ochrany odrůd rostlin na základě jejich rozlišování již v zárodečné fázi (GUPTA et al., 1994).

2. MATERIÁL A METODIKA

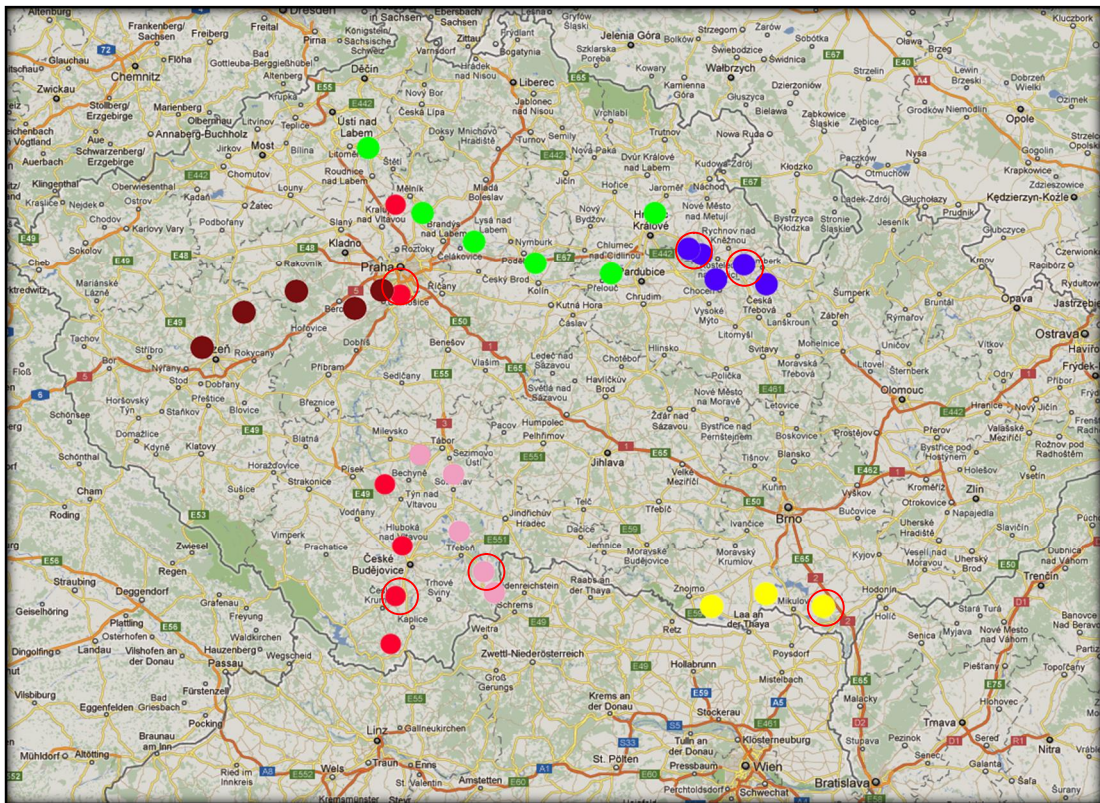
Pro analýzu *P. arundinacea* byly použity dva soubory vzorků. První skupinu představovaly vzorky získané z populací chrastice podél nejvýznamnějších řek v ČR a v druhou skupinu pak tvořily vzorky z Minnesoty, USA.

2.1 Sběr vzorků a pilotní pokus

2.1.1 Odběr rostlinného materiálu v ČR

Odběr rostlin z přirozených populací do kultivačního pokusu proběhl v roce 2011, vždy z jedné lokality podél každé z 6 vybraných řek (Labe, Vltava, Lužnice, Orlice, Berounka a Dyje). Mapa odběrových míst na Obr. 6. Na každé lokalitě byly odebrány 3 celé trsy, včetně oddenků a kořenů, a po zkrácení nadzemních částí byly zasazeny do plastového květináče o objemu 12 L naplněného pískem s přidáním komerčního hnojiva Osmocote. Květináče byly umístěny v mělkých (15 cm hlubokých) novodurových vanách naplněných vodou.

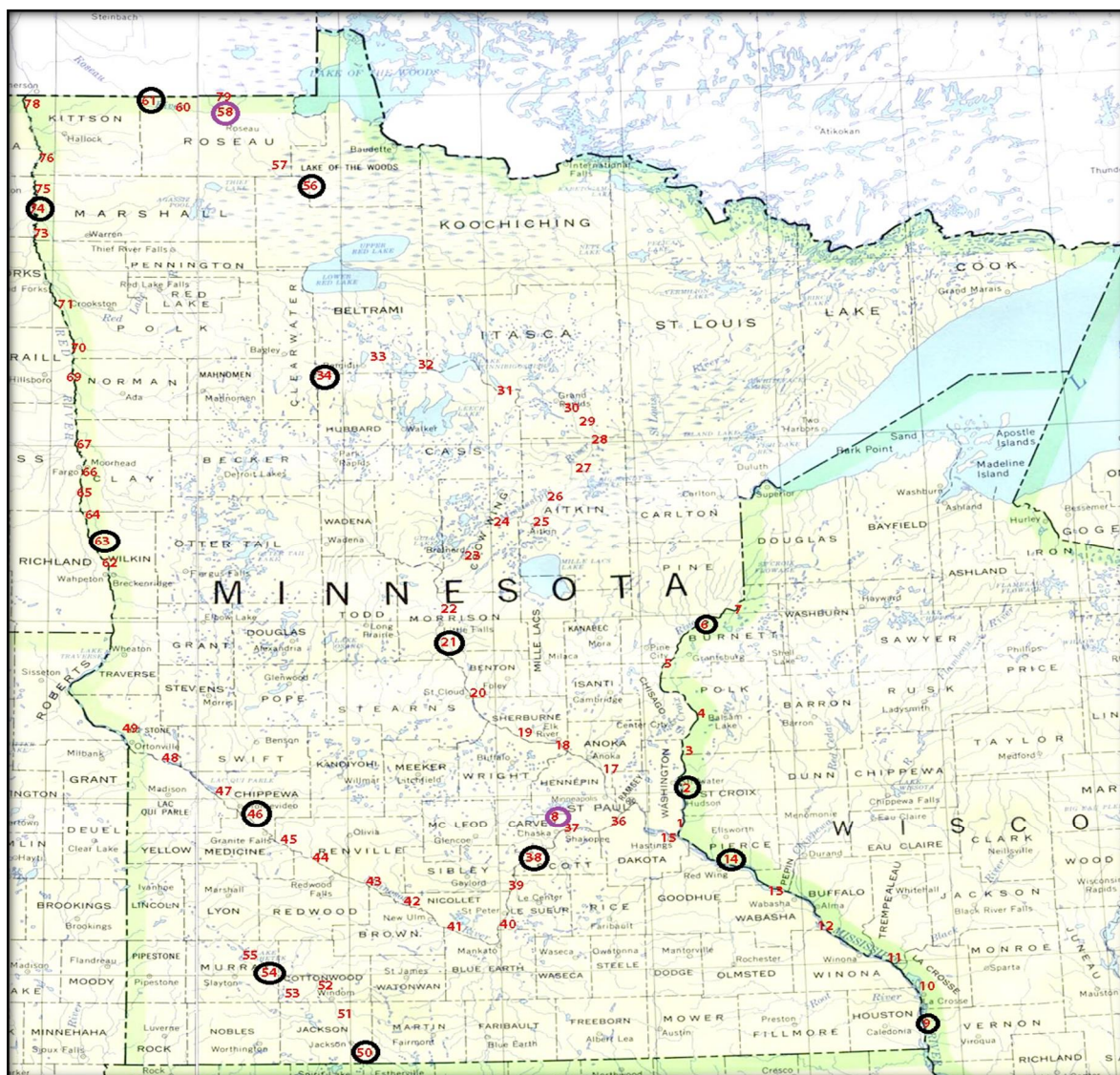
Pícní a okrasné kultivary chrastice rákosovité byly získány z Výzkumné stanice travinářské v Rožnově pod Radhoštěm – Zubří (OSEVA PRO s.r.o.), a ze zahradnictví a od distributorů, kteří prodávají rostliny chrastice rákosovité. Byly soustředěny všechny dostupné kultivary v množství 3-5 rostlin od každého kultivaru a každého distributora. V případě zahradnictví Pelikán (Spálené Poříčí) jsme nakoupili 25 ks rostlin, protože toto zahradnictví prodává rostliny pro kořenové čistírny. Tato sbírka okrasných, komerčních a pícninářských kultivarů byla založena a nadále bude udržována v kultivačním areálu Botanického ústavu AV ČR v Třeboni.



Obr. 6. Mapa odběrových míst na 6 řekách v celé ČR s vyznačením lokalit, kde byly odebrány rostliny do kulturačního pokusu

2.1.2 Odběr rostlinného materiálu v Minnesotě

Sběr rostlinného materiálu z terénu na území Minnesoty (USA) z amerických invazních populací proběhl v roce 2012. Vzorky byly sbírány v populacích podél šesti řek. Čtyři z vybraných řek (St. Croix, Mississippi, Minnesota, Des Moines) patří k povodí Golského zálivu, dvě řeky (Red River of the North, Roseau) ústí do jezera Lake Winnipeg, patřícího do povodí Hudson Bay (mapa sběrů na Obr. 7). Části listů, odebraných na molekulární analýzu, byly umístěny do čajových filtrů a vysušeny v Silica gelu. Po vysušení byl rostlinný materiál skladován v -20°C .



Obr.7. Mapa sběrů v Minnesotě. Černě vyznačené vzorky reprezentující invazivní populace podél řek, fialově označené vzorky reprezentují extenzivně pěstované pícninářské kultivary v MN.

2.1.3 Pilotní pokus v BÚ Třeboň

Pro experimentální část diplomové práce byly v roce 2012 použity rostliny nasbírané na lokalitách podél 6 největších řek v Čechách a na Moravě spolu s komerčními kultivary získanými v prvním roce (2011). Ty byly v r. 2011 zazimovány v samostatných květináčích s označením původu v kádích na pozemku BÚ Třeboň. Na konci dubna jsme zkontrolovali a vytypovali genetické zdroje, které přezimovali v nejlepší kondici. Z vybraných zdrojů bylo z každého odebráno 12 oddělků (části rhizomů), které byly rozděleny do tří květináčů po čtyřech oddělcích (označeny

cedulkou s původním kódem zdrojové rostliny + označení příslušného květináče A, B, C). Každý oddělek byl před zasazením do květináče zvážen. Následně jsme všechny 4 oddělky zasadili do květináče do směsi písku a hnojiva Osmocote. Po týdnu jsme počet rostlin v každém květináči zredukovali na 1 ks. Při jednocení rostlin jsme zohledňovali velikost a stav mladých rostlin, abychom snížili variabilitu rostlinného materiálu na počátku pokusu na minimum. Experimentální kultivace probíhala na pozemku BÚ Třeboň v období od 27. dubna do 12. září 2012. Na všech rostlinách v kultivaci probíhala morfometrická měření jak v průběhu sezóny, tak na konci vegetační sezony, kdy byla kultivace ukončena.

Měření pokusných rostlin v průběhu vegetační sezony

- 1) V období od 21. 6. do 4. 9. 2012 jsme u všech rostlin pravidelně v týdenních intervalech měřili výšku rostlin (měřeno jako délka nejdelšího listu na nejdelším stéble v trsu) a šířku trsu (měřeno jako šířka trsu v nejširším místě a v místě kolmém na toto místo).
- 2) V období od 21. 6. do 17. 7. 2012 jsme u všech rostlin zjišťovali v týdenních intervalech počet výhonů, abychom zjistili dynamiku růstu a expanze jednotlivých genotypů. Počet výhonů se určoval vlastním počítáním výhonů.
- 3) 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). Po změření těchto parametrů byla stébla rozdělena na květní latu, stéblo, listy a uložena do papírových sáčků. Po vysušení na 80°C na konstantní hmotnost byly jednotlivé části stébla zváženy.

Měření a odběry pokusných rostlin na konci vegetační sezony

V polovině září jsme kultivaci ukončili. U všech rostlin byly měřeny následující morfometrické charakteristiky:

- 1) Od každého genotypu jsme odebrali tři stébla. Z odebraných stébel jsme oddělili listy, vyfotili je na bílé ploše, s měřítkem, pro pozdější vyhodnocování listové plochy. Holá stébla a listy byly zváženy a vysušeny při 80°C.
- 2) Rostlinu jsme dále rozdělili na nadzemní a podzemní část, obě části byly vysušeny a zváženy stejně jako stébla.
- 3) U všech genotypů byl zároveň s odběrem zjištěný celkový počet stébel vyprodukovaných za vegetační sezónu. Kromě toho byl zaznamenán i celkový počet kvetoucích stébel (do tohoto počtu byla započtena i stébla odebrána již v průběhu vegetační sezóny). Při odběrech se kromě morfometrických charakteristik hodnotily i fenotypové znaky rostlin:
 - u všech genotypů jsme vyhodnotili panašovanost,
 - po ostříhání nadzemní biomasy na úrovni povrchu substrátu jsme u všech genotypů vyhodnotili hustotu a velikost trsu jako míru pokryvnosti ostříhaných stébel (v %) na povrchu květináče.

Zaznamenaná a změřená data jsme vyhodnotili analýzou variance v programu Statistica a Systat. Opakovaná měření byla vyhodnocována v Lifetimeanalysis programu Statistica.

Morfologické parametry a fenotypovou variabilitu chrastice rákosovité zpracoval ve své bakalářské práci student Vojtěch Januš (JANUŠ, 2013).

2.2 Laboratorní část

2.2.1 Rostlinný materiál použitý pro DNA analýzu

Rostlinný materiál použitý pro molekulární analýzy byl odebrán při terénní části diplomové práce. Odběr probíhal uprostřed sezóny, kdy rostliny byly mladé, zelené bez známek napadení škůdci, virových a bakteriálních onemocnění. Celkem bylo odebráno 109 vzorků. Z amerických populací bylo vybráno 39 vzorků, reprezentující populaci srovnatelnou s českou. Přehled vzorků je uveden v Tab.2.

Vzorky reprezentující americké kultivary jsem si vysadila v laboratoři ze semen, objednaných z Regional Plant Introduction Station ve Washingtonu. Seznam vzorků naleznete v Tab.2.

Takto odebraný materiál byl umístěn do čajových filtrů a vysušen v Silica gelu. Po dostatečném vysušení materiálu, byly vzorky skladovány v -20°C.

Název	Původ	Označení v pokusu	Počet genotypů
Zahradnické kultivary			
"Luteopicta"	Zahradnictví Flos s.r.o.	F/L.	2
"Phalaris arundinacea"	Zahradnictví Flos s.r.o.	F/P.a.	2
"Picta"	Zahradnictví Flos s.r.o.	F/P	2
"Picta"	Agrostis Trávníky	AT/P	2
"Picta"	Zahradnictví Flos s.r.o.	ZN/P	1
"Picta"	Zahradnictví Flos s.r.o.	ZP/COV	2
"Tricolor"	Agrostis Trávníky	AT/T	2
Genotypy selektované pro ČOV			
COV	Zahradnictví Pelikán	ŠF/P	2
Pícninářské kultivary a genotypy z ČR			
Chrastava	OSEVA PRO, s.r.o.Zubří	Chrastava	1
<i>Phalaris arundinacea</i>	OSEVA PRO, s.r.o.Zubří	13.4	1
<i>Phalaris arundinacea</i>	OSEVA PRO, s.r.o.Zubří	77/04	1
<i>Phalaris arundinacea</i>	OSEVA PRO, s.r.o.Zubří	83/03	1
<i>Phalaris arundinacea</i> var. <i>Picta</i>	Zubří	123/04	1
<i>Phalaris arundinacea</i> var. <i>Picta</i>	OSEVA PRO, s.r.o.Zubří	125/05	1
Rostliny z populací podél českých řek			
<i>Phalaris arundinacea</i>	Dyje - Lednice	DY	3
<i>Phalaris arundinacea</i>	Orlice - Týniště nad Orlicí	OR	2

<i>Phalaris arundinacea</i>	Labe - Lochenice	LA	1
<i>Phalaris arundinacea</i>	Berounka - Srbsko	BE	3
<i>Phalaris arundinacea</i>	Vltava - Zlatá Koruna	VL	3
<i>Phalaris arundinacea</i>	Lužnice - Suchdol nad Lužnicí	LU	3
Rostliny z populací podél MN řek			
St. Croix / South of Bayport. MN by the Bayport Marina	St. Croix	2	1
St. Croix State Park. along river by boat launch and swimming areas	St. Croix	6	1
Wet Meadow / Chanhassen, MN; Hort. Research Center 'Rice Paddy' wetlands used by Sue Galatowitsch & Mike Nelson.	Louky u Chanhassen, MN	8	5
Reno	Mississippi	9	1
Red Wing. Wisconsin	Mississippi	14	1
Between Little Falls and Rice	Mississippi	21	1
W of Bear Den Landing, Mississippi Headwaters State Forest	Mississippi	34	1
Blakeley, W of Belle Plaine. MN	Minnesota	38	1
5 km JV Montevideo	Minnesota	46	1
Petersburg, 13 km JV Jackson	De Moines	50	1
Avoca, 15 km V Slayton	De Moines	54	1
W of Mulligan Lake	Roseau	56	1
N of Roseau	Louky v oblasti Roseau	58	5
Caribou, Hgw 4 near confluence with State Ditch. S Canadian Border	Roseau	61	1
Fort Abercrombie State Park, Breckenridge	Red River	63	1
Oslo, 25 km Z Argyle	Red River	74	1
Americké kultivary získané z genové banky RPIS			
VENTURE	RPIS, Washington, USA	VEN	1
PALATON	RPIS, Washington, USA	PAL	1
AUBURN	RPIS, Washington, USA	AUB	1
IOREED	RPIS, Washington, USA	IOR	1
367	RPIS, Washington, USA	365	1
<i>Phalaris arundinacea</i>	RPIS, Washington, USA	PHA	1
PN-609	RPIS, Washington, USA	PN-609	1
GROVE	RPIS, Washington, USA	GRO	1
ARKANSAS UPLAND	RPIS, Washington, USA	ARK	1
MN-76	RPIS, Washington, USA	MN-76	1
CANA	RPIS, Washington, USA	CANA	1
VANTAGE	RPIS, Washington, USA	VAN	1
MCRC1	RPIS, Washington, USA	MCRC1	1
SUPERIOR	RPIS, Washington, USA	SUP	1

Tab.2. Kompletní seznam genotyp .

2.2.2 Pěstování vzorků v laboratoři

Substrát byl před začátkem pokusu zklávkován a květináčky vymyty roztokem Sava. Semena byla vyseta do misky po padesáti, ve dvou opakováních od každého genotypu. Po 4 týdnech bylo odebráno 50 semenáčků od každého genotypu. Vzorky byly uloženy v -20°C a následně zhomogenizovány tekutým dusíkem. Extrakce byla provedena metodou CTAB.

2.2.3 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí pufru cetyltrimetylamonium bromidu (CTAB). Standardní postup dle Williams et al. (1992) jsme modifikovali. Modifikace spočívala v zefektivnění metody a zkrácení doby izolace se stejnou kvalitou, čistotou a výtěžností DNA. Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 100 μl sterilní H_2O a byla uchovávána při -20°C , pro dlouhodobé uchování jsme volili uchovávání při teplotě -80°C .

Protokol CTAB:

- 1) Vzorky o hmotnosti 20-40 mg (2cm listu) umístíme do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Homogenizujeme pomocí tekutého N_2 .
- 2) Připravíme si roztok: CTAB extrakční pufr - 2,5 ml/ 1 vzorek + merkaptoethanol - 2 μl / 1 vzorek. 500 μl roztoku přidáme do každého vzorku.
- 3) Vortexujeme. Inkubujeme při 65°C / 15 minut v termobloku, či vodní lázni.
- 4) Po inkubaci krátce vortexujeme, přidáme 200 μl směsi chloroform: isoamylalkohol (24:1).
- 5) Vortexujeme, nebo 12x obrátíme.
- 6) Centrifugujeme 5 min/ 14000 rpm při teplotě 20°C .
- 7) Přeneseme horní fázi do nové 1,5 ml eppendorfky.
- 8) Opakujeme krok 4-7.
- 9) Přidáme 500 μl Ethanol acetatu. 100 ml směsi připravíme smícháním 4 ml 3M octanu sodného a 96ml 100% etanolu.

- 10) Centrifugujeme 5 min/ 14000 rpm při teplotě 20°C.
- 11) Roztok vylijeme, pelet zachováme.
- 12) Přidáme 500 µl 70% etanolu.
- 13) Centrifugujeme 5 min/ 14000 rpm při teplotě 20°C.
- 14) Roztok vylijeme, pelet zachováme.
- 15) Necháváme schnout 40 minut.
- 16) Přidáme 100 µl H₂O, inkubujeme při 37°C/ 30 minut.

PExtrahovaná DNA byla přenesena do mikrotitračních destiček, pro snadnější manipulaci se vzorky.

2.2.4 PCR reakce

Pro PCR reakce byla použita sada 4 ISSR primerů UBC 810, UBC 825, UBC 881 a UBC 890, sekvence primerů jsou uvedeny v následující tabulce:

UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 881	GGG TGG GGT GGG GTG
UBC 890	VHV GTG TGT GTG TGT GT

Složení reakce:	10 µl	PPP Master Mixu
	0,5 µl	Primer
	0,4 µl	BSA
	7,1-8,1 µl	H ₂ O
	1-2 µl	DNA

Celkový objem reakcí byl vždy 20 µl.

Časový a teplotní profil PCR reakce pro primer UBC 810:

- Počáteční denaturace 94°C/ 5 minut

- 94°C / 30 sekund
 - 54°C/45 sekund
 - 72°C/ 45 sekund
- } 35X

- Finální elongace 72°C/ 10 minut

- Uchování 4°C/ ∞

Časový a teplotní profil PCR reakce pro primer UBC 881 a UBC 890

- Počáteční denaturace 94°C/ 5 minut

- 94°C / 30 sekund
 - 56°C/ 45 sekund
 - 72°C/ 45 sekund
- } 35X

- Finální elongace 72°C/ 10 minut

- Uchování 4°C/ ∞

Časový a teplotní profil PCR reakce pro primer UBC 825:

- Počáteční denaturace 94°C/ 2 minut

- 93°C/ 20 sekund
 - 52°C/ 60 sekund
 - 72°C/ 20 sekund
- } 35X

- Finální elongace 72°C/ 6 minut

- Uchování 4°C/ ∞

2.2.6 Separace amplifikovaných fragmentů

Separace amplifikovaných fragmentů probíhala na 2% agarozovém gelu v 1x TBE pufri.

Příprava 2 % agarózového gelu:

1. Připravíme a vyvážíme vanu
2. Příprava gelu o objemu 230 ml: 4,6 g agarózy
250 ml 1xTBE

Takto připravené chemikálie smícháme dohromady v Erlenmayerově baňce. Rozvaříme v mikrovlnné troubě na max. výkon.

3. Roztok agarózy zchladíme, přidáme 6 μ l EtBr, důkladně promícháme.
4. Agarózu nalijeme do vany. Nutné bez bublin.
5. Po nalití do vaničky umístíme hřebínek a gel necháme tuhnout cca 30 min.
6. Poté vyndáme hřebínek a nanášíme vzorky do jamek v gelu.

Příprava na elektroforézu:

1. Elektroforetickou vanu naplníme dostatečným množstvím pufru 1x TBE.
2. Vzorky nanášíme postupně do jamek v gelu, po stranách nanese 12 μ l 100 bp ladderu, gel se vzorky poté opatrně vložíme pod hladinu pufru do elektroforetické vany.
3. Elektroforéza běží nejdříve při 40 V cca 10 min a pak zvýšíme na 90 V po dobu 4,5 hodiny.
4. Vyjmeme gel z pufru a umístíme pod UV světlo a vyfotíme.

PCR reakce probíhala vždy ve dvou nezávislých reakcích, které byly na gel naneseny vedle sebe. Hodnoceny byly jen takové produkty, které se amplifikovaly v obou PCR reakcích.

2.2.7 Detekce amplifikovaných fragmentů

Po gelové elektroforéze byly fragmenty DNA zviditelněny pomocí barviva Ethidium bromid. Gel byl vyfocen a získaná digitální fotografie byla použita pro vyhodnocování dat.

2.2.8 Vyhodnocování dat

Pro účely komplexního hodnocení molekulárních markerů je vhodné využít statistického zpracování dat. Metoda digitální analýzy pak představuje prostředek pro primární zpracování elektroforeogramů a zaznamenání pozice pruhů na gelu. Na základě zjištěných a korelovaných pruhů jsem sestavila binární matici přítomnosti/nepřítomnosti pruhu v dané zóně a provedla statistické hodnocení (výpočet frekvence alel, výpočet koeficientů genetické identity, výpočty genetických vzdáleností či podobností. Genetická vzdálenost byla hodnocena pomocí klastrové analýzy (Unweighted Pair Group Method Averages) a koordinační analýzy (Principal Coordinates Analysis) v programu MVSP (Kovach Comp. Serv.) a (CIRAD).

3. VÝSLEDKY

U analyzovaných vzorků *P. arundinacea* byly vyhodnoceny výsledky molekulárních analýz - profily ISSR markerů. Amplifikované fragmenty byly separovány pomocí gelové elektroforézy, vyfotografovány pomocí digitálního fotoaparátu a byla provedena obrazová analýza - záznam pozice a počtu amplifikovaných fragmentů. Byla hodnocena přítomnost (1) či nepřítomnost (absence) (0) příslušného fragmentu. Celkem byly hodnoceny 4 ISSR primery (UBC 810, UBC 881, UBC 890, UBC 825) a byla sestavena matice přítomnosti/nepřítomnosti fragmentů. Tato data byla dále zpracovávána pomocí statistických programů MVSP a DARwin. Byly provedeny tři analýzy molekulárních dat - pro soubor českých a amerických vzorků a ve třetí analýze byla hodnocena data z České republiky a Minnesoty dohromady.

3.1 Genetická variabilita vzorků *P. arundinacea* z ČR

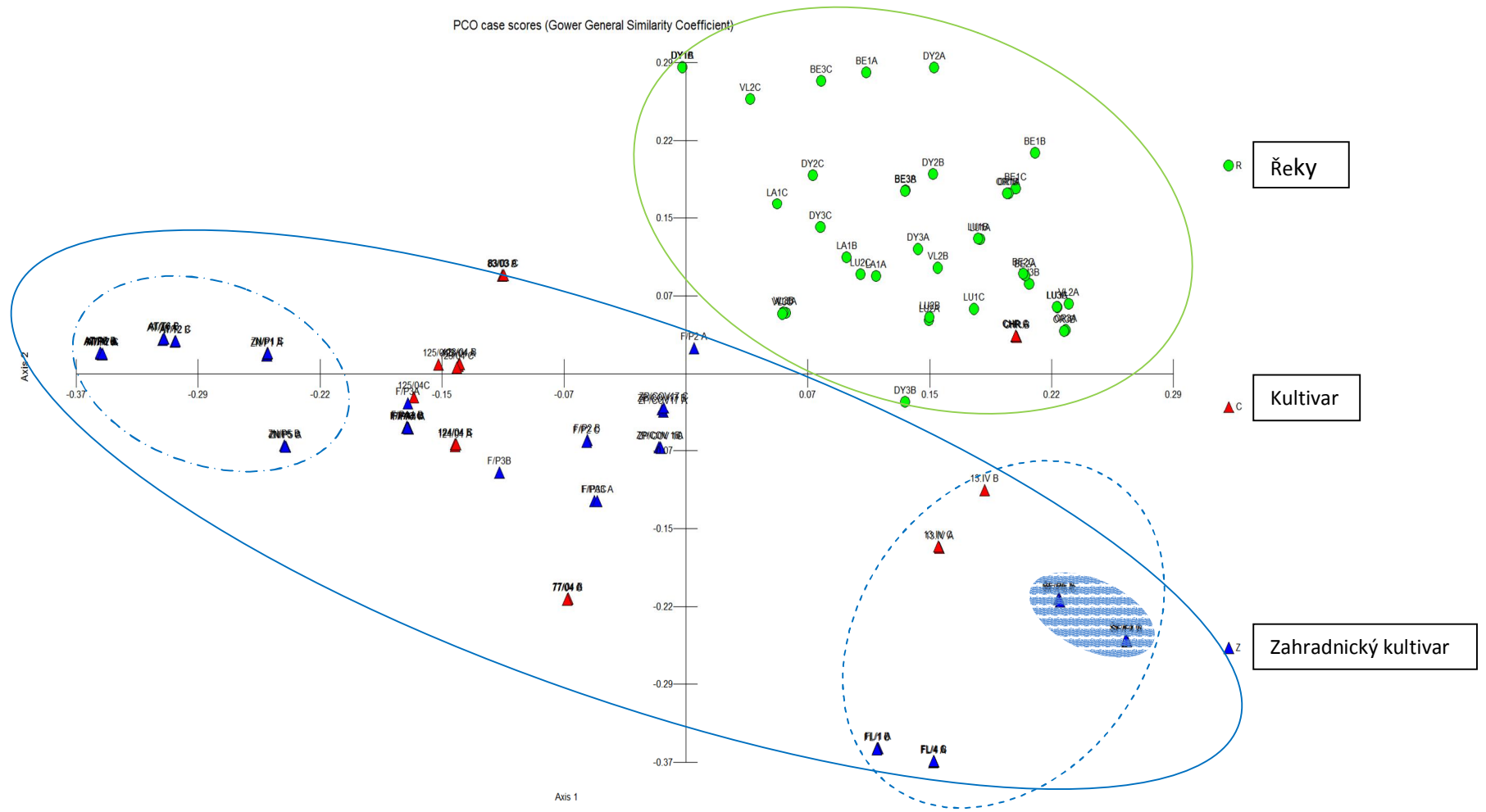
Genetická variabilita vzorků *P. arundinacea* z České republiky. Genotypy z planých populací, zahradnické a pícninářské kultivary a genotypy z ČOV.

Byla provedena PCO a clusterová analýza, na Obr. 8 jsou vedeny výsledky PCO analýzy ve formě ordinačního diagramu, na Obr. 9. jsou uvedeny výsledky clusterové analýzy (UPGMA) ve formě dendrogramu. Byla provedena i Neighbor joining analýza v programu DARwin (výsledky této analýzy jsou uvedeny na Obr. 10). Výsledky z programu DARwin se shodovaly s výstupy z UPGMA analýzy. Na výstupu PCO analýzy je patrné seskupení rostlin z přirozených populací z ČR do jednoho shluku (na Obr. 8 označen zelenou elipsou). Do toho shluku byl přiřazen i vzorek pícninářského kultivaru Chrastava, který byl získán selekcí z přirozených populací a charakterem odpovídá rostlinám z inundačních oblastí podél řek. Rostliny vykazují široký rozsah genetické variability jak v populacích, tak i mezi populacemi a není patrné shlukování podle geografického původu vzorků, tedy podle řek, kde byly vzorky odebírány. V druhém shluku jsou seskupeny zahradnické kultivary, genotypy ze sbírky VÚP v Zubří a

genotypy používané v kořenových čistírnách odpadních vod. Tato skupina se vyznačuje vysokou mírou genetické variability, je rozvolněná a je patrné seskupování vzorků podle jejich původu a morfologického typu rostliny (původ - např. vzorky 13 ze Zubří, vzorky chrastice FL nebo ZP/COV; morfologický typ rostlin - např. vzorky ŠF, nebo skupina panašovaných zahradnických kultivarů ZN/P, AT/T a AT/P). Tyto panašované zahradnické kultivary představují jeden okraj genetické variability, druhý pak představují genotypy selektované pro použití v kořenových čističkách odpadních vod (ŠF, na Obr. 8. podbarveno modře), které jsou jak morfologicky, tak i charakterem profilu ISSR markerů řazeny společně se vzorky chrastice FL a 13 blíže ke skupině planých genotypů

Na Obr. 9 je uveden dendrogram jako výstup UPGMA shlukové analýzy. Výsledky shlukové mají obdobný charakter jako výsledky z PCO analýzy, je patrné seskupení vzorků reprezentující planě rostoucí populace podél řek, pícninářského kultivaru Chrastava a produkčních genotypů pícninářských a pro ČOV ("řeky", Chrastava, 13, ŠF a FL). Druhý velký shluk pak vytváří zahradnické kultivary a ostatní genotypy ze Zubří. Patrný je stejně jako v předchozí analýze trend shlukování genotypů podle původu a morfologických charakteristik (panašování) - např. shlukování panašovaných kultivarů AT/T, AT/P, F/P a ZN/P.

Důležitým výstupem analýzy ISSR markerů je zřetelné odlišení skupiny planých genotypů; vnitřní diference skupiny zahradnických kultivarů a pícninářských genotypů - shluk tvořený panašovanými zahradnickými kultivary a shluk tvořený genotypy produkčními pro využití pícninářské nebo pro účely ČOV.



Obr.8. Výsledky PCO analýzy. V zeleném poli vyznačeny přírodní populace spolu se vzorkem CHRASTAVA. V modrém kruhu seskupení zahradnických a pícninářských kultivarů.

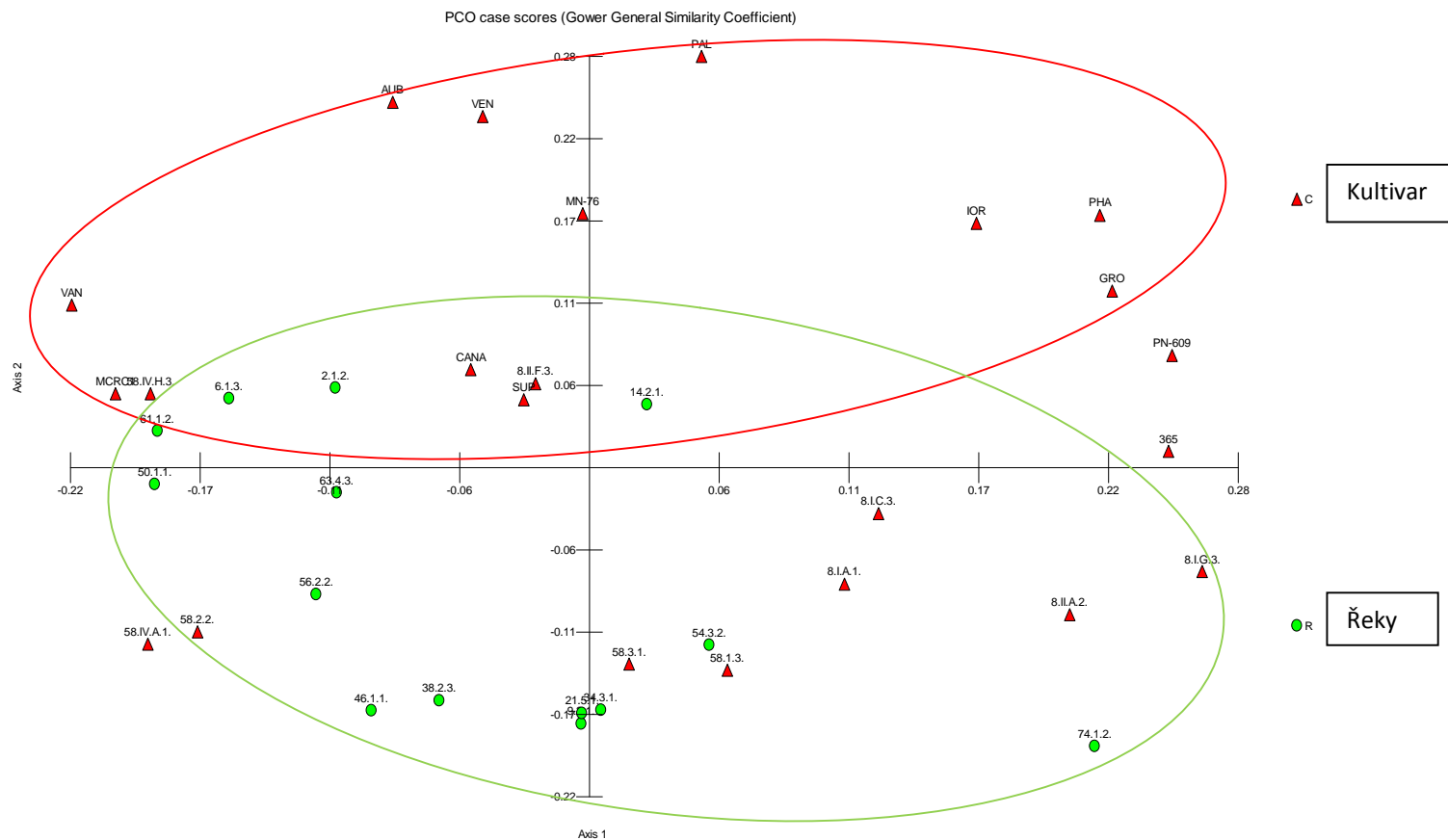
3.2 Genetická variabilita vzorků *P. arundinacea* z Minnesoty, USA

Genetická variabilita vzorků *P. arundinacea* z Minnesoty, USA - genotypy z populací podél řek, extenzivně pěstované pícninářské genotypy a pícninářské kultivary.

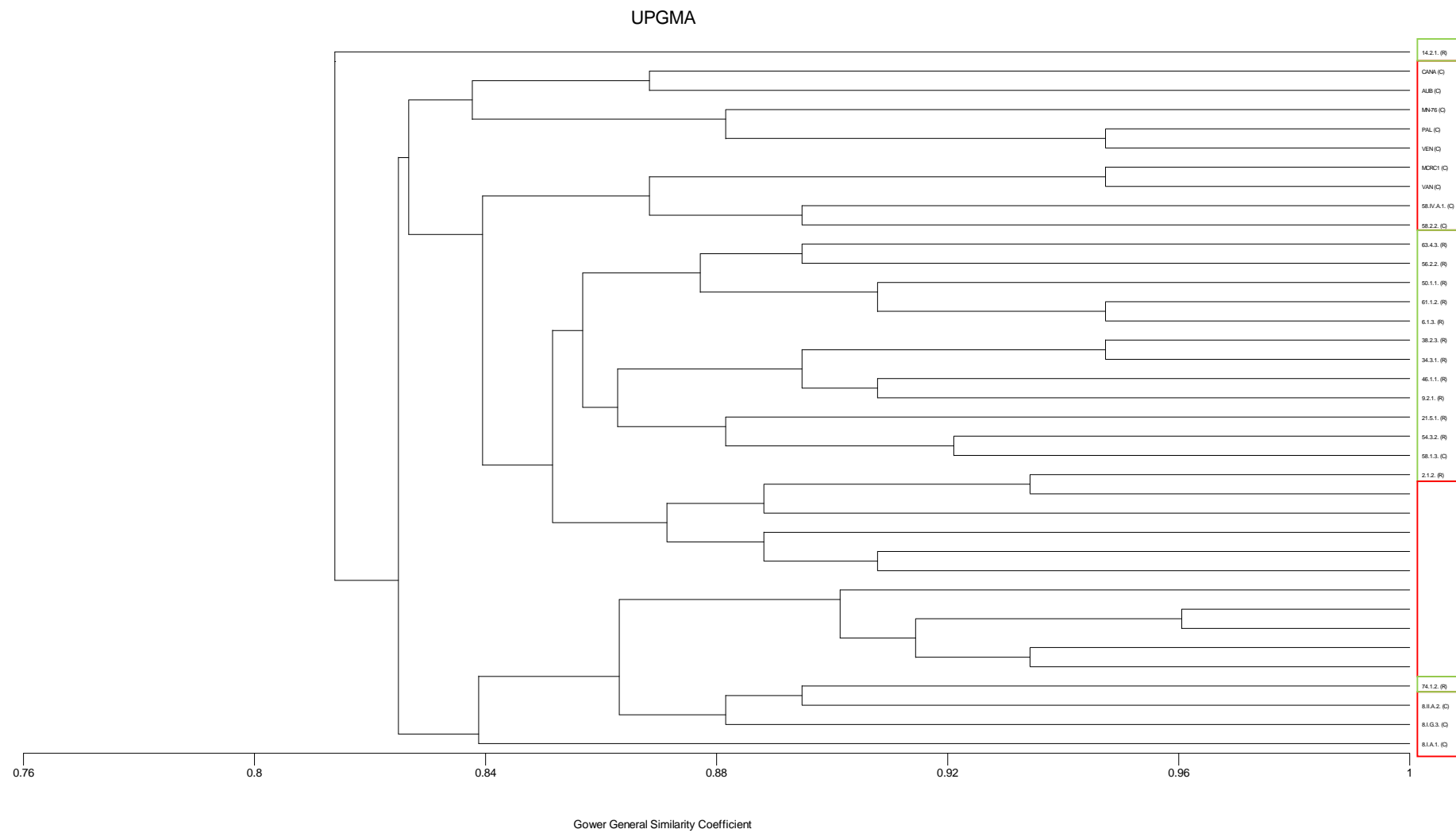
Obdobně jako u vzorků z ČR byla provedena PCO a clusterová analýza, na Obr. 11. jsou vedeny výsledky PCO analýzy ve formě ordinačního diagramu, na Obr. 12 jsou uvedeny výsledky clusterové analýzy (UPGMA) ve formě dendrogramu.

V případě amerických genotypů není 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. Nicméně i zde je možné odlišit skupinu intenzivních pícninářských kultivarů (červený ovál na Obr. 11) a skupinu vzorků odebraných z populací podél řek (zelený ovál na Obr. 11). Na výstupu PCO analýzy je patrný překryv těchto dvou skupin. Vzorky z populací 8 a 58, představují pícninářské kultivary z extenzivních ploch a došlo k jejich začlenění do shluku vzorků z populací podél řek. Logické vysvětlení pak můžeme spatřovat v charakteru těchto extenzivních ploch (ploché často zaplavované území, extenzivně využívané, porosty chrastice byly založeny jako kulturní porosty, ale je zde velmi silné ovlivnění genotypy z populací rostoucích podél řek, ne zcela jasný bývá i zdroj osiva kultivarů) a celkovém rozsahu genetické variability ve sledovaném území, který je o cca 10 % nižší než-li je tomu u souboru českých genotypů (viz. Obr. 12 UPGMA analýza).

Výsledky shlukové analýzy (Obr. 12) mají opět obdobný trend jak PCO analýza, tj. skupina genotypů z populací podél řek, skupiny kultivarů a ne zcela jasné postavení vzorků z populací 8 a 58.



Obr. 11. Výstup z PCO analýzy. Červeně odlišená skupina reprezentující oblasti intenzivního zemědělství. Zeleně značena skupina reprezentující původní výskyt *Phalaris*.



Obr. 12. Výstup z N-J analýzy. Červeně značeny americké kultivary, zeleně plané populace.

3.3 Porovnání genetické variability vzorků *P. arundinacea* z České republiky a Minnesoty

Celý soubor genotypů z populací podél řek, zahradnické a pícninářské kultivary a genotypy.

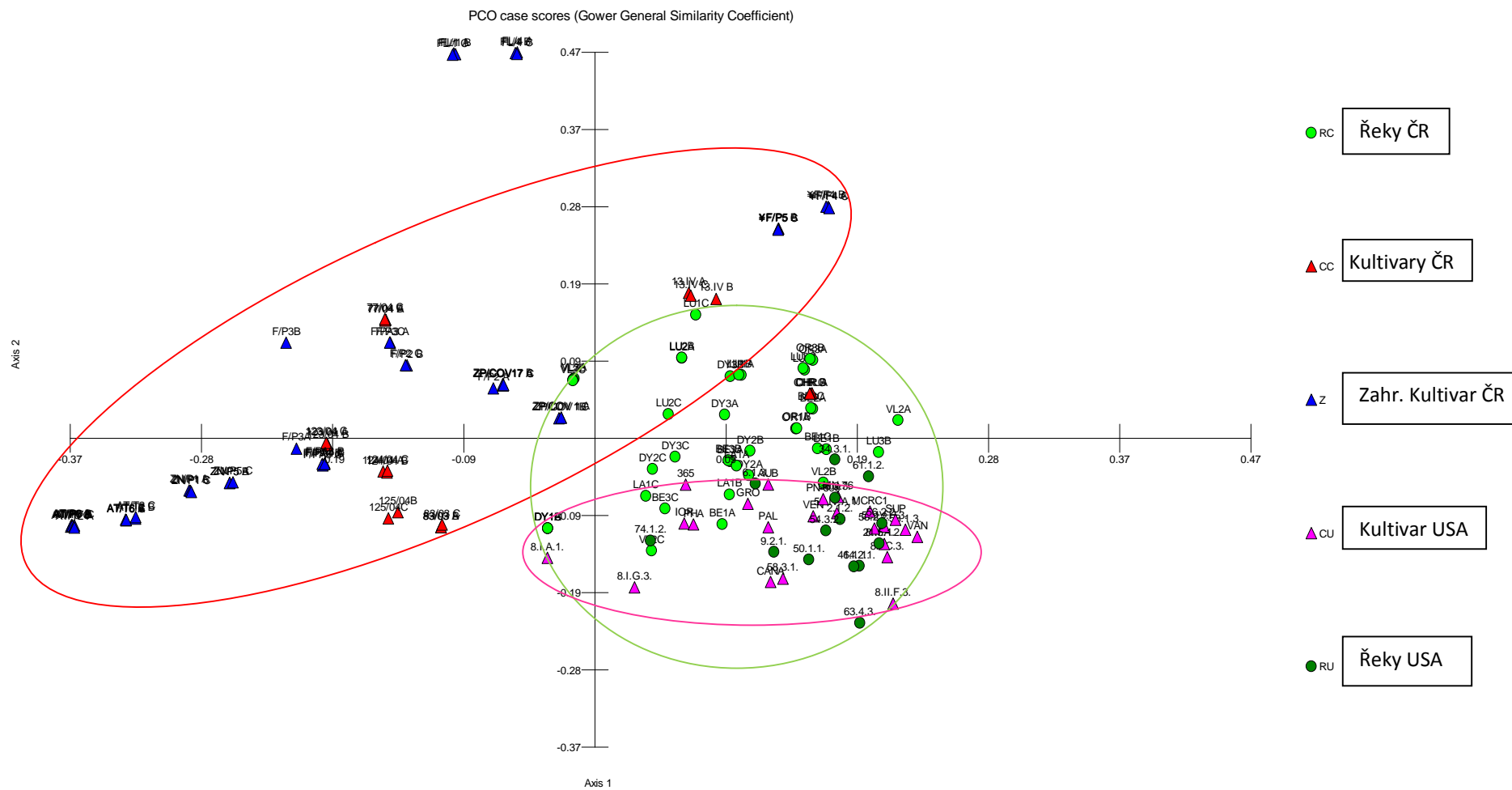
V rámci tohoto souhrnného vyhodnocení dat 4 analyzovaných ISSR markerů byly porovnány výsledky genetické variability v českých nativních, amerických invazních populacích, v souboru pícninářských kultivarů z ČR a MN a souboru zahradnických kultivarů. Výsledky přinášejí zajímavé uspořádání analyzovaných vzorků a přináší i přímé porovnání rozsahu a charakteru genetické variability ve sledovaných souborech.

Na základě PCO analýzy (Obr. 13) došlo k vytvoření dvou hlavních shluků: první shluk zvýrazněný červeným oválem zahrnuje zahradnické kultivary, pícninářské genotypy ze Zubří a genotypy pro ČOV. Seskupení vzorků do tohoto shluku, stejně jako jeho vnitřní strukturalizace je shodná s analýzou I. kdy byly hodnoceny pouze vzorky z ČR. Druhý shluk označený zeleným oválem pak obsahuje genotypy z planých populací podél řek z České republiky, kultivar Chrastava a dále všechny americké vzorky - genotypy z invazivních populací podél řek, pícninářské kultivary a genotypy z extenzivních porostů chrastice z JZ i S Minnesoty. V rámci druhého shluku je patrná vnitřní diference, všechny americké vzorky jsou seskupeny v dolní části shluku - znázorněno fialovým oválem. Vysvětlení pro tento charakter výsledku molekulárních analýz lze spatřovat v rozsahu genetické variability (zahradnické x plané a pícninářské genotypy, české x americké genotypy) a v charakteru rostlin/ populací chrastice rákosovité (zahradnické - panašované či jinak zahradnický významné genotypy x genotypy z inundačních oblasti s charakterem hospodářsky využitelné rostliny). Seskupení všech amerických genotypů do jednoho kompaktního shluku je možné vysvětlit rozsahem genetické variability u souboru amerických genotypů, kdy na nepoměrně menším území, které představovaly odběry vzorků podél českých řek, byl zaznamenán podstatně větší rozsah genetické variability a různorodost genotypů přítomných v daném území.

Výstupem přímé komparativní analýzy českých a amerických vzorků chrastice je rozlišení souboru genotypů do dvou hlavních shluků (zahradnické a speciální genotypy a genotypy z nativních a invazivních populací "pícninářského" charakteru). Dalším významným výstupem je seskupení amerických genotypů do jedné kompaktní skupiny

v důsledku nízké genetické variability tohoto souboru a přímé porovnání rozsahu genetické variability českých a amerických genotypů.

Výsledky UPGMA analýzy jen dokreslují tyto výstupy a zjištění. Na Obr. 14 je modře podbarven shluk amerických genotypů. Na dendrogramu je jednak patrné seskupení všech amerických genotypů do jednoho shluku a také větší míra podobnosti v rámci tohoto shluku.



Obr. 13. Srovnání českých a amerických populací. Světle zeleně plané české populace, červeně odlišené české kultivary, růžově kultivary americké a tmavě zeleně plané americké populace.

4. DISKUZE

4.1. Izolace DNA

Na základě rozsáhlého screeningu a optimalizací extrakčních technik, jsme jako nejvhodnější metodu izolace DNA zvolili techniku CTAB. Izolace DNA byla provedena pomocí pufru cetyltrimetyluammonium bromidu (CTAB), standardní postup dle DOYLE a DOYLE (1987) a WILLIAMS et al. (1992), byl modifikován. Modifikace spočívala v zefektivnění metody a zkrácení doby izolace se stejnou kvalitou, čistotou a výtěžností DNA. Tato metoda izolace je široce využívána u řady rostlinných druhů např. *Brassica napus* (JOZOVÁ, 2012). Naproti tomu JAKUBOWSKI (2010, 2011) ve svých pracích používá izolaci NaCl/CTAB dle ŠTORCHOVÁ (2000). Tato metoda se nám ale neosvědčila, větší výtěžnost spolu s čistotou extrahované DNA vykazovala metoda modifikované izolace CTAB. Metody založené na využití CTAB mají výhodu v nepoužívání fenolu, poměrně často je tento princip izolace DNA obsažen i v komerčně dodávaných kitech.

Oproti většině prací na *Phalaris arundinacea* (např. JAKUBOWSKI 2011, 2012) jsme nepoužili homogenizaci rostlinného materiálu přímo v extrakčním pufru. Po mnoha testech výtěžnosti DNA v poměru s úsporou času, jsme zvolili rychlou a šetrnou metodu homogenizace vzorků v tekutém dusíku. Tato metoda homogenizace byla využita v extrakci u jiných rostlinných druhů, např. u *Taxus baccata* (MÁNEK, 2001) a *Humulus lupulus* (PATZAK, 2003).

4.2. Optimalizace PCR

Pro molekulární analýzy byly použity ISSR markery. ISSR markery použité v této studii byly také aplikované jako účinné nástroje pro poskytování dat a vyhodnocení genetických vztahů v širokém rozsahu plodin včetně *Phalaris*. ISSR markery použil JOSHI et al. (2000) pro odlišení u rýže, NAGAOKA et al. (1997) u pšenice. Touto technikou lze charakterizovat také odrůdovou úroveň druhu. Například pět ukotvených primerů rozlišilo 20 kultivarů *Brassica napus* (CHARTERS et al., 1996). Podobně bylo

rozlišeno 37 kultivarů brambor čtyřmi primery (PREVOST et al., 1999), 3 primery identifikovaly 16 genotypů rybízu (LANHAM et al., 1998).

Pro účely PCR analýzy byl proveden screening primerů a byly vybrány 4 primery poskytujících stabilní, reprodukovatelná a jasně čitelná spektra produktů/fragmentů. Pro každý z použitých primerů bylo nutné optimalizovat teplotu annealingu. Každý primer byl optimalizován pro metodu ISSR.

Optimalizovala se změna koncentrace DNA. Snížením koncentrace se docílilo snížení koncentrace inhibitorů PCR, které mohou být přítomny ve vzorku. Na základě teplotního gradientu byla vybrána nejlepší teplota pro nasednutí primeru. Změna teploty zlepšila vazbu primerů na templátovou DNA. Přidáním $MgCl_2$ byl stabilizován komplex DNA–polymeráza. Specifičnost vazby byl zajištěn přidáním aditiv BSA. Modifikován byl také celý cyklus- prodloužení doby elongace, zvýšení počtu cyklů v reakci. Obdobné postupy optimalizace PCR protokolu uvádí např. MULLIS et.al. (1994)

Touto optimalizací jsme docílili dobrou amplifikaci produktů a vysokou reprodukovatelnost reakce.

PCR reakce probíhala vždy ve dvou nezávislých reakcích, které byly na gel naneseny vedle sebe. Hodnoceny byly jen takové produkty, které se amplifikovaly v obou PCR reakcích.

4.3 Výsledky

Přesné stanovení reálné míry genetické vzdálenosti/ podobnosti je velmi důležité a molekulární přístup může odhalit stupeň genetické variability na genotypové úrovni. Tyto dva aspekty mohou odkazovat na vysokou genetickou podobnost zdánlivě vzdálených rodičů, kteří pocházejí z různých zdrojů. Polymorfní charakter ISSR markerů vychází z hypervariabilní části genomu (MESZAROS et. al., 2007), a proto se nevztahuje na kódující sekvenci, která hraje klíčovou roli při charakterizaci různých kultivarů. Proto může ISSR technika zachytit rychlé mutační změny vyskytující se v genomu během šlechtění, ale to obvykle nemá vliv na fenotypový charakter jednotlivých odrůd. Z tohoto důvodu jsou ISSR markery vhodnou markerovací technikou pro rozlišení mezi

genotypy, které jsou geneticky velmi podobné (REDDY, 2002). Reprodukovatelnost ISSR techniky v rámci naší analýzy a vyhodnocení postupu byla velmi vysoká a žádné problémy se stabilitou a reprodukovatelností vybraných primerů nebyly zaznamenány.

ISSR analýza byla navržena v rámci této DP jako účinná a levná technika, která může poskytnout užitečné informace o genetických profilech *P. arundinacea* (SOBOTKA et. al., 2004; ČURN et. al., 2008).

JAKUBOWSKI ve svých pracech (2010, 2011, 2012) používá k hodnocení genetické variability u *P. arundinacea* metodu SSR. JAKUBOWSKI (2011) pomocí 15 SSR markerů hodnotil 83 planých populací z Eurasie a 24 kultivarů. Odlišil sedm subpopulací v Evropě s vysokou příměsí ostatních genotypů, což naznačuje, že výchozí genetické zdroje *P. arundinacea* se rozšířily po celé Eurasii, a to buď přirozeně nebo lidmi, z důvodu využití chrastice v zemědělství. Výsledky ukazují, že v analyzovaných kultivarech jsou zahrnuty mnohé znaky/ markery vyskytující se u divokých populací, i když moderní kultivary vypadají, že pocházejí z relativně malého genofondu. V naší analýze jsme pomocí 4 ISSR markerů signifikantně odlišili skupiny evropských genotypů od skupiny planých genotypů, zahradnických kultivarů a pícninářských genotypů. Similaritu s nativními populacemi jsme našli u vzorku Chrastava, který byl získán selekcí z přirozených populací a charakterem odpovídá rostlinám z inundačních oblastí podél řek. Přesto ale české kultivary proti americkým vykazují vysokou míru genetické variability.

JAKUBOWSKI (2012) se zabýval identifikací nativních populací v Severní Americe. Pomocí 15 SSR markerů našel na základě analýz herbářových položek původní nativní populaci v Severní Americe, která vyhynula na počátku 20. století. Jako kontrolu použil vzorky Euroasijské, u nichž nebyla nalezena similarita s analyzovanými vzorky z amerických populací a proto jsou analyzované herbářové položky považované za původní americké genotypy. JAKUBOWSKI (2012) předpokládá, že by se tyto původní populace mohly ještě nacházet na Aljašce. Při srovnání amerických a českých populací v naší analýze došlo k výraznému odlišení českých a amerických populací. Důležitým zjištěním je, že rozsah genetické variability u amerických vzorků (kultivarů i vzorků z invazních populací a extenzivních ploch) je o cca 10% nižší než- li je tomu u evropských materiálů. Domníváme se, že tato nízká variabilita americké populace je dána šlechtěním a zúžením genetické variability v důsledku opakovaných selekčních zásahů.

CASLER et al. (2009) na základě 102 AFLP markerů rozdělil analyzované vrorky na dvě oddělené skupiny. První se sestávala ze tří blízce příbuzných genotypů ze Severní Ameriky a druhá obsahovala všechny zbývající genotypy. Své výsledky podpořil analýzou chloroplastové DNA. Pomocí těchto metod dokázal, že genofond původního druhu *P. arundinacea* je zachován v amerických kultivarech. V případě amerických genotypů v naší analýze 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. Nicméně i zde jsme odlišili skupinu intenzivních pícninářských kultivarů a skupinu vzorků odebraných z populací podél řek.

5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo na základě molekulárních analýz vyhodnotit genetickou variabilitu u komerčních pícninářských a okrasných kultivarů a původních populací chrastice rákosovité s různou mírou expansivity v ČR a u invazních populací chrastice z Minnesoty. Dále pak porovnat rozsah genetické variability v nativních a invazních populacích a ověřit, zda je možné na základě analýzy ISSR markerů odlišit kultivary, nativní a invazní populace.

Byla provedena optimalizace izolace DNA a ISSR analýzy u chrastice rákosovité. Pro účely PCR analýzy byl proveden screening ISSR primerů a byly vybrány 4 ISSR primery poskytujících stabilní, reprodukovatelná a jasně čitelná spektra fragmentů.

Byly provedeny molekulární analýzy souboru zahradnických a pícninářských kultivarů, genotypů z extenzivních ploch v Minnesotě, souboru genotypů používaných pro kořenové ČOV a vzorků z nativních populací České republiky a invazních populací z Minnesoty.

V rámci statistického zpracování molekulárních dat byly provedeny tři analýzy molekulárních dat - pro soubor českých vzorků a vzorků pocházející z Minnesoty. Ve společné analýze byla hodnocena data z České republiky a z Minnesoty.

Důležitým výstupem analýzy ISSR markerů je zjištění, že rozsah genetické variability u vzorků z Minnesoty (kultivarů i vzorků z invazních populací a extenzivních ploch) je o cca 10% nižší než- li je tomu u českého materiálu. U skupiny českého materiálu došlo ke zřetelnému odlišení skupiny planých genotypů a skupiny zahradnických kultivarů a pícninářských genotypů. U zahradnických kultivarů a pícninářských genotypů došlo k odlišení dalších dvou podskupin - shluku tvořeného panašovanými zahradnickými kultivary a shluku tvořeného genotypy produkčními pro pícninářské využití nebo pro účely ČOV.

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. Nicméně i zde je možné odlišit skupinu intenzivních pícninářských kultivarů a skupinu vzorků odebraných z populací podél řek.

Při celkovém porovnání českých a Minnesotských vzorků chrastice rákosovité došlo k rozlišení souboru genotypů do dvou hlavních shluků. První obsahuje zahradnické a pícninářské genotypy české. Do druhého byly přiřazeny genotypy z nativní a invazních populací včetně pícninářských kultivarů z Minnesoty. V rámci druhého shluku se pak genotypy z Minnesoty seskupily do jedné kompaktní skupiny v důsledku nízké genetické variability tohoto souboru.

6. POUŽITÁ LITERATURA

AMBROS, Z. & ŠTYKAR, J. (1999) Geobiocenologie I. 1. vyd., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno. 63 s. ISBN 8071573973.

ANDERSSON, B., Lindvall, E. (1997) Use of biomass from Reed Canary Grass (*Phalaris arundinacea*) as raw material for production of paper pulp and fuel. http://www.internationalgrasslands.org/publications/pdfs/1997/1_03_003.PDF.

ANTILLA, C. K., King, R. A., Ferris, C., Ayres, D.R. & Strong, D.R. (2000) Reciprocal hybrid formation of *Spartina* in San Francisco Bay. *Molecular Ecology*, 9: 765–770.

AYRES, D. R., Zaremba, K., Sloop, C. M., Strong, D. R. (2008) Sexual reproduction of cordgrass hybrids (*Spartina foliosa* x *alterniflora*) invading tidal marshes in San Francisco Bay. *Diversity and Distribution*, 14: 187-195.

BAKER, H. G. (1974) The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5: 1-24.

BALDINI, R. M. & JARVIS, C. E. (1991) Typification of some Linnaean names in *Phalaris*(Gramineae). *Taxonomy*, 40: 475–485.

BALDINI, R. M. (1995) Revision of genus *Phalaris arundinacea*. *Webbia*, 49: 265-329.

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.

BĚLOHLÁVKOVÁ, R. (2004) Květena České republiky. Vyd. 1. Editor Bohumil Slavík, Jitka Štěpánková. Ilustrace Anna Skoumalová-Hadačová, Eva Smrčinová. Praha. Academia, 767 s. ISBN 80-200-1161-7.

BERNTHAL, T. W. & WILLIS, K. G. (2004) Using LANDSAT 7 Imagery to map invasive Reed Canary Grass (*Phalaris arundinacea*) A landscape level wetland monitoring methodology. Wisconsin Department of Natural Resources PUB-SS-992, The Wisconsin Department of Natural Resources, Grant No. CD-975115-01-0, U.S. Environmental Protection Agency, Region 5.

- BRODERSEN, C., LAVERGNE, S. & MOLOFSKY, J.** (2008) Genetic variation in photosynthetic characteristics among invasive and native populations of Reed Canary Grass (*Phalaris arundinacea*). *Biological Invasions*, 10: 1317-1325.
- CARLSON, I.T., Oram, R.N., Surpenant, J.** (1996) Reed canarygrass and other phalaris species. In 'Cool-season forage grasses. Vol. 34'. *Agronomy Monograph No. 34*. (Eds LE Moser, DR Buxton, MD Casler) pp. 569–604. (American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America: Madison, WI).
- CASLER, M. D., Phillips, M. M. & Krohn, A. L.** (2009) DNA Polymorphism reveal geographic races of Reed Canarygrass. *Crop science*, 49: 2139-2148.
- ČURN, V. et al.** (2005) Molekulární markery – protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.
- ČURN, V., Nováková A., Šimáčková K., Ondřichová B., Bárta J.** (2008): Molecular markers as a tool for plant breeding and variety identification. In: *Modern Variety Breeding for Present and Future Needs*, Prohens J., Badenes M.L. (eds.). UP Valencia, Spain, 699-703.
- DAEHLER, C. C. & STRONG, D. R.** (1996) Status, prediction and prevention of introduced cordgrass *Spartina* spp invasions in Pacific estuaries, USA. *Biological Conservation*, 78: 51–58.
- DOSTÁL, J.** (1989) *Nová květena ČSSR 2*. Praha .Academia Praha.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L.** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- FISCHER, P.J., Gardner R.C., Richardson T.E.** (1996) Single locus microsatellite isolation using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Research*, 24: 4369-4371.
- GALATOWITSCH, S, M., Anderson, N. O., & ASCHER, P.D.** (1999) Invasiveness in wetland plants in temperate North America. *Wetlands*, 19: 733-755.
- GIFFORD, A. L. S., Ferdy, J. B. & Molofsky, J.** (2002) Genetic composition and morphological variation among populations of the invasive grass, *Phalaris arundinacea*. *Canadian Journal of Botany*, 80: 779-785.
- GODWIN, I.D., E.A.B. Aitken & L.W. Smith.** (1997) Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18: 1524–1528.

- GRAU, D.** (2002) Trávy: Lipnicovité, šáchorovité, sítinovité a rostliny podobné travám Evropy. Vyd. 2. Ilustrace Jürke Grau. Praha. 287 s. ISBN 80-249-0039-4.
- GRAU, D., Kremer, Mösel, Rambold, Triebel** (1998) Trávy. Praha. Ikar.
- 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.
- HARLAN, J.R.** (1975) The origins of polyploidy. *Botanical Review*, 41: 361–390.
- HARTL, D. L.** (2010) Principles of population genetics. 1. vyd. Michiganská univerzita: Sinauer Associates,. ISBN 0878932720.
- HOLM, L. G., Pancho, J. K., Herberger, J. P. & Plunkett, P. L.** (1991) A geographical atlas of world weeds. Krieger Publishing Co., Malabar, Florida.
- HROUDA, L.** (2010) Trávy a jejich příbuzní I. *Živa*, roč. 58: 1.
- HROUDOVÁ, et.al.** (2009) Vegetace České republiky. Academia. Praha. PP. 480-484.
- 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.
- CHARTERS, Y.M. & M.J. WILKINSON.** (2000) The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 160–166.
- CHARTERS, Y.M., Robertson A., Wilkinson M.J., Ramsay G.** (1996) PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *Olifera*) using 5' anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 442-447.
- CHEN, Y., G., Hausner, E., Kenaschuk, D., Procunier, P. Dribnenki & G. Penner.** (1998) Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. *Plant Cell Reports*, 18: 44–48.

- 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.
- JANUŠ, V.** (2013) Zhodnocení fenotypové variability komerčních kultivarů a planých populací chřastice rákosovité v experimentálních podmínkách., s. 41.
- JARNE, P. & LAGODA, P.J.L.** (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 424–429.
- JENKIN, T.J., Sethi, B.L.** (1932) *Phalaris arundinacea*, *Ph. tuberosa*, their F1 hybrids and hybrid derivatives. *Journal of Genetics*, 26: 1–36.
- JOSHI, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar & D.S. Brar.** (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1311–1320.
- JOZOVÁ, E., Havlíčková, L., Čurn, V., Kučera, V., Klíma, M., Vyvadilová, M.** (2012) Využití molekulárních markerů pro hodnocení diverzity genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.). *Úroda*, 12: 159-162.
- KANTETY, R.V., Zeng, X.P., Bennetzen, J.L., Zehr, B.E.** (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding*, 1: 365-337.
- KARP, A., Edwards, K.J.** (1997) DNA markers: a global overview. Caetano-Anollés G and PM Gresshoff eds. *DNA markers: protocols, applications and overviews*. 1-13.
- KERGULÉN, M.** (1993) *Index synonymique de la flore de France*, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- 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.

- 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.
- LANHAM, P.G. & BRENNAN, R.M.** (1998) Characterization of the genetic resources of redcurrant (*Ribes rubrum*: subg. *Ribesia*) using anchored microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 917–921.
- 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.
- 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.
- LAVOIE, C., Dufresne, C. & Delisle, F.** (2005) The spread of reed canary grass (*Phalaris arundinacea*) in Québec: A spatio-temporal perspective. *Écoscience*, 12: 355-375.
- LEFOR, M.W.** (1987) *Phalaris arundinacea* L. (reed canary grass, Gramineae) as an hydrophyte in Essex, Connecticut, USA. *Environmental Management*, 11: 771–773.
- 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.
- LINDIG-CISNEROS, R. & ZEDLER, J. B.** (2001) Effects of light on seed germination in *Phalaris arundinacea* (reed canary grass). *Plant Ecology*, 155: 75-78.

- LINDIG-CISNEROS, R. & ZEDLER, J. B.** (2002) *Phalaris arundinacea* seedling establishment: effects of canopy complexity in fen, mesocosm, and restoration experiments. *Canadian J. Botany—Revue Canadienne De Botanique*, 80: 617–624.
- MÁNEK, J.** (2001) Isoenzymová variabilita populace tisů červeného (*Taxus baccata*) ze šumavského Ktišska v kontextu populací z ČR. *Aktuality šumavského výzkumu*, 134–137.
- 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.
- McWILLIAM, J.R.** (1962) Interspecific hybridization in *phalaris*: hybrids between *Phalaris tuberosa* and the hexaploid race of *Phalaris arundinacea*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 13: 585–598.
- McWILLIAM, J.R., Neal-Smith, C.A.** (1962) Tetraploid and hexaploid chromosome races of *Phalaris arundinacea* L. *Australian Journal of Agricultural Research*, 13: 1–9.
- MEKSEM, K., Leister D., Peleman J., Zabeau M., Salamini F., Gebhardt C.** (1995) A high resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Molecular Genetics and Genomics*, 249: 74–81.
- MERIGLIANO, M. F. & LESICA, P.** (1998) The native status of reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.) in the Inland Northwest, USA. *Natural Areas Journal*, 18: 223–230.
- MESZAROS, K., Karsai I., Kuti C., Banyai J, Lang L., Bedo Z.** (2007): Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.). *South African Journal of Botany*, 73: 43–48.
- MILLER, R. C. & ZEDLER, J. B.** (2003) Responses of native and invasive wetland plants to hydroperiod and water depth. *Plant Ecology*, 167: 57–69.
- MULLIS, K. B., Ferré, F. and Gibbs, R. A.** (1994) *The polymerase chain reaction (PCR)*. Birkhäuser Verlag AG, Basel, Switzerland. ISBN 3-7643-3607-2 (H.b.). ISBN 3-7643-3750-8.

NAGAOKA, T. & OGIHARA, Y. (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 597–602.

OBORNÍK, M., Klíč, M., Žížka, 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.

PATZAK, J. (2003) Porovnání metod izolace RNA pro detekci latentního viroidu chmele (HLVd) pomocí Dot-blot molekulární hybridizace a RT-PCR u chmele (*Humulus lupulus*). *Biologické listy*, 68: 219-227.

POOLER, M. R., Dix, R. L. & Feely, J. (2002) Interspecific hybridization between the native bitter sweet, *Celastrus scandens*, and the introduced invasive species *C. orbiculatus*. *Southeastern Naturalist*, 1: 69–76.

PREVOST, A. & WILKINSON, M.J. (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107–112.

RAMSEY, J., Schemske, D.W. (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 467–501.

REDDY, M.P., Sarla, N., Siddiq, E.A. (2002) ISSR polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128:9-17.

REGAL, V. (1953) Pícní a plevelné trávy. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

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 lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 1477-1481.

RELICHOVÁ, J. (1997) Genetika populací. 1. vyd. Masarykova univerzita, 1997. Brno. ISBN 802101542X.

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.
- SALIMATH, S.S., Oliveira, A.C., Godwin, I.D. & Bennetzen, J.L.** (1995) Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome*, 38: 757–763.
- SALTONSTALL, K.** (2002) Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 2445–2449.
- SCOTT, M., Haymes M., Williams S.M.** (1992) Parentage analysis using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res.* 20: 5493.
- SNUSTAD, D & SIMMONS, J.M.** (2009) *Genetika*. 5. Vyd.. Překlad Jiřina Relichová. Masarykova univerzita. 871 s. Brno. ISBN 978-802-1048-522.
- SOBOTKA, R., Dolanská L., Čurn V., Ovesná J.** (2004) Fluorescence-based AFLPs occur as the most suitable marker system for oilseed rape cultivar identification. *Journal of Applied Genetics*, 45: 161-173.
- SOLTIS, D.E., Soltis, P.S., Tate, J.A.** (2004) Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*, 161: 173–191.
- SPYREAS, G., Wilm, B. V., Plocher, A. E., Ketzner, D. M., Matthews, J. W., Ellis, J. L. & Heske, E. J.** (2010) Biological consequences of invasion by Reed Canary Grass (*Phalaris arundinacea*). *Biological Invasions*, 12: 1253-1267.
- STRAŠIL, Z.** (2000) Ekonomická analýza vybraných energetických rostlin určených pro spalování. In: Sbor. Technika a technologie pro nepotravinářské využití půdy a její udržování v klidu., Brno, s. 17-22.
- ŠTORCHOVÁ, H., Hrdlickova, R., Chrtek, J., Tetera, M., Fitze, D., Fehrer, J.** (2000) An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in NACL/CTAB solution. *Taxon*, 49: 79–84.
- UŠŤAK, S., Stražil, Z., Váňa, V., Honzík, R.** (2012) Pěstování chrastice rákosovité *Phalaris arundinacea* L. pro výrobu bioplynu. Výzkumný ústav rostlinné výroby.

- 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.
- VAN ECK, H.J., Van der Voort J.K., Draaistra J., van Zandrvoort P., van Enckevort E., Segers B., Peleman J., Jacobsen E., Helder J., Bakker J.** (1995) The inheritance and chromosomal localisation of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding*, 1: 397-410.
- VILA, M., Weber, E. & D'Antonio, C. M.** (2000) Conservation implications of invasion by plant hybridization. *Biological Invasions*, 2: 207–217.
- VOS, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Homes, M., Freijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zebeau, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. - *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414.
- VYMAZAL, J.** (2004) Kořenové čistírny odpadních vod. ENKI o. p. s. Třeboň, MSM 000020001.
- WANG, G., R. MAHALINGAN & H.T. KNAP.** (1998) (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max(L.)Merr.* *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 1086–1096.
- WEBER, E.** (2003) *Invasive plants of the world- a references guide to environmental weeds*, Cabi Publishing, s.57-321.
- WERNER, K. J. & ZEDLER, J. B.** (2002) How sedge meadow soils, microtopography, and vegetation respond to sedimentation. *Wetlands*, 22: 451-466.
- WILLIAMS, G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.** (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- WU,K., Jones, R., Dannaeburger, L.& Scolnik, P.A..** (1994) Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research*, 22: 3257–3258.
- ZEDLER, J. B. & KERCHER, S. M.** (2004) Causes and consequences of invasive plants in wetlands: Opportunities, Opportunists, and Outcomes. *Critical Reviews in Plant Science*, 23: 431-452.

ZIETKIEWICS, E., Rafalski A., Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase Chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

7. POUŽITÉ INTERNETOVÉ ZDROJE

HUTLA, P. (2004) Chrastice rákosovitá - pěstování a možnosti využití. Biom.cz [online]. [cit. 2013-03-26]. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/chrastice-rakosovita-pestovani-a-moznosti-vyuziti>

KUNCOVÁ, T. (2013) Ekonomika pěstování chrastice rákosovité. Biom.cz [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/ekonomika-pestovani-chrastice-rakosovite>

SVOBODA, J. (2006) Kořenová čistírna odpadních vod. Příroda.cz [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=663>.

Virtual Herbarium of the Chicago Region [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.vplants.org/plants/glossary/poaceae.html>

Kansas State University range page [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://spuds.agron.ksu.edu/ksgrasskey/images/Phalarisarundinacea.html>

Discover life [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://pick4.pick.uga.edu/20/q?search=Phalaris+arundinacea>