

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



Česká zemědělská
univerzita v Praze

**Genetická diverzita jasanu ztepilého s ohledem na
ekotypovou příslušnost**

Diplomová práce

Autor: Bc. David Chludil

Vedoucí práce: Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. David Chludil

Lesní inženýrství

Název práce

Genetická diverzita jasanu ztepilého s ohledem na ekotypovou příslušnost

Název anglicky

Genetic diversity of European ash based on ecotype classification

Cíle práce

Cílem je analyzovat a popsat genetickou strukturu vybraných subpopulací jasanu ztepilého na území České republiky. Bude provedena populačně-genetická analýza, především s ohledem na příslušnost jednotlivých subpopulací do ekotypových kategorií. Genetické analýze bude předcházet optimalizace genotypizačního protokolu pro mikrosatelitové markery.

Metodika

Budou vytipovány porosty odpovídající ekotypové příslušnosti druhu (lužní, vápencový a horský). Každý ekotyp bude zastoupen alespoň třemi porosty (subpopulacemi) a v rámci každého porostu bude podrobeno genetické analýze alespoň 20 jedinců.

Nezbytnou prerekvizitou genetické analýzy je optimalizace genotypizačního protokolu, proto budou na základě literární rešerše vybrány perspektivní primerové sekvence a sestaveny dvě multiplexové reakce, v každé bude maximalizován počet zastoupených primerů.

Generovaná molekulární data budou interpretována ve smyslu popisu genetické diverzity (např. s využitím R package adegenet), především bude posouzena míra genetické variability mezi a v rámci jednotlivých ekotypových skupin.

Součástí práce bude rešeršní část se zaměřením na problematiku ekotypů jasanu ztepilého a analýzu genetické diverzity.

Harmonogram práce:

- odevzdání osnovy práce: do konce září 2022
- odevzdání rešeršní části práce: do konce listopadu 2022
- vyhotovení výzkumné části práce: do konce února 2023

Doporučený rozsah práce

cca 60 stran

Klíčová slova

Fraxinus excelsior L., lužní, horský a vápencový ekotyp, mikrosatelitové markery

Doporučené zdroje informací

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4), 617-631.
- Fussi, B., & Konnert, M. (2014). Genetic analysis of European common ash (*Fraxinus excelsior* L.) populations affected by ash dieback. *Silvae Genetica*, 63(1-6), 198-212.
- Heuertz, M., Hausman, J. F., Hardy, O. J., Vendramin, G. G., Frascaria-Lacoste, N., & Vekemans, X. (2004). Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution*, 58(5), 976-988.
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334.
- Lefort, F., Brachet, S., Frascaria-Lacoste, N., Edwards, K. J., & Douglas, G. C. (1999). Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (Oleaceae). *Molecular Ecology*, 8(6), 1088-1089.
- Musil, I., & Möllerová, J. (2005). *Listnaté dřeviny I*. Praha, ČZU, 216.
- Papi, R. M., Spanos, K. A., & Kyriakidis, D. A. (2012). Genetic variation of *Fraxinus angustifolia* natural populations in Greece based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *European Journal of Forest Research*, 131(4), 1151-1161.
- Sutherland, B. G., Belaj, A., Nier, S., Cottrell, J. E., P Vaughan, S., Hubert, J., & Russell, K. (2010). Molecular biodiversity and population structure in common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Britain: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 19(11), 2196-2211.
- White, T. L., Adams, W. T., & Neale, D. B. (Eds.). (2007). *Forest genetics*. Cabi.
-

Předběžný termín obhajoby

2021/22 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 1. 9. 2022

prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 5. 9. 2022

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 03. 04. 2023

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Genetická diverzita jasanu ztepilého s ohledem na ekotypovou příslušnost“ vypracoval samostatně pod vedením Ing. Jiřího Koreckého, Ph.D. a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědom, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne

Bc. David Chludil

Poděkování:

Jakákoliv práce většího rozsahu je výsledkem společného úsilí celého týmu lidí. Proto bych chtěl poděkovat lidem, kteří byli klíčoví při zpracování této diplomové práce. Chtěl bych v první řadě poděkovat svému vedoucímu práce Ing. Jiřímu Koreckému, Ph. D. za to, že mi umožnil zpracovávat vlastní téma, které mě zajímalo. Zároveň mu samozřejmě patří dík za ochotu a pomoc při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Jakubovi Dvořákovi a celému týmu, pracujícímu v genetické laboratoři FLD, který mi byl k dispozici vždy, když jsem potřeboval pomoci nebo poradit. Samozřejmě bych chtěl poděkovat správě Krkonošského národního parku, obzvláště Ing. Michalovi Prouzovi, za možnost provádění výzkumu v národním parku a pomoc se sběrem vzorků. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Mgr. Robertovi Helmovi, Ph. D. za odborné poradenství a pomoc se stylistickou formou práce a své rodině za podporu při studiu a vytvoření vhodného zázemí, díky kterému jsem se mohl naplno věnovat zpracování této práce.

Abstrakt

Jasan ztepilý je opadavý strom, jehož přirozený areál se rozprostírá téměř po celé kontinentální Evropě. Jasan plní významnou ekologickou funkci v porostech poblíž vodních toků a jeho dřevo je velmi kvalitní. Současným fenoménem je klimatická změna, která svým přímým i nepřímým působením ohrožuje samotnou existenci lesa tak, jak ho známe. Důležitým faktorem mitigace klimatických změn je podpora a rozvoj porostů s kvalitní genetickou strukturou a vysokou genetickou diverzitou. Zároveň se předpokládá existence tří ekotypů jasanu, nicméně jejich existence dosud nebyla spolehlivě prokázána. Prokázání existence ekotypů by mělo za následek změnu pohledu na zakládání jasanových porostů a jejich pěstování.

Diplomová práce „Genetická diverzita jasanu ztepilého s ohledem na ekotypovou příslušnost“ si klade za cíl prozkoumat genetickou strukturu vybraných českých populací jasanu ztepilého a zasadit tato zjištění do kontextu struktury dalších evropských populací, která byla určena na základě rešerše publikovaných studií.

Jednotlivé subpopulace byly vybírány na základě jejich příslušnosti ke třem ekotypům. Celkem byly odebrány vzorky z devíti subpopulací a každý ekotyp byl zastoupen třemi subpopulacemi. Z každé subpopulace bylo odebráno 20 vzorků a dohromady bylo analyzováno 180 vzorků. Pro laboratorní analýzu vzorků byly navrženy dvě multiplexové reakce se sadou devíti primerů, pokrývajících zkoumanou oblast mikrosatelitové nDNA.

Hlavním zjištěním práce je, že české populace mají relativně vysokou genetickou diverzitu a nižší míru pozorované heterozygotnosti. Též u nich existuje mírná genetická diferenciacie mezi populacemi, která je nejvyšší ze všech zkoumaných evropských populací. Na základě těchto zjištění se dají české populace jasanu ztepilého zařadit do skupiny západoevropských a středoevropských populací. Zároveň získaná data mírně podporují existenci ekotypů, ale zdá se, že genetická struktura je ovlivněna i dalšími vlivy, a proto je nutné tato zjištění ověřit dalšími detailnějšími studiemi.

Klíčová slova: *Fraxinus excelsior* L., lužní, horský a vápencový ekotyp, mikrosatelitové markery, genetická diverzita

Abstract

European ash is a deciduous tree. The natural range covers almost the entire continental Europe. Ash trees fulfil a significant ecological role in riparian woodlands and are valued for their high-quality wood. The current phenomenon, climate change, both directly and indirectly endangers the very existence of the forest as we know it. The major climate change mitigation factor is supporting and developing ash tree stands with quality genetic structure and high genetic diversity. Furthermore, it is presumed that there are three ecotypes of *Fraxinus Excelsior*; however, their existence is yet to be undoubtedly proven. Such proof would ultimately change the outlook on planting and cultivating ash trees.

The thesis "Genetic diversity of European ash based ecotype classification" aims to explore the genetic structure of selected Czech populations of an ash tree and compare its discoveries with the structure of other European populations, determined by the research of the published studies.

Particular subpopulations were chosen based on their ecotype classification. The samples were collected from nine subpopulations, whilst each ecotype was represented by three subpopulations. Twenty samples were collected from each subpopulation, and 180 samples were analysed altogether. Two multiplex reactions with a set of nine primers were proposed for the laboratory analysis, covering the examined area of microsatellite nDNA.

The primary finding of the thesis is that the Czech ash tree populations have relatively high genetic diversity and lower observed heterozygosity. There is also subtle genetic differentiation between populations, which is, in fact, the highest amongst all examined European populations.

Based on the aforementioned findings, the Czech populations of *Fraxinus Excelsior* can be included in the Western European and Central European populations group. Concurrently, the obtained data slightly support the existence of ecotypes, although it seems that the genetic structure is also affected by other factors; thus, it is crucial to verify these claims with further, more detailed studies.

Keywords: *Fraxinus excelsior* L., floodplain, mountain and limestone ecotype, microsatellite markers, genetic diversity

Obsah

1	Úvod	13
2	Cíle práce	15
3	Literální rešerše	16
3.1	Jasan ztepilý (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	16
3.1.1	Taxonomické zařazení	16
3.1.2	Fylogenetické sekce	17
3.1.3	Základní charakteristika druhu	17
3.1.4	Rozšíření	18
3.1.5	Ekotypy	21
3.1.6	Genetická diverzita	23
3.1.7	Současné hrozby	27
3.1.8	Enviromentální funkce a využití v průmyslu a sadovnictví	33
3.2	Molekulární biologie	35
3.2.1	Nukleové kyseliny	35
3.2.2	Genetické markery	37
3.3	Laboratorní metody	40
3.3.1	Polymerázová řetězová reakce	40
3.3.2	Elektroforéza	42
4	Metodika	43
4.1	Výběr zájmových území a sběr vzorků	43
4.1.1	Vápencový ekotyp	43
4.1.2	Lužní ekotyp	45
4.1.3	Horský ekotyp	45
4.2	Příprava a homogenizace vzorků	48
4.3	Izolace DNA	50
4.4	Testování parametrů DNA	53

4.5	Polymerázová řetězová reakce	56
4.6	Fragmentační analýza a zpracování dat	58
5	Výsledky	59
5.1	Genetická struktura uvnitř populací	60
5.2	Genetická diferenciacce mezi populacemi.....	65
6	Diskuze	69
7	Závěr.....	73
8	Seznam zdrojů a použité literatury	74

Seznam tabulek

Tabulka 1: Taxonomické zařazení jasanu ztepilého	16
Tabulka 2: Vývoj zastoupení dřevin v České republice	57
Tabulka 4: Přehled jednotlivých populací a počet analyzovatelných vzorků z jednotlivých ploch.....	59
Tabulka 5: Genetické parametry uvnitř devíti populací, zjištěné analýzou devíti mikrosatelitových lokusů.....	62
Tabulka 6: Chí-kvadrát test (náhodného) křížení v souladu HWE.....	64
Tabulka 7: Párové porovnání míry diferenciace (F_{ST}) mezi jednotlivými populacemi..	66
Tabulka 8: Párové porovnání genetické vzdálenosti podle Nei mezi jednotlivými populacemi.....	68

Seznam obrázků

Obrázek 1: Areál rozšíření jasanu ztepilého	19
Obrázek 2: Rekonstrukce výskytu dřevin v pozdním pleniglaciálu v Evropě.....	24
Obrázek 3: Genetická struktura jasanu v Evropě na základě analýzy nDNA	26
Obrázek 4: Chřadnoucí jasan s patrnou defoliací korun.....	28
Obrázek 5: Životní cyklus <i>H. fraxineus</i>	29
Obrázek 6: <i>A. planipennis</i>	33
Obrázek 7: Jasanová pálka hurl	34
Obrázek 8: B-DNA	36
Obrázek 9: Příklad SNP	39
Obrázek 10: Schéma PCR.....	41
Obrázek 11: Rozmístění jednotlivých zkoumaných ploch v rámci České republiky	44
Obrázek 12: Příklad typického stanoviště vápencového ekotypu z plochy č. 2.....	44
Obrázek 13: Solitérní jasan, rostoucí v těsné blízkosti řeky Labe na ploše č. 4.....	45
Obrázek 14: Mozaikovitá krajina na ploše č. 8	46
Obrázek 15: Oscilační mlýn Retsch MM 400	49
Obrázek 16: Připravený izolační kit a náčiní k extrakci DNA	52
Obrázek 17: Výsledek elektroforézy při testování parametrů DNA.....	55
Obrázek 18: Graf alelických frekvencí na lokusu FEMSATL16	60
Obrázek 19: Graf alelických frekvencí na lokusu M2-30.....	60

Obrázek 20: Graf struktury rozložení alel v jednotlivých populacích.....	63
Obrázek 21: Dendrogram genetické vzdálenosti populací na základě párového porovnání míry diference (F _{ST}).	66
Obrázek 22: Graf genetické vzdálenosti na základě párového porovnání míry diference (F _{ST}), pomocí analýzy hlavních koordinát.	67
Obrázek 23: Analýza molekulární variability.....	68

Seznam použitých zkratek

ADH = Alkoholdehydrogenáza. Enzym, katalyzující přeměnu alkoholů na aldehydy a ketony.

A-DNA = Pravotočivá forma DNA.

AMOVA = Analýza molekulárního rozptylu/variability. Složitá statistická metoda používaná k zhodnocení míry diverzity v populacích a diferenciaci mezi jednotlivými populacemi.

B-DNA = Pravotočivá forma DNA.

cpDNA = Chloroplastová DNA.

d_{1,3} = Prsní nebo výčetní tloušťka. Tloušťka stromu měřena ve výšce 1,3 m (prakticky ve výšce prsou).

DNA = Deoxyribonukleová kyselina. Molekula nesoucí genetickou informaci.

dsDNA = Dvouvláknová DNA.

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová.

GPS = Global Positioning System. Americký globální družicový polohový systém.

HWE = Hardy-Weinbergova rovnováha. Popisuje způsob rozdělení alel v ideální populaci

KRNAP = Krkonošský národní park.

LHO = Lesní hospodářská osnova.

LHP = Lesní hospodářský plán. Stejně jako LHO, hlavní nástroj lesnického plánování.

mRNA = Mediátorová RNA.

mtDNA = Mitochondriální DNA.

NAD⁺ = Oxidovaná forma Nikotinamidadenin dinukleotidu. Koenzym, podílející se na oxidačně-redukčních reakcích.

nDNA = Jaderná DNA.

NIL = Národní inventarizace lesů. Statistické šetření, které poskytuje spolehlivé údaje o aktuálním stavu lesů.

PCoA = Principal Coordinates Analysis (Analýza hlavních koordinát). Složitá matematická metoda, jejíž pomocí je možné graficky zobrazit genetickou příbuznost jednotlivých populací.

PCR = Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce). Laboratorní metoda, jejíž pomocí se zmnožuje zkoumaná DNA.

qPCR = Quantitative PCR (kvantitativní PCR). Typ PCR, při které je možné sledovat průběh PCR v reálném čase. Někdy též Real-time PCR.

RAPD = Random Amplification of Polymorphic DNA (náhodná amplifikace polymorfni DNA). Jeden z typů molekulárních genetických markerů.

RCF/G = Relative Centrifugal Force (Relativní síla odstředivky). Jednotka intenzity otáčení odstředivky, vztažená ke gravitaci Země.

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorfismus délky restričního fragmentu). Jeden z typů molekulárních genetických markerů.

RNA = Ribonukleová kyselina.

rRNA = Ribosomální RNA.

RT-PCR = Reverse transcription polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce s krokem reverzní transkripce). Metoda, která kombinuje reverzní transkripci a PCR. Umožňuje provést PCR, když vstupní materiál je RNA.

SNP = Single nucleotide polymorphism (Jednonukleotidový polymorfismus). Jeden z typů molekulárních genetických markerů.

SSR/STR = Simple sequence repeats/simple tandem repeats, též zvané jako mikrosatelity. Jeden z typů molekulárních genetických markerů.

TAE = Pufrační roztok obsahující Tris, kyselinu octovou a EDTA.

TBE = Pufrační roztok obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA.

Taq = *Thermus aquaticus*. Druh bakterie, z které byla původně izolována termoresistentní polymeráza.

tRNA = Transferová RNA.

VNTR = Variable number tandem repeat. Skupina, do které spadají i mikrosatelitové markery.

Z-DNA = Levotočivá forma DNA.

1 Úvod

V dřívějších dobách se v českých lesích zakládaly jehličnaté monokultury, složené především ze smrku a borovice. Především smrk má lidskou společností ceněné vlastnosti jako například průběžný a přímý kmen, nenáročnost na půdu, rychlý růst a dobrou snášenlivost plantážnického stylu pěstování. Také jeho dřevo je velmi kvalitní a dobře zpracovatelné. Díky tomu se začala lesnická praxe podřizovat potřebám této dřeviny a došlo k vytlačení většiny původních dřevin. Kvůli pěstování na nevhodných stanovištích, která byla smrku vnucena, došlo ke kalamitnímu rozvoji chorob, v posledních letech především devastující kůrovcové kalamity. V posledních letech se stále více prosazují principy přírodě blízkého pěstování lesů, mezi které mimo jiné patří pěstování stanovištně původních dřevin, které by nahradily lesy zdevastované kůrovcovou kalamitou.

Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior*) je opadavý strom z čeledi olivovníkovitých, který je na území České republiky původní. Jasan je rozšířen na velkém množství stanovišť. Obzvláště důležitý je na teplých a suchých stanovištích s vápencovým podkladem a v lesích, poblíž řek a potoků, včetně tvrdého luhu, kde naopak snáší relativně dlouhodobé zamokření. Z tohoto důvodu se začalo uvažovat o existenci různých ekotypů. V literatuře jsou nejčastěji vylišeny tři ekotypy. Jde o vápencový, lužní a horský ekotyp. Existence těchto ekotypů ovšem dosud nebyla ve studiích přesvědčivě potvrzena

Zásadním problémem jasanu v posledních letech je patogen *Hymenoscyphus fraxineus*, který způsobuje úplný rozpad jasanových porostů, což kromě ztráty biodiverzity a přirozené druhové skladby způsobuje i problémy technického rázu, protože pobřežní vegetace významně napomáhá zpevňování říčních břehů. Kromě toho je na jasan vázáno velké množství dalších druhů, především bezobratlých a lišejníků, a plošné vymírání jasanových porostů může způsobit kaskádu, která povede k vymření těchto druhů.

Podpora rezistentních jedinců, případně zakládání semenných sadů rouby, pocházejících z rezistentních jedinců, by mohlo být řešení, které by napomohlo vyřešit problém s odumíráním jasanu. Při těchto snahách bude ovšem velmi důležité zachovat genetickou diverzitu, protože je to klíčový faktor, který umožňuje rychlou a úspěšnou adaptaci na nové hrozby, jakými do budoucna budou klimatická změna nebo například

invazivní brouk *A. planipennis*. Proto je důležité provádět studie, zkoumající genetickou diverzitu a genetickou strukturu evropských populací. Kromě toho je nutné zjistit, zda jsou vymezované ekotypy jasanu geneticky diferencovány. Pokud by se genetická podmíněnost jejich vymezení prokázala, bylo by vhodné s tím v lesnické praxi počítat a používat sadební materiál na základě příslušnosti ke konkrétnímu ekotypu.

2 Cíle práce

Základním cílem diplomové práce bylo popsat genetickou strukturu vybraných subpopulací jasanu ztepilého v České republice. Z důvodu zaměření na příslušnost k ekotypům jasanu bylo cílem vybrat konkrétní subpopulace s ohledem na přírodní a geografické podmínky, charakterizující stanoviště daného ekotypu.

Základní cíl lze dále rozložit na několik dílčích cílů. Prvním dílčím cílem bylo vypracovat podrobnou literární rešerši, jejíž stěžejní částí je zhodnocení dosavadních poznatků o genetické struktuře evropských populací a problematiky ekotypů. Kromě toho byly zpracovány základní informace o jasanu ztepilém a škodlivých činitelích, kterým v současné době čelí nebo bude v blízké budoucnosti čelit. Tato neméně důležitá část rešerše uvádí čtenáře do kontextu a naléhavosti potřeby výzkumu v oblasti genetiky. Posledními kapitolami rešeršní části jsou základy molekulární biologie a laboratorních metod, které jsou nutné pro pochopení praktické části diplomové práce.

Vlastním výzkumným cílem byla laboratorní analýza 180 vzorků rostlinného materiálu, odebraných z předem vytipovaných lokalit. Bylo odebráno dvacet vzorků z každé z devíti lokalit. Každý ekotyp reprezentovaly tři subpopulace, tedy třetina z celkových devíti. Pro naplnění tohoto cíle byly na základě rozboru literatury a následné amplifikační optimalizace vytvořeny dvě multiplexové PCR reakce.

Zároveň je cílem navrhnout konkrétní opatření do lesnické praxe, popřípadě podpořit současné postupy při managementu v porostech jasanu ztepilého.

3 Literální rešerše

3.1 Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.)

3.1.1 Taxonomické zařazení

Rod jasan (*Fraxinus*) spadá do čeledi olivovníkovité (*Oleaceae*) (viz tab. 1), což jsou opadavé (výjimečně stálezelené) dřeviny a byliny. Do čeledi spadá přibližně 500-600 druhů, vyskytujících se převážně na severní polokouli, od tropů po mírné pásmo. V České republice se vyskytují tři domácí druhy v rámci dvou rodů. Kromě jasanu se jedná o ptačí zob (*Ligustrum*). Nejvýznamnější introdukované rody jsou šerík (*Syringa*) a zlatice (*Forsythia*), též nesprávně nazývána zlatý děšť.

Na severní polokouli, v subtropickém a mírném pásmu, roste přibližně 60-65 druhů jasanů. V České republice jsou původní dva druhy: jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.) a jasan úzkolistý (*Fraxinus angustifolia* Vahl). Jasan úzkolistý roste v blízkosti řek a je důležitou složkou nivních ekosystémů (Rozsypálek *et al.*, 2017). Kromě těchto dvou druhů jsou v Evropě původní jasan zimnář (*Fraxinus ornus* L.) a jasan balkánský (*Fraxinus pallisae* Wilmott). Jasan zimnář je strom nižšího vzrůstu, vysoký 4-8 metrů, který se vyskytuje v teplejších oblastech, především ve Středozeví, kde se jedná o hospodářsky významnou dřevinu. Na druhou stranu je původní i v teplejších oblastech Slovenska a v minulosti byl v České republice vysazován. Jasan balkánský se vzácně vyskytuje v jihovýchodní Evropě, kde roste na stepích a lesostepích.

Tabulka 1: Taxonomické zařazení jasanu ztepilého

Taxonomické zařazení		
Říše	rostliny	<i>Plantae</i>
Podříše	cévnaté rostliny	<i>Tracheobionta</i>
Oddělení	krytosemenné	<i>Magnoliophyta</i>
Třída	vyšší dvouděložné	<i>Rosopsida</i>
Podtřída	<i>Asteridae</i>	
Řád	hluchavkotvaré	<i>Lamiales</i>
Čeleď	olivovníkovité	<i>Oleaceae</i>
Rod	jasan	<i>Fraxinus</i>
Druh	jasan ztepilý	<i>Fraxinus excelsior</i> L.

3.1.2 **Fylogenetické sekce**

V minulosti proběhlo několik studií, zkoumající fylogenetickou příbuznost jednotlivých druhů jasanu. Jednou z novějších publikací, která je v současných pracích obvykle citována je Wallander (2008), kde je rod jasan rozdělen do šesti fylogenetických sekcí: *Dipetalae*, *Fraxinus* (*F. excelsior*, *F. angustifolia*), *Melioides*, *Ornus* (*F. ornus*), *Paucifloae* a *Sciandanthus*. Fylogenetické rozdělení zkoumající relativní příbuznost jednotlivých druhů se ukazuje jako významný faktor určující náchylnost daného druhu vůči patogenu. Druhy *Fraxinus excelsior*, *Fraxinus nigra* (americký druh jasanu) a *Fraxinus angustifolia*, spadající spolu s *Fraxinus mandshurica* (původní hostitel patogenu *H. fraxineus* ve východní Asii) do sekce *Fraxinus* jsou všechny náchylné vůči napadení tímto houbovým patogenem i přes to, že se náchylnost jednotlivých druhů v rámci sekce lišila. Americký druh *Fraxinus quadrangulata*, který sice není členem sekce *Fraxinus*, ale je fylogeneticky relativně příbuzný s touto sekcí, je též velmi náchylný vůči nákaze *H. fraxineus*. Na druhé straně spektra stojí sekce *Ornus*, do které spadá například asijský druh *Fraxinus chinensis* nebo druh rostoucí v České republice *Fraxinus ornus*. Druhy spadající do této sekce vykazují velmi silnou rezistenci vůči napadení *H. fraxineus* a při napadení nejsou patrné téměř žádné symptomy. Na základě těchto zjištění lze tedy konstatovat, že při introdukci patogenu do nového prostředí jsou nejvíce ohroženy druhy, které jsou nejvíce příbuzné s původním hostitelem (Nielsen *et al.*, 2017). Relativní rozdílnost v náchylnosti jednotlivých druhů v rámci sekce souvisí s adaptací daného druhu na konkrétní patogen. *F. mandshurica* je původním hlavním hostitelem patogenu a je pravděpodobné, že v dlouhodobém horizontu se projevil efekt červené královny, který popisuje situaci, při které je nutné k zachování rovnováhy ve vztahu hostitel-patogen srovnatelný evoluční vývin obou zástupců v tomto vztahu (Landolt *et al.*, 2016). Díky tomu je *F. mandshurica* relativně rezistentní vůči patogenu, ale příbuzné druhy bez vyvinuté adaptace jsou velmi náchylné na působení patogenu, který se ovšem v průběhu času adaptoval na podobný druh, čímž získává konkurenční výhodu.

3.1.3 **Základní charakteristika druhu**

Jasan ztepilý je strom, který běžně dorůstá 20-35 metrů, ale může dosáhnout výšky až 40 metrů. Běžná výčetní tloušťka ($d_{1,3}$) se pohybuje kolem jednoho metru, ovšem některé stromy dosahují tloušťky až 1,5 metru, a v pralesích byly dokonce zaznamenány kmeny s výčetní tloušťkou dva metry o objemu dvaceti m^3 (Úřadníček *et al.*, 2014). Jasan

ztepilý se dožívá stáří kolem 250 let. Kmen jasanu je zpravidla rovný. V mládí je větvení pravidelné a vstřícné, větve jsou relativně tlusté. Listy jsou lichozpeřené, 3-7 jařmé a jsou rozmístěny poměrně řídké, převážně jen na obvodu koruny. Koruna jako celek působí tedy řídké a má podlouhle vejčitý tvar. Listy se na podzim nebarví a opadávají zelené. Kořenový systém bývá panohový, jasan nejprve koření do stran po povrchu a až následně do hloubky. Silným prokořeněním vrchních vrstev půdy znemožňuje úspěšný nálet ostatních dřevin (Úřadníček *et al.*, 2014).

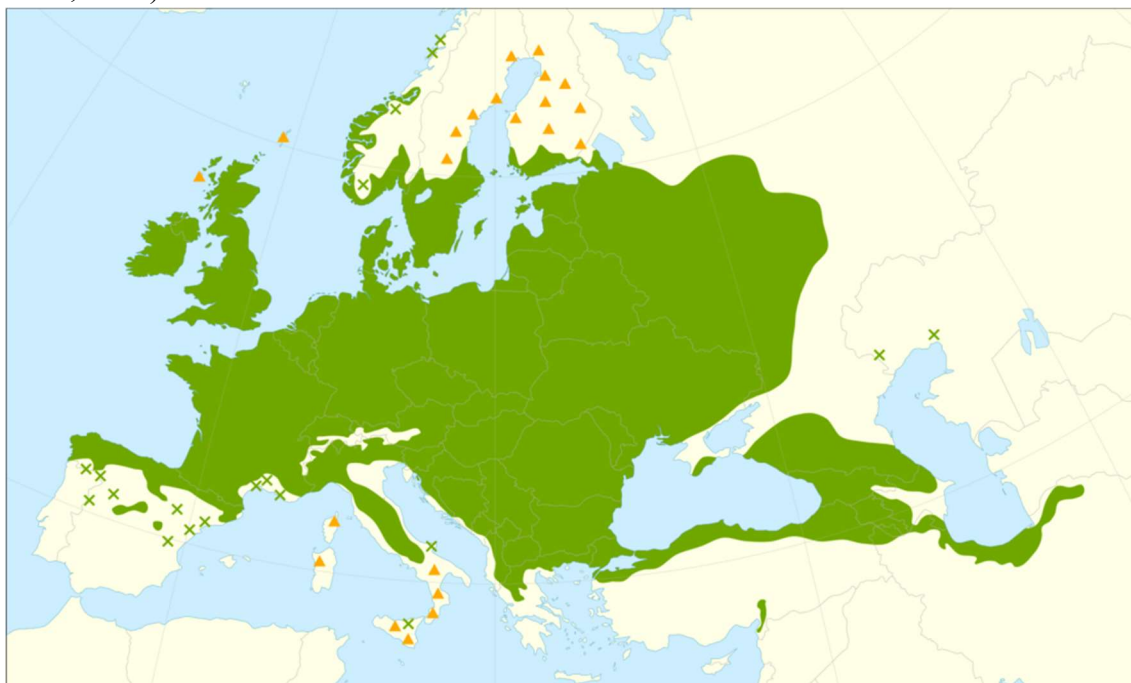
Jasan tvoří nenápadná hroznovitá květenství, která vyrůstají každoročně v dubnu ještě před olistěním. Bezobalné květy mohou být jak oboupohlavné, tak i jednopohlavné. Z toho vyplývá, že jedinec může mít v určitém roce převahu prašnickových květů a v jiném roce převahu pestíkových květů, proto plodnost jednotlivých jedinců v rozmezí jednotlivých let velmi kolísá. Volně rostoucí stromy začínají plodit ve dvaceti letech, stromy rostoucí v porostech o něco později, konkrétně v rozmezí 30-40 let. Fenologicky jsou zajímavé fenologické formy, které raší časně nebo naopak pozdně (Musil a Möllerová, 2005). Plodem jsou 2-5,5 cm dlouhé, na bázi zaokrouhlené nažky, které dozrávají na podzim a na stromě obvykle zůstávají i přes zimu. K oplození dochází za pomoci větru – jedná se tedy o anemogamní druh. Klíčivost jasanu je vysoká a trvá 2–3 roky.

Jasan v mládí dobře snáší velmi silný zástin, a dokonce ho i do určité míry vyžaduje. Postupem let se tolerance zástinu snižuje, až se v dospělosti stává plně světломilným a na zvýšený světelný požitek reaguje rychlým růstem. Jasanu škodí silné mrazy, obzvláště nebezpečné jsou pozdní mrazy, které mohou poškodit terminální pupen, čímž dochází k tvorbě vidlic, které jsou z hospodářského hlediska nežádoucí. Zároveň dochází ke košatění a neprůběžnému růstu kmene, což strom dále znehodnocuje. Jasan lze považovat za indikátor nejlepších půd (Musil a Möllerová, 2005). Jeho optimum je na hlubších, živinami bohatých, čerstvě vlhkých půdách. Preferuje půdy bohaté na dusík. I přes to, že snáší krátkodobé záplavy, trvající kolem dvou týdnů, tak nesnese dlouhodobě stagující vodu. Zároveň nesnese zasolené a zrašeliněné půdy.

3.1.4 Rozšíření

Jasan ztepilý se vyskytuje téměř na celém území Evropy a částečně zasahuje i do Blízkého východu, což dokládá obrázek 1, znázorňující areál rozšíření jasanu ztepilého. Areál jasanu ztepilého pokrývá největší část plochy Evropy z celého rodu

Fraxinus a možná i proto se v angličtině běžně nazývá European ash. Jedinými státy Evropy, kde se jasan nevyskytuje vůbec jsou ostrovní země Malta a Island a z kontinentální Evropy pouze Portugalsko (Enderle *et al.*, 2019). Nejsevernější část areálu jasanu je v teplejších oblastech Skandinávského poloostrova, kde zasahuje až k 63 ° s. š., na východě pokrývá velkou část evropské části Ruska, kde hranice rozšíření vede po toku řeky Volhy až k břehům Černého moře, a dokonce oblasti kavkazka a poloostrova Malá Asie. Na jihu Evropy je výskyt jasanu ztepilého omezený, protože je zde nahrazován teplomilnějším jasanem úzkolistým, ale i přes to se vyskytuje v Řecku, Itálii a velmi omezeně i Španělsku. Na Britských ostrovech se vyskytuje hojně s výjimkou Skotska, kde se vyskytuje spíše vzácně (Musil a Möllerová, 2005; Úřadníček *et al.*, 2014).



Obrázek 1: Areál rozšíření jasanu ztepilého (Caudullo *et al.*, 2017)

Jasan roste v České republice roztroušeně, především jako příměs jiných listnáčů, od planárního vegetačního stupně po vrchovinný stupeň submontánní, výjimečně montánní, ovšem horní ekologická hranice výskytu je 1000 m n. m. V Krkonoších se vyskytuje nejvýše v 980 m n. m. a Bílých Karpatech v 960 m n. m. (Musil a Möllerová, 2005). V rámci Evropy se vyskytuje v jižních pohořích až ve výšce 1400-1500 m n. m. (Úřadníček *et al.*, 2014).

V zemích, ve který je jasan zastoupen, se nejedná o významně rozšířený druh, a to ani v porovnání s ostatními listnatými dřevinami. Nejvíce je zastoupen jasan na Britských ostrovech, kde se jeho podíl na celkové lesnatosti pohybuje od 4,5 % až po 12,7 %

v závislosti na lokalitě (Enderle *et al.*, 2019). V lesích kontinentální Evropy je zastoupen 1-2 %, nejvíce ve střední Evropě, odkud se směrem na sever a jih Evropy jeho zastoupení snižuje. Na severu z důvodu přechodu temperátního lesa na tajgu a na jihu je nahrazován teplemílnějším jasanem úzkolistým. V České republice byl v roce 2021 podíl jasanu na celkové lesnatosti 1,3 %, což je více než udává rekonstruovaná přirozená skladba dřevin, podle které by byl v podmínkách bez zásahu člověka jasan zastoupen 0,6 % (Ministerstvo zemědělství, 2022). Vývoj podílu lesních dřevin v průběhu let je zobrazen v tabulce 2. I přes chřadnutí a odumírání jasanů se v období mezi lety 2004-2014 zvýšilo zastoupení jasanu o 0,2 % na 1,4 %, které nadále zůstávalo konstantní a až v posledních letech se snížilo na 1,3 % (Ministerstvo zemědělství, 2005, 2015, 2022). Zásoba mezi lety 1990 a 2010 se dokonce zdvojnásobila. Tento jev je způsobem tím, že se jasan velmi dobře šíří a před epidemií chřadnutí byl některými autory dokonce považován za expanzivní dřevinu, která by potenciálně mohla způsobovat problémy (Rozsypálek *et al.*, 2017).

Dlouhodobá stagnace zastoupení jasanu, a dokonce snížení zastoupení o 0,1 % u dřeviny se silným expanzivním potenciálem dokazuje závažnost problému s epidemií chřadnutí a odumírání jasanu. Doporučené zastoupení podle zprávy o stavu lesního hospodářství je 1,4 % (Ministerstvo zemědělství, 2022), což je dvojnásobek oproti 0,7 %, které bylo uváděno ještě v loňské zprávě o stavu lesního hospodářství (Ministerstvo zemědělství, 2021). Zvýšení doporučeného zastoupení na 1,4 %, což koresponduje s dlouhodobým podílem jasanu v českých lesích, lze interpretovat jako doporučení k zachování současných jasanových porostů a zamezení jejich rozpadu.

Zásoba dříví vychází z třetí fáze národní inventarizace lesů (NIL 3), která probíhala v letech 2016-2020. Na základě NIL 3 je podíl jasanu na celkové zásobě dříví (hroubí bez kůry) je 1,4 %, konkrétně 12,2 milionů m³, což odpovídá 4,3 m³/ha. Celková zásoba je o 0,2 % nižší než zásoba, zjištěná při předchozí fázi národní inventarizace lesů (NIL 2), která proběhla v letech 2011-2014 a při které byl podíl zásoby jasanů 1,6 %. Jasan byl spolu se smrkem jedinou dřevinou, jejíž zásoba mezi NIL 2 a NIL 3 snížila. Podobného podílu dosáhl jasan v průměrné výši ročních těžeb (1,3 %) a podílu na celkovém běžném přírůstu (1,2 %) (Ministerstvo zemědělství, 2022).

Tabulka 2: Vývoj zastoupení dřevin v České republice. (* = méně než 0,1 %, starší data zaokrouhlena na desetiny) (Ministerstvo zemědělství, 2005, 2010, 2015, 2020, 2022)

Dřevina	Přírozené zastoupení	2004	2009	2014	2019	2021
Smrk	11,2	53,5	52,2	50,7	49,5	48,1
Borovice	3,4	17,4	16,9	16,5	16,1	16,0
Jedle	19,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,2
Buk	40,2	6,4	7,2	8,0	8,8	9,3
Dub	19,4	6,5	6,8	7,1	7,4	7,6
Modřín	0	3,8	3,9	3,9	3,8	3,9
Bříza	0,8	2,9	2,8	2,8	2,8	2,8
Olše	0,6	1,5	1,6	1,6	1,7	1,7
Jasan	0,6	1,2	1,3	1,4	1,4	1,3
Javor	0,7	1,0	1,2	1,4	1,5	1,6
Habr	1,6	1,2	1,3	1,3	1,3	1,4
Lípa	0,8	1,0	1,1	1,1	1,2	1,2
Jilm	0,3	0*	0*	0*	0*	0*
Ostatní	0,6	1,7	1,8	1,9	1,9	2,1

3.1.5 Ekotypy

Jasan je rozšířen ve velkém rozpětí nadmořských výšek a roste na různých, vzájemně velmi odlišných stanovištích. Na jedné straně roste v lužních lesích a vykazuje rezistenci vůči pravidelnému zaplavování, na straně druhé se vyskytuje na velmi suchých stanovištích na vápenci, kde dokáže přečkat i období dlouhotrvajícího sucha. Populace rostoucí v lužích se zároveň liší fenotypově, například vlastnostmi dřeva nebo stomatální vodivostí (množství výměny plynu a transpirace za jednotku času) (Carlier *et al.*, 1992; Dacasa Rüdinger *et al.*, 2008; Buriánek, 2009). Z těchto důvodů se začaly vylišovat různé ekotypy a vznikly podle různých autorů různá dělení. Těmito ekotypy jsou například lužní (dále členěný na lužní horský a nížinný), vápencový, chlumní, suťový, skalní, mechový, vodní. Při bližším pohledu na tyto ekotypy je možné si všimnout, že hlavním hlediskem jejich vylišení je dostupnost vody, a s tím související předpokládaná odolnost vůči záplavám nebo naopak suchu. Proto se v průběhu času ustálilo dělení na lužní ekotyp a vápencový ekotyp. Z důvodu velkého výškového gradientu rozšíření jasanu ztepilého se občas dále vylišuje ještě samostatný horský ekotyp, případně horský a nížinný subtyp

lužního a suťového (vápencového) ekotypu. Lužní ekotyp se vyskytuje v tvrdém a přechodovém luhu, především podél toků velkých řek v nížinách, kde doprovází dub letní a jilmy. Jedná se o pravidelně zaplavovaná stanoviště s celoročním dostatkem vláhy. Vápencový (suťový ekotyp) se vyskytuje v pahorkatinách, především na svazích s jižní expozicí, kde roste spolu s dubem zimním, bukem a jeřábem břekem. Též může tvořit lesostepní společenstva s teplomilnými dřevinami jako například dubem pýřitým. Stanoviště trpí nedostatkem vláhy, ovšem téměř vždy jsou mimořádně bohaté na živiny. V Česku se jedná hlavně o Český a Moravský kras. Horský ekotyp roste v podhorských a horských oblastech v pásmu bučin, kde je dostatek živin a celoroční dostatek vláhy. Hojně se vyskytuje podél horských potoků, kde doprovází olši a na suťových prameništích spolu s javorem klenem a jilmem horským (Musil a Möllerová, 2005; Buriánek, 2009; Úřadníček *et al.*, 2014).

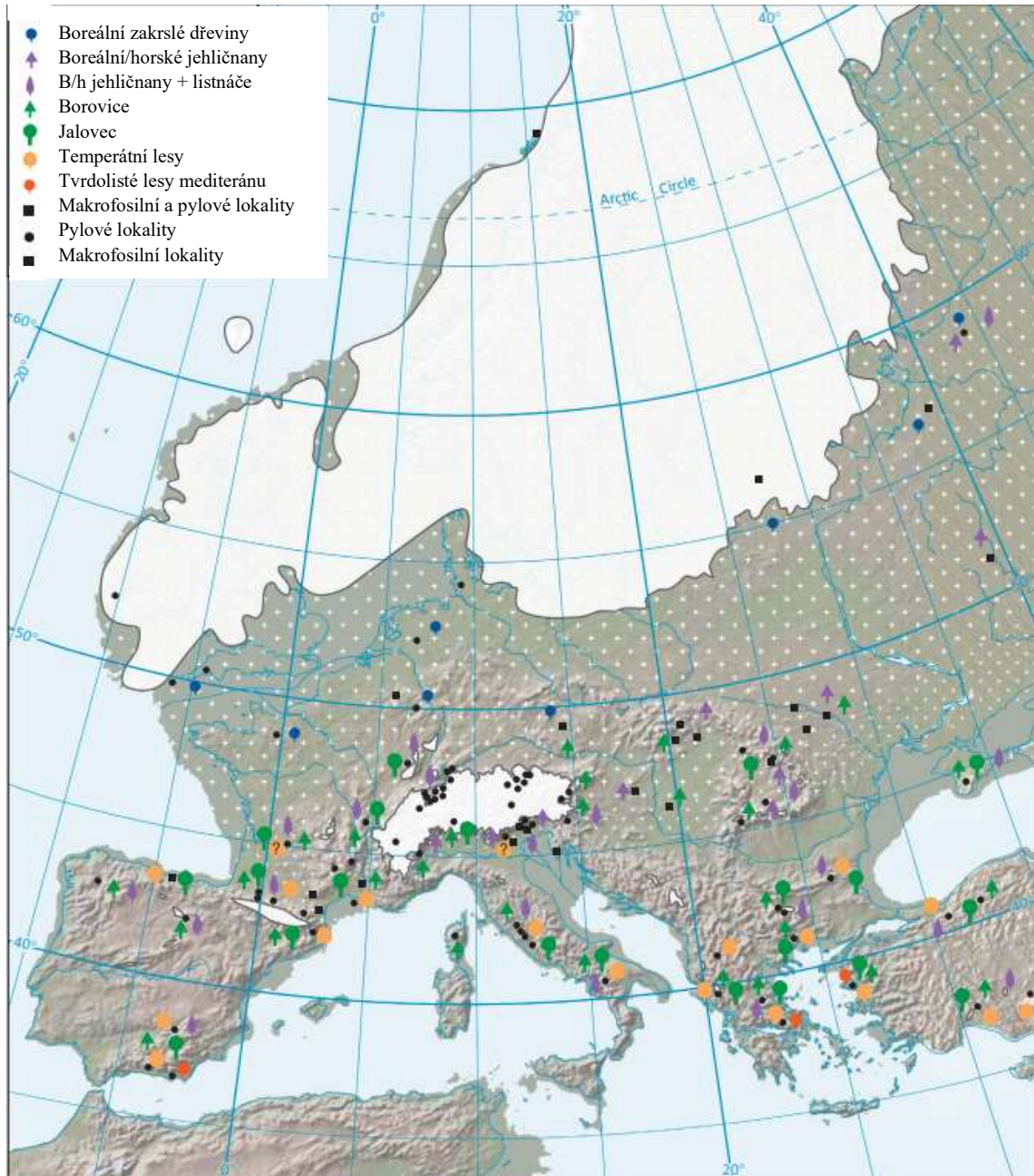
Fenologické odlišnosti u jasanů rostoucích v různých podmínkách lze vypořadovat v přírodě a jsou dokázány i experimentálně (např. Carlier *et al.*, 1992). Ovšem dosud stále nebyla spolehlivě dokázána odlišnost na úrovni genotypu, která by vznikla selekčním tlakem a zapříčinila by přenos těchto znaků na novou generaci, i v případě, že by rostla v jiných podmínkách. V průběhu let vzniklo několik studií, jejichž výsledky přímo odporují existenci ekotypů. Leibundgut (1956) neobjevil významné rozdíly mezi jasanem, rostoucím v lužních polohách s dostatkem podzemní vody a jedinci na vápencových půdách s nedostatkem půdní vláhy. Dlouhodobě zkoumal jasan F. Weiser, který prováděl nejprve nádobové pokusy s generativním potomstvem z porostů nacházejících se na lužních stanovištích a na suchých vápencových stanovištích po dobu deseti let. Poté provedl srovnávací výsadbu, kterou vyhodnotil po dalších 10 a 33 letech. V těchto pokusech nebyla prokázána hypotéza, že stromy, pocházející z lužních porostů jsou více odolné proti zaplavování a stromy, pocházející z vápencových stanovištích jsou odolnější vůči suchu (Weiser, 1965, 1974, 1995). V neposlední řadě Dacasa Rüdinger *et al.* (2008) zkoumala vliv vodního režimu na genetickou strukturu populací v Německu. Hypotéza, formulovaná v této studii, počítá s tím, že různá míra zaplavování jasanových porostů má vliv na expresi genu, kódujícího enzym alkohol dehydrogenázu (ADH), který je nepostradatelnou složkou systému vytváření energie v anaerobních podmínkách (pomáhá regenerovat NAD^+ , díky čemuž může cyklus tvorby energie z glukózy pokračovat). Díky tomuto mechanismu by měli mít teoreticky evoluční výhodu jedinci, s vysokou expresí ADH, čímž by došlo k selekčnímu tlaku, zvyšující frekvenci

daných alel v populaci. Konkrétně byly zkoumány isozymy, vznikající z lokusu ADH2, který se jevil jako vhodný polymorfni kandidát. Ve studii byla objevena určitá genetická struktura, naznačující specifika jednotlivých populací, ale nebylo možné prokázat korelaci mezi vodním režimem lokality a frekvencí určité alely. Vznik zjištěné genetické struktury je přisuzován spíše vlivu člověka nebo hydrochorii. Výsledky této studie tedy též odporují existenci ekotypů. Proto od určité doby autoři přisuzují schopnost jasanu růst na velkém množství vzájemně odlišných stanovišť jeho vysoké adaptibilitě spíše než změně na úrovni genomu, způsobenou selekčním tlakem (Carlier *et al.*, 1992; Dacasa Rüdinger *et al.*, 2008).

3.1.6 Genetická diverzita

Země se nachází v geochronologické periodě zvané kvartér, která započala před 2.58 miliony let a trvá do dnes (Cohen, K.M., Harper, D.A.T., Gibbard, 2022). Pro tuto periodu je typické střídání chladnějších a sušších období, zvaných glaciály a období s vyšší průměrnou roční teplotou a vyšším úhrnem srážek, které se nazývají interglaciály. Posledním glaciálem byl Würmský glaciál, který odhadem skončil před 10 000 – 12 000 lety. V současném období se nacházíme v období holocénu, který vykazuje známky interglaciálu. Glaciál je pro flóru nepříznivé období, při kterém kromě nízkých teplot a nižšího úhrnu srážek se zvětšuje pevninský ledovec, jehož rozloha závisí na konkrétním období, a který znemožňuje existenci většiny rostlinstva. V tomto období se podmínky pro druhy temperátního lesa stávají čím dál více nepříznivé a stahují se do klimaticky nejpríznivějších oblastí, zvaných refugia (Bennett *et al.*, 1991; Tzedakis *et al.*, 2013). Vymezení refugií temperátního lesa je obtížné a metody, které se k tomu používají jsou například analýzy pylu (obr. 2) nebo chloroplastové cpDNA. Vědecká komunita se shoduje na výskytu refugií v jižních poloostrovech, konkrétně Pyrenejského, Apeninského a Balkánského poloostrova a pravděpodobně i v podhůří Alp, což je patrné z obrázku 2 (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004; Tzedakis *et al.*, 2013). Byla uvažována existence refugia v severní, případně severovýchodní Evropě, v okolí Černého moře a dokonce i na Moravě, ale tato refugia nebyla spolehlivě potvrzena (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004; Tzedakis *et al.*, 2013). Uvolněný prostor po temperátním lese v severnějších oblastech Evropy, kde nebyl rozšířen kontinentální ledovec, byl kolonizován boreálním lesem, sestávajícím se především z jehličnatých dřevin a některých listnatých dřevin (například břízou) (Willis a Van Andel, 2004). V jednotlivých refugiích docházelo k tvorbě geneticky homogenních populací, které byly vzájemně velmi odlišné (Kremer

et al., 2002). Při oteplování klimatu, ke konci Würmeského glaciálu začalo docházet k rekolonizaci původních severních částí areálů druhů temperátního lesa, mezi které patří jasan (Hewitt, 1999).



Obrázek 2: Rekonstrukce výskytu dřevin v pozdním pleniglaciálu v Evropě. Bíle je naznačen maximální výskyt kontinentálního ledovce. Boreální zakrslé dřeviny: *Betula nana*, *Salix*; Boreální/horské jehličnany: *Picea*, *Larix*; Boreální/horské jehličnany + listnáče: *Betula*, *Populus*, *Salix*, *Alnus*, *Pinus*, *Juniperis*; Temperátní les: *Quercus*, *Ulmus*, *Corylus*, *Tilia*, *Fraxinus*, *Vitis*, *Carpinus betulus*, *Ostrya*, *Castanea*, *Fagus*, *Abies*, *Cedrus* a *Alnus*; Tvrdořísté lesy mediteránu: *Olea*, *Phillyrea*, *Pistacia* (upraveno podle: Tzedakis et al., 2013)

Jasan je druh, u kterého snadno dochází k outbreedingu, tedy křížení s jedinci, kteří jsou geneticky vzdálení, čímž dochází ke změnám v genetické struktuře populací. Na druhou stranu, stejně jako u ostatních stromových druhů má jasan dlouhý životní cyklus, což má za následek malé množství generací za jednotku času, a proto je genetická struktura jasanu stále velmi ovlivněna jeho šířením z glaciálních refugií (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004; Enderle *et al.*, 2019). V průběhu let proběhlo několik studií, jejichž cílem bylo zmapování genetické struktury jasanu ztepilého v rámci celé Evropy. Byly použity metody, využívající především mikrosatelitové markery jaderné nDNA (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004; Ferrazzini *et al.*, 2007; Beatty *et al.*, 2015) a chloroplastové cpDNA (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004; Fussi a Konnert, 2014; Tollefsrud *et al.*, 2016) a RAPD (náhodná amplifikace polymorfni DNA) (Nowakowska *et al.*, 2004; Pliūra *et al.*, 2005). Na základě výzkumů lze rozlišit v Evropě dvě genetické skupiny jasanu. První skupinou jsou populace, nacházející se ve střední a západní kontinentální Evropě a na Britských ostrovech. Díky velké vzdálenosti od refugií a nedostatečným geografickým překážkám zde docházelo k intenzivnímu toku genů, čímž vznikly populace s vysokou intrapopulační diverzitou, ale velmi nízkou diferenciací mezi jednotlivými populacemi (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004; Nowakowska *et al.*, 2004; Hebel *et al.*, 2006; Beatty *et al.*, 2015). Ve studii Pliūra *et al.* (2005) byla popsána snižující se intrapopulační genetická diverzita směrem od západu na východ Litvy, což podporuje šíření jasanu směrem na severovýchod z jižních refugií. Typickým znakem této skupiny populací je vysoký pozitivní koeficient inbreedingu (Hebel *et al.*, 2006; Ferrazzini *et al.*, 2007; Fussi a Konnert, 2014), který je ovšem podle některých autorů u jasanu nadhodnocen kvůli vysokému podílu nulových alel (Tollefsrud *et al.*, 2016). Druhou skupinou jsou populace, nacházející se v jihovýchodní Evropě na Balkánském poloostrově a ve Skandinávii. Tyto populace mají velmi omezenou genetickou diverzitu v rámci populace, ale velkou genetickou diferenciací mezi jednotlivými populacemi, čímž dochází ke vzniku různorodých demů (skupiny jedinců s jednotným genofondem), na rozdíl od první skupiny, kde se dá vylížit víceméně jenom jeden dem (obr. 3) (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004; Tollefsrud *et al.*, 2016). Pro jihovýchodní část Evropy to může být vysvětleno existencí dvou hlavních refugií na západě a východě Balkánského poloostrova, kdy měli autochtonní porosty díky adaptaci na lokální podmínky konkurenční výhodu, což omezilo tok genů mezi populacemi z různých refugií. Druhým vysvětlením může být geografická členitost území (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004). Do Skandinávie se rozšířil jasan pravděpodobně jedinou migrační cestou z Balkánu, což

dokládá velmi podobná genetická struktura, kterou je možné nalézt u populací z jihovýchodní Evropy, především výskyt podobných alel SSR markerů cpDNA (Tollefsrud *et al.*, 2016). Rozmezí těchto dvou skupin lze nalézt například v Bosně a Hercegovině, kde v západní části země byly populace s charakteristikami středoevropské skupiny a v jihovýchodní části země byla genetická struktura ovlivněna Balkánskými, silně diferenciovanými skupinami (Ballian *et al.*, 2008).

Při studiu markerů cpDNA byla objevena odlišná genetická struktura evropských populací než u nDNA. Na cpDNA, především u čeledi olivovníkovité, probíhají mutace v relativně malé míře (Besnard *et al.*, 2002). Diverzita alel u cpDNA odráží spíše příslušnost jednotlivých alel k daným refugiím, což způsobuje nízkou genetickou diverzitu a vysokou diferenciaci mezi jednotlivými populacemi, pocházejících z různých refugií. Zajímavostí je uniformita jihovýchodních a Skandinávských populací, u kterých byl objeven víceméně pouze jeden haplotyp, což nekoresponduje s výsledky studie nDNA (Heuertz, Fineschi, *et al.*, 2004; Tollefsrud *et al.*, 2016).



Obrázek 3: Genetická struktura jasanu v Evropě na základě analýzy nDNA. Na obrázku jsou zobrazeny jednotlivé demy. Ve střední a západní Evropě existuje víceméně pouze jeden dem, a naopak na jihovýchodě Evropy a ve Skandinávii se vyskytuje velké množství různých demů (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004)

3.1.7 Současné hrozby

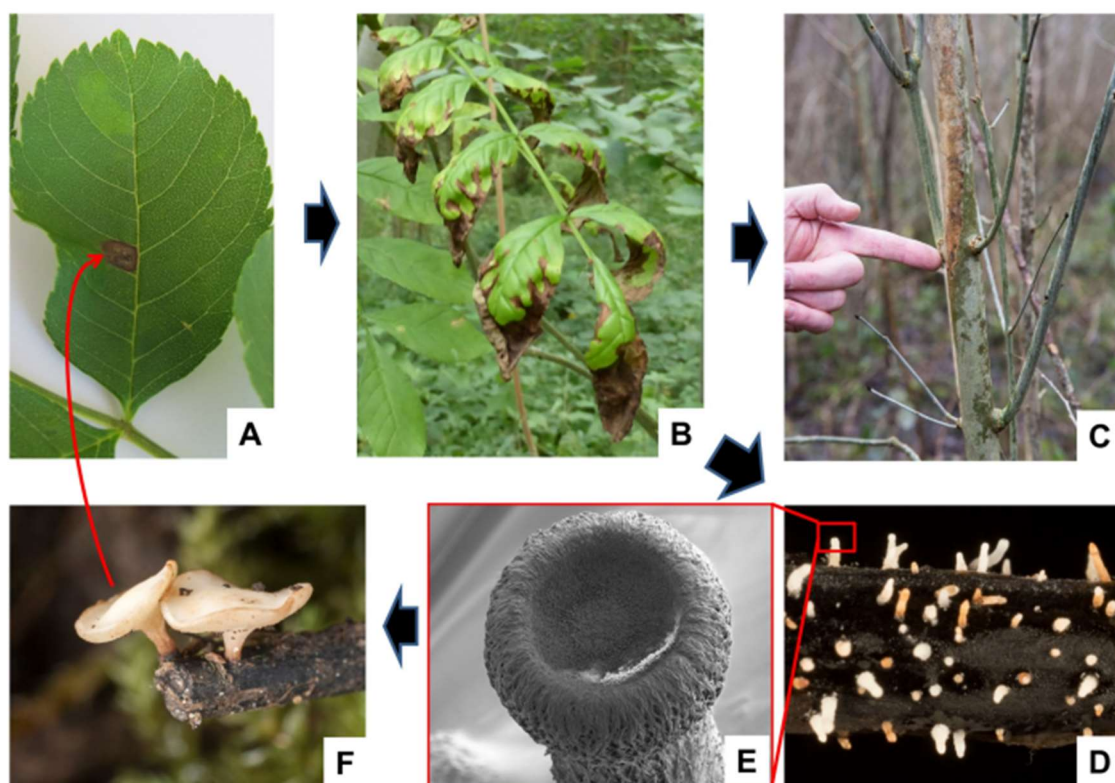
Existuje velké množství patogenů a škůdců, napadající lesní dřeviny. Jasan je například napadán fytoftorou (*Phytophthora spp.*), padlím jasanovým (*Phyllactinia fraxini*), rezavcem štětinatým (*Inonotus hispidus*), lýkohubem zrnitým (*Hylesinus crenatus*) nebo lýkohubem jasanovým (*Hylesinus fraxini*) (Gregorová *et al.*, 2006). Žádný z těchto patogenů nezpůsobuje velkoplošné kalamity a nepředstavují významné riziko pro celkový zdravotní stav jasanových porostů. Proto jasanové porosty až do devadesátých let minulého století prosperovaly, a dokonce se jasan považoval za expanzivní druh (Rozsypálek *et al.*, 2017). V roce 1992 bylo v Polsku a Litvě pozorováno velkoplošné chřadnutí a odumírání jasanů (Queloz *et al.*, 2011) a v roce 2001 bylo poprvé identifikováno anamorfní stádium patogenu, způsobující chřadnutí a odumírání jasanu (Kowalski, 2001), později pojmenováno *Chalara fraxinea* (Kowalski, 2006). Jako teleomorfní stádium patogenu byl v následujících letech označen *Hymenoscyphus albidus*, což je saprofytický druh, který se minimálně od roku 1850 běžně vyskytuje na opadu jasanu a který se nikdy neprojevoval jako patogen, který by snižoval vitalitu stromů (Kowalski a Holdenrieder, 2009). Proto byly provedeny molekulární analýzy vzorků ze stromů, projevující symptomy chřadnutí. Ty objevily dva morfologicky nerozeznatelné druhy, které se pouze lišily drobnými rozdíly na úrovni molekulární biologie a virulencí vůči jasanu. Jeden druh byl určen jako saprofyt *H. albidus* a druhý, více virulentní druh byl pojmenován *H. pseudoalbidus* (Queloz *et al.*, 2011). Později bylo zjištěno, že stejný patogen se vyskytuje v Asii, kde se jedná o saprofytický druh, napadající jasan mandžuský (*Fraxinus mandshurica*) nebo jasan čínský (*Fraxinus chinensis*) a nazývá se zde *Lambertella albida* (Zhao *et al.*, 2013). Do Evropy se pravděpodobně zavlekl se sadebním materiálem nebo výrobky ze dřeva, což je u invazivních patogenů běžné. Z důvodu rozhodnutí mezinárodního botanického kongresu IBC, ohledně opuštění od unikátního pojmenovávání anamorfního a teleomorfního stádia jednoho druhu, byl stanoven jednotný název pro druh, způsobující chřadnutí a odumírání jasanu v Evropě jako *Hymenoscyphus fraxineus* a původní název *Hymenoscyphus pseudoalbidus* je považován za synonymum. V češtině se zažilo pojmenování voskovička jasanová. Ze svého epicentra se šíří nákaza kocentricky průměrnou rychlostí 30-70 km za rok, což je běžné u druhů, které se šíří větrem (Mckinney *et al.*, 2014; Børja *et al.*, 2017; Queloz *et al.*, 2017). Způsob šíření je ovšem ovlivněn i člověkem, především převážením sazenic a obchodem se sadebním materiálem

(Drenkhan *et al.*, 2017; Enderle *et al.*, 2017). V České republice byl poprvé potvrzen výskyt *H. fraxineus* v roce 2007, ovšem chřadnutí jasanu bylo pozorováno již od začátku tisíciletí, a zároveň byla nákaza potvrzena i na herbářových položkách z roku 2002. V dnešní době se již *H. fraxineus* vyskytuje po celé České republice, největší poškození je pozorováno v severovýchodní části republiky a klesá směrem na jihozápad, což podporuje šíření z epicentra v Polsku a Litvě (Jankovský a Holdenrieder, 2009; Rozsypálek *et al.*, 2017).



Obrázek 4: Chřadnoucí jasanu s patrnou defoliací korun

Životní cyklus *Hymenoscyphus fraxineus* je popsán na obrázku 5. Patogen se šíří výhradně askosporami, což jsou pohlavní spory, které jsou v létě unášeny větrem a dopadají na listy jasanu ztepilého. Šíření pomocí nepohlavních spor (konidií), což je běžné u podobných druhů, nebylo dosud prokázáno. Ovšem předpokládá se, že disponují určitou funkcí. Některé studie například předpokládají, že slouží jako spermatie (samčí rozmnožovací buňky), čímž zajišťují rozmnožování mezi různými kmeny a napomáhají úspěšné invazi na nová území (Gross *et al.*, 2012). Po dosednutí askospor na list, začínají spory klíčit a patogen progresivně prorůstá listem a způsobuje nekrózu jeho pletiv. Na podzim napadené listy opadají a patogen přežívá v opadance do léta příštího roku (Downie, 2017). Následně se na řapících objevují apothecia, což jsou bělavé miskovité plodničky (Wey *et al.*, 2016). Z dospělých apothecií se za pomoci větru do okolí šíří velké množství askospor, kterých může být až 100 000 na metr krychlový vzduchu (Chandelier *et al.*, 2014). Askospory dopadají na zdravé listy a cyklus se opakuje.



Obrázek 5: Životní cyklus *H. fraxineus*. A) Askospory, dopadající v létě na listy jasanu, vytvářejí postupně nekrotické léze. B) Mycelium hub se postupně šíří po řapících. C) Mycelium se může dostat až do dřevních částí stromu a může zamezit výměně živin mezi listy a zbytkem stromu. D) Listy opadají převážně na podzim a vytváří se na nich zárodky plodnic, E) které jsou zvětšeny pomocí mikroskopu. F) Z nich se postupně stanou zralé plodnice, které vypouštějí do vzduchu askospory, čímž se uzavírá cyklus (Downie, 2017)

Na rozdíl od příbuzného druhu *H. albidus*, *H. fraxineus* se šíří listem velmi rychle, a proto se může mycelium houby dostat přes listovou stopu do dřevních pletiv (výhony a větve), ve kterých v podzimních a zimních měsících vznikají nekrózy, které zamezují rozvádění živin v rámci stromu. To postupně vede k řídnutí korun (obrázek 4) a postupnému odumírání stromu v průběhu let v důsledku vyčerpání. Na postupující nákazu strom nejčastěji reaguje tvorbou preventivních výhonů, tzv. vlků, typických pro své shlukovité olistění, které paradoxně mohou urychlit odumření stromu v důsledku usnadnění přístupu patogenu do dřevních pletiv (Havrdová *et al.*, 2013).

Hymenoscyphus fraxineus je schopný způsobit odumření jedince pouze svým působením. Ovšem některé studie naznačují, že role *H. fraxineus* je spíš jako prvotní patogen, oslabující vitalitu stromu. Oslabený strom následně napadnou sekundární patogeny, jako např. václavky *Armillaria gallica* a *A. cepistipes* nebo lesklokorka ploská (*Ganoderma applanatum*). Sekundární patogeny způsobují rozvinutí dalších nekroz, včetně nekrózy kořenových krčků, což zapříčiní rozvinutí hniloby kořenů, což dále uspíší odumření celého stromu (Skovsgaard *et al.*, 2010; Lenz *et al.*, 2016; Enderle *et al.*, 2019; Madsen *et al.*, 2021). Patogen se může šířit i do semen, kam se dostává přímo askosporami nebo prorůstáním mycelia z napadených výhonů (Cleary *et al.*, 2013). Odumíráním jsou nejvíce postiženy mladé porosty do dvaceti let věku, u kterých nákaza postupuje velmi rychle a mortalita se blíží 100 % (Madsen *et al.*, 2021). To způsobuje problémy při obnově porostů (Černý, 2011). Dále byla prokázána souvislost mezi nadmořskou výškou a závažností symptomů, která se stoupající nadmořskou výškou klesá a u porostů, rostoucích nad 600 m n. m. lze vypočítat významné snížení působení patogenu (Havrdová *et al.*, 2016). Stromy, rostoucí v zápoji v lese jsou méně ohroženy než solitérní stromy (Heinze *et al.*, 2017), což může souviset s vyšší vlhkostí, která se drží v zapojeném porostu (Enderle *et al.*, 2019). Na druhou stranu se v některých studiích prokázalo, že suché a teplé mikroklima je nepříznivé pro rozvoj nákazy, což by znamenalo, že globální změna by mohlo zmírnit působení nákazy (Grosdidier *et al.*, 2018).

V minulosti byly zkoušeny aktivní opatření proti šíření patogenu jako například těžba napadených jedinců, likvidace infikovaných listů a větví nebo brzké výchovné zásahy, ale o jejich účinnosti někteří autoři spíše pochybují (Havrdová *et al.*, 2013; McKinney *et al.*, 2014; Skovsgaard *et al.*, 2017). Jedním z mála účinných aktivních opatření je regulace importu sadebního materiálu (Enderle *et al.*, 2019). V porostech

napříč Evropou se objevují jedinci, kteří nejeví známky nákazy i přes silný infekční tlak ve svém okolí. Tito jedinci se vyskytují v různých podmínkách a na různých stanovištích, a proto se lze domnívat, že je geneticky podmíněná na individuální úrovni (Havrdová *et al.*, 2016; Downie, 2017; Enderle *et al.*, 2019). Proto se zdá být vyhledávání rezistentních a tolerantních jedinců a celkově zkoumání genetické diverzity a mechanismu rezistence jako nejnadějnější metoda, vedoucí k vyřešení problému s odumíráním jasanu. Navíc evropské populace *H. fraxineus* jsou geneticky velmi homogenní, s velmi nízkou diverzitou. Některé studie dokonce naznačují, že celý genofond evropských populací je tvořen z genomu původních dvou haploidních jedinců, což způsobuje velmi silný efekt zakladatele (McMullan *et al.*, 2018). Zároveň se zdá, že se genetická struktura populací v Evropě příliš nemění, jelikož neexistuje téměř žádná diferenciacce mezi populacemi, v původním epicentru nákazy a na nových lokalitách (Enderle *et al.*, 2019), což naznačuje že nedochází k výrazné adaptaci patogenu. To podporuje smysluplnost geneticky a šlechtitelsky zaměřeného směru výzkumu.

Nejsnazší metodou identifikace dlouhodobě rezistentních jedinců je jejich dlouhodobý monitoring v terénu, při kterém je posuzováno procentuální řídnutí korun (Menkis *et al.*, 2020). Alternativně proběhly výzkumy, které na základě sekvenace genomu jednotlivých jedinců objevily SNP markery, které korelovaly s mírou rezistence jednotlivých stromů vůči nákaze. Při použití nejspolehlivějších markerů byly vytvořeny modely, schopné predikce náchylnosti stromu vůči nákaze s vysokou přesností (Sollars *et al.*, 2017; Stocks *et al.*, 2019). Mechanismus tvorby rezistence nebyl dosud spolehlivě prokázán. Některé studie naznačují, že rezistence souvisí s fenotypovými znaky, jakým je například doba opadu listu. Při brzkém opadu listu se totiž nestihne patogen dostat do větví a výhonů, což zamezí tvorbu nekrotizace ve dřevě (McKinney *et al.*, 2011). Jiné studie naznačují spíše biochemický charakter rezistence. Za pomoci metod transkriptomiky (zkoumání genů, které jsou aktivně přepisovány do mRNA) byla pozorována zvýšená exprese genů, kódujících proteiny a enzymy, které se podílí na regulaci koncentrace sekundárních metabolitů. Těmito metabolity jsou například iridoid glykosidy, což jsou látky, vyskytující se u čeledi Oleaceae, které se podílejí na obraně rostlin proti herbivorům, ale na druhou stranu i podporují růst hub. Proto u jedinců s nižší koncentrací iridoid glykosidů dochází k větší rezistenci vůči *H. fraxineus* (Sollars *et al.*, 2017). Biochemický charakter rezistence naznačuje i studie Sollars a Buggs (2018), která zkoumala metylaci DNA, což je mechanismus, který například

ovlivňuje expresi některých genů. V této studii byla objevena zvýšená exprese genů, kódujících proteiny a enzymy snižující osmotický stres buněk a tvorbu glykosidických vazeb, což souvisí přímo s koncentrací iridoid glykosidů.

Dalším potenciálním rizikem pro jasan ztepilý je brouk z čeledi *Buprestidae* – *Agrilus planipennis*. Tento druh je původní v severovýchodní Asii, kde napadá především místní druhy jasanu a výjimečně i ostatní druhy jako například ořešáky nebo jilmy (Liu *et al.*, 2003). *A. planipennis* je většinu svého života schován pod kůrou stromu. Z vajíček (obr. 6 a), nakladených v kůře hostitelského stromu se líhnou larvy (obr. 6 b), které prochází čtyřmi instary a živí se primárně na lýku a kambiu, čímž vytvářejí typický požerek ve tvaru písmene S (obr. 6 e) a před zimou si vytvářejí ve dřevě komůrky pro přezimování ve formě plně vyvinutých larev nebo kukel. Ovšem při velkém množství larev zkonzumují larvy po určité době veškeré lýko i kambium a začínají se živit na dřevě už dřívějších vývojových fázích, čímž snižují jeho hodnotu. Strom opouštějí pouze dospělci (obr. 6 c), kteří provádějí úživný žír na listech hostitelského stromu, po jednom týdnu se dovyvine rozmnožovací orgány a začíná rozmnožování (Wang *et al.*, 2010). Důvodem k obavám je jeho invazivní potenciál a vysoká mortalita stromů, kterou způsobuje. V roce 2002 byl poprvé potvrzen jeho výskyt v severní Americe a od té doby byl zaznamenán v 38 státech USA a třech provinciích Kanady (*Emerald Ash Borer Network*, ©2023). V roce 2003 byl poprvé zaznamenán v Evropě, konkrétně Moskvě a od té doby se rozšířil minimálně do jedenácti oblastí evropské části Ruské federace (Orlova-Bienkowskaja, 2014). Při současné rychlosti jeho šíření je pravděpodobné, že v následujících desetiletích se rozšíří do střední a západní Evropy, kde spolu s patogenem *Hymenoscyphus fraxineus* způsobí rozpad celých porostů (Valenta *et al.*, 2017). I když se zdá, že rychlost odumírání jasanů ovlivňuje stanoviště, tak při výzkumech v amerických státech Ohio a Michigan, nacházejících se poblíž epicentra šíření *A. planipennis*, bylo zjištěno, že bez ohledu na stanoviště dosáhla mortalita po šesti letech 99 %. Zároveň se na těchto plochách nacházelo nepatrné nebo žádné zmlazení (Knight *et al.*, 2013; Klooster *et al.*, 2014). Odumírání způsobuje přerušení distribuce živin ve stromě, čímž dochází k postupnému chřadnutí jedince až dojde k úplnému odumření (Wang *et al.*, 2010). Prevence je nejsilnější nástroj, a proto je potřeba zamezit jeho zavlečení do kontinentální Evropy, například kontrolou převáženého sadebního materiálu nebo dřevěných výrobků. Zároveň je nutné využít poznatky z Ruska a severní

Ameriky, abychom byli připraveni s ním efektivně bojovat při neúspěšné prevenci (Valenta *et al.*, 2017).



Obrázek 6: a) vajíčka, b) larva, c) dospělec, d) typický závrť ve tvaru D, e) požerok, f) odumřelé stromy po napadení *A. planipennis* (Valenta *et al.*, 2017)

3.1.8 Enviromentální funkce a využití v průmyslu a sadovnictví

Jasan je odolný vůči bořivému větru, a proto se často používá jako větrolam. Kromě toho je vhodný do městské zástavby, alejí a parků. V těchto oblastech je dokonce třetím nejvíce zastoupeným stromem po javorech a lípě (Rozsypálek *et al.*, 2017). Jasan je významným článkem lesa, rostoucího poblíž vodních toků, kde plní významnou vodohospodářskou funkci. Již v 15 letech má velmi rozvinutý kořenový systém a je schopný zpevňovat a stabilizovat břehy řek a jiných vodních toků. Kromě toho dokáže ve vegetační sezoně vytranspirovat až 200 litrů vody denně, čímž vykonává významnou desukční funkci. Tyto vlastnosti způsobují, že je jasan považován jako vhodná melioračně zpevňující dřevina (Šimíček, 1999). Mimo to je ceněn v lesnictví, jelikož produkuje velmi kvalitní opad, čímž zkvalitňuje půdu ve svém okolí, a také díky své robustnosti, toleranci vůči suchu, rychlému růstu a velké výmladnosti (Enderle *et al.*, 2019).

Jasanové dřevo je ceněno díky své tvrdosti, pružnosti a houževnatosti a považuje se za velmi kvalitní materiál. Jedna z jeho výhod je, že se dá vybrousit do téměř hladkého povrchu, což je výhodná vlastnost pro nábytkářství a stavebnictví. Dřevo má velké využití a používá se například na výrobu nábytku, dých, hudebních nástrojů, sportovních pomůcek a náčiní (rakety, luky, lyže nebo pálky), násad, topůrek, podlahových krytin a schodů (Rozsypálek *et al.*, 2017). Obzvláště ceněno je dřevo s vlnitými letokruhy a tzv. očkované dřevo (Úřadníček *et al.*, 2014). Jasanové dřevo je součástí lidových tradic, kdy se například využívá v lidovém truhlářství (Rozsypálek *et al.*, 2017) nebo v irském národním sportu hurling nebo jeho variantě pro ženy camogie, kde se využívá páčka výhradně z jasanového dřeva, zvaná hurl, která je znázorněna na obrázku 7 (McCracken *et al.*, 2017).

V sadovnictví se využívá velké množství kultivarů. Příklady jsou kultivary *Diversifolia* (jednolistý jasan), *Pendula* (smuteční jasan) nebo *Nana*, který se využívá ve stromořadí městských a příměstských lesů (Musil a Möllerová, 2005; Úřadníček *et al.*, 2014).



Obrázek 7: Jasanová páčka hurl (Heritage Hurleys, 2009)

3.2 Molekulární biologie

3.2.1 Nukleové kyseliny

Pro uchování a přenos genetické informace musí být daná molekula velmi stabilní, aby přenášená informace zůstala mezi velkým počtem generací téměř nezměněna, ale zároveň nesmí být stabilní natolik, aby neumožnila přirozenou selekci v reakci na podmínky prostředí. Zároveň musí být variabilní, aby byla schopna kódovat jedinečný znak. Molekuly, které splňují tyto požadavky se nazývají nukleové kyseliny, konkrétně především deoxyribonukleová kyselina (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA) (Eriksson *et al.*, 2006). Nukleové kyseliny jsou biopolymery, skládající se z velkého rozpětí (od desítek až po miliony) jednodušších látek, tzv. nukleotidů. Nukleosid se skládá z molekuly cukru pentózy a dusíkaté báze a fosforylací (přidáním jednoho nebo více zbytků kyseliny fosforečné) vzniká z nukleosidu nukleotid. Existuje několik typů DNA a RNA. Nejvýznamnější typy RNA jsou mRNA (mediátorová), tRNA (transferová) a rRNA (ribosomální), které se dělí především podle funkce v živém organismu. DNA se dělí především podle svého umístění v buňce na jadernou DNA (nDNA) a DNA semi-autonomních organel: chloroplastovou cpDNA a mitochondriální mtDNA.

Struktura nukleových kyselin se dá popsat na několika úrovních. Primární struktura je lineární uspořádání nukleotidů v rámci celé molekuly nukleové kyseliny. Obvykle se schematicky znázorňuje jako řada písmen, odpovídajících jednotlivým dusíkatým basím a konvenčně se zapisuje od 5' konce do 3' konce. Variabilita na úrovni dusíkatých bazí je základem kódování jednotlivých genů. Sekundární struktura popisuje geometrické uspořádání nukleotidových řetězců. RNA tvoří spíše krátké jednovláknové struktury, které se mohou spojovat a vytvářet složitější útvary, například kličky, pseudouzly nebo vlásenky (Staple a Butcher, 2005). DNA je typická dvoušroubovicí. Nejběžněji se v přírodě vyskytuje pravotočivá dvoušroubovice B-DNA, která je znázorněna na obrázku 8. Existují ovšem i jiné typy dvoušroubovice jako například A-DNA nebo levotočivá Z-DNA, výjimečně může vzniknout i hybridní vlákno DNA-RNA (Shaw a Arya, 2008). Řetězce nukleových jsou spojeny vodíkovými můstky. Terciální struktura popisuje prostorové uspořádání molekuly nukleové kyseliny. U DNA dochází běžně k nadšroubovicovému vinutí (supercoilingu), při němž dochází ke šroubovitému stáčení již existující dvoušroubovice, čímž vzniká nadšroubovice (superhelix). Nadšroubovicové vinutí může probíhat ve směru stáčení dvoušroubovice, kdy se nazývá pozitivní vinutí nebo proti směru stáčení dvoušroubovice (negativní vinutí)

(Gilbert a Allan, 2014). Chromatin nebo ribozomy jsou typické příklady kvartérních struktur DNA. Kvartérní struktura DNA vzniká při interakci DNA s jinou molekulou DNA nebo molekulami jiných látek (například proteiny), čímž vznikají funkční útvary.



Obrázek 8: B-DNA, typ pravotočivé dvoušroubovice, která je v přírodě nejběžnější (White *et al.*, 2007)

Nukleová kyselina, v níž je zakódovaná informace pro tvorbu určitého peptidu, proteinu nebo funkční RNA (například tRNA) se nazývá kódující DNA, popřípadě RNA. Existují ovšem i nekódující oblasti nukleové kyseliny, kontroverzně nazývány „junk DNA nebo RNA“ (Gregory, 2005), jejichž funkce je například regulace genové exprese (Carroll *et al.*, 2008). Příklady nekódující DNA jsou například introny (nekódující oblasti genu), pseudogeny (geny, které ztratily schopnost genové exprese) nebo obzvláště významná satelitová DNA a její dvě podskupiny minisatelity a mikrosatelity. Satelitová DNA se skládá z tandemových repetitivních sekvencí a díky jejich vysoké variabilitě v počtu tandemových repetičích se používá k identifikaci jedinců nebo v genetických populačních studiích (Eriksson *et al.*, 2006). Poměr kódujících a nekódujících nukleových kyselin se u různých organismů liší.

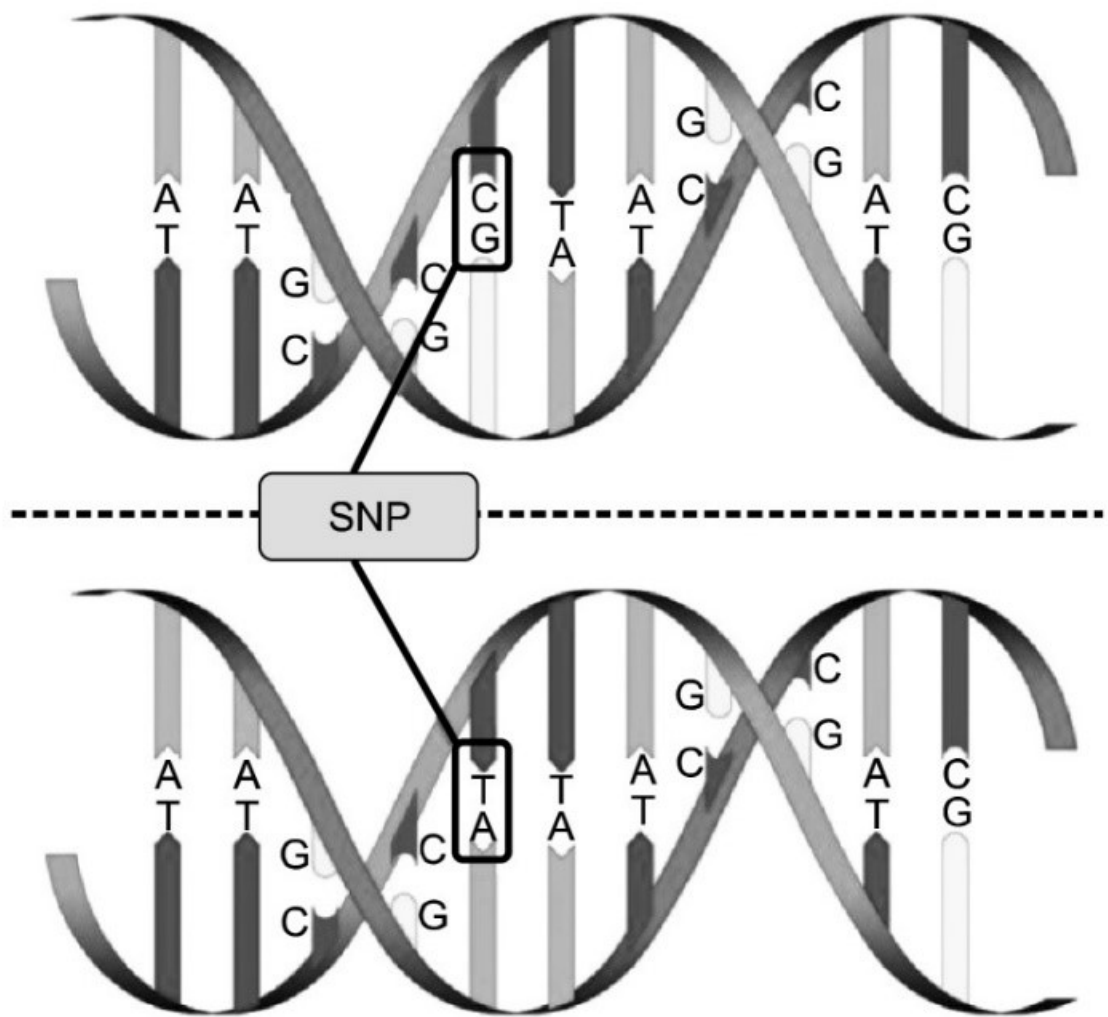
3.2.2 Genetické markery

Genetický marker je nástroj, který se používá k identifikaci jedince, většinou na základě variability konkrétního znaku, produktů genové exprese nebo samotné variability na úrovni sekvence DNA (Encyklopedia Britannica, 2018). Použitím genetického markeru lze zjistit genetickou příbuznost s ostatními zkoumanými jedinci. Toho se využívá například u studií populací, ke zjištění genetické diverzity na úrovni populací, ale i k posouzení míry odlišnosti mezi jednotlivými populacemi. Existují různé typy markerů, fungující na odlišných principech a každý typ markeru má své výhody i nevýhody. Ideálními vlastnostmi markeru je kodominance, což je schopnost odhalit heterozygoty a vysoká míra polymorfismu, díky které lze získat lepší informace o struktuře populací. Metody, používané k analýze genetických markerů by měly být levné a jednoduše použitelné, ale především by měly být jejich výsledky replikovatelné (White *et al.*, 2007).

Hlavními typy genetických markerů jsou markery morfologické, biochemické a molekulární. Principem morfologických markerů je variabilita pozorovatelných znaků a vlastností zkoumaného jedince a jejich mutací. Problémem morfologických znaků je především jejich dominantní charakter a ovlivnění subjektivním vnímáním pozorovatele (Jehan a Lakhanpaul, 2006). Biochemické markery jsou látky, které plní v organismu určitou funkci a disponují variabilitou většinou na strukturální úrovni. Biochemické markery mohou být například isozymy, terpeny nebo jiné sekundární metabolity. Z biochemických markerů se stále poměrně hojně využívají isozymy, což jsou enzymy se stejnou funkcí, ale odlišnou strukturou. Variabilita ve struktuře může být způsobena existencí několika alel na jednom lokusu nebo kódováním enzymu se stejnou funkcí různými geny. Zásadním problémem biochemických markerů je jejich nízký polymorfismus, ale také to, že se nemusí vyskytovat u všech druhů. Jejich výhodou, díky které se používají dodnes je jejich levné a nenáročné použití (Loxdale a Lushai, 1998). Molekulární markery jsou nejnovější skupinou genetických markerů a využívají polymorfismu na úrovni sekvence DNA, čímž umožňují prozkoumat celý genom včetně nekódující DNA, včetně DNA semiautonomních organel mtDNA a cpDNA, (Jehan a Lakhanpaul, 2006; Grover a Sharma, 2016). Variabilita molekulárních markerů může být na úrovni jednotlivých nukleotidů (SNP – single nucleotide polymorphism), v různém počtu tandemových repetíci sekvence několika nukleotidů (VNTR – variable number

tandem repeats) nebo způsobená tzv. indely, což jsou mutace způsobující přidání nebo odebrání určitého počtu nukleotidů z řetězce DNA (Vignal *et al.*, 2002).

Existuje velké množství typů molekulárních markerů. Především v dřívějších dobách byl hojně využíván například RFLP, využívající polymorfismu v délce fragmentů, vzniklých štěpením pomocí restrikčních enzymů. RFLP byl s objevem PCR nahrazen jinými markery (Grover a Sharma, 2016). RAPD je typ markeru, využívající náhodnou amplifikaci polymorfní DNA. Hlavní nevýhodou je dominantní charakter a obtížná replikovatelnost v jiných laboratořích. V dnešní době se využívají nejčastěji mikrosatelitové markery (SSR/STR) a nejmodernější markery založené na polymorfismu na úrovni jednoho nukleotidu (SNP). Mikrosatelity jsou sekvence DNA o velikosti jednoho až šesti nukleotidů, obvykle z nekódujících oblastí DNA, které se tandemově opakují (Eriksson *et al.*, 2006). Nejvíce jsou využívány repetice dinukleotidů, trinukleotidů nebo tetranukleotidů (Jarne a Lagoda, 1996). Mikrosatelity často podléhají mutacím a obtížně se replikují při syntéze DNA, čímž vzniká velké množství různých alel. Díky tomu mají velmi vysoký polymorfismus (Jehan a Lakhanpaul, 2006; Grover a Sharma, 2016), kvůli kterému nacházejí uplatnění v populačních studiích, například při sledování toku genů v populaci (Eriksson *et al.*, 2006) nebo při mapování genomu (Zhang *et al.*, 2008). Dalšími výhodami jsou jejich kodominantní charakter, univerzálnost a snadná replikace výsledků (Grover a Sharma, 2016). Největší nevýhodou je časová a finanční náročnost vývinu nových kvalitních PCR primerů (White *et al.*, 2007). SNP jsou místa v genomu, ve kterých dochází k záměně jednoho nukleotidu, což je znázorněno na obrázku 9. Definice termínu SNP není pevně daná, ale obecně přijímaná podmínka, aby SNP byl považován jako marker, je minimálně 1% frekvence výskytu alely ve všech populacích (Brookes, 1999; Vignal *et al.*, 2002). Jelikož existují čtyři typy nukleotidů s různými typy dusíkatých bází, tak mohou teoreticky existovat v daném místě čtyři alely. V praxi se vyskytují v daném místě zpravidla pouze dvě alely, a proto se SNP považují za bialelické kodominantní markery (Vignal *et al.*, 2002). To způsobuje jejich nízkou variabilitu na úrovni lokusu, která je vynahrazena jejich vysokou abundancí v rámci celého genomu. Jejich nízká schopnost mutovat je předurčuje k použití v evolučních studiích (Jehan a Lakhanpaul, 2006). Většinou se SNP vyskytují v nekódujících oblastech, ale vyskytují se i v genech, čímž mohou způsobit vznik odlišného fenotypu (Grover a Sharma, 2016).



Obrázek 9: Příklad SNP, konkrétně C-T polymorfismu (Doo a Kim, 2015)

3.3 Laboratorní metody

3.3.1 Polymerázová řetězová reakce

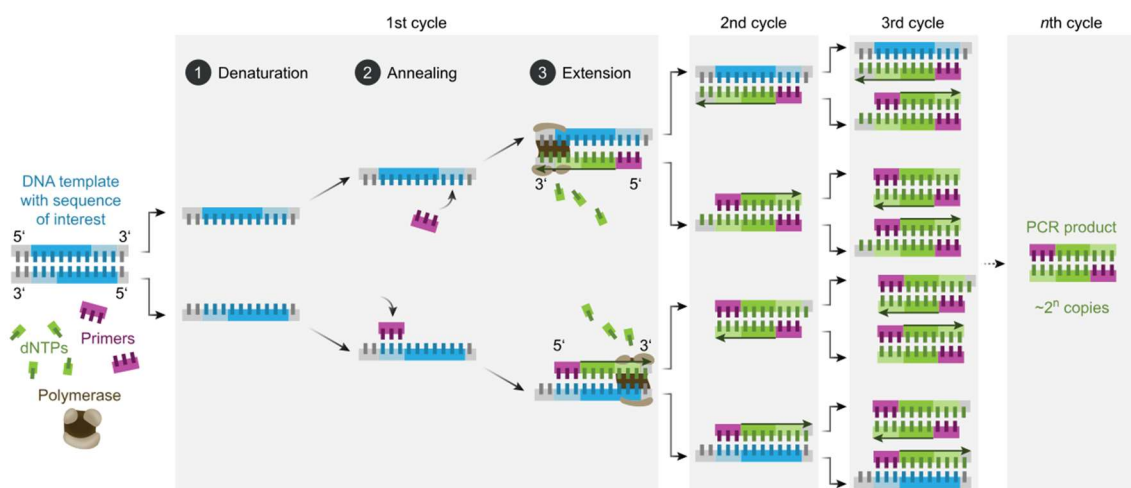
Při provádění genetických analýz většinou disponujeme velmi malým množstvím vstupní DNA, ale většina detailních analýz vyžaduje relativně velké množství DNA. V dřívějších dobách se k replikaci izolovaných fragmentů DNA využívalo klonování a zvětšování v plazmidech nebo jednobuněčných hostitelích (White *et al.*, 2007). V dnešní době se masivně využívá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), která byla objevena roku 1983 Kary Mullisem, využívající principu změny teplot v několika cyklech, čímž dojde k amplifikaci fragmentu DNA (Mullis, 1990). Touto metodou lze levně a rychle vytvořit miliardy kopií i z velmi malého fragmentu DNA. Kromě toho jde provádět u velkého množství vzorků zároveň. Kromě samotné amplifikace DNA je možné využít PCR ke kvantifikaci množství zájmové sekvence DNA nebo k analýze genové exprese. Na využití PCR jsou též založeny některé genetické markery jako RAPD nebo mikrosatelity, jejichž principem je variabilita v délce amplifikovaných fragmentů. Postupem času vznikly další varianty PCR. qPCR za pomoci fluorescenčního barviva umožňuje sledovat průběh a měřit PCR produkty v reálném čase. RT-PCR využívá reverzní transkripce, čímž umožňuje provést PCR, při použití RNA jako vstupního vzorku.

Před samotným započítím PCR je nutné připravit do zkumavek reakční směs. Většinou se používají mikrotitrační desky, ve kterých jsou zkumavky umístěny. Reakční směs se skládá ze vstupní DNA, vybraných DNA primerů, DNA polymerázy, nukleotidů ve formě deoxyribonukleotid trifosfátů a pufru, který většinou obsahuje hořčičnaté ionty. Lze též používat předpřipravené směsi, do kterých se přidají pouze primery a vstupní DNA.

Schéma PCR je znázorněno na obr. 10. Nejprve se směs zahřeje na teplotu kolem bodu varu na 20-30 sekund, čímž dojde k denaturaci DNA, tedy rozpojení dvoušroubovice za vzniku dvou řetězců jednovláknové DNA. Poté je směs zchlazena a dochází k nasedání primerů na konkrétní část vstupní DNA. Primer je oligonukleotid, který je komplementární k určité části vstupní DNA a vytváří místo, na které se může navázat DNA polymeráza. Teplota, vhodná pro nasedání primerů je specifická pro použitý primer a probíhá průměrně 30 sekund. Po nasednutí primerů dochází již k samotné syntéze DNA, při které na primery nasedá DNA polymeráza, která

dosyntetizuje komplementární řetězec. Optimální teplota pro Taq polymerázu je 72 °C (Genetic Science Learning Center, 2018) a délka amplifikační fáze závisí na cílové délce fragmentu. Tento cyklus se zpravidla opakuje 30-50krát. Výsledným produktem PCR je fragment dsDNA s cílovou sekvencí, čehož je dosaženo použitím forward a reverse primeru, které na začátku a konci ohraničují cílovou sekvenci DNA.

Velké množství studií zkoumá u jednoho vzorku větší množství lokusů. Je možné zkoumat v rámci jedné reakce pouze jeden lokus, ale to je časově a finančně náročné. Proto se vytváří tzv. multiplexové reakce, při kterých se při jedné PCR reakci používá najednou několik odlišných primerů. Problémem u multiplexových reakcí jsou odlišné teploty jednotlivých primerů, nutných k jejich nasednutí na cílovou sekvenci DNA a podobná délka fragmentů, vzniklých amplifikací různých primerů. Podobná délka fragmentů se dá snadno vyřešit značkováním jednotlivých primerů různými fluorescenčními barvami, čímž se dají při následné analýze vzájemně odlišit. Nejproblematictější bývá optimalizace multiplexové reakce, při které se musejí experimentálně vybrat vhodné primery a zjistit teplota, při které dochází k bezproblémové amplifikaci na všech lokusech. Problém s odlišnými teplotami pro nasedání primerů se dá částečně eliminovat použitím vhodných PCR reagensií, například předpřipraveným Type-it Multiplex PCR Master Mixem od společnosti Qiagen, jehož použitím se zároveň zrychlí a usnadní optimalizace.



Obrázek 10: Schéma PCR (Wikipedia, 2023)

3.3.2 Elektroforéza

Elektroforéza je laboratorní metoda, při které dochází k separaci látek na základě jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli (Lee a Bahaman, 2012). Existuje několik typů elektroforézy, ale zdaleka nejčastějším typem je gelová elektroforéza, která je vhodná pro molekuly, jakými jsou sacharidy, bílkoviny a nukleové kyseliny. Nejeftektivnější je použití agarózového gelu (Lee *et al.*, 2012). Principem gelové elektroforézy je pohyb nabitých částic póry gelu ve stejnosměrném elektrickém poli, při kterém dochází k jejich separaci. Rozdílná mobilita může být způsobena mj. různou molekulovou hmotností nebo mírou elektrického náboje jednotlivých molekul (Rabindra a Raju, 2012). Gelová elektroforéza probíhá většinou v přístroji ve tvaru vaničky, ve které je ponořen gel v pufrčním roztoku, kterým bývá TBE (Tris/Kyselina boritá/EDTA) nebo TAE (Tris/Kyselina octová/EDTA). Gel se připravuje vařením směsi agarózy a TBE/TAE, v různém poměru, což ovlivňuje výsledné vlastnosti gelu. Do gelu se obvykle přidává interkalační barvivo (např. Ethidium bromid), které při vystavení UV světlu fosforeskuje, čímž napomáhá vizualizaci výsledků elektroforézy. Do nosiče s neztuhlým gelem se zasune hřebínek a gel se následně nechá ztuhnout. Po ztuhnutí gelu se hřebínek vysune a zanechá po sobě v gelu jamky. Do jamek se vnáší směs vzorku a barviva, které napomáhá sledovat pohyb vzorku v gelu a jeho usazení na dno jamky. Celá vanička je nakonec připojena ke zdroji elektrického napětí.

Elektroforézou je možné zjistit pouze relativní rozdíly v pohyblivosti molekul. Větší molekuly se pohybují obtížněji než menší, a proto se po elektroforéze nacházejí největší molekuly nejbliže jamkám, a naopak nejmenší molekuly nejdále od jamek. Při použití DNA žebříčku, který obsahuje fragmenty o známé délce, jsme schopni kvantifikovat délku separované DNA.

Speciálním typem elektroforézy je fragmentační analýza v sekvenátoru. Ta umožňuje rychlou analýzu velkého množství vzorků najednou. Kapilárou probíhají vzorky, označeny fluorescenční barvou, spolu s obarveným vzorkem standardních délek, pracující na podobném principu jako DNA žebříček. Když v kapiláře dosáhnou DNA fragmenty detektoru, dojde k excitaci fluorescenčního barviva, čímž dojde k emisi světla, které zaznamená kamera. Za pomoci softwaru jsou následně interpretovány výsledky, což zahrnuje výpočet délky a kvantity jednotlivých fragmentů.

4 Metodika

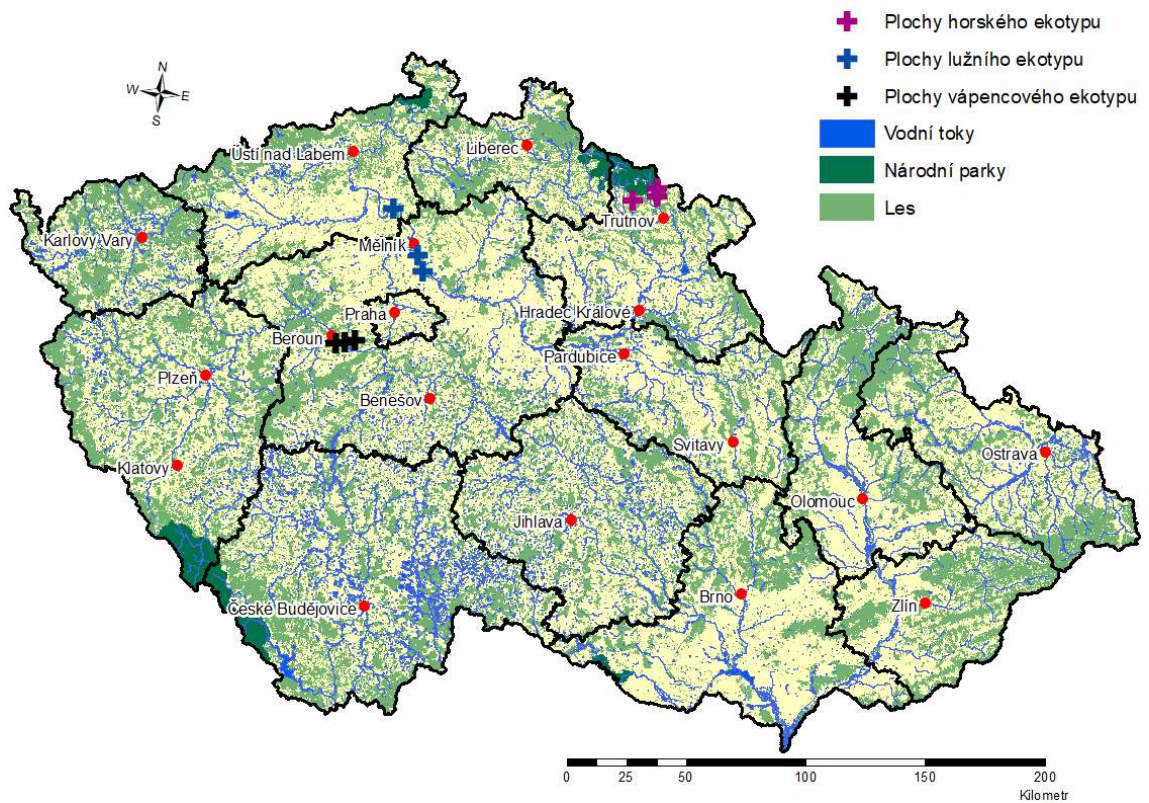
4.1 Výběr zájmových území a sběr vzorků

Vzorky byly odebrány z lužního, vápencového a horského ekotypu. V rámci každého ekotypu byly vybrány 3 porosty, ve kterých proběhl sběr vzorků. Vhodnost porostů pro sběr vzorků byla posouzena několika faktory. Nejdůležitějším faktorem byla příslušnost porostu k danému ekotypu. Samozřejmě v porostu muselo být dostatečné zastoupení jasanu ztepilého, a zároveň byly preferovány porosty s dobrou dostupností letorostů s listy a pupeny. Vzorky byly odebírány ze stromů, vzájemně vzdálených minimálně 25-30 m z důvodu omezení pravděpodobnosti, že stromy pocházejí ze stejného mateřského stromu, a z podstaty přímé příbuznosti budou vykazovat vysokou míru genetické podobnosti. Proto bylo nutné, aby měl porost dostatečnou plochu, aby bylo možné odebrat dostatečné množství vzorků. Byly preferovány porosty, které jsou od dalších porostů, co nejvíce vzdáleny, za účelem získat hodnotnější informace o celkové genetické diverzitě jasanu ztepilého. Kromě toho je možné vzájemně porovnat jednotlivé porosty v rámci jednoho ekotypu a zjistit případnou unikátní genetickou strukturu daného ekotypu.

Před výběrem konkrétních lokalit byla provedena rešerše odborné literatury, na základě, které byly zjištěny charakteristiky jednotlivých ekotypů a určeny oblasti ve kterých se ekotypy nacházejí. Volně dostupné mapové podklady (např. ortofoto, geologické mapy, mapa dřevinného složení nebo porostní mapy, zpracované v rámci LHO), případně konkrétní data (především LHP) od vlastníků lesa byly použity pro výběr konkrétních porostů. Při tomto výběru se hodnotily výše popsané faktory.

4.1.1 Vápencový ekotyp

Porosty, na kterých byly sebrány vzorky stromů, příslušných k vápencovému ekotypu jsou zobrazeny na obr. 11 černým křížem. Nacházejí se v CHKO Český kras a na ploše č. 2 se zároveň nachází NPR Karlštejnsko (obr. 12). Jedná se především o lokality na teplých stanovištích s devonským vápencovým podložím. Kromě jasanu se zde vyskytovaly nejhojněji duby (*Quercus spp.*) a javor babyka (*Acer campestre*). Častým zástupcem květeny byl například jaterník podléška (*Hepatica nobilis*) nebo svízel vonný (*Galium odoratum*).



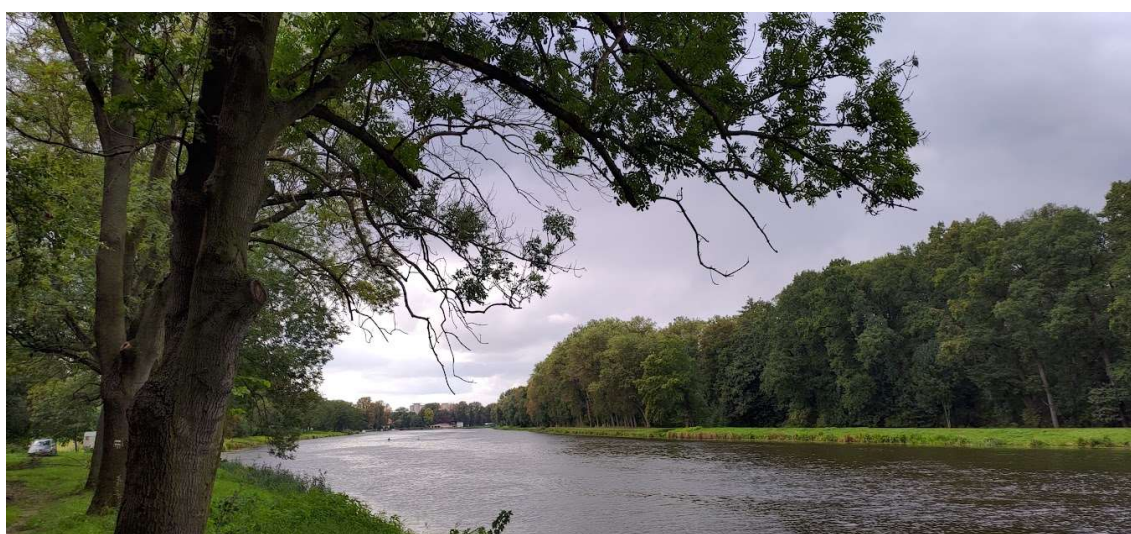
Obrázek 11: Rozmístění jednotlivých zkoumaných ploch v rámci České republiky. Černým křížem jsou označeny plochy vápencového ekotypu, které se nacházejí na území CHKO Český kras. Modrý kříž značí porosty lužního ekotypu, rostoucí v blízkosti řeky Labe. Fialový kříž označuje plochy s porosty horského ekotypu, v rámci KRNAP. Zdroj mapových dat: (Český úřad zeměměřický a katastrální, 2022).



Obrázek 12: Příklad typického stanoviště vápencového ekotypu z plochy č. 2 v rámci NPR Karštejsko.

4.1.2 Lužní ekotyp

Plochy lužního ekotypu byly vybrány v rámci lužních lesů a lesů nacházejících se v těsné blízkosti řeky Labe (viz obr. 11, kde jsou označeny modrým křížem). Porosty jsou ovlivňovány především vodním režimem řeky Labe a typické stanoviště lužního ekotypu je možné si prohlédnout na obrázku 13. Dalšími stromy, vyskytujícími se v lokalitách lužního ekotypu byla např. vrba (*Salix spp.*), topol (*Populus spp.*), trnovník akát (*Robinia pseudoacacia*) nebo dub (*Quercus spp.*). Bylinnému patru dominovaly především nitrofyty, např. kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) a bršlice kozí noha (*Aegopodium podagraria*). Plocha č. 5 se nachází v PR Úpor-Černíkovsko.



Obrázek 13: Solitérní jasan, rostoucí v těsné blízkosti řeky Labe na ploše č. 4.

4.1.3 Horský ekotyp

Odlišný přístup byl zvolen v případě horského ekotypu, který je na obr. 11 označen fialovým křížem. Odběr vzorků probíhal v Krkonošském národním parku ve spolupráci se správou KRNP, konkrétně Ing. Michalem Prouzou, který se problematikou odumírání jasanů v minulosti zabýval. S jeho pomocí byly odebrány vzorky z lokalit, které jsou zároveň zajímavé z hlediska existence dlouhodobě rezistentních jedinců vůči *H. fraxineus*. Všechny plochy se nacházely na svěžích lokalitách, částečně obohacených vodou. Další druhy stromů i bylin byly též velmi podobné na všech lokalitách. Jasan se vyskytovaly v čistě listnatých lesech spolu s olší (*Alnus spp.*), jilmem (*Ulmus spp.*) a javorem klenem (*Acer pseudoplatanus*), často v blízkosti smrkových monokultur (*Picea abies*). V rozvolněnějších částech porostů se nejčastěji objevovaly nitrofilní druhy jako kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) nebo starček vejčitý (*Senecio ovatus*), též zvaný Fuchsův. Přes vzájemnou typologickou

příbuznost se porosty, na rozdíl od předchozích ekotypů, vzájemně velmi lišily rázem krajiny, která byla ve všech případech velmi heterogenní. Na ploše č. 7 se vyskytovalo velké množství základů budov. Největší jasanů se nacházely uvnitř základů, což naznačuje, že byly pěstovány jako zahradní stromy, z nichž se pravděpodobně rozšířily do okolí. Plocha č. 8 se nachází v přírodní památce Sklenářovické údolí na území zaniklé vesnice Sklenářovice. Jedná se opět o krajinu, která byla velmi ovlivněna vlivem člověka. Tato plocha byla charakteristická velkou rozlohou horských luk, na kterých probíhá pastva hospodářských zvířat. Důsledkem činnosti člověka, především pastvy, se utváří mozaikovitá krajina s rozptýlenými hloučky až skupinami listnatých dřevin včetně jasanů (viz obr. 14). Plocha č. 9 se nacházela v nižší nadmořské výšce než předchozí plochy. Jednalo se o typický jasanový porost na okraji lesa, který svým charakterem připomínal porosty vápencového ekotypu.



Obrázek 14: Mozaikovitá krajina na ploše č. 8 v přírodní památce Sklenářovické údolí

Sběr vzorků probíhal primárně ručně ze země. U každého stromu byl odebrán letorost, přibližně o délce 10 cm. Pro extrakci DNA je vhodné použít mladá pletiva, protože obsahují DNA, která ještě není příliš degradovaná. Cílovými orgány byly tedy pupeny a listy. Navíc tyto části stromů byly v dalších publikacích nejčastěji používány na extrakci DNA (např. Heuertz *et al.*, 2004; Ferrazzini *et al.*, 2007). Vhodný letorost obsahoval velké množství pupenů a mladých listů. Listy nesměly být napadené patogeny, částečně uschlé nebo jinak poškozené. Samotná větvička musela být dostatečně velká, aby bylo možné případně využít další pletiva (např. kambium). V případě nedostupnosti větví ze země byly využity nástroje jako teleskopické nůžky nebo lať pro přitáhnutí větve. Takto odebrané vzorky byly vloženy do uzavíratelných plastových sáčků, do kterých byl

zároveň vložen sáček s kuličkami silikagelu a papírek s kódovým označením vzorku. Silikagel je vysoce pórovitá forma oxidu křemičitého, který funguje jako tzv. desikant, tedy pohlcuje nadbytečnou vodu. To přispívá k delší životnosti vzorku, protože se při převozu vzorek méně zapařuje a snižuje se pravděpodobnost vytvoření plísně. Při příležitosti odběru vzorku byla na mobilní telefon zaznamenána poloha GPS v aplikaci Google map. Po ukončení odběru na dané lokalitě byly vzorky uloženy do lednice, která byla připojena do zapalování automobilu, a zároveň v ní byly vloženy chladící gelové vložky pro udržení nejnižší možné teploty. Následně byly vzorky převezeny do laboratoře a uloženy do mrazničky, ve které byly uchovávány při teplotě -26 °C do dalšího použití. Uchovávání vzorků při velmi nízkých teplotách je důležité pro zachování kvality DNA a zamezení její další degradace.

4.2 Příprava a homogenizace vzorků

Před samotným zpracováváním vzorků bylo nutné vybrat část letorostu a její množství, které bude nejvhodnější k izolaci DNA. Pro izolaci DNA byl použit Genomic DNA Mini Kit (Plant) od výrobce Geneaid Biotech Ltd. Izolační protokol DNA kitu doporučuje použití 50-100 mg zmraženého rostlinného materiálu. Z jednoho konkrétního letorostu byl použit list, pupen a kůra, z kterých bylo do jednotlivých zkumavek odváženo různé množství jednotlivých orgánů, konkrétně 30, 50 a 80 mg. Následně byla provedena homogenizace a izolace DNA podle přiloženého izolačního protokolu. Po izolaci byly zhodnoceny parametry DNA pomocí spektrofotometrie a elektroforézy. DNA, izolovaná z pupenu a listu, měla přibližně stejnou koncentraci a kvalitu. Nevýhodou pupenu je velké množství pigmentů, které znečišťují roztok s DNA a mohly by negativně ovlivnit PCR. U DNA, izolované z kůry, bylo dosaženo podobné čistoty jako u DNA z listu, ale výtěžnost byla významně nižší. Dále byl tedy preferován list, u kterého se jeví vstupního množství 50 mg jako vhodný kompromis mezi čistotou a výtěžností. Pupen a kůra byly ponechány jako záložní řešení, pro případ problému s izolací z listu. Výše popsané metody budou v následujících kapitolách detailně popsány ve vztahu k listu s hmotností 50 mg

Po vyjmutí vzorku z mrazničky byl vybrán nejmladší a nejvíce zachovalý list, který byl následně za pomoci skalpelu rozkrájen na menší části, s kterými se lépe pracuje a zároveň se snáze homogenizují. Nakrájený list byl pinzetou přemístěn do 2 mililitrové zkumavky a zvážen na analytické váze AS 82/220.R2 Analytical Balance od společnosti Radwag. Zjištěná hmotnost se dále upravovala, dokud nedosáhla 50 mg. V posledním kroku v rámci přípravy vzorku byly do zkumavky k rostlinnému materiálu vloženy 2 kuličky z karbidu wolframu (WC), který vyniká vysokou pevností, tvrdostí a hustotou. Zkumavky byly popsány na víčku i na těle zkumavky. Takto připravený vzorek byl vložen ve zkumavce zpět do mrazničky. Před přípravou dalšího vzorku byla pracovní plocha a použité nástroje vyčištěny 70% ethanolem, aby nedošlo ke kontaminaci předchozím vzorkem.

Po rozkrájení a navážení 48 vzorků, což je souhrnná kapacita obou konzolí oscilačního mlýnku, bylo možné provést samotnou homogenizaci. Cílem homogenizace je především mechanické narušení pletiv. Do každé konzole bylo vloženo 24 vzorků. Konzole byly současně vloženy pomocí kovových kleští do gumové nádoby s tekutým dusíkem. Je nutné konzole do tekutého dusíku vkládat pomalu, aby z nich nevyskakovaly

zkumavky. Konzole je z tekutého dusíku možné vyjmout ve chvíli, když přestane dusík silně probublávat, protože už nedochází k výraznému ochlazení zkumavek a rostlinného materiálu, který se v nich nachází. Po vyjmutí z tekutého dusíku je nutné, co nejrychleji vložit konzole do krytu a upevnit do oscilačního mlýnu, v tomto případě modelu MM 400 od společnosti Retsch (viz obr. 15). Konzole musí být upevněny pevně, a zároveň přesně ve vymezeném prostoru se zacvaknutým zobáčkem. Při nesprávném upevnění je riziko rozbití konzolí nebo přístroje. V oscilačním mlýnu dochází k radiální oscilaci ve vodorovné poloze a setrvačností wolframových koulí dochází k nárazu s vysokou energií na zmražený rostlinný materiál o stěny zkumavky, čímž se materiál rozmělní na jemný prášek, a zároveň dochází k promíchávání vzorku. Mletí v oscilačním mlýnu trvá 2 minuty při frekvenci 30 Hz. Celý proces od zmražení vzorků v tekutém dusíku po mletí v oscilačním mlýnu proběhnul dvakrát. Zhomogenizované vzorky se uložily do mrazničky nebo byly rovnou použity k izolaci DNA. Při další manipulaci se zkumavkami je nutné dávat pozor na otevírání zkumavek, protože se pod víčkem nachází velké množství nejjemnějšího prášku, který zároveň bývá i nejcennější pro izolaci DNA.



Obrázek 15: Oscilační mlýn Retsch MM 400 připravený k použití

4.3 Izolace DNA

Izolační protokol byl využit jako základ pro izolaci DNA. Jelikož je kit určen pro široké spektrum druhů rostlin, byla nutná mírná optimalizace izolačního protokolu, čímž došlo ke zvýšení koncentrace a čistoty DNA. Izolace probíhala zároveň se šesti nebo dvanácti vzorky. První fází izolace DNA byla fáze lyzační, při které dochází k uvolnění DNA z buněčných struktur. Do každé z připravených zkumavek bylo pipetováno 400 μ l roztoku GP1 a 5 μ l RNázy A. Vzorky byly promíchány pomocí vortexu. Po přidání RNázy A byla zkumavka důkladně zvortexována, a následně vložena do termobloku předehřátého na 60 °C. Do termobloku byla zároveň vložena zkumavka s 200 μ l elučního roztoku na vzorek. V termobloku byly zkumavky uloženy deset minut a v polovině inkubace byly několikrát obráceny o 180 ° a vráceny zpět do inkubátoru. Po deseti minutách bylo do každé zkumavky pipetováno 100 μ l roztoku GP2, zkumavky byly krátce zvortexovány a vloženy do nádoby s ledem. Tento krok je nutné udělat co nejrychleji. V nádobě s ledem byly zkumavky uloženy zhruba 3 minuty. Roztok byl ve zkumavce velmi hustý, což způsobovalo v následujícím kroku ucpání filtrační kolony. Proto byly po vyjmutí z nádoby s ledem zkumavky vloženy do centrifugy, kde byly odstředovány rychlostí 4 000 rcf/g po dobu jedné minuty. Centrifugace způsobila, že se většina pevných látek usadila na dně zkumavky, čímž došlo k jejich separaci od roztoku s DNA. Roztok s DNA byl poté pomocí pipety přemístěn do filtrační kolony, složené z filtru a sběrné zkumavky, kde došlo k odfiltrování zbylých pevných odpadních látek. Pro urychlení filtrace byla celá filtrační kolona vložena do centrifugy a odstředována rychlostí 1 000 rcf/g jednu minutu. Po filtraci byl odstraněn filtr a filtrát byl přelit do nové 1,5 ml zkumavky.

Další fází bylo vázání DNA na křemičitou membránu separační kolony, čímž došlo k oddělení DNA od roztoku, který separační kolonou proteče do sběrné zkumavky. Před použitím bylo do lahvičky s GP3 roztokem přidáno 60 ml isopropanolu. 750 μ l této směsi bylo následně pipetou přidáno do zkumavky s lyzátem. Okamžitě po přidání roztoku GP3 s isopropanolem byla zkumavka vortexována zhruba 5 sekund, aby se směs dokonale promísila. V jiných izolačních protokolech se v tomto kroku používá propipetování GP3 roztoku s isopropanolem v lyzátu, místo okamžitého vortexování. Tato metoda ovšem výsledky spíše zhoršila, proto nebyla dále používána. Následně byla separační kolona umístěna na sběrnou zkumavku. Separací kolona měla malou kapacitu

a z toho důvodu byla směs pipetována do kolony nadvakrát, nejprve v objemu 700 μl , poté zbývající směs zhruba v objemu 555 μl . Pokaždé po přidání směsi do separační kolony byla kolona vložena do centrifugy a odstředována rychlostí 15 000 rcf/g po dobu dvou minut. Po každém odstředění se ve zkumavce nacházel roztok s odpadními látkami, který byl vylit a separační kolona s navázanou DNA byla znovu nasazena na sběrnou zkumavku.

Na membráně separační kolony se kromě DNA stále vyskytovaly kontaminanty. Proto v dalším kroku došlo k jejímu promývání. Do kolony bylo pipetou přeneseno 400 μl roztoku W1, kolona byla vložena do centrifugy a byla odstředována 30 sekund, rychlostí 15 000 rcf/g. Po odstředění byl roztok, nacházející se ve sběrné zkumavce, vylit a separační kolona byla nasazena zpět na sběrnou zkumavku. Před dalším krokem bylo nutné přidat do lahvičky s promývacím roztokem 100 ml bezvodého ethanolu. 600 μl promývacího roztoku s bezvodým ethanolem bylo následně pipetováno do separační kolony, která byla opět odstředována v centrifuze při rychlosti 15 000 rcf/g po dobu 30 sekund. Roztok, který protekl kolonou byl znovu ze sběrné zkumavky vylit a kolona byla opět nasazena na sběrnou zkumavku. Nakonec byla separační kolona odstředována v centrifuze intenzitou 15 000 rcf/g po dobu 3 minut, čímž došlo k vysušení separační kolony, která byla nasáklá především ethanolem. Pro zvýšení čistoty DNA byly opakovány kroky s W1 a promývacím roztokem. Spektrofotometrie naznačovala zvýšení čistoty vzorku, ovšem po elektroforéze byla objevena silná degradace DNA, a proto bylo od vícenásobného promývání upuštěno. Kvůli zřetelné kontaminaci pigmenty byl po promývání promývacím roztokem proveden volitelný krok, tedy promývání pomocí 400 μl bezvodého ethanolu, a následném odstředování rychlostí 15 000 rcf/g po dobu 30 sekund. Ve většině případů nedošlo k významnému zlepšení čistoty DNA, a proto bylo k tomuto volitelnému kroku přistoupeno pouze při silném znečištění, které bylo vizuálně viditelné.

Posledním krokem byla eluce, při které se promytá DNA uvolní ze separační kolony a spolu s elučním roztokem proteče do čisté zkumavky. Proto byla nejdříve separační kolona vyjmuta ze sběrné zkumavky a umístěna na čistou 1,5 ml zkumavku. Následně byl eluční roztok, přehřátý v přechozích krocích na 60 °C, pipetován v objemu 100 μl do středu křemičité membrány v separační koloně. Pět minut po přidání elučního roztoku byla kolona se zkumavkou odstředována intenzitou 15 000 rcf/g po dobu 30 sekund, čímž došlo k protečení elučního roztoku s DNA do 1,5 ml zkumavky.

Po eluci byla DNA málo koncentrována, a proto bylo vyzkoušeno snížení objemu elučního roztoku na 50 μ l, druhá eluce, při které byl do separační kolony přidán roztok s DNA ze zkumavky nebo kombinace obojího. Nejlepších výsledků bylo dosaženo dvojitou elucí, při zachování původního objemu elučního roztoku, tedy 100 μ l. Před druhou elucí byla separační kolona po dokončení odstředování vyjmuta z 1,5 ml zkumavky. Eluční roztok s DNA byl ze zkumavky pipetován do separační kolony a kolona byla nasazena zpět na původní zkumavku. Po pěti minutách byla kolona opět odstředována intenzitou 15 000 rcf/g po dobu 30 sekund. Nakonec byla separační kolona vyhozena, zkumavka s elučním roztokem a DNA nadepsána číslem vzorku na víčko a boční část zkumavky a uložena do mrazničky, kde byla uskladněna do dalšího použití.



Obrázek 16: Připravený izolační kit a náčiní k extrakci DNA

4.4 Testování parametrů DNA

Po dokončení izolace bylo nutné zjistit koncentraci DNA a míru znečištění odpadními látkami, vyjádřenou především poměry 260/280 a 260/230. Tyto parametry byly orientačně zjištěny pomocí spektrofotometrie. Spektrofotometrie byla prováděna na přístroji NanoDrop 2000 od společnosti Thermo Fisher Scientific. Před použitím byl podstavec a výstup na rameni otřen ubrouskem, který byl navlhčen destilovanou vodou, čímž došlo k odstranění případných nečistot z předchozích měření. Pokud byla zkumavka před měřením uložena v mrazničce, bylo nutné ji zhruba 20 minut před použitím přemístit do ledničky, aby došlo k rozmrznutí elučního roztoku s izolovanou DNA. Zároveň bylo vhodné zkumavku krátce zvortexovat, čímž došlo k rovnoměrnému promíchání látek obsažených v roztoku. K přístroji je připojen počítač se softwarem, který poskytuje uživatelské rozhraní pro ovládání přístroje a zobrazování výsledků spektrofotometrie. Při zapnutí přístroje je nutné mít položené rameno ve spodní poloze, na podstavci a vyčkat na kalibraci přístroje. Po kalibraci přístroje je možné zvednout rameno a provést přípravný krok před samotným měřením. V tomto kroku bylo na podstavec pipetováno 1,5 μ l čistého elučního roztoku, poté bylo rameno umístěno na podstavec a na počítači byla zvolena možnost „blank“, čímž přístroj zjistil referenční hodnoty pro čistý eluční roztok. Poté bylo možné provést již samostatné měření, které probíhalo stejným způsobem jako měření samotného referenčního roztoku. Rameno bylo zvednuto do horní polohy, očistil se podstavec a výstup ramene suchým ubrouskem, na osušený podstavec bylo pipetováno 1,5 μ l vzorku, následně se rameno umístilo na podstavec a na počítači byla tentokrát zvolena možnost „measure“. Výsledky, které se zobrazí v uživatelském rozhraní softwaru, je možné přímo v softwaru označit čísla vzorků a po doměření exportovat ve formátu Nanodropu nebo formátu Microsoft Excel .xlsx. Po každém vzorku je nutné suchým ubrouskem očistit podstavec a výstup ramene. Po dokončení práce se spektrofotometrem je vhodné jej očistit ubrouskem, který byl navlhčený destilovanou vodou.

Po spektrofotometrii je vhodné provést elektroforézu, kterou se dají zjistit konkrétní skupiny látek, znečišťující vzorek, a zároveň určit míru degradace DNA, případně ověřit výskyt dostatečného množství nedegradované DNA, nutné pro další analýzu vzorků. Před započítím příprav na elektroforézu je vhodné umístit zmražené vzorky do ledničky, aby před použitím stihly rozmrznout. Prvním krokem byla příprava agarózového gelu. Do baňky bylo přidáno 0,525 g práškové agarózy, která byla smíchána

s 40,25 ml 40X TBE (Tris/Borate/EDTA) roztoku. Tato směs byla krátce promíchána, přikryta plastovým víčkem, aby bylo zamezeno její odpařování a vložena do mikrovlnné trouby, která následně byla zapnuta. Poté co směs začala bouřlivě probublávat, byla v mikrovlnné troubě ponechána ještě zhruba deset sekund, a následně byla z mikrovlnné trouby vyjmuta. Po vyndání z mikrovlnné trouby byla baňka pod proudem tekoucí vody ochlazována zhruba na teplotu 40-50 °C. Po ochlazení bylo do směsi pipetou přidáno 0,7 µl GelRed® Nucleic Acid Gel Stain od společnosti Biotium, směs v baňce byla promíchána a nalita do vaničky s uzavřenými okraji. Následně byl do drážky ve vaničce umístěn hřebínek a směs byla ponechána zhruba 30 minut ke ztuhnutí. Mezi tím byl do elektroforetické vany možné nalít TBE roztok zhruba centimetr a půl pod okraj nádoby, aby byl gel celý ponořený v roztoku, ale zároveň nedošlo k přelití okraje nádoby. Po ztuhnutí byly z vaničky odejmuty gumové boční stěny a vanička byla i s hřebínkem vložena do drážek v přístroji na elektroforézu. Poté byl z gelu opatrně vytáhnut hřebínek, na jehož místě vznikly jamky. Následujícím krokem bylo již samotné vkládání vzorků do jamek v gelu. Na krycí folii Parafilm byly jednotlivě pipetovány 1 µl kapky 6X DNA Loading Dye od společnosti Thermo Fisher Scientific, poté byly do těchto kapek propipetovány jednotlivé vzorky v objemu 5 µl, čímž došlo k jejich promíchání s loadovacím barvivem. Směs vzorku s barvivem byla nanesena do jamek v gelu. Tento krok je nutné provádět rychle, aby nedošlo k vypaření barviva, nedotýkat se špičkou pipety Parafilmu, aby nedošlo k jeho protržení a pipetovat směs do jamek zhruba pod kolmým úhlem vzhledem ke gelu. Do krajních jamek je možné pipetovat žebřík, který pomůže s kvantifikací délky jednotlivých fragmentů, potažmo identifikací kontaminujících skupin látek, které se ve vzorku vyskytují. Posledním krokem bylo přikrytí přístroje na elektroforézu víkem s elektrodami, nastavení hodnot na 100 V, 250 mA a 30 minut a zapnutí přístroje. Po uplynutí 30 minut byla vanička s gelem z přístroje vyjmuta a gel byl vložen do zobrazovacího přístroje (název, spol), ve kterém bylo zvoleno zobrazení gelu ve spektru UV 302 nm s dobou expozice 10 sekund. Po expozici je možné snímek oříznout a změnit poměr barev, čímž lze docílit lepšího kontrastu. Příkladem výsledku elektroforézy při testování parametrů je obrázek 17.



Obrázek 17: Výsledek elektroforézy při testování parametrů DNA. Na obrázku lze v horní části spatřit jasné bandy DNA, které se ovšem protahují v „pásky“, které značí degradaci DNA na kratší fragmenty a znečištění RNA a proteiny.

4.5 Polymerázová řetězová reakce

Na základě rešerše vědeckých studií, které zkoumaly genetickou diverzitu jasanu ztepilého bylo vybráno několik druhově specifických, nadějných mikrosatelitových markerů, které vykazovaly vysokou míru polymorfismu. Těmito markery jsou FEMSATL4, FEMSATL8, FEMSATL11, FEMSATL 12, FEMSATL16, FEMSATL19 (Lefort *et al.*, 1999) FR639485, FR646655 (Beatty *et al.*, 2015) a M2-30 (Brachet *et al.*, 1999). Na základě optimalizace byly vytvořeny dvě multiplexové reakce, které byly nazvány JS M1 a JS M2. Jednotlivé primery byly označeny fluorescenčními barvami, aby byly při další analýze vzájemně odlišitelné. Multiplex JS M1 zahrnuje primery: FEMSATL4 a FR639485, označené modrým barvivem 6-FAM, FEMSATL 8, označený zeleným barvivem VIC, FEMSATL 11, označený žlutým barvivem NED a FEMSATL 16, označený červeným barvivem PET. Důvod, proč bylo možné označit FEMSATL 4 a FR639485 je ten, protože fragmenty vzniklé amplifikací z těchto primerů mají rozdílnou délku a vzájemně se nepřekrývají. Multiplex JS M2 zahrnuje primery: FEMSATL 12, označený žlutým barvivem NED, FEMSATL 19, označený červeným barvivem PET, FR646655, označený zeleným barvivem VIC a M2-30, označený modrým barvivem 6-FAM. Přehled jednotlivých primerů je vypsán v tabulce 3.

Před samotným započítím PCR byla připravena reakční směs. Objem reakční směsi na jednu reakci byl 10 μ l. Hlavními složkami reakční směsi je samotná vstupní DNA, izolovaná z konkrétního vzorku a tzv. PCR mastermix. PCR mastermix je předpřipravená směs primerů, vody a roztoku Type-it od společnosti Qiagen, ve kterém je již obsaženo vhodné množství DNA polymerázy, nukleotidů, chloridu hořečnatého a speciální pufrčního roztoku. Mastermix multiplexu JS M1 pro jednu reakci se skládá z množství primerů, popsaných v tabulce 3, které dohromady tvoří 2,2 μ l, 5 μ l roztoku Type-it a 1,8 μ l ultra čisté vody. V reakční směsi pro jednu reakci multiplexu JS M1 je použito 9 μ l mastermixu a 1 μ l vstupní DNA. Mastermix multiplexu JS M2 je tvořen objemem primerů, z tabulky 3, v celkovém objemu 2 μ l, 5 μ l roztoku Type-it a 1,8 μ l ultra čisté vody. V reakční směsi pro jednu reakci multiplexu JS M2 je použito 8,8 μ l mastermixu a 1,2 μ l vstupní DNA. Vstupní DNA byla zředěna na standardní koncentraci 25 ng/ μ l.

Tabulka 3: Použité primery rozdělené do multiplexů. MP = multiplex, F = forward primer a R = reverse primer. Rozdělení do multiplexů a množství jednotlivých primerů na jednu reakci je výsledkem optimalizace. Koncentrace primerů je 10 mM/μL.

MP	Lokus	Sekvence	Rozmezí (bp)	Fluorescenční značení	Objem na jednu reakci
JS M1	FEMSATL4	TTCATGCTTCTCCGTGTCTC GCTGTTTCAGGCGTAATGTG	142-220	6-FAM	0,2 μl F 0,2 μl R
	FEMSATL8	TGTAGCTCAGGATTGGCAAT AGCGTTGTCCTTAACCTTT	136-207	VIC	0,3 μl F 0,3 μl R
	FEMSATL11	GATAGCACTATGAACACAGC TAGTTCTACTACTCAAGAA	163-249	NED	0,2 μl F 0,2 μl R
	FEMSATL16	TTTAACAGTTAACTCCCTTC CAACATACAGCTACTAATCA	178-205	PET	0,2 μl F 0,2 μl R
	FR639485	TGACAAACCCAGCCTAACTCT GCCTGAGCAAGTAAAGACGCTA	278-345	6-FAM	0,2 μl F 0,2 μl R
JS M2	FEMSATL12	TTTTTGGAACCCTTGATTTT GATGGACGGGCATTCTTAAT	154-214	NED	0,3 μl F 0,3 μl R
	FEMSATL19	CTGTTCAATCAAAGATCTCA TGCTCGCATATGTGCAGATA	155-232	PET	0,3 μl F 0,3 μl R
	FR646655	TGGAGCAGTTGAAGCACTGAAA TCTTCATCTTCCCAACAGCAGC	142-216	VIC	0,1 μl F 0,1 μl R
	M2-30	ACGCGCACGTTCTTTCTATTG GCTTTCTTGACCGGCTGACTAT	176-273	6-FAM	0,3 μl F 0,3 μl R

Mastermix byl připraven těsně před každou PCR, v objemu podle množství prováděných reakcí a vycházel z objemů jednotlivých komponent definovaných pro jednu reakci. Následně bylo do jednotlivých zkumavek v desce pipetováno výše popsané množství vstupní DNA a mastermixu, čímž byla připravena reakční směs. Po napipetování jednoho sloupce, který tvoří 8 zkumavek byly zkumavky uzavřeny víčkem, aby nedocházelo k vypařování reakční směsi a její kontaminaci. Po dopipetování celé desky, byla zvortexována a následně krátce vložena do centrifugy. Po vyjmutí platíčka z centrifugy, bylo vloženo do termocycleru, ve kterém probíhala samotná PCR. Iniciační fáze, při které dochází k aktivaci DNA polymerázy trvala 5 minut při teplotě 95 °C. Následně probíhalo samotné cyklování denaturační fáze, fáze nasedání primerů a syntetizační fáze, které proběhlo dohromady 35krát. Denaturační fáze trvala 30 sekund, při teplotě 95 °C. Následovala fáze nasedání primerů, která trvala 90 sekund, při teplotě 52 °C. Poslední fáze cyklování bylo samotné dosyntetizování DNA, které trvalo 30 sekund při teplotě 72 °C. Finální dosyntetizování DNA proběhlo na konci PCR po dobu 30 minut při teplotě 60 °C. Po skončení PCR byla deska zchlazena v termocycleru na 4 °C do jeho vyjmutí. Po vyjmutí z termocycleru byla deska uložena do chladničky.

4.6 Fragmentační analýza a zpracování dat

Vzorky po PCR byly zaneseny do laboratoře molekulární genetiky FŽP ČZU, kde byla provedena fragmentační analýza na sekvenátoru. Výstup ze sekvenátoru je FSA soubor, pro každý jednotlivý vzorek. Pro analýzu výsledků ze sekvenátoru byl použit program GeneMarker od společnosti Softgenetics. Do programu GeneMarker byly nahrány FSA soubory, které v sobě obsahují informaci o délce jednotlivých fragmentů a jejich množství. Program vizualizuje data v grafu, kde na ose x je délka fragmentů a na ose y jejich množství. Jednotlivé alely jsou většinou znázorněny tzv. peaky, což jsou oblasti s největší abundancí fragmentů konkrétní délky. Program je schopný jednotlivé peaky rozeznat a označit je jako alely. Problém bývá, že při PCR vznikají tzv. amplifikační artefakty, které vznikají například chybami funkce DNA polymerázy při syntéze dsDNA a GeneMarker je nesprávně označuje jako alely. Proto je nutná manuální úprava, při které se vybírají skutečné alely a amplifikační artefakty se odstraňují z tabulky alel. Pro usnadnění práce se mohou vytvořit tzv. panely, což jsou předdefinovaná rozmezí možných délek fragmentů, pro jednotlivé lokusy, čímž se z analýzy automaticky eliminují příliš krátké, a naopak příliš dlouhé fragmenty, u kterých jsme si jisti, že nejsou skutečnými alelami. Po dokončení manuálních úprav byla tabulka alel exportována do sešitu Excel. V sešitu Excel byly nejprve promazány vzorky, u kterých byly identifikovány méně než 4 nenulové alely na jednotlivých lokusech. U těchto vzorků nastal nějaký problém při PCR, a proto se z další analýzy vyřazují, protože neposkytují směrodatné výsledky. Pro další analýzu výsledků byl použit doplněk Microsoftu Excel – GenAlEx (Peakall a Smouse, 2006, 2012), ve kterém byla vytvořena šablona pro kodominantní markery, do které byly nahrány hodnoty jednotlivých alel. Exportovaná tabulka z GeneMarkeru obsahuje u homozygotů pouze jednu hodnotu, a proto bylo nutné manuálně doplnit identickou hodnotu alely do vedlejší buňky.

5 Výsledky

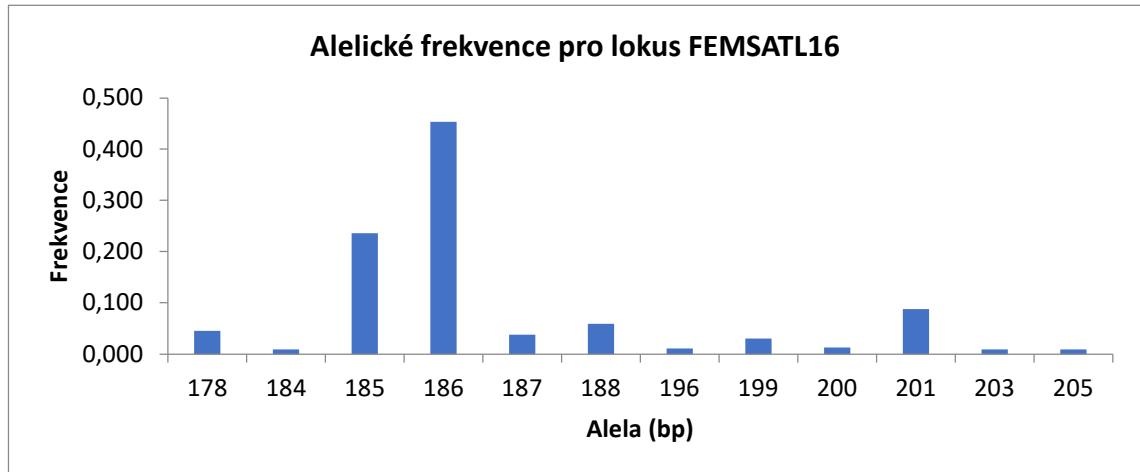
U všech 180 vzorků z devíti ploch byla provedena extrakce DNA, PCR a fragmentační analýza. Při analýze výsledků fragmentační analýzy v programu GeneMarker nebyly objeveny alely na žádném ze zkoumaných lokusů u šesti vzorků. Ze 174 vzorků, s úspěšnou amplifikací mikrosatelitové nDNA alespoň na jednom ze zkoumaných lokusů, nebylo v dalších analýzách využito 11 vzorků, u kterých se vyskytovaly nulové alely na více než čtyřech lokusech. Podmínkou tedy bylo, aby se nevyskytovaly nulové alely na více než 50 % zkoumaných lokusů. Celkový počet vzorků, u kterého byly provedeny následné populačně-genetické analýzy činil tedy 163. Počet analyzovatelných vzorků z jednotlivých ploch lze vyčíst z tabulky 4. 19 z 20 vzorků bylo použito z ploch číslo 1,2,7 a 8. 18 z 20 bylo použito z ploch číslo 3,4,5 a 6. Z plochy číslo 9 bylo použito pouze 15 vzorků, z celkového počtu 20 odebraných vzorků.

Tabulka 4: Přehled jednotlivých populací a počet analyzovatelných vzorků z jednotlivých ploch

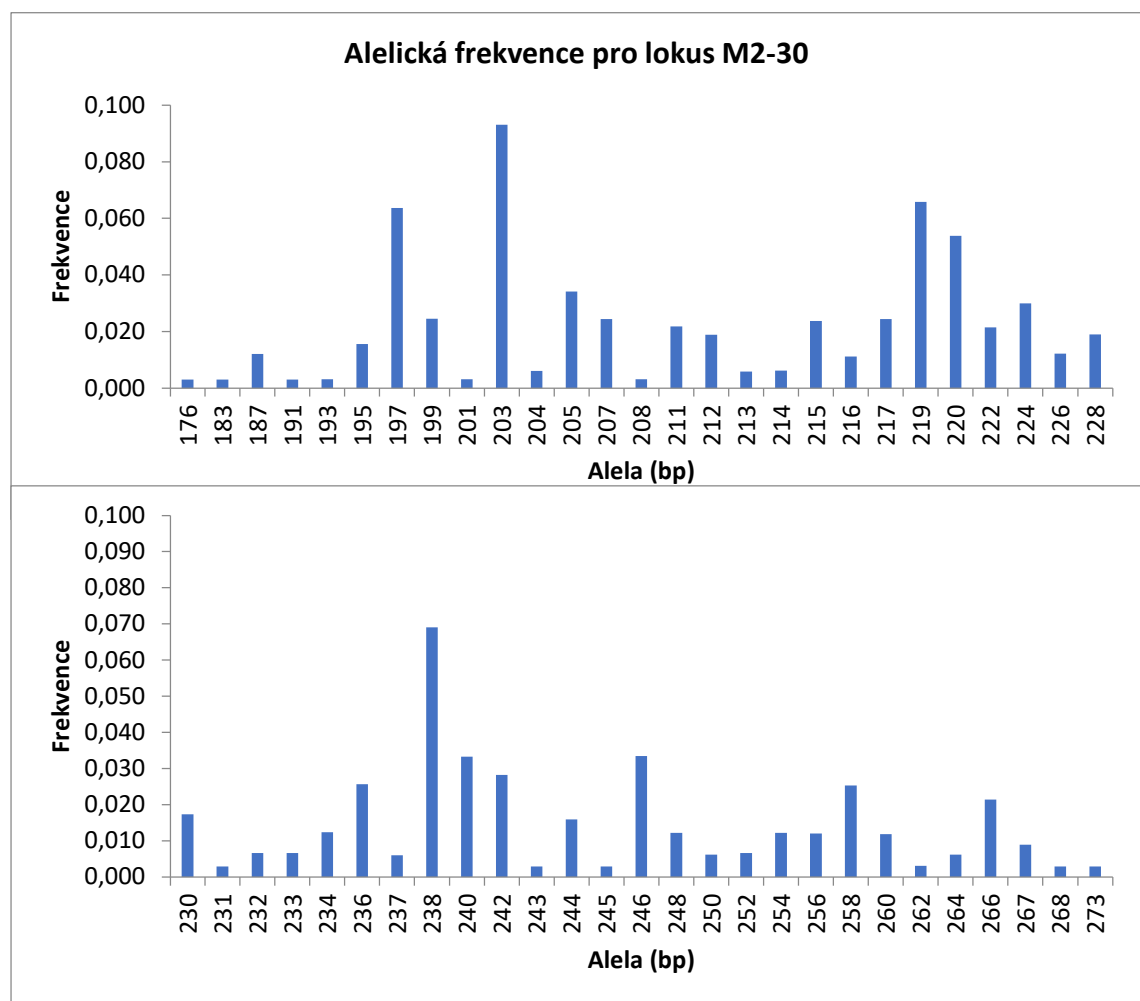
Číslo populace	Ekotyp	Název plochy	Souřadnice	Počet analyzovatelných vzorků
1	vápencový	Koda	49°56'16,77"N 14°5'53,768"E	19
2	vápencový	Karlštejsko	49°56'51,499"N 14°8'38,695"E	19
3	vápencový	Mořina	49°57'16,93"N 14°12'6,307"E	18
4	lužní	Lobkovice	50°14'42,586"N 14°32'37,097"E	18
5	lužní	Kly	50°18'19,612"N 14°30'19,071"E	18
6	lužní	Záluží	50°28'16,048"N 14°19'18,214"E	18
7	horský	Suchá cesta	50°38'29,077"N 15°51'58,375"E	19
8	horský	Sklenářovické údolí	50°40'26,502"N 15°51'0,653"E	19
9	horský	Černý důl	50°37'10,49"N 15°43'2,639"E	15

5.1 Genetická struktura uvnitř populací

Na všech devíti lokusech bylo dohromady detekováno 272 alel. Nejvyšší variabilitu vykazoval lokus M2-30, kde bylo detekováno 54 alel (obrázek 19). Naopak nejméně polymorfní byl lokus FEMSATL16, se 12 alelami (obrázek 18).



Obrázek 18: Graf alelických frekvencí na lokusu FEMSATL16



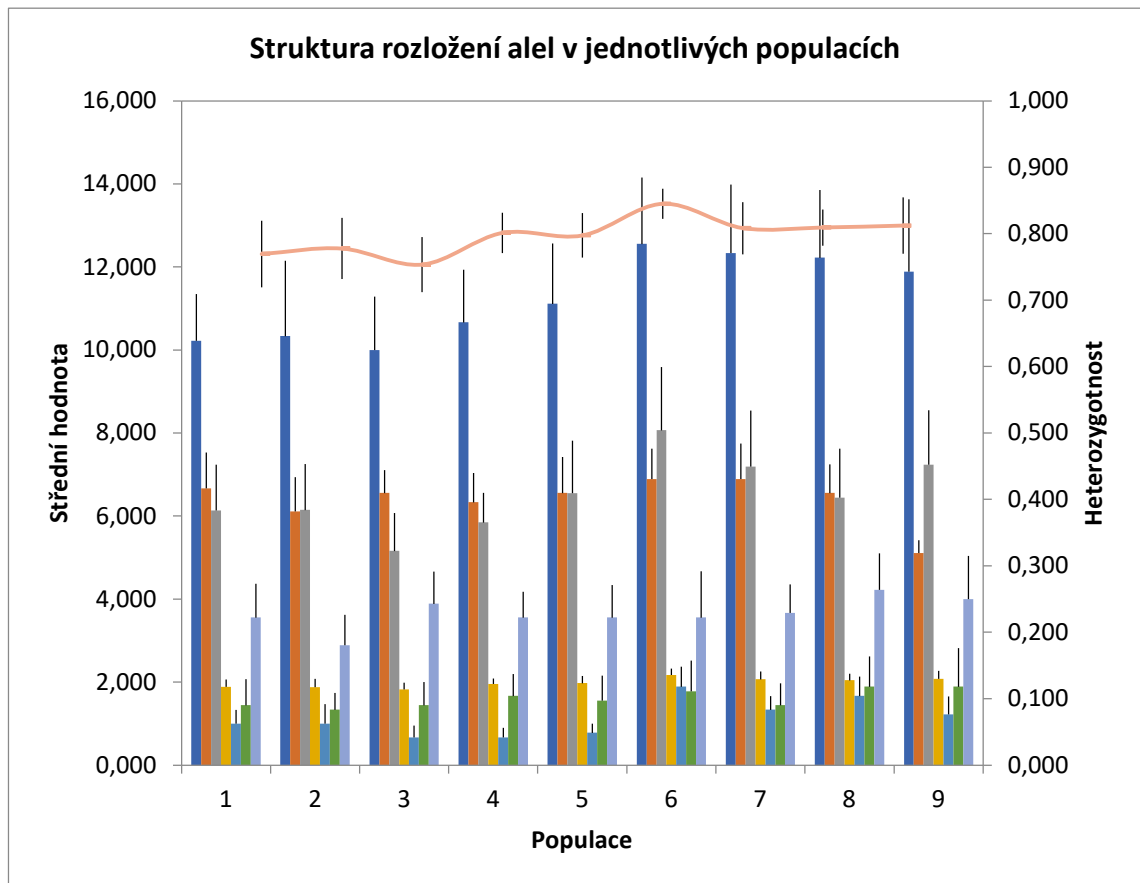
Obrázek 19: Graf alelických frekvencí na lokusu M2-30

Frekvence alel na jednotlivých lokusech byla využita k výpočtům, na základě, kterých byly zjištěny hodnoty různých parametrů. S pomocí hodnot těchto parametrů, obsažených v tabulce číslo 5, lze zjistit charakteristiky genetické struktury jednotlivých populací, které jsou zároveň graficky znázorněny na obrázku číslo 20. Pro jednotlivé populace byl vypočten počet vzácných alel (N_R) s alelickou frekvencí $\leq 0,05$. U populací 1 ($N_R = 32$) a 3 ($N_R = 31$) bylo objeveno nejméně vzácných alel, naopak zdaleka nejvíce alel bylo objeveno u populace 9 ($N_R = 61$). Zajímavostí je, že tři populace s nejnižším počtem vzácných alel byly populace, náležící k vápencovému ekotypu ($N_R = 31, 32$ a 38), populace horského ekotypu měly téměř všechny nejvyšší počet vzácných alel ($N_R = 49, 51$ a 61) a populace lužního ekotypu se s výjimkou jedné populace nacházely přibližně na rozmezí ($N_R = 39, 41, 51$). Na druhé straně se v populacích vyskytovalo i relativně velké množství alel, s vysokou frekvencí $> 0,2$ nebo velmi vysokou frekvencí $> 0,4$. Alel s vysokou frekvencí se vyskytovalo v jednotlivých populacích podobné množství a střední hodnota činí $11,22$. Počet alel s velmi vysokou frekvencí se v populacích pohyboval od 2-6 alel (střední hodnota $2,55$) s výjimkou populace číslo 6, kde se taková alela nevyskytovala žádná. Střední hodnota počtu různých alel na jeden lokus byla nejnižší u populace číslo 3 ($N_a = 10$) a nejvyšší u populace číslo 6 ($N_a = 12,556$) a populace se vzájemně v tomto ukazateli vzájemně příliš nelišily. Tento trend je odlišný, od vzácných alel, které vykazovaly velké rozdíly mezi počtem alel v jednotlivých populacích. Ve všech populacích byly objeveny unikátní alely, které se nevyskytovaly v ostatních populacích. Nejvíce unikátních alel na lokus se vyskytovalo v populaci číslo 6 (střední hodnota $N_p = 1,889$), a naopak nejméně v populacích číslo 3 a 4, ($N_p = 0,667$). Důležitým parametrem je efektivní počet alel (v literatuře často označováno jako genetická nebo alelická diverzita), vyjadřující počet rovnoměrnost zastoupení alel v populaci ($N_E = 1/\sum a_i^2$), kde a_i vyjadřuje četnost alely. Čím vyšší je tento ukazatel, tím rovnoměrněji jsou alely v populaci zastoupeny. Nejnižší byla střední hodnota ukazatele alelické diverzity u populace číslo 3 ($N_E = 5,161$) a nejvyšší u populace číslo 6 ($N_E = 8,066$). Pro posouzení počtu heterozygotů byla vypočtena pozorovaná heterozygotnost ($H_o = H_N/N$), která vyjadřuje počet heterozygotů vůči všem jedincům. Střední hodnota pozorované heterozygotnosti se pohybovala v jednotlivých populacích v rozmezí $H_o = 0,547-0,696$ a střední hodnota všech populací činila $H_o = 0,629$. Kromě toho byla vypočtena očekávaná heterozygotnost ($H_E = 1-\sum p_i^2$), kde p_i je frekvence jednotlivých alel. Očekávaná heterozygotnost vyjadřuje, jaký by byl v dané populaci počet heterozygotů, při náhodném páření. Střední hodnota očekávané heterozygotnosti se

v jednotlivých populacích pohybovala v rozmezí $H_E = 0,754-0,845$ a střední hodnota všech populací dosahovala $H_E = 0,797$. Z těchto dvou hodnot lze vypočítat tzv. fixační index (často označovaným jako koeficient inbreedingu) ($F = (H_E - H_o)/H_E$). Hodnoty fixačního indexu kolem nuly jsou očekávány při náhodném páření, pozitivní hodnoty značí inbreeding nebo nedetekované nulové alely a negativní hodnoty nadbytek heterozygotů, který může být způsobený selekcí upřednostňující heterozygoty nebo tzv. asortativním pářením, při kterém dochází přednostně k páření jedinců s určitým fenotypem. Fixační index se pohyboval v populacích v rozmezí $F = 0,139-0,288$ a celkový koeficient inbreedingu dosáhl hodnoty $F_{IS} = 0,214$. Důležitým ukazatelem míry genetické diverzity je Shannonův informační index, který byl vyvinut roku 1948 Claudem Shannonem (Shannon, 1948). Původně se využíval pro posouzení biologické diverzity v ekologických studiích, ale své uplatnění nachází i ve populačně-genetických studiích. Na základě Shannonova indexu se dá posoudit míra variability v populacích, které sice mají stejný počet alel, ale některé populace mají alely rovnoměrně rozloženy mezi jedinci a v jiných populacích dominuje malé množství běžných alel s vysokou alelickou. Zároveň je Shannonův index více citlivý na ztrátu vzácných alel, způsobenou například efektem hrdla láhve než heterozygotnost (Sherwin *et al.*, 2017). Nejvyšší hodnoty dosáhl Shannonův index u populace číslo 6 ($I = 2,173$) a nejmenší hodnotu indexu vykazuje populace č. 3 ($I = 1,824$).

Tabulka 5: Genetické parametry uvnitř devíti populací, zjištěné analýzou devíti mikrosatelitových lokusů

Pop	N_a	N_R	N_p	N_E	H_o	H_E	F	I
1	10,222	3,888	1	6,135	0,572	0,770	0,257	1,885
2	10,333	2,111	1	6,146	0,655	0,778	0,148	1,847
3	10	3,555	0,667	5,161	0,547	0,754	0,288	1,824
4	10,667	3,555	0,667	5,846	0,645	0,801	0,191	1,955
5	11,111	1,333	0,778	6,551	0,634	0,798	0,208	1,974
6	12,556	6	1,889	8,066	0,608	0,845	0,280	2,173
7	12,333	2,333	1,333	7,191	0,675	0,809	0,167	2,066
8	12,222	3	1,667	6,442	0,669	0,809	0,139	2,045
9	11,889	4,444	1,222	7,237	0,632	0,812	0,254	2,080
Celk.	11,259	3,358	1,136	6,531	0,629	0,797	0,215	1,987



Obrázek 20: Graf struktury rozložení alel v jednotlivých populacích na základě několika ukazatelů. Tmavě odře je značen ukazatel počtu různých alel na jeden lokus (N_a), oranžově je označen stejný ukazatel, zahrnující pouze alely s alelickou frekvencí vyšší nebo rovno pěti procentům. Šedý sloupec, značí alelickou diverzitu (N_e). Žlutý sloupec ukazuje hodnoty Shannonova informačního indexu (I). V pátém, světle modře značeném, sloupci jsou hodnoty počtu unikátních alel (N_p). V posledních dvou sloupcích jsou počty běžných alel s alelickou frekvencí do 25 % (zelený, předposlední sloupec) a do 50 % (poslední, fialový sloupec). Oranžová křivka zobrazuje očekávanou heterozygotnost (H_c). Barevně značené sloupce jsou střední hodnoty vybraných ukazatelů a černě protáhlá úsečka značí směrodatnou chybu (SE) jednotlivých hodnot.

Důležitým fenoménem v populační genetice je Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE), která popisuje rovnovážné rozdělení alel v tzv. panmiktické populaci. V panmiktické populaci dochází k výhradně náhodnému křížení, a tedy v ní neprobíhají síly populační genetiky jakými jsou selekce, mutace nebo migrace a genetický drift se dá zanedbat. Porovnáváním pozorovaných genotypů a předpokládaných genotypů, při platnosti HWE, je možné zjistit, zdali v dané populaci probíhá pouze náhodné křížení a HWE je zachována (tzn. $F = 0$) nebo dochází k narušení náhodného křížení a HWE je narušena některou silou populační genetiky ($F \neq 0$). Testování platnosti HWE lze provést Chí-kvadrát testem (tabulka 6). Nulová hypotéza se stanoví jako $H_0 =$ populace se kříží podle očekávání na základě HWE (dochází pouze k náhodnému křížení a $F = 0$), a alternativní hypotéza tedy zní $H_1 =$ dochází k narušení křížení podle očekávání na základě HWE (nedochází pouze k náhodnému křížení a $F \neq 0$).

Tabulka 6: Chi-kvadrát test (náhodného) křížení v souladu HWE (* = zamítáme H_0 na $\alpha < 0,05$, ** $\alpha < 0,01$, *** $\alpha < 0,001$, ns = výsledek nesignifikantní na $\alpha < 0,05$, nezamítáme H_0)

Pop 1	Hladina významn.	Pop 2	Hladina významn.	Pop 3	Hladina významn.
Lokus		Lokus		Lokus	
FEMSATL4	*	FEMSATL4	ns	FEMSATL4	**
FR639485	ns	FR639485	ns	FR639485	ns
FEMSATL8	*	FEMSATL8	ns	FEMSATL8	ns
FEMSATL11	ns	FEMSATL11	*	FEMSATL11	ns
FEMSATL16	*	FEMSATL16	*	FEMSATL16	*
M2-30	*	M2-30	ns	M2-30	ns
FR646655	ns	FR646655	**	FR646655	***
FEMSATL12	ns	FEMSATL12	***	FEMSATL12	***
FEMSATL19	ns	FEMSATL19	*	FEMSATL19	ns
Pop 4	Hladina významn.	Pop 5	Hladina významn.	Pop 6	Hladina významn.
Lokus		Lokus		Lokus	
FEMSATL4	ns	FEMSATL4	ns	FEMSATL4	ns
FR639485	ns	FR639485	ns	FR639485	*
FEMSATL8	**	FEMSATL8	ns	FEMSATL8	***
FEMSATL11	ns	FEMSATL11	**	FEMSATL11	ns
FEMSATL16	***	FEMSATL16	ns	FEMSATL16	**
M2-30	ns	M2-30	ns	M2-30	*
FR646655	ns	FR646655	***	FR646655	***
FEMSATL12	*	FEMSATL12	ns	FEMSATL12	***
FEMSATL19	ns	FEMSATL19	**	FEMSATL19	*
Pop 7	Hladina významn.	Pop 8	Hladina významn.	Pop 9	Hladina významn.
Lokus		Lokus		Lokus	
FEMSATL4	**	FEMSATL4	ns	FEMSATL4	ns
FR639485	ns	FR639485	ns	FR639485	*
FEMSATL8	ns	FEMSATL8	ns	FEMSATL8	*
FEMSATL11	ns	FEMSATL11	ns	FEMSATL11	ns
FEMSATL16	ns	FEMSATL16	ns	FEMSATL16	*
M2-30	ns	M2-30	**	M2-30	ns
FR646655	ns	FR646655	***	FR646655	***
FEMSATL12	***	FEMSATL12	***	FEMSATL12	ns
FEMSATL19	*	FEMSATL19	**	FEMSATL19	ns

5.2 Genetická diferenciace mezi populacemi

Velmi často se v populačně-genetických studiích používá Wrightova F-statistika. F-statistika se používá k hodnocení míry heterozygotnosti populace, potažmo k zhodnocení míry inbreedingu. Důvodem, proč F-statistika poskytuje zároveň i informace o genetické diverzitě v rámci subpopulace a diferenciaci populací, je ten, že rozdílnosti v genetické struktuře subpopulací vznikají mimo jiné působením inbreedingu. Inbreeding totiž způsobuje redukci heterozygotnosti, tedy nadměrnému počtu homozygotů v populacích, důsledkem narušení náhodného páření.

Všechny ukazatelé z F-statistiky se dají nazvat jako koeficient inbreedingu, ale v užším slova smyslu se tak označuje většinou F_{IS} , který dává informace o míře inbreedingu jednotlivců v rámci dané subpopulace, tedy ztráty heterozygotnosti jednotlivců z důvodu nenáhodného páření v rámci své subpopulace. Tento ukazatel tedy souvisí spíše s genetickou diverzitou a jeho hodnota byla již popsána v předchozí kapitole ($F_{IS} = 0,214$).

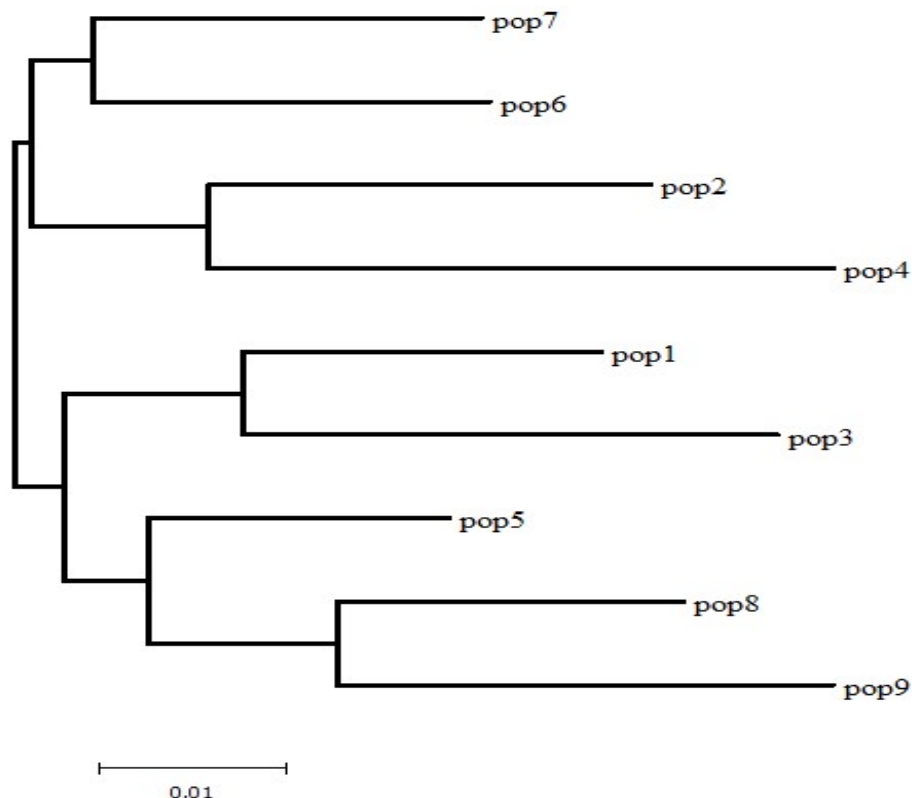
Na druhé straně spektra stojí F_{ST} , který podává informace o genetické diferenciaci mezi různými subpopulacemi. Principem jeho výpočtu je míra inbreedingu v dané populaci vůči všem ostatním populacím, tedy zjištění míry rozložení heterozygotnosti v rámci všech subpopulací. Ale je nutné poznamenat, že existuje několik způsobů výpočtu F_{ST} . F_{ST} je víceméně vždycky větší nebo rovno 0. $F_{ST} = 0$ značí dokonalou platnost HWE s rovnoměrnou distribucí alel ve všech populacích. Při $F_{ST} \leq 0,05$ je diferenciace mezi populacemi statisticky nevýznamná. Na druhé straně $F_{ST} \geq 0,25$ značí velmi vysokou míru diferenciace. Ve zkoumaných populacích dosáhla míra diferenciace mezi populacemi $F_{ST} = 0,057$. V některých studiích se též lze setkat s ukazatelem G_{ST} , který dosáhl hodnoty $G_{ST} = 0,026$

Hodnota, která udává informace, jak míru inbreedingu jedinců v rámci subpopulace, tak i míru diferenciace mezi populacemi je F_{IT} . F_{IT} bere v potaz míru heterozygotnosti jedinců vůči celku. Tento ukazatel dosáhl při výzkumu hodnoty $F_{IT} = 0,257$.

Kromě absolutních hodnot, které poskytují relativní hodnoty míry inbreedingu jednotlivých populací a diferenciace mezi populacemi, lze vypočítat tzv. genetickou vzdálenost populací. Tou je možné zjistit míru genetické příbuznosti jednotlivých populací. Aplikací genetické vzdálenosti je například klastrování různých populací do vzájemně geneticky blízkých skupin nebo zjištění historie šíření druhu na zkoumaném území. Nejběžnějším principem je párové porovnání diferenciace mezi jednotlivými populacemi. Jedním způsobem je párový výpočet míry diferenciace F_{ST} (viz tabulka 7).

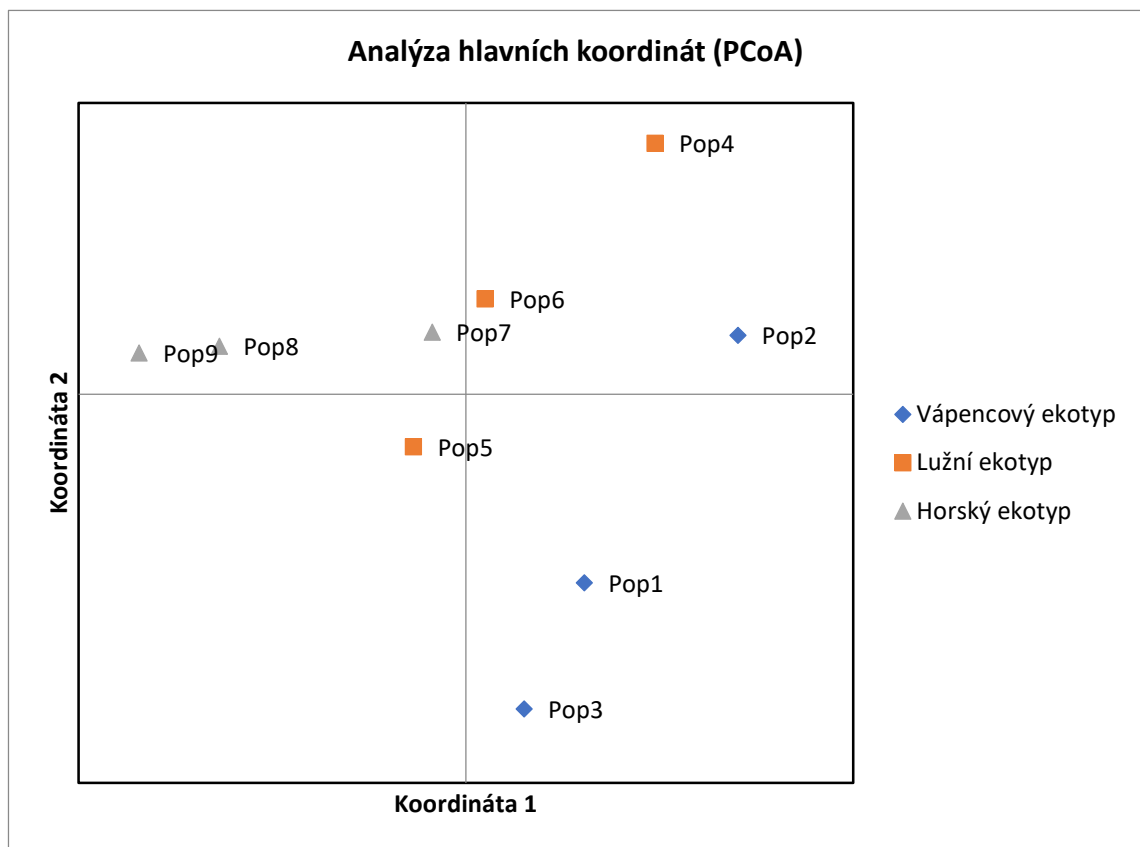
Tabulka 7: Párové porovnání míry diferenciace (F_{ST}) mezi jednotlivými populacemi

Pop 1	Pop 2	Pop 3	Pop 4	Pop 5	Pop 6	Pop 7	Pop 8	Pop 9	
0									Pop 1
0,029	0								Pop 2
0,023	0,035	0							Pop 3
0,038	0,028	0,047	0						Pop 4
0,026	0,031	0,024	0,032	0					Pop 5
0,031	0,029	0,037	0,034	0,026	0				Pop 6
0,028	0,029	0,035	0,036	0,025	0,022	0			Pop 7
0,40	0,044	0,037	0,042	0,021	0,030	0,027	0		Pop 8
0,041	0,053	0,044	0,048	0,029	0,037	0,030	0,023	0	Pop 9



Obrázek 21: Dendrogram genetické vzdálenosti populací na základě párového porovnání míry diferenciace (F_{ST}). Vytvořen v programu POPTREEW

Na základě matice párového porovnání genetické vzdálenosti na základě míry diferenciace F_{ST} lze vytvořit grafy, zobrazující míru příbuznosti mezi jednotlivými populacemi. Jednou možností je dendrogram, zobrazený na obrázku 21, kde délka jednotlivých větví dendrogramu ukazuje míru příbuznosti mezi populacemi a ve kterém jsou klastrované dohromady populace, vykazující určitou míru shodnosti alel. Alternativní možností je využití grafu analýzy hlavních koordinát (PCoA), na kterém jsou vzájemně nejvíce příbuzné populace vyobrazeny blízko sebe, a naopak populace, vykazující velkou míru diferenciace jsou od sebe vzdálené (obrázek 22). Výhodou PCoA je intuitivní vyobrazení vzájemné příbuznosti většího množství populací.



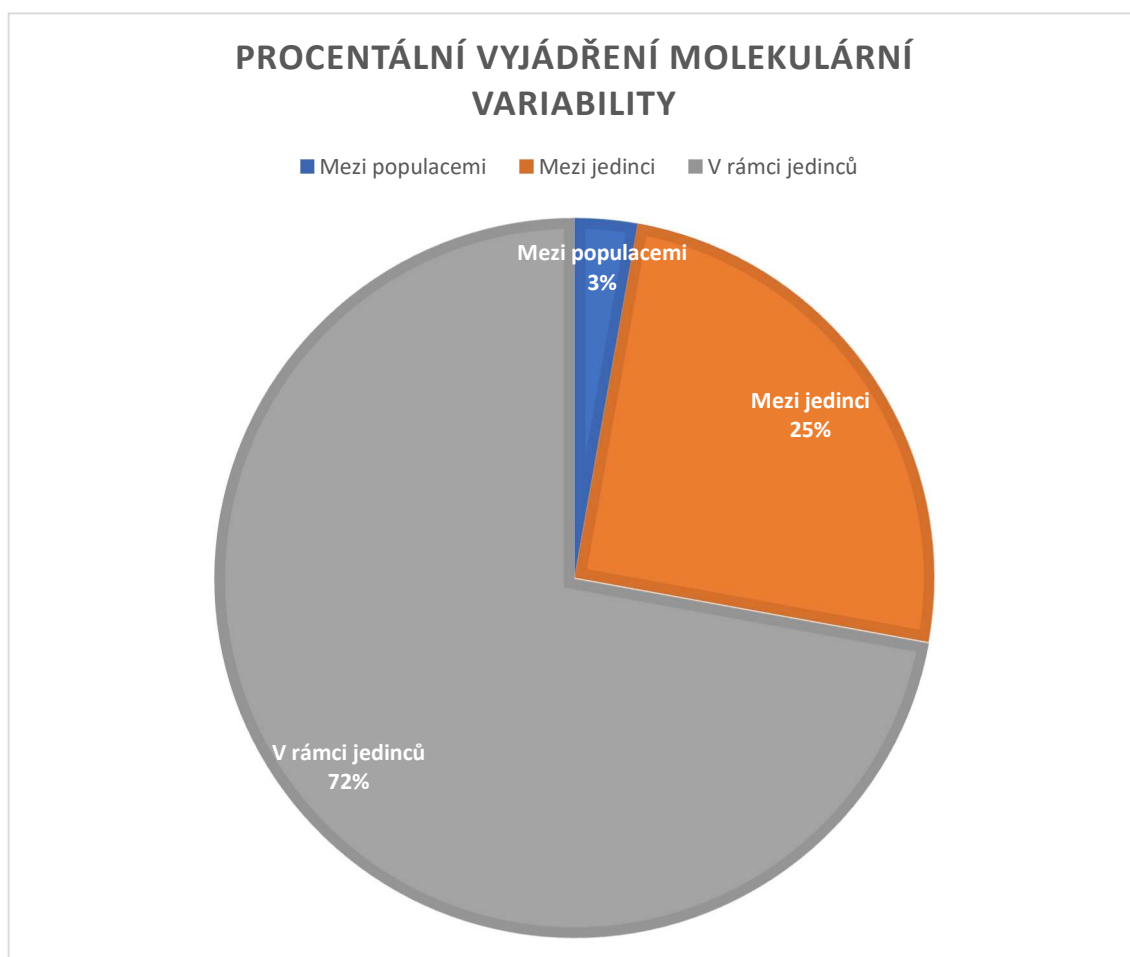
Obrázek 22: Graf genetické vzdálenosti na základě párového porovnání míry diferenciace (F_{ST}), pomocí analýzy hlavních koordinát.

Alternativním ukazatelem genetické vzdálenosti je model standardní genetické vzdálenosti podle Nei (Nei, 1972). Tento model počítá s tím, že diferenciace populací vzniká především mutacemi a genetickým driftem. Je možné si všimnout, že genetická vzdálenost pomocí míry diferenciace F_{ST} i ukazatele podle Nei je velmi podobná, a proto by dendrogram i graf analýzy hlavních koordinát vypadal obdobně.

Tabulka 8: Párové porovnání genetické vzdálenosti podle Nei mezi jednotlivými populacemi

Pop 1	Pop 2	Pop 3	Pop 4	Pop 5	Pop 6	Pop 7	Pop 8	Pop 9	
0									Pop 1
0,225	0								Pop 2
0,173	0,271	0							Pop 3
0,325	0,254	0,416	0						Pop 4
0,209	0,269	0,190	0,314	0					Pop 5
0,276	0,275	0,334	0,391	0,273	0				Pop 6
0,232	0,262	0,300	0,367	0,241	0,228	0			Pop 7
0,353	0,416	0,312	0,438	0,199	0,337	0,268	0		Pop 8
0,345	0,506	0,378	0,508	0,271	0,433	0,296	0,223	0	Pop 9

Komplexním statistickým modelem, kterým je možné zjistit variabilitu na molekulární je AMOVA (analysis of molecular variance), jejíž výsledek je na obrázku 23. Nejvíce dosáhla v rámci jedinců (72 %) a nejméně mezi populacemi (3 %).



Obrázek 23: Analýza molekulární variability

6 Diskuze

Výzkum prokázal vhodnost markerů mikrosatelitové nDNA pro využití v lesnických populačně-genetických studiích. I s relativně nízkým počtem vzorků, kterých do finálních analýz bylo použito 163, bylo detekováno 272 alel na devíti mikrosateliových lokusech nDNA. Největší variabilitu vykazoval lokus M2-30, na kterém bylo zaznamenáno 54 alel. Takto vysoká míra polymorfismu poskytuje velké množství různých informací a umožňuje sestavit podrobnou genetickou strukturu zkoumaných populací.

Ukazatelé genetické diverzity a diferenciace byly porovnány s výsledky studií z Bosny a Hercegoviny (Ballian *et al.*, 2008), Německa (Fussi a Konnert, 2014), Itálie (Ferrazzini *et al.*, 2007), Irska (Beatty *et al.*, 2015) a studie, která zmapovala genetickou strukturu populací jasanu ztepilého na velké části Evropy (Heuertz, Hausman, *et al.*, 2004). Všechny tyto studie využily markery mikrosatelitové nDNA, a proto jsou výsledky vzájemně snadno porovnatelné.

Průměr počtu alel na lokus u všech populací ($N_a = 11,3$) byl vyšší než u populací z Bosny ($N_a = 10,2$), mírně nižší než u italských populací ($N_a = 12,3$) a významně nižší než u německých populací ($N_a = 16,3$). Je nutné též poznamenat, že rozptyl hodnot N_a byl u jednotlivých českých populací vůči celkovému průměru velmi malý, na rozdíl od populací z ostatních zemí, kde se vyskytovaly populace s nízkým i vysokým průměrným počtem alel oproti celkovému průměru. Průměrné počty vzácných a unikátních alel byly posuzovány pouze u německých populací, kde průměrně dosáhly mnohem větších hodnot ($N_R = 10,5$, $N_p = 6,4$) než u českých populací ($N_R = 3,4$, $N_p = 1,1$). Dalším ukazatelem, který byl posuzován pouze u německých populací byla alelická diverzita, poskytující informace a rovnoměrnosti zastoupení alel v populaci. I tento ukazatel byl vyšší u německých populací ($N_E = 7,4$), ovšem i u českých populací byla odhalena poměrně vysoká hodnota alelické diverzity ($N_E = 6,5$). Jediným ukazatelem, který byl uveden ve více než jedné studii je celkový počet alel na lokus, kterých bylo v českých populacích srovnatelné množství jako ve většině studií. Německá studie Fussi a Konnert (2014) výrazně předčila ve všech hodnotách výsledky, získané z českých populací. To může být způsobeno mnohem větším množstvím vzorků, které pocházely z různých oblastí, ale i různých zdrojů. Samozřejmě může docházet ke ztrátě celkové diverzity, vzácných a unikátních alel, ale na základě porovnání s pouze jednou studií je to obtížně prokazatelné.

Důležitým ukazatelem je míra heterozygotnosti, protože heterozygoté mívají větší schopnosti adaptace na nové podmínky. Zároveň se heterozygotnost využívá k posouzení genetické diverzity a diferenciaci populací, protože je přímo ovlivněna inbreedingem, jehož výsledkem je ztráta heterozygotů, čímž vznikají rozdílnosti v genetické struktuře subpopulací. Podíl pozorovaných heterozygotů v populaci byl 62,9 % ($H_O = 0,629$). Očekávaná míra heterozygotnosti, při náhodném páření by měla být 79,7 % ($H_E = 0,797$), což naznačuje, že v subpopulacích probíhá inbreeding, což dosvědčuje koeficient inbreedingu ($F_{IS} = 0,214$). Pozorovaná míra heterozygotnosti přibližně odpovídá hodnotám, naměřeným v ostatních studiích. Nejnížší byla míra heterozygotnosti v Bosně ($H_O = 0,542$) a Itálii ($H_O = 0,571$), kde zároveň dochází k intenzivnímu inbreedingu (Bosna: $F_{IS} = 0,312$; Itálie: $F_{IS} = 0,284$). Naopak vyšší míra heterozygotnosti u populací v Irsku ($H_O = 0,709$) a Německu ($H_O = 0,733$), s čímž se pojila i nižší míra inbreedingu (Irsko: $F_{IS} = 0,067$; Německo: $F_{IS} = 0,112$). Ve studii Heuertz, Hausman, *et al.* (2004), která mapovala genetickou strukturu populací po celé Evropě byla objevena míra inbreedingu obecně velmi malá, ve srovnání s ostatními studii (EU: $F_{IS} = 0,033$; západní a střední EU: $F_{IS} = 0,064$; JV EU: $F_{IS} = 0,012$, Švédsko: $F_{IS} = -0,001$).

Míra genetické diferenciaci byla posuzovaná ve všech studiích na základě ukazatele F_{ST} , jehož princip též souvisí s posouzením heterozygotnosti v jednotlivých populacích. Jedinou výjimkou byl výzkum Beatty *et al.* (2015), který posuzoval Φ_{ST} , což je ukazatel, v omezené míře vzájemně porovnatelný s F_{ST} . U českých populací byla objevena mírná, avšak statisticky významná diferenciaci mezi populacemi ($F_{ST} = 0,057$). V oblasti střední a západní Evropy se jedná o nadprůměrné číslo. Studie Heuertz, Hausman *et al.* (2004) naznačuje existenci geneticky uniformních populací v západní a střední Evropě s vysokou mírou diverzity, ale nízkou diferenciaci mezi populacemi. Průměrná hodnota genetické diferenciaci v oblasti západní a střední Evropy byla v této studii naměřena velmi nízká, pod hranici statistické významnosti ($F_{ST} = 0,027$). To podporují i hodnoty míry diferenciaci populací v Irsku ($\Phi_{ST} = 0,0131$) a Bosně ($F_{ST} = 0,023$), která i přes to, že je geograficky blízko vysoce diferenciovaným populacím jihovýchodní Evropy, má velké množství znaků západnějších populací. Vyšších hodnot dosahují populace v Itálii ($F_{ST} = 0,049$) a Německu ($F_{ST} = 0,045$), i když tyto hodnoty jsou stále nižší než u Českých populací. Pro srovnání průměrná hodnota diferenciaci mezi populacemi jihovýchodní Evropy a Švédska (s podobným vývojem v postglaciální době jako u populací jihovýchodní je o řád vyšší (jihovýchodní Evropy: $F_{ST} = 0,093$; Švédsko

$F_{ST} = 0,153$). U populací s takto vysokým indexem F_{ST} dochází již k velkým genetickým rozdílnostem mezi jednotlivými populacemi.

Na základě dat se dají české populace zařadit ke skupině populací střední a západní Evropy. Je u nich patrná relativně vysoká genetická diverzita v rámci populací, dochází u nich k inbreedingu a genetická diferenciaci mezi populacemi je docela nízká. Na druhou stranu dosahuje genetická diferenciaci mezi populacemi statisticky významné hodnoty a je nejvyšší ze všech porovnávaných studií, zkoumající populace střední a západní Evropy. Zároveň míra pozorované heterozygotnosti a inbreedingu je vyšší než u populací ze dvou zemí (Itálie a Bosna). U pozorované heterozygotnosti a inbreedingu se dá též vyzorovat vzorec. Tyto ukazatele jsou nejvyšší u populací v jihovýchodní Evropě a snižují se směrem na severozápad. V tomto vzorci se nachází Česká republika přesně uprostřed. Tento jev může být přisouzen šíření po době ledové, kdy se šířil jasan ztepilý z jižních refugií směrem na sever, a tedy v jižních populací je větší pravděpodobnost páření geneticky příbuzných jedinců. V těchto původních populací se vystřídalo větší množství generací, a díky konkurenční výhodě v adaptaci na místní podmínky nejsou příliš ovlivňovány vnějšími vlivy. I přes to, že se dají české populace zařadit, vzhledem ke genetické diferenciaci k populacím střední a západní Evropy, protože dosahují podobných a výrazně nižších hodnot, tak nelze vyzorovat žádný výrazný geografický vzorec. Zdá se, že genetická diferenciaci mezi jednotlivými populacemi je u populací střední a západní Evropy spíše ovlivněna specifickými podmínkami a místním reliéfem terénu (např. existencí terénních překážek). Tato hypotéza naznačuje, že u populací, geograficky vzdálených od původních refugií, dochází k tvorbě unikátních genetických struktur, které nejsou ovlivněny glaciální minulostí.

Představu o vzájemné příbuznosti poskytuje nejlépe graf na obrázku 23. I přes to, že si jsou některé populace z odlišných ekotypů vzájemně velmi podobné (např. 6 a 7), tak lze vyzorovat, že populace ze stejných ekotypů se seskupují do jednotlivých klastrů. To samozřejmě nemusí být způsobeno samotnými ekotypy, protože mezi zkoumanými populacemi ze stejného ekotypu byla menší geografická vzdálenost. Na druhou stranu vzájemná příbuznost některých populací neodráží jejich vzájemnou vzdálenost. Například populace 1 je vzdálená pár kilometrů od populace 2, a naopak populace 3 se nachází na druhém konci Českého krasu, ale populace 1 a 3 jsou geneticky velmi podobné a populace 2 je geneticky odlišná. Zvláštní je též vzájemná příbuznost velmi vzdálených a odlišných populací 2 a 4 a příbuznost populace 7 s populacemi 5 a 6. Na základě těchto

informací se dá vytvořit hypotéza, že příslušnost k ekotypům a vzájemná geografická vzdálenost jednotlivých populací velmi ovlivňuje jejich strukturu a genetickou diferenciaci mezi populacemi. Na druhou stranu dochází u populací buď k šíření pylu na velmi dlouhé vzdálenosti v řádu několika desítek až stovek kilometrů, což způsobuje vytvoření podobné genetické struktury u takto vzdálených populací nebo náhodnému vzniku různých populací s podobnou genetickou strukturou. Zajímavé je, že nejmenší množství alel (vč. vzácných) je v populacích z vápencového ekotypu, nejvíce v populacích horského ekotypu a populace lužního ekotypu je více alel než u vápencového ekotypu, ale méně než u horského. Zároveň jsou tyto hodnoty u populací jednotlivých ekotypů velmi podobné. Tato data naznačují určitou genetickou odlišnost jednotlivých populací. Na druhou stranu je možné, že extrémní podmínky (u vápencového ekotypu sucho a u lužního ekotypu záplavy) způsobují selekci specifických alel, čímž dochází ke ztrátě některých alel a celkové genetické diverzity.

Studie, zkoumající genetickou strukturu populací daného druhu mají charakter spíš základního výzkumu a jejich poznatky jsou obtížně aplikovatelné v praxi. Výsledky, publikované v této práci, doplňují informace o genetické struktuře evropských populací. Data sice mírně odrážejí příslušnost jednotlivých populací k ekotypům, ale ta se stále na základě publikovaných dat nedá spolehlivě prokázat. Pro dokonalou analýzu genetické struktury českých populací a případě potvrzení příslušnosti k jednotlivým ekotypům by byly potřeba další a detailnější studie. Proto na základě dřívějších výzkumů i této práce se nedá potvrdit význam využití osiva z porostů na základě příslušnosti k ekotypu. Na druhou stranu se nedá vyvrátit význam zakládání autochtonních porostů, což je obecným principem lesnictví, a proto je vhodné se řídit vyhláškou o přenosu reprodukčního materiálu č. 456/2021 Sb. Zároveň je zachování genetické diverzity důležitou predispozicí pro existenci stabilních porostů pro nadcházející klimatické změny. Tato a další studie prokazuje existenci relativně vysoké genetické diverzity, což je dobrá výchozí pozice a je nutné hospodařit způsobem, aby nedošlo k její redukci. Toho lze dosáhnout například využitím reprodukčního materiálu z většího množství mateřských porostů nebo cíleným šlechtěním jedinců s vhodnými a geneticky různorodými genotypy.

7 Závěr

Všechny vymezené cíle diplomové práce byly splněny. Byly navrženy dvě multiplexové reakce, využívající markery mikrosatelitové jaderné DNA, které se ukázaly jako vhodný nástroj ke zkoumání genetické struktury populací jasanu ztepilého. S jejich pomocí byly provedeny laboratorní analýzy vybraných jedinců z devíti subpopulací.

Na základě literární rešerše byla získaná data zasazena do kontextu genetické struktury populací na území Evropy. Kromě toho byla posuzována vzájemná příbuznost jednotlivých českých subpopulací, se zaměřením na příslušnost k jednotlivým ekotypům. I přes to, že některé výsledky naznačují existenci ekotypů, tak pouze na základě této práce nelze existenci ekotypů přímo potvrdit a jsou nutné další a detailnější studie.

V navazujících studiích by bylo vhodné využít i jiné typy molekulárních markerů, s jejichž pomocí by bylo možné získat detailnější informace o genetické struktuře českých populací. Tato práce použila markery mikrosatelitové jaderné DNA. Proto by mohla vzniknout práce podobného rozsahu, která by využila markery mikrosatelitové chloroplastové DNA. Chloroplastová DNA u čeledi olivovníkovitých méně podléhá mutacím, a proto poskytuje odlišné informace o genetické struktuře populací než jaderná DNA. Zároveň byly u velkého počtu studií využity pouze markery mikrosatelitové chloroplastové DNA, takže jejich využití by umožnilo porovnání výsledků s větším počtem studií. Nejvhodnější by bylo využití SNP markerů, s jejichž pomocí lze získat nejvíce informací o genetické struktuře, protože jsou v genomu velmi redundantní. Zároveň se ukazuje, že jsou vhodným nástrojem pro predikci resistance jedinců a populací vůči *H. fraxineus*, což zvyšuje jejich využitelnost. Problémem je, že se jedná o finančně náročnou metodu, a proto by bylo nutné zajistit odpovídající financování výzkumu. Dalšími metodami, které by se daly využít pro další výzkum je transkriptomika (zkoumání produktů genové exprese) nebo studium míry metylace různých genů.

Jedním z cílů bylo doporučení pro lesnickou praxi, což se ukázalo u práce s charakterem základního výzkumu jako velmi ambiciózní a tento cíl nebyl plně naplněn. Zásadním sdělením pro lesnickou praxi je, že se v České republice nacházejí populaci s dobrou genetickou diverzitou a je vhodné tento stav zachovat, z důvodu nadcházejících klimatických změn.

8 Seznam zdrojů a použité literatury

- Ballian, D. *et al.* (2008) „Genetic characterization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) populations in Bosnia and Herzegovina", *Periodicum biologorum*, 110(4), s. 323–328.
- Beatty, G. E. *et al.* (2015) „Lack of genetic structure and evidence for long-distance dispersal in ash (*Fraxinus excelsior*) populations under threat from an emergent fungal pathogen: implications for restorative planting", *Tree Genetics and Genomes*, 11(3), s. 53. doi: 10.1007/s11295-015-0879-5.
- Bennett, K. D., Tzedakis, P. C. a Willis, K. J. (1991) „Quaternary Refugia of North European Trees", *Journal of Biogeography*, 18(1), s. 103. doi: 10.2307/2845248.
- Besnard, G. *et al.* (2002) „*Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism", *Theoretical and Applied Genetics*, 104(8), s. 1353–1361. doi: 10.1007/s00122-001-0832-x.
- Børja, I. *et al.* (2017) „Ash dieback in Norway—current situation", *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.)—Consequences and Guidelines for Sustainable Management*, s. 166–175.
- Brachet, S. *et al.* (1999) „Rapid identification of microsatellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior*", *Molecular Ecology*, 8(1), s. 160–163.
- Brookes, A. J. (1999) „The essence of SNPs", *Gene*, 234(2), s. 177–186. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00219-X.
- Buriánek, V. (2009) „Proměnlivost, ochrana genetických zdrojů a provenienční výzkum jasanu", *Reports of Forestry Research*.
- Carlier, G., Peltier, J. P. a Gielly, L. (1992) „Comportement hydrique du frêne (*Fraxinus excelsior* L) dans une formation montagnarde mésoxérophile", in *Annales des sciences forestières*. EDP Sciences, s. 207–223.
- Carroll, S. B., Prud'homme, B. a Gompel, N. (2008) „Regulating evolution", *Scientific American*, 298(5), s. 60–67. doi: 10.1038/scientificamerican0508-60.
- Caudullo, G., Welk, E. a San-Miguel-Ayanz, J. (2017) „Chorological maps for the main European woody species", *Data in Brief*, 12, s. 662–666. doi: 10.1016/j.dib.2017.05.007.

Černý, K. (2011) „Nebezpečné patogeny lesních dřevin *Phytophthora alni* a *Chalara fraxinea*: rozšíření, význam a možná rizika vyplývající z jejich zdomácnění“, *Zpravodaj ochrany lesa*, 15, s. 71–75.

Český úřad zeměměřický a katastrální (2022) *Mapový podklad – Data200*. Dostupné z: www.cuzk.cz.

Chandelier, A. *et al.* (2014) „Detection and quantification of airborne inoculum of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* using real-time PCR assays“, *Plant Pathology*, 63(6), s. 1296–1305. doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12218>.

Cleary, M. R. *et al.* (2013) „Natural infection of *Fraxinus excelsior* seeds by *Chalara fraxinea*“, *Forest Pathology*, 43(1), s. 83–85.

Cohen, K.M., Harper, D.A.T., Gibbard, P. . (2022) *ICS International Chronostratigraphic Chart*. Dostupné z: www.stratigraphy.org.

Dacasa Rüdinger, M. C. *et al.* (2008) „Genetic structures of common ash (*Fraxinus excelsior*) populations in Germany at sites differing in water regimes“, *Canadian journal of forest research*, 38(5), s. 1199–1210.

Doo, M. a Kim, Y. (2015) „Obesity: Interactions of genome and nutrients intake“, *Preventive Nutrition and Food Science*, 20(1), s. 1–7. doi: [10.3746/pnf.2015.20.1.1](https://doi.org/10.3746/pnf.2015.20.1.1).

Downie, J. A. (2017) „Ash dieback epidemic in Europe: How can molecular technologies help?“, *PLoS Pathogens*, 13(7), s. 1–6. doi: [10.1371/journal.ppat.1006381](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006381).

Drenkhan, R. *et al.* (2017) „Overview of ash and ash dieback in Estonia“, *Dieback of European ash*, s. 115–124.

Emerald Ash Borer Network (2023). Dostupné z: <http://www.emeraldashborer.info/>.

Encyklopedia Britannica (2018) *Genetic marker*. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/genetic-marker>.

Enderle, R. *et al.* (2017) „Ash dieback in Germany: research on disease development, resistance and management options“, *Dieback of European ash (*Fraxinus spp.*): consequences and guidelines for sustainable management*, s. 89–105.

Enderle, R., Stenlid, J. a Vasaitis, R. (2019) „An overview of ash (*Fraxinus spp.*) and the ash dieback disease in Europe“, *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 14(025). doi: [10.1079/PAVSNNR201914025](https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201914025).

- Eriksson, G., Clapham, D. a Ekberg, I. (2006) *An introduction to forest genetics*. 2nd ed. Uppsala : SLU. Dostupné z: <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:001839301>.
- Ferrazzini, D., Monteleone, I. a Belletti, P. (2007) „Genetic variability and divergence among Italian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.)", *Annals of Forest Science*, 64(2), s. 159–168. doi: 10.1051/forest:2006100.
- Fussi, B. a Konnert, M. (2014) „Genetic analysis of European common ash (*Fraxinus excelsior* L.) populations affected by ash dieback", *Silvae Genetica*, 63(5), s. 198–212. doi: 10.1515/sg-2014-0026.
- Genetic Science Learning Center (2018) *PCR*. Dostupné z: <https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>.
- Gilbert, N. a Allan, J. (2014) „Supercoiling in DNA and chromatin", *Current Opinion in Genetics and Development*, 25(1), s. 15–21. doi: 10.1016/j.gde.2013.10.013.
- Gregorová, B. *et al.* (2006) *Poškození dřevin a jeho příčiny*. Praha: VÚKOZ.
- Gregory, R. T. (2005) *The Evolution of the Genome, The Evolution of the Genome*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-301463-4.X5000-1.
- Grosdidier, M., Ioos, R. a Marçais, B. (2018) „Do higher summer temperatures restrict the dissemination of *Hymenoscyphus fraxineus* in France?", *Forest Pathology*, 48(4), s. e12426.
- Gross, A. *et al.* (2012) „Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*", *Fungal genetics and biology*, 49(12), s. 977–986.
- Grover, A. a Sharma, P. C. (2016) „Development and use of molecular markers: Past and present", *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), s. 290–302. doi: 10.3109/07388551.2014.959891.
- Havrlová, L. *et al.* (2016) „Differences in susceptibility to ash dieback in Czech provenances of *Fraxinus excelsior*", *Forest Pathology*, 46(4), s. 281–288. doi: 10.1111/efp.12265.
- Havrlová, L., Černý, K. a Kowalski, T. (2013) „Nekróza jasanu – přehled současných znalostí", s. 56–63.

- Hebel, I., Haas, R. a Dounavi, A. (2006) „Genetic variation of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) populations from provenance regions in southern Germany by using nuclear and chloroplast microsatellites", *Silvae Genetica*, 55(1), s. 38–44. doi: 10.1515/sg-2006-0006.
- Heinze, B. *et al.* (2017) „Ash dieback in Austria—history, current situation and outlook", *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.)—Consequences and Guidelines for Sustainable Management*, s. 33–52.
- Heritage Hurleys (2009) *Old Celtic Ireland souvenir gift hurl*. Dostupné z: <https://www.flickr.com/photos/66617307@N04/6066364816>.
- Heuertz, M., Fineschi, S., *et al.* (2004) „Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe", *Molecular Ecology*, 13(11), s. 3437–3452. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02333.x.
- Heuertz, M., Hausman, J. F., *et al.* (2004) „Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.)", *Evolution*, 58(5), s. 976–988. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb00432.x.
- Hewitt, G. M. (1999) „Post-glacial re-colonization of European biota", *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1–2), s. 87–112. doi: 10.1111/j.1095-8312.1999.tb01160.x.
- Jankovský, L. a Holdenrieder, O. (2009) „*Chalara fraxinea*—ash dieback in the Czech Republic", *Plant Protection Science*, 45(2), s. 74–78.
- Jarne, P. a Lagoda, P. J. L. (1996) „Microsatellites, from molecules to populations and back", *Trends in Ecology and Evolution*, 11(10), s. 424–429. doi: 10.1016/0169-5347(96)10049-5.
- Jehan, T. a Lakhanpaul, S. (2006) „Single nucleotide polymorphism (SNP) - methods and applications in plant genetics: A review", *Indian Journal of Biotechnology*, 5(4), s. 435–459.
- Klooster, W. S. *et al.* (2014) „Ash (*Fraxinus* spp.) mortality, regeneration, and seed bank dynamics in mixed hardwood forests following invasion by emerald ash borer (*Agrilus planipennis*)", *Biological Invasions*, 16(4), s. 859–873. doi: 10.1007/s10530-013-0543-7.

- Knight, K. S., Brown, J. P. a Long, R. P. (2013) „Factors affecting the survival of ash (*Fraxinus* spp.) trees infested by emerald ash borer (*Agrilus planipennis*)", *Biological Invasions*, 15(2), s. 371–383. doi: 10.1007/s10530-012-0292-z.
- Kowalski, T. (2001) „O zamieraniu jesionów", *Trybuna Leśnika*, (04), s. 6–7.
- Kowalski, T. (2006) „*Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland", *Forest Pathology*, 36(4), s. 264–270. doi: 10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x.
- Kowalski, T. a Holdenrieder, O. (2009) „The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback", *Forest Pathology*, 39(5), s. 304–308. doi: 10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x.
- Kremer, A. *et al.* (2002) „Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks?", *Forest Ecology and Management*, 156(1–3), s. 75–87. doi: 10.1016/S0378-1127(01)00635-1.
- Landolt, J. *et al.* (2016) „Ash dieback due to *Hymenoscyphus fraxineus*: what can be learnt from evolutionary ecology?", *Plant Pathology*, 65(7), s. 1056–1070. doi: 10.1111/ppa.12539.
- Lee, P. Y. *et al.* (2012) „Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments", *Journal of Visualized Experiments*, (62), s. e3923. doi: 10.3791/3923.
- Lee, S. V. a Bahaman, A. R. (2012) „Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis", in *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. doi: 10.5772/36891.
- Lefort, F. *et al.* (1999) „Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (*Oleaceae*)", *Molecular Ecology*, 8(6), s. 1088–1089. doi: 10.1046/j.1365-294x.1999.00655_8.x.
- Leibundgut, H. (1956) „Beitrag zur Rassenfrage bei der Esche", *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen*, 107, s. 165–174.
- Lenz, H. D. *et al.* (2016) „Development of Ash Dieback in South-Eastern Germany and the Increasing Occurrence of Secondary Pathogens", *Forests*. doi: 10.3390/f7020041.

- Liu, H. *et al.* (2003) „Exploratory survey for the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), and its natural enemies in China", *The Great Lakes Entomologist*, 36(3 & 4), s. 11.
- Loxdale, H. D. a Lushai, G. (1998) „Molecular markers in entomology", *Bulletin of Entomological Research*. 2009/07/10, 88(6), s. 577–600. doi: 10.1017/s0007485300054250.
- Madsen, C. L. *et al.* (2021) „Combined progress in symptoms caused by *Hymenoscyphus fraxineus* and *Armillaria* species, and corresponding mortality in young and old ash trees", *Forest Ecology and Management*, 491, s. 119177. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119177>.
- McCracken, A. R. *et al.* (2017) „Ash dieback on the island of Ireland", in. Swedish University of Agricultural Sciences. Dostupné z: [https://t-stor.teagasc.ie/bitstream/11019/1224/1/Ash diebaack on island of Ireland.pdf](https://t-stor.teagasc.ie/bitstream/11019/1224/1/Ash%20dieback%20on%20island%20of%20Ireland.pdf).
- Mckinney, L. V. *et al.* (2014) „The ash dieback crisis: Genetic variation in resistance can prove a long-term solution", *Plant Pathology*, 63(3), s. 485–499. doi: 10.1111/ppa.12196.
- McKinney, L. V. *et al.* (2011) „Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): An emerging infectious disease", *Heredity*. 2010/09/08, 106(5), s. 788–797. doi: 10.1038/hdy.2010.119.
- McMullan, M. *et al.* (2018) „The ash dieback invasion of Europe was founded by two genetically divergent individuals", *Nature Ecology and Evolution*, 2(6), s. 1000–1008. doi: 10.1038/s41559-018-0548-9.
- Menkis, A. *et al.* (2020) „Identifying *Fraxinus excelsior* tolerant to ash dieback: Visual field monitoring versus a molecular marker", *Forest Pathology*, 50(1), s. e12572. doi: 10.1111/efp.12572.
- Ministerstvo zemědělství (2005) *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky k 31.12.2004*. Praha.
- Ministerstvo zemědělství (2010) *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky k 31.12.2009*. Praha.
- Ministerstvo zemědělství (2015) *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky k 31.12.2014*.

Ministerstvo zemědělství (2020) *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství v České republice v roce 2019*. Praha.

Ministerstvo zemědělství (2021) *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2020*. Praha.

Ministerstvo zemědělství (2022) *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství v České republice v roce 2021*. Praha. Dostupné z: https://eagri.cz/public/web/file/715438/Zprava_o_stavu_lesa_2021_web.pdf.

Mullis, K. B. (1990) „The unusual origin of the polymerase chain reaction“, *Scientific American*, 262(4), s. 56–65. doi: 10.1038/scientificamerican0490-56.

Musil, I. a Möllerová, J. (2005) *Listnaté dřeviny*. první. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze.

Nei, M. (1972) „Genetic distance between populations“, *The American Naturalist*, 106(949), s. 283–292.

Nielsen, L. R. *et al.* (2017) „The susceptibility of Asian, European and North American *Fraxinus* species to the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* reflects their phylogenetic history“, *European Journal of Forest Research*, 136(1), s. 59–73. doi: 10.1007/s10342-016-1009-0.

Nowakowska, J., Jabłonowski, S. a Mockeliūnaitė, R. (2004) „Genetic Variability within and among Polish and Lithuanian Populations of Common Ash (*Fraxinus excelsior* L.) Based on RAPD Analysis“, (January 2004), s. 57–64.

Orlova-Bienkowskaja, M. J. (2014) „Ashes in Europe are in danger: the invasive range of *Agrilus planipennis* in European Russia is expanding“, *Biological Invasions*, 16(7), s. 1345–1349. doi: 10.1007/s10530-013-0579-8.

Peakall, R. O. D. a Smouse, P. E. (2006) „GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research“, *Molecular ecology notes*, 6(1), s. 288–295.

Peakall, R. a Smouse, P. E. (2012) „GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update“, *Bioinformatics*, 28(19), s. 2537–2539.

- Pliūra, A. *et al.* (2005) „Pvingila et al 2005 Genetic diversity (RAPD) in natural Lithuanian.pdf", (3), s. 46–53.
- Queloz, V. *et al.* (2011) „Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*", *Forest Pathology*, 41(2), s. 133–142. doi: 10.1111/j.1439-0329.2010.00645.x.
- Queloz, V. *et al.* (2017) „Ash dieback in Switzerland: history and scientific achievements", *Dieback of European ash*, s. 68–78.
- Rabindra, P. a Raju, N. (2012) „Gel-Electrophoresis and Its Applications", in Magdeldin, N. R. E.-S. (ed.) *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. Rijeka: IntechOpen, s. Ch. 2. doi: 10.5772/38479.
- Rozsypálek, J. *et al.* (2017) „Ash and ash dieback in the Czech Republic.", in *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.): Consequences and Guidelines for Sustainable Management*, s. 79–88.
- Shannon, C. E. (1948) „A mathematical theory of communication", *The Bell System Technical Journal*, 27(3), s. 379–423. doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.
- Shaw, N. N. a Arya, D. P. (2008) „Recognition of the unique structure of DNA:RNA hybrids", *Biochimie*, 90(7), s. 1026–1039. doi: 10.1016/j.biochi.2008.04.011.
- Sherwin, W. B. *et al.* (2017) „Information Theory Broadens the Spectrum of Molecular Ecology and Evolution", *Trends in Ecology & Evolution*, 32(12), s. 948–963. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.09.012>.
- Šimíček, V. (1999) *Břehové a doprovodné porosty vodních toků –součást lužních ekosystémů*. Praha.
- Skovsgaard, J. P. *et al.* (2010) „Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.)", *Forest Pathology*, 40(1), s. 7–18.
- Skovsgaard, J. P. *et al.* (2017) „Silvicultural strategies for *Fraxinus excelsior* in response to dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus*", *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 90(4), s. 455–472.
- Sollars, E. S. A. *et al.* (2017) „Genome sequence and genetic diversity of European ash trees", *Nature*, 541(7636), s. 212–216. doi: 10.1038/nature20786.

- Sollars, E. S. A. a Buggs, R. J. A. (2018) „Genome-wide epigenetic variation among ash trees differing in susceptibility to a fungal disease", *BMC Genomics*, 19(1), s. 502. doi: 10.1186/s12864-018-4874-8.
- Staple, D. W. a Butcher, S. E. (2005) „Pseudoknots: RNA structures with diverse functions", *PLoS Biology*, 3(6), s. 0956–0959. doi: 10.1371/journal.pbio.0030213.
- Stocks, J. J. *et al.* (2019) „Genomic basis of European ash tree resistance to ash dieback fungus", *Nature Ecology & Evolution*, 3(12), s. 1686–1696. doi: 10.1038/s41559-019-1036-6.
- Tollefsrud, M. M. *et al.* (2016) „Genetic structure in the northern range margins of common ash, *Fraxinus excelsior* L.", *PLoS ONE*, 11(12), s. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0167104.
- Tzedakis, P. C., Emerson, B. C. a Hewitt, G. M. (2013) „Cryptic or mystic? Glacial tree refugia in northern Europe", *Trends in Ecology and Evolution*, 28(12), s. 696–704. doi: 10.1016/j.tree.2013.09.001.
- Úřadníček, L. *et al.* (2014) *Dendrologie (společenstva a významné druhy ČR)*. first. Brno: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 61300 Brno.
- Valenta, V. *et al.* (2017) „A new forest pest in Europe: a review of Emerald ash borer (*Agrilus planipennis*) invasion", *Journal of Applied Entomology*, 141(7), s. 507–526. doi: <https://doi.org/10.1111/jen.12369>.
- Vignal, A. *et al.* (2002) „A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics", *Genetics Selection Evolution*, 34(3), s. 275–305. doi: 10.1051/gse:2002009.
- Wallander, E. (2008) „Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy", *Plant Systematics and Evolution*, 273(1–2), s. 25–49. doi: 10.1007/s00606-008-0005-3.
- Wang, X.-Y. *et al.* (2010) „The biology and ecology of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, in China", *Journal of Insect Science*, 10(1), s. 128. doi: 10.1673/031.010.12801.
- Weiser, F. (1965) „Untersuchungen generativer Nachkommenschaften von Eschen (*Fraxinus excelsior* L.) trockener Kalkstandorte und grundwasserbeeinflußter Standorte im Gefäßversuch bei differenzierten Wasser-und Kalkgaben", *Forstwissenschaftliches Centralblatt*, 84, s. 44–64.

- Weiser, F. (1974) „Ergebnisse 10 jaehriger vergleichender anbauversuche mit generativen nachkommenschaften von eschen (*fraxinus excelsior* l.) trockener kalkstandorte und grundwasserbeeinflusster standorte ".
- Weiser, F. (1995) „Studies into the existence of ecotypes of ash (*Fraxinus excelsior*).", *Forstarchiv*, 66(6), s. 251–257. Dostupné z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19960603341>.
- Wey, T. *et al.* (2016) „MAT–gene structure and mating behavior of *Hymenoscyphus fraxineus* and *Hymenoscyphus albidus*", *Fungal Genetics and Biology*, 87, s. 54–63.
- White, T. L., Adams, W. T. a Neale, D. B. (2007) *Forest Genetics*. CABI Pub. (CABI Publishing Series). Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=Ose2QgAACAAJ>.
- Wikimedia Commons contributors (2021) [cit. 2021-04-11] File:Polymerase chain reactionen.svg, Wikimedia Commons, the free media repository. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Polymerase_chain_reactionen.svg&oldid=512201078 (accessed April 3, 2023).
- Willis, K. J. a Van Andel, T. H. (2004) „Trees or no trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation", *Quaternary Science Reviews*, 23(23–24), s. 2369–2387.
- Zhang, Y. *et al.* (2008) „Genome-wide identification of microsatellites in white clover (*Trifolium repens* L.) using FIASCO and phpSSRMiner", *Plant Methods*, 4(1), s. 19. doi: 10.1186/1746-4811-4-19.
- Zhao, Y.-J. *et al.* (2013) „*Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan", *Mycotaxon*, 122(1), s. 25–41.