

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Diplomová práce



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



Genetická diverzita populací třešně ptačí

Diplomová práce

Autor: Monika Coufalová

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

2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Ing. Monika Coufalová

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

Genetická diverzita populací třešně ptačí

Název anglicky

Genetic diversity of wild cherry populations

Cíle práce

Cílem práce je posoudit populační genetickou diverzitu s využitím mikrosatelitových dat a provést srovnání populací třešně ptačí zastoupených ve dvou semenných sadech a přirozené populace.

V rešeršní části práce bude proveden literární rozbor problematiky: druhu třešně ptačí se zaměřením na reprodukční charakteristiky druhu, popis molekulárních genetických markerů a nástrojů využívaných k posouzení genetické diverzity včetně principiálního vysvětlení analytických algoritmů.

Metodika

Rešeršní část práce bude zpracována s využitím vědeckých publikací v mezinárodních žurnálech, recenzovaných knih a monografií. Minimální počet zdrojů je 60.

Pro zpracování vlastní výzkumné části budou využita data generovaná na mikrosatelitových lokusech. Ke zpracování a vyhodnocení dat budou využity vhodné softwarové nástroje (Cervus, GenAEx atd.).

Zjištěné poznatky o genetické diverzitě budou diskutovány také z pohledu praktického lesnického managementu.

Harmonogram práce: Do konce prosince 2020 bude vypracována literární rešerše a detailně zpracována metodika diplomové práce. Do konce února 2021 bude provedena analýza dat a jejich vhodná interpretace (kompletace kapitoly Výsledky DP).

Doporučený rozsah práce

min. 50 stran

Klíčová slova

třešeň ptačí, genetická variabilita a diverzita, semenný sad, přirozená populace

Doporučené zdroje informací

- Cachi, A. M., & Wünsch, A. (2014). Characterization of self-compatibility in sweet cherry varieties by crossing experiments and molecular genetic analysis. *Tree Genet Genomes*, 10(5), 1205-1212.
- Ducci, F., & Santi, F. (1997). The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium*). *Can J For Res*, 27(12), 1998-2004.
- Funda, T., & El-Kassaby, Y. A. (2013). Seed orchard genetics. *Plant Sci Rev*, 2012, 21-43.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*, 11(12), 2453-2465.
- Mariette, S., Balsemin, E., Stoeckel, S., Tavaud, M., Le Bouler, H., Santi, F., & Verger, M. (2007). Parental participation in progeny and effective population sizes in experimental seed orchards of wild cherry *Prunus avium* L.(Batsch). *Ann For Sci*, 64(5), 533-539.
- Takayama, S., & Isogai, A. (2005). Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 56, 467-489.
- White, T. L., Adams, W. T., & Neale, D. B. (2007). *Forest Genetics*. CABI, Wallingford.

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 25. 10. 2020

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

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 25. 10. 2020

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 04. 11. 2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Genetická diverzita populací třešně ptačí vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jiřího Koreckého, Ph.D., a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědoma, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Hostivici dne 9.4.2022

Monika Čoufalová
Podpis autora

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Ing. Jiřímu Koreckému, Ph.D., za cenné konzultace, za trpělivost a vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině za trpělivost a Petru Smetanovi za vytvoření nezbytného domácího zázemí.

Abstrakt

Tato práce posuzuje populační genetickou diverzitu s využitím mikrosatelitových dat a porovnává tři populace třešně ptačí (*Prunus avium*) v České republice, a to ve dvou semenných sadech a v příměstské populaci. Celkem byla analyzována molekulárně biologická data od 158 vzorků na 12 lokusech. Získaná data byla analyzována statistickým programem GenAlEx 6.5. Mezi 158 zkoumanými jedinci bylo zjištěno 137 jedinečných genotypů třešně ptačí se 141 různými alelami na 12 lokusech. Získané výsledky ukazují využitelnost mikrosatelitových lokusů pro hodnocení genetické diverzity a pro identifikaci jednotlivých genotypů, neboť zvolené genetické lokusy se ukázaly jako vysoce polymorfni. Největší genetická diverzita byla zjištěna v příměstské populaci oproti populacím semenných sadů. V případě semenných sadů může být problémem neodhalená příbuznost mezi zastoupenými jedinci, která snižuje míru genetické diverzity sadu, a tedy i budoucích generací. Ukazuje se, že molekulárně-genetické analýzy jsou opodstatněné pro odhalení tohoto potenciálního problému. Pro semenný sad by měly být vybírány jen takové stromy, které jsou v souladu se šlechtitelským záměrem co do kvality, kvantity produkce semen i genetické diverzity. Nevhodný výběr a rozmístění geneticky identických rodičů může s ohledem na reprodukční charakteristiku třešně ptačí mít za následek sníženou produkci semen a nižší genetickou diverzitu v semenných sadech. Vyšší míra diverzity odhalená v příměstské populaci je pravděpodobně důsledkem genového toku z kulturních variet třešně.

Klíčová slova: třešeň ptačí, genetická variabilita a diverzita, semenný sad, přirozená populace

Abstract

This work has assessed the population genetic diversity using microsatellite data and compared three populations of wild cherry (*Prunus avium*) in the Czech Republic in two seed orchards and in a suburban population. A total of 158 samples of molecular biological data were analysed at 12 loci. The obtained data were analysed by the GenAEx 6.5 statistical software. In 158 analyzed individuals, 137 unique genotypes of wild cherry were identified, with 141 different alleles across 12 loci. The obtained results show the usability of microsatellite loci for the evaluation of genetic diversity and for the identification of individual genotypes as chosen genetic loci were proven to be highly polymorphic. The highest genetic diversity was found in the suburban population when compared to the seed orchard populations. In the case of seed orchards, a problem may be the undiscovered relationship between the present individuals, which reduces the rate of genetic diversity of the orchard, and therefore of the future generations. Molecular genetic analyses appear to be justified in revealing this potential problem. For a seed orchard, only such trees should be chosen that are in harmony with the breeding plan in terms of quality, seed production quantity, and genetic diversity. Unsuitable selection and deployment of genetically identical parental clones may, with respect to the reproduction characteristics of wild cherry, result in a decreased level of seed production and lower genetic diversity in seed orchards. The higher rate of diversity revealed for the suburban population is probably a consequence of a gene flow from the cultural cherry sorts.

Keywords: wild cherry, genetic variability and diversity, seed orchard, natural population

Obsah

Úvod.....	13
Cíl práce.....	15
1. Rozbor problematiky	16
1.1 Popis druhu	16
1.1.1 Genom třešně ptačí	19
1.1.2 Reprodukční charakteristika druhu	19
1.2 Genetika populací	21
1.2.1 Frekvence alel	21
1.2.2 Genetická diverzita	22
1.2.3 Ukazatelé genetické diverzity	27
1.3 Molekulárně genetické metody ke zjišťování genetické diverzity	30
1.3.1 Genetické markery	30
1.3.2 Využití mikrosatelitových markerů u třešně ptačí	32
1.3.3 Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) u třešně ptačí	34
1.4 Semenné sady	35
1.4.1 Definice semenného sadu a souvisejících odborných pojmů	35
1.4.2 Typy semenných sadů.....	36
1.4.3 Design a rozmístění ramet v sadu	37
1.4.4 Semenné sady třešně ptačí v České republice	39
2 Metodika	41
2.1 Odběr materiálu	41
2.1.1 Semenný sad Lužná u Rakovníka „Čejkovka“	42
2.1.2 Semenný sad Obrovice	43
2.1.3 Příměstská populace	46
2.2 Zpracování materiálu a získání populačně-genetických dat	47
3 Výsledky	51
3.1 Charakteristika sledovaných vzorků a alel v populacích.....	51
3.2 Efektivní počet alel pro jednotlivé populace	54
3.3 Fixační index.....	56
3.4 Shannonův informační index	57

3.5	Souhrnné zhodnocení všech populací	58
3.5.1	Hodnoty základních populačně-genetických charakteristik	59
3.5.2	Výsledky analýzy genetické struktury populací	60
3.5.3	Výsledky genetických vzdáleností mezi populacemi	61
4	Diskuze	62
5	Závěr	67
	Seznam literatury a použitých zdrojů	69

Seznam tabulek

Tabulka 1 Přehled uznaných semenných sadů třešně ptačí v ČR.....	39
Tabulka 2 Počet ramet na klon v semenném sadu Čejkovka.....	42
Tabulka 3 Počet ramet na klon v semenném sadu Obrovice	44
Tabulka 4 Znázornění analyzovaných lokusů a sekvencí primerů	48
Tabulka 5 Velikosti amplifikačních produktů pro jednotlivé lokusy	50
Tabulka 6 Počet specifických alel v jednotlivých lokusech a populacích	53
Tabulka 7 Překryv alel v populacích mezi zkoumanými lokusy	54
Tabulka 8 Efektivní počet alel pro jednotlivé populace	55
Tabulka 9 Hodnoty fixačních indexů pro jednotlivé lokusy a populace	57
Tabulka 10 Hodnoty Shannonova informačního indexu pro jednotlivé lokusy a jednotlivé populace	58
Tabulka 11 Průměrné hodnoty počtu alel na lokus, efektivního počtu alel, pozorované a očekávané heterozygotnosti a fixačního indexu pro jednotlivé populace	59
Tabulka 12 Průměrné hodnoty F_{IS} , F_{IT} , F_{ST} a Nm pro všechny populace.....	61
Tabulka 13 Matice genetických vzdáleností (podle Neie).....	61

Seznam obrázků

Obrázek 1 Mapa uznaných semenných sadů třešně ptačí v ČR (vytvořeno pomocí Google maps).....	40
Obrázek 2 Geografické rozmístění zájmových populací třešně ptačí (vytvořeno pomocí Google maps).....	41
Obrázek 3 Mapa semenného sadu Čejkovka (vytvořeno pomocí mapy.cz).....	43
Obrázek 4 Schéma semenného sadu Čejkovka.....	43
Obrázek 5 Mapa semenného sadu Obrovice (vytvořeno pomocí mapy.cz).....	44
Obrázek 6 Schéma semenného sadu Obrovice.....	45
Obrázek 7 Mapa testovaných stromů třešně ptačí v příměstské populaci (vytvořeno pomocí Google maps).....	46

Seznam grafů

Graf 1 Znázornění efektivního počtu alel pro jednotlivé lokusy v jednotlivých populacích.....	56
Graf 2 Shannonův informační index pro jednotlivé lokusy a jednotlivé populace	58
Graf 3 Průměrná pozorovaná a průměrná očekávaná heterozygotnost v jednotlivých populacích.....	60

Úvod

V posledních letech došlo k dramatickým změnám v lesních porostech v České republice v podobě kalamit velkého rozsahu. Za jeden z hlavních důvodů je pokládáno neadekvátní monokulturní rozšíření naší nejvýznamnější hospodářské dřeviny, smrku ztepilého. Tak rozsáhlé kalamity se společným jmenovatelem napříč téměř celou Českou republikou vyžadují zásadní změnu v myšlení v oblasti lesnického hospodářství. Bylo nutné přehodnotit ekonomické výhody monokultur na rozsáhlých plochách nad riziky významných ekologických a v konečném důsledku i ekonomických dopadů. Jednou z hlavních úprav původní představy o hospodářství je úprava druhové skladby porostů a diferenciací vertikální a horizontální struktury porostů. Aktuálním tématem s velkým potenciálem pak zejména v České republice je využití původních druhů listnáčů. Jedním z nich je i třešeň ptačí (*Prunus avium*), kterou řadíme mezi ušlechtilé listnáče. Třešeň ptačí roste téměř po celé Evropě a vyskytuje se v lesních porostech vtroušeně. Velmi vzácně vytváří přirozené populace. I v rámci snahy o diverzifikaci druhové skladby porostů prostřednictvím začleňování třešně ptačí je snaha o zachování geneticky více diverzifikované populace třešně. Větší genetická diverzita má větší potenciál pro vznik stabilnějších a odolnějších porostů proti abiotickým i biotickým činitelům. Odolnější porosty přispívají k zachování biologické diverzity lesních ekosystémů, které se pak snáze adaptují na změny klimatu. Tímto způsobem napomáhají k ochraně životního prostředí, zachování ekologické stability krajiny i zachování krajinného rázu.

Jedním z důvodů pro začleňování třešně ptačí je její velmi kvalitní dřevo, které je vysoce ceněné jako náhrada za tropické druhy dřevin (po nátěru se podobá červenohnědému mahagonu), a které může být použito například na výrobu nábytkářských dýh. V současnosti roste snaha o snížení dovozu dřeva z tropických oblastí z důvodu stále se zvyšující ceny tohoto dřeva a snahy o zachování tropických lesů. Hlavním významem třešně ptačí v lesním hospodářství je produkce dřeva o vysoké jakosti, které významným způsobem navyšuje ekonomickou hodnotu porostu. Tuto ekonomickou hodnotu je vhodné chránit právě genetickou diverzifikací začleňovaných jedinců. Z třešně bylo vyšlechtěno i několik významných kultivarů pro produkci plodů. Šlechtění a ochrana genových zdrojů třešně je provozována na území České republiky, ale i v celé Evropě. Již vytvořených molekulárních nástrojů pro studium genetiky kultivarů třešně lze s výhodou použít i pro studium „divokého“ druhu třešně. Získat

znalost o genetické diverzitě uvažovaných jedinců a populací lze pomocí mikrosatelitových markerů. Mikrosatelity jsou kodominantní, vysoce polymorfní části genetického kódu. Pro svou velkou rozlišovací schopnost se hodí pro ověřování klonové identity, studium populačně-genetické diverzity a pro odvození informací o původu reprodukčního materiálu v semenných sadech nebo ve směsi jedinců.

Cíl práce

Cílem práce je posoudit populační genetickou diverzitu třešně ptačí s využitím mikrosatelitových dat a provést srovnání populací zastoupených ve dvou semenných sadech a v příměstské populaci, kterou lze považovat za antropogenně významně ovlivněnou. V rešeršní části práce bude proveden literární rozbor problematiky: druhu třešně ptačí se zaměřením na reprodukční charakteristiky druhu, popis molekulárních genetických markerů a nástrojů využívaných k posouzení genetické diverzity včetně principiálního vysvětlení analytických algoritmů.

Hypotézou je, že v populacích semenných sadů bude vyšší genetická diverzita oproti příměstské populaci, neboť semenné sady se zakládají většinou z propagovaných rodičovských stromů z geograficky širší oblasti. Ověření hypotézy bude provedeno pomocí ukazatelů genetické diverzity (heterozygotnost, fixační index, atd.). Přínosem této práce je prohloubení znalostí o problematice populační genetické diverzity třešně ptačí v České republice.

Molekulárně biologická data byla pro tuto práci poskytnuta vedoucím práce a jejich generování tedy nebylo předmětem řešení.

1. Rozbor problematiky

1.1 Popis druhu

Třešeň ptačí (*Prunus avium*, též *Cerasus avium*) je listnatý strom s přirozeným geografickým zastoupením v Evropě, severní Africe a v západní Asii (Ducci and Santi, 1997). V současné době se vyskytuje i mimo původní areál. Podle dostupných archeologických nálezů se předpokládá, že její původní výskyt byl v severozápadní a střední Evropě (Russell, 2003). Třešeň roste od nížin až po dolní patra hor. Například v Alpách se vyskytuje až do nadmořské výšky 1700 m nad mořem, někdy i do výšky 2000 m n. m. V České republice se přirozeně vyskytuje v teplejších polohách. Ve vyšších polohách se vyskytuje jen na chráněných místech. Neoptimálnější podmínky pro pěstování třešně u nás jsou do 350 m n. m., s průměrnou roční teplotou nad +8 °C, s průměrným ročním úhrnem srážek do 650 mm. Nejvíce se třešeň vyskytuje v oblasti středních Čech, středohoří a na jižní Moravě (Hejný and Slavík, 1992). Maximální výskyt v ČR je zaznamenán do nadmořské výšky 810 m n. m. (Krkonoše).

Russel, (2003), uvádí, že se třešeň v lesních porostech vyskytuje vtroušeně a velmi vzácně vytváří přirozené populace. Ideální formou lesa pro třešeň je střední les, kde vhodné podmínky pro třešeň se vyskytují v horní etáži porostu. Je považována za pionýrský druh a využívá se i k rekultivacím.

Demirer, (2019), ve své práci uvádí, že třešeň upřednostňuje bazické půdy. Špatně toleruje malé množství živin v půdě. Třešeň mnohem lépe roste v prostředních zásobených vodou, ale docela dobře snáší i krátkodobé sucho. Na dlouhodobější sucho reaguje tím, že shazuje listy. Nejvíce se jí daří na stanovišti ekologické řady D od dubového až po bukový stupeň. Přirozeně se vyskytuje ve společenství *Carpinion*, *Quercion pubescenti*, *Quercion petraeae* a *Prunion spinosae*.

Straže *et al.*, (2008), popisuje třešeň ptačí jako světlomilnou dřevinu, která zástin a chlad snáší jen slabší. Ve stínu nekvete a chřadne, z tohoto důvodu je dobré ji nechávat v hlavní úrovni. Třešeň je velmi ohrožena pozdními mrazy, větrem a sněhem. Třešeň má malou životnost. Růst třešně je v mladém věku dosti rychlý a v 50-60 letech se růst zvolňuje. Třešeň začíná plodit v 15 až 25 letech, většinou každoročně a bohatě, pokud není v zástině.

Popis třešně ptačí uvádí (Kremer, 1995) takto: Je to listnatý opadavý strom dorůstající výšky 25-35 m. Nejvyšší stáří stromu se pohybuje v rozmezí 150-200 let. Kmen stromu bývá velice silný, výčetní průměr kmene ve výšce 1,3 m nad zemí dosahuje až 1 m. Kmen stromu bývá často rovný, plnodřevný, s vysoko nasazenou korunou. Větve třešně v mladém věku jsou silné, přímé, lesklé, šedavé. Starší větve jsou tmavohnědé. Postranní větve bývají krátké. Koruna stromu bývá velmi pravidelně kulovitá, u mladších stromů často ukončena štíhlou špičkou. U starších jedinců je koruna spíše sloupcovitá, ale vždy stejnoměrně klenutá. Borka má zbarvení červenavě hnědošedé, slabě lesklé, odlupuje se prstencově, vytváří příčné lenticely, ve stáří puká podélně. Kořenový systém vytváří kulovitý tvar, později se rozrůstá i do šířky. Výmladnost kořenů se vyskytuje ojediněle, výmladnost pařezů je též slabá, ale nejčastěji se objevuje výmladnost kmenová. K vývrátům často nedochází.

Götz *et al.*, (2014), uvádí: Pupy jsou vejcovité, leskle červenohnědé. Listové pupeny jsou zašpičatělé, květní pupeny jsou zaokrouhlené, přilehlé, často jich bývá více pohromadě. Délka pupenů je 6-8 mm. Puppenové šupiny bývají četné, lepkavé a zaokrouhlené. Květy rozkvétají krátce před vyrašením listů. Jsou většinou bílé barvy, někdy i narůžovělé, velikost květů je 2 až 3,5 cm v průměru. Květní stopky jsou hladké, dlouhé 2,5 až 5 cm. Na bázi květenství jsou pupenové šupiny, listy se zde nevyskytují. Kališní lístky mají tvar vejčitý, hladký, tupý, většinou jsou zbarveny červenavě. Korunní lístky nejčastěji rostou vějířovitě, ojediněle okrouhle, délka lístků je 10-15 cm. Období kvetení je duben až květen.

Miljković *et al.*, (2019) píše: Listy jsou dlouhé asi 7-15 cm a široké 4-8 cm. Jsou obvejčité až podlouhle oválné, s úzkou špičkou, střídavé, nepravidelně zubaté, se zoubky směřujícími dopředu. Listy jsou na lici hladké a tmavozelené, na rubu svěže zelené a slabě lesklé. V paždí žilek jsou svazečky chloupků. Řapíky jsou 2-4 cm dlouhé. Olistění se vyskytuje hlavně na obvodu koruny, listy na podzim žloutnou nebo červenají. Letorosty jsou červenavě hnědé, silné a hladké.

Peckovice jsou tmavočervené, někdy až téměř černé, zřídka též žluté, nejčastěji kulovité, šťavnaté, dužnaté, s chutí natrpklou až sladkou, velikost 1 až 1,5 cm. Pecka je vejcovitá až kulovitá, hladká, nejčastěji světle hnědá, dlouhá 6 až 10 mm. Klíčivost semen (pecek) je vysoká, rychle však klesá. Semenáček má dělohy velice silné, první listy jsou podobné listům dospělé rostliny.

Třešeň lze rozmnožovat generativním i vegetativním způsobem. Generativní neboli pohlavní rozmnožování třešně se uskutečňuje rozmnožováním semeny. Mezi nepoužívanější způsoby vegetativního rozmnožování se u třešně využívá množení pomocí roubů, řízků a metodami *in vitro*. Roubování třešně začíná v zimním období, ale při teplotách nad 0° C, kdy v době zimního spánku stromu (v prosinci až lednu) se řežou rouby. Rouby se uchovávají v chladném a stinném místě při teplotě 0° C až 2° C a nesmí během skladování uschnout (Bärtels, 1988). Řízkování třešně lze provést pomocí bylinných i dřevitých řízků. Bylinné řízky jsou řízky, které jsou odebírány z dvou až čtyřletých matečných rostlin, následně je vhodné použít stimulátor růstu a provést výsadbu do drobného štěrku v období června. Dřevité řízky je vhodné sázet v listopadu pod sklo (Bärtels, 1988). Metoda *in vitro*, tedy pěstování tzv. ve skle, se provádí na kultivačních médiích za stanovených podmínek teploty, vlhkosti, fotoperiody, kvantity a kvality světla, atd. Po aklimatizaci a otužení jsou dřeviny vypěstované *in vitro* vysazeny do venkovního prostředí, kde dále rostou a vytvářejí sazenice dřevin.

Největší škodliví činitelé virového původu třešně jsou nekrotická kroužkovitost višně (Oliver *et al.*, 2009), proužkovitá mozaika třešně a chlorotická kroužkovitost třešně (Böhmer, 2003). Nekrotická kroužkovitost višně napadá ve velkém i třešně. Způsobuje nejprve vznik zelených až tmavošedých výrůstků na spodní straně listů. S postupným růstem listů tyto výrůstky vypadají a list je dírkovaný. Stromy následně chřadnou a předčasně odumírají. Přenáší se roubováním nebo očkováním pletiv. Proužkovitá mozaika třešně má za následek zpomalení růstu, zhoršení kvality plodů a následné odumírání stromu. Projevuje se tím, že žilnatinu lemují ohraničené proužky žluté nebo krémové barvy. Šíří se očkováním nebo roubováním. Chlorotická kroužkovitost třešně ovlivňuje obzvláště růst stromu. Na listech napadeného stromu se objevují světle zelené skvrny. Přenáší se roubováním, očkováním, mízou, pylem i semeny. Z bakteriálních původců napadajících třešeň jde především o tzv. bakteriální spálu třešně způsobenou *Pseudomonas syringae*. Houba *Monilia* způsobuje odumírání prýtů. Další choroby třešní jsou například strupovitost třešně, monilioza peckovin, dírkovitost listů třešní a jiné. Mezi hmyzí škůdce třešně patří: vrtule třešňová, ploskohřbetka třešňová, pilatka třešňová, mšice třešňová (Francardi and Roversi, 2000), bělokaz třešňový a jiní.

Dřevo třešně ptačí je pevné, pružné, tvrdé, dá se dobře leštit. Vlákna jsou rovná, s jemnou pravidelnou texturou (Walker, 2009). Třešeň ptačí řadíme mezi rychle rostoucí dřeviny s krátkou dobou obmýti 55–70 let (Ďurkovič, 2006). V posledních

letech je její dřevo vysoce ceněno jako náhrada za tropické druhy dřevin (po nátěru se podobá červenohnědému mahagonu). V nábytkářství se používá na výrobu dýh, dále se využívá ve stolařství, v řezbářství, sochařství a výrobě drobných předmětů pro domácnost, hračky a části hudebních nástrojů (Walker, 2009). Obliba třešňového nábytku v 1. polovině 19. století zřejmě napomohla snížení zastoupení třešně ptačí v porostech. Z tohoto důvodu a z důvodu zachování ekologické biodiverzity je nutno přírodní genofond třešně ptačí chránit.

V minulosti i v současnosti jsou v Evropě zakládány třešňové sady s předpokládaným pozdějším dřevařským využitím. I v České republice byly snahy o lesnické pěstování třešně, a to například v oblasti bývalého Lesního Závodu Broumov.

Okrasné kultivary třešně se využívají v sadovnictví, například *Prunus avium* 'Plena', která vytváří plné květy s dlouhým trváním, 'Pendula' (převislý typ - *P. avium* x *P. vulgaris*) a jiné. Třešeň ptačí se též velmi využívá jako podnož. Hlavní význam třešně ptačí ovšem stále spočívá v ovocnářství, kde je známa celá řada kultivarů, odvozená ze tří výrazných skupin (variet či poddruhů): z plané varianty *avium* – ptáčnice, s plody malými a natrpkými – a z pěstovaných velkoplodých a sladkých odrůd varianty *juliana* – srdcovka a varianta *duracina* – chrupka.

1.1.1 Genom třešně ptačí

Shirasawa *et al.*, (2017), uvádí, že třešeň ptačí má diploidní genom s počtem chromozomů nejčastěji $2n = 16$, ale byly zaznamenány i případy s počty chromozomů 24 a 32 v somatických buňkách (Janick, 2005). Shirasawa a kolektiv dále uvádí celkovou délku genomu třešně 352,9 Mbp (milionů párů bází). Ve své práci zjistili, že více než 96,0 % genomu třešně tvoří jádrové eukaryotické geny. Dále předpověděli existenci 43 349 genů zcela nebo částečně kódujících proteiny a vytvořili základní mapu s 2 382 lokusy. Sekvenování celého genomu u šesti kultivarů třešně odhalilo 1 016 866 SNP (single-nucleotide polymorphism; záměna v nukleotidu na dané pozici DNA oproti nukleotidu vyskytujícímu se u většiny populace) a 162 402 inzercí/delecí.

1.1.2 Reprodukční charakteristika druhu

Třešeň ptačí je cizosprašný strom. Projevuje se u ní tzv. gametofytická autoinkompatibilita, tedy geneticky podmíněný mechanismus bránící samooplození (Sharma *et al.*, 2017, Cachi, A. M., 2014, Takayama and Isogai, 2005).

Mechanismus cizosprašnosti třešně je následující: pylové zrnko nesoucí určitou alelu není schopno oplodnit vajíčko, jehož genetická výbava obsahuje stejnou alelu. Informace o typu přítomné alely je uložena na úseku nukleové kyseliny běžně označované jako S-lokus. Na S-lokusu se vyskytují dva geny kódující proteiny zodpovědné za cizosprašnost: první gen pro S-RNázu zodpovědný za samičí (pestíkovou) část cizosprašnosti a druhý gen pro S-haplotypově specifický F-box protein (SFB) zajišťující samčí (pylovou) část cizosprašnosti (Ushijima *et al.*, 2003, Yamane *et al.*, 2003). Konkrétní mechanismus, který zabrání samooplození u třešně, není dodnes zcela objasněn. Podle modelu, který uvádí Tao, R., Iezzoni, (2010), Matsumoto, D., Tao, (2016) a Matsumoto, D., Tao, (2019), se v pylové láčce předpokládá existence „obecného inhibitoru“, jenž je schopen inaktivovat všechny S – RNázy, které zabrání prorůstání pylové láčky z pletiv pestíku. Tento obecný inhibitor je zřejmě víceproteinový komplex (SCF), kterého se účastní i proteiny PavSLFLs, PavSFBL2, MGST, DnaJ-like protein a další minoritní proteiny (Matsumoto, D., Tao, 2016, Matsumoto, D., Tao, 2019). Dle předchozího modelu protein pylové láčky SFB umožňuje selektivně rozeznat S-RNázu, jež se s proteinem SFB nachází v jednom lokusu, a umožní zabránit degradaci S-RNázy obecným inhibitorem. S-RNáza je tedy schopna provést příslušnou funkci, a tedy degradovat RNA v prorůstající pylové láčce. Degradace má pak za následek zastavení růstu pylové láčky už v blizně a neumožní samooplození. Pokud dojde k mutaci či deleci SFB proteinu, může dojít k samosprašnosti třešně. K částečné samosprašnosti třešně může také dojít snížením exprese genu MGST (gen kódující glutation-S-transferázu z M-lokusu), který je součástí SCF komplexu (Ono, K., Akagi, T., Morimoto, T., Wunsch, A., Tao, 2018).

Konkrétní alely v S-lokusu se označují jako S-alely a odlišují se čísly. V minulosti byly postupně získávány znalosti o S-alelách. Například Crane a Brown, (1937), identifikovali prvních šest různých S-alel (S1–S6), z nichž každá znamená jednu skupinu nekompatibility. Dále Matthews a Dow, (1969), shrnuli výsledky genotypů S-alel ze 196 přírůstků třešně a identifikovali 13 skupin nekompatibilit a dále skupinu 0 pro univerzální dárce. Tato skupina 0 zahrnuje kultivary, které mohou úspěšně opylovat všechny kultivary patřící do všech známých skupin nekompatibilit.

Praktický následek je takový, že nemůže dojít k samooplození mezi květy jednoho stromu, ani k oplození mezi vegetativně vzniklými jedinci. K oplození také nedojde mezi stromy, u kterých se alely na S-lokusu shodují, přestože celková genetická výbava

těchto stromů je odlišná (Sharma *et al.*, 2017). Nicméně určitými mutacemi S-alely může dojít k samosprašnosti třešň (Cachi, A. M., 2014). V přirozených populacích třešně ptačí má distribuce a frekvence S-alel ekologický význam a ovlivňuje šíření genů a genetickou rozmanitost třešň (Schueler, Tusch and Scholz, 2006, Vaughan *et al.*, 2007).

Znalosti o S-alelách třešně ptačí jsou velice důležité pro ovocnáře a sadaře z hlediska zakládání nových sadů (Schuster, 2012).

1.2 Genetika populací

Genetika populací, též populační genetika, se zabývá změnami v zastoupení alel jednotlivých genů či specifických oblastí genomu v populaci. Populace je nejčastěji popisována jako skupina jedinců stejného druhu se společným genofondem a žijící v určité oblasti. Frekvence alel je klíčová statistika používaná ke kvantifikaci genetického složení populací (Snustad and Simmons, 2009).

1.2.1 Frekvence alel

Genotyp diploidního stromu nese dvě alely na každém lokusu. Celkový počet alel na každém z lokusů je tedy dvojnásobkem počtu jedinců ve vzorku. Frekvence alely se udává jako podíl zastoupení dané alely mezi všemi alelami (Gillespie, 2004). Frekvence alely nabývá rozsahu od 0 do 1 a můžeme ji vypočítat podle následujícího vzorce (Smouse, P. Peakall, 2015):

$$F_x = \frac{2N_{xx} + N_{xy}}{2N},$$

kde F_x je frekvence alely x , N_{xx} je počet homozygotních jedinců majících dvojici stejných alel x , N_{xy} je počet heterozygotních jedinců s alelou x a libovolnou jinou alelou a N je celkový počet vzorků.

Mnoho genů v přirozených populacích lesních stromů je polymorfních, což znamená, že mají dvě nebo více relativně četných alel (Snustad and Simmons, 2009). Relativně četnou alelou genu rozumíme takovou, jejíž frekvence je větší, než 0,01.

Faktory ovlivňující frekvenci alel

Hlavní příčina pozorované genetické diverzity v určité skupině analyzovaných jedinců je způsobena rekombinačními procesy při pohlavním rozmnožování. Mezi další faktory

ovlivňující frekvenci alel patří mutace, migrace, selekce a genetický drift. Mutace jsou změny v genotypu organismu. Většinou vznikají náhodně. Mutace se dělí podle úrovně, na které na genetickou informaci působí: genové, chromozomové a genomové. Mutace svými účinky ovlivňují fenotyp příznivě či nepříznivě nebo zcela neutrálně, a zvyšuje genetickou variabilitu populací.

- Migrace, též genový tok, je pohyb alel mezi populacemi. Vyskytují se dva účinky migrace, které ovlivňují genetickou strukturu populací: zaprvé obohacení o nové alely (ale též ochuzení), čímž se zvyšuje (nebo snižuje) genetická variabilita, a za druhé pokračující migrace přes generace vede ke snížení genetické diverzity mezi populacemi. Podrobněji o genovém toku je uvedeno v kapitole 1.2.2 Genetická diverzita.
- Selektce neboli přírodní výběr má velký vliv na frekvenci alel v populaci. Jestliže alela vlastního jedince zvýhodňuje na rozdíl od jedinců bez této alely, začne se frekvence této alely zvyšovat v následujících generacích. Frekvence nevýhodných alel se začne postupně snižovat. Dominantní nevýhodné alely se vytrácejí z populace poměrně rychle, jelikož svého vlastníka znevýhodňují, a dochází k tzv. negativní selekci. Recesivní nevýhodné alely mizí pomalu a zcela nevymizí nikdy, neboť svého nositele neznevýhodňují, dokud je druhá z alel na daném lokusu výhodná.
- Genetický drift neboli genetický posun je evoluční proces, při kterém dochází k náhodným posunům ve frekvenci jednotlivých alel v populaci. Tyto přeměny frekvencí alel nepodléhají selekci, ale plně podléhají náhodě při samotném vzniku gamet a zygot. Tyto přeměny jsou kumulativní, a tedy postupně může nastat i fixace jedné alely a ztráta alely druhé. Genetický drift je nejvíce patrný v malých populacích, kde také častěji dochází k fixaci jedné z alel.

1.2.2 Genetická diverzita

Genetická diverzita, též genetická rozmanitost, (genetic diversity, GD) je definována jako celkové množství genetické variace přenášené jednotlivci uvnitř nebo mezi genetickými jednotkami v důsledku jejich evolučních cest a tvoří základ pro jejich reakci na biotické a abiotické vlivy. Genetická diverzita je považována za předpoklad

přizpůsobivosti a dalšího vývoje populace (např. Avise and Hamrick, 1996, Reed and Frankham, 2003, Hedrick, 2001).

Genetická diverzita se běžně vyjadřuje jako heterozygotnost, průměrný počet alel na lokus nebo průměrný podíl polymorfních lokusů (Hedrick, 2005), podrobněji v kapitole 1.2.3 Ukazatelé genetické diverzity. Lze ji odhadnout z několika různých typů genetických markerů (Vignal *et al.*, 2002, Vendramin and Hansen, 2006).

Řada faktorů přispívá k vysoké úrovni genetické diverzity, která se obvykle nachází v populacích lesních stromů (White, Adams and Neale, 2007):

Velikost populace

Mnoho lesních stromů se vyskytuje na velkých stanovištích a mají možnost se více či méně nepřetržitě šířit do dalekých oblastí. Velká velikost populace snižuje citlivost populací k náhodnému genetickému driftu, který vede ke ztrátě genetické diverzity uvnitř populace a ke zvýšení diverzity mezi populacemi. Hamrick, Godt a Sherman-Broyles, (1992), zjistili, že velikost geografického rozsahu druhu byla nejlepším prediktorem úrovně genetické variace v rámci populace.

Průměrná genetická diverzita je vysoká u velké většiny druhů stromů bez ohledu na jejich geografický rozsah. Pouze u druhů s velmi malými disjunkčními populacemi bude pravděpodobně diverzita snížena, a pouze pokud je velikost populace malá po mnoho generací (White, Adams and Neale, 2007). Ve vzácných případech je genetická diverzita malá u druhů s širokým geografickým rozsahem a velkými populacemi z důvodu jedné nebo více událostí extrémního rozsahu, ke kterým došlo v jejich nedávné historii.

Outcrossing

Vysoká úroveň outcrossingu (tj. spojení mezi nepříbuznými jedinci) je zvláště důležitá pro udržení genetické rozmanitosti v populacích. Outcrossing podporuje heterozygotnost a udržování recesivních alel, které by jinak mohly být vystaveny procesu selekce (výběru) (Ward *et al.*, 2005). Kromě toho, rozmnožování mezi heterozygotními jedinci vede ke genetické rekombinaci a vytváření velkého množství různých genotypů v rámci potomků. Například u mnoha lesních dřevin dochází v důsledku outcrossingu k vyšší produkci semen, většímu přežití, vyššímu růstu a vyšší

produktivité. Potomstvo u křížených stromů je obvykle podstatně větší a lépe prospívá i během vývoje porostu.

Opakem outcrossingu je inbreeding. Termín inbreeding označuje páření mezi geneticky příbuznými jedinci včetně samooplození. Inbreeding vede u většiny druhů k poklesu kondice v důsledku nárůstu homozygotních genotypů se škodlivými alelami. Západní červený cedr se jeví jako výjimka z tohoto pravidla: bylo zjištěno, že jeho míra samoopylování je relativně vysoká jak v přirozené, tak v umělé populaci, ale nebyla stanovena téměř žádná inbrední deprese (Russell, Burdon and Yanchuk, 2003).

Dlouhověkost (longevity)

Stromy jsou dlouhověké s dlouhou dobou nástupu plodnosti a následně produkcí semen. Z tohoto důvodu jsou méně často vystaveny potenciálním populačním slabým místům během reprodukce (buď v důsledku omezené doby reprodukce nebo špatného přežití potomků) než je tomu u druhů s krátkými životními cykly (Hamrick, 2004). Protože jednotlivci mohou žít dlouho, stanoviště mohou obsahovat skupiny různých věkových tříd. Starší skupiny se mohou lišit geneticky od mladších skupin, protože prostředí (a tím i režimy selekce, výběru) se lišilo během jejich příslušných životních období, nebo se liší z důvodu náhodných změn. Proto je souhrnná genetická diverzita při posouzení napříč všemi skupinami vyšší.

Dlouhověkost stromů souvisí i s nahromaděním většího množství mutací na každou generaci v porovnání s rostlinami s krátkým životním cyklem (Ledig, 1986).

Migrace mezi populacemi (genový tok)

Podle Endlera, (1977), je genový tok proces, při kterém dochází k přesunu genů mezi populacemi. Genový tok se uskutečňuje pomocí migrace, což je pohyb jedinců mezi populacemi. Migrace přispívá k udržování genetické rozmanitosti v populacích dvěma způsoby (Sauer, 1988): (1) přispíváním nových genetických variant, a (2) vyvažováním ztráty variability v důsledku genetického driftu nebo selekce. Tok genů v lesních stromech je z velké části dosažen pohybem pylu nebo semen z jedné populace do druhé. Šíření zlomených větví řekami nebo potoky nebo během záplav také přispívá k toku genů u druhů, které se snadno množí zakořeněním stonků.

S jednoznačnou identifikací původu a určení toku genů mezi populacemi bez informací o jejich přímém pohybu nejvíce napomáhá v současné době použití molekulárně

genetických markerů (Hedrick, 2005), podrobněji viz kapitola 1.3.1 Genetické markery. Využití markerů je výhodné tam, kde je obtížné odhadnout tok genů, protože migranti se těžko identifikují, nebo zanechávají méně potomků, než jedinci, kteří se nepohybovali, nebo zůstávají krátce, ale přesto se páří.

V semenných sadech lesních stromů je snadnější určit tok genů, protože stromy jsou přisedlé a sledovaný tok genů je omezen pouze na jeden směr: od původu externího zdroje pylu do semenných sadů. Genotypizace všech kandidátských samčích rodičů v sadu a přiřazení potomků (semenných plodin) jednomu z kandidátských otců umožňuje oddělit samčí gamety pocházející ze stromů v sadu od gamet pocházejících z externích zdrojů. Tok genů do semenného sadu z neselektovaného pylu je známý jako kontaminace pyly a vážně ovlivňuje genetickou kvalitu semenných plodin (Adams and Birkes, 1989). Úroveň kontaminace pylem závisí na druhu, jeho způsobu reprodukce, reprodukční fenologii rodičů v sadech i mimo ně, velikosti semenného sadu, stupni izolace a skutečných podmínkách prostředí. Dosud bylo u mnoha druhů hlášeno velké množství studií kontaminace pylem, jejichž míra se pohybovala od téměř 0 (El-Kassaby and Ritland, 1986) až do 90 % (Fast, Dancik and Bower, 1986, Kaya, Isik and Adams, 2006). Na druhé straně další příspěvky rodičů z kontaminace pyly obvykle zvyšují genetickou rozmanitost semenných plodin (Wheeler and Jech, 1986). Je-li kontaminace vysoká, může se diverzita buď zvýšit, nebo snížit v závislosti na genetických vlastnostech zdrojové populace (Adams and Kunze, 1996).

Vzhledem k tomu, že kontaminace pylem ovlivňuje pouze samčí složku reprodukčního úspěchu, polovina všech genů bude pocházet od rodičů v sadech, a to i pod 100 % mírou kontaminace. Ačkoli je kvantifikace kontaminace pylem v sadech klonálních semen relativně přímá pomocí analýzy otcovství z molekulárně genetických markerů, v semenných sadech sazenic je to relativně obtížnější kvůli až řádově vyššímu počtu genotypů. Použití vysoce polymorfních genetických markerů (Brondani *et al.*, 1998) umožňuje s vysokou jistotou odvodit závěry o otcovství (Chaix *et al.*, 2003), a navíc lze očekávat, že skenování v celém genomu pomocí jednonukleotidových polymorfismů plně eliminuje problém velké velikosti rodičovské populace.

Bilancující selekce

Bilancující selekce vede k udržení genetických polymorfismů v populacích, včetně výhody nebo převahy heterozygotů (Snustad and Simmons, 2009). Z tohoto důvodu bilancující selekce je též nazývána jako heterozygotní výhoda.

Lesní stromy zaujímají prostředí, která jsou extrémně heterogenní v prostoru i čase. Například změny půdní vlhkosti a úrodnosti, drsnosti a zastínění povrchu a přítomnost chorob, predátorů a konkurentů se vyskytují na velmi krátké vzdálenosti v rámci lokality a mají hluboký vliv na přežití sazenic a následný růst stromů (Campbell, 1979). Pokud jsou v různých mikrohabitátech v rámci populací upřednostňovány různé genotypy, teorie naznačuje, že výsledná selekce může vést ke stabilní genetické diverzitě uvnitř populace v průběhu času, i když dochází k rozsáhlému prolínání mezi genotypy z různých mikrohabitů (Dickinson and Antonovics, 1973).

Meziroční výkyvy počasí a změny na stanovištích mohou během vývoje porostu prospívat různým genotypům v různých obdobích, což vede ke genetické diferenciaci mezi skupinami věkových tříd v rámci stejného porostu. Proto také dočasná heterogenita prostředí může vést k selekci zvyšující rozmanitost (Hedrick, Ginevan and Ewing, 1976).

Rozsah, v jakém bilancující selekce přispívá k celkové genetické diverzitě v rámci populací lesních stromů, je obtížné kvantifikovat kvůli neschopnosti oddělit její účinky od jiných faktorů podporujících diverzitu, jako je migrace mezi populacemi a systémy křížového rozmnožování (White, Adams and Neale, 2007). Nicméně dvě pozorování podporují závěr, že bilancující selekce má významnou roli při udržování genetických variací v populacích. Za prvé, velká reprodukční schopnost lesních stromů umožňuje intenzivní selekci, která působí při nahrazování stromů z jedné generace na druhou. Za druhé, když porosty v místní oblasti zaujímají prostředí, která jsou podstatně odlišná, adaptivní genetická variace mezi porosty může být rozsáhlá, i když je tok genů mezi porosty silný.

Klonové sady lesních stromů jsou zranitelné vůči škodlivým útokům škůdců (Kleinschmit *et al.*, 1993). Přítomnost genetické diverzity v populacích zvyšuje pravděpodobnost, že alespoň někteří jedinci jsou odolní vůči zamoření škůdci nebo vůči poškození v důsledku klimatických extrémů, které by jinak mohly zcela zničit populaci pouze s jedním nebo několika málo genotypy.

1.2.3 Ukazatelé genetické diverzity

Základními ukazateli genetické diverzity jsou:

Očekávaná heterozygotnost (H_e), nebo též genetická diverzita v rámci populace, se vypočítává pro každý lokus zvlášť. Vyjadřuje zastoupení očekávaných heterozygotů ve zkoumané populaci na základě alelických frekvencí za předpokladu, že platí Hardy-Weinbergův zákon (Baker, 2000, Smouse, P. Peakall, 2015). H_e je v rozsahu 0 – 1, ale může být vyjádřena i v procentech. Vyšší hodnoty H_e vyjadřují vyšší diverzitu alel. H_e se získá podle následujícího vzorce:

$$H_e = 1 - \sum_i p_i^2,$$

kde p_i je frekvence alely i a index i iteruje přes všechny možné alely v daném lokusu.

Pozorovaná heterozygotnost (H_o) je dána podílem heterozygotních jedinců v určitém lokusu (N_{Hets}) z celkového počtu pozorovaných jedinců N (Paule, 1992, Smouse, P. Peakall, 2015). H_o se pohybuje v rozpětí od 0 do 1. H_o se vypočítá z následujícího vzorce:

$$H_o = \frac{N_{Hets}}{N}.$$

Efektivní počet alel (N_e) vyjadřuje odhad, kolik alel v populaci je rovnoměrně zastoupených. Je tím větší, čím rovnoměrněji jsou alely zastoupeny (Smouse, P. Peakall, 2015). N_e se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$N_e = \frac{1}{\sum_i p_i^2}.$$

Fixační index (F) vyjadřuje zastoupení homozygotních a heterozygotních jedinců v populaci na konkrétních polymorfních lokusech (Smouse, P. Peakall, 2015). Fixační index se vyskytuje v rozsahu hodnot -1 až +1. Hodnota -1 udává, že v populaci jsou pouze heterozygoti, hodnota +1 říká, že v populaci se vyskytují jen homozygoti. Fixační index se získá pomocí následujícího vzorce:

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e}.$$

Genetická struktura populací se nejčastěji určuje pomocí Wrightových F -statistik. Tyto statistiky umožňují kvantifikovat rozdělení genetické diverzity (~heterozygotnosti)

uvnitř a mezi populacemi. Níže uvádím podrobněji výpočty jednotlivých ukazatelů (Avice, 2004):

Stupeň inbreedingu (F_{IS}) ukazuje převahu heterozygotních nebo homozygotních jedinců v hodnocených populacích (může jít i pouze o jednu populaci) (Smouse, P. Peakall, 2015). F_{IS} se pohybuje v rozsahu od -1 do +1.

$$F_{IS} = \frac{(\overline{H_e} - \overline{H_o})}{\overline{H_e}},$$

kde $\overline{H_e}$ je průměrná hodnota očekávané heterozygotnosti přes všechny hodnocené populace a $\overline{H_o}$ je průměrná pozorovaná heterozygotnost přes všechny hodnocené populace.

Odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (F_{IT}) hodnotí souhrnně všechny sledované populace, udává převahu homozygotních nebo heterozygotních populací. F_{IT} je definován dle (Smouse, P. Peakall, 2015) jako:

$$F_{IT} = \frac{(H_t - \overline{H_o})}{H_t},$$

kde H_t je celková očekávaná heterozygotnost ve všech hodnocených populacích a $\overline{H_o}$ je průměrná pozorovaná heterozygotnost přes všechny hodnocené populace. H_t je definována následujícím vztahem:

$$H_t = 1 - \sum_i \bar{p}_i^2,$$

kde \bar{p}_i je průměrná frekvence i -té alely přes všechny hodnocené populace.

Stupeň populační diferenciace (F_{ST}) je nejčastěji popisován jako rozptyl alelových frekvencí mezi populacemi v závislosti na průměrné pozorované frekvenci (Avice, 2004). Pokud by byly všechny hodnocené populace v Hardy-Weinbergově rovnováze se stejnými frekvencemi alel, F_{ST} by bylo rovno nule. F_{ST} je definován vztahem:

$$F_{ST} = \frac{(H_t - \overline{H_e})}{H_t},$$

kde $\overline{H_e}$ je průměrná očekávaná heterozygotnost přes všechny hodnocené populace a H_t je celková očekávaná heterozygotnost ve všech hodnocených populacích.

Počet migrantů v populaci (Nm) je hlavním ukazatelem genového toku, který je jeden z hlavních činitelů udávajících genetickou strukturu populací (Smouse, P. Peakall, 2015). Nm se vypočítá pomocí následujícího vztahu:

$$Nm = \frac{[(1/F_{ST}) - 1]}{4},$$

kde F_{ST} představuje stupeň populační diferenciace.

Shannonův informační index vyjadřuje množství informace o zastoupení alel obsažených v daném lokusu a hodnocené populaci, tedy množství informace, které lze získat uspořádáním existujících alel v populaci v různých pořadích. Nabývá hodnot ≥ 0 . Vypočítá se dle vztahu:

$$^sH = - \sum_i p_i \ln p_i,$$

kde p_i je frekvence alely i a index i iteruje přes všechny možné alely v daném lokusu. Například pro jedinou alelu nacházející se v hodnocené populaci u všech vzorků vyjde informační index = $-(1 \cdot \ln 1) = 0$. Obecně lze tedy říci, že populace s vyšším informačním indexem jsou více diverzifikovány.

Genetická vzdálenost mezi populacemi udává, jak moc si jsou porovnávané populace geneticky podobné. Je vypočítána pomocí alelických frekvencí a nejčastěji se vypočítává dle Nei (1972). Nabývá hodnot větších než nula. Vypočítá se podle následujícího vztahu:

$$D = -\ln(I),$$

kde D je Neiova genetická vzdálenost a I je Neiova genetická identita:

$$I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$$

$$J_{xy} = \sum_i p_{ix} p_{iy}$$

$$J_x = \sum_i p_{ix}^2$$

$$J_y = \sum_i p_{iy}^2$$

kde p_{ix} a p_{iy} jsou frekvence i -té alely v populacích x a y . Pro více lokusů se J_{xy} , J_x a J_y vypočítají jako součet přes všechny lokusy a alely dělený počtem lokusů. Tento průměr se pak použije k výpočtu I .

Efektivní velikost populace

Nejčastěji je genetická rozmanitost aproximována efektivní velikostí populace (Wright, 1931). To je koncept, který široce používají kvantitativní a populační genetici a který je součástí většiny šlechtitelských programů pro zvířata a rostliny.

Efektivní velikost populace je abstraktní pojem představující velikost ideální populace, ve které by genetické procesy (např. genetický drift) probíhaly stejnou rychlostí jako v přirozené populaci (Crow and Kimura, 1970). Tento pojem byl vyvinut za účelem zohlednění několika možných faktorů ovlivňujících změny frekvencí alel přenášených do další generace (Wright, 1969). Jinými slovy, efektivní velikost populace je skutečný počet jedinců v populaci, kteří se účastní rozmnožování (Begon, Mortimer and Thompson, 1996, Krebs, 2002). Efektivní velikost populace se tedy může velice odlišovat od celkové velikosti populace (celkového počtu jedinců v populaci).

Patří sem situace, kdy:

- (i) rozmnožovací jedinci představují pouze část celé populace, protože někteří jedinci nedosáhli pohlavní dospělosti nebo se nezúčastnili páření,
- (ii) existuje nerovný počet samčích a samičích jedinců,
- (iii) rodičovské gametické příspěvky se liší (tj. mezi rodiči je nerovný reprodukční úspěch),
- (iv) v prostoru existují prostorové a / nebo časové rozdíly velikosti populace a
- (v) jednotlivci, kteří se rozmnožují, jsou příbuzní.

1.3 Molekulárně genetické metody ke zjišťování genetické diverzity

1.3.1 Genetické markery

Genetický marker je jakýkoliv znak v rámci genetického profilu jedince. Genetické markery lze použít ke studiu genetiky organismů, včetně stromů, na úrovni jednotlivých genů (White, Adams and Neale, 2007). Genetické markery mohou být odvozeny z

jaderných nebo organelových sekvencí; například diagnostické markery odvozené z chloroplastů nebo mitochondrií (Sutton, Flanagan and El-Kassaby, 1991, Sutton *et al.*, 1991, Demesure, Sodzi and Petit, 1995), byly v závislosti na důkazech o jejich mateřské dědičnosti u druhu použity ke sledování historie kolonizace krytosemenných lesních dřevin a jehličnanů (Petit *et al.*, 2002, Gamache *et al.*, 2003).

Podskupinou genetických markerů jsou genové markery, tedy znaky, které jsou pod genetickou kontrolou a mají pouze malý počet genů (nejlépe pouze jeden). Genetické markery se používají například k identifikaci původu a určení toku genů mezi populacemi, k identifikaci jedinců, studiu dědičných chorob nebo ve fylogenetice. Například analýza markerů na mitochondriální DNA umožňuje sledovat vývoj až tisíce let do minulosti po mateřské linii.

Genetické markery můžeme rozdělit do několika skupin (White, Adams and Neale, 2007):

1) morfologické markery - určují vnější vlastnosti stromu (jako například tvar nebo barva listů a květů, apod.). Tyto vlastnosti jsou u většiny lesních dřevin ovlivněny vzájemným působením několika genů, a proto tyto markery nejsou příliš použitelné.

2) biochemické markery – mezi jedny z neznámější patří monoterpeny a alozymy. Monoterpeny jsou podskupinou terpenoidních látek, které se nacházejí v pryskyřicích a esenciálních olejích rostlin (Kozłowski and Pallardy, 1979). V minulosti byly alozymy nejdůležitějším typem genetických markerů používaných v lesnictví (Conkle, 1981, Adams *et al.*, 1992). Nevýhodou těchto biochemických markerů je jejich nižší rozlišovací schopnost.

3) molekulární markery – zabývají se pořadím nukleotidů v DNA. Konkrétněji může například jít o známou sekvenci DNA, kterou lze jednoduše identifikovat, a která není závislá na podmínkách prostředí. Molekulární markery udávají informaci o genotypu jedince a lze tedy podle nich identifikovat klon. Molekulární markery nám umožňují studovat distribuci a rozsah genetických variací v rámci druhů a mezi druhy (Porth and El-Kassaby, 2014). Markery mají různé aplikace v rostlinných vědách. Obvykle se doporučuje kombinace různých typů markerů, aby bylo zajištěno přesnější posouzení rozsahu vnitropopulační a mezipopulační genetické diverzity.

Některé běžně používané typy molekulárních markerů:

- RFLP (restriction fragment length polymorphism). Analyzuje se pomocí hybridizace DNA-DNA, podrobněji o RFLP níže;
- mikrosatelity (Simple Sequence Repeats – SSRs), podrobněji o SSR níže;
- AFLP (amplified fragment length polymorphism);
- celogenomové markery vyskytující se napříč celým genomem, například SNP (Single Nucleotide Polymorphism; podrobněji v kapitole 1.3.3 Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) u třešně ptačí), HybSeq, RADseq. Analyzují se pomocí sekvenování DNA.

RFLP

RFLP byl prvním rozšířeným markerem pro analýzu DNA a používá se hojně i v současnosti. Rozštěpení molekuly DNA se děje pomocí specifických enzymů, které se nazývají restriční endonukleázy. Rozštěpené části DNA mají různou délku, kterou lze detekovat pomocí genové elektroforézy, a využít jako marker. RFLP byl jako první využíván k mapování genomu. Nevýhodou RFLP je, že potřebuje relativně velké množství DNA. Z tohoto důvodu se v dnešní době více používají metody založené na PCR.

Mikrosatelity

Při analýzách populační struktury se v posledních letech nejvíce používá mikrosatelitů neboli SSR markerů. Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA s opakujícím se výskytem stejných kombinací nukleotidů (Li *et al.*, 2002), nejčastěji dlouhých 2-5 bází (Schmidt and Heslop-Harrison, 1996). Často bývají používány mikrosatelitní sekvence dinukleotidové (kde se nejčastěji vyskytuje CA – cytosin, adenin). Tyto mikrosatelitové sekvence se vyskytují na mnoha místech genomu a počet těchto opakujících se sekvencí vykazuje velkou individuální variabilitu. Díky značné variabilitě je možné rozlišit i značně příbuzné jedince a definovat mezi nimi základní příbuzenské vztahy (sourozenecké či rodičovské) a určit vzájemnou míru příbuznosti jedinců ve studované skupině. Mikrosatelity jsou kodominantní, a tedy můžeme rozlišit, zda jde o homozygota nebo heterozygota.

1.3.2 Využití mikrosatelitových markerů u třešně ptačí

Mikrosatelitových markerů se využívá k prověření klonové identity u lesních dřevin. Zejména velké uplatnění nacházíme u prověření klonové identity zdrojů reprodukčního

materiálu (identifikace jedinců). Aby bylo možné získat ze zkoumaných vzorků optimální informace o genetické proměnlivosti studovaných jedinců, je potřebné vyhledat markery, které vykazují vysoký polymorfismus.

Pro ověřování klonové identity a polymorfismu třešně ptačí byly zvoleny jako DNA markery jaderné mikrosatelity nSSR (nuclear simple sequence repeats). Mikrosatelitové lokusy patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu, kdy je polymorfismus dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu nukleotidů. Ke zjištění těchto lokusů nám napomáhá polymerázová řetězová reakce (PCR) s primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s vybraným mikrosatelitovým lokusem. Mikrosatelitové markery již byly široce použity v mnoha genetických výzkumech například pro sledování genetické diverzity, analýzy toku genů, genového mapování, identifikace jedinců, určení rodičovství apod. (Pfeiffer, Olivieri and Morgante, 1997, Oliveira *et al.*, 2006).

Nejprve se začaly k charakterizaci divokých i kulturních třešní využívat mikrosatelitové markery původně navržené pro *Prunus persica* (Schueler *et al.*, 2003). Mikrosatelitové markery byly již vyvinuty i pro kulturní kultivary třešně (Clarke and Tobutt, 2003).

U třešní byly mikrosatelitové markery využity pro identifikaci jedinců a kultivarů např. autory Dirlewanger *et al.*, (2002), Schueler *et al.*, (2003), Jarni, De Cuyper and Brus, (2012). Pro populační studie tohoto druhu je využili Vaughan and Russell, (2004), Schueler *et al.*, (2003) a Testolin *et al.*, (2000).

Z důvodu časových a finančních úspor při provádění DNA analýz u velkých souborů vzorků byly také postupy získávání PCR produktů a odečítání jejich velikostí při fragmentační analýze zaměřeny na seskupování vybraných mikrosatelitových lokusů do multiplexů, kdy probíhají amplifikace a fragmentační analýzy několika lokusů najednou. Například Vaughan and Russell, (2004), využili ve své práci multiplexy PCR pro třešeň ptačí, kde konkrétně použili následující lokusy pro multiplex A: EMPaS01, EMPaS10, S11, S12, S14 a pro multiplex B: EMPaS02, EMPaS06, EMPaS004, 005, 015 a 018. Dále v práci (Jarni, De Cuyper and Brus, 2012), byly použity dva multiplexy PCR pro třešeň ptačí, konkrétně multiplex A zahrnoval lokusy: EMPaS10, EMPaS12, a EMPaS14 a multiplex B: EMPa4, EMPa5, EMPaS2, EMPaS6.

1.3.3 Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) u třešně ptačí

Dalším genetickým markerem využitým i u třešně ptačí je jednonukleotidový polymorfismus, často označovaný jako SNP (z anglického Single Nucleotide Polymorphism). Jde o záměnu v jediném nukleotidu, která se vyskytuje na daném místě v genomu, a v populaci je zastoupena alespoň v určité míře (např. > 1%) (Snustad and Simmons, 2009). Jednonukleotidové polymorfismy se vyskytují v kódujících oblastech genů, nekódujících oblastech genů, ale i v oblastech mezi geny. SNP jsou hojně zastoupeny v celém genomu (Kato *et al.*, 2014). SNP poskytují genetické markery s vysokou hustotou, které by mohly potenciálně poskytnout lepší rozlišení (Gupta, Roy and Prasad, 2001). Vzhledem k tomu, že se staly dostupné vysoce účinné platformy pro genotypování SNP, umožňuje nám to urychlit šlechtění lesních dřevin (Grattapaglia and Resende, 2011, Resende *et al.*, 2012). Fernández a Martiet *et al.*, (2012), uvedli, že SNP měly větší význam, než markery SSR při hodnocení genetické příbuznosti kultivarů třešní. Další práce zabývající se SNP markery u třešně referuje strukturní analýzu 210 kultivarů a krajových odrůd z 16 zemí (Campoy *et al.*, 2016).

1.4 Semenné sady

Podle Schreiner, (1961), byly první semenné sady vytvořeny již v roce 1880 nizozemskými kolonisty na Jávě k šíření původních rostlin, chinovníku lékařského (lat. *Cinchona officinalis*). Použití tohoto pojetí se rozšířilo až o sedmdesát let později. Od této doby existují důkazy o podstatném vylepšování rostlin prostřednictvím výběru a šlechtění (Zobel *et al.*, 1958, Schreiner, 1950). Kromě genetického zlepšení jako takového se semenné sady také používají k produkci osiva, které je dobře přizpůsobeno specifickému prostředí (Nanson, 1972). Moderní šlechtění stromů, jak jej dnes známe, začalo až v padesátých letech dvacátého století (van Buijtenen, 1984).

Toto významné zpoždění mělo dva hlavní důsledky: zaprvé ponechalo většinu populace lesních stromů převážně bez genetické manipulace, a za druhé, umožnilo šlechtitelům stromů využívat znalostí a zkušeností za tu dobu získaných z jiných oblastí (Namkoong, Kang and Brouard, 1988).

1.4.1 Definice semenného sadu a souvisejících odborných pojmů

Odborné pojmy semenný sad, klony a rodiče rodiny definuje Zákon č. 149/2003 Sb., (2003) takto:

- Semenný sad v České republice je definován jako „účelová výsadba selektovaných klonů nebo reprodukčního materiálu získaného z rodiče rodiny, který je izolován nebo obhospodařován tak, že sprášení pylem pocházejícím z rostlin nacházejících se mimo semenný sad je vyloučeno nebo omezeno, pro generativní způsob reprodukce“.
- Klony jsou definovány jako „skupina vegetativních potomků (ramety) získaná z jediného výchozího jedince (ortet) vegetativním množením, například řízkováním, mikrovegetativním množením, roubováním, hřížením nebo dělením“.
- Rodič rodiny je „strom určený k produkci potomstva kontrolovaným nebo volným opylováním určeného jednoho samičího rodiče pylem jednoho samčího rodiče nebo pylem více určených nebo neurčených samčích rodičů, pro generativní způsob reprodukce“.

1.4.2 Typy semenných sadů

Semenné sady lze rozdělit do kategorií podle generace šlechtění a / nebo způsobu rozmnožování rodičovských stromů - jádrové nebo klonové sady (Eriksson, Ekberg and Clapham, 2006).

Sady 1. a vyšší generace

Semenné sady první generace jsou tvořeny rodiči vybranými na základě jejich fenotypových vlastností z lesních porostů nebo z neupravených plantáží (tj. zakladatelské populace). Genetická hodnota zakladatelské populace je do značné míry neznámá. Tyto sady mohou být vylepšeny odstraněním neperspektivních rodičů na základě získaných výsledků z testování potomků (tj. zpětný výběr). Jak se šlechtitelské programy postupně zdokonalují, sady vyšších generací se zakládají pomocí jednotlivců z kontrolovaných křížení mezi elitními genotypy nebo s jejich opylovanými potomky s následnou rekonstrukcí otcovského původu k získání zvýšené genetické hodnoty (tj. výběr vpřed) (El-Kassaby and Lstibůrek, 2009, El-Kassaby *et al.*, 2011).

V semenných sadech 1. generace je předmětem sledování a hodnocení řada kritérií. Jde v první řadě o evidenci úhynu roubovanců, včetně stanovení příčiny úhynu. Fenologii kvetení, fruktifikaci a vlastnosti osiva je třeba sledovat několik let po sobě. Jednorázově je vhodné posoudit homogenitu klonů, resp. ramet semenného sadu pomocí genových markerů na základě genetického screeningu reprezentativního počtu klonů.

U semenných sadů založených pouze na základě fenotypového výběru však nelze vzhledem k částečnému ovlivnění fenotypových znaků prostředím očekávat vysokou míru genetické odezvy. Pro zvýšení šlechtitelského efektu je proto nutno získat informace o genetické kvalitě klonů zastoupených v semenném sadu. Hlavní nástroj pro tento účel nejčastěji představují experimentální testy potomstev těchto klonů. Nová výsadba složená z pozitivně ověřených klonů se pak stává další šlechtitelskou populací, tj. semenným sadem 2. generace. V zemích s nejvyspělejším šlechtěním lesních dřevin se lze setkat i se semennými sady 6. generace. Zvláštním případem jsou semenné sady 1,5. generace, které obsahují klony vybrané na základě testování polosesterských potomstev klonů zastoupených v sadu 1. generace, u nichž známe pouze mateřského rodiče.

Jádrové sady

Jádrové semenné sady jsou sady vytvořené z generativních potomků výběrových stromů. Semena jsou získána z polosesterských potomstev (z volného opylení) nebo plnosesterských potomstev (z kontrolovaného opylení). Získat semena z polosesterských potomstev je výrazněji snazší, ale semena z plnosesterských potomstev jsou efektivnější (oba rodiče jsou výběrové stromy). Výhodou jádrových sadů jsou nižší náklady a kratší doba na založení (Kobliha and Lstibůrek, 2006). Jádrových semenných sadů je celosvětově mnohem méně než klonových sadů. V ČR se vyskytuje pouze jeden jádrový sad, a to sad borovice pokroucené.

Zvláštním případem jádrových semenných sadů jsou tzv. „polycross seed orchards“, které jsou vytvořeny z potomstev rodičovských stromů, kde rodičovské stromy byly sprášeny pylovou směsí z vybraných otcovských jedinců (Plomion *et al.*, 2001).

Klonové sady

Klonové (nebo též klonální) semenné sady se zakládají vegetativním způsobem, například z roubů (ramet), které jsou kopií výběrových rodičovských stromů. Výhodou klonových sadů je, že při vegetativním množení se uchovává genetická identita, ale i stádium ontogenetického vývoje množení stromu (Kobliha and Lstibůrek, 2006). To má za následek dřívější počátek kvetení a úrody, než v sadech jádrových. Převážná většina semenných sadů je klonových a v průměru se skládají z 30–50 různých rodičů (Funda and El-Kassaby, 2012).

Dále podle funkce dělíme klonové sady na:

- 1) produkční – se záměrem o maximální tvorbu semen,
- 2) udržovací – snaha o zachování genetického genofondu,
- 3) klonové archivy – podobné sadům udržovacím, ale se snahou o konzervování genofondu výběrových stromů,
- 4) hybridizační – s cílem intenzivního šlechtění na základě křížení.

1.4.3 Design a rozmístění ramet v sadu

Výběr klonů, návrh a samotné rozmístění ramet v sadu jsou velmi důležitým krokem při zakládání semenného sadu, který ovlivní budoucí kvalitu reprodukčního materiálu. Již bylo vyvinuto a implementováno velké množství návrhů semenných sadů (Gietrych,

1975, Bell and Fletcher, 1978, El-Kassaby, 2003, El-Kassaby *et al.*, 2007). Tyto návrhy jsou založeny na předpokladu, že účinnost opylování je funkcí vzdálenosti, a tak většina genetické výměny nastává mezi sousedními rametami, zatímco mezi těmi vzdálenějšími klesá. Výsadba ramet se provádí v pravidelném sponu a v takovém rozmístění, aby docházelo k dobrému vzájemnému opylení jedinců různých klonů, a zároveň bylo vyloučeno nebo podstatně omezeno sprášení i pylem pocházejícím ze stromů mimo semenný sad. Jelikož se sady pokročilé generace staly normou, bylo nutné začít uvažovat o otázce příbuznosti a zahrnout ji jako další vstupní faktor pro návrh nových sadů. Řešení poskytl návrh minimálního inbreedingu semenného sadu (Lstibůrek and El-Kassaby, 2010).

V současné době se nejčastěji používají následující návrhy semenných sadů:

- Computer Organized Orchard Layouts (COOL): tento design vytvořili Bell a Fletcher, (1978), využívá se v sadech nepravidelného tvaru.
- Randomized, Replicated, Staggered Clonal-Row (R2SCR) (El-Kassaby *et al.*, 2014): tento program je interaktivní a vhodný pro jakoukoli velikost a konfiguraci sadu, pojme libovolný počet klonů, které jsou alokovány do řádků. Dále navrhuje modifikovaný design klonovaných řádků, který replikuje, střídá a náhodně řadí řádky.
- Optimum Neighborhood Algorithm (ONA) (Chaloupková *et al.*, 2016): tento návrh je vhodné použít jak pro zakládání produktivních semenných sadů, tak i klonálních archivů ohrožených druhů, ale může doplňovat i stávající rozložení sadu.
- Minimum Inbreeding design (MI) (Lstibůrek and El-Kassaby, 2010): tento design se využívá v sadech vyšších generací, kde se nacházejí složité příbuzenské vztahy.
- IAPGA algoritmus (Improved Adaptive Parallel Genetic Algorithm), byl vyvinut v roce 2020 Yangem *et al.*, (2020). Jde o počítačový genetický algoritmus použitý pro minimalizaci inbreedingu v klonálních sadech. Algoritmus minimalizuje pravděpodobnost inbreedingu tím, že se snaží maximalizovat vzdálenosti v sadu mezi klony, které mají malou vzájemnou genetickou vzdálenost.

Očekává se, že jak se bude postupovat v šlechtění, budou návrhy semenných sadů i nadále velmi dynamické, aby mohli sadaři vyvážit své činnosti v oblasti pěstování plodin s požadovanými cíli.

1.4.4 Semenné sady třešně ptačí v České republice

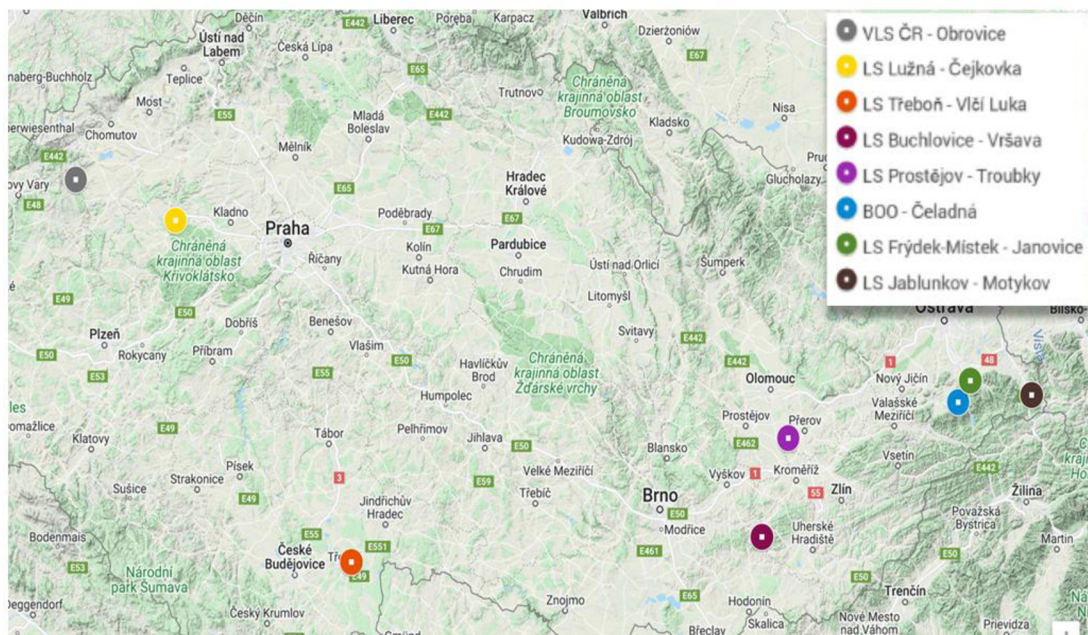
Podle zprávy (ÚHÚL, 2020) je aktuálně v České republice 9 uznaných a 2 registrované semenné sady třešně ptačí. Plocha uznaných semenných sadů třešně je 10,17 ha a plocha sadů registrovaných 2 ha. Z devíti uznaných sadů je 7 ve vlastnictví Lesů České republiky, s.p. (zdroj: <https://eagri.cz/public/app/uhul/ERMA2>), 1 sad ve vlastnictví Biskupství ostravsko-opavského a 1 sad ve vlastnictví Vojenský lesů a statků ČR, s.p. Přehled uznaných semenných sadů třešně ptačí udává Tabulka 1, včetně uvedení místního názvu, čísla uznané jednotky daného sadu, rokem založení, výměrou sadu a počtem klonů při založení sadu. Mapu uznaných semenných sadů třešně ptačí znázorňuje Obrázek 1.

Tabulka 1 Přehled uznaných semenných sadů třešně ptačí v ČR

Vlastník	Místní název	Číslo uznané jednotky	Založení	Výměra (ha)	Počet klonů
LS Buchlovice*	Vršava	CZ-3-3-TR-00192-36-2-Z	2005	0,45	60
LS Frydek-Místek*	Janovice	CZ-3-3-TR-0001-37-2-T	2006	0,94	52
LS Jablunkov*	Motykov	CZ-3-3-TR-00195-38-4-T	2006	0,5	43
BOO*	Čeladná	CZ-3-3-TR-152-38-4-T	1999	0,8	73
LS Prostějov*	Troubky	CZ-3-3-TR-158-37-2-M	2001	1	59
LS Lužná*	Čejkovka	CZ-3-3-TR-170-8-2-S	2002	1,13	61
LS Třeboň*	Vlčí luka	CZ-3-3-TR-00162-13-5-C	2000	1,23	37
VLS ČR	Obrovice	CZ-3-3-TR-00171-4-3-V	2002	1,25	28
LZ Konopiště	Loreta	CZ-3-3-TR-00001-10-3-S	-	0,62	40

LS lesní správa Lesů ČR, BOO je Biskupství ostravsko-opavské, VLS ČR jsou Vojenské lesy a statky ČR, *zdroj (Svoboda *et al.*, 2010)

Obrázek 1 Mapa uznaných semenných sadů třešně ptačí v ČR (vytvoreno pomocí Google maps)



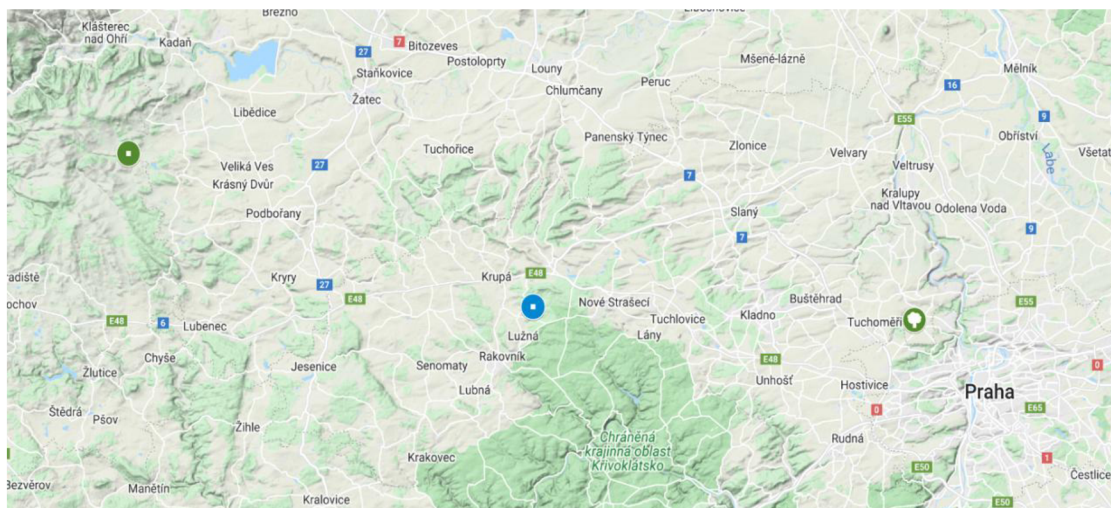
2 Metodika




V práci byla zpracována multilokusová data tří populací třešně ptačí, která byla pro tuto práci již dodána ve formě tabulky genotypů. Níže uvádím dostupné informace o původu vzorků, z nichž byla multilokusová data získána, a metodiku analýzy těchto dat.

2.1 Odběr materiálu

Zkoumaný biologický materiál třešně ptačí byl získán ze třech oblastí České republiky. První oblast se nachází ve středočeském regionu, konkrétně se jedná o semenný sad Lužná u Rakovníka „Čejkovka“ (GPS: 50,1484728, 13,78278). Druhá oblast se nachází v západočeském regionu, jedná se o semenný sad Obrovice (GPS: 50,2806747, 13,2027). Třetí oblast příměstské populace se nachází severozápadně od Prahy (přibližně v okolí GPS: 50,13738, 14,32861). Geografické rozmístění zájmových oblastí znázorňuje následující Obrázek 2.

Obrázek 2 Geografické rozmístění zájmových populací třešně ptačí (vytvoreno pomocí Google maps)



 semenný sad Obrovice,  semenný sad Čejkovka,  příměstská populace

Semenný sad Čejkovka je vzdušnou čarou vzdálen od příměstské populace 40 km.
Semenný sad Čejkovka je vzdušnou čarou vzdálen od semenného sadu Obrovice 44 km.
Semenný sad Obrovice je vzdušnou čarou vzdálen od příměstské populace 80 km

Celkem bylo analyzováno 158 vzorků třešně ptačí z uvedených sadů. Bližší informace o počtech odebraných vzorků v jednotlivých sadech bude uvedena v následujících kapitolách popisujících jednotlivé zkoumané semenné sady.

2.1.1 Semenný sad Lužná u Rakovníka „Čejkovka“

Tento semenný sad byl založen v roce 2002 na území LS Lužná LČR. Sad byl založen z roubovanců výběrových stromů, které byly identifikovány v porostech v LS LČR Křivoklát a LS LČR Nižbor. V semenném sadu bylo na počátku vysazeno celkem 343 jedinců od 61 klonů. V současné době je v sadu 58 klonů (klony 357, 360 a 362 se v sadu již nenacházejí). Tabulka 2 uvádí počet ramet na jednotlivý klon. Průměrný počet ramet na klon je 4,8 a směrodatná odchylka je 4,7. Sad byl vysazen s rozestupy 6 x 6 m v 16 řadách a 21 sloupcích. Rozloha sadu je 1,13 ha.

Tabulka 2 Počet ramet na klon v semenném sadu Čejkovka

Klon	Počet ramet	Klon	Počet ramet	Klon	Počet ramet	Klon	Počet ramet
336	5	351	2	369	2	384	2
337	2	352	4	370	3	385	1
338	1	353	13	371	1	386	1
339	18	354	4	372	14	387	1
340	3	355	3	373	18	388	6
341	3	356	2	374	7	389	17
342	3	358	10	375	2	390	2
343	2	359	6	376	1	391	4
344	10	361	4	377	2	392	5
345	8	363	4	378	2	393	14
346	2	364	1	379	2	394	12
347	2	365	4	380	3	395	12
348	2	366	4	381	1	396	10
349	2	367	9	382	1	397	12
350	2	368	1	383	2	398	8
Průměrný počet ramet na klon				4,8			
Směrodatná odchylka				4,7			

Semenný sad Čejkovka se nachází ve Středočeském kraji v nadmořské výšce 390 m n. m. Sad náleží do klimatického okrsku B2, který je mírně teplý, mírně vlhký, převážně s mírnou zimou. Průměrný roční úhrn srážek je 525 mm a průměrná teplota 7,7 °C. V roce 2007 byl tento semenný sad uznán jako zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu třešně ptačí s evidenčním číslem CZ-3-3-TR-170-8-2-S. Mapu a schéma semenného sadu Čejkovka zobrazuje Obrázek 3 a Obrázek 4.

Z tohoto semenného sadu bylo testováno 62 vzorků. Tyto vzorky reprezentovaly jedince, kteří zastupují jednotlivé klony v sadu a klony 351 a 379 byly v rámci ověření klonové identity odebrány ve dvou variantách.

Obrázek 3 Mapa semenného sadu Čejkovka (vytvořeno pomocí mapy.cz)



Obrázek 4 Schéma semenného sadu Čejkovka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	392	393	391		358	388	395	345	374	398	373	354	396	341	367	389	379	339	397	372	339	
2	380	365	340	355	336	361	353	347	363	352	339	364	397	359	369	383	346	344	396	373	367	
3		372	349	338	390	384	337	387	377	371	370	353	344	358	348	378	356	353	394	389	395	339
4	342	350		382	376	368	374	381	397	344	372	392	375	339	393	389	395	358	393	358	372	389
5	388	373	396	398	345	366	353	358	339	393		391	396	352	374	355	385	367	359	353	373	393
6	365	354	336	361	395	398	343	344	378	341	372	397	359	340	339	366	363	372		339	394	373
7	367	359	344	367	389	345	351	394	373			394	353	372	393		394	373	344	397	358	393
8	397	395	339	379	373	391	342			344	389	370	389	388	380	353	396	374	358	395	389	
9	366	372	374	355	358	398	352	392	397	337		354		373	367	345	343	389	393	394	339	
10	391	350	336		346	356	393	369	365	347	384	351	348	383	363	359	349	397	372	353	373	
11	392	375		353	336	377	395	372		388	339		361		395	344		339	394	395		
12	398		345	394	341	397			370		390		389	340	380	392	342		373	339	393	
13	388	339	396	353	374	373	367	393	395	394	345	373	372	398		389	366	372	374	372	389	
14	359	354	397	344	363	336	389	365	361	389		358	393	339	345	388	352	396	367	394	339	
15	396			367	353	344	358	386	373	339	393	395	394	373	396		398	395	353		373	
16	394	389	393		372		345	398	353	373	397	396	389				373	339		389	397	

2.1.2 Semenný sad Obrovce

Semenný sad Obrovce se nachází v Ústeckém kraji v nadmořské výšce 385 m n. m. Rozloha sadu je 1,25 ha. Klima je zde mírně teplé, náleží do klimatické oblasti MT4.

Tato oblast je charakteristická mírným a krátkým jarem, suchým až mírně suchým létem, mírným a krátkým podzimem a mírnou, teplou a suchou zimou. Průměrné teploty jsou -2 až -3 °C v lednu a 16 – 17 °C v červenci. Roční úhrn srážek dosahuje 500 – 750 mm. Sad byl založen v roce 2002 z roubov odebraných z výběrových stromů, které se nacházely v porostech Doupovských hor. Vysazeno bylo celkem 240 roubovanců od 28 klonů. Spon výsadby byl 7×6 m. Mapu a schéma semenného sadu Obrovice zobrazuje Obrázek 5 a Obrázek 6.

Z tohoto semenného sadu bylo testováno 38 vzorků. Vzorky reprezentovaly jedince, kteří zastupují jednotlivé klony v sadu a některé klony byly v rámci ověření klonové identity odebrány i ve dvou variantách, konkrétně: 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 14A, 14B, 17A, 17B, 20A, 20B, 21A, 21B, 23A, 23B, 25A, 25B, var1 a var2. Počet ramet na klon v sadu uvádí Tabulka 3. Průměrný počet ramet na klon je 6,9 a směrodatná odchylka 2,9.

Tabulka 3 Počet ramet na klon v semenném sadu Obrovice

Klon	Počet ramet	Klon	Počet ramet	Klon	Počet ramet
1	9	12	5	22	10
2	8	13	9	23	5
3	6	14	7	24	4
4	12	15	8	25	5
5	4	16	9	26	7
6	8	17	3	27	4
7	9	18	7	28	8
8	12	19	9	30	9
9	7	20	8	-	-
11	5	21	10	-	-
Průměrný počet ramet na klon				6,9	
Směrodatná odchylka				2,9	

Obrázek 5 Mapa semenného sadu Obrovice (vytvořeno pomocí mapy.cz)



Obrázek 6 Schéma semenného sadu Obrovice

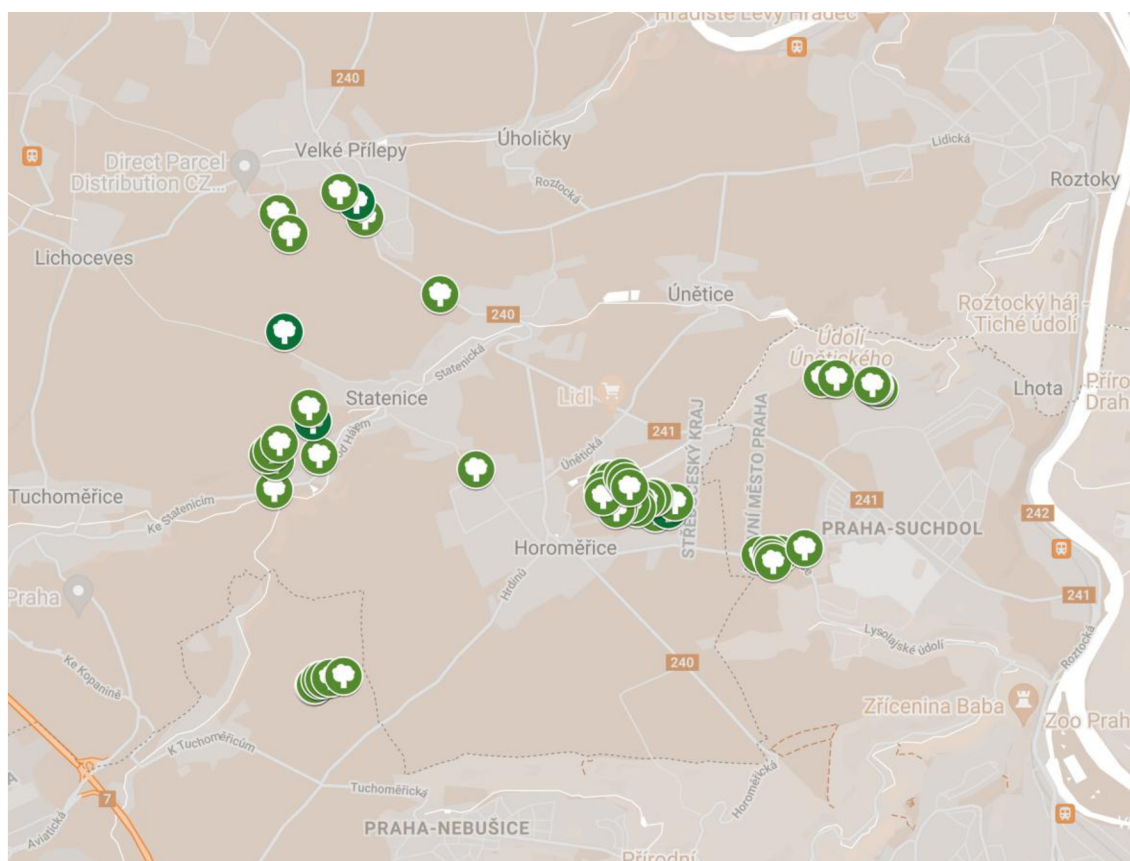
	6	5	4	3	2	1
1			22	bez čísla	bez čísla	
2		16	1	30	21	16
3	13	4	19	5	17	27
4	20	8	2	19	11	20
5		19	7	21	6	14
6		6	23	14	26	21
7		22	15	2	20	19
8			19	1	15	9
9		8	28	16		
10				4	12	18
11		13	16	9	14	8
12		1	6		21	28
13		16	24	15		
14	1	3	11			1
15		16	18	24	13	22
16	8		3	13	14	7
17	28	19	30	6	4	
18			14	1	23	
19		7	3		30	6
20		30	26	23	20	3
21		27	4	22	8	24
22			24	11	28	11
23			22	30		30
24		21	20	25	19	26
25		4	9	8		25
26	26	11	25	26	3	23
27		13	1	13	15	4
28	7	8	30	7	21	9
29	13	16	13	4	8	
30	2	14	30	28	7	5
31	25	23	2	20	4	15
32	1	26	18	2	9	17
33	22	30	5		20	19
34	6	4	16	19	2	12
35	22	6	21	18	6	4
36	12	8	15	14	17	1
37	18	5	9	27	22	7
38	21	16		3	25	28
39	8	15	4	21	27	2
40	9	7		12	15	8
41	4	22		20	26	18
42	12	2	7	8	28	22
43		21	28	13	18	
	6	5	4	3	2	1

Poznámka: chybí čísla klonů 10 a 29

2.1.3 Příměstská populace

Příměstská populace třešně ptačí se nachází v severozápadní části Prahy. Jedná se o třešně, které nebyly záměrně vysazovány, ale jde pravděpodobně o nálety u cest apod. Vzhledem k tomu, že příměstská populace se nachází v těsném okolí lidských obydlí, dochází v ní pravděpodobně i k většímu zastoupení šlechtěných kultivarů třešní. Zeměpisnou polohu stromů, ze kterých byly odebrány vzorky, znázorňuje Obrázek 7. Nadmořská výška se pohybuje od 220 do 310 m n. m. Oblast sběru biologického materiálu se nachází v klimatu mírně teplém, suchém, s mírnou zimou a s velmi krátkým trváním sněhové pokrývky. Průměrný roční úhrn srážek je pod 500 mm a průměrná teplota 8,2 °C.

Obrázek 7 Mapa testovaných stromů třešně ptačí v příměstské populaci (vytvořeno pomocí Google maps)



příměstská populace, znázornění jednotlivých stromů

Z příměstské populace bylo testováno 58 vzorků třešně ptačí.

2.2 *Zpracování materiálu a získání populačně-genetických dat*

Odběr přírodního materiálu byl proveden během jarní sezóny. Sběr vzorků v podobě vegetativních pupenů či listů se zachováním všech zásad odběru, uchování a zpracování rostlinného materiálu pro izolaci DNA (Sharma *et al.*, 2017) probíhal v letech 2014 a 2015. Genomová DNA byla extrahována s využitím izolační sady DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo).

Bylo analyzováno 12 druhově specifických lokusů třešně ptačí. Tyto lokusy znázorňuje Tabulka 4. Jmenovitě se jedná o lokusy EMPaS02, EMPaS05, EMPaS06, dále byly použity lokusy reprezentující planou formu třešně ptačí: EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12 (Vaughan and Russell, 2004) a dále byly analyzovány lokusy: UCD-CH11, (Struss, Ahmad and Southwick, 2003), UDP98-411, UDP98-412 (Testolin *et al.*, 2000), BPPCT_040, BPPCT_034 (Dirlewanger *et al.*, 2002), PS12A02, (Downey, Iezzoni, 2000).

Tabulka 4 Znázornění analyzovaných lokusů a sekvencí primerů

Název lokusu Zdrojová literatura / GenBank přístupový kód (accession number)	primer sekvence (5'–3') F: forward R: reverse	rozsah velikosti (bp)
*BPPCT_034 long D / AF374945	F: CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT R: GCTCGTAAGATTGCTGGTAGC	okolo 228
BPPCT_040 D / AF374946	F: ATGAGGACGTGTCTGAATGG R: AGCCAAACCCCTCTTATACG	okolo 135
EMPaS02 A / AY526619	F: CTA CT TCCATGATTGCCTCAC R: AACATCCAGAACATCAACACAC	135-145
EMPaS05 A / AY526621	F: CATGTGCTTTCTCTGCCC R: TCTTCTCAAGCAATTC CC C	161-171
EMPaS06 C / NA	F: AAGCGGAAAGCACAGGTAG R: GAAGGTACATGGCGTGCC	200-218
*EMPaS10 long A / AY526626	F: GCTAATATCAAATCCCAGCTCTC R: CTACTGGCTTGTGTTGTGTG	151-183
EMPaS11 A / AY526627	F: ACCACTTTGAGGAACTTGGG R: CTGCCTGGAAGAGCAATAAC	73-106
*EMPaS12 long A / AY526628	F: TGTGCTAATGCCAAAAATACC R: GTGGAAGGCCATATTTTCGG	122-148
*PS12A02 long E / AB476763	F: GCCACCAATGGTCTCTCC R: CAACCAAAGCACCCAGATGC	150-178
UCD_CH11 C / NA	F: TGCTATTAGCTTAATGCCTCCC R: ATGCTGATGTCATAAGGTGTGC	134-151
*UDP98_411 long B / AY074719	F: AAGCCATCCACTCAGCACTC R: GCTGATGATGACGACGATGATG	134-160
UDP98_412 B / AY074720	F: AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC R: GCTGAAGACGACGATGATGA	124-132

V tabulce jsou označeny upravené lokusy s příponou long, které byly upravené podle (Korecký J., Bílý J., Sedlák P., 2017) (sekvence předefinovaných reverzních primerů jsou zvýrazněny tučně). NA – jsou sekvence, které nejsou publikované v databázi GenBank. A – (Vaughan and Russell, 2004), B – (Testolin *et al.*, 2000), C – (Struss, Ahmad and Southwick, 2003), D – (Dirlewanger *et al.*, 2002), E – (Downey, S.L., Iezzoni, 2000)

Korecký, Bílý a Sedlák, (2017), uvádí následující postup získání dat: Amplifikace 12 lokusů SSR byla organizována do tří multiplexů v závislosti na teplotním profilu a absenci primerových dimerů. Teplotní profil multiplexu A (lokusy EMPaS02, EMPaS10, EMPaS11, PS12A02, UCD_CH11, UDP98_412) byl 10 cyklů (nejprve při 67 °C a poté 58 °C) a 25 cyklů při 58 °C. Multiplex B (lokusy BPPCT_034, EMPaS05, EMPaS06, EMPaS12) a multiplex C (lokusy BPPCT_040, UDP98_411) probíhaly při teplotách od 64 °C do 55 °C v 10 cyklech a poté 25 cyklech při 55 °C po dobu 1 min.

Pro analýzu délky alely se smíchal 1 µl každého produktu PCR (multiplex A, B, C) a přidal se k 13 µl formamidového roztoku obsahujícího 0,2 µl DNA žebříčku Gene Scan

LIZ 500 Size Standard (Applied Biosystems). Směs byla poté denaturována při 95 °C po dobu 5 minut a rychle ochlazena na ledu po dobu 5 minut. Amplifikované fragmenty byly separovány na Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Tabulka 5 znázorňuje velikosti amplifikačních produktů ve sledovaných lokusech u analyzovaných vzorků.

V práci byla zpracována multilokusová data tří populací třešně ptačí, která byla pro tuto práci již dodána ve formě tabulky genotypů. Ze získané tabulky genotypů bylo pro identifikaci genotypů použito multilokusové párování mezi jednotlivými vzorky pomocí programu Microsoft Excel, a jeho funkce Odebrat stejné. Vzorky, které byly plně spárovány v genotypových lokusech, byly prohlášeny za stejný genotyp (nebo klon). Neidentická multilokusová data tří populací třešně ptačí byla dále zpracována pomocí počítačového programu GenAlEx 6.5 (Smouse, P. Peakall, 2015). GenAlEx – Genetická analýza v Excelu – je navržena jako uživatelsky přívětivý balíček s intuitivním a konzistentním rozhraním v prostředí Microsoft Excel. Před samotným zpracováním v GenAlExu musí být multilokusová data upravena v určité formě. Například kodominantní data musí být prezentována ve dvou sloupcích pro každý lokus. Alely mohou být jednoduše číselně kódovány (1, 2, 3 atd.). Alternativně a výhodně pro mikrosatelitní data mohou být alely kódovány jako jejich celočíselná velikost v párech bází (bp) nebo jako odvozený počet jednoduchých opakování sekvencí. Tyto dva poslední formáty jsou nezbytné pro výpočet genetické vzdálenosti. GenAlEx 6.5 má limit 999 numericky kódovaných alel. Kodominantní alely nemusí být číslovány za sebou.

GenAlEx dokáže vyhodnotit populačně genetická data pomocí metody AMOVA (Analysis of Molecular Variance). AMOVA umožňuje analýzu genetických dat mezi populacemi a odhad široce používaných *F*-statistik a/nebo jejich analogů. Tato metoda dokáže zpracovat všechna získaná data genetických markerů (haploidní, haplotypové, binární, kodominantní a sekvenční). Pomocí programu GenAlEx také vypočítáme další statistiky, jejichž postup výpočtu je uveden v části 1.2.3 Ukazatelé genetické diverzity. Vypočítané statistiky budeme dále interpretovat.

Tabulka 5 Velikosti amplifikačních produktů pro jednotlivé lokusy

Lokus	Velikost amplifikačních produktů (bp)
BPPCT_034	221-258
BPPCT_040	121-171
EMPaS02	134-148
EMPaS05	162-176
EMPaS06	202-229
EMPaS10	152-190
EMPaS11	59-109
EMPaS12	124-150
PS12A02	151-186
UCD_CH11	144-167
UDP98_411	154-177
UDP98_412	111-113

3 Výsledky

Získaná multilokusová data tří populací třešně ptačí byla zpracována pomocí počítačového programu GenAlEx 6.5. Byly vypočítány následující genetické charakteristiky: počet alel na lokus (N_a), efektivní počet alel (N_e), očekávaná (H_e) a pozorovaná (H_o) heterozygotnost, fixační index (F), Shannonův informační index (I), stupeň inbreedingu v populaci (F_{IS}), odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy v populacích (F_{IT}), stupeň populační diferenciace (F_{ST}) a matice genetických vzdáleností mezi populacemi.

3.1 Charakteristika sledovaných vzorků a alel v populacích

Pro kontrolu klonové identity byla generována data z většího počtu ramet jednoho klonu. Genotypy pouze ověřující deklarovanou klonovou příslušnost však nebyly předmětem analýzy. V získaných multilokusových datech byly pozorovány identické genotypy v jednotlivých populacích. V semenném sadu Čejkovka byli nalezeni tito jedinci s identickými genotypy v rámci zkoumaných lokusů, z nichž pro účely hodnocení populací uvažujeme vždy jen jednoho z nich: 339 a 340; 341 a 342; 363 a 364; 375, 376 a 377; 386, 387 a 390; 392-398. Celkem tedy bylo identifikováno 13 identických genotypů evidenčně deklarovaných jako různé klony, které jsme z další analýzy vyřadili. V semenném sadu Obrovice byli nalezeni tito jedinci s identickými genotypy v rámci zkoumaných lokusů, z nichž pro účely hodnocení populací uvažujeme vždy jen jednoho z nich: 17A a 18ab; 2A, 20A a 21B; 20B a 21A; 3B a 9ab; 4ab a 5ab. Celkem jsme tedy vyřadili 6 identických genotypů. V příměstské populaci byli nalezeni tito jedinci s identickými genotypy v rámci zkoumaných lokusů, z nichž pro účely hodnocení populací uvažujeme vždy jen jednoho z nich: 133, 134 a 135. Celkem jsme tedy vyřadili 2 jedince s identickými genotypy v rámci zkoumaných lokusů.

V semenném sadu Čejkovka bylo hodnoceno celkem 49 vzorků jedinečných genotypů ve všech 12 lokusech. Tyto vzorky reprezentovaly jedince, kteří zastupují jednotlivé klony v sadu. Poznámka: klony 351 a 379 byly v rámci ověření klonové identity odebrány každý od dvou jedinců, avšak se ukázalo, že identičtí nejsou, a tedy byli do celkového počtu hodnocených jedinců zahrnuti všichni tito jedinci.

V semenném sadu Obrovce bylo hodnoceno 32 vzorků ve všech 12 lokusech. Tyto vzorky reprezentovaly jedince, kteří zastupují jednotlivé klony v sadu. Některé klony byly v rámci ověření klonové identity odebrány ve dvou variantách. U některých jedinců se ukázalo, že klony navzájem nejsou, a tedy byli do celkového počtu hodnocených jedinců zahrnuti všichni tito jedinci. Naproti tomu se u některých jedinců deklarovaných jako odlišní ukázalo, že navzájem klony jsou, a tedy byli tito jedinci do hodnocení populací započítáni pouze jednou, viz výše.

V příměstské populaci bylo hodnoceno 56 vzorků v lokusech BPPCT_034, BPPCT_040, EMPaS05, EMPaS06, EMPaS12 UDP98-411, 55 vzorků v lokusech PS12A02 a UDP98-412 a 54 vzorků v lokusech EMPaS02, EMPaS10, EMPaS11, UCD-CH110. Nižší hodnoty na některých lokusech v příměstské populaci značí pouze výpadek genotypizace na těchto lokusech.

Celkově bylo ve 137 vzorcích detekováno 141 rozdílných alel ve 12 lokusech. Počet specifických alel v jednotlivých lokusech a populacích znázorňuje Tabulka 6. Největší počet specifických alel se vyskytl v příměstské populaci (37 alel), dále v sadu Obrovce (20 alel) a nejméně v sadu Čejkovka (10 alel). Největší zastoupení specifické alely bylo v populaci Obrovce v lokusu BPPCT_040 (alela 157 v počtu 27 výskytů), dále v populaci Čejkovka v lokusu EMPaS06 (alela 222 v počtu 25) a v příměstské populaci v lokusu EMPaS06 (alela 202 v počtu 15).

Překryv alel mezi populacemi v jednotlivých lokusech znázorňuje Tabulka 7. K největšímu překryvu alel došlo v alele 157 lokusu UCD_CH11 pro sad Čejkovka (58 výskytů), pro příměstskou populaci (52 výskytů) a pro sad Obrovce (39 výskytů). V lokusu BPPCT_040 nedošlo v sadu Obrovce k žádnému překryvu alel s ostatními populacemi (sad v tomto lokusu obsahuje výhradně specifické alely).

Tabulka 6 Počet specifických alel v jednotlivých lokusech a populacích

Lokus	alela	P1	P2	P3	Lokus	alela	P1	P2	P3	Lokus	alela	P1	P2	P3				
BPPCT_034	237	0	18	0	EMPaS06	224	3	0	0	PS12A02	151	0	0	2				
	241	0	0	1		225	0	0	3		155	0	0	1				
	244	0	20	0		226	0	2	0		182	0	2	0				
	245	0	0	1		229	0	0	3		186	0	5	0				
	256	0	5	0		152	0	0	2		146	0	0	6				
	258	0	6	0		164	0	0	1		149	0	0	1				
BPPCT_040	130	0	0	2	EMPaS10	166	1	0	0	UCD_CH11	152	0	2	0				
	133	0	0	2		170	0	0	1		161	1	0	0				
	147	1	0	0		174	0	0	1		154	0	0	1				
	155	0	3	0		178	0	0	1	159	0	0	1					
	157	0	27	0		182	0	2	0	166	0	0	1					
	161	0	19	0		183	2	0	0	171	0	0	3					
	163	0	7	0		184	0	19	0	172	0	0	1					
	169	0	1	0		185	0	0	2	173	0	0	1					
	171	0	7	0		190	0	0	1	175	0	1	0					
EMPaS02	134	3	0	0	EMPaS11	59	0	0	1	UDP98_411	177	0	4	0				
EMPaS05	162	14	0	0		63	0	0	1		111	0	0	1				
	170	22	0	0		102	0	0	1		115	0	0	2				
	176	0	0	5		106	0	0	4		123	0	0	4				
EMPaS06	202	0	0	15		108	0	1	0		109	0	0	1	133	5	0	0
	210	0	0	3		133	0	0	1		UDP98_412	111	0	0	1			
	216	0	0	4	141	1	0	0	115	0		0	2					
	222	25	0	0	150	0	0	2	123	0		0	4					
223	0	13	0	EMPaS12	141	1	0	0	133	0		0	1					
					150	0	0	2	141	1	0	0						
									150	0	0	2						

P1 semenný sad Čejkovka, P2 semenný sad Obrovce, P3 příměstská populace

Tabulka 7 Překryv alel v populacích mezi zkoumanými lokusy

Lokus	alela	P1	P2	P3	Lokus	alela	P1	P2	P3	Lokus	alela	P1	P2	P3
BPPCT_034	221	2	0	13	EMPas06	204	10	13	36	PS12A02	171	1	7	3
	223	11	0	9		206	44	23	7		175	2	1	0
	225	10	9	14		208	9	9	4		177	7	0	10
	227	0	2	2		218	0	1	15		179	2	15	1
	229	2	0	8		220	7	2	25		144	8	3	1
	233	13	0	16	EMPas10	154	31	17	33	UCD_CH11	148	2	1	0
	235	13	4	1		156	1	0	1		151	3	0	5
	243	26	0	16		160	13	13	22		153	15	17	38
	257	21	0	31		168	40	13	34		155	7	2	3
BPPCT_040	121	17	0	20		186	10	0	7		157	58	39	52
	129	7	0	7	EMPas11	66	18	12	26	167	4	0	2	
	131	33	0	26		76	52	42	50	155	25	20	19	
	135	30	0	30	EMPas12	86	8	4	11	163	5	4	21	
	137	7	0	13		104	20	5	13	165	2	3	0	
	143	1	0	1		124	9	18	12	167	39	21	57	
	145	2	0	11	PS12A02	138	19	19	34	UDP98_412	169	27	11	7
EMPas02	136	14	5	10		140	47	8	24		113	15	9	13
	140	11	3	23		146	11	10	24		119	32	37	25
	142	9	11	8		148	11	9	16		121	18	18	40
	144	11	4	21		157	22	0	9		125	27	0	20
	146	48	35	35	159	4	0	15	127	1	0	5		
	148	2	6	11	161	36	0	40	UDP98_411	155	25	20	19	
EMPas05	164	35	19	24	163	7	0	8		163	5	4	21	
	166	0	17	42	165	8	10	14		165	2	3	0	
	172	27	11	13	167	9	2	6		167	39	21	57	
	174	0	17	28	169	0	22	1	169	27	11	7		

P1 semenný sad Čejkovka, P2 semenný sad Obrovce, P3 příměstská populace

3.2 Efektivní počet alel pro jednotlivé populace

Vypočítané hodnoty efektivního počtu alel pro jednotlivé lokusy a jednotlivé populace uvádí Tabulka 8 a schematicky znázorňuje Graf 1.

Efektivní počet alel ve zkoumané populaci Čejkovka dosahuje maximální hodnoty 5,703 v lokusu BPPCT_034 a nejnižší hodnoty 2,573 v lokusu UCD_CH11. Průměrná hodnota efektivního počtu alel pro zkoumané lokusy v sadu Čejkovka je 3,696 a směrodatná odchylka 0,818.

Efektivní počet alel ve zkoumané populaci Obrovce dosahuje maximální hodnoty 4,623 v lokusu BPPCT_034 a nejnižší hodnoty 2,101 v lokusu EMPaS11. Průměrná hodnota efektivního počtu alel pro zkoumané lokusy v sadu Obrovce je 3,575 a směrodatná odchylka 0,915.

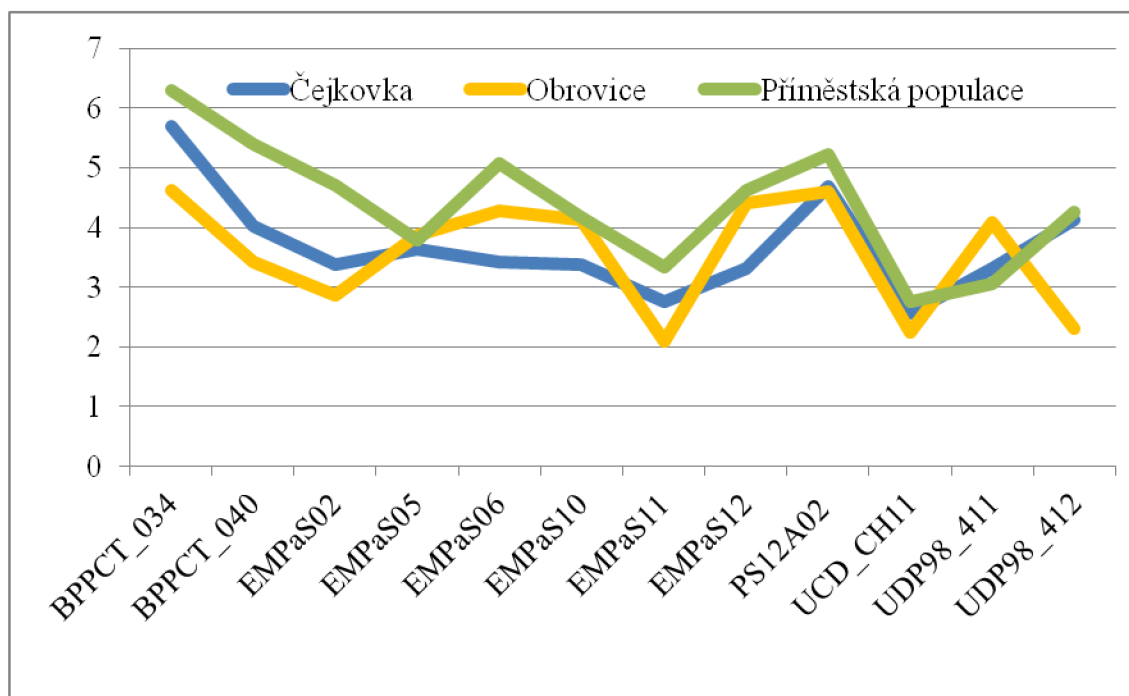
Efektivní počet alel v příměstské populaci dosahuje maximální hodnoty 6,304 v lokusu BPPCT_034 a nejnižší hodnoty 2,761 v lokusu UCD_CH11. Průměrná hodnota efektivního počtu alel pro příměstskou populaci je 4,391 a směrodatná odchylka 0,999.

Nejvyšších hodnot dosahoval efektivní počet alel v lokusu BPPCT_034. Nejnižší hodnoty efektivního počtu alel pro všechny populace byly zaznamenány v lokusech EMPaS11 a UCD_CH11.

Tabulka 8 Efektivní počet alel pro jednotlivé populace

Lokus	Čejkovka	Obrovce	Příměstská populace
BPPCT_034	5,703	4,623	6,304
BPPCT_040	4,032	3,419	5,398
EMPaS02	3,386	2,860	4,703
EMPaS05	3,646	3,864	3,781
EMPaS06	3,430	4,276	5,079
EMPaS10	3,386	4,129	4,166
EMPaS11	2,750	2,101	3,346
EMPaS12	3,319	4,404	4,629
PS12A02	4,689	4,592	5,220
UCD_CH11	2,573	2,241	2,761
UDP98_411	3,307	4,080	3,049
UDP98_412	4,125	2,309	4,261
Průměr	3,696	3,575	4,391
Směrodatná odchylka	0,818	0,915	0,999

Graf 1 Znárodnění efektivního počtu alel pro jednotlivé lokusy v jednotlivých populacích



3.3 Fixační index

Tabulka 9 zobrazuje konkrétní hodnoty fixačních indexů pro jednotlivé lokusy a populace. Průměrná hodnota fixačního indexu v semenném sadu Čejkovka byla 0,006, v semenném sadu Obrovce 0,053 a v příměstské populaci 0,025. Ze získaných hodnot fixačního indexu je patrné, že ve všech třech zkoumaných populacích mírně převažují homozygoti nad heterozygoty.

Tabulka 9 Hodnoty fixačních indexů pro jednotlivé lokusy a populace

Lokus	Populace		
	Čejkovka	Obrovice	Příměstská populace
BPPCT_034	0,060	-0,037	0,087
BPPCT_040	-0,086	0,028	-0,074
EMPaS02	0,131	-0,009	0,036
EMPaS05	0,016	-0,012	-0,044
EMPaS06	0,049	-0,061	0,133
EMPaS10	0,073	0,010	0,050
EMPaS11	0,070	0,105	-0,004
EMPaS12	-0,168	-0,011	0,021
PS12A02	0,014	0,281	0,010
UCD_CH11	-0,035	0,266	-0,103
UDP98_411	-0,112	0,006	0,070
UDP98_412	0,057	0,063	0,121
Průměr	0,006	0,053	0,025
Směrodatná odchylka	0,085	0,107	0,070

3.4 Shannonův informační index

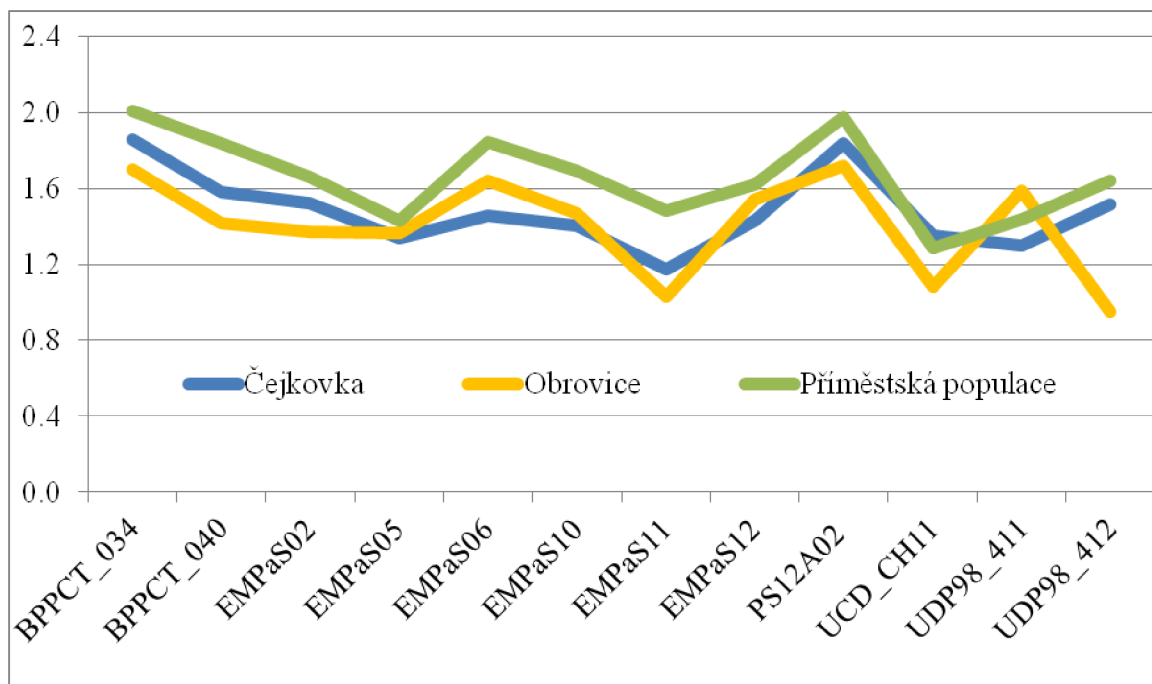
Tabulka 10 a Graf 2 znázorňují vypočítané hodnoty Shannonova informačního indexu pro jednotlivé lokusy a pro jednotlivé populace.

Nejvyšší hodnoty Shannonova informačního indexu v semenném sadu Čejkovka byly zaznamenány v lokusech PS12A02 a BPPCT_034 a nejnižší v EMPaS11. V sadu Obrovice byly nejvyšší hodnoty Shannonova informačního indexu získány v lokusech PS12A02 a BPPCT_034 a nejnižší v UDP98_412. V příměstské populaci byly nejvyšší hodnoty Shannonova informačního indexu získány v lokusech BPPCT_034 a PS12A02 a nejnižší v UCD_CH11.

Tabulka 10 Hodnoty Shannonova informačního indexu pro jednotlivé lokusy a jednotlivé populace

Lokus	Populace		
	Čejkovka	Obrovce	Příměstská populace
BPPCT_034	1,855	1,699	2,011
BPPCT_040	1,583	1,417	1,837
EMPaS02	1,524	1,371	1,659
EMPaS05	1,336	1,367	1,433
EMPaS06	1,455	1,638	1,843
EMPaS10	1,404	1,469	1,692
EMPaS11	1,176	1,028	1,482
EMPaS12	1,428	1,543	1,624
PS12A02	1,840	1,720	1,973
UCD_CH11	1,354	1,079	1,282
UDP98_411	1,302	1,587	1,439
UDP98_412	1,518	0,949	1,644
Průměr	1,481	1,406	1,660
Směrodatná odchylka	0,195	0,251	0,217

Graf 2 Shannonův informační index pro jednotlivé lokusy a jednotlivé populace



3.5 Souhrnné zhodnocení všech populací

Následující souhrnná data byla stanovena ve všech třech populacích pro 12 druhově specifických lokusů třešně ptačí.

3.5.1 Hodnoty základních populačně-genetických charakteristik

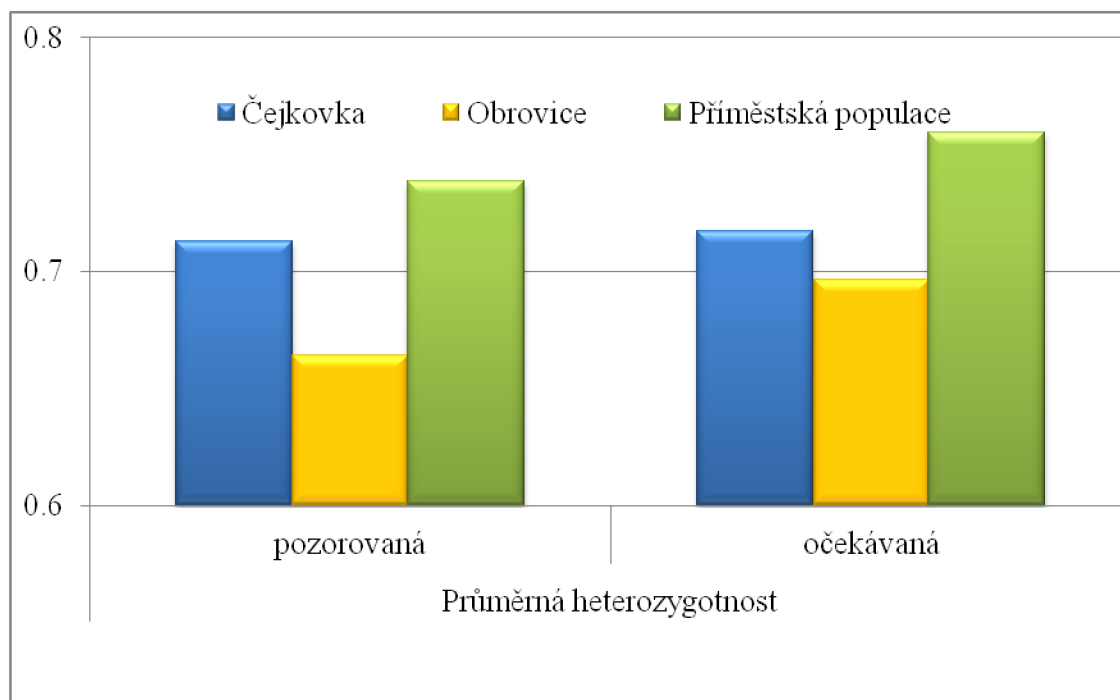
Souhrn průměrných výsledků pro jednotlivé populace udává Tabulka 11.

Největší průměrný počet alel na lokus byl zaznamenán v příměstské populaci ($N_a = 8,883$), dále v sadu Čejkovka ($N_a = 6,583$) a nejméně v sadu Obrovce ($N_a = 5,833$). Největší průměrný efektivní počet alel byl zaznamenán v příměstské populaci ($N_e = 4,391$), dále v sadu Čejkovka ($N_e = 3,696$) a nejméně v sadu Obrovce ($N_e = 3,575$). Největší průměrná pozorovaná i očekávaná heterozygotnost byla zjištěna v příměstské populaci ($H_o = 0,738$, $H_e = 0,759$), viz Tabulka 11 a Graf 3. Ve všech populacích byla získána průměrná kladná hodnota fixačního indexu: nejmenší v sadu Čejkovka ($F = 0,006$), dále v příměstské populaci ($F = 0,025$) a nejvyšší v sadu Obrovce ($F = 0,053$). To znamená, že ve všech populacích byl zaznamenán větší podíl homozygotů, než heterozygotů.

Tabulka 11 Průměrné hodnoty počtu alel na lokus, efektivního počtu alel, pozorované a očekávané heterozygotnosti a fixačního indexu pro jednotlivé populace

Populace	Průměrný počet alel na lokus	Průměrný efektivní počet alel	Průměrná heterozygotnost		Průměrný fixační index
			pozorovaná	očekávaná	
Čejkovka	6,583	3,696	0,713	0,717	0,006
Obrovce	5,833	3,575	0,664	0,697	0,053
Příměstská populace	8,883	4,391	0,738	0,759	0,025
Průměr	7,083	3,887	0,705	0,724	0,028
Směrodatná odchylka	0,370	0,166	0,017	0,013	0,015

Graf 3 Průměrná pozorovaná a průměrná očekávaná heterozygotnost v jednotlivých populacích



3.5.2 Výsledky analýzy genetické struktury populací

Hodnoty parametrů genetické struktury populací byly vypočítány pomocí Wrightových F -statistik a počítačového programu GenAlEx 6.5. Byly vypočítány následující hodnoty: stupeň inbreedingu v populaci (F_{IS}), odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy v populacích (F_{IT}) a stupeň populační diferenciace (F_{ST}). Pomocí F_{ST} byl vypočítán i počet migrantů v populaci (Nm). Získané výsledky průměrných hodnot parametrů pro všechny populace znázorňuje Tabulka 12.

Průměrná hodnota stupně inbreedingu (F_{IS}) byla získána 0,027. Tato kladná hodnota znamená nadbytek homozygotů v populacích. Průměrná hodnota odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy v populacích byla $F_{IT} = 0,086$. Z této hodnoty vyplývá, že ve všech sledovaných populacích byl průměrně zaznamenán téměř 9 % pokles heterozygotnosti ve srovnání s Hardy-Weinbergovým zákonem. Stupeň populační diferenciace (F_{ST}) byl 0,061. Z této hodnoty vyplývá, že je malá míra genetické diferenciace mezi populacemi. Průměrný počet migrantů v populacích (Nm) nabył hodnoty 5,890, což naznačuje existenci genového toku v populacích.

Tabulka 12 Průměrné hodnoty F_{IS} , F_{IT} , F_{ST} a Nm pro všechny populace

Průměrné hodnoty pro všechny populace	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	Nm
	0,027	0,086	0,061	5,890

3.5.3 Výsledky genetických vzdáleností mezi populacemi

Získané hodnoty genetických vzdáleností mezi populacemi (dle (Nei, 1972)) uvádí Tabulka 13. Rozpětí genetických vzdáleností se nachází od 0,198 až 0,377. Získané hodnoty genetických vzdáleností jsou pro populace Čejkovka-Obrovce 0,377 a populace Obrovce-příměstská 0,360. Nejbližší si jsou populace Čejkovka a příměstská (0,198). Naopak nejvzdálenější jsou si populace Čejkovka a Obrovce.

Tabulka 13 Matice genetických vzdáleností (podle Neie)

Populace	Čejkovka	Obrovce	Příměstská populace
Čejkovka	0	0,377	0,198
Obrovce	0,377	0	0,360
Příměstská populace	0,198	0,360	0

4 Diskuze

Pro generování dat použitých v této diplomové práci byly použity dříve publikované primery pro amplifikaci mikrosatelitových oblastí DNA třešně ptačí. Jmenovitě se jedná o lokusy BPPCT_034, BPPCT_040 (Dirlewanger *et al.*, 2002), EMPaS02, EMPaS05, EMPaS06, EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12 (Vaughan and Russell, 2004), PS12A02, (Downey, S. L., Iezzoni, 2000) a dále byly analyzovány lokusy: UCD-CH11 (Struss, Ahmad and Southwick, 2003), UDP98-411 UDP98-412 (Testolin *et al.*, 2000).

Celkově bylo pomocí použitých primerů detekováno 141 rozdílných alel ve 12 lokusech s celkovým počtem 137 jedinečných genotypů. Průměrný počet nalezených alel na lokus přes všechny zkoumané populace činil 11,75. Budeme-li uvažovat všechny možné kombinace těchto alel, při 12 lokusech by tak bylo možné identifikovat až $11,75^{12} = 6\,925\,552\,076\,635$ jedinců lišících se navzájem v uvedených lokusech. Číslo je pouze teoretické a závisí na skutečné distribuci počtu různých alel mezi lokusy. Například pokud by v některém z lokusů byla zjištěna pouze jedna alela, počet různých jedinců by se snížil v našem případě o celý řád. Nejmenší počet zaznamenaných jedinečných alel v jednom z lokusů však byl 7 (lokus EMPaS02), a tedy je uvedené číslo alespoň řádově vypovídající. Zjištění přispívá k potvrzení předpokladu o vysoké variabilitě uvedených mikrosatelitových lokusů, i o jejich potenciálu k identifikaci jedinců pouze na základě těchto lokusů. Velkou variabilitu v počtu alel v uvedených lokusech uvádí také Schueler *et al.*, (2003), kde ve své práci uvádí, že zkoumali 7 lokusů a detekovali u nich celkem 48 různých alel v přirozené populaci 84 stromů.

Největší počet specifických alel se vyskytl v příměstské populaci (37 alel), dále v sadu Obrovice (20 alel) a nejméně v sadu Čejkovka (11 alel). Největší zastoupení specifické alely bylo v populaci Obrovice v lokusu BPPCT_040 (alela 157 v počtu 27 výskytů). V populaci Čejkovka byla zjištěna specifická alela s nejvyšší četností v lokusu EMPaS06 (alela 222 v počtu 25) a v příměstské populaci v lokusu EMPaS06 (alela 202 v počtu 15). V porovnání s prací z Velké Británie, Vaughan *et al.*, (2007), bylo pro tento lokus pozorováno pouze 9 alel v kulturní a 6 alel v přirozené populaci. Největší zastoupení počtu alel bylo dosaženo v lokusu BPPCT_040: celkem 16 alel, v příměstské populaci 9, dále 8 alel v sadu Čejkovka a 6 alel v sadu Obrovice. Thouraya *et al.* (2021), pro tento lokus uvádí 11 alel v kulturní populaci (21 jedinců) a 5 alel v přirozené populaci (4 jedinci). Stejný počet alel (16) byl zjištěn v této diplomové práci pro lokus EMPaS10 v počtu 7 alel v sadu Čejkovka, 5 v sadu Obrovice a 12 v příměstské

populaci. Thouraya *et al.* (2021), pro tento lokus uvádí 7 alel v kulturní populaci (21 jedinců) a 1 alelu v přirozené populaci (4 jedinci).

Největší překryv alel mezi populacemi se vyskytl v alele 157 lokusu UCD_CH11 pro sad Čejkovka (58 výskytů), pro příměstskou populaci (52 výskytů) a pro sad Obrovice (39 výskytů). V lokusu BPPCT_040 nedošlo v sadu Obrovice k žádnému překryvu alel s ostatními populacemi, a tedy sad v tomto lokusu obsahuje výhradně specifické alely (celkem 6). V lokusech EMPaS02 a EMPaS11 a EMPaS12 došlo k překryvu alel ve všech třech populacích. Toto zjištění podporuje jiná zjištění o relativně velké vzájemné genetické blízkosti nebo, chceme-li, o relativně malé vzájemné genetické vzdálenosti zkoumaných populací.

Průměrný efektivní počet alel nabýval nejvyšších hodnot v příměstské populaci ($N_e = 4,391$ pro 56 jedinců), dále v populaci semenného sadu Čejkovka ($N_e = 3,696$ pro 49 jedinců) a nejnižší hodnoty v sadu Obrovice ($N_e = 3,575$ pro 32 jedinců). Ve studii Avramidou, Ganopoulose a Aravanopoulose, (2010), byla získána průměrná hodnota efektivního počtu alel $N_e = 2,137$ pro 36 jedinců. Ve studii provedené kolektivem Thouraya *et al.*, (2021), byla získána průměrná hodnota $N_e = 3,880$ pro kulturní populaci s 21 jedinci a $N_e = 3,038$ pro přirozenou populaci 4 jedinců. Ve studii Ganopoulose, Aravanopoulose a Tsaftarise, (2013), byla získána průměrná hodnota $N_e = 6,767$ pro přirozenou populaci 93 jedinců a $N_e = 3,810$ pro kultivovanou populaci s 21 jedinci.

Ze získaných hodnot fixačního indexu hodnocených lokusů je patrné, že ve všech třech zkoumaných populacích mírně převažují homozygoti nad heterozygoty.

Nejvyšší hodnota Shannonova informačního indexu ($^S H$), a tedy nejvyšší genetická diverzita v porovnání s ostatními hodnocenými populacemi, byla pozorována u příměstské populace ($^S H = 1,660$). Nejnižší průměrná hodnota Shannonova informačního indexu byla pozorována u sadu Obrovice ($^S H = 1,406$). Ve srovnání se studií z Tuniska, Thouraya *et al.*, (2021), se hodnoty Shannonova informačního indexu v přirozené populaci pohybovaly v rozmezí 0 – 1,733 (průměr 1,120; 4 jedinci) a v kulturní populaci v rozmezí 1,174 – 2,172 (průměr 1,584; 21 jedinců). Dále ve studii Ganopoulose, Aravanopoulose a Tsaftarise, (2013), byla získána hodnota $^S H = 2,077$ pro přirozenou populaci 93 jedinců, a $^S H = 1,476$ pro kultivovanou populaci s 21

jedinci. Hodnoty z uvedené studie shodně s touto diplomovou prací naznačují, že přirozená populace je více diverzifikována, než populace kultivovaná.

Průměrné hodnoty pozorované heterozygotnosti H_o se u pěti francouzských a jedné italské populace pohybovaly v rozmezí 0,18 - 0,50 (Ducci and Santi, 1997). V případě této diplomové práce se průměrné hodnoty H_o pro populace pohybovaly v rozmezí 0,664 (Obrovice) – 0,738 (Příměstská populace). Pozorování souhlasí s výsledkem o genetické diverzitě populací na základě Shannonova informačního indexu. Průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti H_e byly u dvou britských populací 0,679 a 0,686 (Vaughan, Cottrell, Moodley, Connolly and Russell, 2007). V případě této diplomové práce se hodnoty H_e pro populace pohybovaly v rozmezí 0,697 (Obrovice) – 0,759 (Příměstská populace).

Studie Barreneche *et al.*, (2021), která zkoumala celkem 314 jedinců z 19 evropských zemí, uvádí průměrnou pozorovanou heterozygotnost $H_o = 0,71$, což je ve shodě s touto diplomovou prací. Studie dále uvádí průměrnou očekávanou heterozygotnost $H_e = 0,7$, která je také ve shodě s touto diplomovou prací.

Průměrné hodnoty efektivního počtu alel v rámci populací se v této diplomové práci pohybovaly v rozsahu 3,575 (Obrovice) až 4,391 (Příměstská populace). Nejvyšší průměrný počet efektivních alel byl tedy pozorován u příměstské populace; tato populace má také nejvyšší počet různých alel. Naproti tomu práce Avramidou, Ganopoulose a Aravanopoulose, (2010), uvádí pro své zkoumané populace nižší průměrný efektivní počet alel 2,137. Průměrný fixační index byl získán v této diplomové práci v rozsahu 0,006 (Čejkovka) až 0,053 (Obrovice), což je podstatně méně ve srovnání s prací Avramidou, Ganopoulose a Aravanopoulose, (2010), kde byla získána hodnota 0,185. Průměrný počet alel na lokus získaný v této diplomové práci se pohyboval v rozsahu 5,833 (Obrovice) až 8,833 (Příměstská populace), což je ve shodě s prací Vaughana *et al.*, (2007), kde hodnoty průměrného počtu alel ve dvou populacích dosáhly hodnot 7,77 a 8,77.

V této práci byl získán celkový stupeň inbreedingu v populacích $F_{IS} = 0,027$. Z kladné hodnoty F_{IS} i kladné hodnoty průměrného fixačního indexu je patrné, že v populacích se vyskytuje více homozygotů. Při porovnání 22 tureckých přirozených populací zjistili Uzan *et al.*, (2022), celkovou průměrnou hodnotu $F_{IS} = 0,016$. Ve srovnání se studií z Tuniska, Thouraya *et al.*, (2021), kde byly hodnoceny dvě populace - jedna přirozená populace a jedna kulturní, byla získána průměrná hodnota $F_{IS} = 0,101$. Hodnota

odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy v populacích (F_{IT}) byla v této diplomové práci 0,086. Při porovnání 113 kultivarů třešně ptačí zjistili Muccillo *et al.*, (2019), průměrnou hodnotu $F_{IT} = 0,052$. Stupeň populační diferenciace (F_{ST}) byl získán v této práci 0,061. Při porovnání 22 tureckých přirozených populací zjistili Uzan *et al.*, (2022), průměrnou hodnotu $F_{ST} = 0,097$. Ve své studii zjistili Thouraya *et al.*, (2021), průměrnou hodnotu $F_{ST} = 0,04$. Počet migrantů v populaci (Nm) v této práci nabyl hodnoty 5,890. Při porovnání 22 tureckých přirozených populací zjistili Uzan *et al.*, (2022), průměrnou hodnotu $Nm = 2,414$.

Získané hodnoty genetických vzdáleností dle Neie, (1972), mezi populacemi jsou pro populace Čejkovka-Obrovce 0,377 a populace Obrovce-příměstská 0,360. Nejblíže si jsou populace Čejkovka a příměstská (0,198).

Dle Chaisurisri a El-Kassaby, (1994), a Ducci a Santi, (1997), mohou semenné sady mít ještě větší alelické bohatství, než jaké se v průměru nachází v přírodních populacích. Tento jev je pravděpodobně výsledkem toho, že se výběr stromů běžně provádí z širší zeměpisné oblasti, a tak pokrývá jedince představující velké množství subpopulací. Ve skutečnosti zdůrazňuje pozitivní roli semenných sadů, protože sdružuje jedince, kteří by se za normálních okolností nebyli schopni křížit z důvodu přítomnosti fyzických (geolokačních) bariér. Tato vlastnost je zvláště důležitá u druhů opylovaných hmyzem s rozptýleným rozšířením, jako je divoká třešeň, která má jinak velmi omezený přístup k pylu ze vzdálenějších, a tedy (pravděpodobně) méně souvisejících zdrojů. Teoretické a empirické údaje ukazují, že semenné sady s 20 a více rodiči by měly představovat podobnou úroveň genetické rozmanitosti jako osivo získané z přirozené populace (Johnson and Lipow, 2002).

Hypotéza o větší genetické diverzitě v semenných sadech se v této diplomové práci nepotvrdila. Největší genetická diverzita byla zjištěna v příměstské populaci oproti populacím semenných sadů. Vyšší genetická diverzita příměstské populace mohla být způsobena genovým tokem ze šlechtitelských kultivarů z okolí. Ověřit tuto hypotézu by vyžadovalo další studii, která by měla k dispozici genetické informace o těchto šlechtitelských kultivarech v okolí. Shodné zjištění, totiž že příměstská populace obsahuje vyšší množství informace, a tedy vyšší míru diverzity, uvedla již zmíněná studie Ganopoulose, Aravanopoulose a Tsaftarise, (2013).

Nižší genetická diverzita semenných sadů mohla být způsobena náhodným výběrem rodičů s identickými genotypy mylně považovanými za odlišné. Tito jedinci mohli vzniknout vegetativní propagací (kořenovými výmladky). Kořenové výmladky se běžně vyskytují v populacích třešně ptačí (Russell, 2003). Rozloha kořenových výmladků může být 20 – 5000 m² (Kobliha, 2002). Problematikou kořenových výmladků třešně ptačí se zabývají i tyto práce: v Německu práce (Schueler *et al.*, 2003) a práce (Höltken and Gregorius, 2006), ve Velké Británii (Vaughan, Cottrell, Moodley, Connolly and Russell, 2007), v Řecku (Ganopoulos, Aravanopoulos and Tsiftaris, 2013).

Hypotéza o kořenových výmladcích nejspíše platí i v příměstské populaci, kde byly pozorovány dva identické genotypy v rámci zkoumaných lokusů u dvou různých jedinců, kteří se nacházejí ve své těsné blízkosti. V semenném sadu Čejkovka se vyskytlo celkem 13 identických genotypů. V semenném sadu Obrovice bylo pozorováno celkem 6 identických genotypů. Výsledky také naznačují, že v některých případech mohlo dojít i k záměně při výsadbě jedinců v rámci sadu (dle pozice v sadu), chybnému označení jedinců v sadu nebo k nesprávnému odběru či záměně genetického materiálu pro analýzu. Nevhodný výběr a rozmístění shodných rodičů může s ohledem na reprodukční charakteristiku třešně ptačí mít za následek sníženou produkci semen a nižší genetickou diverzitu v semenných sádkách.

5 Závěr

Cílem práce bylo posoudit populační genetickou diverzitu s využitím mikrosatelitových dat a provést srovnání populací třešně ptačí *Prunus avium* zastoupené ve dvou semenných sadech a příměstské populaci.

Na základě analýzy dat byl zaznamenán největší průměrný efektivní počet alel v příměstské populaci, dále v sadu Čejkovka a nejmenší v sadu Obrovice. Největší průměrný počet alel na lokus byl zaznamenán v příměstské populaci, dále v sadu Čejkovka a nejméně v sadu Obrovice. Největší průměrná pozorovaná i očekávaná heterozygotnost byla zjištěna v příměstské populaci, dále v sadu Čejkovka a nejnižší v sadu Obrovice. Stejný výsledek platí i pro Shannonův informační index.

Vyšší genetická diverzita byla zjištěna v příměstské populaci oproti populacím semenných sadů. Z těchto výsledků je patrné, že při založení semenných sadů mohlo dojít k nevědomému výběru shodných rodičovských stromů nacházejících se ve své blízkosti a vzniklých vegetativní propagací (kořenovými výmladky). Nevhodný výběr a rozmístění shodných rodičů může s ohledem na reprodukční charakteristiku třešně ptačí mít za následek sníženou produkci semen a nižší genetickou diverzitu v semenných sadech. Z tohoto důvodu by bylo dobré před založením semeného sadu testovat rodičovské stromy genetickými metodami. S ohledem na reprodukční charakteristiku třešně ptačí je také v zájmu zamezení snížení produkce semen v semenných sadech použití metody k vhodnému rozmístění příbuzných stromů při plánování semenných sadů ale i při plánování úprav již založených sadů. S tímto nám v současné době velmi napomáhají počítačové programy (algoritmy) pro návrhy semenných sadů (např. schéma COOL, (Bell and Fletcher, 1978), nebo z kvadratických přiřazovacích úloh MI design, (Lstibůrek and El-Kassaby, 2010).

Z pohledu praktického lesnického managementu přispívají informace zjištěné o genetické diverzitě třešně ptačí z této práce k pochopení problematiky a následně i k podpoře zkvalitnění genetických zdrojů skrze výběr jedinců vedoucí k větší diverzitě populací v semenných sadech. Geneticky více diverzifikované populace mají větší potenciál pro vznik stabilnějších a odolnějších porostů proti abiotickým i biotickým činitelům. Diverzifikované porosty se snáze adaptují na změny klimatu, a tímto způsobem napomáhají k ochraně životního prostředí. Vedle přírodních kladů se dá

předpokládat i zvýšení produkce a kvality dřeva (nebo alespoň snížení úbytku produkce) pro majitele lesů, a z toho vyplývající vzrůstající finanční výnosy. Znalosti genetických informací o uvažovaných jedincích ve spolupráci s počítačovými programy podporujícími vhodný návrh semenných sadů nám mohou napomoci k urychlení šlechtitelských programů třešně ptačí.

Přínosem této práce je prohloubení znalostí o populační genetické diverzitě třešně ptačí v České republice.

Seznam literatury a použitých zdrojů

- Adams, G. W. and Kunze, H. A. (1996) 'Clonal variation in cone and seed production in black and white spruce seed orchards and management implications', *Forestry Chronicle*, 72, pp. 475–80.
- Adams, W. T. *et al.* (1992) *Population Genetics of Forest Trees*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Adams, W. T. and Birkes, D. S. (1989) 'Mating patterns in seed orchards'. In *Proceedings of the 20th Southern Forest Tree Improvement Conference*. In University, C. (ed.). Charleston, South Carolina, pp. 75–86.
- Aranzana, M. J. *et al.* (2003) 'A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome', *Theoretical and Applied Genetics*, 106, pp. 819–825.
- Avise, J. C. (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sinauer Associates.
- Bärtels, A. (1988) *Rozmnožování dřevin*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- Bell, G. D. and Fletcher, A. M. (1978) 'Computer organized orchard layouts (COOL) based on the permuted neighborhood design concept', *Silvae Genetica*, 27, pp. 223–5.
- Böhmer, B. (2003) *Atlas chorob a škůdců okrasných rostlin, ovoce a zeleniny*. Praha.
- Brondani, R. P. V. *et al.* (1998) 'Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*', *Theoretical and Applied Genetics*, 97, pp. 816–27.
- van Buijtenen, J. P. (1984) 'Strategies for maintaining the genetic base. How will advanced generation tests differ from first?' In Progeny testing: proceedings of Servicewide Genetics. In *Workshop; Charleston, South Carolina*. Washington, D.C., USA: USDA Forest Service, pp. 566–72.
- Cachi, A. M., & W. (2014) 'Characterization of self-compatibility in sweet cherry varieties by crossing experiments and molecular genetic analysis', *Tree Genet Genomes*, 10(5), pp. 1205–1212.
- Cachi, AM, Wunsch, A. (2014) 'S-Genotyping of sweet cherry varieties from Spain and S-locus diversity in Europe', *Euphytica*, 197, pp. 229–236.
- Campbell, R. K. (1979) 'Genecology of Douglas-fir in a watershed in Oregon Cascades', *Ecology*, 60, pp. 1036–1050.
- Campoy, J. A. *et al.* (2016) 'Genetic diversity, linkage disequilibrium, population structure and construction of a core collection of *Prunus avium* L. landraces and bred cultivars', *BMC Plant Biol*, 16(49).
- Česko. Vláda. Zákon č. 149/2003 Sb., o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnicky významných druhů a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin) - znění od 1. 2. 2022. In *Sbírka zákonů České republiky*. 2003, Částka 57, s. 3279-3294. Dostupné také z WWW: <<https://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/ViewFile.aspx?type=c&id=4141>>
- Chaix, G. *et al.* (2003) 'Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed

- orchard of *Eucalyptus grandis*', *Theoretical and Applied Genetics*, 107, pp. 705–12.
- Chaloupková, K. *et al.* (2016) 'Optimum neighborhood seed orchard design', *Tree Genetics & Genomes*, 12(105).
- Clarke, J. B. and Tobutt, K. R. (2003) 'Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* "Napoleon"', *Molecular Ecology Notes*, 3, pp. 578–580.
- Conkle, M. T. (1981) *Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects*.
- Crane, M. B. and Brown, A. G. (1937) 'Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium*', *L. J. Pomol. Hort. Sci.*, (15), pp. 86–116.
- Crow, J. F. and Kimura, M. (1970) *An Introduction to Population Genetics Theory*, Harper and Row. New York.
- Demesure, B., Sodzi, N. and Petit, R. J. (1995) 'A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast dna in plants', *Mol. Ecol.*, 4, pp. 129–131.
- Demirer, T. (2019) 'Effect of leonardite application on leaf nutrient content and fruit chemical parameters of cherry (*Prunus avium* L.)', *Journal of Plant Nutrition*, 42(19), pp. 2532–2538.
- Dickinson, H. and Antonovics, J. (1973) 'The effects of environmental heterogeneity on the genetics of finite populations', *Genetics*, 73, pp. 713–735.
- Dirlewanger, E. *et al.* (2002) 'Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.)', *Theoretical and Applied Genetics*, 105, pp. 127–138.
- Downey, S.L., Iezzoni, A. F. (2000) 'Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, pp. 76–80.
- Ducci, F. and Santi, F. (1997) 'The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium*)', *Canadian Journal of Forest Research*, 27(12), pp. 1998–2004. doi: 10.1139/x97-159.
- Đurkovič, J. (2006) 'Rapid micropropagation of mature wild cherry', *Biologia Plantarum*, 50(4), pp. 733–736.
- El-Kassaby, Y. A. *et al.* (2014) 'Randomized, replicated, staggered clonal-row ((RSCR)-S-2) seed orchard design', *Tree Genetics & Genomes*, 10(3), pp. 555–563.
- El-Kassaby, Y. A. and Ritland, K. (1986) 'Low levels of pollen contamination in a Douglas-fir seed orchard as detected by allozyme markers', *Silvae Genetica*, 35, pp. 224–9.

- Eriksson, G., Ekberg, I. and Clapham, D. (2006) *An Introduction to Forest Genetics*. 2nd edn. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Fernández i Marti, A. *et al.* (2012) ‘Genetic diversity and relatedness of sweet cherry (*Prunus avium*L.) cultivars based on single nucleotide polymorphic markers’, *Front Plant Sci*, 3, p. 116.
- Francardi, V. and Roversi, P. F. (2000) ‘Seasonal population dynamics of *Myzus cerasi* (F.) (Homoptera, Aphidoidea) and its natural enemies in *Prunus avium* timber plantations’, *Annali dell’ Istituto Sperimentale per la Selvicoltura*, 29, pp. 87–91.
- Funda, T. and El-Kassaby, Y. A. (2012) ‘Seed orchard genetics’, *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 7(JUNE 2012). doi: 10.1079/PAVSNR20127013.
- Gamache, I. *et al.* (2003) ‘Diverging patterns of mitochondrial and nuclear DNA diversity in subarctic black spruce: Imprint of a founder effect associated with postglacial colonization’, *Mol. Ecol.*, 12, pp. 891–901.
- Gillespie, J. H. (2004) *Population genetics: a concise guide (2. ed.)*. Edited by M. Baltimore. The Johns Hopkins University Press.
- Götz, K. P. *et al.* (2014) ‘Seasonal changes of physiological parameters in sweet cherry (*Prunus avium* L.) buds’, *Scientia Horticulturae*, 172, pp. 183–190.
- Grattapaglia, D. and Resende, M. D. V. (2011) ‘Genomic selection in forest tree breeding’, *Tree Genet. Genomes*, 7, pp. 241–255.
- Gupta, P. K., Roy, J. K. and Prasad, M. (2001) ‘Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants’, *Curr Sci*, 80, pp. 524–535.
- Hamrick, J. . (2004) ‘Response of forest trees to global environmental changes’, *Forest Ecology and Management*, 197(1–3), pp. 323–335.
- Hedrick, P. W. (2005) *Genetics of Populations*. 3rd edn. Boston, MA: Jones and Bartlett.
- Hedrick, P. W., Ginevan, M. E. and Ewing, E. P. (1976) ‘Genetic polymorphism in heterogeneous environments’, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7, pp. 1–32.
- Hejny, S. and Slavík, B. (1992) *Květena České republiky*. 3rd edn. Praha: Academia.
- Hormaza, J. I. (2002) ‘Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats’, *Theoretical and Applied Genetics*, 104, pp. 321–328.
- Janick, J. (2005) ‘The origin of fruits, fruit growing, and fruit breeding’, *Plant Breeding Rev.*, 25, pp. 255–320.
- Jarni, K., De Cuyper, B. and Brus, R. (2012) *Genetic variability of wild cherry (Prunus*

avium L.) seed stands on Slovenia as revealed by nuclear microsatellite loci, *Plos ONE* 7 (7): e41231. doi: 10.1371/journal.pone.0041231.

Kato, S. *et al.* (2014) 'Origins of Japanese flowering cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) cultivars revealed using nuclear SSR markers', *Tree Genetics & Genomes* 2, 10, pp. 477–487.

Kleinschmit, J. *et al.* (1993) 'Past, present, and anticipated applications of clonal forestry. In: Ahuja, M.R. and Libby, W.J. (eds.)', *Clonal Forestry II. Conservation and Application*, pp. 9–41.

Kobliha, J. and Lstibůrek, M. (2006) 'Semenné sady jako zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu – minulost, současnost a budoucnost', in: 20. – 21. 6., Bzenec, pp. 4–7.

Korecký J., Bílý J., Sedlák P., L. M. (2017) 'Innovative multiplex and its evaluation for effective genotyping of wild cherry', *Silva Fennica*, 51(3).

Kozłowski, T. T. and Pallardy, S. G. (1979) *Physiology of Woody Plants*. London, UK: Academic Press.

Kremer, B. P. (1995) *Stromy v Evropě zdomácnělé a zavedené druhy*. Praha: Ikar.

Ledig, F. T. (1986) 'Heterozygosity, heterosis, and fitness in outbreeding plants', *Conservation Biology*, pp. 77–104.

Li, Y. C. *et al.* (2002) 'Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review', *Molecular Ecology*, 11(12), pp. 2453–2465. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x.

Lstibůrek, M. and El-Kassaby, Y. A. (2010) 'Minimum-inbreeding seed orchard design', *Forest Science*, 56, pp. 603–8.

Malécot, G. (1948) 'Les mathématiques de l'hérédité'. Paris: Masson.

Matsumoto, D., Tao, R. (2016) 'Recognition of a wide -range of S -RNases by S locus F -box like 2, a general -inhibitor candidate in the *Prunus* -specific S -RNase -based self -incompatibility system', *Plant Mol Bio*, 91, pp. 459–469.

Matsumoto, D., Tao, R. (2019) 'Recognition of S -RNases by an S locus F -box like protein and an S haplotype -specific F -box like protein in the *Prunus* -specific self -incompatibility system', *Plant Mol Biol.*, 100, pp. 367–378.

Matthews, P. and Dow, K. P. (1969) 'Incompatibility groups: sweet cherry (*P. avium*)', pp. 540–544.

Miljković, D. *et al.* (2019) 'Wild cherry (*Prunus avium* (L.)) leaf shape and size variations in natural populations at different elevations', *Alpine Botany*, 129(2), pp. 163–174.

Namkoong, G., Kang, H. C. and Brouard, J. S. (1988) *Tree Breeding: Principles and*

Strategies. New York: Springer-Verlag.

Nanson, A. (1972) 'The provenance seedling seed orchard', *Silvae Genetica*, 21, pp. 243–8.

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

Oliveira, E. J. *et al.* (2006) 'Origin, evolution and genome distribution of microsatellites', *Genetics and Molecular Biology*, 29, pp. 294–307.

Oliver, J. E. *et al.* (2009) 'Genetic diversity of Prunus necrotic ringspot virus isolates within a cherry orchard in New York', *Plant Dis.*, 93(6), pp. 599–606.

Ono, K., Akagi, T., Morimoto, T., Wünsch, A., Tao, R. (2018) 'Genome Re - Sequencing of Diverse Sweet Cherry (*Prunus avium*) Individuals Reveals a Modifi er Gene Mutation Conferring Pollen -Part Self -Compatibility', *Plant Cell Physiol.*, 59(6), pp. 1265–1275.

Petit, R. J. *et al.* (2002) 'Chloroplast DNA variation in European white oaks— Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations', *Forest Ecol. Manag.*, 156, pp. 5–26.

Pfeiffer, A. M., Olivieri, A. M. and Morgante, M. (1997) 'Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.)', *Genome*, 40, pp. 411–419.

Plomion, C. *et al.* (2001) 'Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites', *Canadian Journal of Forest Research*, 31, p. s. 1816-1825.

Porth, I. and El-Kassaby, Y. A. (2014) 'Assessment of the Genetic Diversity in Forest Tree Populations Using Molecular Markers', *Diversity*, 6, pp. 283–295.

Resende, M.D.V. Resende, M. F. R. J. *et al.* (2012) 'Genomic selection for growth and wood quality in Eucalyptus: Capturing the missing heritability and accelerating breeding for complex traits in forest trees', *New Phytol.*, 194, pp. 116–128.

Russell, J. H., Burdon, R. D. and Yanchuk, A. D. (2003) 'Inbreeding depression and variance structures for height and adaptation in self- and outcross Thuja plicata families in varying environments', *Forest Genetics*, 10, pp. 171–84.

Russell, K. (2003) *Technical Quidelines for genetic conservation and use for wild cherry (Prunus avium)*, Euforgen. Rome.

Sauer, J. D. (1988) *Plant migration the dynamics of geographic patterning in seed plant species*. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, California.

Schmidt, T. and Heslop-Harrison, J. S. (1996) 'The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet', *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

93(16), pp. 8761–8765.

Schueler, S. *et al.* (2003) ‘Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes’, *Genome*, 46, pp. 95–102.

Schueler, S., Tusch, A. and Scholz, F. (2006) ‘Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites’, *Mol Ecol*, 15, pp. 3231–3243.

Schuster, M. (2012) ‘Incompatible (S-) genotypes of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.)’, *Scientia Horticulturae*, (148), pp. 59–73.

Sharma, K. *et al.* (2017) ‘S-genotype diversity in wild cherry populations in the Czech Republic’, *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48(1), pp. 92–97.

Smouse, P. Peakall, R. (2015) ‘GenAlEx 6.502 Appendix 1 Methods and Statistics’.

Snustad, D. P. and Simmons, M. J. (2009) *Genetika*. Brno.

Straže, A. *et al.* (2008) ‘Research on colour variation of steamed cherrywood (*Prunus avium* L.)’, *Wood Research*, 53(2), pp. 77–90.

Struss, D., Ahmad, R. and Southwick, S. M. (2003) ‘Analysis of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars Using SSR and AFLP Markers’, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, pp. 904–909.

Sutton, B. C. S. *et al.* (1991) ‘Inheritance of chloroplast and mitochondrial-dna in *Picea* and composition of hybrids from introgression zones’, *Theor. Appl. Genet.*, 82, pp. 242–248.

Sutton, B. C. S., Flanagan, D. J. and El-Kassaby, Y. A. (1991) ‘A simple and rapid method for estimating representation of species in spruce seedlots using chloroplast DNA restriction-fragment-length-polymorphism’, *Silvae Genet.*, 40, pp. 119–123.

Svoboda, J. *et al.* (2010) ‘Koncepte zachování a reprodukce genových združení lesních dřevin u Lesů České republiky, s. p., na období 2010 - 2019’. Lesy České republiky, s.p., p. 40.

Takayama, S. and Isogai, A. (2005) ‘Self-incompatibility in plants’, *Annual Review of Plant Biology*, 56, pp. 467–489. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144249.

Tao, R., Iezzoni, A. F. (2010) ‘The S -RNase -based gametophytic self -incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features’, *Sci. Hortic.*, 124, pp. 423–433.

Testolin, R. *et al.* (2000) ‘Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars’, *Genome*, 43, pp. 512–520.

ÚHÚL, B. nad L. (2020) ‘Informace o reprodukčním materiálu lesních dřevin ČR’.

Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem.

Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A.M., Gradziel, T.M., Tao, R., Hirano, H. (2003) 'Structural and Transcriptional Analysis of the Self-Incompatibility Locus of Almond: Identification of a Pollen-Expressed F-Box Gene with Haplotype-Specific Polymorphism', *Plant Cell*, 15(3), pp. 771–81.

Vaughan, S. P. *et al.* (2007) 'Distribution and finescale spatial-genetic structure in British wild cherry (*Prunus avium* L.)', *Heredity*, 98, pp. 274–283.

Vaughan, S. P. and Russell, K. (2004) 'Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*', *Molecular Ecology Notes*, 4, pp. 429–431.

Walker, A. (2009) *Dřevo velká encyklopedie : 150 druhů dřeva : podrobný průvodce 'strom za stromem' : svět nejvšestrannějšího přírodního zdroje*. Praha: Grada.

Ward, M. *et al.* (2005) 'To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees', *Heredity*, 95, pp. 246–254.

Wheeler, N. and Jech, K. (1986) 'Pollen contamination in a mature Douglas-fir seed orchard', in *In Proceedings from IUFRO Conference on Breeding Theory, Progeny Testing and Seed Orchards*. Williamsburg, VA, pp. 160–71.

White, T. L., Adams, W. T. and Neale, D. B. (2007) *Forest genetics*, CAB International. doi: 10.1038/167764a0.

Wright, S. (1931) 'Evolution in Mendelian populations', *Genetics*, 16, pp. 97–159.

Wright, S. (1969) 'Evolution and the Genetics of Populations', *The Theory of Gene Frequencies*. Chicago IL: University of Chicago Press.

Yamane, H., Ikeda, K., Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R. (2003) 'pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*', *Plant Cell Physiol.*, 44(7), pp. 764–9.