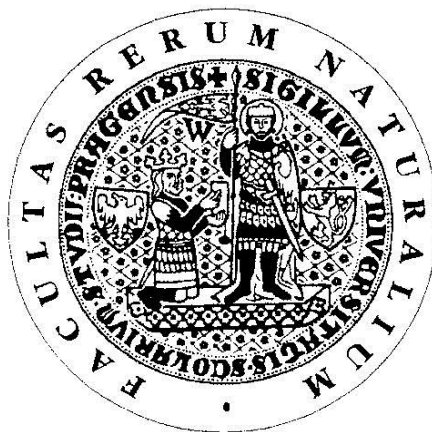


**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Botanika



**Bc. Zuzana Liblová**

Důsledky polyploidizace pro invazní potenciál druhu *Vicia cracca*

Impact of polyploidy on the invasive potential of *Vicia cracca*

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Zuzana Münzbergová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Mária Šurinová

Praha, 2014

## **Prohlášení:**

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

V Praze, 7. 8. 2014

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala především své školitelce Zuzaně Münzbergové za pomoc a nekonečnou trpělivost při tvorbě této práce, Márii Šurinové, která se mnou v pozici konzultantky strávila nemálo náročných dnů a Anežce Eliášové za poskytnutí materiálu a vlastních dat k doplnění mé práce. Za finanční podporu, která umožnila získat rostlinný materiál pro tuto práci a cenné zkušenosti ze zahraničí, patří můj dík také Nadaci „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“, Nadaci Český literární fond a Fondu mobility Univerzity Karlovy v Praze.

## Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	7
1. Úvod.....	9
2. Materiál a metody.....	17
2.1 Studovaný druh <i>Vicia cracca</i> L.....	17
2.2 Studované lokality.....	21
2.3 Ploidie modelových rostlin.....	22
2.4 Klíčivost a výška semenáčků.....	23
2.5 Růstový pokus.....	24
2.6 Genetická vzdálenost populací.....	26
3. Analýza dat.....	32
4. Výsledky.....	33
4.1 Rozšíření cytotypů <i>Vicia cracca</i> ve druhotně osídleném areálu.....	33
4.2 Klíčivost a výška semenáčků.....	33
4.3 Růstový pokus.....	35
4.4 Genetická vzdálenost.....	44
5. Diskuse.....	48
5.1 Rozšíření cytotypů <i>Vicia cracca</i> ve druhotně osídleném areálu.....	48
5.2 Klíčivost a výška semenáčků.....	49
5.3 Růstový pokus.....	52
5.4 Genetická vzdálenost mezi populacemi.....	58
6. Závěr.....	60
Literatura a použité zdroje.....	61
Příloha A.....	69
Příloha B.....	69

## Abstrakt

Náplní této práce jsou informace o většinově se vyskytujících cytotypech, respektive diploidech a tetraploidech druhu *Vicia cracca*. První část je věnována rozmístění cytotypů studovaného druhu v Severní Americe, kde je tento druh invazní. Rozmístěním cytotypů se zabývám v rámci hypotézy, že polyploidní druhy se mezi invazními druhy vyskytují častěji než druhy diploidní. Jejich vyšší úspěšnost může být dána větší variabilitou genů, získanou polyploidizací a případnými genovými subfunkcionalizacemi. Všechny invazní populace *Vicia cracca* zahrnuté v této práci byly výhradně tetraploidní, což podporuje hypotézu o vyšší invaznosti polyploidů. Polyploidizované druhy totiž mohou být například lepšími kompetitory a to díky vlastnostem, které plynou právě ze znásobení genomu. Mezi tyto vlastnosti lze zahrnout různé růstové charakteristiky nebo zvýšenou stresovou odolnost vůči některému faktoru. Druhou částí mé práce je proto testování hypotézy, že polyploidi jsou více variabilní ve velikosti různých částí rostlinného těla a proto jsou schopni více vyrůst i v podmínkách, které nejsou vhodné pro diploidy. Jak předpovídá tzv. EICA hypotéza (evolution of increased competitive ability), rostliny v sekundárním areálu mají více prostoru pro další evoluci a lze tedy očekávat, že jejich růstové charakteristiky se budou lišit i od rostlin stejné ploidie z areálu původního. Tato část práce tedy obsahuje výsledky srovnání vybraných růstových vlastností rostlin z původních diploidních a tetraploidních populací a invazních tetraploidních populací s cílem posoudit, co by mohlo být důvodem současného rozmístění těchto cytotypů. Reakce invazních tetraploidů na stres zastíněním byly podobné tetraploidům z přirozených oblastí výskytu a lišili se od diploidů. To naznačuje, že polyploidní rostliny byly preadaptovány podmínkám nového prostředí a že proces polyploidizace byl tedy významným předstupněm k invazi druhu. Při srovnávání rostlin z přirozeného a druhotného areálu je také užitečné vědět, z jaké části přirozeného areálu invazní populace pocházejí. Proto se ve třetí části práce zabývám určováním příbuzenské vzdálenosti mezi populacemi *Vicia cracca* z Evropy a Severní Ameriky. Nalezení rozdílů ve vybraných sekvencích obecně umožňuje posuzovat příbuznost cytotypů a jednotlivých populací. Sekvence jaderných a chloroplastových DNA markerů, které byly v této práci testovány, však nebyly dostatečně odlišné pro bližší určení genetické vzdálenosti sledovaných populací.

KLÍČOVÁ SLOVA: *Vicia cracca*, tetraploid, invazní druh, růstový experiment, genetická vzdálenost, genetické markery

## Abstract

This work is about diploids and tetraploids of *Vicia cracca* species, the two commonly occurring cytotypes. The first part is devoted to the distribution of cytotypes of this species in the secondary range in North America. It was hypothesised that polyploid species become invasive more frequently than diploid species. Their greater success may be given by greater variability of genes obtained by polyploidisation and gene subfunctionalizing. All invasive populations of *Vicia cracca* species involved in this study were tetraploid. Based on this we can say that only tetraploids are invasive in this secondary colonized area. Polyploid species can be better competitors thanks to their expected better growth characteristics and stress resistance. Therefore the second part of this work is testing the hypothesis that polyploids are more variable in size of different parts of the plant body and therefore more able to grow even in conditions that are not suitable for diploids. As predicted by the EICA hypothesis (evolution of increased competitive ability), secondary colonized area also provide more space for further evolution and we can expect that growth characteristics of plants from the invasive range will differ from plants of the same ploidy from the original distribution range. This part of the work thus contains the results of comparison of selected growth characteristics of original diploids and tetraploids and invasive tetraploids. The purpose is to evaluate the growth characteristics of these cytotypes and assess what could be the reason for the current occurrence. Shadow stress reaction observed in invasive tetraploid plants was more similar to natural tetraploids than diploids. This suggests that polyploid plants are preadapted to new environmental conditions and the process of polyploidization was therefore important precursor to invasive species. When we compare plants from natural and secondary area is also helpful to know what part of the natural range of the invasive population come from. Therefore, the third part deals with the determination of genetic distance between populations of *Vicia cracca* from Europe and North America. Detection of the differences in selected sequences generally allows to assess the relationship between cytotypes and populations. The sequence of nuclear and chloroplast DNA markers tested in this work, however, were not sufficiently different to specify genetic distances of the populations.

KEYWORDS: *Vicia cracca*, tetraploid, invasive species, growth experiment, genetic distance, genetic markers



## 1. Úvod

Ve snaze odpovědět na otázku, jaké jsou příčiny rostlinných invazí, již bylo napsáno mnoho praktických i teoretických prací. Tyto příčiny jsou hledány na úrovni biogeografické (Hierro *et al.* 2005), evoluční (Maron *et al.* 2004), kompetiční (Bossdorf *et al.* 2004) a také v genetické variabilitě invazních populací (Dlugosch & Parker 2008). Základem úspěšné invaze je předpoklad, že nepůvodní druhy se dokáží nějakým způsobem prosadit mezi druhy domácími. A právě ten způsob, jakým se to některým druhům podaří, je to, co se snažíme pomocí různorodě navržených pokusů určit.

Prakticky jsou možné dvě základní cesty, jak se dobře přizpůsobit novému prostředí. Rostliny musí mít buď velkou fyziologickou toleranci a plasticitu (Alpert & Simms 2002), nebo musí projít evolucí, aby dosáhly určité hodnoty fitness (Richardson & Pyšek 2006). Obě cesty se nutně nevylučují (Parker *et al.* 2003, Richardson & Pyšek 2006) a mohou být ovlivňovány dalšími faktory. Podle Parker *et al.* (2003) se prostřednictvím rychlé evoluce mohou vytvořit adaptace na různé typy prostředí. Rychlý adaptivní vývoj umožňuje velká genetická variabilita v populacích a rostliny se přizpůsobí novým typům prostředí. Fenotypovou plasticitu je možné definovat jako prostředím vyvolané rozdíly v růstu či vývoji organismu (Alpert & Simms 2002) nebo také jako kapacitu jednoho genotypu vykázat škálu fenotypů jako odpověď na variabilitu prostředí (Fordyce 2006). V souvislosti s invazemi je důležitá tzv. adaptivní fenotypová plasticita, kdy selekce přímo podporuje fenotypovou proměnlivost (Burns & Winn 2006). Fenotypová plasticita jako taková tedy nutně nemusí souviset přímo s invazností a pouze plasticita zvyšující fitness rostlin může být označována jako adaptivní (Gianoli & González-Teuber 2005). Adaptivní plasticita se očekává v časově nebo prostorově variabilním prostředí (Van Kleunen & Fischer 2005). Fenotypová plasticita může být podstatná v raných stádiích invazí. Umožní rostlinám relativně rychle obsadit širokou škálu prostředí. Velkou fenotypovou plasticitou a vysokou genetickou variabilitou jsou často charakterizovány velkoplošně rozšířené druhy, což zahrnuje i druhy invazní (Bazzaz 1986). V pozdějších fázích pak mohou být pod vlivem selekce upřednostněny naopak některé lokální adaptace (Sexton *et al.* 2002). Lokální adaptace (nízká fenotypová plasticita) utvářená směřovanou selekcí může být pro invazní rostliny jednou z možností evoluční odpovědi na nové prostředí. Podle van Kleunen & Fischer (2005) nemusí totiž být plasticita určitého znaku

pro rostlinu vždy výhodná. A to v případě, pokud selekce nezvýhodňuje vysoce plastické genotypy pro určitý znak a tudíž ve větší míře plastický genotyp nemusí být nutně upřednostňován před strategií méně plastických genotypů. Cenou za plasticitu může být snižená fitness rostliny dokonce i při dosažení stejných hodnot v určitém znaku ve srovnání s méně plastickým genotypem. Být lokálně adaptovaný je tedy jednou z cest pro invazní druhy rostlin jak se pokusit kvalitně konkurovat původním druhům v novém prostředí. Jak vyplývá z celé řady dosavadních studií, míra invaznosti rostlin je dána kombinováním různých znaků s cílem dosáhnout v různých typech prostředí co nejvyšší fitness (např. Sexton *et al.* 2002, Griffith & Sultan 2006, Muth & Pigliucci 2006).

Výhodou během invazí je i mnohonásobné zavlečení. S počtem přichozích diaspor totiž roste nejen šance na úspěšné uchycení druhu (Tilman 2004), ale také se zvyšuje genetická variabilita zavlečených populací. Ačkoli zavlečené rostliny postihuje silný efekt hrdla lahve (bottle-neck effect) a ke snížení genetické diverzity dochází ve valné většině případů, prostřednictvím mnohonásobných zavlečení mohou nové populace genetickou bohatost opět získat (Bossdorf *et al.* 2005). Invaze tak mohou být v některých případech důsledkem zvýšení genetické variability vzniklé několikanásobným zavlečením (Dlugosch & Parker 2008). Přesto se najdou příklady, jako například případ druhu *Hypericum canariense* (Dlugosch & Parker 2008), kdy i přes jednorázové zavlečení a silný efekt zakladatele (founder effect), byl druh schopen rychlého adaptivního vývoje a následné rozsáhlé invaze. Lavergne & Molofsky (2007) poukazují také na to, že v některých případech jako u jimi sledovaného druhu *Phalaris arundinacea*, může dojít naopak k nárůstu genetické variability u zavlečených populací oproti populacím původním. Pod vlivem rychlé evoluce a selekce pak taková situace může rovněž vést ke zvýšené schopnosti invaze. Invaze na velké vzdálenosti můžeme připisovat fenotypové plasticitě (Parker *et al.* 2003), rychlé adaptaci na klimatické změny a místní ekologické podmínky (Barret *et al.* 2008), ale také je zde nezanedbatelný vliv možných preadaptací předchozím růstem na původním území (Thuiller *et al.* 2005). Zda mají invazní rostliny vlastnosti potřebné pro úspěšnou invazi už na původním území, tzv. preadaptace, nebo si invazivitu vyvíjí až po zavlečení na území nové, což lze označit pojmem post-adaptace, řešili i Ellstrand & Schierenbeck (2000). Po shrnutí výsledků z četných studií mohli říci, že pro vznik invazivity u rostlin jsou možné oba zmíněné způsoby.

Ve snaze o vysvětlení úspěchu nepůvodních druhů zejména rostlin byla od Blossey & Nötzold (1955) navržena tzv. EICA hypotéza (The evolution of increased competitive ability hypothesis). Tato hypotéza předpokládá takový výběr, který upřednostňuje genotypy s lepší konkurenční schopností (Müller & Martens 2005). Další hypotézou, která se snaží o vysvětlení invazní úspěšnosti mnoha introdukovaných druhů je ERH (Enemy release hypothesis). Myšlenky této hypotézy jsou v podstatě zahrnuty v předchozí zmíněné EICA hypotéze, která je však rozvíjí v širším kontextu, a proto se oběma hypotézami budu zabývat zároveň. Základní myšlenkou je uvolnění rostliny od nepřátel na původním místě a v případě, že na novém stanovišti nemá rostlina žádné přirozené predátory (např. specializované býložravce), soubor vlastností rostliny umožňuje využít prostředky, které původně musela vynakládat na obranné mechanismy, ke svému růstu a rozmnožování. Zavlečené rostliny pak mohou vytvářet více biomasy než jedinci z původního areálu, mají více potomků a jsou více životaschopné. Zároveň se předpokládá, že predátoři (generalisté) na novém území upřednostňují místní původní druhy (Müller-Schärer & Schäffner 2008). Tato hypotéza byla od jejího uvedení mnohokrát testována na různých modelových rostlinných druzích. Ve své práci například Bossdorf *et al.* (2005) shrnul výsledky velkého počtu studií zejména o fenotypových změnách invazních polyploidů různých druhů rostlin. V mnoha těchto studiích bylo opravdu zjištěno, že rostliny snížily svoji odolnost nebo investovaly více do růstu, ale na rozdíl od základního předpokladu hypotéz, se málokdy obě změny vyskytly v rámci jedné populace zároveň. Takovou situaci ukázal také Meyer *et al.* (2005) na modelovém druhu *Solidago gigantea*. Rostliny z lokalit původního výskytu druhu v Severní Americe spolu s rostlinami z druhotně kolonizované Evropy byly pěstovány společně po dobu dvou let. Přestože byla u invazních rostlin zjištěna snížená odolnost k poškození od hmyzích býložravců, neprosplávaly tyto rostliny o mnoho lépe než rostliny z původního areálu výskytu, pokud byly pěstovány bez přítomnosti těchto býložravců. Příkladem na testování hypotéz je také práce od Vilà *et al.* (2004) s obdobným výsledkem. V rámci této práce se autoři zabývali srovnáváním míry poškození od hmyzích býložravců u rostlin původem z Evropy a u zavlečených invazních rostlin ze Severní Ameriky. Invazní rostliny vykazovaly sice méně rozsáhlá poškození, ale byly v průměru naopak menšího vzrůstu než rostliny z Evropy.

V nemalém počtu studií jsou také tyto hypotézy vyloučeny úplně. Z výsledků takových studií často plyne, že v novém prostředí došlo u rostlin naopak k podstatnému nárůstu investic do obranných mechanismů. Běžně i bez současného poklesu plodnosti a růstu. Příkladem je práce na *Lepidium draba* od Müller & Martens (2005), v níž byly sledovány rostliny z populací z původního areálu výskytu (Evropa), a z populací v kolonizovaném areálu (Severní Amerika). Vzrůstem se rostliny nijak průkazně nelišily a invazní polyploidní jedinci ze Severní Ameriky navíc obsahovali mnohem více obranných látek než jejich diploidní neinvazní varianty.

Z uvedených příkladů lze vyvodit, že ani jednu z hypotéz nemůžeme zcela zobecnit. Reakce na přenesení na nové území záleží na konkrétním druhu rostliny i na míře speciace původních nepřátel v domácím prostředí (Alpert 2006). Při ověřování předpokladů je potřeba klást větší důraz na prozkoumání vlastností kompetice a odolnosti a samozřejmě zohlednit i mnohé další faktory (Bossdorf *et al.* 2005).

Protože polyploidní varianty mnoha druhů jsou nápadně často nacházeny mezi rostlinami označovanými jako plevele a invazní rostliny (Bennett *et al.* 1998, Te Beest *et al.* 2011), které způsobují nejen ekonomické problémy v mnoha zemích, kam byly zavlečeny z míst svého přirozeného výskytu a kde často negativně ovlivňují společenstva ostatních organismů ve svém okolí (Williamson 1996) a mohou měnit jejich složení, byla polyploidie již v mnoha případech navržena jako podporující úspěch cizích rostlin (Verlaque *et al.* 2002). Polyploidizace je totiž způsobem jak může rostlina získat nové užitečné vlastnosti. Její vliv se projevuje na mnoha úrovních od molekulární až po ekologickou (Adams & Wendel 2005). Polyploidizací se můžou změnit například morfologické, fenologické, fyziologické znaky i ekologie rostliny. Tyto změny mohou vytrvat po dobu jedné nebo i více generací (Levin 2002). Úspěšné invaze rostlinných druhů na nová území jsou založeny na využití schopností daného druhu se vyrovnat se změnami na mnoha různých úrovních. A právě polyploidizace je velkou příležitostí pro rostliny tyto schopnosti získat.

Polyploidie, tedy stav, kdy má organismus více než dvě kompletní chromozómové sady, hraje významnou roli v evoluci a druhové variabilitě rostlin. Odhaduje se, že polyploidní fázi někdy v průběhu své existence prošlo minimálně jednou 60-70 % kvetoucích rostlin (Masterson 1994, Soltis *et al.* 2003). U mnoha rostlinných druhů byly

nalezeny přímé důkazy o jednom i více proběhlých cyklech polyploidizace. Polyploidizace je dnes všeobecně uznávána jako velmi významný faktor ve vývoji rostlin (Adams & Wendel 2005). Vznik polyploidů je podle Stebbins (1950) možný několika způsoby. Pokud dojde ke splnutí neredukovaných gamet od stejného druhu, jsou tyto jedinci označováni jako autopolyploidi. Naproti tomu splnutím neredukovaných gamet různých druhů a tedy hybridizací, vznikají tzv. allopolyploidi. Třetím typem jsou segmentární allopolyploidi, kteří vznikli z rodičů, jejichž chromozómové sady se lišily jen částečně. Výskyt autopolyploidie byl v minulosti dlouho podceňován, protože takoví jedinci jsou morfologicky velmi podobní svým diploidním rodičům a pokud vhodnými metodami není zjištěna jejich ploidie, většinou je od nich nelze s určitostí rozpoznat (Soltis *et al.* 2007). Polyploidizace je pro rostliny výhodná především proto, že rostlina touto cestou získá více genů, které jsou složeny z více různých typů alel. Na základě toho lze poté předpokládat, že pokud se polyploidizovaná rostlina ocitne v prostředí nevýhodném pro diploidy téhož druhu, může využít nabytých vlastností, které plynou právě z variability alel a lépe se tak zvládne přizpůsobit aktuálním podmínkám na stanovišti. Přizpůsobení (adaptace) může probíhat mnoha způsoby, samozřejmě v závislosti na genetických možnostech jedince.

Základním dopadem polyploidizace je větší množství DNA, což se s velkou pravděpodobností projeví většími buňkami v organismu. Důsledkem toho jsou pak u polyploidů větší některé jejich orgány či celé rostliny (Segraves & Thompson 1999). Polyploidi často mají více celkové biomasy (Van Kleunen *et al.* 2011). Od toho se posléze odvíjí interakce s dalšími druhy rostlin a organismů v okolí což může mít velký vliv na úspěšné šíření. Je-li rostlina schopna dobře kompetovat s ostatními druhy rostlin, má i lepší kolonizační schopnosti a lépe se šíří (Leger 2008, Goergen *et al.* 2011). Dobré kompetiční schopnosti polyploidů oproti jejich diploidním předkům mohou být dány několika vlastnostmi. Jednou z nich je už zmíněná samotná velikost rostliny, která plyne z větších buněk. Ta může rostlině pomoci přerůst okolní vegetaci a dostat se blíže ke světlu. Schopnost vyrůst více umožní rostlině vyhnout se boji o světlo, v případě kořenů pak o méně zastoupené živiny v půdě (Bretagnole *et al.* 1995). Polyploidní rostliny se mohou tedy od diploidů odlišovat růstovými vlastnostmi, jako je délka stonku, počet větví nebo listů a více kořenů. V neposlední řadě mohou být pro kompetici důležitá třeba časněji klíčící semena a rychleji rostoucí vitálnější semenáčky. Vztahy s opylovači, býložravci,

půdními organizmy a patogeny jsou pro rostlinu neméně důležité. V závislosti na stupni ploidie se například může složení opylovačů mezi cytotypy úplně lišit (Thompson *et al.* 2004). Na základě vzniku takových rozdílů mezi diploidy a polyploidy může dojít dokonce ke vzniku nových rostlinných druhů (Nuismer & Thompson 2001).

Nově vytvořené polyploidní rostliny si tak díky získaným vlastnostem mohou lépe poradit například s nestabilními podmínkami daného stanoviště. Často dochází k situaci, kdy polyploidní část populace začne využívat niku více či méně odlišnou od niky diploidních jedinců. V případě, že k oddělení nik nedojde, mohou polyploidi na základě jiných vlastností dokonce přímo diploidní příbuzné z jejich současného místa výskytu vytlačit (Leitch & Leitch 2008). Polyploidní rostliny mohou mít také zvýšenou ekologickou toleranci, což jim umožní tolerovat širší rozsah podmínek prostředí, než jaký jsou schopni tolerovat jejich diploidní rodiče (Stebbins 1950). Také mohou získat odolnost vůči extrémním stanovištním nebo klimatickým podmínkám (větší tolerance stresu). Širší ekologická tolerance pravděpodobně umožňuje polyploidům snadněji osídlit nová stanoviště, zatímco větší tolerance stresu by mohla zajistit schopnost obývat širší škálu biotopů (Te Beest *et al.* 2011). Například Lowry & Lester (2006) se zabývali studiem druhů z rodu *Clarkia*. Z výsledků jejich práce vyplynulo, že polyploidní rostliny mají výrazně větší areály výskytu, zahrnující více typů klimatických a jiných podmínek, než diploidi. Pravděpodobně tedy buď genetická rozmanitost, nebo schopnost kolonizace, nebo kombinace obojího, má podstatný význam pro rozšíření cytotypu.

Polyploidie, jak je vidět, tedy může rostlinám poskytnout řadu výhod nejen v prvních fázích invaze. Rostlina s vyšším stupněm ploidie může mít lepší kompetiční schopnosti a být lepším kolonizátorem než její diploidní příbuzní (Soltis & Soltis 2000), což může využít po zavlečení na nové území. Polyploidi tedy mohou být zvýhodněni ve fázi ustalování, během které přežívají pouze jedinci, kteří jsou schopni se lépe adaptovat na změněné podmínky. Ti se pak mohou po čase začít šířit na jiné typy habitatů. Díky spektru nových vlastností, které plynou ať už ze samotné duplikace genomu v případě autopolyploidů, nebo navíc i ze zvýšené heterozygotnosti u allopolyploidů, získají polyploidní rostliny možnost v nových podmínkách přežít a časem se dokonce stát úspěšnými kolonizátory a dále se po novém území šířit.

Vysoký výskyt polyploidie u kvetoucích rostlin je, vzhledem k překážkám, které brání už vytvoření polyploidních linií a poté jejich přetrvání, celkem překvapující. Pokud nejsou polyploidní jedinci schopni úspěšného křížení mezi sebou a nemají ani jiné fitness výhody, bude polyploidní (z počátku menšinový) cytotyp téměř jistě z populace vyloučen. Přesto u mnoha druhů rostlin existují úspěšné linie jejich polyploidních variant. Na základě toho se mnoho odborných prací zaměřuje na hledání adaptačních výhod spojených s polyploidii, jako je zvýšená kompetiční schopnost, rozšíření ekologické tolerance nebo zvýšení odolnosti vůči patogenům (Oswald & Nuismer 2011). V podstatě lze ale říct, že polyploidi jednoduše mají výhodu nad diploidy už jen z toho důvodu, že zdvojený genom nabízí velké množství příležitostí tyto adaptace získat (Osborn 2003, Chen 2007).

Pandit *et al.* (2011) shromáždil informace o chromozómových číslech 640 celosvětově ohrožených a neohrožených druhů rostlin a 81 invazních druhů a jejich neinvazních příbuzných. Z těchto dat vyplynulo, že druhy, které mají status ohrožených druhů, jsou většinou diploidní, zatímco druhy označované za invazní jsou převážně polyploidní.

Polyploidizace ale nepřináší pouze pozitivní důsledky. Znásobení genomu ve většině případů způsobuje jeho nestabilitu, horší regulaci metabolismu a poruchy v reprodukci. V reakci na to dochází k rozsáhlým změnám, jejichž prostřednictvím se rostlina snaží nastalé problémy zmírňovat. Velmi rychle po polyploidizační události je změněna exprese mnoha genů, u allopolyploidů na mnohem vyšší úrovni než u autopolyploidů, protože hybridizací je exprese ovlivněna mnohem více než samotným znásobením genomu (Chen 2007). Často následuje rozsáhlé umlčování a odstraňování duplicitních genů. Kopie genů mohou být zapínány a vypínány tkáňově specificky v reakci na různé vnější podněty. Náchylnost k zachování nebo odstranění genu záleží na jeho příslušnosti ke konkrétní genové rodině (Adams & Wendel 2005). Geny, které zůstanou zachovány ve vícero kopiích, mohou následně podstoupit proces subfunkcionalizace. To znamená, že projdou oddělenými vývojovými procesy a získají rozdílné funkce (Hegarty & Hiscock 2007). Pokud je tedy zbytečné, aby stejnou funkci vykonávalo více kopií genu, může být funkce rozdělena mezi tyto kopie, nebo může jedna z kopií získat funkci úplně novou. Tím může polyploidní jedinec získat biochemické a ekologické výhody, které poté významně přispívají k jeho úspěchu (Soltis & Soltis 2000). Mnohé z nastalých změn

mohou být tedy potenciálně výhodné, častěji však vedou k nestabilitě (Comai 2005) a výsledný stav může být neslučitelný s dalším přežíváním. Nově vzniklí polyploidní jedinci mají tak z mnoha důvodů jen velmi omezenou šanci na uchycení se v původní (diploidní) populaci (Felber 1991). Přežití polyploidních rostlin je prvotně dáno velkou tolerancí ke změnám jejich chromozómového čísla a restrukturalizacím celého genomu (Leitch & Leitch 2008).

Při srovnání rostlin z přirozeného a druhotného areálu je také užitečné vědět, z jaké části přirozeného areálu invazní populace pocházejí. K takovéto analýze se využívá různé rychlosti vzniku mutací v genomech jedinců, což umožňuje určovat genetickou vzdálenost jednotlivých populací a v případě invazních rostlin navrhnout jejich zdrojovou populaci. Dobrým příkladem je práce od Plut *et al.* (2011). Autoři se zabývali nalezením původního místa v Evropě, odkud pochází invazní populace *Phragmites australis* v Severní Americe. K dispozici měli jedince z původních a invazních populací ze Severní Ameriky a jedince z populací ve Velké Británii a z populací ve střední Evropě. Parametry podle kterých tyto jedince srovnávali, byly: počet společných alel mezi populacemi, genetická podobnost mezi regiony založená na  $F_{ST}$  a Nei's genetic distance. Výsledky ukázaly, že genetická diverzita je nižší v nativních populacích S. Ameriky a vyšší v populacích v Evropě. Nejnižší diverzita se ukázala v invazních populacích v S. Americe. To je dáno pravděpodobně účinkem efektu zakladatele, tj. zakládající jedinci v sekundárním areálu výskytu „obsahují“ jen část genetické diverzity, kterou disponovala původní populace v primárním areálu výskytu. Z jedenatřiceti sledovaných alel měly invazní americké rostliny dvaadvacet společných s rostlinami z Velké Británie i Evropy. Ze zbývajících devíti alel sdílely americké invazní populace šest alel pouze s populacemi z Velké Británie, dvě alely byly společné pro nativní a invazní populace S. Ameriky a jedna byla unikátní pouze pro invazní populace S. Ameriky. Podle  $F_{TS}$  i Nei's genetic distance jsou tedy invazní populace geneticky nejbližší populacím z Velké Británie, proto autoři připisují původ invazních amerických populací právě tam.

Tato práce se věnuje druhu *Vicia cracca* (vikev ptačí), jehož původním areálem výskytu je Evropa a Asie. V relativně nedávné době byl zavlečen na další kontinenty a v současnosti je na mnoha místech tento druh považován invazní. Protože tomuto druhu



doposud nebyla věnována větší pozornost, jsou k dispozici pouze stručné informace o jeho výskytu ve druhotně osídleném areálu, a proto se nabízí k zamyšlení to, které vlastnosti přispěly ke schopnosti rostlin *Vicia cracca* se tak úspěšně rozšířit na nové území. Vzhledem k tomu, že se tento druh vyskytuje v původním areálu jako diploidní a tetraploidní cytotyp nabízí se též otázka, do jaké míry je úspěšnost druhu v novém areálu spojena s jeho polyploidii. Na základě toho byly stanoveny tři základní otázky, jimiž se tato práce zabývá:

1. Jaké je rozšíření ploidii *Vicia cracca* ve druhotně osídleném areálu?
2. Existují rozdíly v klíčivosti, růstu a reakci na zastínění mezi diploidními a tetraploidními rostlinami z původního areálu a tetraploidními rostlinami z druhotně osídleného areálu?
3. Jaká je genetická vzdálenost mezi jednotlivými populacemi? Které populace z původního areálu výskytu vikve ptačí jsou pravděpodobným zdrojem invazních populací v Severní Americe?

## 2. Materiál a metody

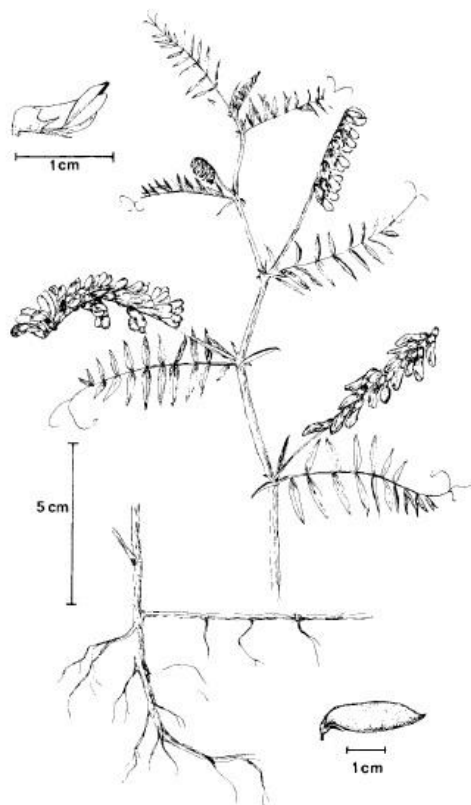
### 2.1 Studovaný druh *Vicia cracca* L.

*Vicia cracca* L. patří do rodu *Vicia* L., do podrodu *Cracca*, sekce *Cracca*, *Vicia cracca* agg. V tomto rodě je dosud zařazeno na 190 druhů rostlin (ILDIS 2005). Spolu s *Lathyrus* L., *Pisum* L., *Lens* L. a *Vavilovia* tvoří monofyletickou skupinu *Vicieae* v rámci čeledi *Fabaceae*. Rod *Vicia* L. samotný je ovšem na základě analýzy genu *matK* (Steele & Wojciechowski 2003) a dalších analýz založených na jaderné ribozomální nrITS sekvenci (Choi *et al.* 2006) považován za parafyletický. První komplexní rozdělení *Vicia* L. provedla Kupicha (1976). Oddělila dva základní podrody *Vicia* a *Cracca* (syn. *Vicilla*), každý z nich se dále členil do dvou skupin. Základními znaky použitými pro toto členění byla relativní délka květenství a přítomnost nektarií na palistech. Podrod *Cracca* byl chápán jako primitivní a různorodější, než podrod *Vicia* (Maxted 1993). Základ tohoto konceptu rodu *Vicia* L. víceméně platí dodnes.

Rod *Vicia* L. je rozšířen zejména v mírném pásmu severní polokoule a dále také v extratropické Jižní Americe (Van de Wouw *et al.* 2001). Druhotně také v Severní Americe, Austrálii a na Novém Zélandu. Největší diverzita rodu je v oblastech kolem Středozemního moře a na Kavkazu. Přesné centrum původu je nejasné. Habitaty osídlené druhy tohoto rodu jsou různorodé, od disturbovaných míst jako okraje polí a silnic, přes okraje lesů až po stepi (Van de Wouw *et al.* 2001). Takto rozsáhlou distribuci po světě lze možná vysvětlit jejich povahou, která se dá svým charakterem přirovnat k plevelům. Přes polovinu severoamerických druhů pochází původně z Eurasie (Kupicha 1976).

Základními chromozomovými čísly u druhů tohoto rodu jsou  $x = 5, 6$  a  $7$ . Polyploidizace zde generuje pouze malou část diverzity. Je známo jen 19 polyploidních druhů ze 144, u kterých víme chromozomová čísla. Všechny 19 je řazeno do podrodu *Cracca*, především pak do sekce *Cracca* Dumort. a *Cassubicae* Radzhi (Hanelt & Mettin 1989). Sekce *Cracca* je nejširší a nejvariabilnější částí celého podrodu *Cracca*. Od původního vymezení této sekce od Kupicha (1976) bylo provedeno ještě několik fylogenetických analýz pro přesnější rozdělení sekce *Cracca*. Analýza na základě izozymové variability (Jaaska 2005) ukázala parafyletičnost této sekce, zatímco kladistické a fenetické analýzy založené na hodnocení množství morfologických znaků (Leht 2005) se přiklánějí spíše k monofyletickému původu.

*Vicia cracca* L. je vytrvalá hemikryptofytní polykarpická bylina luk, pastvin, lesních lemů, křovin, břehů vod a naspů. Jednotlivé rostliny bývají až 150 cm vysoké. Jejich lodyhy jsou plné, ale chabé, rostliny jsou tak v podstatě závislé na opoře okolní vegetací. Květenstvím je mnohokvětý hrozen. Jednotlivé květy jsou na stopkách dlouhých 1-2 mm. Koruna květů je obvykle 10 mm dlouhá, modrofialová, vzácně bílá, nevonná. Čepel pavézy je stejně dlouhá jako nehet. Listy mají obvykle 5-8(-12) párů lístků. Lístky jsou po obou stranách matné, mají tvar podlouhlé elipsy, mohou být až úzce kopinaté. Palisty jsou celokrajné, výjimečně s několika trojúhelníkovitými krátkými zuby (Kubát *et al.* 2010). Na konci listu vyrůstá úponek pro přichycení k okolní vegetaci (Klebesadel 1980). Lusky bývají podlouhle čárkovité, šedohnědé barvy a obsahují obvykle 2-5 semen. Můžeme ji nalézt od nížin až po subalpínský stupeň. Kvete od června do září (Kubát *et al.* 2010). Grafické znázornění rostliny *Vicia cracca* viz obrázek 1.



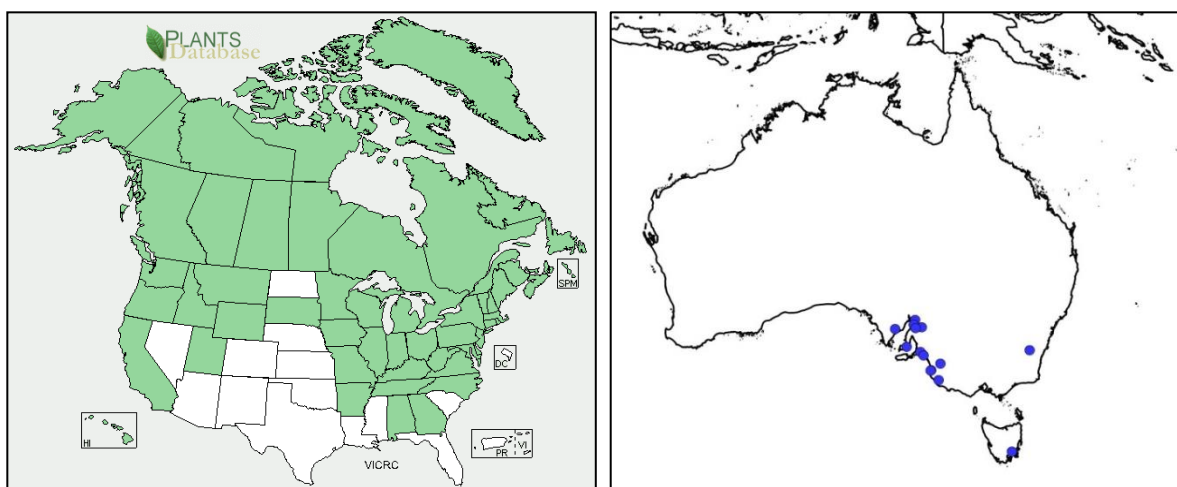
Obrázek 1. Nákres rostliny *Vicia cracca*. Převzato od Hermann (1960).

Z diplomové práce Eliášové (2008), která hledala charakteristiky, podle nichž by bylo možné rozlišit diploidní a tetraploidní rostliny z evropských populací *V. cracca* vyplývá, že kromě toho, že tetraploidi jsou většinou větší, lze je od diploidů odlišit ještě pomocí některých morfometrických znaků v květenství a na listech. Rozdíly v těchto znacích jsou nicméně větší mezi diploidy a tetraploidy z čistých populací, než mezi těmito cytotypy vyskytující-li se v populaci smíšené.

Známými chromozómovými čísly tohoto druhu jsou  $2n = 14$  (diploid), 21 (triploid) a 28 (tetraploid). U polyploidů *Vicia cracca* se předpokládá autopolyploidní původ a to vzhledem k velkým podobnostem v karyotypech cytotypů (Rousi 1960, Dvořák *et al.* 1977), párování chromozómů během meiózy (Rousi 1962), velké podobnosti v morfologických znacích (Rousi 1973) a existenci životaschopných a morfologicky normálních aneuploidních jedinců s  $2n = 27, 30$  (Rousi 1960) nebo  $2n = 18-26$  (Chrtková-Žertová 1973). Také výsledky nejnovější práce na tomto druhu (Eliášová *et al.* 2014), na

základě allozymových markerů, podporují autopolyloidní vznik. Druh *V. cracca* L. je původní v Eurasii (Campbell 1956, in Klebesadel 1980), včetně Sachalinu a Japonska (Rousi 1960). V rámci České a Slovenské republiky se vyskytují populace tetraploidní (převážně ČR) nebo diploidní (převážně SR), sekundární kontaktní zóna se smíšenými populacemi a vzácnými triploidními jedinci kopíruje česko-slovenské hranice. Rozšíření v Evropě sleduje trend výskytu tetraploidů spíše směrem severozápadním, zatímco diploidi převažují na východě (Trávníček *et al.* 2010).

Podle Polunin (1959, in Klebesadel 1980) byla *Vicia cracca* již před 1000 lety zavlečena do Grónska. První zmínka o *Vicia cracca* v Kanadě pochází z roku 1860 z Ontaria (Aarssen *et al.* 1986). Podle Fletcher (1880) byla *Vicia cracca* už v 80. letech 19. století hojně rozšířenou součástí kanadské flóry. V celém druhotně osídleném areálu (Obrázek 2) je tento druh silně invazní. Na základě výsledků několika prací o ploidii rostlin *Vicia cracca* (Ledingham 1957, Mulligan 1961, Rousi 1960, Tomkins & Grant 1978) se předpokládá, že v těchto druhotně osídlených areálech se vyskytují pouze tetraploidi. Šíří se převážně semeny, ale výjimečné není ani vegetativní rozšiřování pomocí pupenů na kořenech (Klebesadel 1980). Z vlastní zkušenosti mohu říct, že *Vicia cracca* je přinejmenším v jižní části Kanady plevelem, vyskytujícím se hlavně podél cest a na rumištích. Zejména kolem komunikací jsou velmi rozsáhlé a spojitě lemy tvořené (nejen) tímto druhem a často tak není reálné určit hranici mezi jednotlivými populacemi.



Obrázek 2. Výskyt *Vicia cracca* v Severní Americe, šedá oblast (vlevo) a v jižní Austrálii, černá kolečka (vpravo). Obrázky jsou převzaty z <http://plants.usda.gov> a <http://avh.ala.org.au>, aktuálně ke dni 21. 6. 2014.

Existuje několik prací, které mimo jiné zmiňují něco málo také o historii zavlečení *Vicia cracca* do Severní Ameriky. Autorem jedné z nich je Klebesadel (1980), který sepsal informace o výskytu a charakteristice tohoto druhu na Aljašce. Podle něj se *Vicia cracca* jako píce pěstovala na Aljašce už na počátku 20. století a to hned ve třech zemědělských pěstitelských stanicích. Z těchto lokalit se posléze samovolně rozšířila do okolí. Často podle něj tvoří dominantní druh na opuštěných polích. Lépe prý prosperuje na vlhkých nánosových půdách. Údajně byla využívána také k cílenému pokrytí volné půdy jako ochrana před erozí (Gleason 1958 a Hulten 1968, in Klebesadel 1980). Pokud už se někde vyskytuje, je těžké se jí kvůli přetrvávajícím podzemním stonkům zbavit. Umí se dobře přizpůsobit klimatu centrální a jižní Aljašky. Ačkoliv nejsou rostliny v prvním roce příliš vitální, přečkají-li zimu, rostou pak velice dobře (Klebesadel 1980). Semena vikve ptačí se vyznačují tuhými nepropustnými obaly (tzv. fyzicky dormantní semena). Klíčení těchto semen je proto silně závislé na narušení těchto obalů. Reprodukční úspěch rostlin totiž není kompletní ve chvíli, kdy rostlina vyprodukuje semena, ale záleží také na tom, zda semena vůbec vyklíčí a úspěšně porostou (Skogen *et al.* 2010). Klíčení semen s nepropustnými obaly obecně může záviset na různých typech okolních faktorů, jako je teplota, vlhkost a abraze, způsobená půdními částicemi. Tyto faktory mohou obaly narušit a dovolit vodě dostat se k embryím (Rolston 1978, Coffey & Kirkman 2006). U druhů *Vicia cracca* (Van Assche *et al.* 2003) i dalšího zástupce vikví s obdobným typem semen *Vicia villosa* (Jacobsen *et al.* 2010) bylo prokázáno, že dormance je prolomena mechanickým působením částic půdy na obal semen.

## 2.2 Studované lokality

Pro účely studování ploidie rostlin *Vicia cracca* v sekundárním areálu jejího rozšíření jsem měla k dispozici semena z devíti populací v USA. Semena z pěti populací z Aljašky jsem získala od Mgr. Anežky Eliášové, byla sesbírána v roce 2009. Semena ze čtyř populací v New Yorku na moji prosbu sesbíral Dr. Jeffrey J. Doyle v roce 2012. Dále jsem pak v létě 2013 shromáždila rostlinný materiál z 50 populací ve státě Ontario (Kanada). Rostlinný materiál z těchto populací byl pro další účely uchován v silikagelu. Na

základě prací zmíněných v předchozí kapitole jsem předpokládala, že rostliny z těchto lokalit budou tetraploidní. Tento předpoklad jsem otestovala, jak je popsáno v metodice.

Ke sledování klíčivosti a na růstový pokus jsem použila semena *Vicia cracca* z původního i sekundárního areálu výskytu druhu. Semena z původního areálu, tedy z Evropy, pocházela z několika lokalit na pomezí České a Slovenské republiky, nasbírána byla v roce 2012. Semena z druhotného areálu byla již výše zmíněná z Aljašky a New Yorku. Materiál z Ontaria jsem v době zakládání růstového pokusu ještě neměla. Jednotlivé populace a jejich ploidie viz příloha A.

Do studia genetické vzdálenosti mezi populacemi už byl zahrnut i materiál *Vicia cracca* získaný v roce 2013 v Ontariu. Rostliny byly ihned po sběru uchovávány v papírových sáčcích v silikagelu. Materiál byl rozdělen podle populací, v rámci populace byla oddělena každá rostlina samostatně. Vybrány byly vždy populace, které od sebe byly geograficky nejvzdálenější, z každé pak byla do analýz použita jedna rostlina. Celkem tedy dvanáct populací z Ontaria, dále dvě populace z New Yorku a tři aljašské. Z Evropy bylo vybráno 27 rostlin. Každá pocházela z jiné populace, pouze v případě, že byla některá z populací smíšená, tedy se v ní nacházeli diploidi i tetraploidi, byly do analýz zahrnuty oba cytotypy. Protože byla k dispozici i DNA rostliny z populace v Gruzii (jihozápadní Asie), byla použita pro zajímavost také. Materiál z evropských a gruzijské populace poskytla Mgr. Anežka Eliášová. Podrobnosti o populacích použitých v této části viz příloha B.

## 2.3 Ploidie modelových rostlin

Před založením růstového pokusu bylo klíčové ověřit předpokládanou ploidii modelových rostlin. U všech evropských rostlin byla proto jejich ploidie změřena průtokovým cytometrem Partec Ploidy Analyzer II v Laboratoři průtokové cytometrie Botanického ústavu AV ČR v Průhoncích. Příprava vzorků proběhla podle metodiky Otto (1990). Na přípravu vzorků byl odstrižen vždy jeden lístek z každého semenáčku. Jako standard byl ke každému vzorku přidán kousek mladého listu *Pisum sativum* 'Ctirad', ( $2C = 8.84 \text{ pg}$ ; Greilhuber & Ebert 1994) a 0,5 ml vychlazeného pufru Otto I. Každý vzorek zvlášť byl nasekán žiletkou v Petriho misce. Získaná suspenze byla následně přefiltrována přes  $0,42 \text{ }\mu\text{m}$  tenkou nylonovou síťku do 2 ml plastové zkumavky, aby se oddělily zbytky

pletiv. Poté byl Ke každému vzorku přidán 1 ml pufru Otto II s fluorochromem DAPI. Nakonec byla měřena relativní intenzita fluorescence, u každého vzorku 1000-3000 jader. Ploidie živých rostlin z invazních kanadských populací (Ontario) byla měřena obdobným postupem, pomocí BD FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA) v laboratoři Department of Botany (University of Guelph, Ontario, Canada). Jako pufr byl používán LB01 (Doležel *et al.* 1989), jako barvivo DAPI. Seznam a složení použitých pufrů a barviv užitých pro cytometrické analýzy je uveden v tabulce 1.

Po změření ploidie vyklíčených semenáčků z českých a slovenských populací jsem zjistila pouze jednu smíšenou, tj. diploidy a tetraploidy v rámci jedné populace společně. Dále pak sedm diploidních a dvě tetraploidní populace. Všechny kanadské populace byly tetraploidní.

Tabulka 1. Pufry a barviva použitá při přípravě materiálu pro měření na průtokovém cytometru.

Název	Složení
Otto I	monohdrát kyseliny citronové (0,1M) 4,2 g Tween 20 [0,5% (v/v)] 1 ml destilovaná voda k doplnění do objemu 200 ml
Otto II	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O (0,4M) 28,65 g destilovaná voda k doplnění do objemu 200 ml
LB01	Tris (15mM) Na <sub>2</sub> EDTA (2mM ) spermine. 4HCl (0.5mM) KCl (80mM) NaCl (20mM) Triton X-100 [0.1% (v/v)]
DAPI	Otto II 10 ml DAPI (zásobní roztok 1 mg/ml) 400 µl β-merkaptoetanol

## 2.4 Klíčivost a výška semenáčků

Na základě cytometrického měření byly rostliny rozděleny na následující typy: 2xE (evropské diploidní rostliny), 4xE (evropské tetraploidní rostliny), 4xN (newyorské tetraploidní rostliny) a 4xA (aljašské tetraploidní rostliny). Jednotlivé populace a jejich

ploidie jsou uvedeny v příloze A. Semena z České republiky, Slovenské republiky a Aljašky byla v rámci typů rozdělena do skupin podle mateřských rostlin a populací. Semena rostlin z New Yorku jsem dostala rozdělená pouze podle populací. Všechna semena byla před pokusem spočítána.

Semena vikve ptačí mají tvrdý vnější obal, který je v přirozeném prostředí po opadnutí od mateřské rostliny narušen kontaktem s částicemi půdy. Ručně sesbíraná semena však nejsou tomuto vlivu vystavena. Před výsevem proto byla všechna semena jemně obroušena smirkovým papírem. Tato semena pak byla koncem března 2013 vyseta do plastových květináčů 10x10x10 cm na směs hlíny a písku 1:1, ve skleníkových podmínkách. V každém květináči tedy byla semena od jedné mateřské rostliny, kromě semen z New Yorku, která byla vyseta hromadně, každá ze čtyř populací do jedné plastové vaničky cca 20x30 cm. Klíčení probíhalo po dobu pěti týdnů. Do výsledné klíčivosti byly zahrnuty i ty semenáčky, které brzy po vyklíčení uhynuly. Takových bylo ale jen zanedbatelné množství. Před pokročením do další fáze experimentu byla změřena také výška nejvyššího semenáčku od každé mateřské rostliny.

## 2.5 Růstový pokus

Pro následující část experimentu bylo potřeba zúžit soubor populací tak, aby byl k dispozici přibližně stejný počet skupin semenáčků (tj. jedna skupina = jedna mateřská rostlina) z původního, jako z druhotně osídleného areálu. U evropských rostlin byl žádoucí i podobný počet diploidních a tetraploidních skupin. Severoamerické rostliny byly všechny tetraploidní. S ohledem na počet skupin semenáčků v jednotlivých populacích a na ploidii jedinců v každé populaci byly vybrány celkem tři populace evropských diploidů, dvě populace evropských tetraploidů, jedna smíšená evropská populace, tři aljašské populace tetraploidů a tři newyorské tetraploidní populace. Z těchto vybraných skupin semenáčků, byly poté vždy vybrány dva největší (z každé skupiny) a po jednom přesazeny do samostatných květináčů 16x16 cm, na substrát hlína:písek 1:1. Jeden byl označen symbolem A, druhý symbolem B. Ke každé rostlině byla nakonec umístěna jedna rameta *Bromus erectus* (sveřep vzpřímený), který měl posloužit jako mechanická opora (vikev ptačí je do určité míry pnoucí rostlina, která využívá okolní vegetaci jako oporu).



Ve výsledku tak byly připraveny dva identické soubory rostlin A a B. Každý obsahoval stejný počet jedinců vzešlých ze semen od týchž vybraných mateřských rostlin. Všechny květináče byly pečlivě označeny číslem populace, ploidií jedince a označením souboru A nebo B. Takto ošetřené rostliny byly ještě na krátký čas umístěny zpátky do skleníku, aby se zvýšila šance na dobré uchycení a případně se snadno doplnily uhynulé rostliny před přenesením do venkovních podmínek.

Přibližně po deseti dnech byla u všech rostlin opět změřena výška a stanoven počet větví (čas 1) a následovalo přenesení do venkovních podmínek. Soubor rostlin A byl umístěn na plné světlo, zatímco soubor B byl přes kovovou konstrukci zastíněn hustou sítí (rašlový úplet, Juta), která poskytovala 65% zastínění. Během léta byly všechny rostliny dvakrát změřeny (čas 2 a 3), vždy zhruba po čtyřech týdnech. Opět se měřila vždy délka nejdelší větve vyrůstající z úrovně půdy a počet větví u každé rostliny. Větve, které byly do každého počítání zahrnuty, musely ze stonku vyrůstat těsně na úrovni roviny půdy v květináči nebo pod ní. To proto, že takové větve byly chápány jako umožňující expanzivní růst do šířky. Kratší větve, které vyrůstaly na stonku výše nad úrovní půdy, započítávány nebyly. Tyto větve obvykle nebyly delší než 5 cm. Ke konci léta byla též sbírána zralá semena z jednotlivých odkvetlých rostlin a skladována v označených papírových sáčcích. Sklizení rostlin proběhlo v polovině října 2013. Všechny rostliny vikve i sveřepu byly vyndány z květináčů a byla odstrážena jejich nadzemní biomasa. U vikví byla opět změřena nejdelší větev a stanoven počet větví (čas 4). Nadzemní biomasa každé rostliny jednotlivě byla následně umístěna do označeného papírového sáčku. Sáčky pak byly umístěny do sušárny na 60 °C na 5 dní, aby se biomasa zcela vysušila. Sušená biomasa byla druhý den po vyjmutí ze sušárny vážena na analytické váze.

Vzhledem k tomu, že několik dnů před sklizením rostlin přišlo náhle přechodně mrazivé počasí, většina rostlin vikve měla v době sklizně větve již odumřelé. Proto i mrtvé větve byly zahrnuty do všech měření. Podzemní biomasu se bohužel nepodařilo získat, protože kořeny sveřepu byly prorostlé s kořeny vikve do té míry, že nebylo možné je od sebe úspěšně oddělit.

## 2.6 Genetická vzdálenost populací

Ve třetí části mé práce je testováno, zda lze porovnáním vybraných genetických markerů určit konkrétní oblast, resp. populaci v původním areálu *Vicia cracca*, ze které byl tento druh zavlečen do Severní Ameriky. Správná identifikace zdrojové populace invazních druhů je totiž předpokladem pro nalezení faktorů, které jsou za tyto invaze zodpovědné (Lombaert *et al.* 2011).

Fylogenetické metody jsou vhodným nástrojem jak studovat vztahy organismů. Molekulární fylogenetická analýza je jednou z nejdůležitějších metod nejen pro srovnávací analýzy mezi organismy (Harvey & Pagel 1991), ale i pro studium evoluce genů (Nei & Takezaki 2008). Fylogenetický strom je možné použít též pro klasifikaci rodin genů (Misawa & Tajima 2000). Determinovat evoluční vzdálenost je velmi důležité pro správnou rekonstrukci fylogenetického stromu (Misawa & Tajima 2012). Na základě výsledků sekvenování vybraných úseků DNA byl v této práci proveden výpočet genetické vzdálenosti populací a z těchto dat byl pak sestaven fylogenetický strom, jako například v práci od Plut *et al.* (2011). Všechny laboratorní postupy byly prováděny v laboratořích Populační genetiky v Průhonicích (Praha, Česká republika).

### Izolace DNA

K dispozici byly živé rostliny z Aljašky a New Yorku, vypěstované v předchozím experimentu, rostliny z Ontaria (uchovány v silikagelu), DNA z rostlin z 27 různých populací z Evropy a jedna z Gruzie. Již izolovanou DNA evropských rostlin a gruzijské rostliny pro mé účely laskavě poskytla Mgr. Anežka Eliášová, která se věnuje fylogenetickým vztahům evropských populací *V. cracca*.

DNA ze živých i sušených rostlin byla izolována podle protokolu Štorchová *et al.* (2000). Konkrétní postup obsahuje oproti původnímu protokolu mírné úpravy z důvodu optimalizace izolace DNA z rostlin *V. cracca* při dostupných laboratorních podmínkách. Použité chemikálie a pufrы jsou uvedeny v tabulce 2 a 3. Čerstvý rostlinný materiál byl vložen do třecí misky a bylo k němu přilito malé množství tekutého dusíku. Následně materiál byl rozdrcen na prášek a bylo přidáno 1,3 ml extrakčního pufru. Pokud byl k dispozici suchý materiál, pomocí pinzety byl vložen do 1,5ml zkumavky spolu s magnetickou kuličkou. Zkumavka byla umístěna do Tissue Lyseru II (Qiagen) a materiál

byl rozdrčen při frekvenci 30 kmitů/s po dobu 1 min. K rostlinnému materiálu bylo poté přidáno 100 ml 0,5M EDTA a 5 mg PVP. Další postup byl pro oba typy vzorků stejný. Suspenze byla inkubovaná 20 minut při teplotě 25°C. Poté centrifugována 5 min při 7000 rpm. Horní vodná fáze (supernatant) byla odlita a k peletu přidáno 0,3 ml extrakčního pufru, 0,3 ml lyzačního pufru a 2 µl RNázy A. Vzniklá směs byla homogenizována. Vzorek byl následně inkubován v termobloku 15 min při 65 °C. Po prvních 3-5 minutách byla zkumavka lehce protřepána. K suspenzi bylo poté přidáno za použití filtrových špiček 0,64 ml směsi chloroform:isoamylalkohol (24:1) a zkumavka byla po dobu 1 min v ruce přetřepávána. Následovala centrifugace 10 min při 9000 rpm. Bezprostředně poté byla odebrána horní vodná fáze do nové zkumavky, ke které byl přidán isopropanol vychlazený na -20°C v objemu 2/3 vzorku. Vzniklá směs byla promíchána a umístěná na 60 min až 8 hodin do -20°C. Dále byla směs centrifugována 15 min při 13 000 rpm a při teplotě 4 °C. Supernatant byl odlit a k peletu bylo přidáno 0,7 ml 80% etanolu. Obracením v ruce po dobu 1 min byla směs opět promíchána. Následovala centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Supernatant byl opět opatrně odlit a pelet ponechán vyschnout na vzduchu. K vyschlému peletu bylo přidáno 40 µl ddH<sub>2</sub>O a vzorek byl ponechán při 60 °C po dobu 1h. Kvalita a kvantita získané DNA byla stanovena pomocí NanoDropu 2000 (Thermo Scientific). Taktéž byla provedena vizuální kontrola produktů na agarózovém gelu. Pro přípravu gelu bylo odváženo 0,53 g agarózy, která byla smíchána s 35 ml TAE pufru (výsledkem byl 1,5% roztok agarózy). Roztok byl následně přiveden k varu v mikrovlnné troubě. Roztok byl dále doplněn destilovanou vodou do původního objemu 35 ml. Po vychladnutí na cca 50 °C byl roztok nalit do formy pro elektroforézu. Roztok agarózy byl před nalitím do formy obarven 1 µl roztoku ethidium bromidu. Pro vytvoření jamek byl na formu umístěn plastový hřebínek. Roztok byl poté ponechán 15 minut při 25 °C, aby došlo k jeho ztuhnutí. K 5 µl každého vzorku izolované DNA bylo přidáno 1 µl barviva 6X DNA Loading Dye (bromophenol blue a xylene cyanol FF). Po ztuhnutí byl gel umístěn do elektroforetické vany, naplněné TAE pufrem a hřebínek byl odebrán. Do vytvořených jamek byly napipetovány připravené obarvené vzorky DNA. Do krajní jamky gelu byly pipetou nadávkovány 4,5 µl markeru GeneRuler Express DNA Ladder. Elektroforéza proběhla při stálém napětí 100 V po dobu 20 minut. Pokud byl na gelu po osvětlení UV světlem ( $\lambda=302$  nm) viditelný produkt, mohl být vzorek izolované DNA dále použit.

### Výběr vhodných úseků k fylogenetické analýze

Pro účely srovnání cytotypů bylo vybráno několik úseků DNA a odpovídajících primerů. Primery byly dodány firmou Sigma-Aldrich. Markery, které byly testovány, jsou: *atpI-H* (Shaw *et al.* 2007), *matK* (Wojciechowski *et al.* 2004), *rbcL* (Sulaiman *et al.* 2003), *rpoC1* (Domenech *et al.* 2014), CNGC4, FENR, GLNA, SUSY, ACCO, SAT, tRPP, CDC2, CPOX2, HATPS, PTDT, DSI (Choi *et al.* 2006), *trnL-trnL-trnF* (Taberlet *et al.* 1991) a ITS (oblast ITS1, 5.8S rDNA, ITS2; White *et al.* 1990). Jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce 4.

### PCR amplifikace a sekvenace vybraných úseků

Pro amplifikaci *rbcL*, *matK*, *rpoC1*, *trnL-trnL-trnF*, ITS, DSI, *atpI-H*, CDC2, CNGC4, PTDT, SAT, FENR, HATPS a GLNA bylo použito na přípravu vzorků 5  $\mu$ l reakční směsi QIAGEN Multiplex PCR Kit, po 0,5  $\mu$ l od obou primerů, 0,5  $\mu$ l DNA a 3,5  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O. Pro CPOX2 5  $\mu$ l reakční směsi QIAGEN Multiplex PCR Kit, po 0,5  $\mu$ l od obou primerů, 0,25  $\mu$ l DNA a 4  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O. Pro tRPP pak 5  $\mu$ l reakční směsi QIAGEN Multiplex PCR Kit, po 0,5  $\mu$ l od obou primerů, 0,2  $\mu$ l DNA a 3,8  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O. Pro vybrané useky byl optimalizován jak postup přípravy samotného vzorku, tak program pro PCR.

Vzorky byly následně purifikovány pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) a poté osekvenovány komerční firmou (SEQme, Dobříš). U regionů, jejichž délka nepřesahuje 500 bp bylo vlákno sekvenováno pouze z forward směru sekvence. Delší úseky bylo nutné sekvenovat z obou směrů.

### Hodnocení variability sekvencí

Z výsledných chromatogramů byla hodnocena míra polymorfismu pro každý typ markeru, tj. zda mají jedinci z různých populací v dané sekvenci nukleotidové záměny, delece či inserce. Pro stanovení vhodnosti hodnocených markerů na vnitropopulační úrovni bylo osekvenováno deset jedinců z geograficky vzdálených populací. Vzorky byly připravené stejným způsobem, jako je popsáno výše.

### Sekvenace markerů s dostatečným polymorfismem

Pro primery markerů ITS, DSI a tRPP byl vytvořen vzorek v kombinaci s DNA ze všech sedmadvaceti evropských rostlin (2x i 4x), dvanácti kanadských (4x), dvou

aljašských (4x), jedné newyorské rostliny (4x) a jedné asijské (4x). Sekvence *atpI*-H regionu pro evropské rostliny byly k dispozici již osekvenované (poskytnuty od A. Eliášové) a proto byly vytvořeny vzorky pouze s DNA jedinců z ostatních lokalit. Produkty byly následně osekvenovány. Výsledné sekvence byly manuálně kontrolovány a vyhodnoceny.

Tabulka 2. Seznam použitých chemikálií.

Komerční název	Výrobce	Čistota
Tris (hydroxymethylaminomethane)	Penta	p.a.
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)	Penta	p.a.
NaCl	Penta	p.a.
Chloroform	Penta	p.a.
Isoamylalkohol	Penta	p.a.
Ethanol	Penta	p.a.
RNáza A (100mg/ml)	Qiagen	
CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromid)	Serva	crystal pure
Agarosa for routine use	Sigma-Aldrich	≤ 10 % vlhkosti
Sorbitol	Sigma-Aldrich	≥ 98%
β-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich	≥ 99%
Fenol	Sigma-Aldrich	≥ 99%
PVP (polyvinylpyrrolidon)	Sigma-Aldrich	~ 100 μm částice
Ethidium bromid	Sigma-Aldrich	≥ 95%
dNTP mix 10mM	Thermo Scientific	
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Thermo Scientific	
10x Taq Buffer with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Thermo Scientific	
Taq polymerase without MgCl <sub>2</sub> (5U/μl)	Thermo Scientific	
6X DNA Loading Dye	Thermo Scientific	

Tabulka 3. Roztoky a pufrы použité pro práci s DNA.

Název	Chemikálie	Výsledné pH
EP (extrakční pufr)	0,1M Tris-HCl pH 7,5 0,005M EDTA pH 8 0,35M Sorbitol 10mM β-merkaptoethanol /0,1%/	8
LP (lyzační pufr)	0,1M Tris-HCl pH 7,5 0,05M EDTA pH 8 2M NaCl CTAB /2%/	8
TE pufr	dd H <sub>2</sub> O 10mM Tris-HCl pH 8 1mM EDTA pH 8	8
TAE (tris-acetát-EDTA pufr)	40mM Tris, 1mM EDTA 20mM 99,8% kys. octová	7,5

#### Komerční soupravy

QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen) - hotová reakční směs pro PCR

GeneRuler Express DNA Ladder (Thermo Scientific) - velikostní standard (100 – 5000 bp)

GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) - velikostní standard (50 – 1000 bp)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) - přečištění PCR produktů

Tabulka 4. Genetické markery a sekvence primerů, které byly v této práci testovány.

Marker	Funkce	Typ	Sekvence forward primeru	Sekvence reverse primeru
<i>atpI-H</i>	Plastid ATP synthase complex, 4th subunit	cpDNA	TATTTACAAGYGGTATTCAAGCT	CCAA YCCAGCAGCAATAAC
<i>matK</i>	Megakaryocyte-associated tyrosine kinase	cpDNA	C TTGTTTGRCTNTATCGCACTATG	CTTTTGTGTTCCGAGCYAAAAGTTC
<i>rbcL</i>	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	cpDNA	TCTGTTACTAACATGTTACTTTC	TCCCTCATTACGAGCTTGTACACA
<i>rpoC1</i>	The gamma subunit of cyanobacterial RNA polymerase	cpDNA	GTGGATACACTTCTTGATAAATGG	CCATAAGCATAATCTTGAGTTGG
<i>trnL-trnL-trnF</i>	Leucyl-tRNA	cpDNA	CGAAATCGGTAGACGCTACG	ATTTGAACTGGTGACACGAG
<i>ACCO</i>	ACC oxidase	nrDNA	GAAGATGGCGCAAAAAGAAAGT	CGATGTGTGTGTCATCTCGTTAAGTTCCTT
<i>CDC2</i>	Purative cdc2 kinase	nrDNA	CAACTTTGCAAGGGTGTGCTTCT	ACTAACACCTGGCCACACATCTTCA
<i>CNGC4</i>	CNGC4-like protein	nrDNA	AGAGATGAGAATCAAGAGGGGATGCA	CATGATGAAGAGCAATTCGTCCACTGGA
<i>CPOX2</i>	Cationic peroxidase 2	nrDNA	GATAATGGCCTTGTTATGAAITACTACA	GCTCAGACAAGCTTCTTCTTGTGGA
<i>DSI</i>	Disulfide isomerase P5 precursor	nrDNA	GAAGCCAAAAAGTATGAAGGGCCACGCAC	CATGGTGCATAAAAACCTCAACCAAGACATC
<i>FENR</i>	Ferredoxin NADP reductase	nrDNA	ATGCTTATGCCAAAAGATCCAAATGC	CTCACAGCAAAAGTCGAGCCCTGAAAGT
<i>GLNA</i>	Glutamine synthetase	nrDNA	GAATGGTGTGGTGTCTCACACA	TGGTGGTGTCTGCAATCATGGAAAG
<i>HATPS</i>	p-type H+-ATPase	nrDNA	TGAGTGGCAAGGCTTGGAAACAAATCT	TCAGCTTCAACCACACAGATTCAACATGTC
<i>ITS</i>	ITS gene region	nrDNA	GGAAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>PTDT</i>	Plastidic ATP/ADP-transporter	nrDNA	GCAACTGGAATTGCTACATTCATAATGA	CGAATAAAACTGTACTTAGCACTCTTGC
<i>SAT</i>	Sulfate adenylyltransferase	nrDNA	GTATCATGATGGACTTGTATCTTTCGTC	AGCCTTTGCATGCCACTGCACCTCA
<i>SUSY</i>	Sucrose synthase	nrDNA	TCGCAATGAACCCACACAGATTTC	GTCCAACTTGGCCATGGTGAAGATA
<i>tRPP</i>	tRNA-processing protein SEN3-like	nrDNA	TGAACTATGATCTGAAATCTCCAAAAGT	AGATGCAATTTTCAGCATTAGCCCTTCTG

### 3. Analýza dat

Vliv typu rostliny (evropské diploidní rostliny = 2xE, evropské tetraploidní rostliny = 4xE, tetraploidní rostliny z New Yorku = 4xN a tetraploidní rostliny z Aljašky = 4xA) a populace na klíčivost semen a výšku semenáčků byl testován pomocí zobecněného lineárního modelu (GLM) za předpokladu, že hodnoty mají v případě klíčivosti binomické, u výšky semenáčků Gaussovo rozložení.

Dále byl testován vliv ošetření, typu rostliny, populace a také interakcí těchto proměnných na počet větví a výšku rostlin *V. cracca*. Pro počet větví v časech 2-4 byl použit GLM za předpokladu Poissonova rozložení hodnot. Jako kovariáta byl dán počet větví v čase 1. Při testování výšky rostlin v časech 2-4 byl použit GLM za předpokladu Gaussova rozložení dat. Jako kovariáta byla použita výška rostlin v čase 1.

Vliv typu rostliny, ošetření a populace na kvetení rostlin byl testován také za použití GLM a to za předpokladu, že zjištěné hodnoty mají binomické rozložení. Vliv stejných proměnných na počet semen, který kvetoucí rostlin vytvořily, byl hodnocen pomocí GLM za předpokladu, že hodnoty mají Poissonovo rozložení. Jako kovariáta byla v obou případech použita výška rostlin vynásobená počtem větví v čase 1. V modelu byla zahrnuta také interakce typu rostliny a ošetření.

Vliv typu rostliny, ošetření, populace a váhy sušiny nadzemní biomasy *B. erectus* na váhu sušiny nadzemní biomasy vikve byl testován za použití vícecestné ANOVy. Všechny analýzy výše byly provedeny v programu R x64 3.1.0.

K alignmentu sekvencí byl použit MAFFT 7.017 (Kato *et al.* 2002), který je součástí programu Geneious 6.1.7. Fylogenetická analýza zahrnovala sekvence chloroplastového *atpI-H* úseku a sekvence jaderných DSI, ITS a tRPP úseků. K bayesiánské analýze byl použitý program MrBayes vers. 3.2.2. (Ronquist *et al.* 2012). Zvoleným modelem byl GTR +  $\Gamma$ + I model s možností šesti typů substitucí ( $n = 6$ ) s podílem nevariabilních pozic. Program vygeneroval 2,5 milionu generací s celkovým počtem 2501 fylogenetických stromů. Prvních 25% stromů bylo odstraněno a byl získán výsledný fylogenetický strom. Metoda maximalní pravděpodobnosti (MP) byla provedena programem PhyML 3.0., který je rovněž součástí programu Geneious 6.1.7. Pro rekonstrukci MP stromu byly použity nearest neighbor interchanges (NNIs) a subtree

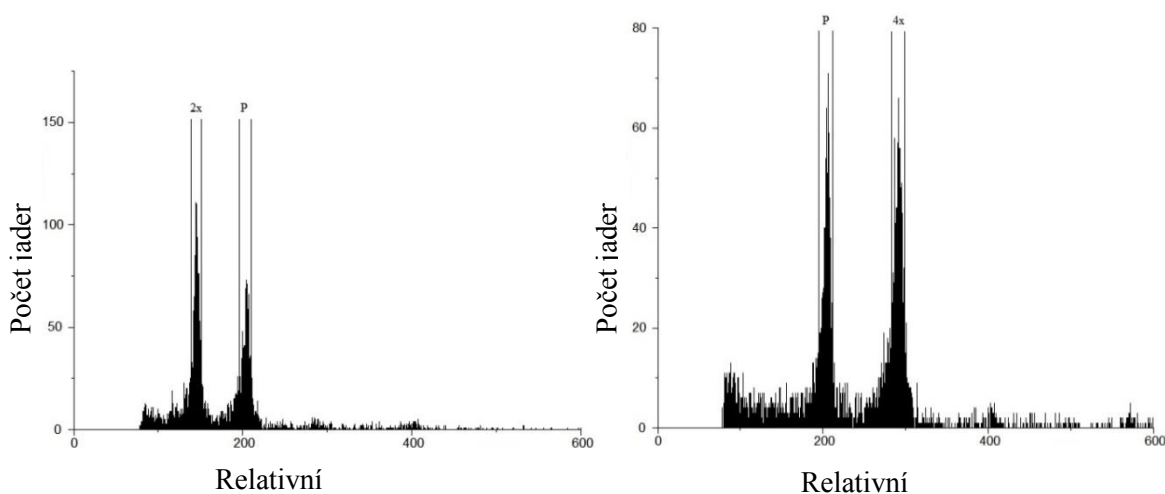


pruning and regrafting (SPR) algoritmy. Podpora zjištěné topologie fylogenetického stromu byla určena pomocí bootstrap analýzy opakované 100x.

## 4. Výsledky

### 4.1 Rozšíření cytotypů *Vicia cracca* ve druhotně osídleném areálu

Z výsledků měření stupně ploidie několika jedinců z každé invazní populace je patrné, že v Severní Americe se vyskytují pouze tetraploidní rostliny *V. cracca*, a to jak v populacích z Aljašky, tak v populacích získaných z New Yorku i z Ontaria. Vzorový graf z průtokového cytometru pro tyto populace viz obrázek 3.



Obrázek 3. Histogram relativní fluorescence diploidů (2x) a tetraploidů (4x) *Vicia cracca*. P = referenční standard (*Pisum sativum* ‘Ctirad’). Jádra všech rostlin byla po izolování obarvena DAPI.

### 4.2 Klíčivost a výška semenáčků

Klíčivost se mezi jednotlivými typy lišila,  $P < 0,001$  (Tabulka 5). Byla průkazně ovlivněna typem rostliny i populací (Tabulka 6). Největší procento semen vyklíčilo u diploidních rostlin z původního areálu výskytu druhu, tedy z Evropy. Nejméně pak vyklíčilo tetraploidních semen z New Yorku. Tetraploidní semena z Evropy a Aljašky měla klíčivost podobnou. Oproti rostlinám z New Yorku pak byla klíčivost těchto dvou skupin

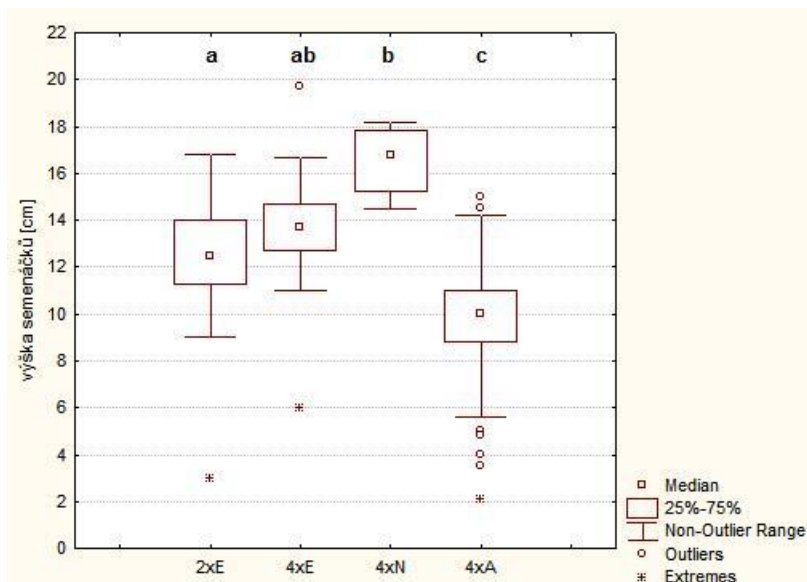
semen vyšší, zatímco ve srovnání s evropskými diploidními semeny byla naopak nižší. Stejně šance na vyklíčení měla pouze semena tetraploidů z New Yorku a tetraploidní semena z Evropy,  $P = 0,551$  (Tabulka 5). Výška semenáčků byla průkazně ovlivněna typem rostliny, ale nelišila se mezi populacemi (Tabulka 6). Nejvyšší semenáčky měly rostliny z New Yorku, nejmenší naopak u rostlin pocházejících ze semen z Aljašky. Výšky evropských rostlin byly velmi podobné (Graf 1).

Tabulka 5. Procentuální klíčivost semen jednotlivých typů a prokazatelnost rozdílů v klíčivosti u těchto typů. Řádky se stejným písmenem nejsou průkazně odlišné ( $p > 0.05$ ).

Místo původu	Ploidie	Počet semen zasazených	Klíčivost %	Rozdílnost klíčivosti
Evropa	2x	638	63,17	a
Evropa	4x	240	55,42	ab
Aljaška	4x	2107	53,16	b
New York	4x	473	33,40	c

Tabulka 6. Vliv typu rostliny a populace na klíčivost a výšku semenáčků.

	Klíčivost			Výška semenáčků		
	Df	F	P	Df	F	P
typ	4	32,064	< <b>0,001</b>	3	13,792	< <b>0,001</b>
populace	15	3,343	< <b>0,001</b>	17	1,258	0,258
residuals	161			160		



Graf 1. Boxplot. Výška semenáčků ve skupinách podle typu rostliny. Typy označené stejným písmenem se od sebe průkazně neliší.

### 4.3 Růstový pokus

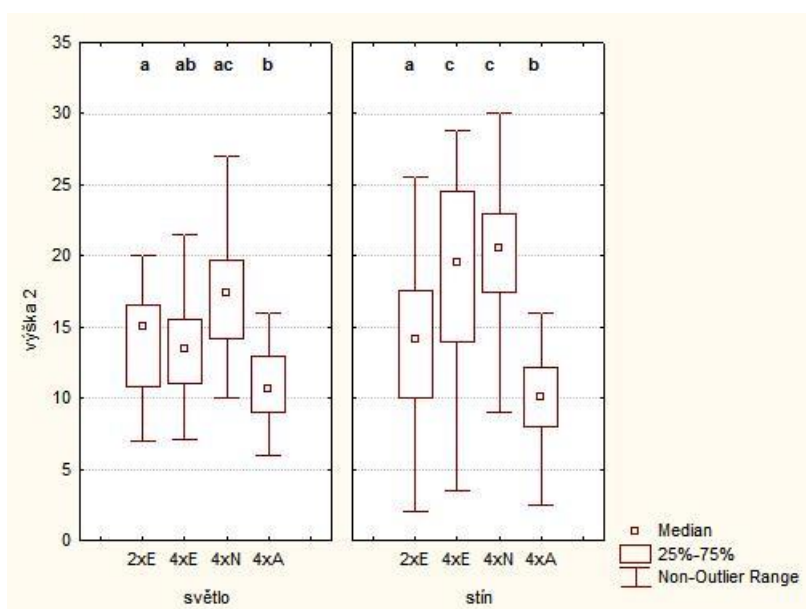
#### Výška rostlin

Výška rostlin v pokusu byla ve všech měřeních (čas 2, 3 a 4) průkazně ovlivněna výškou rostlin na počátku pokusu (čas 1) a typem rostliny. Výška v čase 2 a 4 byla pak průkazně ovlivněna také ošetřením. Průkazná byla interakce mezi typem rostliny a ošetřením a to při všech měřeních. Žádný vliv neměla lokalita původu semen (Tabulka 7). Výška rostlin je tedy ovlivněna jak typem rostliny, tak způsobem ošetření. Ve většině případů jsou vyšší rostliny ty, které byly umístěné ve stínu. Výjimky tvoří rostliny 4xA v čase 2, 4xN v čase 3 a 4xN a 4xE v čase 4, kdy jsou o něco vyšší rostliny umístěné na plném světle. Průkazný rozdíl v rámci těchto výjimek ve výškách mezi rostlinami na světle a ve stínu je ale pouze u 4xN v čase 3. Nejvyšší jsou obecně rostliny 4xN z obou ošetření, kromě situace v čase 3, kdy jsou rostliny tohoto typu, ze skupiny umístěné ve stínu, až druhé nejvyšší po rostlinách 4xE, umístěných taktéž ve stínu. Rozdíl mezi nimi ale není statisticky významný. Co se týká rostlin 4xE, dalo by se říct, že rostliny umístěné na světle s postupem času svojí výškou převýší rostliny 2xE, taktéž umístěné na světle. Ve stínu je trend opačný, 2xE postupně převyšují rostliny 4xE. Kromě typu 4xA, který má v obou ošetřeních vždy nejmenší výšku ze všech typů rostlin, je tedy vidět, že výška je mnohem

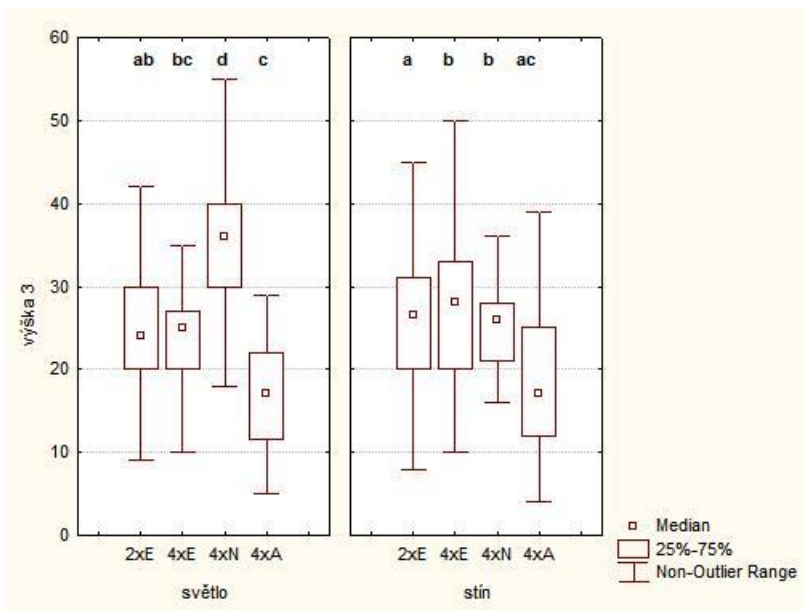
variabilnější, než počet větví. Grafy 2-4 ukazují průměrnou výšku rostlin všech typů na světle a ve stínu v jednotlivých časech měření. Graf 5 znázorňuje vývoj výšky rostlin v průběhu času.

Tabulka 7. Vliv vybraných faktorů na výšku rostlin v časech 2, 3 a 4. Zvýrazněné hodnoty značí prokazatelný vliv.

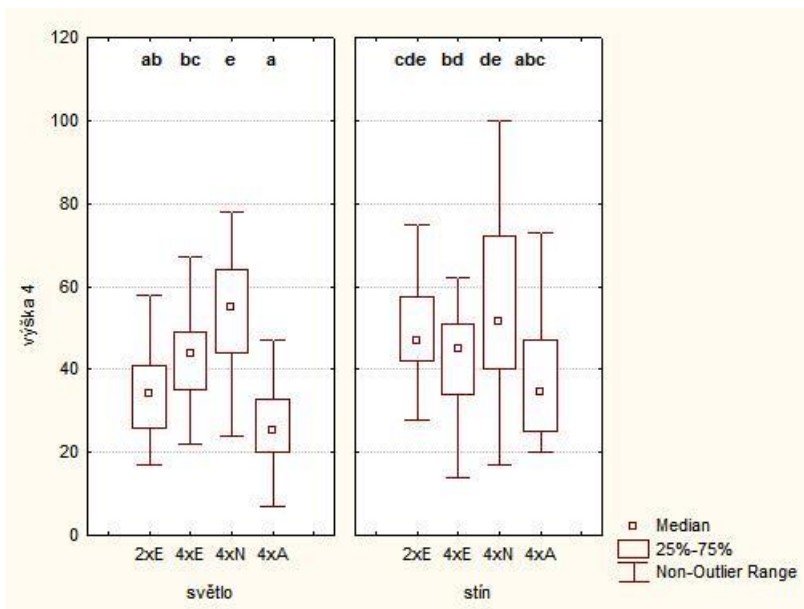
	Čas 2			Čas 3			Čas 4		
	Df	F	P	Df	F	P	Df	F	P
výška 1	1	173,623	< <b>0,001</b>	1	52,008	< <b>0,001</b>	1	62,127	< <b>0,001</b>
typ	3	15,960	< <b>0,001</b>	3	11,664	< <b>0,001</b>	3	7,636	< <b>0,001</b>
ošetření	1	12,628	< <b>0,001</b>	1	0,535	0,466	1	9,321	<b>0,003</b>
populace	9	1,753	0,079	9	1,344	0,217	9	0,488	0,882
typ:ošetření	3	4,616	<b>0,004</b>	3	6,175	< <b>0,001</b>	3	4,586	<b>0,004</b>
ošetření:populace	9	1,342	0,218	9	0,457	0,902	9	1,328	0,225
residuals	193			185			186		



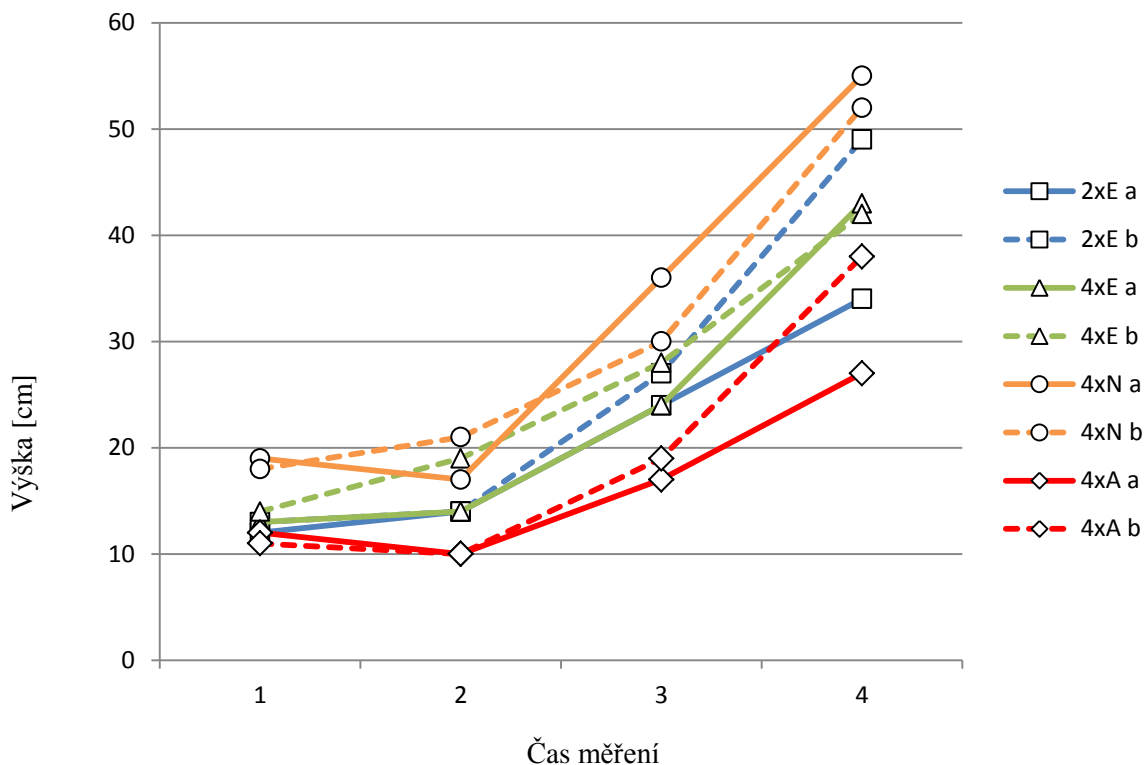
Graf 2. Boxplot. Výška v čase 2 u rostlin na světle a ve stínu. Typy označené stejným písmenem se od sebe průkazně neliší,  $P > 0,05$ .



Graf 3. Boxplot. Výška v čase 3 u rostlin na světle a ve stínu. Typy označené stejným písmenem se od sebe průkazně neliší,  $P > 0,05$ .



Graf 4. Boxplot. Výška v čase 4 u rostlin na světle a ve stínu. Typy označené stejným písmenem se od sebe průkazně neliší,  $P > 0,05$ .



Graf 5. Vývoj výšky rostlin jednotlivých typů v průběhu pokusu. Označení a = rostliny na světle, b = rostliny ve stínu.

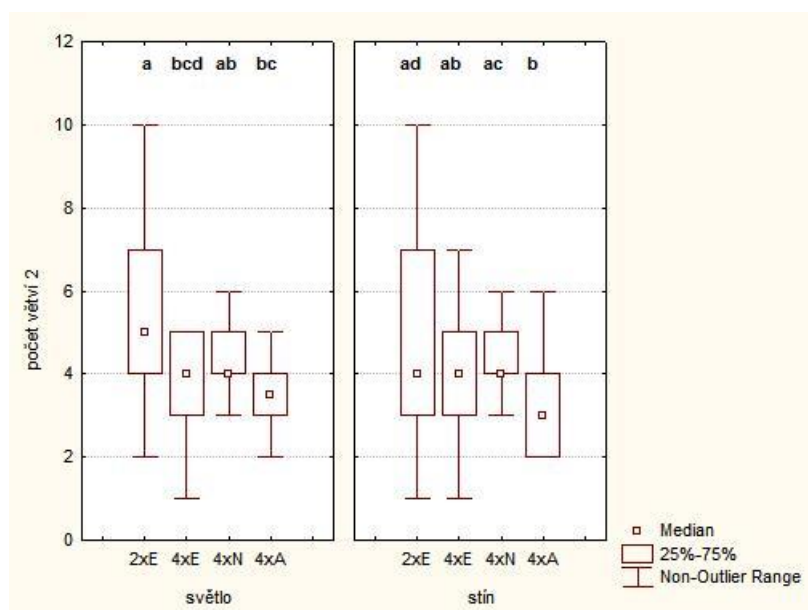
#### Počet větví

Počet větví v pokusu byl ve všech měřeních (čas 2, 3 a 4) průkazně ovlivněn počtem větví na počátku pokusu (čas 1) a typem rostliny. Počet větví v čase 3 a 4 byl průkazně ovlivněn také ošetřením a lokalitou. Interakce mezi typem rostliny a ošetřením nebyla v žádném měření průkazná (Tabulka 8). Počet větví je obecně u všech typů větší u rostlin umístěných na světle. Tento trend je jen mírně narušen u typů 4xE a 4xN v čase 2, kdy mají více větví rostliny ve stínu, nicméně tento rozdíl není statisticky významný. Rozdíl v celkovém počtu větví mezi rostlinami na světle a ve stínu se navíc s postupujícím časem u všech typů zvyšuje. V časech 2 a 4 mají nejvíce větví rostliny z obou ošetření u typu 2xE, následované typem 4xN (též z obou ošetření), který má větví o něco méně a dále 4xE (rovněž obě ošetření). V čase 3 se výsledky poněkud liší. Nejvíce větví je u rostlin 4xN (obě ošetření), o něco méně pak u rostlin typu 4xE umístěných na slunci, 2xE umístěných na slunci, 2xE ve stínu a 4xE ve stínu. Nejméně větví, a to ve všech časech a v obou ošetřeních, mají rostliny 4xA. Grafy 6-8 ukazují průměrný počet větví rostlin všech typů na

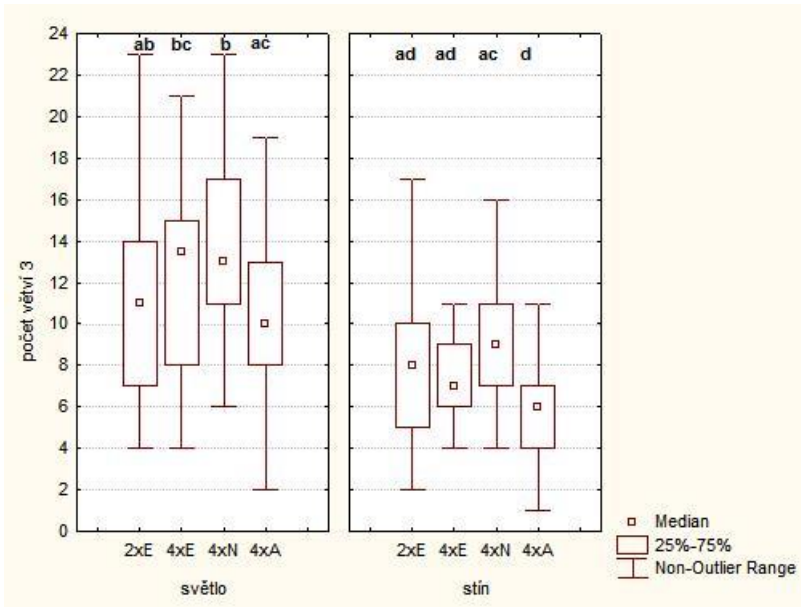
světla a ve stínu v jednotlivých časech měření. Graf 9 znázorňuje vývoj počtu větví rostlin v průběhu času.

Tabulka 8. Vliv vybraných faktorů na počet větví v časech 2, 3 a 4. Zvýrazněné hodnoty značí prokazatelný vliv.

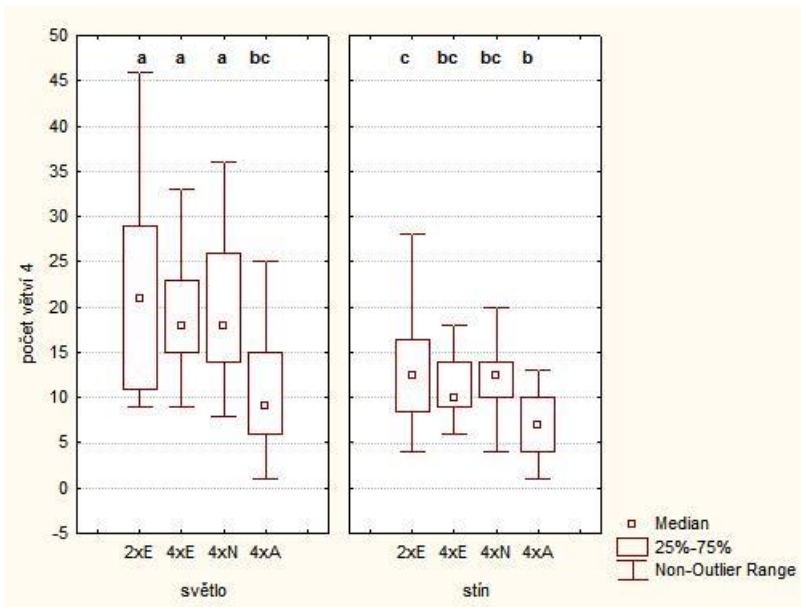
	Čas 2			Čas 3			Čas 4		
	Df	Deviance	P	Df	Deviance	P	Df	Deviance	P
počet větví 1	1	55,359	< <b>0,001</b>	1	19,669	< <b>0,001</b>	1	62,387	< <b>0,001</b>
typ	3	9,969	<b>0,019</b>	3	28,397	< <b>0,001</b>	3	143,300	< <b>0,001</b>
ošetření	1	0,913	0,339	1	101,019	< <b>0,001</b>	1	190,687	< <b>0,001</b>
populace	9	11,414	0,248	9	21,854	<b>0,009</b>	9	28,059	< <b>0,001</b>
typ:ošetření	3	3,323	0,344	3	2,760	0,430	3	3,765	0,288
ošetření:populace	9	7,187	0,618	9	15,442	0,079	9	20,354	<b>0,016</b>
residuals	193	80,057		185	258,87		186	522,40	



Graf 6. Boxplot. Počet větví v čase 2 u rostlin na světle a ve stínu. Typy označené stejným písmenem se od sebe průkazně neliší,  $P > 0,05$ .

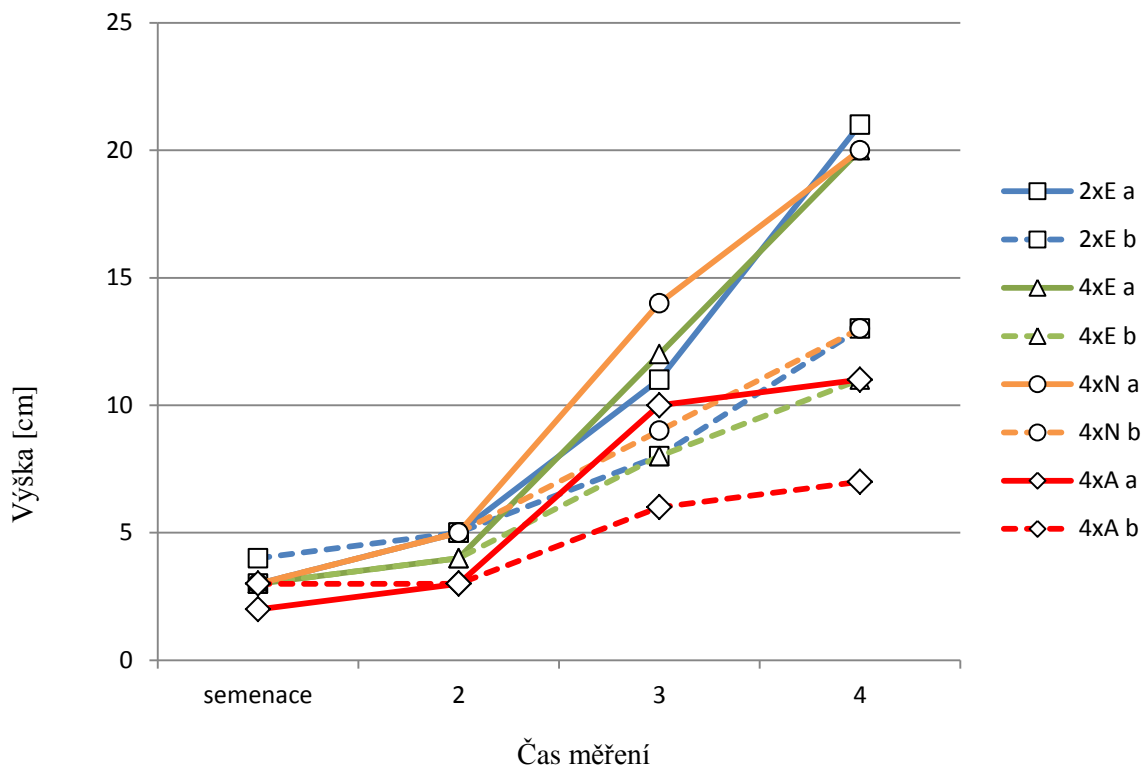


Graf 7. Boxplot. Počet větví v čase 3 u rostlin na světle a ve stínu. Typy označené stejným písmenem se od sebe průkazně neliší,  $P > 0,05$ .



Graf 8. Boxplot. Počet větví v čase 4 u rostlin na světle a ve stínu. Typy označené stejným písmenem se od sebe průkazně neliší,  $P > 0,05$ .





Graf 9. Vývoj počtu větví rostlin jednotlivých typů v průběhu pokusu. Označení a = rostliny na světle, b = rostliny ve stínu.

### Kvetení a počet semen

Kvetení rostlin i počet následně vytvořených semen bylo průkazně ovlivněno výškou rostlin a počtem větví na počátku pokusu (čas 1) a také typem rostliny. Průkazný vliv mělo pak zejména ošetření. Žádný vliv neměla lokalita původu semen (Tabulka 9). Ze skupiny rostlin umístěné pod stínící textilií nevytvořila květy ani jedna rostlina. Ve skupině umístěné na plném světle kvetly pouze některé rostliny z evropských a newyorských populací. Z výsledků je patrný velký vliv typu rostliny na kvetení, což odpovídá tomu, že květy vytvořily pouze tři ze čtyř rostlinných typů a v rámci typů kvetlo různé množství rostlin. Největší podíl kvetoucích rostlin byl mezi rostlinami z New Yorku. Méně rostlin s květy měly pak evropské tetraploidní rostliny a diploidi. Aljašské rostliny neměly květy vůbec. Významně větší počet kvetoucích rostlin, oproti ostatním typům, byl mezi newyorskými tetraploidy. Všechny kvetoucí rostliny následně vytvořily semena. Počet semen vytvořených rostlinami na plném světle opět silně závisel na typu, kdy newyorské

rostliny měly výrazně vyšší průměrný počet semen na jednu kvetoucí rostlinu, než rostliny evropské obou cytotypů. Nejméně semen pak měly rostliny diploidní (Tabulka 10).

Tabulka 9. Vliv vybraných faktorů na kvetení rostlin a počet semen vytvořených v rámci jednotlivých typů rostlin.

	Kvetení			Počet semen		
	Df	F	P	Df	Deviance	P
větve1*výška1	1	13,168	< <b>0,001</b>	1	2859,3	< <b>0,001</b>
typ	3	6,624	< <b>0,001</b>	3	1365,4	<b>0,011</b>
ošetření	2	24,316	< <b>0,001</b>	1	2246,3	< <b>0,001</b>
populace	9	1,432	0,168	9	745,4	0,729
typ:ošetření	2	-		3	3521,4	< <b>0,001</b>
residuals	214			214	26116	

Tabulka 10. Procento kvetoucích rostlin pro jednotlivé typy a průměrný počet semen vytvořených jednou kvetoucí rostlinou.

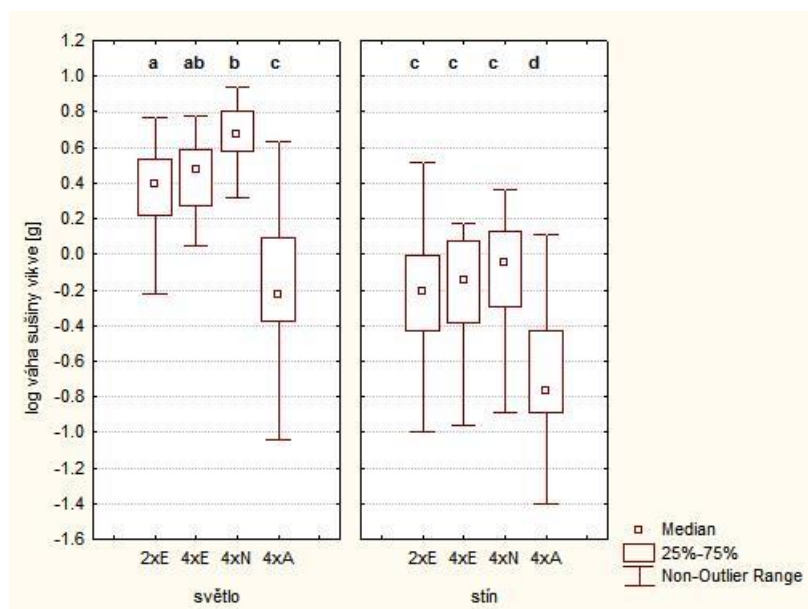
Původ	Ploidie	Kvetoucí rostliny [%]		Průměrný počet semen na jednu kvetoucí rostlinu	
		Světlo	Stín	Světlo	Stín
Evropa	2x	19,35	0	7,83	0
Evropa	4x	25	0	18,8	0
New York	4x	63,33	0	30,63	0
Aljaška	4x	0	0	0	0

### Množství nadzemní biomasy

Množství biomasy nadzemní části rostlin *V. cracca* (resp. její sušiny) bylo průkazně ovlivněno typem rostliny, ošetřením i populací. Průkazně vyšla i interakce typu rostliny a ošetření, tzn rozdíly mezi typy rostlin, jsou různé v závislosti na ošetření. Naopak množství biomasy *B. erectus* nemělo na výsledné množství biomasy *V. cracca* žádný vliv (Tabulka 11). Průměrná váha sušiny vikve byla nejvyšší u newyorských rostlin v obou ošetřeních. Nejméně sušiny měly vždy aljašské rostliny, opět v obou ošetřeních (Graf 10).

Tabulka 11. Vliv vybraných faktorů na množství nadzemní biomasy rostlin *Vicia cracca*.

	Df	F	P
<i>B.erectus</i>	1	0,153	0,696
typ	3	50,221	< 0,001
ošetření	1	218,441	< 0,001
populace	9	2,812	< 0,001
typ:ošetření	3	24,313	< 0,001
ošetření:populace	9	1,629	0,109
residuals	205		



Graf. 10. Boxplot. Váha sušiny rostlin pěstovaných na světle a ve stínu. Typy označené stejným písmenem se od sebe průkazně neliší,  $P > 0,05$ .

### Přežívání rostlin

Úmrtnost rostlin byla nejvyšší v ošetření B (stín) v rámci diploidů. Naopak rostliny z New Yorku přežily do konce pokusu všechny (Tabulka 12). U evropských tetraploidů uhynulo pět rostlin v každém ošetření a to vždy rostliny v páru, tj. obě od téže mateřské

rostliny. Protože nepřežily ani rostliny nevystavené stresu zastíněním, dá se předpokládat, že obecně potomstvo od těchto mateřských rostlin nebylo příliš životaschopné. Podobné páry uhynulých rostlin byly i u diploidů, v tomto případě ale uhynulo ještě několik rostlin z ošetření ve stínu navíc.

Tabulka 12. Počty rostlin na začátku a na konci pokusu a procentuální úmrtnost v rámci jednotlivých typů.

Původ	Ploidie	Původní počet rostlin		Počet rostlin na konci pokusu		Úmrtnost [%]	
		Světlo	Stín	Světlo	Stín	Světlo	Stín
Evropa	2x	36	36	31	28	13,9	22,22
Evropa	4x	20	20	19	19	5	5
New York	4x	30	30	30	30	0	0
Aljaška	4x	30	30	30	26	0	13,33

#### 4.4 Genetická vzdálenost

Optimalizované postupy PCR pro testované primery jsou uvedeny v tabulce 13.

##### Použitelnost vybraných úseků k fylogenetickým analýzám

Celkem bylo testováno pět chloroplastových a třináct jaderných úseků. Pro fylogenetickou analýzu byl vybrán jeden chloroplastový *atpI-H* úsek a tři jaderné úseky DSI, ITS a tRPP. Tyto úseky byly vybrány na základě poměru délky sekvence a počtu nalezených variabilních míst. Délky sekvencí a množství variabilních míst jsou uvedeny v tabulce 14. Důvody k vyřazení ostatních úseků byly technické a biologické.

Technické důvody: publikované primery nebyly dostatečně specifické pro jedince *V. cracca* a tím pádem nedošlo k amplifikaci DNA a tvorbě PCR produktu (ACCO a SUSY), neuniformní amplifikace (CPOX2) a tvorba více typů produktů (FENR, CNGC4, GLNA). Proto nebyly v další práci dále používány. Biologickým důvodem byla

nedostatečná variabilita v sekvencích testovaných úseků. Po zhodnocení výsledných sekvencí byly pro další práci vybrány tyto markery: *atpI-H*, ITS, DSI a tRPP.

Tabulka 13. Optimalizované postupy PCR. Zvýrazněné markery byly použité pro výslednou fylogenetickou analýzu.

Marker	I. Aktivace HotStarTaq polymerázy		II. Denaturace řetězce		III. Nasedání primerů		IV. Prodlužování řetězce		Počet cyklů II. - IV.	V. Závěrečná elongace	
	[°C]	min	[°C]	s	[°C]	s	[°C]	s		[°C]	s
<b><i>atpI-H</i></b>	<b>95</b>	<b>15</b>	<b>95</b>	<b>30</b>	<b>51</b>	<b>40</b>	<b>72</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>72</b>	<b>10</b>
<i>matK</i>	95	15	95	60	53	60	72	60	32	72	10
<i>rbcL</i>	95	15	95	60	53	60	72	60	32	72	10
<i>rpoC1</i>	95	15	95	20	56	30	72	20	32	72	10
<i>trnL-trnF</i>	95	15	<b>95</b>	<b>20</b>	<b>55</b>	<b>30</b>	<b>72</b>	<b>20</b>	<b>32</b>	72	10
ACCO	95	15	95	60	58	60	72	60	32	72	10
CDC2	95	15	95	20	58	30	72	20	32	72	10
CNGC4	95	15	95	60	59	60	72	60	30	72	10
CPOX2	95	15	95	60	58	60	72	60	32	72	10
<b>DSI</b>	<b>95</b>	<b>15</b>	<b>95</b>	<b>20</b>	<b>51</b>	<b>30</b>	<b>72</b>	<b>20</b>	<b>32</b>	<b>72</b>	<b>10</b>
FENR	95	15	95	30	51	40	72	30	32	72	10
GLNA	95	15	95	30	51	40	72	30	32	72	10
HATPS	95	15	95	20	58	30	72	20	32	72	10
<b>ITS</b>	<b>95</b>	<b>15</b>	<b>95</b>	<b>20</b>	<b>54</b>	<b>30</b>	<b>72</b>	<b>20</b>	<b>32</b>	<b>72</b>	<b>10</b>
PTDT	95	15	95	20	58	30	72	20	32	72	10
SAT	95	15	95	20	51	30	72	20	32	72	10
<b>tRPP</b>	<b>95</b>	<b>15</b>	<b>95</b>	<b>20</b>	<b>49</b>	<b>30</b>	<b>72</b>	<b>20</b>	<b>32</b>	<b>72</b>	<b>10</b>

Tabulka 14. Průměrný počet nalezených variabilních míst pro každý marker. Pokud byly při hodnocení sekvence v nějakém místě mezi sebou odlišné, šlo většinou o záměnu dvou typů nukleotidů, výjimečně pak třech. V několika případech byly nalezeny i inserce či delece jednoho i více nukleotidů v sekvencích některých jedinců. Zvýrazněné markery byly použity pro výslednou fylogenetickou analýzu.

Marker	Délka sekvence bp	Počet variabilních míst
<b><i>atpI-H</i></b>	<b>794</b>	<b>12</b>
<i>matK</i>	670	6
<i>rbcL</i>	700	1
<i>rpoC1</i>	580	5
<i>trnL-trnF</i>	570	0
CDC2	480	4
<b>DSI</b>	<b>263</b>	<b>5</b>
HATPS	400	0
<b>ITS</b>	<b>501</b>	<b>5</b>
PTDT	170	2
SAT	330	2
<b>tRPP</b>	<b>103</b>	<b>8</b>

Pomocí fylogenetické analýzy bylo identifikováno pět skupin. V největší, nerozlišené skupině, je dvaatřicet populací obou ploidií. První rozlišená skupina zahrnuje tetraploidní populace Česka, Gruzie a Maďarska. Podpora této skupiny, zjištěná bayesiánskou analýzou (BA) je velmi silná. Metoda maximální pravděpodobnosti (MP) však tuto skupinu nerozlišila. Druhá skupina zahrnuje diploidní populace Maďarska a Francie a její podpora je velmi silná z obou typů analýz. Třetí vymezená skupina zahrnuje tetraploidní populace Polska a Holandska a diploidní populaci Itálie. BA tuto skupinu podpořila velmi silně, metoda MP Holandskou populaci zařadila k nerozlišené skupině. Podskupina zahrnující tetraploidní populaci Polska a diploidní populaci Itálie je velmi silně podpořena pomocí BA a slabě podpořena metodou MP. Skupina zahrnující invazní tetraploidní populace Aljašky a New Yorku byla podpořena slabě metodou BA a metoda MP tuto skupinu nerozlišila. Obdobné výsledky byly získány i u poslední skupiny zahrnující diploidní populace Bulharska a Srbska.

4x Aljaska1	
4x Aljaska3	
4x NewYork2	
4x Kanada1	
4x Kanada2	
4x Kanada3	
4x Kanada4	
4x Kanada5	
4x Kanada6	
4x Kanada7	
4x Kanada8	
4x Kanada9	
4x Kanada10	
4x Kanada11	
4x Kanada12	
2x Slovensko	
2x Polsko1	
2x VelkaBritanie	
4x Sycarsko	
4x Finsko	
4x Spaineisko	
2x Rumunsko	
2x Chorvatsko	
2x Slovinsko1	
4x Slovinsko2	
2x Rakousko1	
4x Rakousko2	
4x Italie1	
2x Francie2	
4x Francie3	
4x Nemecko	
4x Norsko	
4x Cesko	
4x Gruzie	
4x Madarsko2	
2x Madarsko1	
2x Francie1	
4x Polsko2	
4x Polsko3	
2x Italie2	
4x Holandsko	
4x Aljaska2	
4x NewYork1	
4x Bulharsko	
4x Sibsiko	
	0.935
	0.885
	70
	0.977
	52
	0.759
	0.561
	0.519

Obrázek 4. Konsenzuální fylogenetický strom kombinující chloroplastový *atpI-H* úsek a jaderné DSI, ITS a trPP úseky. Posteriorní pravděpodobnost je uvedena nad větvemi, bootstrap podpora je uvedena pod větvemi. Hodnoty nižší než 50 % nejsou uvedené. U každé oblasti je uvedena ploidy rostlin. Invazní populace jsou kanadské, aljašské a newyorské. Populace označené jako Kanada (1-12) pocházejí z Ontaria.

## 5. Diskuse

### 5.1 Rozšíření cytotypů *Vicia cracca* ve druhotně osídleném areálu

Ze Severní Ameriky, která je pro druh *V. cracca* sekundárním areálem, jsem měla k dispozici rostliny z několika populací v New Yorku, na Aljašce a v Ontariu. Rostliny ze všech těchto populací byly tetraploidní. Protože to byl jediný cytotyp, který jsem mezi nimi našla, připadá v úvahu hypotéza, že pouze tetraploidní rostliny byly právě díky polyploidizaci schopny se po introdukci na nové území přizpůsobit novým podmínkám a obstát v konkurenci s původními druhy, zatímco diploidi se prostě uchytili nedokázali. Samozřejmě je další možnost, že tam byly zavlečeny pouze rostliny tetraploidní a diploidi na území Severní Ameriky nikdy nebyli. Už Rousi (1960) došel ke zjištění, že v severní části Evropy, která bývala v minulosti zaledněna, se vyskytují pouze tetraploidi *V. cracca*, zatímco diploidi jsou nacházeni především na jihu a dále směrem na východ. Takto striktní rozdělení areálů cytotypů v Evropě bylo ukázáno i v práci Eliášová (2008), kde je na základě dostupné literatury o chromozómových číslech rostlin *V. cracca* sestavena ilustrativní mapa jejich výskytu. V Asii jsou pak údajně podle Rousi (1960) pouze diploidi. A protože podle něj i v Severní Americe a na Novém Zélandu byly do té doby nalezeny pouze tetraploidní populace, konstatoval, že tetraploidní rostliny musí mít oproti diploidům lepší kolonizační schopnosti.

Na mnoha případech již bylo ukázáno, že se ve druhotně kolonizovaném areálu vyskytují pouze polyploidní rostliny od určitého druhu, ačkoliv v primárním areálu existuje více variant jeho cytotypů (Te Beest *et al.* 2011). Rozložení cytotypů v původním a invazním areálu bylo sledováno také například u druhu *Oxalis pes-caprae* L. V původním areálu tohoto druhu v jižní Africe se nachází diploidní rostliny, tetraploidní rostliny, kterých je většina (Krejčíková *et al.* 2013) a vzácně pentaploidní rostliny (Ornduff 1987). Castro *et al.* (2007) naproti tomu zkoumal ploidii rostlin na západě Středomoří. Tato oblast je částí sekundárně osídleného areálu druhem *Oxalis pes-caprae* L. Stejně jako Baker (1965), i Castro našel převážně pentaploidní populace, v menším množství pak také tetraploidy. Z výsledků těchto studií je vidět, že zatímco pentaploidní rostliny nebyly ve svém původním areálu výskytu příliš hojné ve srovnání s ostatními cytotypy, v novém areálu se z nich staly velmi úspěšné invazní rostliny. Podle Ornduff (1987) navíc nebyly



tetraploidní rostliny do sekundárního areálu zavlečeny spolu s pentaploidy, ale vznikly ze zavlečených pentaploidů *de novo* pomocí neredukovaných diploidních gamet. Také Treier *et al.* (2009) se zabývali výskytem diploidních a tetraploidních cytotypů *Centaurea maculosa* Lam. Zatímco v Evropě, která je přirozeným areálem tohoto druhu, se vyskytují převážně diploidi, v Severní Americe, do které byl druh zavlečen, jsou dominantní tetraploidi. U tetraploidních populací v Evropě zjistili prokazatelný posun v klimatickém optimu směrem k sušším podmínkám oproti diploidům. U populací tetraploidů v Severní Americe pak byl tento posun ještě výraznější. Tyto populace byly mnohem lépe adaptovány na výrazně sušší severoamerické klima. Všechny tetraploidní rostliny měly také více větvené stonky ve srovnání s diploidy. Do Severní Ameriky tak podle autorů byly sice zavlečeny oba cytotypy, ale invazním se stal díky preadaptacím pouze jeden z nich.

Protože jsem nenalezla žádnou studii, která by ukázala, že v Severní Americe se kromě tetraploidů vyskytují i diploidní populace *V. cracca*, je možné se přiklonit k hypotéze, že na jejím území jsou všechny populace tohoto druhu výhradně tetraploidní. Nicméně přestože *Vicia cracca* roste podle informací *Plants Database* (United States Department of Agriculture) na většině severoamerického území, ploidy rostlin byla měřena jen v populacích v několika málo státech. Aby bylo možné tvrdit, že jsou zde opravdu pouze a jedině tetraploidi, bylo by nutné mít data o ploidii rostlin *V. cracca* z mnohem většího počtu populací napříč celou Severní Amerikou.

## 5.2 Klíčivost a výška semenáčků

K porovnání a interpretaci výsledků klíčivosti semen použiji část výsledků z pokusu od Eliášová & Münzbergová (2014). V jejich pokusu byla použita semena diploidních a tetraploidních rostlin *V. cracca* pocházejících z několika evropských populací. Tato semena byla vyseta do květináčů umístěných v zahradě a ponechána během zimy přirozené skarifikaci půdními částicemi. Klíčivost diploidů po přirozené skarifikaci byla v prvním roce pokusu ve výsledku pouze 3,3%. Klíčivost tetraploidů byla o něco vyšší a to 10,7%. Můžeme ale říci, že klíčivost obou cytotypů byla relativně nízká.

Pro účely mého pokusu byla semena obroušena uměle. Ve výsledku pak nejvíce klíčila diploidní semena 2xE, ačkoliv rozdíl v klíčivosti oproti tetraploidním 4xE nebyl

statisticky průkazný. Oproti situaci po přirozené skarifikaci semen v práci Eliášová & Münzbergová (2014), kdy tetraploidních semen vyklíčilo prokazatelně více ( $P < 0,001$ ), po umělé skarifikaci tedy byla klíčivost obou evropských cytotypů velmi podobná. Má tedy způsob skarifikace vliv na výslednou klíčivost cytotypů? Jakým způsobem jejich klíčivost ovlivnil? Pokud mají diploidní semena silnější obaly, než tetraploidní semena, pak je možné, že umělou skarifikací byly obaly diploidů narušeny více, než dokáže přirozená skarifikace a to umožnilo vyklíčit většímu množství semen. Zároveň, pokud mají evropská tetraploidní semena *V. cracca* obaly tenčí, než diploidi, pak by tedy mohla být přirozená skarifikace pro tetraploidy dostačující pro relativně vysokou klíčivost. Hrubší zásah skarifikací umělou už nemusí klíčivost významně zvýšit a klíčivost obou cytotypů bude podobná. Hrubší zásah mohl naopak u tetraploidů poranit embryo a tím pádem se úspěch klíčivosti u tohoto cytotypu snížil. 4xA semena měla procentuální klíčivost velmi podobnou semenům 4xE. Přestože aljašská semena byla o čtyři roky starší, než všechna ostatní, nezdá se, že by tím byla výsledná klíčivost těchto semen jakkoliv ovlivněna, protože u semen tohoto typu standardně klesá klíčivost se stářím jen velmi pomalu. Kromě tloušťky obalů zde mohou hrát samozřejmě roli i jiné, zatím neprozkoumané faktory, jako chemické složení semenných obalů a jeho vnitřní anatomie (Hormat & El Alaoui-Faris 2004). Eliášová & Münzbergová (2014) ve své práci říkají, že diploidní semena mají silnější dormanci, než semena tetraploidní. Také to může být jedním z důvodů, proč v prvním případě po přirozené skarifikaci klíčila v menším množství než tetraploidi, zatímco ve druhém případě, díky zásahu umělou skarifikací, naopak klíčila více. Hrubším narušením obalů se dormance prostě prolomila u většího množství semen.

Nejnižší klíčivost byla shledána u 4xN semen, tedy rostlin z New Yorku. Je možné, že tato semena byla prostě méně životaschopná, než semena z ostatních lokalit obou cytotypů. Samozřejmě jsou zde možné vlivy umělé skarifikace, která může výsledky ovlivnit (Eliášová & Münzbergová 2014). Semena newyorských tetraploidů mohla být nechtěně obroušena více (v případě, že mají slabší semenné obaly oproti diploidům), než semena tetraploidů z jiných populací, embryo mohlo být porušeno a to ovlivnilo jejich celkovou klíčivost. To se ale, vzhledem k tomu, že všechna semena byla broušena najednou a pomocí stejného smirkového papíru, nezdá moc pravděpodobné. Dalším důvodem rozdílů v klíčivosti jednotlivých typů může být v zásadě to, že sběr semen z každé oblasti prováděl

někdo jiný. Semena z New Yorku tak mohla být sebrána příliš brzy, v době, kdy embrya uvnitř ještě nebyla vyvinutá. V neposlední řadě se nabízí také vysvětlení založené na genetické informaci. Newyorské populace mohou být málo geneticky variabilní, a proto mohou mít celkově nižší životaschopnost. Ramsey & Schemske (1998) sice na základě výsledků své práce, ve které srovnávali mnoho studií, ukázali, že autoployploidie upřednostňují cizosprašení, ale pokud jsou populace izolované nějakou nepřirozenou bariérou, například ve městech a jedinci se kříží opakovaně v rámci jediné populace, úroveň inbrední deprese v takových populacích může být pak relativně vysoká. V důsledku toho mohou být semena neschopna vyklíčení (Kirkpatrick & Jarne 2000). Už jen samotnou ployploidizací totiž velmi často vznikají jedinci se sníženou fertilitou oproti diploidům (Bretagnolle & Thompson 1995, Husband 2004). Klíčivost semen byla sledována i v práci od Crawford & Whitney (2010). Ti se zabývali sledováním vlivu genetické variability experimentálních populací *Arabidopsis thaliana* na množství vyklíčených semen. Jejich výsledky ukazují, že v populacích s variabilnějšími genotypy vyklíčilo prokazatelně více semen než v tzv. „monokulturních“ populacích s nízkou genetickou diverzitou. V úvahu by mohl přijít také vliv hustoty semen na ploše. Existuje několik prací o dokumentování vlivu množství vysetých semen na jejich klíčivost (např. Bergelson & Perry 1989, Murray 1998, Dyer *et al.* 2000, Lortie & Turkington 2002, Turkington *et al.* 2005). V těchto experimentech byla sledována klíčivost semen (buď jako celkové procento nebo klíčivost v závislosti na čase) pod vlivem jejich hustoty na ploše. Například Murray (1998) manipuloval s hustotou semen u *Eragrostis curvula* a zjistil, že při vyšších hustotách vyklíčilo více semen. Protože byla newyorská semena v mém pokusu vyseta hromadně po celých populacích, nikoliv po mateřských rostlinách, jako ostatní typy, je možné, že v důsledku většího množství semen v nádobě byla úspěšnost klíčení nižší. Pro ilustraci jsem vypočítala, kolik semen připadalo v průměru na 1 cm<sup>2</sup> zeminy. V klasických květináčích 10x10x10 cm, tedy pro aljašské a evropské rostliny, bylo na 1 cm<sup>2</sup> průměrně 0,1 semene, zatímco v nádobách 20x30x6cm, ve kterých byla klíčena newyorská semena, připadalo na 1 cm<sup>2</sup> plochy zeminy průměrně 0,2 semene. Zda tento rozdíl ovlivnil výslednou klíčivost, je zřejmě nepravděpodobné, protože rozdíl je relativně malý.

Další zajímavou informací, kterou zjistily Eliášová & Münzbergová (2014) je, že tetraploidi *V. cracca* klíčili v prvním roce prokazatelně ( $P < 0,001$ ) rychleji, než diploidi.

Tato schopnost tetraploidů může být klíčovou vlastností pro jejich výskyt v západní a severní Evropě, kam se rozšířili po ústupu ledovce (Trávníček *et al.* 2010) a také v Severní Americe (Eliášová *et al.* 2014). Naproti tomu silnější dormance diploidů a schopnost přetrvávat v půdě delší dobu může být výhodou pro suchou jihovýchodní Evropu, která je pravděpodobně i místem původu tohoto druhu (Van de Wouw *et al.* 2001). Eliášová & Münzbergová (2014) dále zjistila, že tetraploidní rostliny *V. cracca* mají semena prokazatelně větší a těžší, než jsou semena diploidů. Větší semena mají typicky větší zásoby, které mohou použít v časně fázi růstu. Semenáčky z větších semen jsou vyšší a mají větší šanci na přežití (Moles & Westoby 2004). Přesto ve své práci Eliášová & Münzbergová (2014) neprokázaly žádný rozdíl mezi výškou semenáčků diploidů a tetraploidů *V. cracca*. Ani v mém pokusu nebyl nalezen prokazatelný rozdíl mezi 2xE a 4xE. Oproti 2xE byly semenáčky typu 4xN vyšší, ale jen na 95% hladině průkaznosti. Silně průkazně nejmenší byly aljašské rostliny. Výška newyorských i aljašských semenáčků může být způsobena evolucí po zavlečení v důsledku vlivu různých faktorů prostředí. Oblast Aljašky se nepochybně v mnohých ohledech liší od prostředí v New Yorku a výsledná výška rostlin z těchto populací je pravděpodobně přirozeným přizpůsobením na dané podmínky. V této diplomové práci nebyla věnována pozornost velikosti semen. Ačkoliv neměla na výšku semenáčků evropských cytotypů prokazatelný vliv (Eliášová & Münzbergová 2014) nemůžeme vyloučit, že by mohla mít nějaký význam u invazních tetraploidů.

### 5.3 Růstový pokus

Na konci pokusu se typ 2xE na světle lišil výškou pouze od 4xN a byl tak zároveň s 4xE a 4xA druhý nejvyšší. Počet větví vytvořil stejný jako 4xE i 4xN a množstvím biomasy byl spolu s 4xE opět druhý nejvyšší. Ve stínu byla průměrná výška rostlin tohoto typu podobná všem ostatním typům, počet větví a biomasa se lišila pouze od typu 4xA. Rostliny 4xE byly na světle druhé nejvyšší spolu s 2xE, počet větví a množství biomasy měly podobně jako 2xE i 4xE. Ve stínu se výškou nelišily od žádného typu, počet větví a biomasu měly opět odlišnou pouze od 4xA. Na světle byly rostliny typu 4xN prokazatelně nejvyšší, větví ale vytvořily průměrně stejně jako 2xE a 4xE, nadzemní biomasy vytvořily

nejvíce spolu s 4xE. Ve stínu byla jejich průměrná výška, počet větví i množství biomasy odlišná pouze od 4xA. 4xA byly na světle obdobně vysoké jako 2xE, spolu s tímto typem byly nejnižší, počet větví a množství nadzemní biomasy měly prokazatelně nejmenší. Ve stínu byly rostliny podobné výškou typům 2xE a 4xE, počet větví a biomasa byly opět nejnižší ze všech.

Odpovědi invazních a neinvazních rostlin na zastínění se zabývali také van Kleunen *et al.* (2011). Testovali, zda se invazní a neinvazní druhy liší v adaptivní plasticitě. K dispozici měli 14 párů rostlinných druhů. Druhy v každém páru byly blízké příbuzné. Všechny vybrané druhy jsou původní v Evropě, ale jeden z každého páru se po zavlečení do různých částí světa stal invazním. Tento rostlinný materiál pěstovali v zahradním pokusu pod dvěma ošetřeními, polovina rostlin byla zastíněna, druhá polovina ponechána na plném světle. Celková biomasa byla ve výsledku vždy větší u invazních druhů. Ty měly také tendenci tvořit delší listy a dávat více materiálu do nadzemní biomasy ve srovnání s podzemní biomasou, ale rozdíly v těchto znacích mezi invazními a neinvazními zůstávaly i v zastínění podobné. Invazní a neinvazní rostliny se pak vůbec nelišily ve specifické listové ploše. Autoři tak neprokázali žádný vztah mezi tím, zda je nebo není rostlina invazní a způsobem ošetření pro žádný z měřených morfologických znaků. Nicméně zdůraznili, že právě tvorba většího množství biomasy za různých typů podmínek, při porovnání páru invazní a neinvazní rostlina, by mohla předurčovat právě toho jednoho z páru k tomu, aby se stal úspěšným kolonizátorem nových území.

Gianoli & González-Teuber (2005) zjišťovali míru fenotypové plasticity jako odpovědi na různý stupeň zastínění u druhů *Convolvulus arvensis* (v Chile je invazní), *C. chilensis* (endemit Chile) a *C. demissus* (endemit Chile a Argentiny). Měřenými charakteristikami v jejich práci byly délka řapíku, délka stonku, počet větví, počet listů, délka listů a specifická plocha listů. *Convolvulus chilensis* vykázal ve většině případů nejvýraznější reakci, plasticita zbylých dvou druhů byla méně výrazná a u obou druhů podobná. Plasticita invazního druhu *C. arvensis* byla v porovnání s endemickým *C. chilensis* ve většině případů výrazně menší. Proč je invazní i přes relativně malou plastickou reakci na zastínění právě *C. arvensis*? Oproti vysoce endemickému druhu byl schopen udržet růstové charakteristiky na relativně stejných hodnotách v různých úrovních zastínění. Právě to může být pro druh podstatnou vlastností, aby byl úspěšným v invazi.

Burns & Winn (2006) porovnávali morfologické a reprodukční vlastnosti pěti párů invazních a neinvazních příbuzných druhů čeledi *Commelinaceae* za několika typů podmínek, kterými byly různá dostupnost vody a živin. Invazní druhy ve srovnání s neinvazními obecně vykazovaly vyšší plodnost, vyšší rychlost růstu a větší specifickou listovou plochu, ale pouze za vysoké dostupnosti živin. Množství vody nemělo v tomto ohledu vliv. Naopak, celková biomasa, poměr biomasy kořenů a stonku a specifická listová plocha se mezi invazními a neinvazními druhy nelišila bez ohledu na ošetření. Ve výsledku tak autor souhlasí s Daehler (2003), že studie, které se snaží předvídat invazivitu na základě sledovaných vlastností rostlin, nemusí nalézt ty správné vlastnosti, které jsou spojené s invazivitou, a to pokud jsou tyto vlastnosti měřeny za podmínek, které nejsou pro invazi příznivé, jako například nízká úroveň živin. Studie, které se zabývají invazními rostlinami, by tedy měly zahrnovat celou škálu různých podmínek, aby bylo možné určit vlastnosti spojené s invazivitou s co největší jistotou (Burns & Winn 2006).

V rozsáhlé studii, kterou provedl Goodwin *et al.* (1999), byly u 165 párů rostlinných druhů (druhy pocházejí z Eurasie a vždy jen jeden druh z páru je invazní v Severní Americe) hodnoceny čtyři charakteristiky, které bylo možné u všech vybraných druhů dohledat v literatuře. Jednalo se o životní formu druhu, délku stonku, délku kvetení a velikost areálu výskytu v Eurasii. Po zhodnocení dostupných dat z výsledků vyplynulo, že přestože je životní forma druhu považována za dobrý prediktor pro invazivitu (Lodge 1993), u sledovaných druhů na ni nemá žádný vliv. Ačkoliv invazní rostliny byly vesměs prokazatelně vyšší a měly delší periodu kvetení, pouze u 60 % studovaných druhů by bylo podle autorů možné na základě těchto charakteristik předpovídat jejich schopnost stát se invazní, což je podle nich v podstatě stejné, jako náhodný výběr. Jediným efektivním prediktorem pro invazivitu byla shledána velikost původního areálu druhu v Eurasii. Na základě tohoto byli schopni úspěšně „předpovědět“ invazivitu u většiny sledovaných druhů. Znovu tak potvrdili, že velikosti původních areálů rostlinných druhů jsou podstatné pro schopnost úspěšně kolonizovat další území (Rejmánek & Richardson 1996).

Van Kleunen *et al.* 2010 provedli meta-analýzu 117 studií zabývajících se měřením vlastností 125 invazních a 196 neinvazních druhů rostlin v invazním areálu druhů. Testovali, zda je invaze spojena s vlastnostmi souvisejícími s výkonem (fyziologie, ukládání biomasy, rychlost růstu, velikost a fitness), a zda jsou výsledky závislé na typu

pokusu či na biogeografických nebo biologických faktorech. Celkově pak mohli říci, že invazní druhy měly významně vyšší hodnoty než druhy neinvazní a to pro všech šest výše uvedených vlastností. Větší rozdíly byly nalezeny při srovnání invazních a původních druhů než v rámci porovnání invazních a neinvazních zavlečených druhů. Nicméně ze srovnání invazních a původních druhů v určité oblasti, přičemž tyto původní druhy jsou zároveň invazivní jinde, nebyly shledány žádné podstatné rozdíly. Rozdíly ve fyziologii a rychlosti růstu byly výraznější v tropických oblastech. Všechny rozdíly ve znacích obecně nezávisely na tom, zda invazní druh pochází z Evropy. Stejně tak nebyly ovlivněny prostředím v experimentu. Na základě výsledků pak autoři došli k závěru, že invazní druhy mají obecně vyšší hodnoty pro vlastnosti spojené s výkonem, než druhy neinvazní. To naznačuje, že by to mohlo být možné předvídat budoucí rostlinné invaze právě z vlastností druhů.

Po umístění rostlin pod ošetření tedy každý typ reagoval trochu jiným způsobem. Podíváme-li se ale na výslednou výšku jednotlivých typů rostlin, u všech tetraploidních typů byla v konečném čase průměrná výška přibližně stejná u rostlin na světle i ve stínu. Pokud bylo tedy jejich počáteční reakcí na zastínění snížení růstové rychlosti (4xE a 4xN), po nějaké době dokázaly i rostliny vystavené stresu z nedostatku světla svoji výšku srovnat s nestresovanými rostlinami. Rostliny typu 4xA nereagovaly na zastínění žádnou změnou své výšky oproti rostlinám na světle. Pouze diploidní rostliny měly zásadně odlišnou reakci, stresované zastíněné rostliny v rámci tohoto typu byly na konci pokusu prokazatelně nižší. Na základě těchto výsledků je možné uvažovat, že reakci na zastínění u invazních tetraploidních rostlin, kterou jsme pozorovali taktéž u evropských tetraploidů, by bylo možné označit za preadaptaci tohoto cytotypu k tomu, aby se mohl stát úspěšným kolonizátorem nových území.

Co se týká počtu větví, pouze rostliny aljašských tetraploidů měly ve výsledku stejné množství větví jak ve stínu, tak na světle. Je proto možné, že tato reakce je post-adaptací, tedy schopností, která u evropských rostlin nebyla vyvinuta a v evoluci se objevila až u tetraploidních populací v oblasti Aljašky. Pokud reakci aljašských rostlin hodnotíme podle toho, že u ostatních typů rostlin (2xE, 4xE a 4xN) reagovaly zastíněné rostliny vytvořením menšího počtu větví, než kolik vytvořily rostliny nezastíněné, dá se říct, že jsou aljašské rostliny v tomto směru lépe přizpůsobené na stres z nedostatku světla.

Na reakci aljašských rostlin se lze však dívat i z pohledu reakce rostlin na světle. Pokud totiž bereme v úvahu průměrné počty větví jednotlivých skupin rostlin, přírůstek počtu větví u aljašských rostlin na světle je v posledním časovém úseku velmi malý, je dokonce menší, než průměrný přírůstek počtu větví v tomtéž časovém úseku u rostlin zastíněných. Je proto možné, že aljašské tetraploidní rostliny jsou ve srovnání s jinými typy nejen mnohem lépe přizpůsobené na zastínění, a jsou tedy schopny lépe odolávat stresu, který nedostatek světla způsobuje, ale zároveň se u nich v protikladu s ostatními typy objevuje horší schopnost kontinuálně zvyšovat počet větví, pokud jsou vystaveny plnému světlu, což lze považovat za přirozenou podmínku míst, kde se tento druh obvykle vyskytuje. K vyvinutí této schopnosti zrovna u rostlin v oblasti Aljašky mohlo dojít pod tlakem mnoha různých klimatických i jiných faktorů, které konkrétně tuto oblast oproti jiným v Severní Americe nějakým způsobem vymezují a charakterizují.

Ze zjištěných výsledků lze dále vyvodit fakt, že nejvyšší rostliny *V. cracca* vytvořily během doby růstu také nejvíce nadzemní biomasy. O množství nadzemní biomasy v závěru můžeme v podstatě říct, že rostliny 4xA utrpěly zastíněním nejmenší újmu, z čehož lze vyvodit, že jsou na zastínění přizpůsobené lépe, než ostatní testované typy. Svou reakcí jsou pak v tomto případě nejbližší evropským rostlinám obou cytotypů, u nichž byl pokles v množství vytvořené biomasy pod zastíněním jen o málo větší. Typ 4xN má svou reakcí nejbližší k evropským tetraploidům. Na základě těchto výsledků by se dalo uvažovat, zda je možné, aby severoamerické invazní tetraploidní populace *V. cracca* pocházely z různých původních cytotypů, tedy jak z diploidů tak z tetraploidů, a to v závislosti na tom, do které části Severní Ameriky byl ten který cytotyp zavlečen.

Na rostlinách bylo sledováno i to, zda tvoří květy a počet vytvořených semen. Rostliny ve stínu nekvetly ani u jednoho typu. Protože procentuální zastínění bylo relativně vysoké, je pochopitelné, že rostliny neměly pro kvetení vhodné podmínky. Přirozená stanoviště *V. cracca* jsou obvykle spíše slunná. Mezi rostlinami na slunci kvetly pouze tři typy, 2xE, 4xE a 4xN. Největší procento kvetoucích rostlin bylo mezi 4xN, kde kvetla více než polovina z nich a také vytvořily nejvíce semen průměrně na jednu kvetoucí rostlinu. Rostliny s vyššími ploidiemi často tvoří více semen než jejich diploidní příbuzní (Burton & Husband 2000). Přihlédneme-li k tomu, že semena newyorských rostlin měla zdaleka nejnižší klíčivost ze všech typů, jedná se možná o reprodukční strategii. Aby bylo možné



udržet alespoň stabilní velikost populací, rostliny jsou v podstatě nuceny vytvořit velké množství semen. *V. cracca* je druh, který se rozmnožuje převážně cizosprašením, nicméně je u něj možné i samoopylení. Samoopylení sice vede ke vzniku velkého množství semen, většina z nich ale zůstává nevyvinutá (Eliášová *et al.* 2014). Oba evropské typy měly přibližně  $\frac{1}{4}$  kvetoucích rostlin. Diploidní rostliny vytvořily však v průměru o polovinu méně semen. Fakt, že tetraploidi vytváří semen více, by mohl být jedním z důvodů, proč se invazním tetraploidům na nových stanovištích daří lépe i přes to, že jakožto autotetraploidi mohou trpět již zmíněnou inbrední depresí. V počtu větví ani ve výšce se oba evropské typy podstatně nelišily ani v jednom ošetření. Vytvoří-li však tetraploidi větší množství semen, tak při stejné klíčivosti obou cytotypů bude v důsledku tetraploidních rostlin stále více a mohou diploidy ze stanoviště vytlačit. Počet vytvořených semen tak může být pro tetraploidy preadaptací, která se po zavlečení do Severní Ameriky dále vyvíjela. Význam preadaptací je pro invazní rostliny často podstatný. To dokládá ve své práci i Lachmuth *et al.* (2010). Při hledání vysvětlení invazity u populací tetraploidů *Senecio inaequidens* v Evropě, které byly zavlečeny z několika míst v Africe, totiž zjistili, že některé tetraploidní populace v Africe vykazují mnohé environmentální preadaptace na toleranci k chladu oproti diploidním populacím. Po zavlečení vícera cytotypů do Evropy dala pak tato preadaptace podstatnou výhodu tetraploidům a napomohla jim při úspěšné kolonizaci tohoto kontinentu. Nicméně, velmi vysoký počet semen u newyorských tetraploidů může být důsledkem snahy o kompenzaci snížené životaschopnosti způsobené inbrední depresí. Ačkoliv semena vznikají převážně cizosprašením (Eliášová *et al.* 2014), mohou mít newyorské populace nízkou genetickou variabilitu. Efekt dlouhodobého křížení podobných genotypů může být pak ve výsledku podobný jako v případě samoopylování. Zvýšená produkce semen kvůli zajištění reprodukce tedy může být převážena právě vzniklou inbrední depresí (Herlihy & Eckert 2002) a výsledkem je zmíněná nízká klíčivost semen. Pokud jsou tedy newyorské populace geneticky málo variabilní, opakované křížení jedinců v rámci těchto populací způsobuje nízkou životaschopnost semen. Toto omezení se následně rostliny snaží vyrovnávat tvorbou velkého množství semen, čímž se zvyšuje šance, že jich vyklíčí dostatečné množství, aby mohla být velikost populace udržována alespoň na konstantní velikosti.

## 5.4 Genetická vzdálenost mezi populacemi

Z vytvořených fylogenetických stromů na základě markerů *atpI-H*, *tRPP* a *DSI* je vidět, že tyto genetické markery, nejsou úplně vhodné pro bližší určení fylogenetických vzdáleností mezi jednotlivými populacemi pro druh *V. cracca*. Počet mutací v sekvencích bohužel nebyl dostačující pro jasné rozdělení populací na základě příbuzenské vzdálenosti. Pro jemnější rozdělení by bylo vhodné použít větší počet genetických markerů s vyšší variabilitou. Důvodem, proč jsou genetické markery u tohoto druhu tak málo variabilní je pravděpodobně evoluční stáří taxonu. Rod *Vicia L. sensu stricto* se v rámci skupiny *Vicieae* vymezil přibližně před 14 miliony lety. Oddělení samotného druhu *V. cracca L.* je pak odhadováno na dobu před teprve před jedním milionem let (viz Schaefer *et al.* 2012). Vzhledem k takto pro evoluci krátkému času nelze proto očekávat rozsáhlé evoluční změny v genomech, na základě kterých by bylo možné spolehlivě určit příbuzenskou vzdálenost jednotlivých populací v rámci jednoho konkrétního druhu. Navíc, *V. cracca* přinejmenším v minulosti bývala zemědělsky využívanou rostlinou a proto je dost pravděpodobné, že semena se jako osivo převážela z různých míst na jiná. Původ nějaké konkrétní populace je pak téměř nemožné dohledat.

Kromě výše uvedených byla v průběhu sepisování výsledků hodnocena variabilita souboru dalších 31 markerů. U žádného z nich však nebyl nalezen dostatečný počet polymorfních míst. Vzhledem k těmto výsledkům proto v rámci další práce na tomto druhu přecházíme na použití mikrosatelitů, protože umožňují vyšší genotypové rozlišení (Arnaud-Haond *et al.* 2005). Výsledná data budou posléze použita pro rekonstrukci vztahu populací *V. cracca*.

V neposlední řadě je ale problémem to, že *V. cracca* je původní i v Asii. Jako zástupce asijských rostlin *Vicia cracca* je v analýzách zahrnut pouze materiál z Gruzie. Je možné, že ze skutečné zdrojové populace nebyly odebrány vzorky a proto studie založené na molekulárních markerech často mohou o původu zavlečených populací poskytnout nesprávné závěry (Lombaert *et al.* 2011). Je zde tedy velká pravděpodobnost, že došlo ke zkreslení a k neúplnosti výsledků. I kdybychom tedy použitím mikrosatelitů získali čitelnější výsledek, jednalo by se stále jen o neúplný obraz skutečné situace.

Na původní otázku, které populace z původního areálu výskytu vikve ptačí jsou pravděpodobným zdrojem invazních populací v Severní Americe, nelze na základě

výsledků této práce odpovědět. Sestavení fylogenetického stromu za použití čtyřech genetických markerů neukázalo žádné bližší vymezení invazních populací vzhledem k některé z evropských původních populací *V. cracca*. Nalezení zdrojové populace invazních druhů obecně není jednoduché. Bartlett *et al.* (2002) studovali invazní populace *Bromus tectorum* na východním pobřeží USA a na základě sídlení několika typů alel se jim podařilo navrhnout některé populace v Evropě a v Asii, ve kterých by mohly mít invazní východoamerické populace původ. Například ale Marston & Villalard-Bohnsack (2002), se pokoušeli hledat původ populací invazní řasy *Grateloupia doryphora* u Rhode Islandu na západním pobřeží Atlantického oceánu. Tento druh je původní v tropických mořích, ale jeho areál se rozšířil nejprve do evropských pobřežních vod na východní pobřeží Atlantiku a poté i na jeho západní břehy. Autoři použili markery ITS, COX a také metodu RAPD. V těchto úsecích byla ale zjištěna jen minimální variabilita a autorům se na jejich základě nepodařilo specifikovat mezi evropskými populacemi konkrétní zdroj populací u Rhode Islandu. Použití mikrosatelitů se tedy zdá být pro hledání zdrojových populací mnohem účelnější. To dokazuje i Okada *et al.* (2009). Autorům se podařilo za použití mikrosatelitních markerů navrhnout, která oblast z původního areálu výskytu druhu *Cortaderia jubata* (Bolívie, Ekvádor a Peru) je nejpravděpodobnějším zdrojem invazních populací v Kalifornii, Maui a na Novém Zélandu. Všechny tyto invazní populace jsou podle autorů pouze jediný klon a převládající genotyp se shoduje s genotypem rostlin v jižním Ekvádoru. Úspěšné použití mikrosatelitů můžeme ukázat také v práci DeWalt *et al.* (2011), kteří s jejich pomocí navrhli oblast v centrální Číně, která je pravděpodobným zdrojem invazních populací tetraploidů *Triadica sebifera* na jihovýchodě USA. Populace z navržené zdrojové oblasti a z jihovýchodu USA se nicméně pořád ještě poměrně liší a proto se autoři domnívají, že se pouze přiblížili k nalezení konkrétního zdroje invazních populací. Velkou roli hraje také rychlost mutací a omezený genový tok mezi invazními a původními populacemi a je zde velká pravděpodobnost, že zdroji invazních populací byly populace z více různých míst v původním areálu. Invazní populace pak mohou být výsledkem splynutí původně oddělených genetických zdrojů. Ačkoliv tedy mohou být genetické markery v některých případech pro určení příbuzenské vzdálenosti v rámci populací jednoho druhu dostačující, použití mikrosatelitů je často nezbytné a to zejména u evolučně mladších taxonů.

## 6. Závěr

Mezi měřenými rostlinami *Vicia cracca*, pocházejícími z invazních populací na několika lokalitách v Severní Americe, nebyli nalezeni žádní diploidní jedinci, a proto můžeme na základě těchto výsledků podpořit hypotézu, že jsou zde invazní pouze tetraploidi. Pro ověření, zda je předpokládaný lepší růst invazních rostlin dán polyploidizací, či až následnou adaptací rostlin na nové podmínky, jsem testovala vliv zastínění na růst diploidních a polyploidních rostlin z Evropy a polyploidních rostlin ze Severní Ameriky. Vzhledem ke zjištěným reakcím na toto ošetření u testovaných typů v rámci druhu *Vicia cracca* mohu říci, že tetraploidi v Evropě jsou pravděpodobně preadaptováni na to, stát se invazními. Tetraploidi, jakožto cytotyp se zdvojeným genomem, mají více genetického materiálu a tedy více možností, jak vyvinout požadovanou vlastnost pod tlakem okolního prostředí. U dvou invazních typů tetraploidů se nicméně reakce na zastínění vzájemně dost liší. Pokud tedy byli jejich evolučními předky původní neinvazní tetraploidi, měli po zavlečení na nové území na základě větší variability v genomu širokou škálu možností jak tuto různorodost využít aby zde mohli přežít. Kombinací variability genomů rostlinného materiálu a vlivu podmínek místa, kam byly rostliny zavlečeny, se poté v Severní Americe vyvinulo množství různě přizpůsobených populací *Vicia cracca*. Jejich reakce na jeden vybraný typ ošetření ale rozhodně nevypovídá o tom, jestli je některý z typů celkově ve své schopnosti kolonizace lepší nebo horší než ostatní. Genetické markery testované v této práci bohužel nejsou v evolučním smyslu dostatečně informativní a na jejich základě proto nelze blíže specifikovat vztahy mezi jednotlivými populacemi. S přihlédnutím k výsledkům fylogenetické analýzy původních a invazních populací *Vicia cracca* tak nebylo možné navrhnout konkrétní zdrojové populace invazních rostlin.

## Literatura a použité zdroje

- Aarssen, L. W., Hall I. V., Jensen K. I. N. 1986. The biology of Canadian weeds. 76. *Vicia angustifolia* L., *V. cracca* L., *V. sativa* L., *V. tetrasperma* (L.) Schreb. and *V. villosa* Roth. *Can. J. Plant Sci.* 66:711–737.
- Adams K. L. & Wendel J. F. 2005. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 135–141.
- Alpert P. & Simms E. L. 2002. The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology* 16: 285–297.
- Alpert P. 2006. The advantages and disadvantages of being introduced. *Biological Invasions* 8: 1523–1534.
- Arnaud-Haond S., Alberto F., Teixeira S., Procaccini G., Serrão E.A., Duarte C.M. 2005. Assessing genetic diversity in clonal organisms: low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. *Journal of Heredity* 96, 434–440.
- Australia's Virtual Herbarium. <http://avh.ala.org.au>.
- Baker H. G. 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. In Baker H. G., Stebbins G. L., (eds.): The genetics of colonizing species, pp. 147–168, Academic Press, New York.
- Barrett S. C. H., Colautti R. I., Eckert C. G. 2008. Plant reproductive systems and evolution during biological invasion. *Molecular Ecology* 17: 373–383.
- Bartlett E., Novak S. J., Mack. R. N. 2002. Genetic variation in *Bromus tectorum* (*Poaceae*): Differentiation in the eastern United States. *American Journal of Botany* 89(4): 602–612.
- Bazzaz F. A. 1986. Life history of colonizing plants: some demographic, genetic, and physiological features. *Ecology of Biological Invasions of North America and Hawaii*, eds Mooney, H.A.
- Bennett M. D., Leitch I. J., Hanson L. 1998. DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Annals of Botany* 82: 121–134.
- Bergelson J. & Perry R. 1989. Interspecific competition between seess – relative planting date and density affect seedling emergence. *Ecology*, Vol. 70(6): 1639–1644.
- Blossey B. & Nötzold R. 1995. Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology* 83: 887–889.
- Bossdorf O., Auge H., Lafuma L., Rogers W. E., Siemann E., Prati D. 2005. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144: 1–11.
- Bossdorf O., Prati D., Auge H., Schmid B. 2004. Reduced competitive ability in an invasive plant. *Ecology Letters* 7: 346–353.
- Bretagnolle F., Thompson J. D., Lumaret R. 1995. The influence of seed size variation on seed germination and seedling vigour in diploid and tetraploid *Dactylis glomerata*. *Annals of Botany* 76: 607–615.
- Burns J. H. & Winn A. A. 2006. A comparison of plastic responses to competition by invasive and non-invasive congeners in the *Commelinaceae*. *Biological Invasions* 8: 797–807.

- Burton T. L. & Husband B. C. 2000. Fitness differences among diploids, tetraploids and their triploid progeny in *Chamerion angustifolium*: Mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. *Evolution*, 54(4): 1182–1191.
- Campbell J. B., Best K. F., Bud A. C. 1956. 99 Range forage plants of the Canadian prairies. *Canada Department of Agriculture Pub.* 964. 99 pp. In Klebesadel L. J. 1980. Birdwetch - Forage crop, ground cover, ornamental or weed? *Agroborealis*, Vol. 12(1): 46-49.
- Castro S., Loureiro J., Santos C., Ater M., Ayensa G. Navarro L. 2007: Distribution of Flower Morphs, Ploidy Level and Sexual Reproduction of the Invasive Weed *Oxalis pes-caprae* in the Western Area of the Mediterranean Region. *Annals of Botany* 99: 507-517.
- Coffey K. L. & Kirkman L. K. 2006. Seed germination strategies of species with restoration potential in a fire-maintained pine savanna. *Natural Areas Journal*, Vol. 26(3): 289-299.
- Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews. Genetics* 6: 836–846.
- Crawford K. M. & Whitney K. D. 2010. Population genetic diversity influences colonization success. *Molecular Ecology* 19, 1253–1263.
- Daehler C. C. 2003. Performance Comparisons of Co-Occurring Native and Alien Invasive Plants: Implications for Conservation and Restoration. *Annual review of ecology and systematics*, vol. 34: 183-211.
- DeWalt S. J., Siemann E., Rogers W. E. 2011. Geographic distribution of genetic variation among native and introduced populations of Chinese tallow tree, *Triadica sebifera* (*Euphorbiaceae*). *American Journal of Botany* 98(7): 1128–1138.
- Dlugosch K. M. & Parker I. M. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17: 431–449.
- Doležel J., Binarová P., Lucretti S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia plantarum* (Praha) 31: 113–120.
- Domenech B., Asmussen-Lange C. B., Baker W. J., Alapetite E., Pintaud J. C., Nadot S. 2014. A phylogenetic analysis of palm subtribe *Archontophoenicinae* (*Arecaceae*) based on 14 DNA regions. *Botanical Journal of the Linnean Society* 175 (4): 469–481.
- Dvořák F., Dadáková B., Grüll F. 1977. Studies of the morphology of chromosomes of some selected species. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 12: 343-375.
- Dyer A. R., Fenech A., Rice K. J. 2000. Accelerated seedling emergence in interspecific competitive neighbourhoods. *Ecology Letters*, Vol. 3(6): 523-529.
- Eliášová A. & Münzbergová Z. 2014. Higher seed size and germination rate may favour autotetraploids of *Vicia cracca* L. (*Fabaceae*). *Biological journal Of the Linnean Society*. DOI: 10.1111/bij.12318.
- Eliášová A. 2008. Evaluation of cytotype and morphological variability of *Vicia cracca* L. (*Fabaceae*) in central Europe. Diploma thesis. Univerzita Karlova v Praze, 2008.
- Eliášová A., Trávníček P., Mandák B., Münzbergová Z. 2014. Autotetraploids of *Vicia cracca* show a higher allelic richness in natural populations and a higher seed set after artificial selfing than diploids. *Annals of Botany* 113: 159–170.
- Ellstrand N. C. & Schierenbeck K. A. 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *National Academy of Sciences, USA* 97: 7043–7050.

- Felber F. 1991. Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population – effect of relative fitness of the cytotypes. *Journal of Evolutionary Biology* 4: 195–207.
- Fletcher J. 1880. Notes of the flora Ottawaensis, with special reference to the introduced plants. *Trans. Ottawa Field Nat. Club* 2: 36-37.
- Fordyce J. A. 2006. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J. Exp. Biol.* 209: 2377–2383.
- Gianoli E. & González-Teuber M. 2005. Environmental heterogeneity and population differentiation in plasticity to drought in *Convolvulus chilensis* (*Convolvulaceae*). *Evolutionary Ecology* 19: 603–613.
- Gleason H. A. 1958. The new Britton and Brown illustrated Flora of the Northeastern United States and adjacent Canada. Vol. 2. *The New York Botanical Garden*. Lancaster Press, Inc., Lancaster, PA. 655 pp. In Klebesadel L. J. 1980. Birdwetch - Forage crop, ground cover, ornamental or weed? *Agroborealis*, Vol. 12(1): 46-49.
- Goergen E. M., Leger E. A., Espeland E. K. 2011. Native perennial grasses show evolutionary response to *Bromus tectorum* (cheatgrass) invasion. *Plos One* 6: e18145.
- Goodwin B. J., McAllister A. J., Fahrig L. 1999. Predicting invasiveness of plant species based on biological information. *Conservation Biology* 13: 422–426.
- Greilhuber J. & Ebert I. 1994. Genome size variation in *Pisum-sativum*. *Genome*, vol. 37, issue 4, s. 646-655.
- Griffith T. & Sultan S. E. 2006. Plastic and constant developmental traits contribute to adaptive differences in co-occurring *Polygonum* species. *Oikos* 114: 5–14.
- Hanelt P. & Mettin D. 1989. Biosystematics of the genus *Vicia* L. (Leguminosae). *Annual review of ecology and systematics*, vol. 20: 199-223.
- Harvey P. H. & Pagel D. M. 1991. *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford University Press 1.
- Hegarty M. & Hiscock S. 2007. Polyploidy: doubling up for evolutionary success. *Current Biology* 17: R927–R929.
- Herlihy C. R. & Eckert C. G. 2002. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilization plant. *Nature* 416: 320–323.
- Hermann F. J. 1960. Vetches of the United States-native, naturalized and cultivated. *Agric. Handbook* No. 168. USDA, Washington, 84 pp.
- Hierro J. L., Maron J.L., Callaway R.M. 2005. A biogeographical approach to plant invasions: the importance of studying exotics in their introduced and native range. *Journal of Ecology* 93: 5–15.
- Hormat K. & El Alaoui-Faris F. E. 2004. Seed coat study of some Moroccan taxa of the genus *Vicia* L. section *Cracca* S. F. Gray (Leguminosae). *Lazaroa* 25: 153-159.
- Hulten E. 1968. Flora of Alaska and neighbouring territories. Stanford University Press, Stanford, CA. 1008 pp. In Klebesadel L. J. 1980. Birdwetch - Forage crop, ground cover, ornamental or weed? *Agroborealis*, Vol. 12(1): 46-49.
- Husband B. C. 2004. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 537–546.
- Chen Z. J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review in Plant Biology* 58: 377–406.
- Choi H. K., Luckow A. M., Doyle J., Cook R. D. 2006. Development of nuclear gene-derived molecular markers linked to legume genetic maps. *Mol Gen Genomics* 276: 56-70.

- Chrtková-Žertová A. 1973. Cytotaxonomic study of *Vicia cracca* complex 1. Czechoslovak taxa. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 8: 67-93.
- ILDIS [International Legume Database & Information Service]. 2005. Version as of November 2005. <http://www.ildis.org/>
- Jaaska V. 2005. Isozyme variation and phylogenetic relationships in *Vicia* subgenus *Cracca* (*Fabaceae*). *Annals of Botany* 96: 1085-1096.
- Jacobsen K. L., Gallagher R. S., Burnham M., Bradley B. B., Larson Z. M., Walker C. W., Watson J. E. 2010. Mitigation of Seed Germination Impediments in Hairy Vetch. *Agronomy Journal*, Vol. 102(5): 1346-1351.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30:3059-3066.
- Kirkpatrick M. & Jarne P. 2000. The Effects of a Bottleneck on Inbreeding Depression and the Genetic Load. *The American Naturalist*, vol. 155, issue 2: 154-167.
- Klebesadel L. J. 1980. Birdwetch - Forage crop, ground cover, ornamental or weed? *Agroborealis*, Vol. 12(1): 46-49.
- Krejčíková J., Sudová R., Oberlander C. K., Dreyer L.L., Suda J. 2013: Cytogeography of *Oxalis pes-caprae* in its native range: where are the pentaploids? *Biol Invasions* 15: 1189-1194.
- Kubát K. *et al.* 2010. Klíč ke květeně České republiky. *Academia*, Praha.
- Kupicha F. K. 1976. Infrageneric structure of *Vicia*. Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh, vol. 1976, issue 3: 287-326.
- Lachmuth S., Durka W., Schurr F. M. 2010. The making of a rapid plant invader: genetic diversity and differentiation in the native and invaded range of *Senecio inaequidens*. *Molecular Ecology* 19: 3952–3967.
- Lavergne S. & Molofsky J. 2007. Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 3883–3888.
- Ledingham G. F. 1957. Chromosome numbers of some Saskatchewan Leguminosae with particular reference to *Astragalus* and *Oxytropis*. *Can. J. Bot.* 35: 657-666.
- Leger E. A. 2008. The adaptive value of remnant native plants in invaded communities: an example from the Great Basin. *Ecological Applications* 18: 1226–1235.
- Leht M. 2005. Cladistic and phenetic analyses of relationships in *Vicia* subgenus *Cracca* (*Fabaceae*) based on morphological data. *Taxon* 54 (4): 1023-1032.
- Leitch A. R. & Leitch I. J. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320: 481–483.
- Levin D. A. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford: Oxford University Press.
- Lodge D. M. 1993. Biological invasions: lessons for ecology. *Trends in Evolution and Ecology* 8: 133-137.
- Lombaert T., Guillemaud T., Thomas C. E., *et al.* 2011. Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Molecular Ecology* 20: 4654–4670.
- Lortie C. J. & Turkington R. 2002. The effect of initial seed density on the structure of a desert annual plant community. *Journal Of Ecology*, Vol. 90(3): 435-445



- Lowry E. & Lester S. E. 2006. The biogeography of plant reproduction: potential determinants of species' range sizes. *Journal of Biogeography* 33: 1975–1982.
- Maron J. L., Vilà M., Bommarco R, Elmendorf S., Beardsley P. 2004. Rapid evolution of an invasive plant. *Ecological Monographs* 74(2): 261–280.
- Marston M. & Villalard-Bohnsack M. 2002. Genetic variability and potential sources of *Grateloupina doryophora* (*Halymeniaceae*, Rhodophyta), an invasive species in Rhode Island (USA). *J. Phycol.* 38: 649–658.
- Masterson J. 1994. Stomatal size in fossil plants – evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421–424.
- Maxted N. 1993. A Phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (Leguminosae, *Vicieae*). *Biological journal of the Linnean Society*, vol. 111, issue 2: 155-182.
- Meyer G., Clare R., Weber E. 2005. An experimental test of the evolution of increased competitive ability hypothesis in goldenrod, *Solidago gigantea*. *Oecologia* 144: 299-307.
- Misawa K. & Tajima F. 2000. A simple method for classifying genes and a bootstrap test for classifications. *Molecular biology and evolution* 17(12): 1879-84.
- Misawa K. & Tajima F. 2012. New Weighting Methods for Phylogenetic Tree Reconstruction Using Multiple Loci. *Journal of Molecular Evolution* 75(1-2): 1-10.
- Moles A. T. & Westoby M. 2004. Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology* 92: 372-383.
- Müller C. & Martens N. 2005. Testing predictions of the ‘evolution of increase competitive ability’ hypothesis for an invasive crucifer. *Evolutionary Ecology* 19: 533–550.
- Müller-Schärer H. & Schaffner U. 2008. Classical biological control: exploiting enemy escape to manage plant invasions. *Biological Invasions* 10: 859–874.
- Mulligan G. A. 1961. Chromosome numbers of Canadian weeds III. *Canadian Journal of Botany* 39: 1057-1066.
- Murray B. R. 1998. Density-dependent germination and the role of seed leachate. *Austral Ecology*, Vol. 23(5): 411-418.
- Muth N. Z. & Pigliucci M. 2006. Traits of invasives reconsidered: phenotypic comparisons of introduced invasive and introduced noninvasive plant species within two closely related clades. *American Journal of Botany* 93: 188–196.
- Nei M. & Takezaki N. 2008. Empirical tests of the reliability of phylogenetic trees constructed with microsatellite DNA. *Genetics* 178 (1): 385-92.
- Nuismer S. L. & Thompson J. N. 2001. Plant polyploidy and non-uniform effects on insect herbivores. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268: 1937–1940.
- Okada M., Lyle M., Jasieniuk M. 2009. Inferring the introduction history of the invasive apomictic grass *Cortaderia jubata* using microsatellite markers. *Diversity and Distributions*, (Diversity Distrib.) 15 , 148–157.
- Ornduff R., 1987. Reproductive systems and chromosome races of *Oxalis pes-caprae* L. and their bearing on the genesis of a noxious weed. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 74: 79-84.
- Osborn T. C., Pires J. C., Birchler J. A *et al.* 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* 19: 141–147.
- Oswald B. & Nuismer S. L. 2011. A unified model of autopolyploid establishment and evolution. *The American Naturalist*, vol. 178, issue 6: 687.

- Otto F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. (eds), *Methods in cell biology: flow cytometry*, pp. 105-110, Academic Press, San Diego, CA.
- Pandit M. K., Pockock M. J. O., Kunin W. E. 2011. Ploidy influences rarity and invasiveness in plants. *Journal of Ecology* 99: 1108–1115.
- Parker I. M., Rodriguez J., Loik M. E. 2003. An evolutionary approach to understanding the biology of invasions: local adaptation and general-purpose genotypes in the weed *Verbascum thapsus*. *Conservation Biology* 17: 59–72.
- Plants Database (United States Department of Agriculture). <http://plants.usda.gov/java/>.
- Plut K., Paul J., Ciotir C., Major M., Freedland R. J. 2011. Origin of non-native *Phragmites australis* in North America, a common wetland invader. *Fundam.Appl.Limnol.* 179/2: 121-129.
- Polunin N. 1959. Circumpolar arctic flora. *Ciarendon press*, Oxford, 514 pp. In Klebesadel L. J. 1980. Birdwetch - Forage crop, ground cover, ornamental or weed? *Agroborealis*, Vol. 12(1): 46-49.
- 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.
- Rejmánek M. & Richardson D. M. 1996. What attributes make some plants species more invasive? *Ecology* No. 77, vol. 6:1655-1660.
- Richardson D. M. & Pyšek, P. 2006. Plant invasions – merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Progress in Physical Geography* 30: 409–431.
- Rolston M. P. 1978. Water impermeable seed dormancy. *Botanical Review* 44: 365-396.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Huelsenbeck J. P. *et al.* 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542.
- Rousi A. 1960. Cytotaxonomical studies on *Vicia cracca* L. and *V. tenuifolia* Roth. I. Chromosome numbers and karyotype evolution. *Hereditas* 47: 81-110.
- Rousi A. 1962. Cytotaxonomical studies on *Vicia cracca* L. and *V. tenuifolia* Roth. II. Meiosis. *Hereditas* 48: 390-408.
- Rousi A. 1973. Cytotaxonomical studies on *Vicia cracca* L. and *V. tenuifolia* Roth. III. The relation between karyotype and morphology. *Annales Botanici Fennici* 10: 89-96.
- Segraves K. A. & Thompson J. N. 1999. Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution* 53 (4): 1114-1127.
- Sexton J. P., McKay J. K., Sala A. 2002. Plasticity and genetic diversity may allow saltcedar to invade cold climates in North America. *Ecological Applications* 12: 1652–1660.
- Shaw J., Lickey B. E., Schilling E. E., Small L. R. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 84 (3):275-288
- Schaefer H., Hechenleitner P., Santos-Guerra A., Menezes de Sequeira M., Pennington R. T., Kenicer G., Carine M. A. 2012. Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe *Fabeae* with special focus on the middle-Atlantic island lineages. *BMC Evolutionary Biology* 12:250.

- Skogen K. A., Senack L., Holsinger K. E. 2010. Dormancy, small seed size and low germination rates contribute to low recruitment in *Desmodium cuspidatum* (Fabaceae). *The journal of the Torrey Botanical Society* 137 (4): 355-365.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Schemske D. W., Hancock J. F., Thompson J. N., Husband B. C., Judd W. S. 2007. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56 (1): 13-30.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Tate J. A. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New phytologist* 161: 173-191.
- Soltis P. S. & Soltis D. E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *PNAS* 97: 7051- 7057.
- Stebbins G. L. 1950. *Variation and evolution in plants*. New York: Columbia University Press.
- Steele K. P. & Wojciechowski M. F. (2003). Phylogenetic analyses of tribes *Trifolieae* and *Vicieae*, based on sequences of the plastid gene *matK* (*Papilionideae*: Leguminosae). In: Klitgaard B. B., Bruneau A. (eds.): *Advances in Legume Systematics*, part 10, *Higher Level Systematics*. pp. 355-370. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Sulaiman S. F., Culham A., Harborne J. B. 2003. Molecular phylogeny of Fabaceae based on *rbcL* sequence data: with special emphasis on the tribe *Mimoseae* (*Mimosoideae*). *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 11(1), 9-35.
- Štorchová H., Hrdličková R., Chrtek Jr. J., Tetera M., Fitze D. , Fehrer J. 2000. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon*, Vol.49(1): 79-84.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Te Beest M., Le Roux J. J., Richardson D. M. *et al.* 2011. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany* 109 (1): 19-45.
- Thompson J. N., Nuismer S. L., Merg K. 2004. Plant polyploidy and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 511-519.
- Thuiller W., Richardson D. M., Pyšek P., Midgley G. F., Hughes G. O., Rouget M. 2005. Niche-based modelling as a tool for predicting the risk of alien plant invasions at a global scale. *Global Change Biology* 11: 2234-2250.
- Tilman D. 2004. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: A stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly. *National Academy of Sciences* 101: 10854-10861.
- Tomkins D. J. & Grant W. F. 1978. Morphological and genetic factors influencing the response of weed species to herbicides. *Canadian Journal of Botany* 56: 1466-1471.
- Trávníček P, Eliášová A., Suda J. 2010. The distribution of cytotypes of *Vicia cracca* in Central Europe: the changes that have occurred over the last four decades. *Preslia* 82: 149-163.
- Treier U. A., Broennimann O., Normand S., Guisan A., Schaffner U., Steinger T., Müller-Schärer H. 2009. Shift in cytotype frequency and niche space in the invasive plant *Centaurea maculosa*. *Ecology* 90: 1366-1377.
- Turkington R., Goldberg D. E., Olsvig-Whittaker L., Dyer A. R. 2005. Effects of density on timing of emergence and its consequences for survival and growth in two communities of annual plants. *Journal Of Arid Environments*, Vol. 61(3): 377-396.

- Van Assche JA, Debucquoy KLA, Rommens WAF. 2003. Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some Leguminosae (*Fabaceae*). *New Phytologist* 158: 315-323.
- Van de Wouw M., Enneking D., Maxted N., Robertson L. D. 2001. Genetic resources of Mediterranean *Vicia* species. Chapter 9 in: Maxted N. and Bennett S. J., Eds. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Dordrecht: Kluwer; 2001; pp. 132-157
- Van Kleunen M. & Fischer M. 2005. Constraints on the evolution of phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* 166: 49–60.
- Van Kleunen M., Schlaepfer D. R., Glaettli M., Fischer M. 2011. Preadapted for invasiveness: do species traits or their plastic response to shading differ between invasive and non-invasive plant species in their native range? *Journal of Biogeography*, vol. 38, issue 7: 1294-1304.
- Van Kleunen M., Weber E., Fischer M. 2010. A meta-analysis of trait differences between invasive and non-invasive plant species. *Ecology Letters*, vol. 13, issue 2: 235-245.
- Verlaque R., Aboucaya A., Fridlender A. 2002. Invasive alien flora of France: ecology, life-forms and polyploidy. *Botanica Helvetica* 112: 121–136.
- Vilà M., Maron J. L., Marco L. 2004. Evidence for the enemy release hypothesis in *Hypericum perforatum*. *Oecologia* 142: 474-479.
- White T., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Academic Press*, San Diego, pp. 315-322.
- Williamson M. 1996. *Biological invasions*. 1st ed. New York: Chapman & Hall, xii, 244.
- Wojciechowski M. F., Lavin M., Sanderson M. J. 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analyses of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* 91: 1846-1862.

## Příloha A

Přehled populací, které byly použity pro sledování klíčivosti. Jedinci ze zvýrazněných populací byli v práci dále použiti pro měření vybraných morfologických znaků.

Populace	Země původu	Zeměpisné souřadnice		Počet mateřských rostlin	
		Šířka	Délka	2x	4x
P2	Česko	49.382799	18.410704	1	
P3	Česko	49.379547	18.426144	1	
<b>P4</b>	<b>Slovensko</b>	<b>49.379986</b>	<b>18.432851</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
P5	Slovensko	49.347913	18.499660	8	
<b>P6</b>	<b>Slovensko</b>	<b>49.482364</b>	<b>18.801672</b>	<b>14</b>	
<b>P8</b>	<b>Česko</b>	<b>49.300551</b>	<b>18.138084</b>		<b>9</b>
<b>P9</b>	<b>Česko</b>	<b>49.265544</b>	<b>18.078651</b>	<b>8</b>	
<b>P10</b>	<b>Česko</b>	<b>49.239461</b>	<b>18.022535</b>		<b>9</b>
<b>P11</b>	<b>Česko</b>	<b>49.216028</b>	<b>18.082750</b>	<b>15</b>	
P12	Česko	49.223683	18.077792	5	
A1	Aljaška	61.605510	- 149.12007		20
<b>A2</b>	<b>Aljaška</b>	<b>64.853480</b>	<b>- 147.81023</b>		<b>20</b>
A3	Aljaška	61.587397	- 149.431875		20
<b>A4</b>	<b>Aljaška</b>	<b>64.819610</b>	<b>- 147.71233</b>		<b>21</b>
<b>A5</b>	<b>Aljaška</b>	<b>64.980833</b>	<b>- 148.111944</b>		<b>21</b>
N1	New York	42.465447	- 76.457854		?
N2	New York	42.462765	- 76.458725		?
N3	New York	42.460859	- 76.448175		?
N4	New York	42.447103	- 76.490156		?

## Příloha B

Přehled populací *Vicia cracca*, které byly použity pro sestavení fylogenetického stromu.

Populace	Zeměpisné souřadnice		Ploidie
	Šířka	Délka	
Aljaška 1	61.605510	- 149.12007	4x
Aljaška 2	64.853480	- 147.81023	4x
Aljaška 3	64.819610	- 147.71233	4x
Bulharsko	42.825306	24.653389	4x
Česko	49.479944	18.425139	4x
Finsko	62.625278	29.695278	4x
Francie 1	47.121944	4.49	2x
Francie 2	44.227361	5.496806	2x
Francie 3	44.227361	5.496806	4x
Gruzie	86.016667	45.587667	4x
Chorvatsko	45.244	17.673639	2x

Itálie 1	46.4795	11.779778	4x
Itálie 2	44.6545	9.312667	2x
Kanada 1	44.044495	- 78.456105	4x
Kanada 2	43.28265	- 79.92096	4x
Kanada 3	43.37691	- 80.341	4x
Kanada 4	45.18113	81.52196	4x
Kanada 5	43.9494	- 80.39647	4x
Kanada 6	44.52536	- 80.93545	4x
Kanada 7	44.17297	- 78.08916	4x
Kanada 8	45.63573	- 78.87789	4x
Kanada 9	45.4264	- 75.70053	4x
Kanada 10	43.69594	- 80.40873	4x
Kanada 11	43.63923	- 79.39674	4x
Kanada 12	43.22	- 79.61946	4x
Maďarsko 1	47.149	17.098889	2x
Maďarsko 2	46.329278	19.925694	4x
Nemecko	47.907722	7.593778	4x
New York 1	42.465447	- 76.457854	4x
New York 2	42.447103	- 76.490156	4x
Nizozemí	52.346111	5.016944	4x
Norsko	59.897222	10.711389	4x
Polsko 1	50.77475	20.451167	2x
Polsko 2	50.77475	20.451167	4x
Polsko 3	52.536412	21.210861	4x
Rakousko 1	47.059361	15.598583	2x
Rakousko 2	47.059361	15.598583	4x
Rumunsko	45.253583	24.457083	2x
Slovensko	49.1235	19.399111	2x
Slovinsko 1	46.556944	15.86925	2x
Slovinsko 2	46.556944	15.86925	4x
Srbsko	44.136889	20.492806	4x
Španělsko	43.1975	- 4.851667	4x
Švýcarsko	46.803889	7.150556	4x
Velká Británie	51.306389	1.043056	2x