

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Genetická struktura populací ohrožených
horských druhů vrb (*Salix* spp.)**

Genetic population structure of endangered willow species (*Salix* spp.)

Diplomová práce

Autor: **Bc. Michal Sochor**

N1501 Biologie, obor Botanika
prezenční studium

Vedoucí práce: **RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.**

Srpen 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce. Uvedl jsem všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpal.

V Olomouci 1. 8. 2011

Podpis:

Poděkování

Chtěl bych upřímně poděkovat několika lidem, bez jejichž pomoci by práce nemohla být dokončena. Zvláštní poděkování patří RNDr. Ľuboši Majeskému za praktickou pomoc při laboratorní práci a analýze dat a RNDr. Radimu J. Vašutovi, PhD., nejen za konzultace a motivaci k další práci. Nemalý dík patří také Bc. Soně Hrachové a Mgr. Evě Stanovské za primární data a poskytnutí rostlinného materiálu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Michal Sochor

Název práce: Genetická struktura populací ohrožených horských druhů vrb (*Salix* spp.)

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP

Vedoucí práce: RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.

Rok obhajoby: 2011

Abstrakt: Horské vrby v ČR představují skupinu ohrožených druhů se zajímavou fylogeografií a zároveň také reprodukčními strategiemi, určujícími ekologické a genetické charakteristiky jejich populací. Jako dva modelové druhy byly vybrány *S. daphnoides* Vill., pro studium struktury populací na okraji přirozeného rozšíření pod výrazným anthropickým tlakem, a *Salix lapponum* L., pro studium genetické diverzity populací dlouhodobě izolovaných od hlavního areálu i od ostatních exklávních arel, vykazující hybridizaci a speciaci. Na základě analýzy polymorfismu v mikrosatelitárních lokusech byla kvantifikována klonalita, vnitropopulační struktura a mezipopulační diferenciace u různých typů populací. Přirozené populace obou druhů vykazují vysokou genetickou diverzitu a velmi nízký až nulový stupeň klonality. Vysazované populace *S. daphnoides* jsou tvořeny vždy jedním či dvěma klony, u druhého druhu však udržují vysoký stupeň variability, srovnatelný s populacemi přirozenými. Mezipopulační diferenciace je u obou druhů slabá až středně silná, avšak vždy průkazná, svědčící o sníženém genovém toku mezi populacemi, a to i na krátké vzdálenosti. Hybridizace a introgrese, významná pro *S. lapponum*, sice byla prokázána, další studium těchto jevů je však nutné pro přesnější interpretaci.

Klíčová slova: mikrosatelity, SSR, vysokohorské vrby, klonalita, F-statistika, mezipopulační diferenciace

Počet stran: 55

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Michal Sochor

Title: Genetic population structure of endangered willow species (*Salix* spp.)

Type of thesis: master thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacky University

Supervisor: RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.

The year of presentation: 2011

Abstract: Mountainous willows represent rare and endangered species. Their phylogeography and reproduction strategies interestingly influence their population structure. We therefore have chosen two model species - i) *Salix daphnoides* Vill. from the Beskydy mountains as a species with marginal populations in the Czech Republic under strong human influence and ii) *Salix lapponum* L. from the Krkonoše mountains as a glacial relic species with high degree of hybridization and speciation. Based on microsatellite loci analysis natural populations of both species have high degree of genetic diversity and rare clonal propagation (PD = 1,0 and 0,83 respectively). On the other hand, *S. daphnoides* anthropogenic populations are formed by only one or two genotypes and probably aren't able to reproduce. *S. lapponum* re-introduced populations are genetically as variable as the natural populations, but have slightly higher degree of clonality (caused by men). Both species' populations are weakly or moderately (but always significantly) differentiated, indicating lower gene flow between even geographically close populations. Hybridization and introgression in *S. lapponum* were detected, but more data are needed for more precise conclusions in this topic.

Keywords: microsatellites, SSR, mountainous willows, clonality, F-statistics, interpopulation differentiation

Number of pages: 55

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

1	Úvod	6
1.1	<i>Teoretické pozadí analýzy mikrosatelitárních dat</i>	<i>10</i>
2	Materiál a metody.....	15
2.1	<i>Rostlinný materiál.....</i>	<i>15</i>
2.2	<i>Izolace DNA.....</i>	<i>17</i>
2.3	<i>Molekulární markery</i>	<i>18</i>
2.4	<i>Fragmentová analýza</i>	<i>18</i>
2.5	<i>Analýza dat</i>	<i>19</i>
3	Výsledky	21
3.1	<i>Salix daphnoides</i>	<i>21</i>
3.1.1	<i>Vnitropopulační charakteristiky</i>	<i>22</i>
3.1.2	<i>Diferenciace subpopulací.....</i>	<i>23</i>
3.1.3	<i>Populační struktura</i>	<i>24</i>
3.2	<i>Salix lapponum</i>	<i>29</i>
3.2.1	<i>Vnitropopulační charakteristiky</i>	<i>29</i>
3.2.2	<i>Pohlavní diferenciace.....</i>	<i>31</i>
3.2.3	<i>Diferenciace subpopulací.....</i>	<i>33</i>
3.2.4	<i>Populační struktura</i>	<i>33</i>
3.2.5	<i>Hybridizace a introgrese</i>	<i>36</i>
4	Diskuze.....	37
4.1	<i>Klonální propagace</i>	<i>37</i>
4.2	<i>Vnitropopulační struktura.....</i>	<i>40</i>
4.3	<i>Mezipopulační diferenciace</i>	<i>42</i>
4.4	<i>Výsadby.....</i>	<i>45</i>
4.5	<i>Hybridizace a introgrese</i>	<i>46</i>
5	Závěr	47
6	Použitá literatura.....	49

1 Úvod

Vrba lýkovcová (*Salix daphnoides* Vill.) a vrba laponská (*Salix lapponum* L.) jsou ohrožené taxony české a moravské květeny. *S. daphnoides* je řazena do kategorie C3 v červeném seznamu ČR i Moravskoslezského kraje (Holub et Procházka 2000, Sedláčková et Plášek 2005), *S. lapponum* pak do kategorie C2 v Červeném seznamu ČR a do kat. C3 pro českou část Krkonoš v červeném seznamu Krkonoš (Holub et Procházka 2000, Štursa et al. 2009). Ačkoli jsou habituálně, ekologicky i fylogeograficky značně rozdílné, sdílejí řadu rysů, které je spojují z pohledu populačně genetického. Kromě stejné ploidie ($2n = 2x = 38$; Chmelař et Koblížek 1990), která má důsledky v udržování genetické diverzity, heterozygotnosti i pro analýzu molekulárních dat, sdílejí i podobné reprodukční strategie. Je to zejména entomogamie kombinovaná s anemogamií a anemochorie s příležitostnou hydrochorií, dále také potenciální možnost klonální propagace pomocí kořenových či stonkových výmladků a zakořeňování větviček (Krasny et al. 1988; Karrenberg et al. 2002). Dalšími společnými charakteristikami jsou vazba na určitým způsobem vzácné a extrémní biotopy a z toho plynoucí fragmentárnost výskytu a v neposlední řadě také zásahy člověka do přirozeného ekologického a geografického rozšíření i do populační struktury druhů.

Vrba lýkovcová (*Salix daphnoides* Vill.) je poměrně nápadnou dřevinou stromovitého vzrůstu, jejíž celkový areál je omezen pouze na 3 centra v Evropě: hory střední a částečně jižní Evropy (Alpy, Karpaty, Pyreneje, Apeniny), východní Pobaltí a jižní Norsko a Švédsko. V Pobaltí však nastává problém s determinací, neboť tamní rostliny jsou morfologicky podobnější spíše příbuznému druhu *S. acutifolia* Willd., vyskytující se dále na východ. Navíc i řada lokalit ze střední Evropy je sporná v otázce původnosti. Zejména výskyty v Lucemburku, severovýchodním Německu, centrálním Polsku a některé výskyty ve Švédsku a Pobaltí jsou zřejmě sekundární následkem výsadeb člověkem (Skvortsov 1999). Na území České republiky druh zasahuje pouze nejzápadnější částí své karpatské arely a přirozeně se tak u nás vyskytuje jen v Moravskoslezských Beskydech (Chmelař et Koblížek 1990).

Druh je diagnostický a dominantní ve společenstvech svazu *Salicion eleagnodaphnoidis* (Moor 1958) Grass in Mucina et al. 1993 a diagnostický pro asociaci *Myricarietum germanicae* (Rubel 1912) Jenik 1955 (svaz *Salicion incanae* Aichinger 1933). V České republice se oba typy společenstev vyskytují na šterkových říčních

náplavech pouze v Beskydech a Podbeskydí, navíc jsou ohroženy regulacemi toků a jinými, zejména vodohospodářskými zásahy (Chytrý et al. 2001). Vrba lýkocová se nicméně vyskytuje po celém území České republiky i na jiných stanovištích, které pro ni nejsou typické, následkem záměrných výsadeb jakožto okrasné, medonosné a břehy-zpevňující dřeviny (Chmelař et Koblížek 1990, Stanovská 2011). Není proto moc překvapivé, že i v oblasti Beskyd lze tento druh nalézt na stanovištích anthropogenních, ale také na stanovištích přirozených či přírodě blízkých, jako jsou zejména společenstva svazu *Calthion palustris* Tüxen 1937 a podsvazu *Alnion glutinoso-incanae* Oberdorfer 1953 (svaz *Alnion incanae* Pawłowski et al. 1928; Sochor et al. 2010, Stanovská 2011).

Naproti tomu *S. lapponum* je rostlinnou výhradně nižšího keřovitého vzrůstu, vysokou do 1,5 (vzácně až 2,5) m, avšak tvořící rozsáhlé polykormony, již z dálky identifikovatelné podle sivé barvy. Ve střední Evropě osídluje subalpínská vrchoviště, křoviny a vysokobylinné nivy svazu *Adenosylion* Br.-Bl. 1926 (Chytrý et al. 2001). Centrem celkového rozšíření je téměř celá Skandinávie a boreo-arktický pás evropského Ruska a západní Sibiře s těžištěm výskytu v (leso)tundře s přesahem do lesostepí. Exklávně se druh vyskytuje ve vysokých horách Evropy: ve Skotsku a severní Anglii, ve východních Pyrenejích, francouzském centrálním masivu, Sudetách, východních Karpatech, Bulharsku a Makedonii. V Alpách a západních Karpatech je nahrazen příbuzným druhem *S. helvetica* Vill., na východní Sibiři a Altaji vikarizuje se *S. krylovii* E. Wolf. Postavení a taxonomická hodnota taxonů této skupiny však není jednoznačně vyřešena (Skvortsov 1999). Na území České republiky *S. lapponum* představuje glaciální relik, zachovaný pouze v subalpínském stupni Krkonoš a reziduálně také na Pradědu v Hrubém Jeseníku. Z Krkonoš byla popsána lysá forma jako *S. daphneola* Tausch, endemická pro toto pohoří, jejíž taxonomické postavení je opět velmi sporné a bude předmětem dalšího studia (Hroneš 2009).

Jakožto zástupci rodu *Salix* se oba druhy vyznačují řadou charakteristik, determinujících populační strukturu a genetickou diverzitu uvnitř populací. Nejvýznamnější jsou entomogamie s fakultativní anemogamií a anemochorie se specifickou morfologií semen, která jsou četná, drobná a ochmýřená. To umožňuje efektivní šíření na velké vzdálenosti. Předpokládaný vysoký genový tok, vycházející ze způsobu opylení i šíření semen, tak způsobuje prudké změny v subpopulacích i v rámci metapopulace. Za příhodných okolností v době uvolnění semen je umožněno osídlení nových, často

odlehých stanovišť velkým počtem semenáčků a reagovat na různé selekční tlaky prostředí, takže je zlepšena adaptabilita populací (Hörandl et al. 2002).

Dalším potenciálně významným faktorem je hybridizace, která je v rodu známým fenoménem. Obecně jsou v rámci areálu druhu nejnáchylnější k hybridizaci malé periferní populace, které častěji přicházejí do kontaktu s jinými, příbuznými druhy a tím se zvyšuje podíl pylu těchto odlišných druhů. Malé populace jsou pak zvláště ohroženy zejména díky asymetrickému genovému toku. Pro tyto populace pak může mít interspecifický genový tok v zásadě 2 důsledky: genetická asimilace nebo outbrední deprese (Rieseberg 1997, Ellstrand et Elam 1993). U *S. daphnoides* je v Moravskoslezských Beskydách hybridizace spíše výjimkou, než pravidlem, ačkoliv i zde byli hybridy pozorováni (Stanovská 2011, Vašut R. J. osobní komunikace) a molekulárně geneticky potvrzeni (nepublikovaná data). Mnohem častější je hybridizace u *S. lapponum* v Krkonoších, kde přichází do kontaktu, mimo jiné, se *S. silesiaca* a na některých lokalitách, zvláště na Pančavské louce, byla pozorována řada jedinců intermediárního fenotypu či jedinci vykazující různé kombinace znaků obou druhů (Hrachová et Hroneš, osobní komunikace).

Mnohem významnějším jevem však může být klonální propagace, snižující efektivní velikost populace a tím i genetickou diverzitu. Zvlášť nápadný fenomén je to u vysokohorských druhů, které musí čelit náročným ekologickým podmínkám jako jsou prudký gradient a ostré hranice prostředí, silná fragmentace a disturbance prostředí, krátké vegetační období, omezené zdroje, silné větry nebo dlouhá období sněhové pokrývky (Pluess et Stöcklin 2004, Reisch et al. 2007), jejichž následkem je investice do generativní reprodukce riziková. To jsou z velké části faktory, se kterými se musí vyrovnat i *Salix daphnoides*, jakožto druh ekologicky specializovaný na nestabilní prostředí šterkových náplavů divočících horských řek (např. Skvortsov 1999). Tato specializace navíc vyžaduje dostupnost vhodných stanovišť pro uchycení semenáčků, tedy stanovišť, která jsou velmi nestabilní, podléhají rychlým, nepředvídatelným změnám a mimo to limitují přítomnost vegetace jak nedostatkem živin, tak často i vody. Právě dostupnost vody bývá zásadní pro úspěšné osídlení náplavu a je odrazem jak hloubky říční vody pod povrchem, tak hrubostí zrna sedimentu (Karrenberg et al. 2002). V rámci čeledi *Salicaceae* Mirbel je vegetativní propagace poměrně běžný a obecně známý jev, nicméně přirozená míra využití tohoto typu rozmnožování zdá se být závislá na mnoha faktorech, od morfologicko-fyziologických adaptací, přes aktuální charakter

biotopu, po původnost druhu v daném území či na daném biotopu. Druhou stranou téže mince jsou i záměrné výsadby člověkem, které jsou činěny pochopitelně většinou pomocí snazšího vegetativního množení.

Jak již bylo zmíněno, oba druhy na naše území zasahují marginálně či exklávně – pouze okrajovými populacemi karpatské arely u *S. daphnoides* a izolovanými populacemi od hlavního areálu i od ostatních pohoří Evropy u *S. lapponum*. Jako takové mohou být postiženy sníženým genovým tokem (posíleným navíc izolovaností biotopů v horských údolích *S. daphnoides*) a následným genetickým driftem a inbreedingem, které umocňují a jsou umocňovány poklesem efektivní velikosti populací. Následkem těchto procesů je pak eroze kvantitativní genetické diverzity, nezbytné pro adaptivní evoluci, a kvůli zvýšení homozygotnosti také výraznější projev genetického zatížení (*genetic load*) negativními mutacemi (Keller et Waller 2002). Dalším problémem malých izolovaných populací pak může být náhodná akumulace negativních mutací, proti nimž je selekce v malých populacích zpravidla neúčinná. Naopak selekčně výhodné alely se fixují méně než ve velkých populacích a jsou spíše eliminovány. To může vést až k tzv. mutačnímu zhroucení (*mutational meltdown*) či extinkčnímu víru (*extinction vortex*; Jaquiéry et al. 2008). Odhad populačních parametrů jako fixační index F_{ST} (Weir et Cockerham 1984) nebo jeho analogy, např. G_{ST} (Nei 1973), ρ_{ST} (Rousset 1996), Φ_{ST} (Michalakis et Excoffier 1996), tak mohou představovat určitý index náchylnosti populace k negativním vlivům genetického driftu (Keller et Waller 2002), což dokládají i teoretické studie postavené na matematických modelech (Jacquiéry et al. 2008).

Vzhledem k vodohospodářským zásahům do přirozeného režimu horských řek či zakládání nových populací řízkováním v posledních desetiletích je navíc možné očekávat i prodělaný *bottleneck*, který sice také snižuje genovou diverzitu, ale oproti driftu a inbreedingu se projevuje přechodným zvýšením heterozygotnosti populace, neboť během drastického poklesu efektivní velikosti populace se alelická diverzita snižuje rychleji než heterozygotnost. To má za následek nižší pozorovaný počet alel, než jaký by byl očekávatelný na základě pozorované heterozygotnosti při rovnováze mutace–drift (Cornuet et Luikart 1996) .

Salix daphnoides byla vzhledem k výše uvedeným charakteristikám a předpokladům vybrána jako modelový druh vrby pro studium struktury populací na okraji přirozeného rozšíření pod výrazným anthropickým tlakem. *Salix lapponum* pak jako modelový druh pro studium genetické diverzity populací dlouhodobě izolovaných od hlavního areálu i

od ostatních exklávních arel, vykazující hybridizaci a speciaci (*S. daphneola*). Poznání intenzity genového toku, míry propojení jednotlivých subpopulací, genové diverzity, reprodukčního chování a přirozeného ekologického vymezení těchto populací obou druhů je nezbytné pro další kroky v ochraně genofondu těchto, ale i dalších, ekologicky nebo fylogeneticky příbuzných druhů. Byť se jedná o práci víceméně regionálního charakteru, uvážené zobecnění získaných dat může poskytnout další z důležitých dílčích informací v populační genetice anemochorních dlouhověkých rostlin či rostlin ohrožených biotopů.

1.1 Teoretické pozadí analýzy mikrosatelitárních dat

Ve 40. a 50. letech 20. století Sewall Wright a Gustave Malécot představili nezávisle na sobě statistiky, které měly kvantifikovat složky genetické diverzity ve strukturované populaci. Zatímco Malécotova práce prakticky upadla v zapomnění zejména z toho důvodu, že publikoval ve francouzštině, Wrightova práce dala základ dalším metodám analýzy populačně genetických dat a její interpretaci (Holsinger 2010a, Holsinger et Weir 2009).

Snad nejjednodušeji lze tyto tzv. F-statistiky pro populaci se třemi úrovněmi (jedinec, subpopulace a metapopulace) formulovat v termínech redukce heterozygotnosti

a) jedince vůči subpopulaci: $F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$,

b) subpopulace vůči ekvivalentní celkové populaci s náhodným oplozením:

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_S \text{ a}$$

c) jedince vůči celkové populaci: $F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T$,

kde H_I je frekvence heterozygotů v každé subpopulaci (či aritmetický průměr pro všechny subpopulace), H_S je očekávaná heterozygotnost ekvivalentní subpopulace s náhodným oplozením (či aritmetický průměr pro všechny subpopulace) a H_T je očekávaná heterozygotnost ekvivalentní celkové populace s náhodným oplozením (Relichová 2001, Hamilton 2009).

Alternativně lze F_{ST} index, jakožto základní míru diferenciacie subpopulací, definovat v termínech alelických frekvencí a jejich variancí pro frekvence p a q alel bialelického

lokusu každé z n subpopulací jako $F_{ST} = \frac{\text{var}(p)}{\overline{pq}} = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (p_i - \bar{p})^2}{\overline{pq}}$ (Hamilton 2009). Sám

Wright (1951) definoval F indexy jako korelace gamet: F_{IS} jako korelaci mezi gametami

individua relativně k subpopulaci, F_{ST} jako korelaci mezi gametami náhodně vybranými ze subpopulace relativně k celkové populaci a F_{IT} jako korelaci mezi gametami jedince relativně k celkové populaci (Holsinger et Weir 2009).

Stejně jako většina „pionýrských“ prací trpěly i tyto Wrightovy indexy řadou nedostatků. Krom toho, že byly zprvu definovány pro jediný lokus, byly postaveny na ostrovním modelu, podle kterého si všechny subpopulace mohou vyměňovat alely se stejnou pravděpodobností (Song et al. 2006), na modelu nekonečných alel (*infinite allele model*) a navíc Wright ani Malécot nebrali v potaz statistický ani genetický výběr (Holsinger 2010a). Statistický výběr (*statistical sampling*) je důsledek faktu, že zpravidla není možné pracovat se všemi jedinci subpopulace, ani se všemi subpopulacemi daného druhu, čímž není možné přesně stanovit *parametry* populací (např. F_{ST} , p), ale jen jejich *odhady* (správně označované stříškou: \hat{F}_{ST} , \hat{p}). Ačkoliv se parametry a odhady v praxi kvůli přehlednosti a jednoduchosti zaměňují – i v této práci budou všechny odhady označované bez stříšky, neboť je zřejmé, že vycházejí z konkrétního vzorku z populace a podléhají tak statistickému výběru, při vytváření teoretických modelů mívá tato záměna závažné důsledky. Podobně závažný, ale mnohem méně ovlivnitelný, je genetický nebo také evoluční výběr (*genetic/evolutionary sampling*), který je nevyhnutelným důsledkem genetického driftu. V každém časovém okamžiku jsou totiž reálné *parametry* aktuální populace odlišné následkem stochastických evolučních procesů. I kdyby bylo možné sledovat dvě populace se stejnými výchozími parametry za působení identických evolučních podmínek (migrace, mutace, drift, selekce), výsledné populace by po stejném čase byly odlišné (Holsinger et Weir 2009).

Statistický výběr je zohledněn G_{ST} indexem (Nei 1973), který je Wrightovu F_{ST} nejpodobnější. Obecně je považován za rozšíření Wrightova F_{ST} pro více alel, jelikož se jedná o vážený průměr F_{ST} pro všechny alely. Ve skutečnosti jsou F_{ST} a G_{ST} dva odlišné populační parametry, neboť oba berou v potaz jiný soubor studovaných populací (Michalakis et Excoffier 1996). G_{ST} je definován jako poměr průměrné genové diverzity (tj. *de facto* heterozygotnosti) mezi subpopulacemi a celkové genové diverzity v populaci: $G_{ST} = D_{ST}/H_T$ (Nei 1973). Při průměrování genových diverzit pro různé lokusy lze dosáhnout lepšího odhadu, než při průměrování výsledných G_{ST} pro jednotlivé lokusy (Takahata et Nei 1984), což je značný přínos této populační charakteristiky. Jejím problémem je však ignorace genetického výběru, kvůli čemuž je

vhodným měřítkem genetické diferenciace jen v případech, kdy nesledujeme příspěvek genetického driftu (Holsinger et Weir 2009). G_{ST} proto bývá implementován do statistických softwarů jen vzácně, např. v FSTAT (Goudet 1995).

V současnosti je nejčastěji používaný přístup podle Weira a Cockerhama (1984), implementovaný ve většině příslušných programů, např. v GENEPOP (Raymond et Rousset 1995), FSTAT (Goudet 1995), MSA (Dieringer et Schlötterer 2003) či SPAGEDi (Hardy et Vekemans 2002) a v modifikované podobě také v ARLEQUIN (Excoffier et al. 2005). Jedná se o momentovou metodu odhadu, založenou na analýze variance. Variance je zde rozdělena do 3 hlavních komponent, získaných z vážené analýzy variance alelických frekvencí: a (variance mezi subpopulacemi), b (variance mezi jedinci v rámci subpopulace) a c (variance mezi gametami v rámci jednotlivce). V termínech těchto komponent lze pak definovat odhady populačních parametrů \hat{F} , $\hat{\theta}$ a \hat{f} jako: $\hat{F} = (a+b)/(a+b+c)$, $\hat{\theta} = a/(a+b+c)$, $\hat{f} = b/(b+c)$. Přitom lze dokázat, že za příslušných okolností F odpovídá Wrightovu F_{IT} , $\theta = F_{ST}$ a $f = F_{IS}$. Vážením pro u alel a l lokusů lze získat odhad fixačního indexu pro celkovou populaci $\hat{\theta}_w = \sum_l \sum_u a_{lu} / \sum_l \sum_u (a_{lu} + b_{lu} + c_{lu})$, který je přesnější než nevážený průměrný odhad (Weir et Cockerham 1984). Tento přístup má řadu výhod. Je nenáročný na výpočetní výkon (dá se počítat „v ruce“), zmíněné odhady mají nízký bias (při opakovaném výběru z populace bude průměrná variance ve frekvenci alel blízko neznámé reálné varianci; Holsinger et Weir 2009), zohledňuje statistický i genetický sampling, nestejnou velikost vzorku co do počtu subpopulací, jedinců, hodnocených lokusů i pozorovaných alel a v neposlední řadě je přesnější pro vyšší hodnoty fixačního indexu a pro lokusy ve vazbě (Weir et Cockerham 1984). V posledních letech byl dále rozšiřován, ale všeobecně se zatím používá zejména původní algoritmus. Např. Song et al. (2006) rozšiřují přístup o mezipopulační korelace v alelických frekvencích, vzniklé např. následkem vyšší mutační či migrační rychlosti a pozorované zejména pokud počet studovaných populací není dostatečně vysoký. Mezipopulační korelace jsou totiž faktorem, který jednak ovlivňuje výsledný odhad F_{ST} a jednak znemožňuje přesnější χ^2 aproximaci a tím i intervaly spolehlivosti pomocí této metody (Song et al 2006).

Dalším způsobem odhadu populačních parametrů je metoda maximální věrohodnosti (*maximum likelihood*), která poskytuje sice vychýlené odhady, ale s menší směrodatnou odchylkou, a výsledné odhady se tak odchylují od reálného parametru méně než odhady

předchozích metod (Holsinger et Weir 2009). Podstatou této metody je vytvoření funkce $L(a_{ik}|n_{ik}, p_{ik})$, kde a_{ik} je absolutní zastoupení alely i ého lokusu ve vzorku k té populace, n_{ik} je velikost tohoto vzorku a p_{ik} je frekvence příslušné alely. Odhadem \hat{p}_{ik} jsou pak ty hodnoty p_{ik} , které maximalizují hodnotu této funkce (Holsinger 1999). Metodu maximální věrohodnosti využívá i bayesiánský přístup, a to k „očišťení“ priori informace o alelické frekvenci. V bayesiánské metodě je pak alelická frekvence všech populací aproximována beta distribucí (pro bialelický lokus) nebo Dirichletovou distribucí (pro multialelické lokusy), ze které se pak pomocí Gibbsova výběru (*Gibbs sampling*; jeden z *Markov chain Monte Carlo* algoritmů) odvodí plně posteriorní distribuce fixačního indexu. Výhodou této metody je zahrnutí jak modelu s pevnými efekty, tak modelu s náhodnými efekty, a to i na různých úrovních hierarchické struktury v rámci jediné analýzy. Navíc interpretace takto získaných odhadů populačních parametrů nezávisí na použitém modelu populační divergence tak, jako u předchozích metod, tedy kromě metody maximální věrohodnosti, která však závisí na modelu s náhodnými efekty. Problémem bayesiánského přístupu je závislost přesnosti odhadu na přesnosti aproximace Dirichlerovou nebo beta distribucí. Nicméně, jak namítá sám autor, zdá se nepravděpodobné, že by byl výsledný fixační index výrazně ovlivněn výběrem distribuce (Holsinger 1999). Tato metoda je vhodná zejména pro studie s malým počtem lokusů či vzorků, při vyšším počtu studovaných lokusů (alespoň 8 až 10) by měla poskytovat velmi podobné výsledky, jako metoda Weira a Cockerhama (Holsinger 2010b). Využívá ji software HICKORY (Holsinger et Lewis 2007).

Bayesiánský přístup včetně MCMC (*Markov chain Monte Carlo*), ale za poněkud jiným účelem, je implementován i v programu STRUCTURE (založen na algoritmu podle Pritchard et al. 2000), který je v současnosti poměrně hojně využíván. Oproti výše popsaným F-, G- a θ -statistikám tento přístup nevyžaduje apriorní informaci o zdrojové populaci každého jedince, ale naopak jde o nalezení struktury v datech a přerozdělení studovaných individuů do K clusterů (tj. hypotetických populací). Lze tak posoudit, zda subjektivní rozdělení do subpopulací (např. na základě geografické vzdálenosti, geomorfologické izolovanosti apod.) je konzistentní s genetickou strukturou. Navíc lze takto odhalit skrytou populační strukturu v rámci arbitrárně vymezených subpopulací. Je to metoda založená na modelech a jako taková vyžaduje řadu apriorních předpokladů, nejvýznamnější z nich Hardy-Weinbergova rovnováha v rámci jednoho

clusteru a původně také vazebná rovnováha mezi studovanými lokusy (tento předpoklad byl však vyřešen implementací dalšího modelu; Falush et al. 2003). Zcela zásadní je volba modelu genového toku. Zatímco v modelu bez *admixture*, který nepředpokládá výměnu alel mezi clustery, MCMC algoritmus zahrnuje iteraci 2 kroků (odhad alelické frekvence každé populace a z ní pak odhad populace, ze které vzorek pochází), pro model s *admixture* do algoritmu vstupuje ještě parametr α , tedy proporce genomu odvozená z příslušné populace, která je pak aktualizována v 3. kroku iterace (podrobnosti o algoritmu viz v Pritchard et al. 2000).

Zatím všechny popsané metody populačně genetické analýzy byly postaveny primárně na modelu nekonečných alel (*infinite allele model*, IAM), popřípadě modelu k alel (KAM). První z nich předpokládá, že každou mutací vzniká nová alela odlišná od všech dosud přítomných v populaci. Každé dvě alely daného lokusu identické stavem (tzv. *identical by state*, IBS) jsou tak považovány za identické původem (*identical by descent*, IDB). Model k alel pak tuto rovnici ruší (tedy $IBS \neq IDB$) a mutace podle něj mění jeden alelický stav na jiný z $k-1$ možných, a to se stejnou pravděpodobností $1/(k-1)$ (Hamilton 2009). Tyto modely se proto zdají být vhodné pro markery s malou mutační rychlostí, např. alozymy, naopak např. u rychle mutujících mikrosatelitů vyvstává rozumná obava z homoplazie a tím i z připsání zjištěné mezipopulační podobnosti migraci a historickým událostem, spíš než mutaci. U mikrosatelitů bylo navíc zjištěno, že každý mutační krok mění alelický stav jen o jednu či dvě repetice a nová alela tak svou délkou přímo závisí na délce alely původní (Slatkin 1995). Krokový mutační model (*stepwise mutation model*, SMM) proto bere v úvahu počáteční stav mutované alely a sekvence vzájemně podobnější jsou pak pokládány za evolučně příbuznější s krátkým časem od jejich divergence, oproti sekvencím odlišnějším (Hamilton 2009).

Právě na tomto modelu je postaven Slatkinův R_{ST} index, definovaný jako

$$R_{ST} = \frac{\bar{S} - S_w}{\bar{S}},$$

kde S_w je variance ve velikosti alel v rámci subpopulací a \bar{S} je variance

v celkové populaci (Slatkin 1995). V tomto původním pojetí je analogický G_{ST} indexu pro IAM a nezohledňuje počet studovaných populací. Rousset (1996) proto definuje rovnovážný parametr ρ_{ST} studiem vztahu mezi pravděpodobnostmi identity původem a časů koalescence a Michalakis et Excoffier (1996) následně na základě analýzy molekulární variance (AMOVA) definují odhad tohoto parametru, který označují $\hat{\Phi}_{ST}$.

Vztah mezi $\hat{\Phi}_{ST}$ a \hat{R}_{ST} je pak $\hat{\Phi}_{ST} = \frac{(1-c)\hat{R}_{ST}}{1-c\hat{R}_{ST}}$, kde $c = \frac{2N-P}{2NP-P}$ pro P studovaných

populací a celkem N studovaných jedinců (Michalakis et Excoffier 1996).

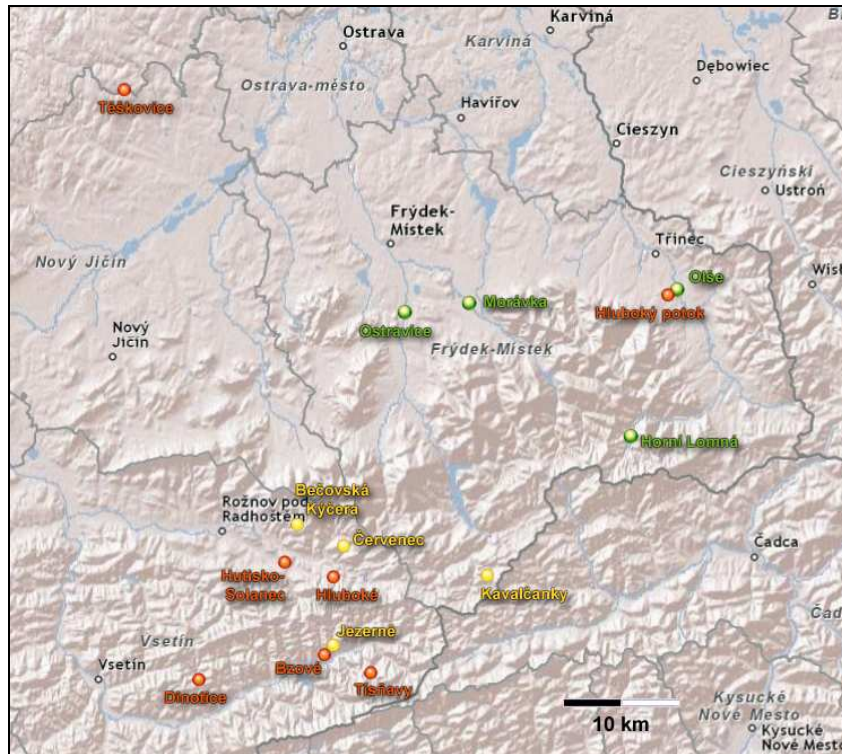
2 Materiál a metody

2.1 Rostlinný materiál

Oba taxony, *Salix daphnoides* Vill. i *Salix lapponum* L., byly studovány na území České republiky z hlediska ekologického a fytoecnologického kolegyněmi Soňou Hrachovou (*S. lapponum*) a Evou Stanovskou (*S. daphnoides*) v rámci jejich diplomových prací (Hrachová 2011, v tisku; Stanovská 2011). Obě zmapovaly všechny známé populace z našeho území a poskytly i rostlinný materiál pro genetickou analýzu.

V případě *Salix daphnoides* byly prosbírány všechny známé populace z Moravskoslezských Beskyd (fyto geografický okres č. 99 *sensu* Skalický 1988) a jedna 3členná populace z nedalekého fyto geografického okresu Jesenické podhůří (č. 75), a to všichni nalezení jedinci. Z celkového počtu 15 populací se pouze 4 nacházely na šterkových náplavech beskydských řek (lokality podél Lomné, Morávky, Ostravice a Olše), 4 populace na pcháčovách loukách svazu *Calthion* (Kavalčanky, Jezerné, Červenec, Bečovská Kýčera) a zbývající populace rostly v olšinách či na jiných, pro daný druh fytoecnologicky nepřirozených biotopech – Tísňavy, Hutisko-Solanec, Bzové, Hluboké, Dinotice, Těškovice a přítoky Olše – zejména Hluboký potok. Všechny populace mimo šterkové náplavy byly \pm stejnověké, většinou zastoupené jediným pohlavím (Stanovská 2011; Sochor et al. 2010).

U *Salix lapponum* byly vybrány nejbohatší populace české části Krkonoš (fyto. okres 93), konkrétně 4 populace bez známých výsadby – Pančavská louka a její oddělená horní část a populace na severním a jižním okraji Navorské jámy, a dále 3 lokality, kde byly v minulosti prováděny záměrné výsadby – Labská louka, Pramen Labe a lokalita pod Luční boudou. Podobně jako u předchozího druhu, tyto vysazované populace rostly na fytoecnologicky a ekologicky netypických biotopech, ale porosty jevíly morfologickou variabilitu. Většina jejich jedinců se sexuálně neprojevovala. Na všech lokalitách byly rostliny sbírány podél transektů přirozeně definovaných vodotečí či arbitrárně za účelem postižení maximální variability prostředí. U každého jedince bylo zaznamenáno též pohlaví, pokud v daný rok nekvetl, byl označen jako „sterilní“.



Obrázek 1: Mapa lokalit studovaných populací *S. daphnoides*, barevně jsou odlišeny populace různých biotopů: zeleně štěrkové náplavy (*Salicion eleagno-daphnoidis*), žlutě pcháčové louky (*Calthion*), červeně olšiny (*Alnion*). Zdroj mapového podkladu: ArcGIS



Obrázek 2: Mapa populací *S. lapponum* v Krkonoších – přirozené populace modře, vysazované žlutě. Populace pod Luční boudou se nachází zcela odděleně, cca 11 km východně od ostatních. Zdroj mapového podkladu: www.mapy.cz.

U obou druhů byly sbírány zdravé, vitální listy, sušeny v papírových obálkách na silikagelu nebo co nejrychleji přirozeným teplem, popř. v sušičce maximálně při 60 °C, a dále skladovány v suchu a temnu při pokojové teplotě až do jejich dalšího zpracování.

2.2 Izolace DNA

Izolace DNA sledovala mírně modifikovaný CTAB protokol podle Doyle & Doyle (1987). 50 mg suchých listů zbavených střední žilky bylo homogenizováno pomocí homogenizátoru (Retsch Mixer Mill MM 301) v 2ml Eppendorf zkumavkách a následně extrahováno v 700 µl CTAB pufru (2% CTAB; 0,1 M Tris HCl pH=8,0; 0,02 M EDTA pH=8,0; 1,4 M NaCl; 1% PVP40) s 2 µl merkptoethanolu na třepačce při 65 °C alespoň 60 min. Dále bylo přidáno 700 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1), řádně protřepáno a centrifugováno (15 min., 13 000 rpm, 10 °C). Horní vodná fáze byla šetrně odebrána a přidán opět stejný objem směsi chloroformu s isoamylalkoholem (24:1), protřepáno a centrifugováno za stejných podmínek. Horní fáze byla následně přenesena do stejného objemu vychlazeného (-20 °C) isopropanolu a směs dále ponechána při +4 °C alespoň 30 min. k precipitaci nukleových kyselin. Po centrifugaci (15 min, 13 000 rpm., 4 °C) byl supernatant odstraněn, sediment mírně osušen a rozpuštěn v 200 µl 10× TE pufru. Po přidání 2,0 µl RNasy (10 µg/ml) byl roztok inkubován 30 min. při 37 °C na termobloku. Pro další precipitaci bylo přidáno 20 µl acetátu sodného (3 M) a dvojnásobek objemu ethanolu (96 %, 440 µl, -20 °C) a ponecháno alespoň 30 min. při +4 °C*. Po centrifugaci (13 000 rpm., 15 min., 4 °C) byl pelet promyt 80% EtOH a následně 70% EtOH. Pro minimalizaci pravděpodobnosti ztráty peletu byly vzorky po každém promytí ještě centrifugovány (13 000 rpm., max. 10 min., 10 °C). Promytý pelet byl nakonec vakuově vysušen (Savant SpeedVac concentrator) a rozpuštěn v 80 až 130 µl 1× TE pufru (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0).

Kvalita a kvantita izolátů byla stanovena předběžně separací produktů na 1,5% agarosovém gelu, barveném ethidiumbromidem, a poté také spektrofotometricky (NanoDrop 1000). Koncentrace naměřená spektrofotometricky byla použita pro finální

* Druhá precipitace alkoholem zde byla použita vzhledem k lepší purifikaci izolátu a odstranění látek (residua listových barviv, fenolické sloučeniny apod.), které by mohly ovlivnit fyzikálně chemické vlastnosti izolátu a následně i spektrofotometrickou kvantifikaci či vlastní PCR reakci.

naředění izolátu na koncentraci 5 ng/μl v 1× TE pufru. Pracovní roztoky DNA byly skladovány při +4 °C po dobu i několika měsíců, zásobní roztoky byly zamrazeny při -20 °C.

2.3 Molekulární markery

Vzhledem ke všem výhodám a nevýhodám všech dostupných molekulárních markerů (viz předchozí bakalářská práce: Sochor 2009) byly pro tuto populační studii zvoleny mikrosatelity, publikované již dříve (Stamati et al. 2003, Barker et al. 2003). PCR podmínky byly optimalizovány pro každý mikrosatelit zvlášť. Pro amplifikaci cílových sekvencí byla použita GoTaq polymeráza (Promega). *Master mix* byl namíchan podle doporučení výrobce, tj. 1× reaction buffer, 0,2 mM každého dNTP, 1 μM každého z primerů (finální koncentrace), 0,25 jednotek DNA polymerázy a 5 ng templátové DNA v 10 μl reakčního roztoku. PCR podmínky taktéž sledovaly protokol výrobce, tj. pro GoTag polymerázu počáteční denaturace 95 °C po 2 min., denaturace 95 °C po 30 s, annealing s variabilní teplotou po 30 s, extension 72 °C po 30 s (u delších produktů 45 s), počet cyklů variabilní, final extension 72 °C po 5 min. Specifika každého lokusu jsou shrnuta v tabulce 1.

2.4 Fragmentová analýza

Elektroforetická separace PCR produktů byla prováděna na 6%, 0,4 mm silném polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek. Na vlastní přípravu gelu byl použit zásobní roztok akrylamidu (150 ml 40% roztok akrylamid : N,N'-metylenbisakrylamid 19:1, 420 g močoviny, 50 ml 10× TBE a 484 ml ddH₂O), peroxodisíran amonný a N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin. Pro zajištění přilnutí gelu na sklo bylo ošetřeno silanem. Před nanášením PCR produktu byl smíchán s polovičním objemem formamidovým denaturačním pufrem (formamid a *loading dye* 9:1) a denaturován 3 min. při 96 °C. Čas elektroforetické separace závisel na délce amplifikované sekvence, při napětí 2 000 V a proudu 120 mA se pohyboval od 2 do 5,5 hodiny. Gel byl následně promyt alespoň 20 min. v 10% kys. octové (fixace DNA a vymytí močoviny), 5 minut v 1% kys. dusičné a barvení 35 min. v 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného s 0,15% formaldehydem. Vyredukování navázaného stříbra následně probíhalo v 3% roztoku uhličitanu sodného s 0,15% formaldehydem a 2ppm thiosíranem sodným. Po usušení byl elektroforetogram vyhodnocen na transiluminátoru.

Tabulka 1: Seznam studovaných lokusů, rbs19 publikován v Stamati et al. 2003, ostatní v Barker et al. 2003. Z těchto prací jsou také převzaty primerové sekvence a opakované motivy. T_a je teplota annealingu, C počet cyklů PCR reakce.

Název	Sekvence primeru (5'–3') (F/R)	Opakovaný motiv	Původní označení	S. daphnoides		S. lapponum	
				T _a [°C]	C	T _a [°C]	C
rbs19	TCATTTGCTCGATGAGGTTG GTGGTAGTTGCAAAAGGGGA	(CT) ₁₀	gSIMCT024	55,5	23	-	-
Sx08	ACTTCAATCTCTCTGTATTCT CTATTTATGGGTTGGTCGATC	[TG] ₂₁ AG[TG] ₃ AG [TG] ₃ AG[TG] ₃ AGT GAG[TG] ₃	SB24	55,5	31	55,5	31
Sx10	TAATGGAGTTCACAGTCCTCC ATACAGAGCCATTTTCATCAC	[TC] ₂₁	SB80	64,3	29	64,7	30
Sx12	TATTGCTTTGATGGCGACTGC CAGCAACGGAAATAGCAACAG	[ACCGCC] ₅ ACCGC	SB88	61,0	29	-	-
Sx13	GACGCACATACACCATTACAC TGTTAGAAAATTAGGCACGGA	[GT] ₁₇	SB93	55,5	30	-	-
Sx14	ATGTCATTCAGGTTTGTTC ATGGTTAACTTGTTACTGTA	[CCG] ₅	SB100	50,0	36	50,0	36
Sx18	CTGTTTCTGCCACTATTAC TATAATCTGTCTCCTTTGGC	[GCC] ₉	SB196	55,5	30	-	-
Sx20	CCTCTTTTCTATTGTGGTCT GGCATGTATTTTACTCCAAC	[CT] ₄ CC [CT] ₃ [CA] ₂₂	SB201	50,0	27	50,0	28
Sx22	TATAAAGACAAATACCTGGGG CATCAAAGACTGCTAGAAAGG	[CA] ₂ [GA] ₂ GGAA [TA] ₂ [CA] ₁₅ GA	SB210	-	-	59,7	32
Sx23	AAATTACCGTCCAATAAAGA CATTAGCCATGAACAAGTAAA	[TA] ₂ [TGTGCG] ₄ [TG] ₉	SB233	50,0	31	50,0	32
Sx24	ATTCCTTCTTCATCAGTAGC GACAACGCCATTACATGACC	[GCC] ₃ ATCATT CCCC[GCC] ₄	SB243	52,0	28	-	-

2.5 Analýza dat

Pro grupování identických multilokusových genotypů a výpočet P_{ID} (*probability of identity*) byl použit program GIMLET (ver. 1.3.3; Valière 2002) a následně spočítána proporce rozlišitelných genotypů (PD – *proportion of distinguishable genotypes*) jako podíl počtu zjištěných genet a počtu studovaných ramet v každé subpopulaci (Reisch et al 2007). Průměrný počet alel na lokus a pozorované a očekávané heterozygotnosti (*sensu* Nei 1973) byly počítány s využitím programu POPGENE (ver. 1.32; Yeh et al.

1999). Rozdíly ve velikosti populací u *Salix lapponum* byly ošetřeny rarafakcí pomocí softwaru HP-RARE (ver. June-6-2006; Kalinovski 2005), který byl rovněž použit pro výpočet bohatosti privátních alel. Pro výpočet F a ρ statistik byl použit software GENEPOP (ver. 4.0.11; Raymond et Rousset 1995, Rousset 2008), založen na přístupu Weira a Cockerhama (1984) pro F_{ST} a F_{IS} a přístupu podle Rousseta (1996) a Michalakise a Excoffiera (1996) pro ρ_{ST} a ρ_{IS} . Pomocí tohoto softwaru byl také proveden U test (*score test*) na převahu a deficit heterozygotů (*heterozygote excess/deficit*) podle Rousseta a Raymonda (1995) a dále test na genovou diferenciaci, a to exaktní G test založený na Markovově řetězci pro každý lokus zvlášť, kombinace pro všechny lokusy následně byla provedena Fisherovou metodou. Výsledkem testu je P -hodnota pro nulovou hypotézu „Alely jsou odvozeny ze stejné distribuce u obou subpopulací“ (Rousset 2008). Parametry markovova řetězce všech zmíněných testů byly zvoleny následující: *dememorisation* (tj. *burnin*) 10 000, *batches* (tj. počet běhů) 200, *iterations per batch* (počet iterací na jeden běh) 10 000.

Pro analýzu populační struktury byl využit program STRUCTURE (ver. 2.2; Pritchard et al. 2000). Vzhledem k nezvladatelnému nároku na výpočetní výkon byla aplikace spuštěna na Bioportálu Univerzity v Oslo (www.bioportal.uio.no). Zvolené parametry MCMC algoritmu: *burnin* 80 000, počet iterací 800 000, počet replikací (*runs*) 10. Analýza proběhla pro všechna K od 1 do 19, přičemž nejvhodnější počet clusterů byl vybrán pomocí hodnot průměrných věrohodností $L(K)$, tj. posteriorních pravděpodobností dat pro každé K , $\Pr(X|K)$, a pomocí jejich změny – průměrné ΔK . Tyto charakteristiky, stejně jako koeficienty podobnosti jednotlivých běhů (*runs*) analýzy, byly spočítány pomocí aplikace STRUCTURE-SUM (ver. 2009; Ehrich 2009). V případě vysokých a vyrovnaných hodnot koeficientů podobnosti a tím i velké podobnosti mezi jednotlivými běhy byly do dalších analýz zařazeny všechny běhy. V opačných případech byly vybrány běhy vzájemně podobnější a ty analyzovány společně, tj. jejich individuální Q hodnoty byly zprůměrovány s využitím programu CLUMPP (ver. 1.1.2; Jakobsson et Rosenberg 2007). Výsledná Q -matice se stala zdrojem dat pro aplikaci DISTRUCT (ver. 1.1; Rosenberg 2004), jejíž výstupem je diagram znázorňující příslušnost každého vzorku k jednotlivým K clusterům.

Doplňující test na mezipopulační migranty byl proveden v softwaru IMMANC (Rannala et Mountain 1997) s 10 000 replikacemi. Za účelem stanovení míry hybridizace a introgrese byl využit software NewHybrids (ver. 1.1; Anderson et Thompson 2002)

s výše uvedenými parametry MCMC (*burnin* 80 000, počet iterací 800 000) a dále analýza hlavních koordinát v softwaru GenAlEx (ver. 6.41; Peakall et Smouse 2006).

3 Výsledky

Tabulka 2: Počty alel a rozsah jejich velikostí pro jednotlivé studované lokusy.

Prac. název	S. daphnoides		S. lapponum	
	Počet alel	Rozsah velikostí [bp]	Počet alel	Rozsah velikostí [bp]
rbs19	13	34	-	-
Sx08	7	16	10	64
Sx10	6	28	5	27
Sx12	2	5	-	-
Sx13	7	18	-	-
Sx14	3	9	4	24
Sx18	3	6	-	-
Sx20	13	46	11	74
Sx22	-	-	5	24
Sx23	8	20	9	33
Sx24	3	9	-	-

3.1 *Salix daphnoides*

Vzhledem k absenci PCR produktu většiny lokusů byly z analýz vyřazeny vzorky D37, D43 a D46, všechny z lokality Horní Lomná. Dále byla vyřazena položka D168 z lokality Kopytná (přítok Olše) z důvodu chybné determinace – kromě zřetelné tetraploidie u ní byly nalezeny i unikátní alely. Stejně tak do analýz nebyl zařazen domnělý hybrid *S. ×digenea* z lokality Kavalčanky (jeden jedinec). Na základě analýzy 4 lokusů (Sx10, Sx12, Sx13, rbs19), byly identifikovány klonální populace (Kavalčanky, Jezerné, Červenec, Bečovská Kýčera, Tísňavy, Hutisko-Solanec, Hluboké, Bzové, Dinotice a Těškovice), přičemž za klon (genetu) byli považováni všichni jedinci s identickým multilokusovým genotypem. *Unbiased probability of identity*, tedy pravděpodobnost, že by dva jedinci s identickým genotypem v těchto lokusech mohli být odvozeni sexuálním způsobem, $P_{ID} = 1,294 \cdot 10^{-3}$. To je sice pravděpodobnost relativně vysoká, ale vzhledem k charakteru těchto populací je více než dostačující. V dalších 6 lokusech pak byly genotypovány polymorfní populace Horní Lomná, Morávka, Ostravice a Olše. Pro tyto populace je pak $P_{ID} = 8,459 \cdot 10^{-9}$.

3.1.1 Vnitropopulační charakteristiky

Jak je vidět z tabulky 3, studované populace se podle míry klonální propagace zřetelně rozpadají do dvou skupin: první 4 populace klonalitu téměř nevykazují (Horní Lomná, Morávka, Ostravice a Olše), naopak zbývající prakticky nevykazují genetickou variabilitu, neboť většina z nich je tvořena jedinou genetou, kromě populace v Hutisku-Solanci se dvěma genetami (z toho jedna však zastoupena jedinou rametou). První 4 populace, rostoucí na štěrkových náplavech, vykazují proto zcela pochopitelně i větší absolutní genovou diverzitu ve studovaných lokusech, vyjádřenou jednak průměrným počtem alel na lokus (u polymorfních populací v rozmezí 3,8 – 5,1; u klonálních nikdy nepřesahuje hodnotu 2,0), jednak očekávanou heterozygotností, která se u prvních jmenovaných pohybuje mezi 0,54 a 0,61; u klonálních populací pak nepřesahuje 0,38. Počty alel po rarefakci jsou interpretačně podobné, ačkoliv rozdíly mezi populacemi v této veličině pochopitelně nejsou tak výrazné. Rarefakce u monoklonálních „populací“ při takto nízkém počtu lokusů podléhá do značné míry stochasticitě (evolučního) samplingu a odráží spíše pozorovanou heterozygotnost v jednotlivých lokusech, než alelickou diverzitu v populaci, podobně jako tzv. *unbiased heterozygosity* (*sensu* Nei 1978). Tyto charakteristiky zde proto nejsou uvedeny.

Poněkud komplikovanější situace nastává u populace na řece Olši, kterou nelze jednoznačně definovat na základě geografické vzdálenosti jedinců ani ekologické diferenciace. Jednotlivé statistiky proto byly vypočítány pro celkovou metapopulaci podél Olše, včetně přítoků, a dále pro každou subpopulaci zvlášť. Z analýzy dílčích subpopulací je velmi nápadná klonalita u subpopulace podél Hlubokého potoka a jedna geneta s dvěma rametami byla zjištěna i v subpopulaci Olše (*s. str.*). Interpretace těchto výsledků je však komplikována velmi malými reálnými velikostmi těchto subpopulací.

Velké polymorfní populace vykazují signifikantní deficit heterozygotů oproti Hardy-Weinbergově rovnováze, což se projevuje i u F_{IS} , popř. u ρ_{IS} indexů, které jsou poměrně vysoké, zejména v případě populace na Morávce. Populace z jiných stanovišť vykazují většinou signifikantní převahu heterozygotů nebo méně i HW rovnováhu. Je však nutno si uvědomit, že počty genet a mnohdy i ramet v těchto populacích jsou velmi nízké, což výrazně ovlivňuje sílu testu i hodnoty koeficientů inbreedingu, včetně jejich interpretace. Žádné klonální genety mezi různými populacemi nebyly zjištěny.

Tabulka 3: Vnitropopulační charakteristiky sledovaných populací, šedé linie oddělují populace na odlišných biotopech – odshora: štěrkové náplavy, *Calthion* a *Alnion*. PD je proporce odlišitelných genotypů (počet genet / počet ramet), A je průměrný počet alel na lokus, H_{exp} očekávaná heterozygotnost, H_{obs} pozorovaná heterozygotnost. F_{IS} (převaha heterozygotů) i D (deficit heterozygotů) testovány U testem, hvězdičky určují signifikanci ve prospěch těchto alternativních hypotéz: * $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns $P > 0,05$.**

Populace	počet vzorků	počet genet	PD	H_{obs}	H_{exp}	A	F_{IS}	D	Test na HE/HD
Horní Lomná	28	28	1,000	0,520	0,576	5,100	0,104	0,106	ns/***
Morávka	35	35	1,000	0,428	0,548	5,100	0,225	0,218	ns/***
Ostravice	31	31	1,000	0,532	0,618	4,556	0,140	0,063	ns/***
Olše – vč. přítoků	11	8	0,800	0,490	0,542	3,778	0,138	-0,067	ns/*
Olše – s. str.	4	3	0,750	0,287	0,354	2,222	0,333	0,367	ns/*
Olše – Hluboký p.	3	1	0,333	0,625	0,323	1,625	-1,000	-1,000	*/ns
Olše – Hluchová	2	2	1,000	0,611	0,472	2,556	0,044	-0,018	ns/ns
Olše – Kopytná	2	2	1,000	0,556	0,403	2,000	0,200	-0,427	ns/ns
Kavalčanky	9	1	0,111	0,500	0,250	1,500	-1,000	-1,000	***/ns
Jezerné	1	1	–	0,750	0,375	1,750	–	–	–
Červenec	5	1	0,200	0,600	0,327	1,667	-0,800	-0,640	*/ns
Bečovská Kýčera	5	1	0,200	0,667	0,333	1,667	-1,000	-1,000	*/ns
Tísňavy	11	1	0,091	0,250	0,125	1,250	-1,000	-1,000	**/ns
Hutisko-Solanec	5	2	0,400	0,438	0,342	2,000	-0,143	-0,332	ns/ns
Hluboké	6	1	0,167	0,750	0,375	1,750	-1,000	-1,000	***/ns
Bzové	1	1	–	0,250	0,125	1,250	–	–	–
Dinotice	14	1	0,071	0,667	0,333	1,667	-1,000	-1,000	***/ns
Těškovice	3	1	0,333	0,750	0,375	1,750	-1,000	-1,000	ns/ns

3.1.2 Diferenciace subpopulací

Pokud se podíváme na tabulku č. 4 párových fixačních indexů, velké neklonální populace na Morávce, Lomné a Ostravici jsou vzájemně diferencovány středně silně, avšak signifikantně, s F_{ST} mezi 0,049 a 0,103 a ρ_{ST} relativně podobnými. Již více je od nich diferencována populace na Olši s F_{ST} nad 0,117 a ρ_{ST} dokonce až 0,239, taktéž velmi signifikantně s $P < 0,001$. Ostatní – klonální populace mají fixační indexy poměrně různorodé, většinou však velmi vysoké, a genetická diferenciace je vesměs signifikantní. Výjimky tvoří populace Jezerné a Bzové, které jsou však tvořeny každá jen jediným individuem a takovýto výstup se tudíž dá očekávat, stejně jako vzájemná odlišnost jiných klonálních populací s fixačními indexy nezdědka vysoko nad 0,4.

Za povšimnutí však stojí F_{ST} mezi populacemi Ostravice a Těškovice velmi se blížíci nule a nesignifikantní diferenciaci těchto dvou populací, indikující snad původ Těškovického klonu v Ostravické populaci.

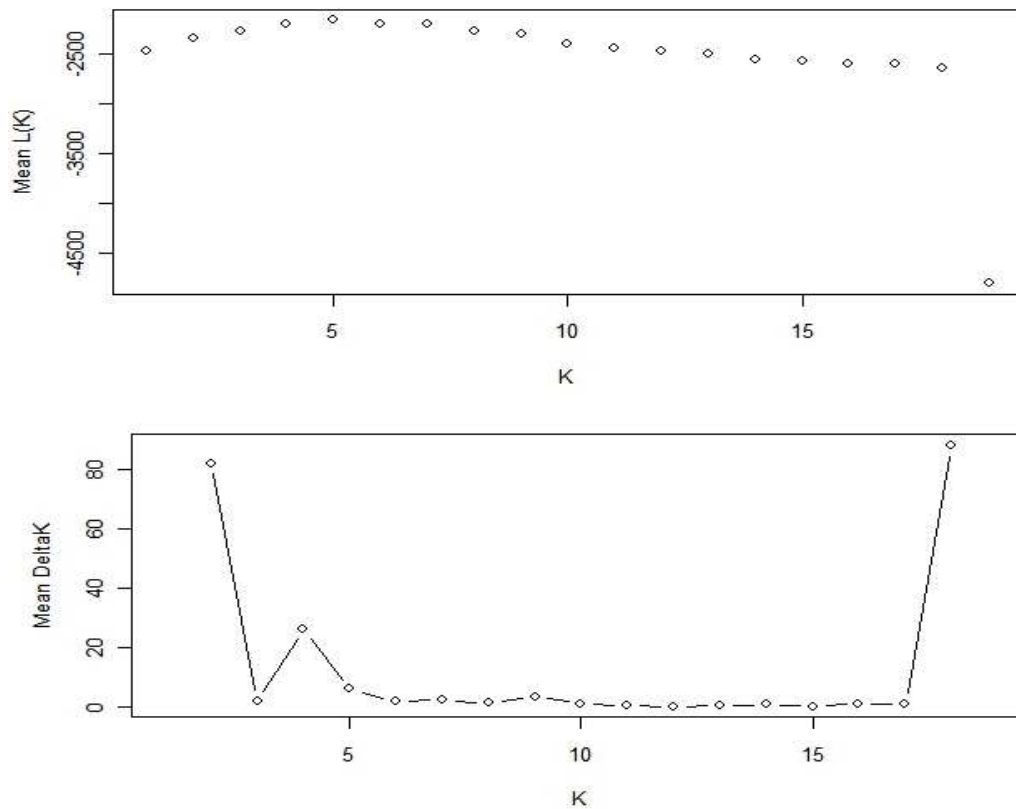
3.1.3 Populační struktura

V programu STRUCTURE byl celkový soubor 114 jedinců (z každé genety byla do analýzy zařazena jediná rameta) rozdělen do K clusterů od $K = 1$ až po $K = 19$. Jako nejvhodnější počet clusterů K se podle průběhu průměrné věrohodnosti a její změny (viz obr. 3) jevíly počty 2 a 4. Jako další možné vhodné K pak byly zvoleny 3 a 5, které taktéž mohou přinést určitou informaci o populační struktuře. Je však nutné podotknout, že již na tento první pohled není struktura v datech dostatečně výrazná na to, aby bylo možno jednoznačně stanovit optimální K . Pro sestavení diagramu bylo využito všech 10 běhů (*runs*) pro $K = 2$ a 4, neboť průměrný koeficient podobnosti mezi běhy dosahoval 0,98 a 0,99 v tomto pořadí. Pro $K = 3$ bylo zprůměrováno 7 běhů s výraznou podobností, pro $K = 5$ pak 8 běhů (průměrné koeficienty podobnosti mezi všemi 10 běhy 0,64 a 0,77), zbývající běhy byly použity samostatně, avšak jejich interpretace je rovnocenná s ostatními a nejsou proto v práci zařazeny. Pro slabou strukturu v datech manuál doporučuje využití modelu LOCPRIOR (priorita lokality), implementovaný od verze 2.3. Vzhledem k využití Bioportálu UIO, který v době analýzy poskytoval pouze verzi 2.2 softwaru STRUCTURE, tento model nakonec nebyl použit.

Na výsledných diagramech (obr. 4–7) je zřetelně patrná diverzita vzorků uvnitř i mezi apriorně stanovenými populacemi. Pro každé K je však možné v diagramech odlišit 4 až 5 oblastí, odpovídající přibližně 4 velkým populacím šterkových náplavů. Jako silně heterogenní se jeví populace na Morávce, zahrnující 14 jedinců výrazně odlišných od zbývajících populace. Ve všech 4 velkých populacích se vyskytují jedinci geneticky zcela odlišní od ostatních jedinců a podobnější naopak jedné z dalších populací. Např. vzorek D59 (3. zprava) z Horní Lomné je zřetelně odlišný od zbývajících populace a zdá se být migrantem z populace ostravické. Zajímavostí je, že i biotop tohoto jedince byl odlišný od ostatních. Podobně geneticky výjimečný je např. vzorek D68 (1. jedinec) z Morávky, klastrující se spíše k Horní Lomné, či vzorek D147 (11. zprava) z Ostravice, klastrující se k Olši. Tito a ještě někteří další jedinci byli detekováni signifikantně ($P < 0,05$) jako migranti v softwaru IMMANC stejně, jako podle STRUCTURE (označení šipkami v obr. 7). Další identifikovaní migranti nesouhlasí podle obou programů a nejsou vyznačeni,

ačkoliv tento nesoulad je vesměs způsoben jen mírným překročením P-hodnoty nad hranici 0,05.

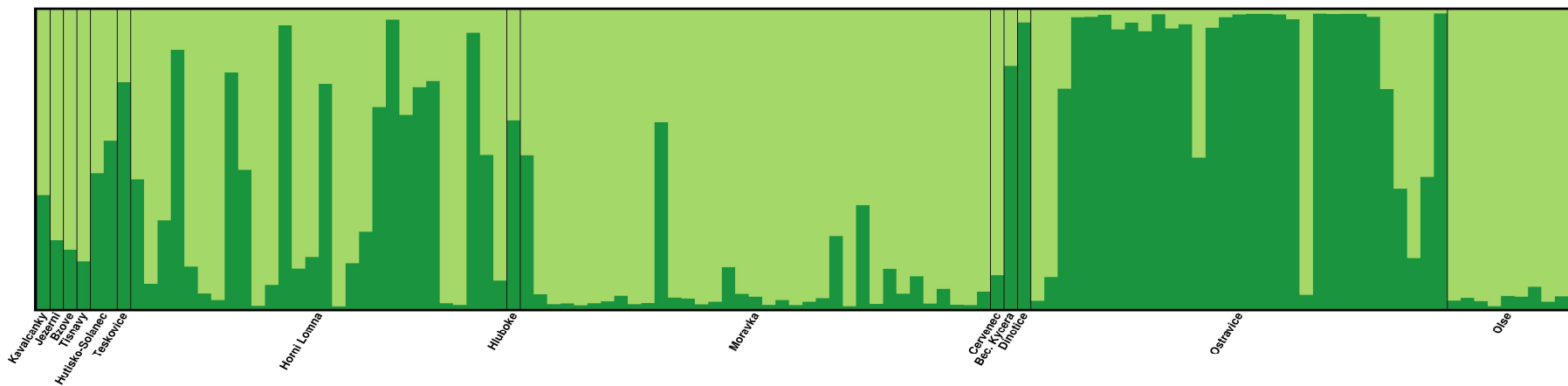
Zmíněný cluster 14 jedinců z Morávky byl dodatečně vyčleněn pro analýzu populační diferenciace. Skupina se jeví opravdu vyhraněně, párové F_{ST} vůči zbytku populace je rovno 0,170, tedy srovnatelné s dalšími populacemi (s Horní Lomnou $F_{ST} = 0,150$; s Ostravicí 0,170; s Olší 0,210). Zbytek populace z Morávky je pak od ostatních populací diferencován méně ($F_{ST} = 0,052$; 0,123 a 0,134 v tomto pořadí), avšak vždy vysoce signifikantně. Přitom je cluster vnitřně poměrně stabilizovaný, $F_{IS} = 0,049$, signifikantně v HW rovnováze. Poněkud překvapivá je populace na Olši, včetně přítoků, která se jeví jako poměrně homogenní, minimálně vzhledem k terénním datům a informacím o klonalitě, které indikují spíše polyfyletický a částečně umělý původ populace.



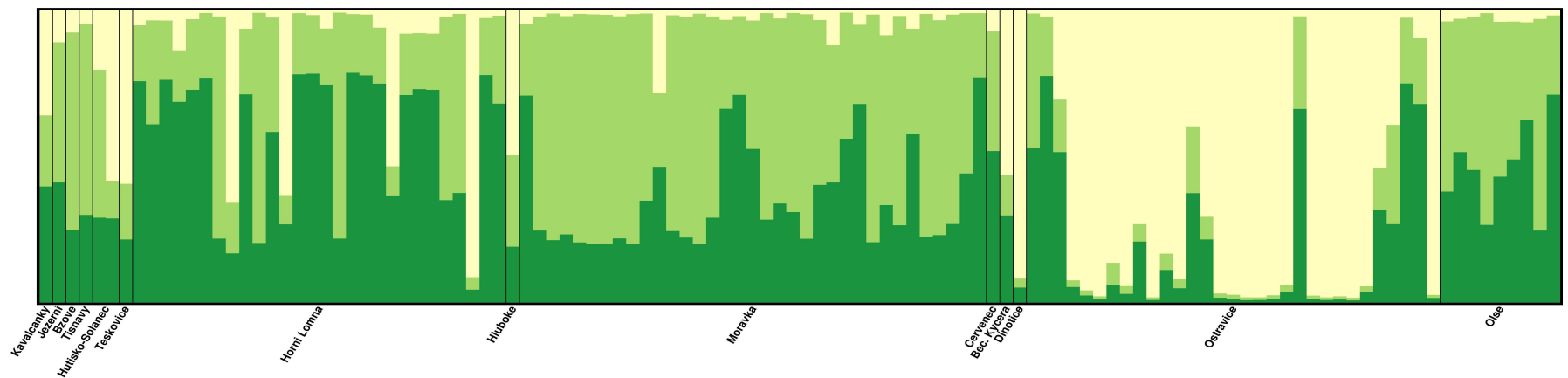
Obrázek 3: Průběh průměrné věrohodnosti (nahore) a průměrné změny věrohodnosti (dole) pro jednotlivá K.

Tabulka 4: Párové F_{ST} (pod úhlopříčkou) a ρ_{ST} (nad úhlopříčkou). Hvězdičky za F_{ST} indikují diferenciaci subpopulací v alelických frekvencích podle exaktního G testu: * vysoce signifikantní ($P < 0,001$), ** signifikantní ($P < 0,01$), * signifikantní ($P < 0,05$), NS nesignifikantní ($P > 0,05$).**

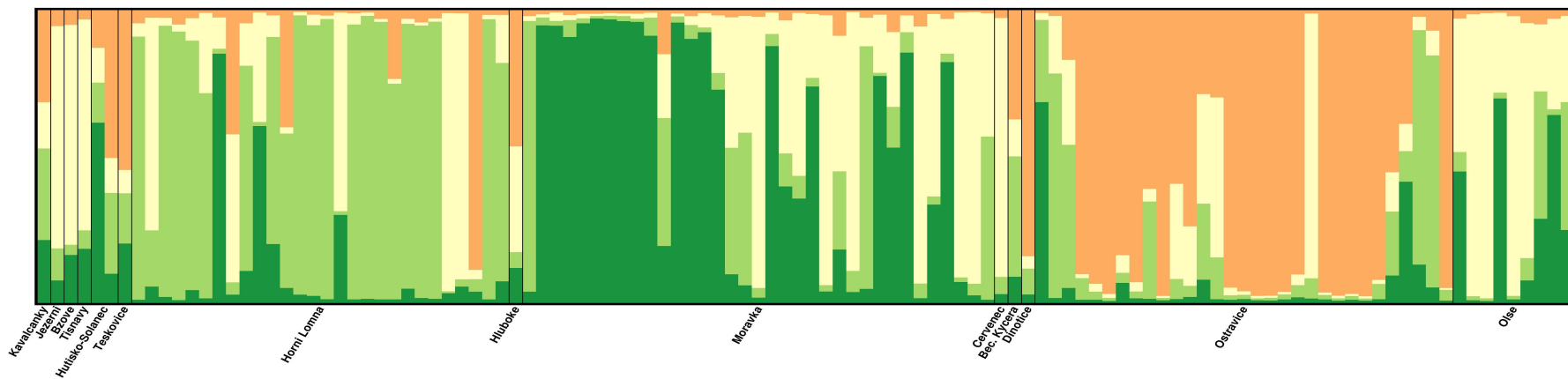
Populace	H.L.	Mor.	Ost.	Olše	Kav.	Jez.	Čer.	B.K.	Tís.	H.-S.	Hlu.	Bzo.	Din.	Těš.
Horní Lomná	-	0,066	0,022	0,152	0,282	-0,101	0,056	-0,040	0,018	0,164	0,046	-0,207	0,042	-0,045
Morávka	0,049***	-	0,069	0,239	0,243	-0,054	0,130	-0,040	0,084	0,129	0,009	-0,210	0,040	-0,090
Ostravice	0,082***	0,103***	-	0,229	0,414	0,053	0,259	0,005	0,206	0,283	-0,006	-0,030	0,088	-0,111
Olše s. l.	0,137***	0,117***	0,127***	-	0,004	-0,230	0,114	0,043	0,134	-0,064	0,058	-0,213	0,200	-0,052
Kavalčanky	0,249***	0,280***	0,314***	0,329***	-	0,629	0,655	0,499	0,651	0,024	0,498	0,577	0,573	0,465
Jezerné	-0,091 ^{ns}	-0,067 ^{ns}	0,031 ^{ns}	-0,088 ^{ns}	0,544**	-	0,644	0,400	0,693	0,434	0,520	0,570	0,534	0,593
Červenec	0,174***	0,181***	0,224***	0,155***	0,547***	0,371 ^{ns}	-	0,305	0,556	0,615	0,534	0,058	0,367	0,677
Beč. Kýčera	0,110**	0,116***	0,055*	0,203***	0,429***	0,480*	0,310***	-	0,345	0,408	0,110	0,148	0,041	0,097
Tišňavy	0,237***	0,205***	0,334***	0,196***	0,633***	0,462 ^{ns}	0,383***	0,533***	-	0,620	0,589	0,667	0,433	0,706
Hutisko-Sol.	0,177***	0,210***	0,158***	0,233***	0,205***	0,247 ^{ns}	0,482***	0,357***	0,632***	-	0,439	0,403	0,534	0,361
Hluboké	0,233***	0,245***	0,189***	0,338***	0,588***	0,455*	0,429***	0,429***	0,594***	0,479***	-	0,358	0,094	0,039
Bzové	0,039 ^{ns}	0,013 ^{ns}	0,104*	0,072 ^{ns}	0,612*	0,429 ^{ns}	0,300 ^{ns}	0,450 ^{ns}	0,500 ^{ns}	0,418*	0,356 ^{ns}	-	0,206	0,502
Dinotice	0,225***	0,241***	0,090***	0,375***	0,492***	0,545***	0,428***	0,194**	0,618***	0,386***	0,342***	0,510**	-	0,146
Těškovice	0,114 ^{ns}	0,122*	0,008 ^{ns}	0,125*	0,463***	0,400 ^{ns}	0,408***	0,200 ^{ns}	0,512***	0,343**	0,333***	0,444 ^{ns}	0,333***	-



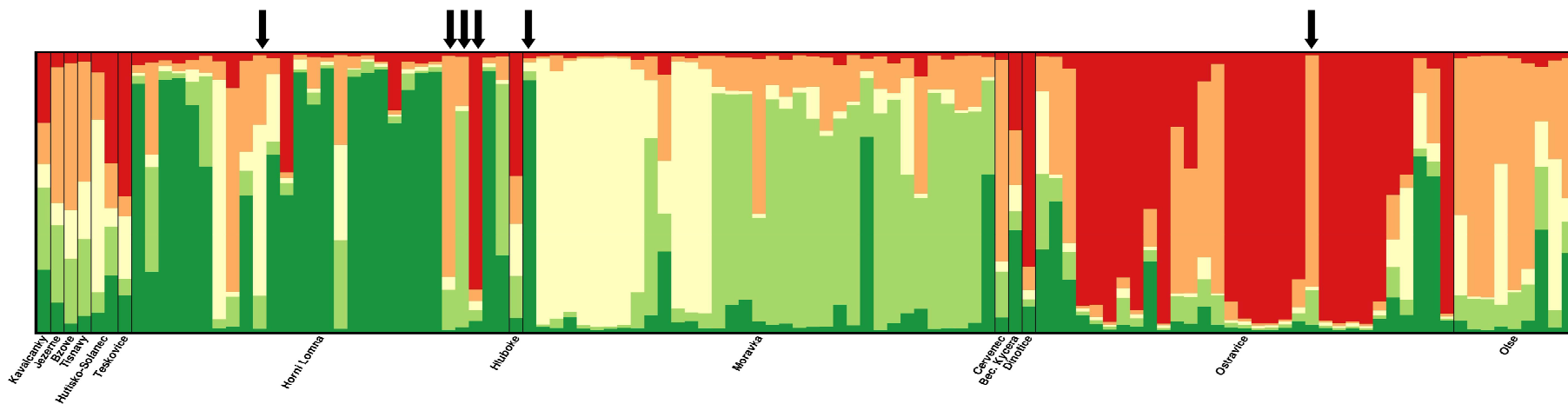
Obrázek 4: Výstup z analýzy ze STRUCTURE pro K=2, průměr pro 10 běhů.



Obrázek 5: Výstup z analýzy ze STRUCTURE pro K=3, průměr pro 7 konzistentních běhů.



Obrázek 6: Výstup z analýzy ze STRUCTURE pro K=4, průměr pro 10 běhů.



Obrázek 7: Výstup z analýzy ze STRUCTURE pro K=5, průměr pro 8 konzistentních běhů. Šipky označují jedince, signifikantně detekované v programu IMMANC jako migranty, kteří zároveň odpovídají migrantům dle STRUCTURE.

3.2 *Salix lapponum*

Analýza dat *Salix lapponum* byla komplikována charakterem růstu a distribucí keřů, který neumožňoval jednoznačné odlišení jednotlivých ramet přímo v terénu. Ty byly rozlišovány primárně na základě orientace větví, zapojenosti porostu, morfologických znaků, pohlaví apod. a u nejasných případů bylo sebráno více vzorků z jediného domnělého polykormonu či promísené skupiny keřů ve dvou na sebe kolmých transektech v 1m vzdálenostech (Hrachová S., osobní komunikace). Nejprve proto byly všechny vzorky genotypovány ve třech náhodně vybraných lokusech (Sx08, Sx20, Sx23) a stanoven počet genet v každé takové skupině, přičemž za jednu genetou byly považovány všechny vzorky identického multilokusového genotypu, $P_{ID} = 3,817 \cdot 10^{-4}$. Z každé genety skupiny byl do dalších analýz zařazen pouze jeden vzorek. Celkový studovaný soubor se tak omezil na 232 ramet, které byly dále genotypovány ještě ve třech lokusech (Sx22, Sx10, Sx14), výsledná $P_{ID} = 3,972 \cdot 10^{-6}$. Z vnitropopulačních a mezipopulačních analýz byly vyřazeny vzorky *S. silesiaca* a jejích hybridů se *S. lapponum*, odlišené na základě morfologie, a stejně tak jedinec PL52 z Pančavské louky, u něhož byly zjištěny 3 alely charakteristické pouze pro hybridy a *S. silesiaca*. Jediným vyřazeným vzorkem z důvodu špatné amplifikace PCR produktu byl jedinec NJ5 ze severní části Navorské jámy. Celkem tedy bylo v 7 populacích analyzováno 205 jedinců.

3.2.1 Vnitropopulační charakteristiky

Počet ramet v populaci byl stanoven na základě terénních pozorování a po odstranění duplicitních vzorků z nejasných skupin jedinců. Výsledná proporce rozlišitelných genotypů v jednotlivých populacích bez známých výsadeb (tj. obě populace z Pančavské louky a obě populace z Navorské jámy) se pohybuje od 0,83 do 1,00 (viz tab. 5). Naproti tomu v populacích dosazovaných či vysazovaných bylo zjištěno PD v intervalu $\langle 0,38; 0,54 \rangle$. Většina multiklonálních genotypů je zastoupena 2–4 rametami, pouze u jediné genety bylo zjištěno 34 ramet ve 4 populacích. Všechny zjištěné mezipopulační klonální duplikace zahrnují vždy jednu populaci přirozenou a jednu až tři populace dosazované.

Populace bez výsadeb jsou signifikantně v HW nerovnováze s deficitem heterozygotů na úrovni genet i na úrovni ramet s F_{IS} od 0,022 po 0,179. Pouze horní část Pančavské

louky vykazuje nesignifikantní nadbytek heterozygotů. U dosazovaných populací nebyl statisticky signifikantně prokázán ani nadbytek, ani deficit heterozygotů, na úrovni ramet jsou hodnoty F_{IS} výrazně záporné, ale na úrovni genet se již pohybují v intervalu $\langle 0,003; 0,093 \rangle$. Koeficienty inbreedingu ρ_{IS} , založené na krokovém mutačním modelu (SSM), se od F_{IS} více či méně výrazně odchylojí, což je zřejmě dáno výrazným délkovým polymorfismem amplifikovaných mikrosatelitárních sekvencí (viz tab. 1), kdy např. u lokusu *Sx20* je rozsah zjištěných délek 74 bp.

Z hlediska genetické diverzity se obě skupiny populací neliší příliš výrazně, ačkoliv vyšší diverzitu udržují populace dosazované (viz tab. 5). Absolutně nejvyšší průměrný počet alel udržují populace severní části Navorské jámy a horní části Labské louky, ačkoliv obě vykazují disproporčně nižší očekávanou heterozygotnost. To svědčí o nerovnoměrném zastoupení jednotlivých alel a přítomnosti vzácných alel, což dokládají i vysoké hodnoty bohatosti privátních alel.

Tabulka 5: Klonální charakteristiky, koeficienty inbreedingu a test na HW rovnováhu u jednotlivých populací na úrovni genet a ramet. Šedá linka odděluje přirozené a vysazované populace. PD je proporce odlišitelných genotypů (počet genet / počet ramet). Očekávaná heterozygotnost H_{exp} počítána podle Nei (1973), F_{IS} podle metody Weira a Cockerhama (1984), ρ_{IS} podle Rousseta (1996). HE (převaha heterozygotů) i HD (deficit heterozygotů) testovány U testem, hvězdičky určují signifikanci ve prospěch těchto alternativních hypotéz: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P \leq 0,001$, ns $P > 0,05$**

Populace	počet ramet	počet genet	PD	F_{IS} (ramety)	ρ_{IS} (ramety)	F_{IS} (genety)	ρ_{IS} (genety)	Test na HE/HD (genety)
Pančavská louka	49	42	0,857	0,020	0,074	0,022	0,101	ns/*
Horní č. Pančavské l.	6	5	0,833	-0,174	-0,438	-0,088	-0,327	ns/ns
Navorská jáma – J	44	37	0,841	0,108	0,062	0,122	0,050	ns/***
Navorská jáma – S	39	39	1,000	0,179	-0,014	0,179	-0,014	ns/***
Horní Labská louka	21	8	0,381	-0,375	-0,491	0,093	0,054	ns/ns
Pramen Labe	20	10	0,500	-0,104	-0,437	0,074	-0,252	ns/ns
Pod Luční boudou	26	14	0,538	-0,181	-0,409	0,003	-0,123	ns/ns

Tabulka 6: Ukazatele genetické diverzity: průměrný počet alel na lokus (A), průměrný počet alel po rarefakci (A_r), bohatost privátních alel (R_p), pozorovaná a očekávaná heterozygotnost (H_{obs.} a H_{exp.})

Populace	A	A _r	R _p	Úroveň ramet		Úroveň genet	
				H _{obs.}	H _{exp.}	H _{obs.}	H _{exp.}
Pančavská louka	4,500	3,664	0,039	0,673	0,680	0,675	0,681
Horní č. Pančavské l.	2,667	2,667	0,027	0,694	0,551	0,667	0,557
Navorská jáma – J	3,667	2,781	0,092	0,442	0,491	0,447	0,503
Navorská jáma – S	6,000	3,353	0,414	0,468	0,564	0,468	0,564
Horní Labská louka	5,000	4,110	0,263	0,754	0,540	0,625	0,642
Pramen Labe	3,833	3,516	0,023	0,715	0,633	0,633	0,648
Pod Luční boudou	4,833	3,814	0,172	0,731	0,609	0,667	0,645

3.2.2 Pohlavní diference

Rozdíly v genetické variabilitě mezi pohlavími jsou nepatrné. Analýza molekulární variance na úrovni ramet odhalila pouze 3,37 % variability mezi pohlavími s (marginálně) nesignifikantní genetickou diferenciací pohlaví ($P = 0,052$). Na úrovni genet připadala na rozdíly mezi pohlavími pouze 1,66 % zjištěné variability, ačkoliv diference pohlavních skupin byla signifikantní ($P < 0,001$). V některých populacích lze sledovat sníženou genetickou diverzitu u sterilních rostlin (Pančavská louka, jižní Navorská jáma), ta je však dána pouze stochasticky malým počtem vzorků a není statisticky významná (viz tab. 7). Stejně tak u většiny populací existuje snížená diverzita u samčích rostlin. V součtu všech populací jsou však rozdíly zanedbatelné. Výrazná diference existuje u sterilních rostlin z pohledu klonality. Většina sterilních (tj. v daném roce nekvetoucích rostlin) je vázána na populace dosazované a tudíž populace se zvýšenou (anthropogenně danou) klonalitou. Naopak všechny 4 sterilní rostliny v přirozených populacích jsou monoklonální a rozdíly v klonalitě mezi pohlavními skupinami tak zřejmě nelze přisuzovat přirozeným biologickým procesům.

Tabulka 7: Genetická diverzita pro samičí (F), samčí (M) a sterilní jedince (S): průměrný počet alel na lokus (A), průměrný počet alel po rarefakci (A_r), bohatost privátních alel (R_p), pozorovaná a očekávaná heterozygotnost ($H_{obs.}$ a $H_{exp.}$) na úrovni genet.

Populace	pohl.	počet ramet	počet genet	PD	A	A_r	R_p	$H_{obs.}$	$H_{exp.}$
Pančavská louka	F	33	27	0,818	4,333	1,684	0,045	0,698	0,678
	M	14	13	0,929	4,333	1,684	0,015	0,667	0,649
	S	2	2	1,000	1,833	1,472	0,041	0,417	0,354
Horní č. Pančavské l.	F	5	4	0,800	2,667	1,574	0,005	0,583	0,521
	M	-	-	-	-	-	-	-	-
	S	1	1	1,000	2,000	2,000	0,114	1,000	0,500
Navorská jáma – J	F	23	20	0,870	3,667	1,485	0,035	0,408	0,501
	M	20	16	0,850	3,000	1,498	0,057	0,515	0,490
	S	1	1	1,000	1,167	1,167	0,008	0,167	0,083
Navorská jáma – S	F	19	19	1,000	5,167	1,601	0,141	0,484	0,585
	M	20	20	1,000	4,833	1,544	0,079	0,452	0,530
	S	-	-	-	-	-	-	-	-
Horní Labská louka	F	1	1	1,000	1,667	1,667	0,348	0,667	0,333
	M	1	1	1,000	1,500	1,500	0,008	0,500	0,250
	S	19	6	0,316	4,167	1,520	0,018	0,639	0,595
Pramen Labe	F	-	-	-	-	-	-	-	-
	M	-	-	-	-	-	-	-	-
	S	20	10	0,500	3,833	1,649	0,024	0,633	0,648
Pod Luční boudou	F	5	5	1,000	3,500	1,600	0,044	0,533	0,540
	M	2	2	1,000	2,167	1,556	0,067	0,667	0,417
	S	19	7	0,368	4,167	1,580	0,017	0,762	0,646
Přirozené populace	F	80	70	0,875	6,167	1,658	0,580	0,552	0,654
	M	54	49	0,907	5,833	1,595	0,489	0,530	0,589
	S	4	4	1,000	3,500	1,649	0,587	0,500	0,568
Populace s výsadbami	F	6	6	1,000	4,000	1,662	0,543	0,556	0,606
	M	3	3	1,000	3,000	1,656	0,597	0,546	0,656
	S	58	23	0,397	4,833	1,687	0,622	0,670	0,687
Všechny populace	F	86	78	0,907	7,000	1,665	0,568	0,552	0,661
	M	57	52	0,912	6,167	1,609	0,533	0,535	0,603
	S	90	24	0,267	4,833	1,684	0,647	0,639	0,670

3.2.3 Diferenciace subpopulací

Naprostá většina subpopulací je od jiných diferencována signifikantně, avšak slabě či středně silně (viz tab. 8). Pouze horní Labská louka vykazuje téměř nulovou a nesignifikantní diferenciaci od ostatních vysazovaných populací a také od horní části Pančavské louky. Poslední jmenovaná subpopulace je naopak až dosti silně odlišená od ostatních přirozených subpopulací, zvláště od subpopulací z Navorské jámy. Fixační indexy založené na SMM se u některých populačních kombinací výrazně odlišují od F_{ST} , celkově však oba modely poskytují podobné výsledky.

Tabulka 8: Párové F_{ST} (pod úhlopříčkou) a p_{ST} (nad úhlopříčkou) indexy na úrovni genet, hvězdičky určují signifikanci genové diferenciaci v alelických frekvencích podle exaktního G testu: * vysoce signifikantní ($P < 0,001$), ** signifikantní ($P < 0,01$), * signifikantní ($P < 0,05$), NS nesignifikantní ($P > 0,05$).**

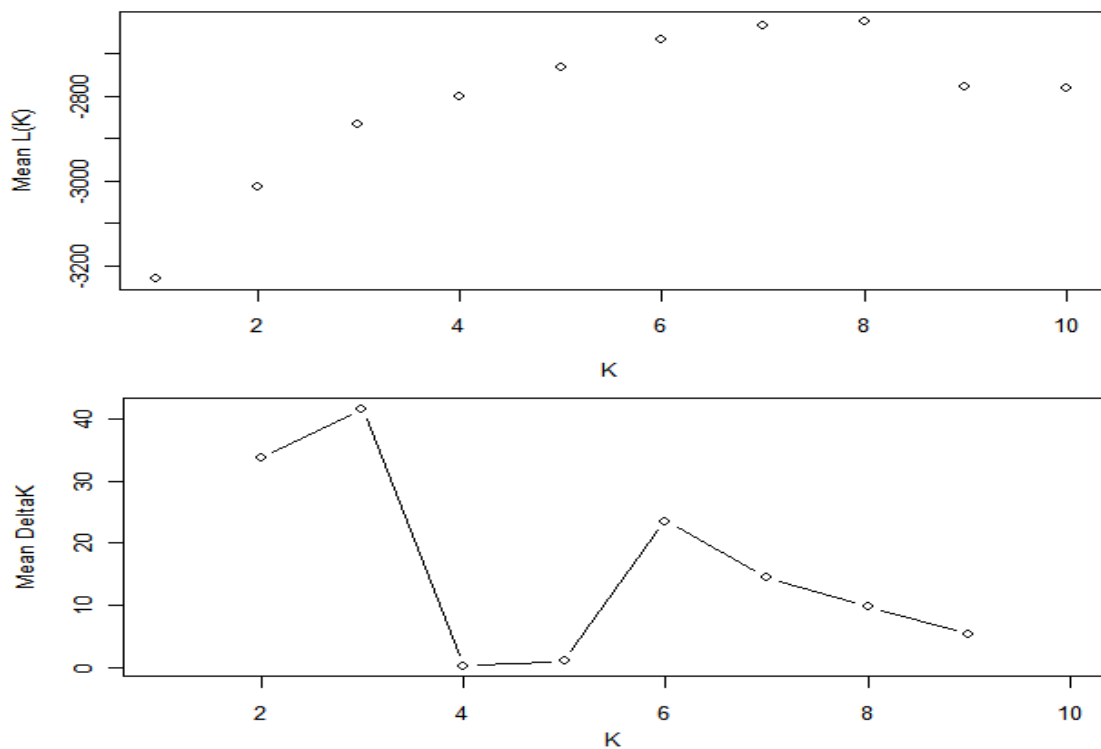
	Pančavská louka	Pančava - horní	Navorská jáma - J	Navorská jáma - S	Pod Luční boudou	Pramen Labe	Horní Labská louka
Pančavská louka	-	0,112	0,210	0,068	0,014	-0,008	-0,027
Pančavská l. - horní	0,136***	-	0,486	0,159	0,020	0,041	0,067
Navorská jáma - J	0,097***	0,244***	-	0,128	0,365	0,321	0,262
Navorská jáma - S	0,081***	0,177***	0,038***	-	0,132	0,116	0,074
Pod Luční boudou	0,037***	0,071*	0,132***	0,123***	-	-0,030	-0,018
Pramen Labe	0,040***	0,083*	0,130***	0,102***	0,010***	-	-0,040
Horní Labská louka	0,029***	0,018 ^{NS}	0,089***	0,045***	-0,002 ^{NS}	-0,009 ^{NS}	-

3.2.4 Populační struktura

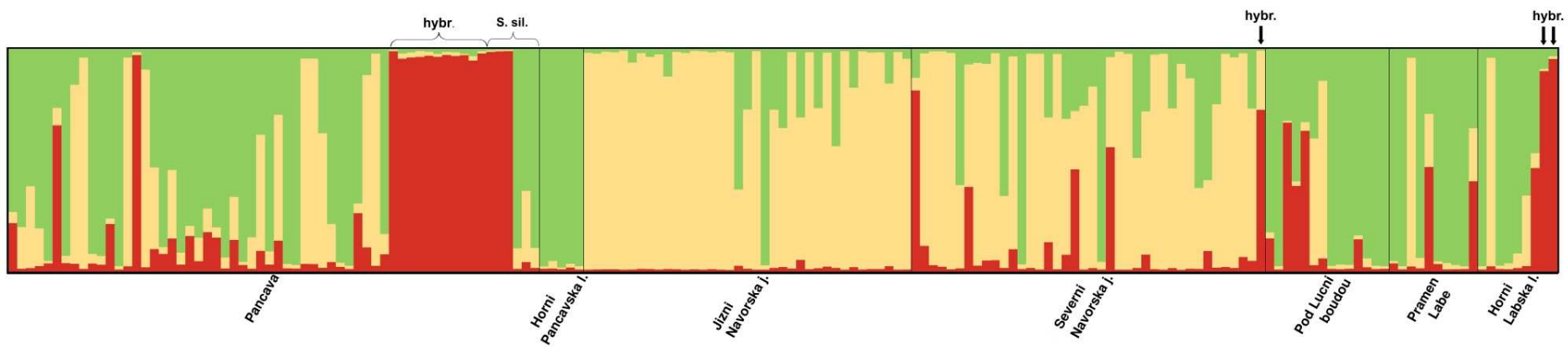
Analýza v programu Structure byla provedena pro $K = 1$ až $K = 10$. Nejlepší statistickou podporu na základě průběhu průměrné ΔK měly $K = 3$ a $K = 6$ (viz obr. 8). Při $K = 3$ bylo všech 10 běhů velmi vyrovnaných (koeficient podobnosti 0,986), při $K = 6$ se tři běhy mírně odlišovaly (celkový koeficient podobnosti pro všechny běhy 0,800) a použito proto bylo pouze 7 vzájemně konzistentních běhů.

Již na první pohled je patrná velmi slabá struktura v datech a slabá mezipopulační diferenciaci (viz obr. 9 a 10). Nejvýrazněji se odlišují morfologicky determinovaní hybridní *S. ×nepitifolia* J. et C. Presl a druhý rodičovský taxon *S. silesiaca* Willd. (vyznačení na obr. 9 nahoře), avšak 3 jedinci domnělé *S. silesiaca* podle této analýzy

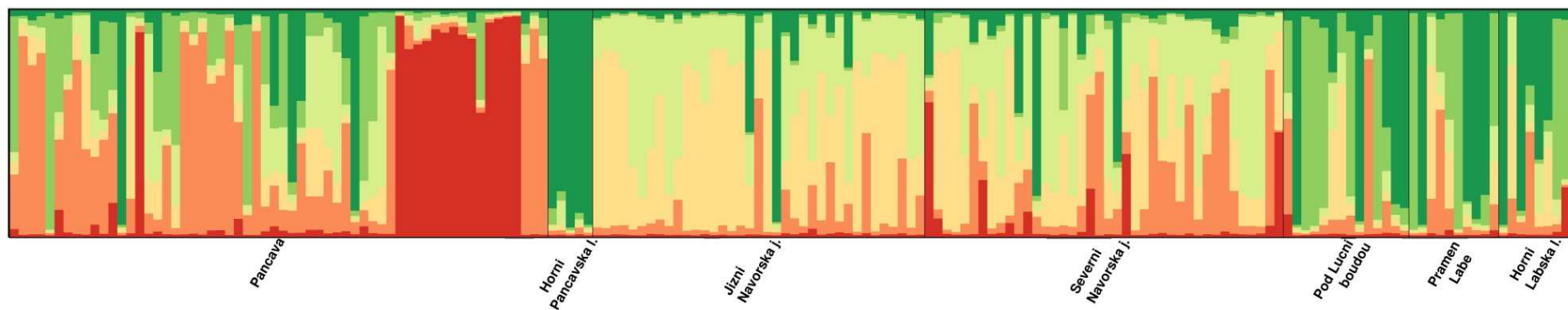
spadají spíše k *S. lapponum*. Na druhou stranu řada jedinců morfologicky nepodchycených byla identifikována jako introgresanti. To se týká zejména již zmíněného jedince PL52 (15. zleva) a řady jedinců ze severní Navorské jámy, kteří všichni nesou alespoň jednu vzácnou alelu, vyskytující se s vyšší frekvencí pouze u hybridů a *S. silesiaca*. Mezipopulační struktura odpovídá diferenciaci dle F statistiky, tj. diferenciaci jen slabá. Relativně homogenní a divergovaná se jeví Navorská jáma s oběma populacemi a zejména horní část Pančavské louky, která nevykazuje výraznější imigraci diaspor. Pravděpodobně však šíří své diaspory do okolních přirozených populací, zejména do zbytku Pančavské louky, která je geneticky velmi heterogenní, stejně jako všechny 3 studované vysazované populace, pocházející právě z velkého počtu jedinců na Pančavské louce, včetně její horní části.



Obrázek 8: Průběh průměrné věrohodnosti (nahore) a průměrné změny věrohodnosti (dole) pro jednotlivá K u *S. lapponum*.



Obrázek 9: Výstup z analýzy ze STRUCTURE pro K=3, průměr pro 10 běhů. Nahoře vyznačení morfologicky determinovaní jedinci *Salix silesiaca* a hybridi *S. ×nepetifolia*.



Obrázek 10: Výstup z analýzy ze STRUCTURE pro K=6, průměr pro 7 konzistentních běhů, pořadí jedinců stejné jako u obr. 9.

3.2.5 Hybridizace a introgrese

Na některých lokalitách, zejména na Pančavské louce, je znám výskyt jedinců se zastoupením znaků jak *S. lapponum*, tak i *S. silesiaca*, přičemž oba druhy jsou na těchto lokalitách přítomny v morfologicky typických exemplářích. Šest jedinců *S. silesiaca* a 14 hybridů proto bylo zařazeno do datasetu za účelem odlišení rodičovských druhů a hybridů a stanovení míry introgrese. Analýza v softwaru NEWHYBRIDS však nepodala žádný relevantní výsledek, neboť celý soubor jedinců rozdělila na 3 větší skupiny: cca 17 % jedinců bylo s velkou pravděpodobností přiřazeno k jednomu rodičovskému clusteru, cca 50 % jedinců k druhému rodičovskému clusteru, cca 10 % jedinců pak bylo označeno jako F2 generace hybridů a zbývající jedinci tvořili kontinuální variabilitu mezi těmito třemi skupinami. Vyhraněné clusterly však neodpovídaly morfologickému určení keřů: první (menší) cluster zahrnoval pouze morfologicky čisté *S. lapponum*, zatímco druhý (výrazně větší) cluster kromě ní obsahoval také všech 6 vzorků domněle „čisté“ *S. silesiaca* a všechny domnělé hybridy.

Stejně tak analýza hlavních koordinát (PCoA) nebyla schopna detekovat diskontinuity ve variabilitě datového souboru a všechny vzorky společně tvořily jeden homogenní shluk s nakupením hybridů v jednom kvadrantu spolu se *S. lapponum* a druhý rodičovský druh *S. silesiaca* byl rozptýlen napříč celou variabilitou datového souboru. Podrobnější výsledky z NEWHYBRIDS ani z PCoA nejsou v práci zařazeny jak z důvodů výše uvedených, tak zejména kvůli nízkému počtu referenčních vzorků *S. silesiaca*.

Jako nejvhodnější se nakonec ukázala analýza softwaru STRUCTURE, který spolehlivě odlišil všechny morfologicky determinované hybridy a dalších cca 10 jedinců, kteří mohou být hybridního nebo introgresního původu. U všech těchto jedinců byly zjištěny vzácné alely, vyskytující se s vyšší frekvencí jen u morfologicky identifikovaných hybridů či *S. silesiaca*. Avšak *S. silesiaca* byla od zbytku souboru odlišena jen z poloviny, tj. 3 jedinci se klastrují k hybridům a 3 jedinci naopak k „čistým“ *S. lapponum* (viz obr. 9).

4 Diskuze

4.1 Klonální propagace

Jednou z význačných charakteristik celé čeledi *Salicaceae* je dobrá schopnost regenerace jak z prýtů, tak z kořenů, ačkoliv regenerace kořenových fragmentů, typická pro rod *Populus* L., je v rodu *Salix* pouze výjimečná, známá jen u severoamerické *S. interior* Rowlee (Skvortsov 1999). U tohoto druhu, ekologicky podobného *S. daphnoides*, bylo navíc pozorováno časté vegetativní šíření pomocí kmenových výmladků a zakořeňování nadzemních fragmentů. U druhu *S. alaxensis* Coville, blízce fylogeneticky i ekologicky příbuzného *S. lapponum*, pak kromě zakořeňování větví bylo zjištěno i šíření pomocí výmladků z kořenů (Krasny et al. 1988). Regenerace z nadzemních fragmentů prakticky všech velikostí od malých větviček až po celé kmeny je přitom nejsnazší v zimě, před nebo těsně po rašení pupenů (Houle et Babeux 1993, Karrenbeg et al. 2002). To je v našich podmínkách období zvýšeného průtoku v horských řekách a tedy i zvýšené pravděpodobnosti fragmentace příbřežních dřevin a odnos těchto fragmentů dále po proudu. Význam vegetativní propagace také stoupá na extrémních, tj. příliš suchých, či dlouze zaplavovaných stanovištích, což je případ zejména kořenových výmladků. U kořenujících fragmentů nadzemních orgánů zdá se být zásadnějším faktorem proudící voda jakožto vektor těchto propagulí. V obou případech je však umožněno osídlit i mikroklimaticky suboptimální stanoviště, zabraňující klíčení semen a uchycení semenáčků (Krasny et al. 1988).

Bylo by tedy hypoteticky možné, aby se *S. daphnoides* šířila v Moravskoslezských Beskydech na ekologicky netypických biotopech, zejména ve společenstvech svazů *Calthion* a *Alnion incanae*, spontánně, avšak pouze vegetativním způsobem, jak by odpovídalo ze získaných genetických dat. Proti této hypotéze však stojí zejména stejnověkost populací, oddělenost jedinců a jejich často pravidelné rozmístění, v kombinaci s absencí výrazných disturbancí lokality, které by umožnily vznik a transport rostlinných fragmentů, a s pravděpodobnou absencí kořenových výmladků. Takovéto „populace“ jsou tak zřetelně antropogenního původu. Pouze 4 populace – populace šterkových náplavů – jsou geneticky i demograficky výrazně jinak strukturovány a lze je považovat za přirozené. Přes všechny dispozice ke klonální propagaci však u nich nebyl zjištěn jediný případ vícerametového genotypu, až na metapopulaci podél řeky Olše a jejích přítoků, která je však zřejmě také částečně

anthropogenní (Stanovská 2011). Do genetické analýzy přitom byly zařazeni všichni nalezení jedinci.

U *S. lapponum* byla v krkonošských přirozených populacích, tj. bez známých výsadeb, zjištěna proporce rozlišitelných genotypů PD od 0,83 o 1,00, což dokládá opět vysokou míru generativní reprodukce. Většina vícerametových genet je zastoupena pouze dvěma, vzácněji třemi rametami a vzdálenost mezi nimi se pohybuje od 4,1 do 57,7 m s průměrnou hodnotou 16,7 m. Nebyl zjištěn žádný případ genotypu s rozšířením mezi dvěma či více přirozenými populacemi, pouze mezi jednou přirozenou (Pančavská louka nebo její horní část) a jednou až třemi vysazovanými populacemi. K téměř totožné míře klonální propagace došli i Stamati et al. (2007) u téhož druhu na Skotské vysočině: PD = 0,95. Většina ramet téhož genotypu však byla vzdálena do 2 m, pouze dva páry ramet rostly ve větších vzdálenostech – 5 a 8 m, přičemž druhý případ byl zřejmě způsoben sesuvem půdy po svahu se současnou fragmentací keře. Podobně i u *S. reinii* Fr. et Sav. ex Seemen byla zjištěna většina ramet identického genotypu ve vzdálenostech méně než 1 m, pouze jediné dvě byly vzdáleny 30,4 m. Studované populace na jihovýchodních svazích Mt. Fuji však rostou na velmi mladé sopečné, skeletnaté a suché půdě (Lian et al. 2003). Také populace *S. lapponum* na Skotské vysočině se nacházejí na strmých skalnatých svazích, kde je zakořenění nadzemních částí rostlin obtížnější, než v krkonošských vrchovištích. Zvláště u populace na Pančavské louce je možné vysvětlit klonální propagaci na takto dlouhé vzdálenosti např. fragmentací keřů počátkem vegetační sezóny tajícím sněhem, odnosem fragmentů vodou přilehlého potoka a následné zakořenění na jeho březích.

V rámci rodu není zjištěný vysoký podíl generativní reprodukce není tak neobvyklý, jak by se podle schopnosti vegetativního šíření mohlo zdát. Různé studie u vrb již dříve prokázaly řadu případů s minimální klonální propagací. *S. hukaoana* Kimura, ekologicky velmi podobná *S. daphnoides* a endemická pro Japonsko, vykazuje PD = 0,94 (Kikuchi et al. 2011). Podobně Douhovnikoff et al. (2010) našli na transektech v arktické tundře v celkovém vzorku 160 jedinců pěti nerozlišovaných druhů vrb jen dvě klonální genety, čili PD = 0,98. Podobné chování bylo popsáno i u *Salix arctica* Pall. (Steltzer et al. 2008). Mnohem vyšší vegetativní šíření v přirozených populacích bylo nalezeno u příbuzného rodu *Populus*. Např. u *Populus alba* L. byly v italských introgresních populacích s *P. tremula* L. zjištěn celkový PD = 0,63 (Castiglione et al. 2010), v Rakousku pak 0,76 u čistého druhu a 0,66 u hybridu *P. ×canescens*

(Aiton) Sm. (van Loo et al. 2008). Avšak u *P. nigra* L. byly klonální genety zaznamenány pouze v oblastech zregulovaných vodních toků a u populací zřetelně anthropogenního původu. V přirozených populacích neupravovaných vodotečí nebyla žádná klonální duplikace zjištěna (Smulders et al. 2008). Tato data jsou konzistentní i se studií klonality u *Salix exigua* Nutt. v Severní Americe, kdy sice byly zjištěny velmi vysoké míry vegetativní propagace (PD = 0,31 – 0,70 na 6 lokalitách 2 říčních systémů, s průměrem 0,46), navíc na každé lokalitě (v průměru) 6 ze 17 zjištěných genotypů zaujímalo 75 % vegetací porostlé plochy, ale míra klonality byla signifikantně vyšší na lokalitách zregulované řeky, čili stanovištích s menší pravidelnou disturbancí (Duhovnikoff et al. 2005).

Autoři citované studie upozorňují i na vysokou mortalitu semenáčků (100% na všech šesti lokalitách ve dvou po sobě jdoucích letech) a odkazují na podobné výsledky starších prací (např. McBride et Strahan 1984, Bradley et Smith 1985), které však poukazují na význam disturbancí pro úspěšné uchycení semenáčků dřevin šterkových náplavů a tím i na význam nezregulovaných toků pro tyto druhy, spíše než na jejich závislost na vegetativní reprodukci. Vysoká mortalita již vzešlých semenáčků v těchto případech byla způsobena téměř výhradně občasnými silnými záplavami v zimním období. Úspěšné uchycení semenáčků je obecně u vrb poměrně vzácné, navzdory vysoké produkci semen, a je podmíněno poněkud málo pravděpodobnou existencí optimálních klimatických a edafických podmínek v období uvolňování semen, zvláště u ripariálních druhů. Jejich semena mají totiž velmi krátkou životnost (poločas životnosti semen u *S. daphnoides* 13,8 dne), klíčí většinou během 24 hodin od dopadnutí na vlhký půdní povrch a ačkoliv mají vysokou počáteční klíčivost (99 % u *S. daphnoides*; Karrenberg et Suter 2003), následkem náchylnosti semenáčků k suchu či zaplavení je mortalita v prvním roce zpravidla mezi 90 až 100 % (Karrenberg et al. 2002). To je také důvod, proč semenáčky vrb zpravidla nebývají pozorovány, navzdory většinou vysoké genetické variabilitě v populacích a nízké klonalitě. U arktických druhů vrb (např. *S. reticulata* L., *S. lanata* L., *S. myrsinites* L.) byla zjištěna podmíněná dormance, která zajišťuje, že semeno vyklíčí nikoliv na konci krátkého vegetačního období, ale až na začátku následujícího léta (Skortsov 1999). Vysokou mortalitu u těchto druhů však způsobují všeobecně náročné klimatické poměry arktické či alpinské tundry (např. Pluess et Stöcklin 2004) a semenáčky nejsou tudíž zaznamenávány ani v těchto biotopech (např. Stamati et al. 2007; Hrachová S., osobní

komunikace). Za určitých (byť relativně vzácných) příhodných okolností však může i malá populace jednorázově generovat obrovský počet vitálních semenáčků, jak bylo pozorováno např. u *S. eleagnos* Scop. na nově vzniklých náplavech po povodních v roce 1997 na řece Ostravici (Klečková L., osobní komunikace).

Poněkud odlišným případem, dokládajícím potenciál k vegetativní propagaci, je klonální diverzita invazních druhů vrb mimo areál svého původního rozšíření, kde však navíc hraje roli i efekt zakladatele. Budde et al. (2011) zjistili ve vzorku 171 jedinců komplexu *Salix alba* L. – *S. euxina* I.V. Belyaeva v Patagonii pouze 13 genet, z toho jedna zahrnovala 154 ramet a největší vzdálenost mezi rametami téhož klonu byla 790 km. Stejně tak Lin et al. (2009) poukazují na nízkou genetickou variabilitu v introdukovaných severoamerických populacích *S. purpurea* L.

4.2 Vnitropopulační struktura

Přirozené populace obou studovaných druhů vykazují poměrně vysokou alelickou diverzitu ve studovaných lokusech, která je úměrná jak obligátní cizospašnosti, tak fylogeografické situaci taxonů na našem území. Ačkoliv přímé srovnání genetické diverzity mezi různými lokusy je poněkud obtížné a často zavádějící, průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti všech studovaných lokusů jsou velmi podobné např. s hodnotami zjištěnými u populací vzácné japonské *S. huakoana* (Kikuchi et al. 2011), ale již mnohem menší než hodnoty zjištěné u *S. lapponum* ve Skotsku, kde tento druh vykazuje dosti vysoký počet alel na lokus i vzhledem k *S. lanata* L. a *S. herbacea* L. (Stamati et al. 2007). Ale ani ve srovnání s běžnými druhy uvnitř jejich areálů se *S. lapponum* a *S. daphnoides* nijak zásadně neliší. Např. severoamerické populace *S. eriocephala* Mich. vykazují jen nepatrně vyšší hodnoty heterozygotnosti (Lin et al. 2009).

Téměř všechny přirozené studované populace vykazují signifikantně pozitivní a v některých případech dosti vysoké hodnoty koeficientu inbreedingu F_{IS} , až na jednu výjimku, kterou je skupina jedinců v horní části Pančavské louky s nesignifikantním nadbytkem heterozygotů. Zvýšená míra inbreedingu bývá nejčastěji způsobena poklesem efektivní velikosti populace, ať už následkem větší míry klonality, vychýleným poměrem pohlaví či prostým poklesem absolutní velikosti populace, a následným zvýšením frekvence oplození mezi příbuznými jedinci (Relichová 2001). Interpretovat deficit heterozygotů jako důsledek inbreedingu však nemusí být vždy

oprávněné. Snížená pozorovaná heterozygotnost totiž může být způsobena i jinými faktory, např. selekcí, ale také přítomností nulových alel (Chapuis et Estoup 2007), klonálními duplikacemi ve vzorku či Wahlundovým efektem (Lee et al. 2011). Selekcí proti heterozygotům, zvláště v populacích s výraznější hybridizací, sice nelze vyloučit, ale vzhledem k obecně přijímané selekční neutralitě SSR lokusů a také k většinou nesignifikantním výsledkům testů na selekční neutralitu pro studované populační vzorky asi nelze selekcí považovat za primární faktor, ovlivňující koeficienty inbreedingu. Podobně ani nulové alely nejsou pravděpodobnou příčinou, zvláště u *S. lapponum*, kde chybějící data tvoří pouze 0,53 % dat, a ovlivnění klonálními duplikacemi pak bylo zabráněno jejich odstraněním a analýzou na úrovni genet. Wahlundův efekt, čili redukce heterozygotnosti v důsledku rozdělení populace do vzájemně izolovaných skupin s následným ovlivněním genetickým driftem, však již nelze nezohlednit. Příkladem může být nápadný cluster 14 jedinců *S. daphnoides* na řece Morávce, který je oddělen od zbytku populace 130 m říčního toku, je vnitřně homogenní a v signifikantní HW rovnováze. Identicky se chová již zmíněný cluster 5 jedinců *S. lapponum* v horní části Pančavské louky, který je izolován jak vzdáleností, tak porostem *Pinus mugo*. Není proto vyloučeno, že více či méně silná izolace, avšak obtížně detekovatelná, existuje i mezi dalšími skupinkami v rámci arbitrárně vymezených populací a ta následně způsobuje jednak genetický drift, jednak i asortativní oplození, vedoucí k inbreedingu.

V rámci čeledi *Salicaceae* bývají pozitivní hodnoty F_{IS} zjišťovány, a to i dosti vysoké. Dokonce i v rodu *Populus*, ve kterém je mezipopulační diferenciace zřejmě spíše slabší (viz dále), byly zjištěny koeficienty inbreedingu i nad 0,5 (viz např. Lee et al. 2011 pro *P. davidiana* Dode a další druhy příbuzné *P. tremula* L.). Stejně tak Stamati et al. (2007) zjistili velké kladné rozdíly mezi očekávanou a pozorovanou heterozygotností u *S. lapponum* i *S. lanata*. Již mnohem nižší, avšak stále pozitivní hodnoty F_{IS} byly detekovány u evropských populací *Populus nigra* L. (Smulders et al. 2007).

Naopak signifikantní nadbytek heterozygotů a tedy i negativní F_{IS} byl zjištěn jen u některých vysazovaných populací *S. daphnoides*. Tento jev byl přítom detekován např. u 71 % populací *S. huakoana* (Kikuchi et al. 2011). Obecně bývá způsoben prodělaným bottleneckem, neboť při prudkém poklesu efektivní velikosti populace je ztráta vzácných alel rychlejší než redukce heterozygotnosti a před ustavením nové rovnováhy mutace–drift je tak v populaci přechodně více heterozygotů, než kolik by se

dalo očekávat na základě pozorovaných alel (Cornuet et Luikart 1996). Dalším význačným znakem prodělaného bottlenecku je snížený poměr (M) počtu mikrosatelitárních alel a rozsahu jejich velikostí. Ztráta každé jedné alely totiž redukuje celkový počet alel, ale pouze ztráta nejdelší nebo nejkratší alely redukuje rozsah jejich velikostí. Míra poklesu poměru M je pak pozitivně korelována s rozsahem a délkou trvání bottlenecku (Garza et Williamson 2001). Ačkoliv žádná ze studovaných přirozených populací nevykazuje signifikantní nadbytek heterozygotů, rozsah alelických délek u *S. lapponum* je nápadný, neboť mezi velikostmi alel často neexistuje kontinuální variabilita. Např. u lokusu *Sx20* lze sledovat dva hiáty ve spektru alelických délek a všechny detekované alely tak mají původ zřejmě ve 3 různých ancestrálních alelách, popř. prodělaly alespoň 2 velké mutace. U čtyř z pěti mikrosatelitů, použitých jak u *S. lapponum*, tak i *S. daphnoides*, existují výrazné rozdíly v rozsahu délek alelických sekvencí mezi těmito druhy při relativně podobném počtu alel (viz tab. 2). Celkové průměrné M je pak u *S. daphnoides* rovno 0,367, u *S. lapponum* 0,190. Tento rozdíl by mohl indikovat dávný bottleneck právě u *S. lapponum*, jejíž populace od té doby opět dosáhly rovnováhy mutace–drift, indikované pozitivními hodnotami F_{IS} . Jiné vysvětlení nízkého poměru M by mohlo spočívat v hybridním původu našich populací, které mohou představovat pozůstatek sympatrie geneticky divergovaných populací (byť stejného druhu) následkem pleistocénních migrací. Tyto úvahy jsou však bez dalšího studia zatím ryze spekulativní.

4.3 Mezipopulační diferenciaci

Ačkoliv jsou vrby výborně přizpůsobeny anemochorii a tím i šíření na velké vzdálenosti, zjištěná genetická diferenciaci přirozených populací signalizuje poměrně slabý genový tok mezi nimi. V případě přirozených populací *S. daphnoides* se přitom mezipopulační geografické vzdálenosti pohybují od 5,7 do 24,3 km. Míra diferenciaci (F_{ST}) navíc nekoreluje s geografickou vzdáleností. Geograficky nejbližší populace jsou Ostravice a Morávka (5,7 km), mající však nejvyšší hodnoty párového F_{ST} (0,103), pomineme-li populaci na Olši, která je zřejmě částečně dosazovaná. Naopak největší vzdálenosti mezi Ostravicí a Horní Lomnou (22,5 km) a mezi Morávkou a Horní Lomnou (17,75 km) nezaručují vyšší hodnoty F_{ST} (0,082 a 0,049). IBD hypotéza (*isolation by distance*; izolace vzdáleností) tedy u *S. daphnoides* zřejmě nevysvětluje mezipopulační diferenciaci a vzhledem k nízkému počtu beskydských populací na větší

škále ani není testovatelná, nicméně nepřímým důkazem izolace vzdáleností byl mohl být již zmíněný geneticky odlišný cluster 14 jedinců na řece Morávce. Takováto populační struktura by mohla indikovat velmi nízký genový tok i na relativně krátké vzdálenosti, jakými mohou být i pouhé desítky metrů, a následný Wahlundův efekt uvnitř subpopulací, zvyšující F_{IS} . Nicméně z analýzy programu STRUCTURE vyplývá, že i mezi populacemi vzdálenými přes 20 km zřejmě existují semenní i pyloví migranti. Jedním z možných vysvětlení tohoto patternu genového toku může být vedle IBD také hypotéza zvyšování genového toku na dlouhé vzdálenosti v souvislosti s anthropogenní fragmentací a odlesňováním krajiny (White et al. 2002, Bacles et al. 2005). V přirozených podmínkách krajiny se souvislým zapojeným lesem je genový tok omezen pouze na krátké vzdálenosti kolem mateřské rostliny, avšak s postupným otevíráním krajiny je umožněna migrace semen i pylu i mezi dříve izolovanými populacemi. Tato hypotéza byla potvrzena i pro *Salix huakoana* Kimura (Kikuchi et al. 2011).

U *S. lapponum* jsou studované přirozené populace vzdáleny od 250 do 950 m a vzájemná diferenciace je srovnatelná či ještě výraznější než u *S. daphnoides* (párové F_{ST} od 0,038 do 0,244; vždy signifikantně odlišné od nuly). Geografická vzdálenost mezi populacemi koreluje s F_{ST} pouze do vzdálenosti ca 700 m, další dva páry vzdálenějších populací (Pančavská louka a horní Pančavská louka, Pančavská louka a severní Navorská jáma) pak jsou diferencovány slaběji. Mantelův test na této úrovni docela pochopitelně vyšel nesignifikantně ($P = 0,191$), vzhledem k malému počtu populací. Nicméně marginálně nesignifikantní byly výsledky testu na úrovni jedinců pro Pančavskou louku ($P = 0,070$), kde genetická vzdálenost mírně pozitivně koreluje se vzdáleností geografickou ($R^2 = 0,012$). Jistější výsledky však přinese až další studium.

V rámci rodu *Salix* byla tzv. IBD hypotéza (*isolation by distance*; izolace vzdáleností) potvrzena mezi i uvnitř populací *S. alba* L. (Van Puyvelde et Triest 2007) a nepřímo také u šesti ripariálních druhů vrb, kdy byl zjištěn děšť 90 % semen ve vzdálenosti do 200 m od matečné rostliny a šíření semen na větší vzdálenost bylo minimální, ačkoliv jednotlivá semena byla zjišťována na celém sledovaném území (Gage et Cooper 2005). Nepříbuzná, avšak také anemochorní *Hypochaeris radicata* L. vykazuje IBD pouze na malé škále: ve vzdálenostech do 3,5 km genetická vzdálenost signifikantně koreluje se vzdáleností geografickou, ale nad touto hranicí jsou populace příliš silně izolovány a jsou tak ovlivňovány více genetickým driftem než migrací (Mix et al. 2006).

Zajímavé je srovnání výše uvedených dat s výsledky prací na ekologicky i reprodukčně podobném rodu *Populus*, kde byla výrazná diferenciace nalezena pouze mezi populacemi napříč Evropou a i populace vzdálené několik set kilometrů vykazovaly vysoký genový tok a tím i poměrně nízké, byť signifikantní indexy diferenciace (Smulders et al. 2008, Castiglione et al. 2010). Nicméně na srovnatelně velkém geografickém prostoru byla zjištěna velmi silná genetická diferenciace mezi populacemi *P. cathayana* Rehd v centrální Číně ($G_{ST} = 0,489$), kde však jsou jednotlivé populace vystaveny velmi rozdílným selekčním tlakům a ty jsou tak pravděpodobně zodpovědné za zjištěnou diferenciaci (Chen et Peng 2010).

Vysvětlení pomocí selekce ale neobstojí pro studii genového toku mezi populacemi *Populus nigra* L. podél toku řeky Drôme ve Francii (Imbert et Lefèvre 2003). Vzdálenosti mezi sousedícími populacemi se pohybovaly od 0,5 do 13 km a diferenciace (F_{ST}), zjištěná pomocí šesti mikrosatelitárních lokusů, pak od 0,005 po 0,117; v 99,6 % případů signifikantní. Byla potvrzena IBD hypotéza a intenzivnější genový tok v dolních částech toku, kde se nacházejí jednak silnější populace, představující větší zdroj migrantů, jednak i menší topografické bariéry pro pohyb semen či pylu. Ty bývají často považovány, spolu s geografickou vzdáleností, za hlavní příčinu genetické diferenciace, ale např. na anemochorním a anemogamním druhu *Betula occidentalis* Hooker byl zjištěn spíše jiný jev – izolace nadmořskou výškou. U tohoto druhu zřejmě existuje poměrně intenzivní genový tok i na vzdálenost 660 km napříč topografickými bariérami, nicméně byla zjištěna signifikantní genetická diferenciace mezi populacemi z různých nadmořských výšek, byť stejného údolí. Její příčiny mohou být různé: od odlišné rychlosti klíčení pylové láčky či semen v různých teplotních podmínkách podle genotypů rodičů, přes životnost semen ovlivněnou přítomností parazitů, až po nepřekrývající se období kvetení rostlin z různých nadmořských výšek (Williams et Arnold 2001). Izolace nadmořskou výškou však není relevantní ani pro *S. lapponum*, ani pro *S. daphnoides*. Studované populace obou druhů se totiž nacházejí v přibližně stejných nadmořských výškách. Nejpravděpodobnějším vysvětlením poměrně vysokých a signifikantních hodnot fixačních indexů proto budou topografické bariéry: v případě *S. daphnoides* zejména horské hřbety, oddělující jednotlivá údolí, a v rámci údolí pak zapojená příbřežní vegetace. U *S. lapponum*, jejíž zde studované populace rostou na stejné „náhorní rovině“, resp. při jejím okraji, mohou bariéru

představovat husté porosty *Pinus mugo*, které tyto populace obklopují a často je vzrůstem převyšují.

4.4 Výsadby

Jedním z problémů, na který měla tato studie odpovědět, je otázka přirozenosti ekologicky atypických populací, o kterých bylo známo nebo se spekulovalo, že jsou vysazované. V případě *S. daphnoides* nebyly zjištěny žádné informace o konkrétních výsadbách, avšak z charakteru populací mimo štěrkové náplavy (jedno pohlaví, uniformní věková struktura apod.) se dalo dobře usuzovat na jejich anthropogenní původ (Stanovská 2011). Genetická data pak měla tuto hypotézu podpořit či vyvrátit, kvantifikovat genetickou diverzitu v těchto populacích a případně zjistit jejich původ. Jak již bylo diskutováno dříve, všechny tyto domněle vysazované populace sestávají z jedné či dvou genet, takže byly odvozeny pouze z jednoho či dvou mateřských stromů vegetativním způsobem, tj. řízkováním, které je pochopitelně snazší a rychlejší, než sběr a výsev semen. Nepodařilo však ani v jednom případě najít konkrétní dvojici mateřské ramety z přirozené populace a dceřiných ramet vysazených, což může být dáno vysokým stářím výsadeb a relativně velkou dynamikou říčních náplavů, vč. populací rostlin na nich rostoucích (např. Karrenberg et al. 2002). Z analýzy programu STRUCTURE však vyplývá, že žádná ze studovaných populací není výrazně geneticky odlišná od populací přirozených a byly proto zřejmě odvozeny z rostlin dané oblasti, tj. Beskyd a blízkého okolí. Nejvýraznější podobnost existuje mezi klonem z Dinotic a ostravickou populací, jíž je poměrně podobný i klon z Těškovic. Ještě méně zřetelná je podobnost klonů z Jezerných a Bzových k populaci na Olši. Avšak na základě alelických frekvencí jak podle STRUCTURE, tak podle IMMANC jednoznačně nelze odvodit z konkrétní populace přirozené ani jednu z populací vysazovaných. Vzhledem k absenci sexuálně odvozených jedinců, k přítomnosti často jediného pohlaví i k absenci vhodného biotopu je další samovolná reprodukce anthropogenních populací jen málo pravděpodobná.

Zcela jiná je situace u *S. lapponum* v Krkonoších. U tří studovaných lokalit totiž je známo, že na nich v minulosti probíhaly záměrné výsadby ze strany správy Krkonošského národního parku a znám je i přibližný původ vysazovaných rostlin – Pančavská louka (Hrachová et Hroneš, osobní komunikace). Tyto informace potvrzují i získaná genetická data, která odhalila řadu identických genotypů mezi populacemi na

Pančavské louce a vysazovanými populacemi, a také slabou diferenciací mezi těmito populacemi. Oproti *S. daphnoides* však v nepřírozených populacích *S. lapponum* existuje velké množství genet a tím i vysoká genová diverzita, dokonce převyšující samplované populace přirozené. To vysvětluje masový způsob výsadeb – ve velmi krátké době bylo sebráno obrovské množství (tj. řádově několik tisíc) řízků z Pančavské louky, které byly poté rozsázeny na jiná, byť ekologicky ne zcela vhodná stanoviště. Tak velké množství rostlinného materiálu nemohlo být získáno z několika málo keřů a do výsadeb se tak dostal obrovský počet rozdílných genotypů. Z hlediska genetické diverzity jsou tyto nové populace velmi polymorfní a tedy i reprodukčně perspektivní, avšak suboptimální ekologické podmínky nedovolují většině jedinců kvést a jejich potenciál pro uchování genofondu je tedy zatím pouze skrytý.

4.5 Hybridizace a introgrese

V oblasti Krkonoš se hojně vyskytují v morfologicky typické podobě jak *S. lapponum*, tak *S. silesiaca*, avšak řada keřů vykazuje kombinaci znaků obou druhů a mnohdy není možné příslušného jedince jednoznačně determinovat, zvláště v pokročilém vegetačním období (Hrachová a Hroneš, osobní komunikace). Usuzuje se proto v této oblasti na intenzivní hybridizaci obou taxonů s možnou kontinuální introgrésí. Skutečná míra zmíněných jevů je však otázkou. Při snaze z populačních analýz v této práci vyřadit hybridy vyvstaly potíže i s jednoznačnou genetickou determinací obou druhů na základě mikrosatelitárních dat. Jako outgroup bylo do datasetu zařazeno 6 vzorků *S. silesiaca* a 14 morfologicky „zřejmých“ hybridů. Bez vnesení jakékoliv apriorní informace však většina algoritmů nedokázala tento outgroup odlišit (např. PCoA, NEWHYBRIDS). Až software STRUCTURE, který zřejmě dokáže lépe zohlednit vzácné alely, vylíčil kromě morfologicky identifikovaných hybridů a *S. silesiaca* také 10 jedinců jim částečně podobných (7 ze severní Navorské jámy a 3 z Pančavské louky). U všech těchto jedinců byly zjištěny privátní alely, které se ve zbytku datasetu vůbec nevyskytují a zřejmě tak pocházejí právě ze *S. silesiaca*. Tři „čistí“ (tj. morfologicky ± jednoznační) jedinci tohoto druhu však zmíněné alely vůbec neobsahují a jejich genotyp obsahuje pouze alely běžné u *S. lapponum*. Pro to existují v zásadě dvě vysvětlení: tito jedinci byli mylně identifikováni, nebo genetická diferenciacie obou taxonů je, přinejmenším ve studovaných šesti lokusech, příliš slabá na jejich identifikaci. Pro testování této druhé hypotézy by však bylo potřeba rozšířit datový soubor o více domněle „čistých“ jedinců

S. silesiaca a nejlépe i o další vhodný genetický marker. Spolehlivost morfologické determinace a míra introgrese bude předmětem dalšího studia. Na základě získaných dat je však možné potvrdit, že hybridizace a introgrese v krkonošských populacích *S. lapponum* a *S. silesiaca* probíhá, dost možná oběma směry, a to nejintenzivněji na Pančavské louce a na severním okraji Navorské jámy.

5 Závěr

Dodnes se v literatuře traduje efektivní šíření anemochorních druhů na dlouhé vzdálenosti a tím i slabá diferenciace jejich populací napříč areálem. Na základě stále přibývajících molekulárních dat se však zdá, že v přirozených podmínkách intenzivní genový tok mezi populacemi anemochorních vyšších rostlin probíhá pouze na vzdálenost řádově stovek metrů a za přítomnosti i drobných topografických bariér se může redukovat na vzdálenosti mnohem kratší. Vnitřní substruktura fyziognomicky velmi homogenních populací následkem slabého genové toku pak může způsobit až deficit heterozygotnosti oproti hodnotám očekávaným z pozorovaných alelických frekvencí. To potvrzují i data získaná u *S. lapponum* a *S. daphnoides*, jejichž populace z ČR vykazují fixační indexy sice nízké či středně vysoké, ale signifikantně odlišné od nuly, a signifikantní deficit heterozygotů. Také tato data však potvrzují existenci příležitostných migrantů i na vzdálenost desítek kilometrů a s ní i obecný význam vzácných jevů nejen v biologii rostlin.

Oba studované druhy, ačkoliv se na území ČR vyskytují jen okrajovými populacemi (v případě *S. daphnoides*) či exklávně a reliktně (v případě *S. lapponum*) a jsou u nás vzácné, vykazují poměrně vysoký polymorfismus ve studovaných SSR lokusech a zřejmě tedy i celkovou genetickou variabilitu. Přes dobrý potenciál v nepohlavnímu rozmnožování se přirozené populace obou druhů udržují převážně či dokonce výhradně sexuálním způsobem. Vyšší stupeň klonality byl zjištěn pouze u populací anthropogenně vzniklých, u nichž bývá v závislosti na charakteru výsadb klonální variabilita nulová (*S. daphnoides*) až vysoká, srovnatelná či vyšší než u populací přirozených (*S. lapponum*). V obou případech však jsou pro spontánní sexuální šíření a udržení populací zcela zásadní ekologické faktory prostředí, potřebné jak pro úspěšné kvetení a produkci semen, tak pro jejich klíčení a přežití semenáčků na vhodných obnažených stanovištích. Výsadby řízkováním proto nejsou pro ochranu genofondů těchto taxonů efektivní a jediným způsobem jejich ochrany je ochrana jejich

přirozených biotopů. Zatímco vrbě laponské, rostoucí u nás výhradně v subalpínském stupni pod vysokým stupněm ochrany, zatím žádné ohrožení nehrozí, vrba lýkovcová je vázána na nestabilní štěrkové náplavy divočících horských řek. To jsou biotopy, ustupující pod tlakem v posledních desetiletích velmi „oblíbených“ vodohospodářských zásahů, které mají za cíl regulaci toků a tedy potlačení přirozeného režimu řeky, nezbytného pro periodickou obnovu náplavů. Reálné ohrožení *S. daphnoides* na našem území proto může být v budoucnu mnohem závažnější, než jak by se mohlo zdát z relativně častých nálezů jednotlivých stromů po celém území ČR.

6 Použitá literatura

- ANDERSON E. C. et THOMPSON E. A. (2002): A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. – *Genetics* 160: 1217–1229.
- BACLES C. F. E., BURCZYK J., LOWE A. J. et ENNOS R. A. (2005): Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. – *Evolution* 59(5): 979–990.
- BARKER J. H. A., PAHLICH A., TRYBUSH S., EDWARDS J. et KARP A. (2003): Microsatellite markers for diverse *Salix* species. – *Molecular Ecology Notes* 3: 4–6.
- BRADLEY C. E. et SMITH D. G. (1985): Plains cottonwood recruitment and survival on a prairie meandering river floodplain, Milk River, southern Alberta and northern Montana. – *Canadian Journal of Botany* 64: 1433–1442.
- BUDDE K. B., GALLO L., MARCHELLI P., MOSNER E., LIEPELT S., ZIEGENHAGEN B., LEYER I. (2011): Wide spread invasion without sexual reproduction? A case study on European willows in Patagonia, Argentina. – *Biological Invasions* 13: 45–54.
- CASTIGLIONE S., CICATELLI A., LUPI R., PATRIGNANI G., FOSSATI T., BRUNDU G., SABATTI M., VAN LOO M. et LEXER C. (2010): Genetic structure and introgression in riparian populations of *Populus alba* L. – *Plants Biosystems* 144(3): 656–668.
- CORNUET J. M. ET LUIKART G. (1996): Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. – *Genetics* 144: 2001–2014.
- DIERINGER D. et SCHLÖTTERER C. (2005): Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. – *Molecular Ecology Notes* 3: 167–169.
- DOUHOVNIKOFF V., MCBRIDE J. R. ET DODD R. S. (2005): *Salix exigua* clonal growth and population dynamics in relation to disturbance regime variation. – *Ecology* 86(2): 446–452.
- DOYLE J. J. et DOYLE J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- ELLSTRAND N. C. ET ELAM D. R. (1993): Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217–242.

- EXCOFFIER L., LAVAL G. et SCHNEIDER S. (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. – *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- EHRICH D. (2009): Documentation for Strucuture-sum, version 2009. – dostupné na <http://www2.uit.no/ikbViewer/Content/184557/Structure-sum-2009.zip> dne 7. 3. 2011.
- FALUSH D., STEPHENS M et PRITCHARD J. (2003): Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. – *Genetics* 164: 1567–1587.
- GAGE E. A. et COOPER D. J. (2005): Patterns of willow seed dispersal, seed entrapment, and seedling establishment in a heavily browsed montane riparian ecosystem. – *Canadian Journal of Botany* 83: 678–687.
- GARZA J. C. et WILLIAMSON E. G. (2001): Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. – *Molecular Ecology* 10: 305–318.
- GOUDET J. (1995): FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. – *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- HARDY O. J. et VEKEMANS X. (2002): Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. – *Molecular Ecology Notes* 2: 618–620.
- HAMILTON M. B. (2009): *Population genetics*. – Oxford.
- HOLSINGER K. E. (1999): Analysis of genetic diversity on geographically structures populations: A Bayesian perspective. – *Hereditas* 130: 245–255.
- HOLSINGER K. E. (2010a): Analyzing the genetic structure of populations. – dostupné na <http://darwin.eeb.uconn.edu/eeb348/lecturenotes/genetic-structure.pdf> dne 21. 2. 2011.
- HOLSINGER K. E. (2010b): Analyzing the genetic structure of populations: a Bayesian approach. – dostupné na <http://darwin.eeb.uconn.edu/eeb348/lecture-notes/genetic-structure-bayes.pdf> dne 28. 2. 2011.
- HOLSINGER K. E. et LEWIS P. O. (2007): Hickory: a package for analysis of population genetivc data v 1.1. – dostupné na <http://darwin.eeb.uconn.edu/hickory/hickory.html> dne 28. 2. 2011.

- HOLSINGER K. E. et Weir B. S. (2009): Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . – EEB Articles 22, dostupné na http://digitalcommons.uconn.edu/eeb_articles/22 dne 22. 2. 2011.
- HOLUB J. et PROCHÁZKA F. (2000): Red list of the flora of the Czech Republic (state in the year 2000). – Preslia 72: XX-XX.
- HÖRANDL E., FLORINETH F. AT HADACEK F. (2002): Weiden in Österreich und angrenzenden Gebieten. – Wien.
- HRONEŠ M. (2009): Rozšíření a morfologická variabilita populací vrby laponské (*Salix lapponum* L.) v České republice. – bakalářská práce na Katedře botaniky Univerzity Palackého v Olomouci, pp. 39.
- CHAPUIS M. et ESTOUP A. (2007): Microsatellites null alleles and estimation of population differentiation. – Molecular Biology and Evolution 24(3): 621–631.
- CHEN K. et PENG Y. (2010): AFLP analysis of genetic diversity in *Populus cathayana* Rehd originating from southeastern Qinghai-Tibetan plateau of China. – Pakistan Journal of Botany 42(1): 117–127.
- CHMELAR J. ET KOBLÍŽEK J. (1990): 65: *Salicaceae* Mirbel – vrbovité. – In: Hejný S. et Slavík B. [eds.]: Květena ČR 2, pp. 458–495.
- CHYTRÝ M., KUČERA T., KOČÍ M. [eds.] (2001): Katalog biotopů ČR. – Praha.
- IMBERT E. et LEFÈVRE F. (2003): Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (*Salicaceae*) along a dynamic river system. – Journal of Ecology 91: 447–456.
- JAKOBSSON M. et ROSENBERG N. A. (2007): CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. – Bioinformatics 23 (14): 1801–1806.
- JAQUIÉRY J., GUILLAUME F. ET PERRIN N. (2008): Predicting the deleterious effects of mutational load in fragmented populations. – Conservation Biology 23(1): 207–218.
- KELLER L. F. et WALLER D. M. (2002): Inbreeding effects in wild populations. – Trends in Ecology and Evolution 17(5): 230–241.
- KALINOVSKI S. T. (2005): HP-Rare: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. – Molecular Ecology Notes 5: 187189.
- KARRENBERG S., EDWARDS P. J. et KOLLMANN J. (2002): The life history of *Salicaceae* living in the active zone of floodplains. – Freshwater Biology 47: 733–748.

- KARRENBERG S. et SUTER M. (2003): Phenotypic trade-offs in the sexual reproduction of *Salicaceae* from flood plains. – *American Journal of Botany* 90(5): 749–754.
- KIKUCHI S., SUZUKI W. et SASHIMURA N. (2011): Gene flow in an endangered willow *Salix hukaoana* (*Salicaceae*) in natural and fragmented riparian landscapes. – *Conservation Genetics* 12: 79–89.
- KRASNY M. E., VOGT K. A. et ZASADA J. C. (1988): Establishment of four *Salicaceae* species on river bars in interior Alaska. – *Holarctic Ecology* 11: 210–219.
- LEE K. M., KIM Y. Y. et HYUN J. O (2011): Genetic variation in populations of *Populus davidiana* Dode based on microsatellite marker analysis. – *Genes and Genomics* 33: 163–171.
- LIAN C., OISHI R., MIYASHITA N., NARA K., NAKAYA H., WU B., ZHOU Z. et HOGETSU T. (2003): Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. – *Molecular Ecology* 12: 609–618.
- LIN J., GIBBS J. P. et SMART L. B. (2009): Population genetic structure of native versus naturalized sympatric shrub willows (*Salix*; *Salicaceae*). – *American Journal of Botany* 96(4): 771–785.
- MCBRIDE J. R. et STRAHAN J. (1984): Establishment and survival of woody riparian species on gravel bars of an intermittent stream. – *American Midland Naturalist* 112(2): 234–245.
- MICHALAKIS Y. et EXCOFFIER L. (1996): A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. – *Genetics* 142: 1061–1064.
- MIX C., ARENS F. P., RENGELINK R., SMULDERS M. J. M. et VAN GROENENDAEL M. (2006): Regional gene flow and population structure of the wind-dispersed plant species *Hypochaeris radicata* (*Asteraceae*) in an agricultural landscape. – *Molecular Ecology* 15: 1749–1758.
- NEI M. (1973): Analysis of gene diversity on subdivided populations. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 70(12): 3321–3323.
- PEAKLALL R. et SMOUSE P. E. (2006): GenA1Ex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. – *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.

- PLUESS A. R. ET STÖCKLIN J. (2004): Population genetic diversity of the clonal plant *Geum reptans* (*Rosaceae*) in the Swiss Alps. – *American Journal of Botany* 91(12): 2013–2021.
- PRITCHARD J. K., STEPHENS M. et DONNELLY P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. – *Genetics* 155: 945–959.
- REISCH C., SCHURM S. et POSCHLOD P. (2007): Spatial genetic structure and clonal diversity in an alpine population of *Salix herbacea* (*Salicaceae*). – *Annals of Botany* 99: 647–651.
- RANNALA B. et MOUNTAIN J. L. (1997): Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 9197–9201.
- RAYMOND M. et ROUSSET F. (1995): Genepop (version-1.2) – population-genetics software for exact tests and ecumenicism. – *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- REISCH C., SCHURM S. et POSCHLOD P. (2007): Spatial genetic structure and clonal diversity in an alpine population of *Salix herbacea* (*Salicaceae*). – *Annals of Botany* 99: 647–651.
- RELICHOVÁ J. (2001): *Genetika populací*. – Brno.
- RIESEBERG L. H. (1997): Hybrid origins of plant species. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359–389.
- ROSENBERG N. A. (2004): Distruct: a program for the graphical display of population structure. – *Molecular Ecology Notes* 4: 137–138.
- ROUSSET F. (1996): Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. – *Genetics* 142: 1357–1362.
- ROUSSET F. (2008): Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. – *Molecular Ecology Notes* 8: 103–106.
- ROUSSET F. et RAYMOND M. (1995): Testing heterozygote excess and deficiency. – *Genetics* 140: 1413–1419.
- SEDLÁČKOVÁ M. et PLÁŠEK V. [eds.] (2005): Červený seznam cévnatých rostlin Moravskoslezského kraje (2005). – *Časopis Slezského muzea Opava (A)* 54: 97–120.

- SKALICKÝ V. (1988): Regionálně fytogeografické členění ČR. – In: Hejný S. et Slavík B. [eds.]: Květena ČR 1, pp. 103–121.
- SKVORTSOV A. K. (1999): Willows of Russia and adjacent countries. Taxonomical and geographical revision. English translation. – Joensuu, 307 pp.
- SMULDERS M. J. M., COTTRELL J. E., LEFÈVRE F., VAN DER SCHOOT J., ARENS P., VOSMAN B., TABBENER H. E., GRASSI F., FOSSATI T., CASTIGLIONE S., KRYSTUFEK V., FLUCH S., BURG K., VORNAM B., POHL A., GEBHARDT K., ALBA N., AGÚNDEZ D., MAESTRO C., NOTIVOL E., VOLOSZYANCHUK R., POSPÍŠKOVÁ M., BORDÁCS S., BOVENSCHEN J., VAN DAM B. C., KOELEWIJN H. P., HALFMAERTEN D., IVENS B., VAN SLYCKEN J., VANDEN BROECK A., STORME V. et BOERJAN W. (2008): Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: Consequences for conservation and restoration. – *Forest Ecology and Management* 255: 1388–1399.
- SOCHOR M. (2009): Molekulární markery pro studium vysokohorských druhů vrb (*Salix*). – bakalářská práce na Katedře botaniky Univerzity Palackého v Olomouci, pp. 43.
- SOCHOR M., STANOVSKÁ E. et VAŠUT R. J. (2010): Are the populations of *Salix daphnoides* in the Western Carpathians (Czech Republic) natural? (poster) – In: Spano P., Cherubini L. [eds.]: Fifth International poplar symposium, Book of abstracts, p. 42.
- SONG S., KEY D. K. et HOLSINGER K. E. (2006): Differentiation among populations with migration, mutation and drift: implications for genetic inference. – *Evolution* 60(1): 1–12.
- STAMATI K., BLACKIE S., BROWN W. S. ET RUSSELL J. (2003): A set of polymorphic SSR loci for subarctic willow (*Salix lanata*, *S. lapponum* and *S. herbacea*). – *Molecular Ecology Notes* 3: 208-282.
- STANOVSKÁ (2011): Vrba lýkocová (*Salix daphnoides*) v Moravskoslezských Beskydech: vztahy mezi rozšířením, ekologií, populační strukturou a ohrožením druhu. – diplomová práce na Katedře ekologie a životního prostředí Univerzity Palackého v Olomouci, pp. 101.
- STELTZER H., HUFBAUER R. A., WELKER J. M., CASALIS M., SULLIVAN P. F. et CHIMNER R. (2008): Frequent sexual reproduction and high intraspecific variation in *Salix*

- arctica*: Implications for a terrestrial feedback to climate change in the High Arctic. – Journal of Geophysical Research 113: G03S10.
- ŠTURSA J., KWIATKOWSKI P., HARČARIK J., ZAHRADNÍKOVÁ J. et KRAHULEC F. (2009): Černý a červený seznam cévnatých rostlin Krkonoš. – Opera Corcontica 46: 67–104.
- TAKAHATA N. et NEI M. (1984): F_{ST} and G_{ST} statistics in the finit island model. – Genetics 107: 501–504.
- VALIÈRE N. (2002): GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. – Molecular Ecology Notes 2: 377–379.
- VAN LOO M., JOSEPH J. A., HEINZE B., FAY M. et LEXER C. (2008): Clonality and spatial genetic structure in *Populus ×canescens* and its sympatric backcross parent *P. alba* in a Central European hybrid zone. – New Phytologist 177: 506–516.
- VAN PUYVELDE K. et TRIEST L. (2007): ISSRs indicate isolation by distance and spatial structuring in *Salix alba* populations along Alpine upstream rivers (Alto Adige and Upper Rhine). – Belgian Journal of Botany 140: 100–108.
- WEIR B. S. et COCKERHAM C. C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. – Evolution 38 (6): 1358–1370.
- WHITE G. M., BOSHIER D. H. et POWELL W. (2002): Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilis* Zuccarini. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 99(4): 2038–2042.
- WILLIAMS J. H. JR. et ARNOLD M. L. (2001): Sources of genetic structure on the woody perennial *Betula occidentalis*. – International Journal of Plant Sciences 162(5): 1097–1109.