

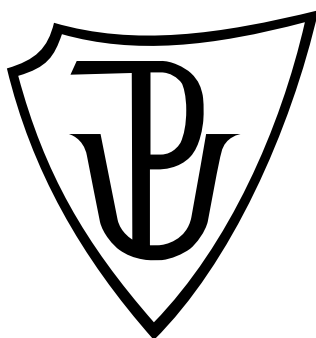
Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Barbora Hanzlíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Populační genetiky vrby hrotolisté (*Salix hastata*) a jejich kříženců ve Velké Kotlině v Hrubém Jeseníku

Diplomová práce

Bc. Barbora Hanzlíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: RNDr. Radim Jan VAŠUT, Ph.D.

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE A SOUHRN

Jméno a příjmení autora: Bc. Barbora Hanzlíková

Název práce: Populační genetika vrby hrotolisté (*Salix hastata*) a jejich kříženců ve Velké kotlině v Hrubém Jeseníku

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: RNDr. Radim Jan VAŠUT, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Klíčová slova: *Salix hastata*, mikrosatelity, SSR, hybridizace

Počet stran: 50

Počet příloh: 0

Jazyk: český

SOUHRN

Silně ohrožený druh *Salix hastata* je na své jediné makrolokality v Česku, tj. ve Velké kotlině v Hrubém Jeseníku zdánlivě ohrožený hybridizací s běžnějším horským druhem *S. silesiaca*. Vnitropopulační charakteristiky populace tohoto druhu, rozsah a směr hybridizace není ale dosud uspokojivě známý. S pomocí sedmi mikrosatelitů jsem se pokusila navázat na dřívější výzkum této populace s cílem zjistit neznámé populační charakteristiky. I přes dvojí opakování analýz se podařilo fragmentační analýzou vizualizovat PCR produkty pouze pro tři ze sedmi mikrosatelitů a tato data nedokázala poskytnout dostatečnou informaci o populaci. V práci diskutuji metodiku, dřívější výsledky a možný budoucí směr výzkumu.

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION AND SUMMARY

Author's first name and surname: Bc. Barbora Hanzlíková

Title: Population genetics of the halberd willow (*Salix hastata*) and its hybrids in the Velká Kotlina of the Hrubý Jeseník Mts.

Type of thesis: master

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc

Supervisor: RNDr. Radim Jan VAŠUT, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Keywords: *S. hastata*, microsatellites, SSR, hybridization

Number of pages: 50

Number of appendices: 0

Language: Czech

SUMMARY

The highly endangered species *Salix hastata* is on its only macrolocality in the Czech Republic, ie in the Great Basin in the Hrubý Jeseník, seemingly endangered by hybridization with the more common mountain species *S. silesiaca*. However, the intra-population characteristics of the population of this species, the extent and direction of hybridization are not yet satisfactorily known. With the help of seven microsatellites, I tried to build on previous research of this population in order to find out unknown population characteristics. Despite duplicate analyzes, PCR products were able to visualize PCR products for only three of the seven microsatellites, and these data failed to provide sufficient information about the population. In this work I discuss the methodology, past results and possible future direction of research.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování patří mému vedoucímu práce RNDr. Radimu J. Vašutovi, Ph.D. za dohled a vedení práce a pomoc při vyhodnocování analytických dat a za poskytnutí nepublikovaných dat z jeho výzkumu (nedokončené analýzy SSR B. Trnkové, grafické výstupy z nepublikovaných DArTseq analýz). Výzkum byl podpořen interním grantem PřF UP IGA_PrF_2020/001.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Evě Hříbové, Ph.D. a Mgr. Lucii Bílkové za možnost provádět část práce pod jejich dohledem.

Obsah

Seznam obrázků	vi
Seznam tabulek.....	vi
1. Úvod	1
2. Cíl práce.....	2
3. Literární přehled	3
3.1. Rod <i>Salix</i>	3
3.2. <i>Salix hastata</i>	7
3.3. Hybridizace a introgrese u vrb	9
3.4. Molekulární markery využívající se u rostlin.....	14
4. Materiál a metody.....	18
4.1. Rostlinný materiál	18
4.2. Použité chemikálie, soupravy	18
4.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	19
4.4. Použité mikrosatelity	19
4.5. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	20
4.5.1. Sběr a uchování rostlinného materiálu	20
4.5.2. Izolace DNA.....	22
4.5.3. Kontrola extrahované DNA a stanovení její koncentrace pomocí Nanodropu	22
4.5.4. Amplifikace DNA	23
4.5.5. Purifikace PCR produktů VF125NT8	24
4.5.6. Fragmentační analýza.....	25
4.5.7. Analýza dat.....	26
5. Výsledky.....	28
5.1. Měření koncentrace pomocí Nanodropu	28
5.2. Výsledky Ověření kvality DNA	29
5.3. Amplifikace DNA	29
5.4. Ověření přítomnosti PCR produktů po purifikaci	30
5.5. Fragmentační analýza.....	31
5.6. Složení populace.....	34
5.7. Vyhodnocení a srovnání dřívějších výsledků.....	36
6. Diskuze	38
6.1. Experimentální část	38
6.2. Hybridizace <i>S. hastata</i> a <i>S. silesiaca</i>	39
6.3. Další postup řešení problematiky	39
7. Závěr.....	42
8. Literatura	43

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1:	4
Obrázek 2:	6
Obrázek 3:	7
Obrázek 4:	8
Obrázek 5:	9
Obrázek 6:	12
Obrázek 7:	17
Obrázek 8:	29
Obrázek 9:	30
Obrázek 10:	31
Obrázek 11:	34
Obrázek 12:	35
Obrázek 13:	35
Obrázek 14:	36
Obrázek 15:	37
Obrázek 16:	37
Obrázek 17:	40
Obrázek 18:	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1:	19
Tabulka 2:	21
Tabulka 3:	23
Tabulka 4:	23
Tabulka 5:	24
Tabulka 6:	24
Tabulka 7:	25
Tabulka 8:	25
Tabulka 9:	26
Tabulka 10:	28
Tabulka 11:	32

1. ÚVOD

Modelovým organismem této studie je silně ohrožený druh vrby *Salix hastata*, která má v České republice ojedinělý výskyt, a to v subalpínských mokřadech ve Velké kotlině v Hrubém Jeseníku, kde se vyskytuje okolo sta jedinců, a na jedné mikrolokalitě v prameništi pod Petrovými kameny. V takto malých populacích je velká pravděpodobnost, že dojde ke snížení genetické diverzity, vzniku inbreedingu a zvýšení rizika vzniku stochastických jevů jako genetický posun. Všechny tyto jevy společně se snižováním biodiverzity a fragmentací krajiny vedou ke zvýšenému riziku ohrožení druhu. Dřívější pozorování prokázaly hojný výskyt křížence tohoto vzácného druhu s běžnou *Salix silesiaca*. Právě proces hybridizace a introgrese je zvláště u vrb velmi časným jevem, který ovlivňuje složení populací a v mnohých případech znemožňuje určování a odlišování jednotlivých druhů. Z vědeckého hlediska a z pohledu potřeb ochrany přírody není dosud přesně známá míra hybridizace mezi oběma druhy a zda je druh *S. hastata* ohrožena introgresí se *S. silesiaca*. Této problematice se dříve věnovala B. Trnková (roz. Brandová), která zjistila ekologicko-prostorovou separaci *S. hastata* a jejich kříženců ve Velké kotlině (Brandová, 2008 a 2010), optimalizovala vybrané mikrosatelity (Brandová, 2008 a 2010, Sochor, 2009) a provedla morfometrickou analýzu (Brandová *et al.*, nepublikováno). Má diplomová práce navazuje na dřívější práci B. Trnkové a jejím cílem je rozšířit znalosti o populacích *S. hastata* v České republice.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je analyzování genetické a genotypové variability studované vrby *S. hastata* a jejich kříženců nalezených v Hrubém Jeseníku a posouzení charakteru této unikátní populace. Dalším krokem bylo popsání frekvence a směr hybridizace mezi *S. hastata* a *S. silesiaca* v téže lokalitě a posoudit možnou účast dalších druhů na hybridizaci v této populaci.

Tato práce navazuje na dřívější nedokončený výzkum Blanky Trnkové (Brandová 2008, 2010), která provedla ve spolupráci s Mgr. Evou Hřibovou, Ph.D. optimalizaci mikrosatelitů pro komplex *S. hastata* a *S. silesiaca*, pilotní analýzy s několika mikrosatelity a kompletní morfometrické analýzy (R. J. Vašut, ústní sdělení). Její práce přinesla zajímavé dílčí výsledky a cílem mé práce bylo tedy na tento výzkum navázat a dokončit jej.

V průběhu realizace vyvstaly potíže s analýzou mikrosatelitů, proto doplňujícím cílem byla analýza menšího počtu vzorků, ale s využitím celo-genomové analýzy pomocí DArTseq genotypování.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. ROD *SALIX*

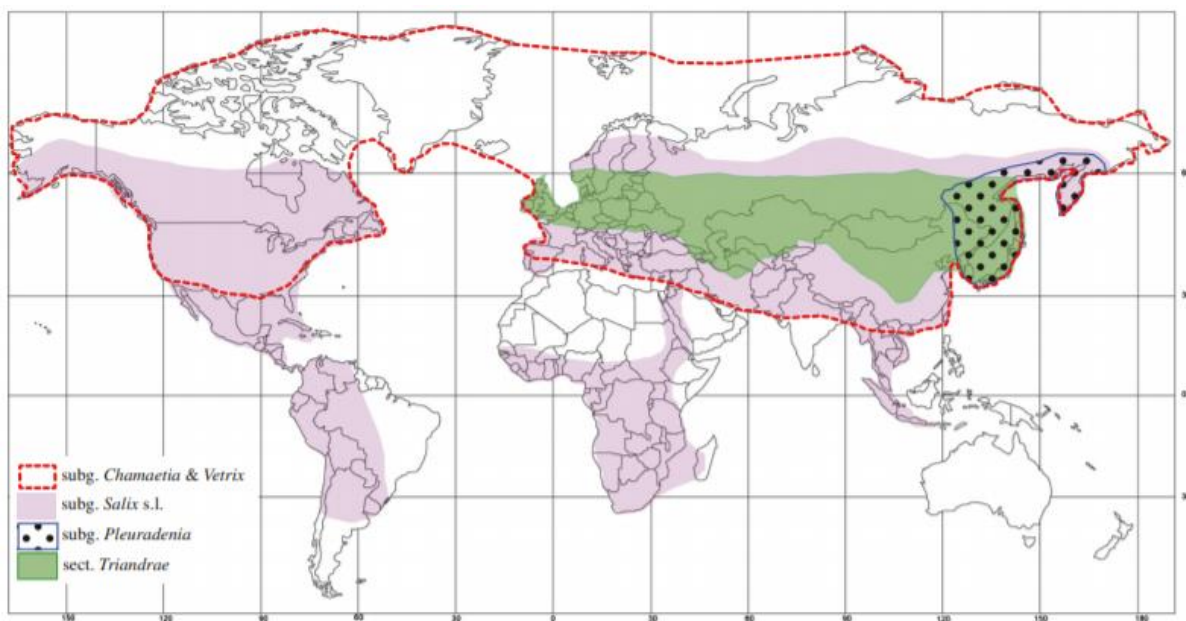
Rod *Salix* je řazen do čeledi vrbovité (*Salicaceae*). Tento rod sestává asi ze 300-550 druhů (Chao, 1987; Fang, 1987; Chmelař a Koblížek, 1990; Skvortsov, 1999), které mají téměř celosvětové rozšíření s těžištěm výskytu převažujícím na severní polokouli. Nejrozšířenější jsou vrby v severní Eurasii, severní Americe a v horách východní Asie (především v Číně). Vrby jsou výhradně dřeviny, které mohou dosahovat velikosti obrovských vzpřímených stromů (*S. cardiophylla* může být vysoká až 35 m; *S. alba* a *S. excelsa* až 30 m, průměr jejich kmene může být až 1 m) nebo mohou tvořit malé keře velké jen několik centimetrů (Skvortsov, 1999). Za nejmenší vrbu České republiky je považována *S. herbacea*, která se vyskytuje ve vysokohorských oblastech, kde roste ve formě drobných zakrslých keřů dorůstajících do velikosti až 8 cm (Šimíček, 1992). V jižní Evropě dochází k postupnému zvýšení diverzity vrb od jihu na sever, průměrný počet taxonů v porostu v jižní Evropě jsou tři, kdežto v severní Evropě je to taxonů šest (Cronk, 2015).

Vrby jsou dvoudomé opadavé stromy i keře, u kterých probíhá opylení pomocí větru a hmyzu, jejich semena jsou morfologicky přizpůsobena svojí drobnou velikostí (0,8-3 mm) a ochmýřením na šíření pomocí větru (Vašut *et al.*, 2013). Semena vykazují velkou klíčivost, které se vlivem sucha rychle snižuje, v 1 kg je přibližně 1.000.000 semen (Šimíček, 1992). Vrby jsou poměrně nenáročné dřeviny, které snadno snášejí různé půdní typy a snadno se přizpůsobí odlišným vodním režimům, nicméně mají velmi vysoké nároky na světlo, což je řadí mezi tzv. heliofyty (Šimíček, 1992). Důležitým faktorem pro rozšíření a hojnost druhů je dostupnost vlhkosti, která je nezbytná pro klíčení semen, pojmenování *Salix* je pravděpodobně odvozeno z keltského slova „sallies“, „sal“ znamená „blízko“ a „lis“ znamená „voda“ (Newsholme, 1992). Na rozdíl od jiných rostlin se vrby snadno přizpůsobují i velkým změnám v množství vody v půdě a jsou schopny překonávat velké výkyvy ve výšce vodní hladiny spodních vod (Šimíček, 1992). Z tohoto důvodu patří vrby mezi nejčastější kolonisty vodních okrajů, a to zejména kvůli otevřenému prostoru a dostatečné vlhkosti stanoviště, což vytváří příznivé prostředí právě pro klíčení semen (Isebrands a Richardson, 2013).

Vrby mají mohutný kořenový systém, v kterém je zachován hlavní kořen a dále se zde vyskytují silně rozvětvené postranní kořeny, pupeny jsou většinou kryté jednou (vzácně dvěma) šupinami (Chmelař a Koblížek, 1990). Nejčastějším typem listů u vrb je střídavý, listy jsou celistvé většinou s krátkými řapíky a vykazují velký rozsah variací mezi druhy, a to hlavně ve velikosti, textuře a tvaru listu (Newsholme, 1992). I přes proměnlivost listů uvnitř druhů,

zůstávají listy stěžejním znakem při identifikaci a taxonomickém zařazení jednotlivých druhů (Šimíček, 1992). Palisty se vyskytují u všech druhů vrb s výjimkou *S. purpurei*, kde úplně chybí (Šimíček, 1992). Květenstvím jsou vzpřímené jehnědy, a jelikož jsou vrby dvoudomé jedna rostlina může nést pouze jeden typ (buď samčí nebo samičí) jehněd, lidově označovány jako „kočičky“ (Šimíček, 1992). Výjimečně mohou být květy jedné jehnědy bisexuální, popřípadě mohou jehnědy produkovat jak samčí, tak samičí květy jako je tomu například u *S. aegyptiaca* (Newsholme, 1992). Jehnědy se u jednotlivých druhů odlišují v délce a tvaru a mohou se tvořit před, po nebo současně s tvorbou listů, některé druhy mohou nést jehnědy po celé jaro a léto (*S. triandra*) (Newsholme, 1992). Jakmile dojde k opylení vajíček, začínají se vyvíjet semena, které zrají 3-5 týdnů (Šimíček, 1992) Plodem u vrb je tobolka s dvěma otevírajícími se chlopněmi (Chmelař a Koblížek, 1990).

Taxonomie a systematika u rodu *Salix* byla a je stále obtížná, a to kvůli dvojdomé reprodukci, jednoduchým květům, běžné přirozené hybridizaci a rozdílné fenotypové plasticitě (Skvortsov, 1999). V současné době je v Evropě stále používán systém rozdělení podle Skvortcova a to na tři podrody: subgen. *Salix*, subgen. *Vetrix* a subgen. *Chamaetia* (Skvortsov, 1999). Výskyt jednotlivých poddruhů znázorňuje Obrázek 1.



Obrázek 1: Geografické rozložení hlavních linií rodu *Salix* (převzato Wu *et al.*, 2015).

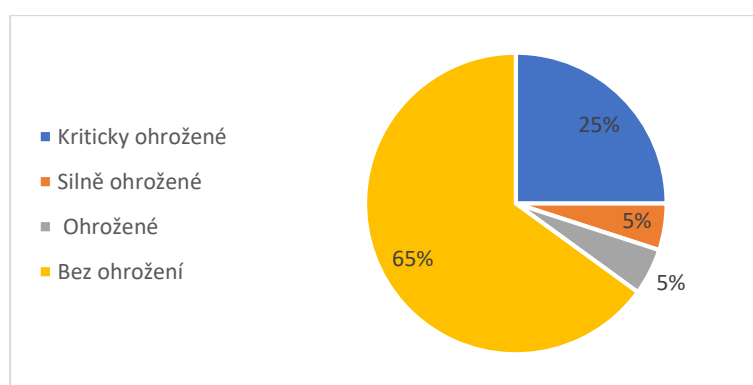
Chromozomy vrb jsou malé a uniformní. Základní chromozomové číslo je 19 ($2n = 38$), příležitostně se může v genomu vyskytovat chromozomů 22, což je pravděpodobně následek jejich fragmentace (Skvortsov, 1999). U rodu se poměrně často setkáváme s polyploidii, která

se pohybuje od diploidie (2n) až do dodekaploidie (12n), naprostá většina vrby v České republice jsou diploidní druhy, včetně studovaných druhů *S. hastata* a *S. silesiaca* (a další potenciálně křížících se druhů jako *S. aurita*, *S. caprea* nebo *S. purpurea* (Vašut *et al.*, 2013).

Vrby mají svůj význam i v různých odvětvích průmyslu. Svoje využití nachází vrbové dřevo se svým červenohnědým až šedohnědým zabarvením hlavně v truhlářské výrobě nebo při výrobě nábytku. Vrbové proutky se pěstují na výrobu proutěného nábytku nebo na pletení košů, což je jedno z jedním z nejstarších řemesel, které se dochovalo až do dnešní doby. Vrby jsou také známe pro léčivé vlastnosti jejich kůry a listů. V mladých stoncích vrby se nachází míza, jejíž glukosidová složka salicin byl po mnoho let extrahován a používán jako analgetikum při příznacích horečky a za účelem snižování bolesti, v dnešní době bylo jeho využití nahrazeno syntetickou výrobou kyseliny acetylsalicylové, která je součástí léku aspirinu (Newsholme, 1992). Množství salicinu je pro každý druh vrby individuální, největší množství obsahuje *S. purpurea* a to až 7 % a některé druhy neobsahují salicin žádný jako například *S. cinerea* (Korbelář a Endris, 1981). Své využití v lékařství má i vrbová kůra, která se sbírá brzy na jaře z dvouletých nebo tříletých větví vrby, takto získaná kůra se využívala pro snížení dráždivosti nervové soustavy, kůra také obsahuje až 10 % tříslovin, které působí proti průjmům (Korbelář a Endris, 1981). V poslední době se začaly rozmáhat vrbové plantáže za účelem využití vrby při získávání bioenergie (Isebrands a Richardson, 2013). Biopalivo je ekologicky nadějný zdroj, který umožňuje snižovat hladiny skleníkových plynů, množství kyselého deště, zabraňovat erozi půdy a znečišťování vody a také se díky jeho používání snižuje závislost na fosilních palivech (Kuzovkina a Quigley, 2005). Rod *Salix* má také svůj potenciál na využití ve fytořemediaci půdy, což je schopnost rostlin odstranit znečišťující látky z prostředí pomocí chemických a metabolických procesů. Vrby pro toto využití splňují většinu požadavků, jsou rychle rostoucí, snadno se množí a mají rozsáhlý kořenový systém se schopností akumulovat znečišťující látky (Kuzovkina a Quigley, 2005). Vrby jsou odolné vůči některým kovům jako je kadmium, zinek, měď, nikl, olovo nebo železo, a jsou schopné tyto kovy akumulovat ve svých tkáních. Výhodou vrby oproti jiným bylinným rostlinám, které se k tomuto účelu využívají, je schopnost vrby tvořit hlubší a rozsáhlejší kořenové systémy, a tak mohou být odstraněny i kovy nacházející se v hlubších vrstvách půdy (Kuzovkina a Quigley, 2005). Vrby jsou také často využívány k zajištění stability břehů, kde pomáhají zabraňovat abrazi (eroze způsobená pohybem hladiny). Jejich výhodou je, že jsou schopny snášet zaplavení kořenů, nejčastějším druhem vysazovaným podél břehů je *Salix fluviatilis* (Gebauer *et al.*, 2010).

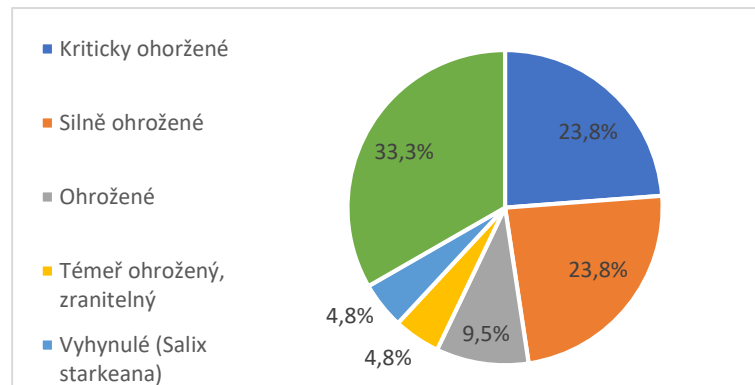
Řada rodů dřevin v České republice je v různém stupni ohrožení, a to hlavně z důvodu neustálého poklesu jedinců v daných populacích, což je pravděpodobně způsobeno

nejrůznějšími antropickými vlivy jako jsou například fyzické ničení biotopů, radikální změna ekotopu, nevhodné hospodaření a mnoho dalšího. Tyto rozsáhlé zásahy člověka vedli odborníky k vytvoření tzv. červených seznamů (Úradníček, *et al.*, 2017). V České republice se vyskytuje 21 původních druhů vrb (Daníhelka *et al.*, 2012). Z toho je 7 druhů vrb chráněno zákonem o ochraně přírody a krajiny (vyhláška č. 395/1992 Sb.). Řada takto chráněných druhů je většinou chráněna i územně prostřednictvím chráněných území. Zákonem chráněné druhy vrb jsou znázorněny na Obrázku 2. Ke kriticky ohroženým dřevinám z rodu *Salix* se řadí *S. bicolor*, *S. herbacea*, *S. lapponum*, *S. myrtilloides*, *S. nigricans*, silně ohrožená je *S. appendiculata* a ohrožená *S. repens*. Ostatní vrby spadají do kategorie bez ohrožení, a tudíž nejsou chráněny zákonem (Úradníček, *et al.*, 2017).



Obrázek 2: Zákonem chráněné druhy vrb v České republice (zpracováno podle Úradníček, *et al.*, 2017).

Červené knihy/seznamy jsou na rozdíl od legislativně tvořených seznamů založeny na studiu stavu výskytu jednotlivých taxonů a změny v četnosti populací. Pro jejich sestavování jsou používány dostupné herbáře a další relevantní data (ekologická, populační, genetická). Ve většině států nejsou Červené seznamy právně závazné (Úradníček, *et al.*, 2017). Na základě Červeného seznamu z roku 2017 jsou do kategorie kriticky ohrožené řazeny tyto druhy vrb (Obrázek 3) *S. myrtilloides*, *S. herbacea*, *S. bicolor*, *S. lapponum* var. *daphneola*, *S. appendiculata*. Do skupiny silně ohrožených jsou zařazeny druhy *S. myrsinifolia*, *S. hastata*, *S. lapponum*, *S. repens*, *S. elaeagnos*. Jako ohrožené jsou vedeny *S. daphnoides* a *S. rosmarinifolia* a jako téměř ohrožená *S. pentandra* (Úradníček, *et al.*, 2017). Za vyhynulý druh vrby je považován *S. starkeana* (Brandová, 2008 a 2010; Grulich, 2012; Grulich a Chobot, 2017).



Obrázek 3: Ohrožené druhy vrb v České republice (zpracováno podle Grulich, 2012; Úradníček, *et al.*, 2017).

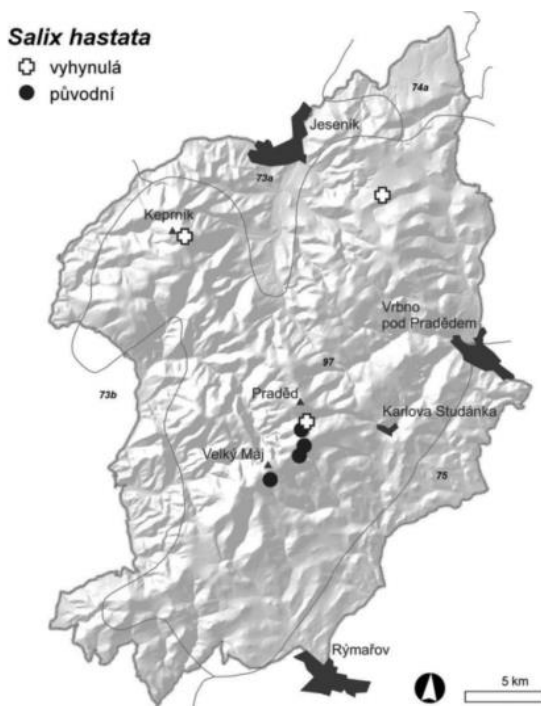
3.2. *SALIX HASTATA*

Český název pro *Salix hastata* je vrba hrotolistá popřípadě vrba šípová. Vyskytuje se po celé severní polokouli nejčastěji v boreálním pásmu Eurasie a na Aljašce, v teplejších oblastech se vyskytuje ostrůvkovitě ve vyšších horách (Chmelař a Koblížek, 1990). U nás roste pouze v Hrubém Jeseníku (Brandová, 2008 a 2010), na Slovensku ji nalezneme v Belanských Tatrách, Nízkých Tatrách a ve Velké Fatře (Šimíček, 1992).

Tradičně je přijímán koncept druhu, který se rozpadá na 3 poddruhy, a to na vrbu hrotolistou pravou (*Salix hastata* L. subsp. *hastata*), která se vyskytuje nejbližší ve slovenských Karpatech, na vrbu hrotolistou svěží (*Salix hastata* L. subsp. *vegeta*) (Chmelař a Koblížek, 1990) a na *Salix hastata* L. subsp. *Subintegrifolia*, které se vyskytuje v severních oblastech Skandinávie, Ruska, na Sibiři a v Severní Americe, tento koncept je přijímán i u nás (Elven a Karlsson, 2000; Hroneš *et al.*, 2014).

Poddruh *vegeta* je poloplazivý keř, který dosahuje maximální velikosti 2 metrů a délka jeho života je přibližně 30 let. Jeho kmen je v průměru velký asi 3 cm a vyrůstají z něho vystoupavé větve (Chmelař a Koblížek, 1990). Listy jsou u tohoto poddruhu eliptické až okrouhlé, po okrajích pilovité, nahoře zašpičatělé. Mladé listy mají na líci řídké chloupky, na rubu jsou hustě chlupaté, v průběhu času chloupky mizí (Šimíček, 1992). Z rubové strany jsou listy světle zelené až bělavé, lysé se síťnatou žilnatinou (Chmelař a Koblížek, 1990). Palisty jsou u této vrby dobře vyvinuté, velké, srdčitého tvaru, k jejich opadávání dochází současně s listy. Rozdílem od ostatních vrb je, že se žlázy vyskytují i na ploše palistu (Šimíček, 1992). Jehnědy jsou válcovité dlouhé 2-4 centimetry. Samčí květy obsahují 2 tyčinky a lysé nitky, samičí květy mají stopkaté lysé semínko, blizny jsou zakřivené a dvoulaločné. Květní listeny samičích květů jsou narůžovělé až světle hnědé (Chmelař a Koblížek, 1990). Hlavní kvetoucí období této vrby je květen a červen (Šimíček, 1992).

Keř se vyskytuje na vlhkých svazích podél potoků, často na půdách bohatší o minerály, upřednostňuje bazické podklady, jedná se o světlomilnou rostlinu (Úradníček *et al.*, 2009). V České republice se vyskytuje v oblasti Hrubého Jeseníku, kde bylo nalezeno 12 historických lokalit výskytu, nyní se nejspíše vyskytuje pouze ve Velké a Malé kotlině a na svazích pod Petrovými kameny (viz Obrázek 4). V ostatních oblastech vrba zřejmě vyhynula nebo zde byly nalezeny jen kříženci se *Salix silesiaca* (Brandová, 2008 a 2010; Hroneš *et al.*, 2014).

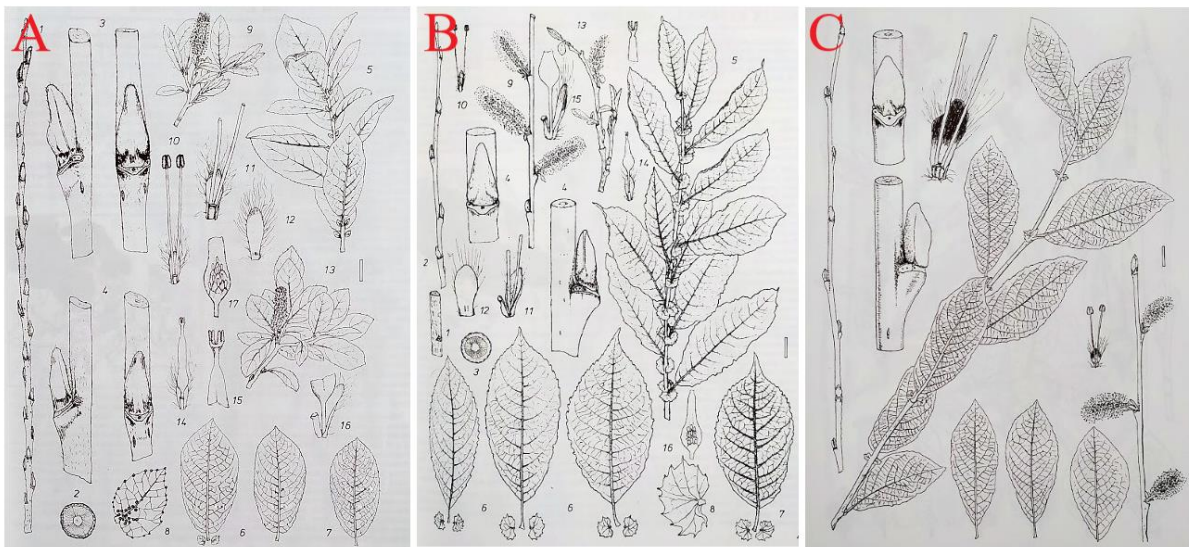


Obrázek 4: Výskyt vrby hrotolisté (*Salix hastata*) v oblasti Hrubého Jeseníku (převzato Hroneš *et al.*, 2014).

Většina populace, okolo sta jedinců, této vrby se vyskytuje v již zmíněné Velké kotlině, kde dochází ke křížení mezi vrbou hrotolistou (*S. hastata*) a vrbou skezskou (*S. silesiaca*) a vzniká zde kříženec zvaný *Salix×chlorophana*, který byl z této lokality poprvé popsán (Andersson 1865). Tento kříženec na zdejší lokalitě převažuje, nicméně bylo prokázáno, že oba rodiče i kříženec se od sebe odlišují upřednostňováním rozdílných typů biotopů, proto bylo ohrožení vrby hrotolisté hybridizací vyvráceno (Brandová a Vašut, 2010).

Salix silesiaca dosahuje větší velikosti než *S. Hastata* a to až 4 metrů, za příznivých podmínek může být i vyšší. Její velikosti a tvar je do značné míry ovlivněn stanovištěm a nadmořskou výškou (Šimíček, 1992). Délka života je přibližně 40 let (Chmelař a Koblížek, 1990). Jedním z hlavních rozlišovacích znaků této vrby je odlupující se korkové pletivo, které se výrazně podobá lískové kůře (Šimíček, 1992). Listy má eliptické až široce vejčité, na konci se zužují do špičky, na líci lysé, na rubu rozptýlené chloupky. Okraje listů jsou hrubě pilovité

a po celém obvodu různě zvlněné, rašící listy jsou zbarveny do červena (Chmelař a Koblížek, 1990). *S. silesiaca* začíná kvést před nebo zároveň s rašením listů. Jehnědy má přisedlé na krátkých stopkách. Stanoviště výskytu jsou vlhká a chladná horská údolí, strže horských potoků. Jelikož je schopná snést mírný zástin může být nalezena i v lesích. V České republice se vyskytuje v Krkonoších, Sudetech a Beskydech (Šimíček, 1992). Srovnání morfologie taxonů *S. hastata*, *S. silesiaca* a jejich křížence je znázorněn na Obrázku 5.



Obrázek 5: Srovnání morfologie dvou druhů vrb a jejich hybrida. A: *S. hastata*, B: *S. silesiaca*, C: hybrid *S. hastata* L x *S. silesiaca* wild (převzato ze Šimíček, 1992).

3.3. HYBRIDIZACE A INTROGRESE U VRB

Jako přirozenou hybridizaci označujeme jev, kdy dochází k sekundárnímu kontaktu mezi dlouhodobě izolovanými taxony ve volné přírodě (Genovart, 2009). V minulosti panovaly mezi biology rozdílné názory na roli hybridizace v evoluci. Zoologové považovali hybridizaci za izolovaný proces, které vede k taxonomickým nejasnostem, zatímco botanici na ni nahlíželi jako na další evoluční proces (Genovart, 2009). V dnešní době je hybridizace považována jako jeden z důležitých evolučních procesů u rostlin (Mallet, 2005; Whitney *et al.*, 2010). Hybridizace ovlivňuje evoluci několika způsob, jedná se o jednu z forem genetické rekombinace, vlivem jejího působení dochází ke generování nových genotypů, které mohou osidlovat nová stanoviště. Při stabilizaci hybridních populací, často pomocí polyploidie nebo introgrese, můžou dojít k tvorbě nových biologických druhů a pokud dojde ke křížení hybrida s jedním rodičovským druhem, může docházet k toku genů mezi druhy (Stebbins, 1959). Téměř ve všech případech vede přirozená hybridizace ke vzniku alespoň několika životaschopným potomkům s určitou mírou plodnosti (Arnold, 1997).

Jedinec, který je označován jako hybrid, je takový organismus, který vznikl křížením mezi jedinci různých druhů (Rieseberg, 1997). Hybridní zóna je oblast v přírodě, kde dochází k prostorovému a časovému překryvu a křížení mezi dvěma populacemi jedinců, kteří se liší v jednom nebo více dědičných znacích (Arnold, 1997). U rostlin bývají hybridní zóny rozptýlené, nelze je dobře geograficky rozlišit, a je pro ně charakteristický výskyt hybridů ve skupinách převážně na hranicích mezi různými stanovišti (Harrison a Harrison, 1993).

Mezi většinou druhů existuje pouze nízká četnosti tvorby hybridů, a to z toho důvodu, že jejich vznik je ovlivněn reprodukčními bariérami, které se snaží hybridizaci omezit (Mallet, 2005). Většinou dochází k adaptaci hybridů, pokud dojde k narušení nebo změnám v prostředí typického pro rodičovské druhy (Triest *et al.*, 1997). Častým příkladem, kdy k hybridizaci dochází je tání ledovců vlivem globálního oteplování, které zasahuje mimo jiné i evropské Alpy. Zde bylo prokázáno, že dochází ke zrychlenému tání ledovců již od 80. let 20. století (Paul *et al.*, 2004). Díky těmto událostem dochází k sekundárnímu kontaktu mezi některými druhy vrb a vznikají hybridi, kteří jsou schopni osidlovat extrémní podmínky, což umožňuje jejich soužití s rodičovskými druhy (Gramlich *et al.*, 2016).

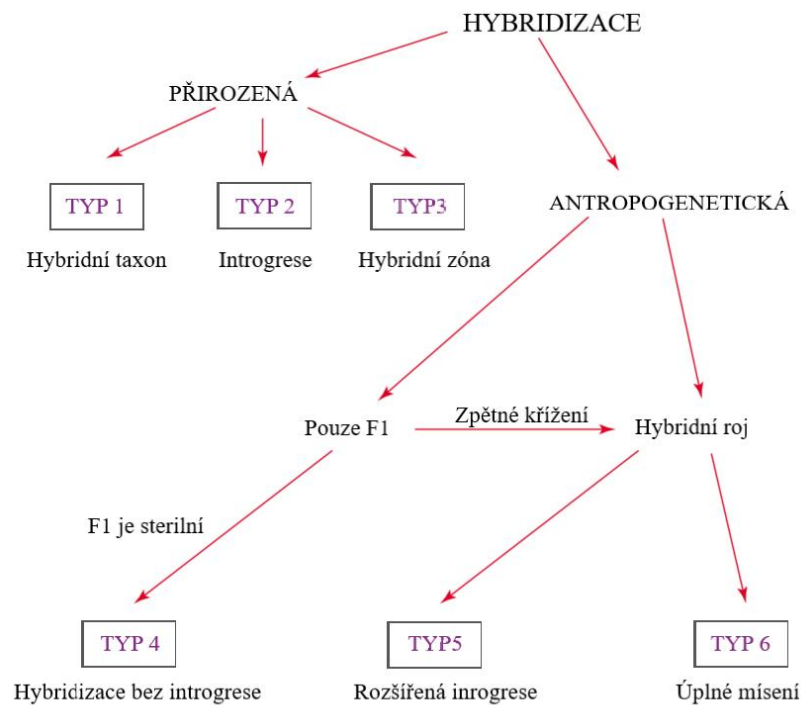
Nepoměrně častěji dochází k hybridizaci druhů uvnitř rodů, než mezi jednotlivými rody (Whitney *et al.*, 2010). U některých skupin organismů se hybridizace vyskytuje mnohem častěji než u jiných, u cévnatých rostlin je obecně hybridizace 2–3 krát rychlejší než u jednotlivých druhů zvířat. Konkrétně u cévnatých rostlin ve Spojeném království bylo zjištěno, že až 25 % druhů hybridizuje nejméně s jedním dalším druhem, v porovnání u evropských motýlů, savců a ptáků bylo zjištěno, že dochází k hybridizaci u 6–12 % druhů (Mallet, 2005). Bylo prokázáno, že schopnost hybridizovat se vyskytuje častěji u víceletých druhů rostlin a u druhů, které vytváří dřevinné růstové formy. Vyšší schopnost tvorby hybridů pravděpodobně také koreluje s proměnlivou velikostí genomu, je častější u rostlin opílovávaných abioticky (vodou nebo větrem) a u rostlin s asexuální reprodukcí a s větším genomem (Mitchell *et al.*, 2019).

U vrb se s hybridizací (mezidruhovému křížení) mezi druhy *Salix* setkáváme velmi běžně. Majorita hybridů je plodná a je schopna se dále křížit s jinými hybridy nebo s čistými druhy (Newsholme, 1992). Právě kvůli hybridizaci je identifikace a klasifikace druhů *Salix* velmi obtížná. Mezi faktory, které napomáhají vysoké úrovni genetické rozmanitosti u těchto druhů je jejich dvoudomost, tvorba velkého množství semen, které jsou rozptylována větrem, a schopnost klonálního růstu v kombinaci s dlouhou životností (Triest *et al.*, 2000).

Stejně jako u vrb i u příbuzných topolů dochází k mezidruhovému křížení a vytváření hybridních zón. Příkladem je studie zaměřená na dva odlišné druhy topolů *Populus alba* a *Populus tremula* (Bresadola *et al.*, 2019). I přes to, že jsou oba druhy ekologicky odlišné,

nejsou mezi nimi reprodukční bariéry zcela vybudovány, a proto dochází v místech překryvu jejich stanovišť k hybridizaci (Christe *et al.*, 2016). Práce byla zaměřená na studium rozdílného fenotypu mezi rodičovskými druhy a jejich hybridy za použití rekombinantní mapovací populace složené z rostlin, které byly vypěstovány ze semen hybridní zóny. Na základě toho byly charakterizovány příslušné geny a zjištěn typ jejich dědičnosti, která ovlivňuje rozdílnost mezi hybridy (Bresadola *et al.*, 2019).

Rozlišujeme dva typy hybridní speciace a to vznik homoploidů nebo polyploidů (Rieseberg a Willis, 2007). Jako polyploidní speciace označujeme nově vzniklou hybridní linii, u které dochází k duplikaci genomu hybridů. Naopak u homoploidní speciace. nedochází ke změně počtu chromozomů a tato speciace je méně častá, a to hlavně kvůli snížené kondici hybridů v první generaci, jelikož jsou pomocí selekce omezovány nekompatibility a tyto hybridy nemají duplikovaný genom, a proto jsou schopni se zpětně křížit se svými rodičovskými druhy. Problém také nastává při jejich detekci, často u nich chybí diagnostické vlastnosti jako je například právě změna v počtu chromozomů (Rieseberg a Willis, 2007). Dále můžeme hybridizaci rozdělit na tu, které vzniká přirozeně a je součástí evoluce taxonů, a na antropogenetickou, která se projevuje v důsledku činností člověka (Allendorf *et al.*, 2001) (viz Obrázek 6). Hybridizace uplatňující se při vývoji některých taxonů, které vznikají přirozeným genetickým mísením genů, řadíme k TYPu 1. Dalším typem (značen jako TYP 2) přirozené hybridizace je přirozená introgrese, které ale nevede k vytvoření nového taxonu, také je sem zařazen přenos mitochondriální DNA, populace, v nichž se tento druh hybridizace vyskytuje, získaly procesem alely z jiných taxonů, u kterých nedochází ke zvyšování četnosti při další hybridizacích. TYP 3 je klasifikován jako hybridní zóny, které se běžně vyskytují v mnoha rostlinných i živočišných taxonech (Barton a Hewitt, 1985). Další tři typy hybridizace vznikají činností člověka, prvním případem (TYP 4) je situace, kde jsou detekováni primárně F1 hybridí a dochází ke zbytečnému reprodukčnímu úsilí, které může vyvrcholit až k demografickému riziku. Další dva typy hybridizace jsou spojeny s tzv. hybridními roji. Pokud je hybridizace mezi dvěma druhy geograficky omezena a je stále možné rozlišit rodičovské druhy od hybridů jedná se o TYP 5. Jestliže dochází k tvorbě fertálních hybridů, kteří se následně kříží mezi sebou, a i s rodiči, za několik generací dojde ke vzniku hybridního roje, kdy vlivem postupné hybridizace bude docházet ke zvyšování podílu jedinců hybridního původu, zatímco podíl rodičovských druhů bude postupně klesat (Allendorf *et al.*, 2001).



Obrázek 6: Rozdělení hybridizace do dvou základních kategorií (převzato a upraveno Allendorf *et al.*, 2001).

V případě studované hybridní populace *S. hastata* v Hrubém Jeseníku lze uvažovat o TYPu 2 nebo TYPu 3. Míra introgrese (TYP 2) není ale dosud známá, zároveň ekologická data naznačují (Brandová, 2008 a 2010), že populace by mohla mít charakter mozaikové hybridní zóny podle vegetační typů/biotopů a introgrese by tak byla v této populaci jen omezená (TYP 3).

Vznik nových jedinců procesem hybridizace může také ovlivňovat vztahy mezi rostlinami a živočichy. Hybridy mohou v některých případech vykazovat sníženou odolnost proti býložravcům a patogenům (Ericson *et al.*, 1993, Floate *et al.*, 1993) a mohou působit jako tzv. „hybridní dřež“, kdy dochází k vábení škůdců k těmto jedincům, čímž se snižuje schopnost škůdců napadnout a adaptovat se na rodičovské druhy (Whitham *et al.*, 1989). Tyto skutečnosti mohou být zapříčiněny rozdílnou chemií, morfologií nebo fenologií hybridů oproti rodičovským druhům (Orians a Fritz, 1995; Waltz a Whitham, 1997; Fritz *et al.*, 1999). Tento fenomén mohl sehrát významnou roli v dramatickém úbytku četnosti druhu (a některých kříženců) v posledních 30 letech ve Velké Fatře (J. Kliment, ústní sdělení). Hybridy nemusí být jen citlivější než rodičovské druhy, ale také mohou být odolnější, vytvářet přechodné hostitele, kdy dochází ke změnám v hustotách parazitů, a ve složení jednotlivých druhů nebo se svojí citlivostí podobají jednomu z rodičovských druhů (Boecklen a Spellenberg 1990, Fritz *et al.*, 1996). Tato poslední možnost rezistence hraje důležitou roli ve stabilizaci hybridních zón tím,

že býložravci nebudou upřednostňovat hybridy před rodičovskými druhy, a tak nebudou působit jako selektivní činidla vůči těmto hybridům (Fritz, 1999). Tyto interakce mezi živočichy a hybridními rostlinami mohou hrát důležitou roli v evoluci hybridních druhů (Fritz, 1999).

Introgrese je definována jako pohyb genů mezi druhy, který je umožněn pomocí zpětného křížení nebo zjednodušeně jako přenos genů mezi populacemi, které jsou geneticky vzájemně rozlišitelné (Rieseberg a Carney, 1998). Pro proces introgrese jsou nezbytné tři fáze a to, prvotní tvorba F₁ hybridů, jejich následné zpětné křížení z jedním nebo druhým rodičovským druhem a následná přirozená selekce určitých rekombinantních variant (Stebbins, 1959). Je poměrně obtížné detekovat introgresi na základě morfologických znaků, a to z toho důvodu, že při zpětném křížení dochází ke vzniku jedince podobajícího se rodičovským druhům. Při každém zpětném křížení také dochází k úbytku genetického materiálu od druhého rodiče, což ztěžuje detekci introgrese také pomocí genetických metod (Martinsen *et al.*, 2001). U vrb je to o to komplikovanější, že některé druhy (mezi něž *S. silesiaca* patří) vykazují vysokou míru plasticity a je velmi těžké (mnohdy nemožné) odlišit od sebe genetický projev zpětné hybridizace od fenotypové plasticity čistého druhu, což bylo i recentně prokázáno celo-genomovým genotypováním v komplexu tetraploidních úzkolistých vrb (R. J. Vašut, in prep). Proto jsou v současné době využívány molekulárně genetické markery, které jsou nezávislé a vyznačují se jednoduchými způsoby dědičnosti a exprese. Výhodou je také jejich značné množství oproti morfologickým znakům (Martinsen *et al.*, 2001). Introgrese může mít různé důsledky (Arnold, 1992). V důsledku introgrese může docházet k sloučení hybridizujících forem (Wynn, 1986) nebo naopak k posílení reprodukčních bariér na základě asortativního párování (Howard 1986). Díky introgresi se také mohou vytvářet nové typy genotypů, které jsou schopny kolonizovat novou lokalitu (Lewontin a Birch, 1966). V případě, že jsou adaptivní alely udržovány v genomu pomocí přirozeného výběru mluvíme o adaptivní introgresi (Rieseberg *et al.*, 2003). Příkladem adaptivní introgrese u rostlin můžeme pozorovat u slunečnice, u které se vytvořila zvýšená odolnost vůči býložravcům (Whitney *et al.*, 2006) nebo schopnost kosatce tolerovat povodně (Martin *et al.*, 2006). Tento typ introgrese také hraje důležitou roli v prostředí, kdy množství genetických variací a mutací přináší pouze omezenou možnost adaptace (Hamilton a Miller, 2015).

Introgrese byla studována například u druhů *Salix purpurea* a *Salix helvetica*, mezi kterými se začali tvořit hybridy následkem sekundárního kontaktu v evropských Alpách vlivem tání ledovce (Gramlich *et al.*, 2016). Pomocí bialelických SNP (Single-Nucleotide

Polymorphism) byla zjišťována povaha zpětných křížení mezi F1 hybrid x rodič a F1 hybrid x F1 hybrid. V případě, že se v této populaci vyskytuje většina F2 hybridů (F1 hybrid x F1 hybrid) bude potenciálně docházet ke tvorbě hybridních rojů a evoluce hybridů. Zatímco pokud se zde bude převažovat zpětné křížení, zvýší se pravděpodobnost introgrese genů mezi hybridy a rodičovskými druhy. Bylo zjištěno, že populaci tvoří rodičovské druhy a hybridy, kteří vznikali převážně křížením, a to buď s rodičovskými druhy nebo F2 hybridy. Tato skutečnost tedy poukazuje na přítomnost introgrese v této populaci, která může zapříčinit přenos některých adaptivních vlastností mezi druhy (Gramlich *et al.*, 2018).

3.4. MOLEKULÁRNÍ MARKERY VYUŽÍVAJÍCÍ SE U ROSTLIN

Je několik možností, jak pojem marker definovat: a) jedná se o orientační bod nebo alelu nacházející se na chromozomu, který slouží k identifikaci specifické oblasti DNA (Semang *et al.*, 2006); b) gen se snadno určitelnou fenotypovou expresí, který se využívá pro určení jednotlivce nebo buňky případně se může jednat o sondu k označení jádra, chromozomu nebo určitého lokusu na chromozomu (King *et al.*, 2006). Jelikož se markery a zkoumané geny nacházejí v blízkosti na stejném chromozomu, při vzniku nové generace rostlin, nedochází k jejich rozdělení (Semang *et al.*, 2006). Markery můžeme rozdělit do několika skupin, první skupina jsou markery, jejichž detekce je založena na vizuálně hodnotitelných znacích, jako jsou například určité morfologické vlastnosti rostliny. Druhou skupinou jsou markery založené na určitém genovém produktu tzv. biochemické markery a poslední skupina jsou markery pro identifikaci určité oblasti DNA – molekulární markery (Semang *et al.*, 2006).

Molekulární markery můžeme rozdělit na dominantní, při jejich použití nelze rozlišit homozygota od heterozygota a využívají se pro odhadování genotypu, ale nelze pomocí nich určit frekvence alel, patří sem například RAPD (**R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**NA) nebo AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism). Druhým typem jsou markery kodominantní, díky kterým lze rozlišovat homozygoty od heterozygotů a jejich uplatnění je při odhadu frekvencí alel v populacích, do této skupiny jsou řazeny mikrosateliny a většina RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) (Ouborg *et al.*, 1999). Markerové systémy, které jsou založeny na PCR, byly velmi přínosné pro vývoj a následné začleňování genetických map u značného množství rostlin. Konkrétně pro tento případ byla mimo jiné využita kombinace AFLP markerů s opakováním jedné sekvence SSR (**S**ingle **S**equences **R**epeat), díky čemuž bylo možné selektivně amplifikovat polymorfní mikrosatelitoné lokusy (Morgante a Vogel, 1994). Dále byly AFLP markery například použity při genetické analýze hybridů vytvořených

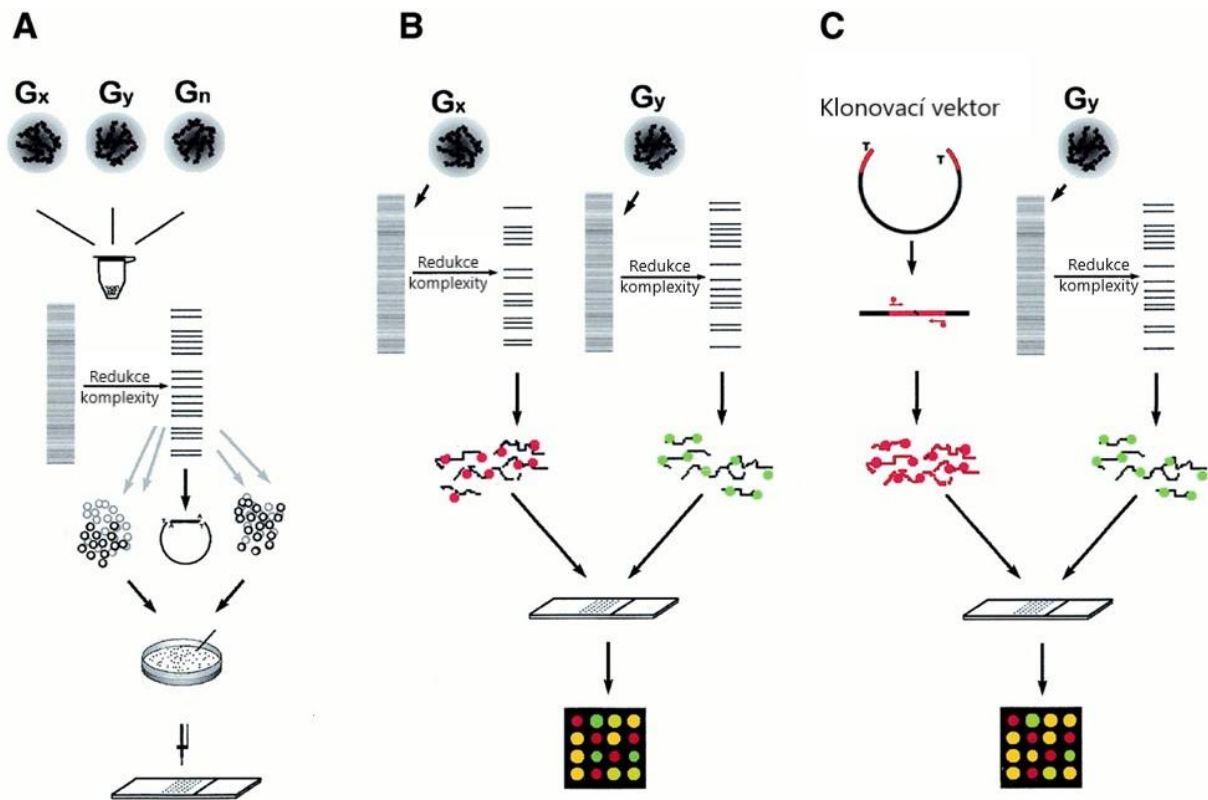
křížením mezi *Salix alba* L. (vrba bílá) a *Salix fragilis* L. (vrba křehká) a následně byl posuzován typ dědičnosti v této populaci (Barcaccia *et al.*, 2014).

Mikrosatelity (Litt a Luty, 1989) jsou jednoduché tandemově opakující se sekvence DNA, které se nacházejí v různém zastoupení napříč genomy všech organismů (Chambers a MacAvoy, 2000). Nachází se jak v kódujících, tak nekódujících oblastech jaderného genomu a jsou charakteristické vysokým stupněm polymorfismu (Zane *et al.*, 2002). Mikrosatelity se vyskytují také v genomu chloroplastů (Provan *et al.*, 2001) a mitochondrií (Soranzo *et al.*, 1999). U zvířat je nejčastějším opakováním AC, zatímco u rostlin AT, jedná se tedy o obecný znak, díky kterému můžeme rozlišovat živočišné a rostlinné genomy (Powell *et al.*, 1996). Polymorfismus je zapříčiněn různým počtem opakování v mikrosatelitních oblastech, z tohoto důvodu je snadné ho detekovat pomocí polymerázové řetězové reakce, jejich využití je především v genetice a při šlechtění rostlin, konkrétně svoje upotřebení našli při určování otcovství, konstrukci genomových map o vysoké hustotě, genovém mapování, jako markery pro různé selekce a při určování genetických a evolučních vztahů (Parida *et al.*, 2009). Výhodou těchto markerů je jejich vysoký polymorfismus, většinou jsou kodomonantní, analýza vyžaduje malá množství DNA a lze ji snadno automatizovat, naopak jejich nevýhodou jsou vysoké náklady na jejich vývoj a dostupnost pouze pro určité druhy (Semang *et al.*, 2006). Využití mikrosatelitů je například při charakterizaci a rozlišení jedinců, kteří jsou dále využíváni pro šlechtitelské účely. Tato analýza byla provedena u topolů a osik, které jsou stále častěji využívány pro výrobu biomasy, kdy bylo nutné selektovat jedince s vhodnými vlastnostmi (Liesebach *et al.*, 2010).

Markerové systémy, o kterých byla zmínka výše, jakou jsou RFLP, RADP nebo AFLP výrazně přispěly k pochopení organizace genomu a genetické variability, nicméně jsou všechny závislé na gelové elektroforéze, což nemá tak velkou vypovídací hodnotu, jelikož při separaci různě velkých fragmentů DNA může docházet k obtížím při vyhodnocování alelické konstituce pouze na základě dostupných proužků na gelu. (Jaccound *et al.*, 2001). Z tohoto důvodu se zahájilo vyvíjení nových metod, které by tato omezení překonávaly. Začaly se používat metody založené na hybridizaci, kde byly příslušné sondy imobilizované na pevném nosiči, příkladem jsou DNA čipy, které byly vyvinuty pro identifikaci a genotypizaci jednodukleotidových polymorfismů (SNP z angl. **S**ingle **N**ukleotide **P**olymorfismus), nicméně tato analýza je nákladný a pracný proces, který zahrnuje DNA sekvenování, proto není tato metoda vhodná pro běžné analýzy například zemědělských plodin Proto byly hledány jiné metody, které by měly podobné rozlišovací schopnosti, ale s větším rozsahem a nižší cenou analýzy, z tohoto

důvodu byly vyvinuty tzv. DArTseq (**D**iversity **A**rray **T**echnology sequencing), které představují vysoce výkonný, nízkonákladový systém s minimálním nárokem na množství analyzované DNA a jsou schopny poskytovat komplexní analýzu genomu i u organismů bez znalosti DNA sekvence. Jejich možné využití je při genetickém mapování, šlechtění s využitím genetických markerů nebo při pozorování změn metylace v genomu (Jaccound *et al.*, 2001). Výhodami těchto markerů je již zmíněná nezávislost na DNA sekvenci, jedná se o vysoce kvalitní markery, nejsou založeny na analýze pomocí elektroforézy, je možné je plně automatizovat a jsou efektivní s ohledem na cenu, zvláště pokud se využívají na multiplexované testy (více jak 100 markerů) (Wittenberg *et al.*, 2005).

Princip analýzy pomocí DArT je znázorněna na Obrázku 7. **A)** Nejprve dochází k izolaci genomické DNA jednotlivých vzorků, které jsou zájmem studia, a jejich smíchání dohromady. Následně dochází k štěpení DNA pomocí restričních enzymů, kdy se vytvoří fragmenty na které se ligují specifické adaptéry. Dalším krokem je redukce komplexity, která je zajišťovaná pomocí PCR s primery navrženými k naligovaným adaptérům. Takto připravené fragmenty jsou zaklonovány do vektory, kde dochází k jejich amplifikaci a purifikaci. Nakonec jsou klony nanášeny na pevný podklad. **B)** Ze dvou znárodněných vzorků jsou vytvořeny reprezentace popsané v A). Jednotlivé reprezentace jsou rozlišeny pomocí rozdílných fluorescenčních barviv (červená, zelená), smíchány a hybridizovány na array. Následně je měřena intenzita signálů (zelená:červená) u každého políčka arraye. Oblastí zájmu jsou políčka, kdy se poměr signálů výrazně liší (liší se tudíž i dva porovnávané fragmenty genomu). **C)** Vzorek určený k analýze je převeden na reprezentaci podle postupu A) a označen fluorescenčně. Červenou barvou jsou označeny fragmenty náležící klonovanému vektoru (jsou společné pro všechny políčka). Dochází k hybridizaci červených (z vektoru) a zelených (představuje reprezentaci) fragmentů na array a následně dochází k analýze intenzity signálů. Na připravené arrayi je možné analyzovat jakýkoliv organismus se stejným genofondem, z kterého byla array vytvořena



Obrázek 7: Schématické znárodnění analýzy pomocí DArT markerů. (převzato a upraveno Jaccound *et al.*, 2001).

Nejprve byly DArT markery použity pro druh s relativně jednoduchým genomem, což byla rýže (Jaccound *et al.*, 2001). Později začaly být používány i pro druhy se složitějšími genomy jako je například ječmen (Wenzl *et al.*, 2004). Následovalo použití těchto markerů u *Arabidopsis thaliana*. Tento experiment se odlišoval tím, že byly použity dva restriční enzymy, kdy k jejich místům štěpení byly ligovány dva rozdílné adaptéry (každý pro jeden enzym) a dále byl použit třetí enzym, k jehož štěpným místům adaptér ligován nebyl. Dalším rozdílem bylo to, že adaptérové sekvence na vzniklých fragmentech se lišily od adaptérových sekvencí fragmentů, které byly imobilizované na array, čímž bylo zabráněno hybridizaci řetězců komplementárních k adaptérům, které byly společné pro všechny analyzované klony (Wittenberg *et al.*, 2005). Tyto markery byly již použity ke studiu vrb, kdy první studie přinesla pouze zjištění, že i v rámci evolučně mladých druhů lze pomocí této metody velmi spolehlivě odlišit základní druhy (Przyborowski *et al.*, 2013). V současnosti byly markery testovány pro využití identifikace kříženců vrb, kde se ukázalo, že tato metoda dokáže extrémně spolehlivě stanovit nejen F1 křížence, ale také zpětné křížence s rodičovskými druhy nebo křížence tří druhů (Vašut *et al.*, in prep.).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. ROSTLINNÝ MATERIÁL

Byly analyzovány rostliny druhů *Salix hastata*, *Salix silesiaca* a jejich křížence *Salix* × *chlorophana*. Přehled jedinců je shrnutý v Tabulce 2.

4.2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY

- Chemikálie
 - HyperLadder 100 bp, Biolone
 - Barvička pro obarvení gelu Simply safe, EURX
 - 96 % ethanol, VWR International
 - TRIS (ultra pure), VWR International
 - Kyselina boritá, Lach-Ner
- Komerční kity
 - DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN
 - TaKaRa Ex Taq, Clontech
- Použité roztoky
 - 1% agarózový gel, 2 g agarózy; 200 ml 0,5% TBE pufr
 - 10x TBE pufr (108 g TRIS, 55 g kyseliny borité, 900 ml ddH₂O, 40 ml 0,5M EDTA, pH 8)
- Software
 - FireReader V4, Uvitec
 - NanoDrop 2000
 - SPLITSTREE verze 4.16.2 (Huson a Bryant 2006)
 - [<https://uni-tuebingen.de/fakultaeten/mathematisch-naturwissenschaftliche-fakultaet/fachbereiche/informatik/lehrstuehle/algorithms-in-bioinformatics/software/splitstree/>]
 - STRUCTURE verze 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007; Hubisz *et al.*, 2009)
 - [<https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>]
 - STRUCTURE HARVESTER (Earl a vonHoldt, 2012)
 - [<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>]

4.3. SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ

- Analytické vány HR – 120, AND
- Centrifuga 5414D, Eppendorf
- Centrifuga 5804R, Eppendorf
- Centrifuga cytologická PCR plate spinner, VWR
- Elektroforetická vana owl easycast B1, Thermo scientific
- Flowbox, Telstar PC-100
- Chladničky Liebherr
- Mastercycler vapo. Protect pro S, Eppendorf
- Mikrovlnná trouba, ETA 3203
- Mlečí nádoba MM 301, Retsch
- Spektrofotometr NanoDrop 2000, Thermo Scientific
- Thermocycler PTC - 200, MJ RESEARCH
- Třepačka laboratorní MS 2 minishaker, IKA
- Třepačka Mixing block MB-102, BIOER
- UV transluminátor Unitec cambridge, Biotech
- Výrobník vločkového ledu Ice Makers, Brema
- Zdroj minis 300, Major science

4.4. POUŽITÉ MIKROSATELITY

V této práci byly použity jako molekulární markery mikrosatelity, jejich přehled je uveden v Tabulce 1. Bylo využito mikrosatelitů vyvinuté pro jiné druhy vrb (Barker *et al.*, 2003; Stamati *et al.*, 2003) a které byly již dříve optimalizovány a úspěšně použity v laboratorních podmínkách katedry botaniky PřF UP (Brandová, 2008 a 2010; Sochor, 2009).

Tabulka 1: Přehled použitých mikrosatelitů a jinech primerů.

Název	Sekvence primeru 5'-3'	Motiv repeticce	Teplota annelingu [°C]	Fluorescenční barvivo (M13)	Zdroj
SX12	TATTGCTTTGATGGCGACTGC CAGCAACGGAAATAGCAACAG	[ACCGCC] ₅ ACCGC	51	FAM	Barker <i>et al.</i> , 2003
SX13	GACGCACATACACCATTACAC TGTTAGAAAATTAGGCACGGA	[GT] ₁₇	51	VIC	Barker <i>et al.</i> , 2003
SX18	CTGTTTCTGCCACTATTAC TATAATCTGTCTCCTTTGGC	[GCC] ₉	51	NED	Stamati <i>et al.</i> , 2003

Název	Sekvence primeru 5'-3'	Motiv repeticce	Teplota annealingu [°C]	Fluorescenční barvivo (M13)	Zdroj
SX20	CCTCTTTTTCTATTGTGGTCT GGCATGTATTTTTACTCCAAC	[CT] ₄ CC [CT] ₃ [CA] ₂₂	51	VIC	Barker <i>et al.</i> , 2003
SX22	TATAAAGACAAATACCTGGGG CATCAAAGACTGCTAGAAAGG	[CA] ₂ [GA] ₂ GGAA [TA] ₂ [CA] ₁₅ GA	55	VIC	Barker <i>et al.</i> , 2003
SX23	AAATTACCGTCCAATAAAGA CATTAGCCATGAACAAGTAAA	[TA] ₂ [TGTGCG] ₄ [TG] ₉	55	PET	Barker <i>et al.</i> , 2003
SX24	ATTCCTTTCTTCATCAGTAGC GACAACGCCATTACATGACC	[GCC] ₃ ATCATT CCCC[GCC] ₄	51	PET	Barker <i>et al.</i> , 2003

4.5. POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY

4.5.1. Sběr a uchování rostlinného materiálu

Studované vzorky vrb pocházejí z lokality jediného výskytu *S. hastata* v Česku, tj. Velké kotliny v Hrubém Jeseníku (NPR Praděd). Sběry byly realizovány v letech 2011-2013 R. J. Vašutem a B. Brandovou, doplňující sběry byly provedeny v červenci 2020 (R. J. Vašut). Do analýz byly zařazeny vybrané vzorky pocházející z Nízkých Tater (Velký Bok) a Velké Fatry (prameniště a hrana karu hory Ploská), sbírané v létě 2019. Starší sběry byly provedeny odběrem několika listů, u novějších sběrů (2019-2020) byly vždy odebrány i s malou větvičkou pro vytvoření herbářového dokladu (a morfologickému srovnání). Všechny sběry byly uskutečněny s adekvátními povoleními pro realizaci výzkumu v Hrubém Jeseníku (NPR Praděd), tj. na základě povolení výjimky ze zákona dle § 43 odst. 3 zákona č. 114/1992 Sb. a dle § 56 odst. 1 a 2 zákona č. 114/1992 Sb. (uděleno pro léta 2011-2015, recentně obnoveno pro období 2019-2021). Rostliny původem ze Slovenska byly sbírány ve spolupráci s Dr. D. Bernátovou (Botanická zahrada Univerzity J. A. Komenského v Blatnici) a Dr. P. Turisem (správa Národního parku Nízké Tatry) v rámci jejich povolení.

V mých analýzách jsem původně testovala 226 vzorků *S. hastata* a *S. silesiaca* z Hrubého Jeseníku a jiných středoevropských populací (Nízké Tatry, Velká Fatra), z toho zhruba polovina představovaly vzorky z dřívějších sběrů, druhá polovina nové sběry z posledních 2 let. Přehled použitých rostlin je shrnutý v Tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled všech analyzovaných druhů a jejich kříženců.

Taxon	Lokalita / GPS	Označení položek	PCR destička
<i>Salix hastata</i>	Hrubý Jeseník, Velká kotlina, horní část 50°3'27.052"N, 17°14'12.064"E	H1-H43	1
<i>Salix hastata</i>	Nízké Tatry, Velký Bok 48°56'38.571"N, 19°52'45.536"E	NT-89, NT-93, NT-100	1
<i>Salix cf. hastata x silesiaca x hastata</i>	Velká Fatra, Ploská, hrana karu a navazující mokřady 48°56'0.050"N, 19°7'29.212"E	VF38-prm, VF183, VF151, VF190	2
<i>Salix silesiaca</i>	Hrubý Jeseník, Velká kotlina, horní část 50°3'27.052"N, 17°14'12.064"E	S3-S20	1
<i>Salix silesiaca</i>	Nízké Tatry, Velký Bok 48°56'27.650"N, 19°52'50.808"E	NT-73, NT-77	1
<i>Salix silesiaca</i>	Velká Fatra, Ploská, hrana karu a navazující mokřady 48°56'0.050"N, 19°7'29.212"E	VF6B, VF7A, VF97, VF27, VF73	2
<i>Salix sp. (kříženci)</i>	Hrubý Jeseník, Velká kotlina, horní část 50°3'27.052"N, 17°14'12.064"E	Z1-Z7, X12-X13, F1, 217-238	1
<i>Salix sp. (kříženci)</i>	Nízké Tatry, Velký Bok 48°56'27.650"N, 19°52'50.808"E	NT-76, NT-88, NT-94 NT-75, NT-78, NT-84, NT-96	2
<i>Salix sp. (kříženci)</i>	Velká Fatra, Ploská, hrana karu a navazující mokřady 48°56'0.050"N, 19°7'29.212"E	VF1LD, VF14LD, VF21, VF35, VF43, VF59, VF74, VF93, VF107B, VF134, VF1P, VF22, VF36, VF44, VF60, VF81, VF122, VF135, VF7LD, VF15P, VF24, VF37, VF61, VF83, VF98, VF123, VF136, VF2P, VF8, VF15LD, VF25, VF48, VF62, VF84, VF99, VF138, VF3A, VF9, VF16A, VF49, VF66, VF89, VF100, VF125, VF147, VFVD3, VF10, VF16B, VF30, VF40, VF52, VF68, VF90, VF101, VF126, VF14P, VF5, VF12, VF18, VF34A, VF41, VF53, VF70, VF91, VF102, VF127, VF2LD, VF6A, VF13, VF20, VF24NP, VF42, VF56, VF92, VF104, VF133	2
<i>Salix alpina</i>	Nízké Tatry, Velký Bok 48°56'27.650"N, 19°52'50.808"E	NT-90	1
<i>Salix retusa</i>	Nízké Tatry, Velký Bok 48°56'27.650"N, 19°52'50.808"E	NT-91, NT-99	1
<i>Salix caprea</i>	Velká Fatra, Ploská, hrana karu a navazující mokřady 48°56'0.050"N, 19°7'29.212"E	VF124, VF39	2
<i>Salix cinerea</i>	Velká Fatra, Ploská, hrana karu a navazující mokřady 48°56'0.050"N, 19°7'29.212"E	VF47	2

4.5.2. Izolace DNA

Pro izolaci DNA byly použity listy bez zjevné infekce houbami. K extrakci byl použit extrakční kit firmy Qiagen, DNeasy Plant Mini Kit, izolace probíhala při pokojové teplotě. Do kónických mikrozkuvek bylo naváženo 20 μg listů bez středové žilnatiny. Do každé mikrozkuvky byly vloženy 2 keramické kuličky a takto připravené zkuvky byly umístěny do mlecí nádoby a promíchány na homogonizátoru (Retsch) na 3 min a 30 Hz. Pokud nebyly listy dobře rozdrnceny krok se opakoval. Do mikrozkuvek bylo přidáno 400 μl pufru AP1 a 4 μl RNasy A, tyto dvě složky není možné namíchat před použitím. Takto připravená směs byla smíchána a inkubována 10 min na 65°C. Po inkubaci bylo přidáno 130 μl pufru P3 a inkubováno 5 min na ledě. Následovala centrifugace 5 min při 20.000 g. Mezi tím byly připraveny kolonky QIAshredder spin column, které byly vloženy do 2 ml sběrných mikrozkuvek. Supernatant (400 μl) byl po stočení na tuto kolonku přepipetován a centrifugován 2 min při 20.000 g. Filtrát, který prošel přes kolonku byl smíchán s 1,5 x větším objemem pufru AW1, než jaký byl přenesen na kolonku (600 μl). Směs byla propipetována a nanesena na kolonku DNeasy Mini spin column umístěné do 2 ml sběrné mikrozkuvky, centrifugace probíhala 1 min při 6.000 g. Proteklý filtrát byl vylit. Na kolonku bylo naneseno 500 μl pufru AW2, centrifugace 1 min při 6.000 g, filtrát byl vylit a tento krok opakován pouze se změnou centrifugace na 2 min při 20.000 g. Kolonky byly umístěny do nových (finálních) mikrozkuvek a bylo na ně naneseno 100 μl pufru AE pro eluci DNA. Vzorky byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě a poté centrifugovány 1 min při 6.000 g. Poslední krok byl opakován.

Sběry z let 2011-2013 a doplňující sběry pro DArTseq genotypování (2020) byly zpracovány klasickou CTAB extrakční metodou (Doyle a Doyle, 1987; Brandová, 2010).

4.5.3. Kontrola extrahované DNA a stanovení její koncentrace pomocí Nanodropu

Po izolaci byly vzorky smíchány s vzorkovacím pufrem v poměru 2 μl pufru + 3 μl DNA a naneseny na 1 % agarózový gelu obsahující barvivo Simply safe a separovány 10 min při 150 V. Následně bylo pomocí UV transluminátoru vizuálně ověřeno, že vzorky obsahují extrahovanou jadernou DNA. U vzorků, kde nebyla prokázána přítomnost DNA byla extrakce opakována. Po získání DNA vybraných vzorků rostlin byla stanovena její přibližná koncentrace pomocí přístroje NanoDrop.

DNA extrahovaná z dřívějšího výzkumu školitele byla uchována v mrazácích, část vzorků při -20°C , část vzorků při -80°C . Koncentrace DNA těchto vzorků byla rovněž stanovena pomocí přístroje NanoDrop.

4.5.4. Amplifikace DNA

Dalším krokem byla amplifikace DNA pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce, zkratka z ang. **p**olymerase **c**hain **r**eaction). Vzorky byly přepipetovány do 96-ti jamkových destiček pro urychlení práce. Umístění vzorků v destičkách je uvedeno v Tabulce 3 a Tabulce 4. Pro rychlejší orientaci jsou vzorky označeny kódy, jejichž seznam se nachází v Tabulce 2. V destičkách byly vynechány 3 poslední pozice. První byla pro negativní kontrolu a další dvě kvůli nefunkčnosti dvou kapilár sekvenátoru, vzorky se tedy z určitých pozic museli přepipetovat nakonec, tak aby došlo k jejich analýze.

Tabulka 3: Umístění vzorků v 96-ti jamkové destičce. Destička označena jako 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H1	H10	H24	H32	H41	Z6	S18	219	227	235	NT78	NT94
B	H2	H17	H25	H33	H42	Z7	S19	220	228	236	NT82	NT96
C	H3	H18	H26	H34	H43	S3	S20	221	229	237	NT84	NT99
D	H4	H19	H27	H35	Z1	S4	X12	222	230	238	NT88	NT100
E	H5	H20	H28	H36	Z2	S5	X13	223	231	NT73	NT89	NT101
F	H6	H21	H29	H37	Z3	S6	F1	224	233	NT75	NT90	
G	H7	H22	H30	H39	Z4	S11	217	225	233	NT76	NT91	
H	H8	H23	H31	H40	Z5	S17	218	226	234	NT77	NT93	

Tabulka 4: Tabulka 3: Umístění vzorků v 96-ti jamkové destičce. Destička označena jako 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VF1LD	VF6B	VF14LD	VF21	VF35	VF43	VF59	VF74	VF93	VF107B	VF134	NT4
B	VF1P	VF7A	VF14P	VF22	VF36	VF44	VF60	VF81	VF97	VF122	VF135	NT5
C	VF2LD	VF7LD	VF15P	VF24	VF37	VF47	VF61	VF83	VF98	VF123	VF136	NT6
D	VF2P	VF8	VF15LD	VF25	VF38	VF48	VF62	VF84	VF99	VF124	VF138	NT7
E	VF3A	VF9	VF16A	VF27	VF39	VF49	VF66	VF89	VF100	VF125	VF147	
F	VF3VD	VF10	VF16B	VF30	VF40	VF52	VF68	VF90	VF101	VF126	VF151	
G	VF5	VF12	VF18	VF34A	VF41	VF53	VF70	VF91	VF102	VF127	VF183	
H	VF6A	VF13	VF20	VF34NP	VF42	VF56	VF73	VF92	VF104	VF133	VF190	

Reakční směs byla připravena podle následující tabulky (viz Tabulka 5) pro 96 vzorků a za podmínek níže (Tabulka 6).

Tabulka 5: Složení reakční směsi na 1 a 96 vzorků.

Složky směsi	1 vzorek [μl]	96 vzorků [μl]
H ₂ O	5,29	507,84
10x Ex Taq pufr (včetně Mg ²⁺)	1	96
2,5 mM sNTP mix	0,8	76,8
10 μM primer Forward	0,8	76,8
10 μM primer Reverse	1	96
10 μM fluor. Primer (PET, VIC, FAM, NED)	0,06	5,76
TaKaRa Ex Taq polymeráza (5U/ μl)	0,05	4,8
DNA	1	-
Celkový objem reakce	10 μl	

Tabulka 6: Podmínky PCR reakce.

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	30	1
Denaturace	94	30	30
Navázání primerů	51/55 (v závislosti na konkrétním mikrosatelitu)	30	
Prodlužování	72	60	
Finální prodlužování	72	60	
Konec reakce	4	∞	

Po provedení PCR reakce byly destičky uchovávány v mrazáku při teplotě -20°C .

4.5.5. Purifikace PCR produktů

Pro následnou fragmentační analýzu mirosatelitů bylo nutné vzorky po PCR přečistit, abychom se zbavili interferujících složek a nepoškodili kapiláry analyzátoru.

Nejprve byla připravena směs 96% ethanolu a 3M NaAc (pH 4,3), na 2 desky bylo smícháno 7 ml 96% ethanolu a 337,5 μl NaAc. Takto připravená směs byla promíchána a napipetována do jamek se vzorky, které byly předem rozpuštěné a stočené. Na jamku bylo

pipetováno 36,5 µl směsi. Poté byly desky zalepeny fólií a vortexovány cca 7 s, tak aby nedošlo ke kontaktu směsi a fólie. Desky byly inkubovány při pokojové teplotě 15 min ve tmě, aby nedocházelo k vyzařování fluorescenčního barviva. Následně byla vychlazena centrifuga na 4°C a vzorky byly po uplynulé době centrifugovány 45 min při 3600 RPM a 4°C. Po centrifugaci byl supernatant vylit a desky osušeny pomocí buničité vaty. Pak byla provedena purifikace pomocí 50 µl 70% ethanolu na jamku pipetováno a následovala centrifugace 22 min při 3600 RPM a 4°C. Krok purifikace byl opakován (celkem 2 purifikace 70% ethanolem). Dále byly desky umístěny do flowboxu, kde byly sušeny po dobu 30 min bez světla, dokud nedošlo k vysušení ethanolu. Nakonec bylo na jamku přidáno 12 µl redestilované vody a pro lepší rozpuštění byly desky centrifugovány 1 min při 3600 RPM. Na závěr se desky inkubovaly 15 min v lednici a následně byly uchovávány v mrazáku při -20°C.

4.5.6. Fragmentační analýza

Desky pro jednotlivé mikrosatelity byly rozděleny do skupin na základě obsahujících fluorescenčních primerů M13 tak, aby byla ve skupině vždy pouze jedna deska s příslušnou barvou fluorescence (vždy pouze jeden PET – červená, VIC – zelená, FAM – modrá a NED – žlutá). Pokud by došlo k smíchání vzorků se stejnou barvou fluorescence, nebylo by možné detekovat správný signál. Desky byly rozděleny do skupit podle následující tabulky viz Tabulka 7.

Tabulka 7: Rozdělení desek do skupin pro fragmentační analýzu.

Skupina	Desky s příslušnými mikrosatelity		
1	SX 13	SX 23	SX 12
2	SX 20	SX 24	
3	SX 22	SX 18	

Fragmentační analýza byla provedena v 96ti jamkové destičce. Kdy byly smíchány složky podle následující tabulky viz Tabulka 8.

Tabulka 8: Rozpis směsi na jamku pro fragmentační analýzu.

Formaldehyd	Doplnit do celkového objemu 12 µl
Hmotnostní standart LIZ-500	0,2 µl
Vzorek (purifikovaný PCR produkt)	0,8 µl
Celkový objem reakce	12 µl

Podle stupně multiplexu byla připravena reakční směs podle Tabulky 9.

Tabulka 9: Reakční směsi pro různé stupně multiplexu.

Pro 2 markery - multiplex	
Vzorek	1,6 µl (2*0,8 µl)
LIZ standart	0,2 µl
Formaldehyd	10,2 µl
Pro 3 markery - multiplex	
Vzorek	2,4 µl (3*0,8 µl)
LIZ standart	0,2 µl
Formaldehyd	9,4 µl

Po připravení reakční směsi byly vzorky 2 min denaturovány pomocí cycleru při 98 °C. Dopředu byl připraven excel soubor s názvy jednotlivých vzorků a mikrosatelitů, které byly analyzovány. Připravení souboru předem zjednodušuje následné vyhodnocování, jelikož vzorku již budou pojmenování ve výstupních souborech.

4.5.7. Analýza dat

Alelické hodnoty mikrosatelitů byly statisticky vyhodnoceny. Původním cílem práce bylo posoudit přítomnost hybridizace v populaci *S. hastata* ve Velké Kotlině, a to dokončením rozpracované práce B. Trnkové (Brandová, 2010). Pokusila jsem se o vyhodnocení svých dat i dat B. Trnkové a jejich srovnání. Vzhledem k metodickým komplikacím (různé mikrosatelity a odlišně nekompletní datasety) musely být oba datasety vyhodnoceny zvlášť.

Pro analýzu populační struktury vzorků se zaměřením na stanovení možného hybridního původu vzorků. K tomuto účelu byl využit program STRUCTURE ve verzi 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Metoda využívá bayesiánský přístup k nalezení struktury v datech, bez ohledu na skutečný počet taxonů/populací se analýza snaží nalézt hypotetický počet K klastrů (shluků), který domněle odpovídá ancestrálním populacím/taxonům. Vstupní matice dat obsahovala hodnoty velikosti alel mikrosatelitů, do analýzy byly zahrnuty všechny vzorky s nadpolovičním počtem amplifikovaných mikrosatelitů (scházející hodnoty byly označeny hodnotou „-9“). Parametry analýzy byly 100.000 pro burnin, 1.000.000 iterací pro K = 1-10 pro oba datasety. Analýzy byly provedeny modelem „ADMIXTURE“, který vypočítává *admixture* podíly pro

každého jedince. Pro slabá data, s omezenou strukturou v datech, je doporučován model „LOCPRIOR“, který ale v tomto případě nebyl použit, neboť vzorky pocházejí z jedné makropopulace. Přesná prostorová pozice v populaci není známá. Vyhodnocení dat z analýz bylo provedeno pomocí webové utility STRUCTURE HARVESTER (Earl a vonHoldt, 2012), s pomocí které byl stanoven nejpravděpodobnější počet klastrů (ΔK) pomocí Evanno metody (Evanno *et al.*, 2005), vyhodnocena podobnost jednotlivých běhů a vypočítán medián hodnot jednotlivých klastrů pro každého jedince. Předběžná vizualizace byla provedena s využitím webové aplikace STRUCTURE PLOT v2.0 (Ramasamy *et al.*, 2014), finální grafické výstupy byly provedeny manuálně z mediánových hodnot *Q matrix* v grafickém editoru.

Pro nalezení retikulárních vztahů a jejich prezentací formou *network* grafu byl použit program SPLITSTREE verze 4.16.2 (Huson a Bryant, 2006), analyzující data metou *split decomposition*. Vstupní matice dat ve formátu *fasta* obsahovala binární data (přítomnost/absence alely).

5. VÝSLEDKY

Pro analýzu byly použity listy *S. hastata*, *S. silesiaca* a jejich kříženců. Vzorky byly sbírány ve Velké Kotlině v Hrubém Jeseníku. Doplnující vzorky pro srovnání s jeseníckou populací byly dále sbírány v Nízkých Tatrách a ve Velké Fatře. K hlavním morfortypům byly pořízeny dokumentační herbářové položky, které jsou deponovány v OL (herbář katedry botaniky PrF UP v Olomouci). Z takto připravených listů byla izolována DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kitu.

5.1. MĚŘENÍ KONCENTRACE POMOCÍ NANODROPU

Po vyizolování DNA byla změřena její koncentrace pomocí Nanodropu. Pokud byla koncentrace příliš nízká a to pod 10 ng/μl byla izolace pro daný vzorek opakována. Vzorky s vyšší koncentrací byly naředěny na 10 ng/μl. Přehled naměřených koncentrací pro vzorky 1. PCR platička je uveden v Tabulce 10, pro 2. platičko byly koncentrace obdobné.

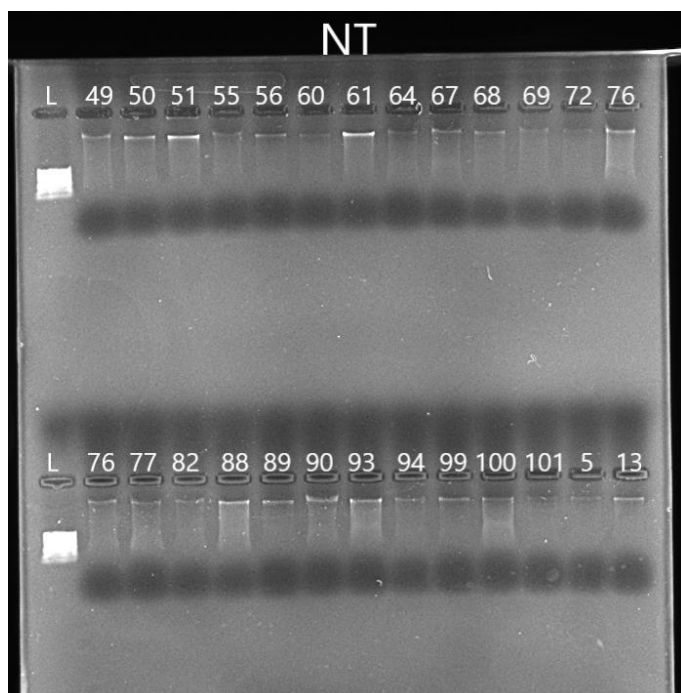
Tabulka 10: Zjištěné koncentrace pro jednotlivé vzorky DNA, 1. PCR platičko.

Kód vzorku	Koncentrace [ng/μl]	Kód vzorku	Koncentrace [ng/μl]	Kód vzorku	Koncentrace [ng/μl]	Kód vzorku	Koncentrace [ng/μl]
H1	59,3	H31	24,6	S11	92,6	232	174,3
H2	23,9	H32	35,7	S17	104,9	233	52,7
H3	20,6	H33	20,6	S18	98,0	234	47,9
H4	75,8	H34	23,5	S19	328,6	235	170,3
H5	70,3	H35	18,3	S20	272,5	236	58,3
H6	64,7	H36	27,8	X12	19,7	237	30,4
H7	176,4	H37	18,8	X13	184,6	238	30,5
H8	186,1	H39	28,1	F1	57,0	NT73	41,0
H10	30,2	H40	39,6	217	151,2	NT75	18,3
H17	39,0	H41	40,7	218	125,3	NT76	60,4
H18	18,4	H42	67,4	219	197,0	NT77	63,1
H19	82,7	H43	48,4	220	106,0	NT78	27,8
H20	74,3	Z1	183,5	221	186,2	NT82	52,0
H21	63,4	Z2	65,7	222	47,2	NT84	20,7
H22	122,9	Z3	20,8	223	233,4	NT88	88,2
H23	130,4	Z4	57,0	224	259,8	NT89	55,7

Kód vzorku	Koncentrace [ng/μl]	Kód vzorku	Koncentrace [ng/μl]	Kód vzorku	Koncentrace [ng/μl]	Kód vzorku	Koncentrace [ng/μl]
H24	69,8	Z5	29,3	225	43,1	NT90	91,6
H25	92,7	Z6	111,0	226	79,5	NT91	72,9
H26	63,5	Z7	114,1	227	141,1	NT93	119,1
H27	154,5	S3	159,7	228	57,9	NT94	47,4
H28	256,1	S4	76,7	229	149,9	NT96	32,8
H29	64,2	S5	45,0	230	38,9	NT99	52,4
H30	17,9	S6	28,6	231	204,6	NT100	193,5

5.2. VÝSLEDKY OVĚŘENÍ KVALITY DNA

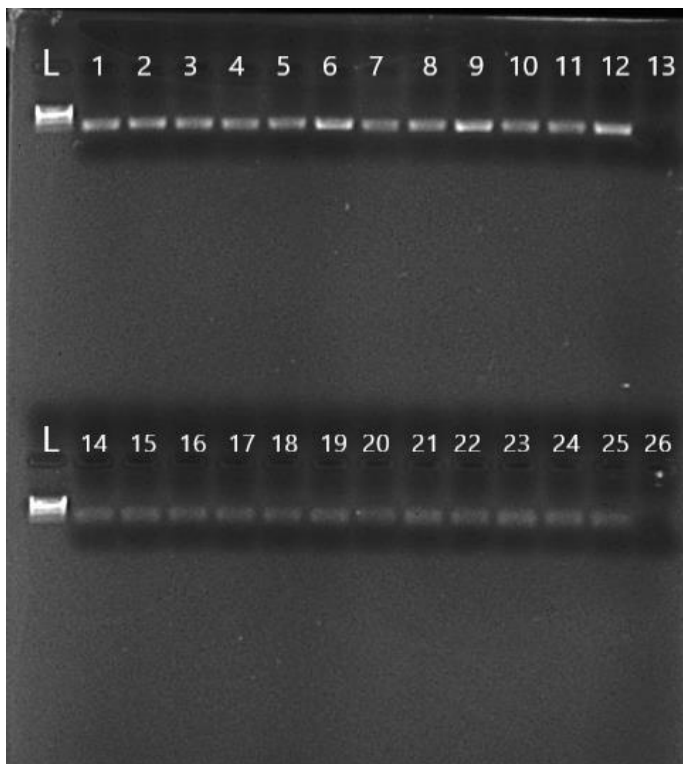
Pro ověření kvality vyizolované DNA byla použita elektroforéza na 1% agarózovém gelu. Pokud nanesená DNA vytvořila po separaci jeden viditelný pruh (Obrázek 8), bylo přistoupeno k dalšímu kroku, v opačném případě byla izolace provedena znovu a celý proces se opakoval.



Obrázek 8: Kontrola kvality vyizolované DNA pomocí agarózového gelu pro vzorky NT (pocházející z Nizkých Tater). Legenda: L: standart molekulové hmotnosti 100pb; jamky: vyizolovaná DNA.

5.3. AMPLIFIKACE DNA

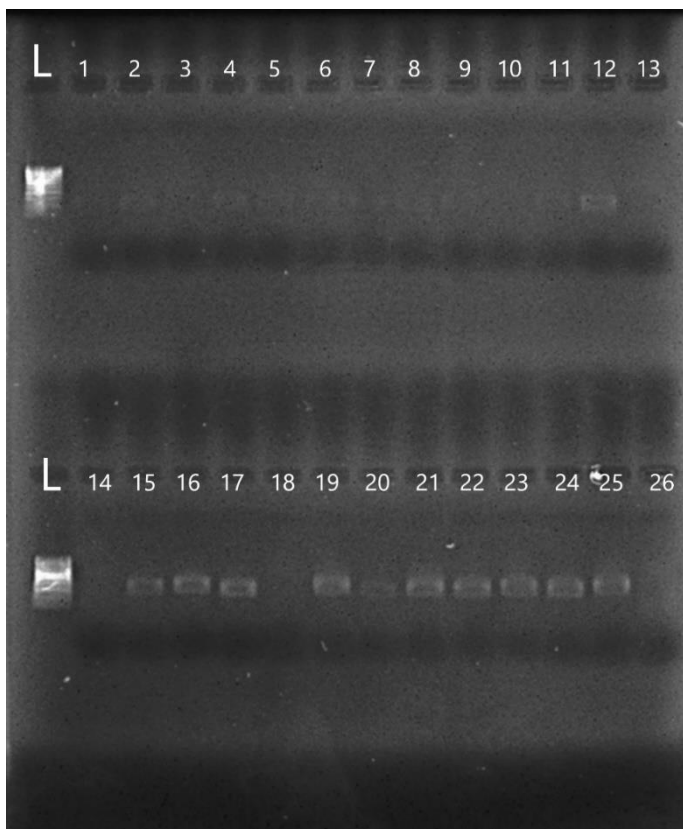
Všechny vzorky DNA byly amplifikovány pomocí PCR reakce se všemi 7 primery (SX12, SX13, SX18, SX20, SX22 a SX24). Po amplifikaci byl zkontrolován průběh reakce a přítomnost produktů pomocí agarózového gelu (Obrázek 9).



Obrázek 9: Ověření správného průběhu PCR reakce pro primery SX12 (první řádek) a SX13 (druhý řádek). Legenda: L: standard molekulové hmotnosti 100pb; jamky: náhodně vybrané amplifikované PCR produkty, jamky 13 a 26: negativní kontroly.

5.4. OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI PCR PRODUKTŮ PO PURIFIKACI

Po provedené purifikaci PCR produktů bylo nutné opět zkontrolovat jejich přítomnost, jelikož během tohoto procesu může docházet k ztrátě produktů. U všech použitých primerů byly produkty detekovány, nicméně u některých byly velmi slabé (Obrázek 10), pravděpodobně docházelo během tohoto procesu ke ztrátě produktů vlivem jejich velikosti.



Obrázek 10: Kontrola přítomnosti purifikovaných PCR produktů pro primery SX20 a SX18. Legenda: L: standart molekulové hmotnosti 100pb; jamky 13 a 26: negativní kontrola, jamky 1-12: náhodně vzorky purifikovaných PCR produktů pro primer SX20, jamky 14-25: náhodně vzorky.

5.5. FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

Fragmentační analýza byla provedena pro 7 testovaných primerů, výsledky byly získány pouze pro 3 z nich, a to pouze pro 1 PCR platičko. Druhé PCR platičko, převážně se vzorky ze Slovenských Karpat obsahující převážně různé stupně hybridizace *S. hastata* a *S. silesiaca* údajně neposkytly žádný hodnotitelný výsledek. U primeru SX20 bylo extrémně málo produktu, což způsobilo, že se peaky nedaly jednoznačně skórovat. Ostatní primery tedy SX12, SX13 a SX22 neposkytovaly vůbec žádný signál. Výsledky jsou uvedené v Tabulce 11.

Tabulka 11: Scóre fragmentační analýzy pro primery SX18, SX23 a SX24.

Pozice na destičce	Marker			Kódy vzorků
	SX18	SX23	SX24	
A1	193/193	nic	123/125	H1
A2	193/193	233/233	125/125	H10
A3	193/193	220/220	125/125	H24
A4	193/193	223/223	125/125	H32
A5	193/193	220/240	123/123	H41
A6	184/193	225/225	125/125	Z6
A7	186/193	229/229	123/125	S18
A8	193/193	220/220	123/125	219
A9	193/193	212/212	119/125	227
A10	193/199	212/212	125/125	235
A11	193/193	nic	123/125	NT78
A12	193/193	nic	123/123	NT94
B1	193/193	nic	123/123	H2
B2	193/193	213/231	123/125	H17
B3	empty	empty	empty	empty
B4	193/193	216/216	125/125	H33
B5	193/193	nic	123/125	H42
B6	193/193	229/229	123/125	Z7
B7	193/193	216/223	123/123	S19
B8	193/193	220/220	125/125	220
B9	193/193	213/213	123/125	228
B10	193/193	213/213	125/125	236
B11	193/193	220/220	125/125	NT82
B12	193/196	nic	125/125	NT96
C1	empty	empty	empty	empty
C2	193/193	220/231	125/125	H18
C3	193/193	nic	125/125	H26
C4	193/193	220/220	125/125	H34
C5	193/193	213/213	125/129	H43
C6	193/193	229/233	123/123	S3
C7	193/193	212/212	123/123	S20
C8	193/193	220/220	125/125	221
C9	193/193	223/231	125/125	229
C10	184/193	223/231	125/125	237
C11	???	???	125/125	NT84
C12	193/193	225/229	123/123	NT99
D1	184/193	nic	123/123	H4
D2	193/193	220/220	123/125	H19
D3	193/193	nic	119/125	H27
D4	193/193	220/220	123/125	H35
D5	193/199	nic	123/125	Z1

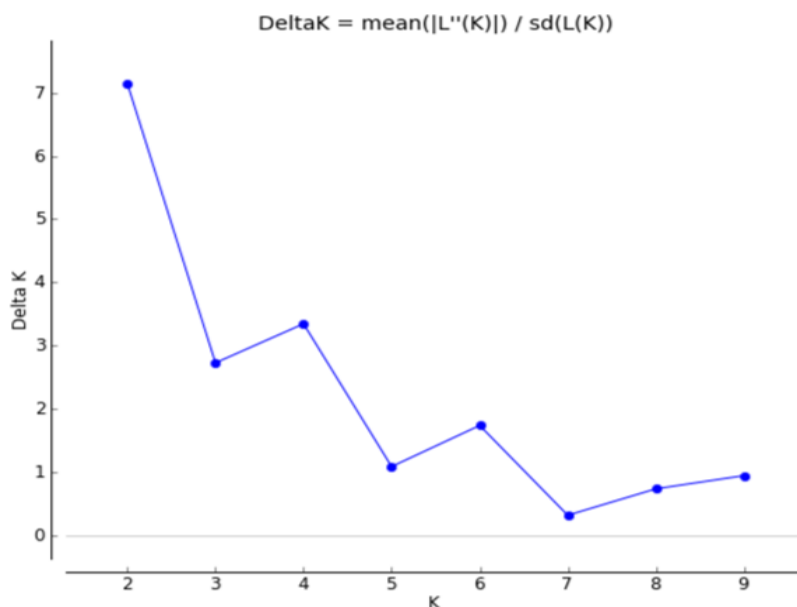
Pozice na destičce	Marker			
	SX18	SX23	SX24	Kódy vzorků
D6	193/193	213/220	125/125	S4
D7	193/193	212/212	125/125	X12
D8	193/193	220/223	123/125	222
D9	184/193	223/223	125/125	230
D10	193/193	223/223	125/125	238
D11	193/193	213/213	125/125	NT88
D12	193/193	220/251	123/123	NT100
E1	193/193	nic	125/125	H5
E2	193/193	223/223	119/125	H20
E3	186/193	213/233	125/125	H28
E4	184/193	220/220	125/125	H36
E5	193/199	225/242	123/123	Z2
E6	???	220/220	125/125	S5
E7	193/193	223/233	125/125	X13
E8	193/193	223/229	119/125	223
E9	193/193	213/213	125/125	231
E10	193/193	213/213	125/129	NT73
E11	193/193	nic	123/125	NT89
E12	186/193	???	123/125	NT101
F1	???	nic	nic	H6
F2	186/193	213/218	125/125	H21
F3	193/193	220/220	125/125	H29
F4	184/193	nic	123/125	H37
F5	184/193	213/213	125/125	Z3
F6	193/199	nic	123/125	S6
F7	193/193	240/240	123/125	F1
F8	186/199	213/213	125/129	224
F9	193/193	213/220	123/125	232
F10	193/193	213/220	125/125	NT75
F11	193/193	220/220	125/125	NT90
F12	193/193	213/213	123/125	H3
G1	199/199	nic	123/123	H7
G2	184/193	244/244	125/125	H22
G3	193/193	nic	123/125	H30
G4	193/193	223/223	123/123	H39
G5	193/193	nic	125/125	Z4
G6	193/193	nic	119/125	S11
G7	193/193	nic	123/125	217
G8	193/193	nic	125/125	225
G9	193/199	nic	125/125	233
G10	193/199	nic	125/125	NT76
G11	193/193	nic	125/125	NT91

Pozice na destičce	Marker			
	SX18	SX23	SX24	Kódy vzorků
G12	193/196	220/220	123/125	H25
H1	186/193	nic	125/125	H8
H2	193/193	220/220	123/125	H23
H3	193/193	nic	123/125	H31
H4	193/193	223/223	123/123	H40
H5	193/193	213/213	125/125	Z5
H6	193/193	220/220	125/125	S17
H7	193/193	213/238	123/125	218
H8	193/193	nic	125/125	226
H9	193/193	220/220	125/125	234
H10	193/202	220/220	123/123	NT77
H11	193/193	nic	125/125	NT93
H12	NK	NK	NK	NK

5.6. SLOŽENÍ POPULACE

Pomocí programu STRUCTURE bylo analyzováno 93 jedinců.

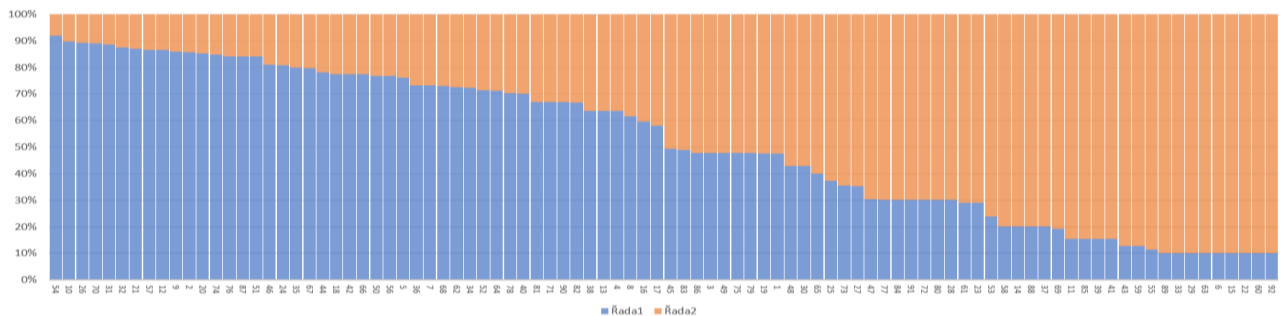
Program STRUCTURE HARVESTER (Obrázek 11) vyhodnotil jako nejpravděpodobnější hodnotu $K=2$ (Obrázek 12), jako méně pravděpodobnou variantu poté $K=4$ (Obrázek 13).



Obrázek 11: Stanovení nejpravděpodobnější klastru pomocí Evanno metody s využitím STRUCTURE HARVESTER

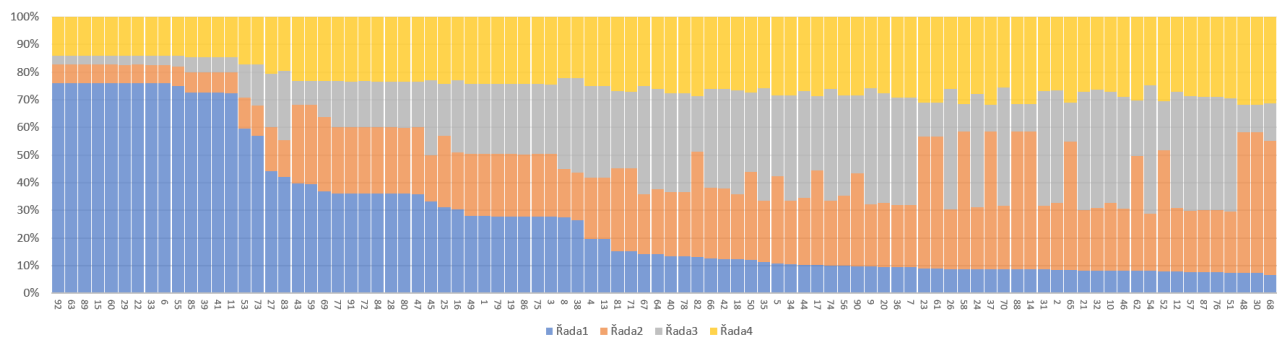
Došlo tak na rozdělení pouze na 2 klastry, tj. zdánlivě odpovídající jen 2 ancestrálním populacím (Obrázek 12). Analýza poukazuje na možnou introgresi dvou druhů, a to v našem

případě *S. hastata* a *S. silesiaca*. kdy ani jeden z druhů není čistý. Toto může být způsobeno malým počtem markerů a zkreslením vlivem nedostatečné kvality.



Obrázek 12: Výsledek analýzy pro nejpravděpodobnější hodnotu K=2.

Pro druhou analýzu byla použita druhá nejpravděpodobnější varianta K a to K=4. Na Obrázku 13 můžeme pozorovat rozdělení do 4 klastrů. Modrý klastř představuje *S. hastata* a zbylé 3 klastry lze hodnotit jako *S. silesiaca*, ve které se pravděpodobně projevuje křížení s dalšími taxony. Nízký počet fragmentační analýzou úspěšně vizualizovaných markerů neumožňuje postulovat přesnější výsledky.

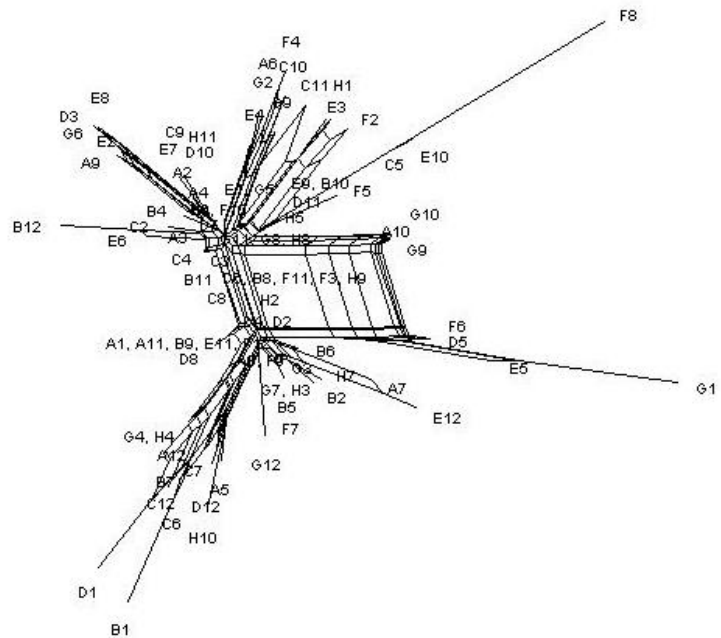


Obrázek 13: Výsledek analýzy pro hodnotu K=4.

Analýza vztahů mezi vzorky s využitím programu SPLITSTREE, tj. nalezení síťových vztahů ukázalo poměrně realistický pattern, který zdánlivě shlukuje 2 výraznější klastry (Obrázek 14), projevují se ovšem další menší klastry, které by hypoteticky mohly odpovídat hybridizaci/introgrsi dalších druhů, která je ve studované lokalitě (i mezi doplňujícími vzorky z Karpat) předpokládána. Bohužel zjištěný pattern ve variabilitě mikrosatelitů neodpovídá morfologické determinaci vzorků a zjištěné klastry jdou napříč taxony i napříč dvěma makrolokalitami. Úspěšná fragmentační analýza pro pouze 3 mikrosatelity se proto jeví jako nedostatečná pro popsání předpokládaných hybridizačních procesů ve studované populaci. Dalším důkazem nedostatečnosti polymorfismu ve studovaných datech je fakt, že nepříbuzné

druhy *S. alpina* (G11 a G12) a *S. retusa* (F11) (obě ze skupiny *Chamaetia*, tj. plazivých alpínských vrb) nevykazují žádnou odlišnost od *S. hastata*, *S. silesiaca* a jejich kříženců.

0.1



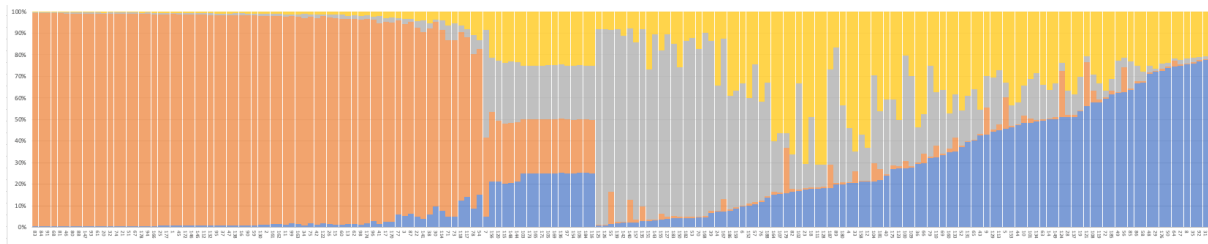
Obrázek 14: Síťový (network) graf vztahů vzorků vypočítaný metodou split decomposition pomocí programu SPLITS TREE. Čísla odpovídají pipetovací pozici na PCR platičku (Tabulka 3).

5.7. VYHODNOCENÍ A SROVNÁNÍ DŘÍVĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

Vyhodnotila jsem nepublikované analýzy B. Trnkové pro 188 vzorků s využitím 10 mikrosatelitů. Tato data byla zatížena velmi vysokým podílem neúplných profilů, ze 188 rostlin jen 29 vzorků mělo kompletní profil pro 10 mikrosatelitů. Celkem 94 vzorkům zcela scházely profily pro 3 mikrosatelity. Matice pro analýzy proto obsahovaly značný počet scházejících údajů.

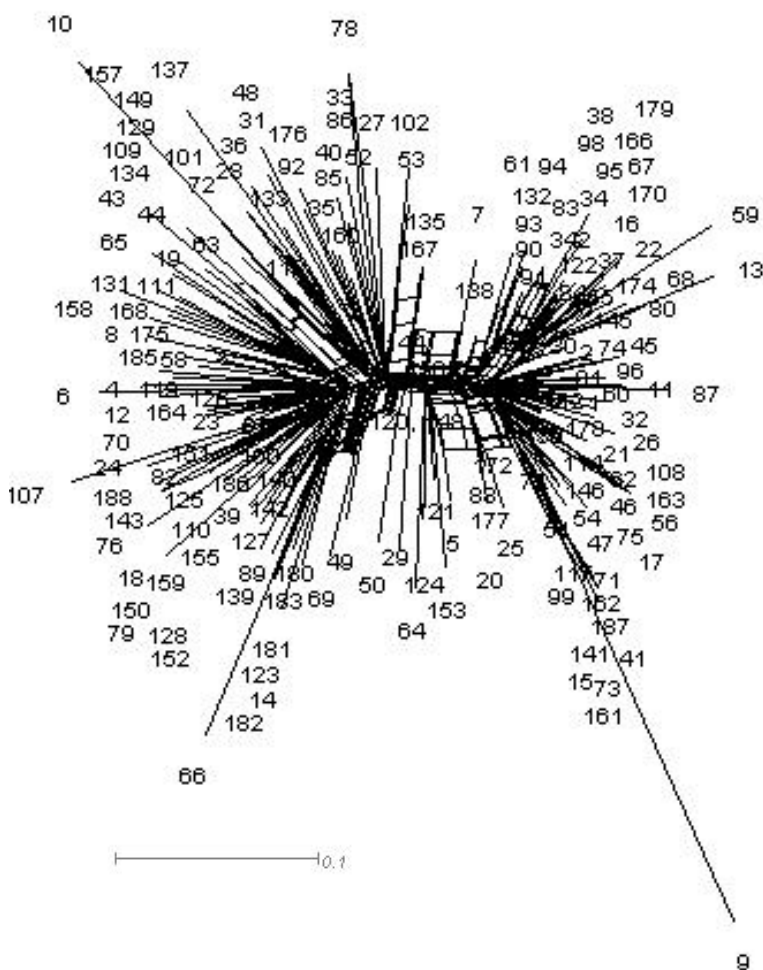
STRUCTURE analýza, pro nejpravděpodobnější počet klastrů $K=4$ ukázala pattern naznačující přítomnost *S. hastata*, která i přes tendenci k hybridizaci má charakter čistého

druhu. Naopak zbývající klastry naznačují, že *S. silesiaca* má silnější tendenci ke křížení a do velké míry je ovlivněná introgresí některého (některých) dalších druhů v lokalitě (Obrázek 15).



Obrázek 15: STRUCTURE analýza 188 vzorků a 10 mikrostaletů z nedokončených analýzy B. Trnkové. Oranžovou barvou jsou reprezentován klastr odpovídající *S. hastata*, barvou modrou+šedou klastry odpovídající *S. silesiaca*, žlutá barva hypoteticky představuje další pop

Nalezení retikulárních vztahů mezi jednotlivými vzorku ve stejném datasetu pomocí SPLITSTREE přineslo podobně realistický pattern, zřetelné jsou 2 výrazné shluky vzorků s množstvím vzorků intermediárních mezi hlavními klastry (Obrázek 16).



Obrázek 16: Síťový (network) graf retikulárních vztahů pro 188 vzorků a 10 mikrostaletů (SPLITSTREE) z nedokončených analýzy B. Trnkové. Pravá část grafu zobrazuje *S. silesiaca* s plynule navazujícími kříženci, v levá část grafu odpovídá *S. hastata*.

6. DISKUZE

6.1. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

U vrb již byly mikrosatelity navrženy v několika studiích (Baker *et al.*, 2003; Stamati *et al.*, 2003; Bozzi *et al.*, 2015) a také použity pro studium hybridizace (Brandová, 2010; Sochor, 2011; Sochor *et al.*, 2013). Pro samotnou experimentální část bylo vybráno 7 mikrosatelitů, které podávaly konzistentní výsledky. Izolace DNA z listů proběhla pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit bez komplikací, bylo jen potřeba odstranit středovou žilnatinu listů a po rozdrčení listy vždy zkontrolovat, aby zde nezůstaly žádné velké kousky, pouze jemný prach. Tento kit je známý tím, že poskytuje poměrně čistě extrahovanou DNA, ale za cenu nízkého výtěžku. Kontrola na agarózovém gelu i měření na NanoDropu ovšem prokázala, že extrakce DNA byla pro PCR analýzy dostatečná. Výsledná koncentrace bylo pro další kroky vyhovující a průměrně se pohybovala okolo 87 ng/μl. PCR podmínky pro vybrané mikrosatelity byly již optimalizovány dříve, převzala jsem metodiku, která byla optimalizována pro práci ve stejné laboratoři, PCR reakce tudíž probíhaly bez větších problémů, PCR reakce byly opakovány 2x. Kontrola na agarózovém gelu po extrakci DNA, PCR reakci a do jisté míry i purifikace vzorků byla úspěšná. Za hlavní příčinu neúspěšné fragmentační analýzy, která ani po dvakrát provedených PCR reakcích nepřinesla hodnotitelné výsledky, považuji obecně krok purifikace PCR produktů, popřípadě přílišné naředění purifikovaných PCR produktů pro fragmentační analýzu. K této masivní ztrátě docházelo i přes úpravy v protokolu. Tento krok nebylo možné vypustit, kvůli možnému poškození kapilár sekvenátoru. Možnou příčinou může být malá velikosti PCR produktů, která způsobila jejich vymytí při proplachování ethanolem. Toto vysvětlení by odpovídalo pro dva mikrosatelity poskytující výsledky, a to SX18 a SX23, jejichž PCR produkty jsou největší z celé skupiny a to konkrétně 184 pb a 215 pb. Nicméně výsledky byly získány i pro mikrosatelit SX24, jehož PCR produkt je ze skupiny naopak nejmenší. Obecně se jeví jako problematické udržení vzorků v PCR platičkách při promývání po centrifugaci. Přestože jsou mikrosatelity velmi spolehlivým molekulárním markerem, který je relativně nenáročný na podmínky PCR reakce (a v mém případě byly použity mikrosatelity, které již dříve poskytly ve stejné laboratoři na Ústavu experimentální botaniky hodnotitelné výsledky). Má práce přinesla nepříjemné potvrzení známého faktu, že nedostatečný počet markerů nemůže poskytnout dobře hodnotitelný výsledek. Opakování neúspěšných analýz, za využití značených primerů, znehodnocuje jednu z hlavních výhod mikrosatelitů, kterou je finanční dostupnost. Opakované PCR analýzy a opakované fragmentační analýzy se tak cenově přibližují modernějším postupům využívající celo-genomové sekvenování a poskytující

o několik řádů vyšší počet markerů (tj. tisíce až desetitisíce markerů), s využitím Whole-Genome Sequencing (WGS) metod, které již byly použity na studie u vrb (Przyborowski *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2020).

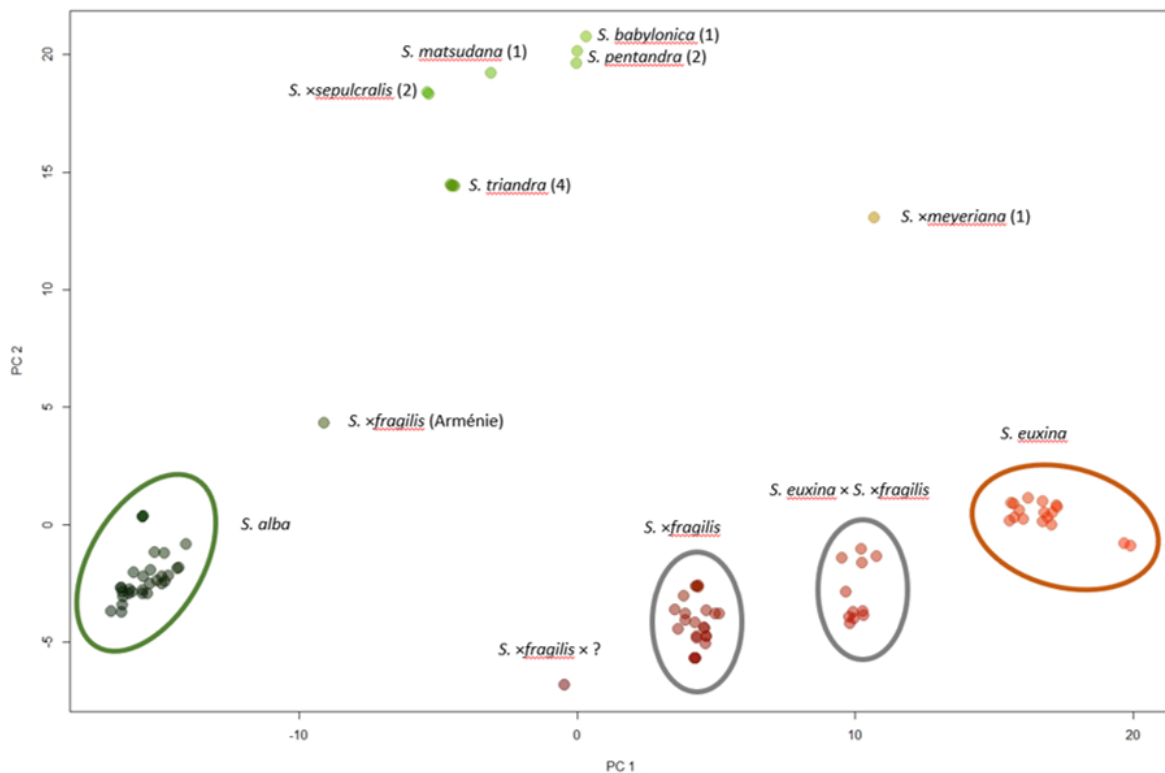
6.2. HYBRIDIZACE *S. HASTATA* A *S. SILESIACA*

Cílem práce mělo být prokázání hybridizace mezi druhy *S. hastata* a *S. silesiaca*, která je známá již od objevuje křížence N. J. Anderssonem, který taxon *Salix ×chlorophana* popsal právě z Velké Kotliny v Hrubém Jeseníku (Andersson, 1865). Kříženec byl opakovaně z lokality uváděn, je stabilně považován za součást Květeny ČR (Chmelař a Koblížek 1990; Vašut, 2019). Přestože je hybridizace tohoto druhu v ČR i jinde v Evropě známá, zůstává velkou neznámou míra hybridizace a vliv na ohrožení tohoto silně ohroženého druhu (Brandová a Vašut, 2014). Bohužel ani jeden z datasetů, tj. nedokončené výsledky B. Trnkové, ani moje výsledky poznamenané neúspěšných fragmentační analýzou v důsledku ztráty PCR produktů, jednoznačně nedokázaly odpovědět na charakter hybridizace v unikátní lokalitě Velké Kotliny v Hrubém Jeseníku. Terénní pozorování (R. J. Vašut, ústní sdělení), morfometrické analýzy tvaru listové čepele (B. Trnková, nepublikované výsledky) dávají tušit, že hybridizace ve Velké kotlině má velmi komplexní charakter: rodičovské druhy jsou početně vzácnější než jejich kříženec (Brandová a Vašut, 2014), který ale dále vytváří křížence s třetími druhy (*S. aurita*, *S. purpurea*, možná také *S. caprea*; R. J. Vašut, ústní sdělení). Právě míra této násobné hybridizace zůstává neznámou a stávající data nedokázaly míru takové hybridizace popsat. I přes celkovou rozporuplnost dat lze zřetelně vidět rozsáhlou hybridizaci, pozorovaný pattern ve STRUCTURE výsledcích pravděpodobně odráží zpětné křížení, které je u vrb (ale i u příbuzných topolů) známé (R. J. Vašut, nepublikovaná data pro *Salix*; Lexer *et al.*, 2005; Castiglione *et al.*, 2010; Christe *et al.*, 2016; Suarez-Gonzales *et al.*, 2016 pro *Populus*). Přesto introgresi dalšího, třetího druhu nelze z dat jednoznačně prokázat, proto lze jen hypotetizovat, že pattern STRUCTURE analýz do jisté míry naznačuje introgresi 1-2 dalších druhů, ale může zároveň odrážet jen subpopulace *S. silesiaca*, které nemusejí souviset s introgresí jiného druhu. Hlavním závěrem mé studie tak zůstane fakt, že mikrosatelity, jako dříve dostupná a výhodná metoda, se stávají nedostatečnými a v případě neúspěchů i finančně nevýhodným postupem.

6.3. DALŠÍ POSTUP ŘEŠENÍ PROBLEMATIKY

Jelikož se mikrosatelity neukázaly jako nejlepší volba, nabízí se řešení použitím jiného typu markerů. Nejlepším východiskem se jeví DArTseq genotypování. To je finančně relativně

dostupné, jelikož za výrazně vyšší cenu poskytuje řádově více lokusů. Zvyšují tak přesnost analýz tím, že statistické analýzy nejsou postaveny na jednotlivých markerech, ale na tisících až deseticích markerů, které jsou na všech chromozomech genomu – poskytují tak možnost identifikovat lokusy přítomné jen na některých chromozomech, a proto identifikovat zpětné křížení nebo dávnější introgresi. První publikované výsledky (Przyborowski *et al.*, 2013) ukázaly, že tato metoda poskytuje kromě vysokého počtu lokusů (v této studii 1362) také poměrně vysoký počet druhově specifických lokusů (markerů), např. *Salix triandra* měla 135 druhově specifických markerů (tj. 32,5 % všech markerů). V komplexu úzkolistých vrb (*S. alba* – *S. euxina*) bylo získáno dokonce řádově více markerů (152.449), počet druhově specifických markerů se pohyboval od 2.409 (*S. euxina*) po 34.377 (*S. triandra*) (Vašut, Weger a kol., in prep.). Takto robustní počet markerů umožňuje bezpečně identifikovat zpětné křížení nebo vícečetnou hybridizaci tří druhů (Obrázek 17 a Obrázek 18).



Obrázek 17: Diskriminační analýzy (PCA) pro 94 vzorků úzkolistých vrb *Salix* subgen *Salix*, na základě 152 449 DArTseq markerů. Díky vysokému počtu markerů dokázaly statistické analýzy spolehlivě identifikovat v populacích zpětné křížení: dolní část grafu ukazuje F1 křížence *S. alba* × *S. euxina* (= *S. xfragilis*, dole uprostřed) a jejich F2 zpětného křížence (R. J. Vašut, J. Weger a kol. Nepublikovaná data, poskytnutá R. J. Vašutem)

7. ZÁVĚR

Tato práce se zaměřila na silně ohrožený druh *S. hastata* a vznik jejich kříženců ve Velké Kotlině v Hrubém Jeseníku, kde u nás druh jediné roste. Cílem bylo zjištění charakteru populace a následně určit míru a směr hybridizace mezi *S. hastata* a *S. silesiaca*, popřípadě i účast jiných druhů. Ke studiu populace byly jako molekulární markery zvoleny kodominantní mikrosatelity, jejichž podmínky už byly dříve pro naše účely optimalizovány. Celkem bylo použito 7 mikrosatelitů, z nichž pouze 3 poskytly analyzovatelné údaje, kvůli problémům v postupu. Z údajů jsme schopni pouze potvrdit přítomnost hybridizace mezi *S. hastata* a *S. silesiaca*. Kvůli malému množství dat, nebylo možné určit míru ani směr hybridizace ani spolehlivě stanovit vnitropopulační charakteristiky (např. heterozygotnost) studovaného druhu. Mikrosatelity se tedy ukázaly pro tuto studii jako nevýhodné, a to z hlediska finančního i množství získaných dat. Situaci měly objasnit DArTseq markery, které poskytují řádově více lokusů, což umožňuje zvýšit přesnost analýzy. Tyto markery byly již dříve k tomuto účelu využity. Bohužel data pro *S. hastata* a její křížence nebyly při dokončení práce dostupná.

8. LITERATURA

- Allendorf F. W., Leary R. F., Spruell P., Wenburg J. K. (2001): The problems with hybrids: setting conservation guidelines. – *Trends in Ecology and Evolution* 16: 613–622.
- Andersson N. J. (1865): *Monographia Salicum*. – Pars I. Kongl. Sven. Vetens. Akad. Handl., ser. N., 6/1(4)
- Arnold M. L. (1992): Natural hybridization as an evolutionary process. – *Annual review of Ecology and Systematics*, 23: 237–261.
- Arnold M. L. (1997): *Natural hybridization and evolution*. – Oxford University, Press on Demand.
- Barcaccia G., Meneghetti S., Lucchin M., de Jong H. (2014): Genetic segregation and genomic hybridization patterns support an allotetraploid structure and disomic inheritance for *Salix* species. – *Diversity* 6: 633–651.
- Barker J. H. A., Pahlich A., Trybush S., Edwards J., Karp A. (2003): Microsatellite markers for diverse *Salix* species. – *Molecular Ecology Notes* 3: 4–6.
- Barton N. H., Hewitt G. M. (1985): Analysis of hybrid zones. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 113–148.
- Boecklen W., Spellenberg R. (1990): Structure of herbivore communities in two oak (*Quercus spp.*) hybrid zones. – *Oecologia* 85: 92–100.
- Brandová B. (2008): *Ekologie, biologie a rozšíření vrby šípovité (Salix hastata) ve Velké kotlině (Hrubý Jeseník)*. – Bakalářská práce, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Brandová B. (2010): *Hybridizace horských druhů vrb na příkladu vrby hrotolisté ve Velké kotlině*. – Diplomová práce, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Brandová B., Vašut R. J. (2010): Je u nás vrba šípová ohrožena hybridizací? – *Ochrana přírody* 2010(5):19–21.
- Bresadola L., Caseys C., Castiglione S., Buerkle C. A., Wegmann D., Lexer C. (2019): Admixture mapping in interspecific *Populus* hybrids identifies classes of genomic architectures for phytochemical, morphological and growth traits. – *New Phytologist* 223: 2076–2089.

- Castiglione S., Cicatelli A., Lupi R., Patrignani G., Fossati T., Brundu G., Sabatti M., van Loo M., Lexer C. (2010): Genetic structure and introgression in riparian populations of *Populus alba* L. – *Plant Biosystems* 144: 656–668.
- Cronk Q., Ruzzier E., Belyaeva I., Percy D. (2015): *Salix* transect of Europe: latitudinal patterns in willow diversity from Greece to arctic Norway. – *Biodiversity Data Journal* 3: e6258. doi:10.3897/BDJ.3.e6258
- Danihelka J., Chrtek J., Kaplan Z. (2012): Checklist of vascular plants of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 647–811
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Earl D. A., vonHoldt B. M. (2012): STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. – *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- Elven R., Karlsson T. (2000): *Salicaceae Mirbel.* – In: Jonsell B. [ed.], *Flora Nordica* 1: 118–195, Bergius Foundation, Stockholm
- Ericson L., Burton J. J., Wennström, A. (1993): Inter-specific host hybrids and phalacrid beetles implicated in the local survival of a smut pathogen. – *Oikos* 68: 393–400.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. – *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. (2007): Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. – *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578.
- Fang Ch. (1987): On the distribution and origin of *Salix* in the World. Chinese. – *Acta Phytotaxonomica Sinica* 25: 307–312.
- Floate K., Kearsley M., Whitham, T. (1993): Elevated herbivory in plant hybrid zones: *Chrysomela confluentes*, *Populus* and phenological sinks. – *Ecology* 74: 2056–2065.
- Fritz R. (1999): Resistance of hybrid plants to herbivores: genes, environment, or both? – *Ecology* 80: 382–391.
- Fritz R. S., Roche B. M., Brunfeld S. J., Orians C. M. (1996): Interspecific and temporal variation in herbivore responses to hybrid willows. – *Oecologia* 108: 121–129.
- Gebauer R., Martinková M., Úradníček L., Tichá S. (2010): Kořenový systém vrb podél vodních nádrží a toků. – *Živa* 2010(2): 60–61.

- Genovart M. (2009): Natural hybridization and conservation. – *Biodiversity and Conservation*, 18: 1435.
- Gramlich S., Sagmeister P., Dullinger S., *et al.* (2016): Evolution in situ: hybrid origin and establishment of willows (*Salix L.*) on alpine glacier forefields. – *Heredity* 116: 531–541.
- Gramlich S., Wagner N. D., Hörandl E. (2018): RAD-seq reveals genetic structure of the F2-generation of natural willow hybrids (*Salix L.*) and a great potential for interspecific introgression. – *BMC Plant Biology* 18: 317. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1552-6>
- Grulich V. (2012): Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. – *Preslia* 84: 631–645.
- Grulich V., Chobot K., *et al.* (2017): Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, 178 s. ISBN 978-80-88076-47-6.
- Hamilton J. A., Miller J. M. (2015): Adaptive introgression as a resource for management and genetic conservation in a changing climate. – *Conservation Biology* 30: 33–41.
- Harrison R. G., Harrison, R. G., *et al.* (1993): Hybrid zones and the evolutionary process. – Oxford University Press on Demand.
- Howard D.J. (1986): A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. – *Evolution*, 40: 34-43.
- Hroneš M., Nývltová V., Brandová B., Ševčík J., Dančák M., Vašut R. J. (2014): Vysokohorské vrby (*Salix*) sudetských pohoří České republiky-rozšíření a současný stav populací. – *Zprávy České Botanické Společnosti* 49: 29–47.
- Hubisz M. J., Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. (2009): Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. – *Molecular Ecology Resources* 9: 1322–1332.
- Huson D. H., Bryant D. (2006): Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. – *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267.
- Chambers G. K., MacAvoy E. S. (2000): Microsatellites: consensus and controversy. – *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 126: 455–476.
- Chao N. (1987): On the distribution of *Salicaceae* in China. – *Acta Phytotaxonomica Sinica* 25: 114–124.
- Chmelař J., Koblížek J. (1990): 65. Salicaceae Mirbel – vrbovité. – In: Hejný S. & Slavík B. [eds.], *Květena České republiky* 2, pp. 458-495 – Academia, Praha.

- Christe C., Stölting K. N., Bresadola L., Fussi B., Heinze B., Wegmann D., Lexer C. (2016): Selection against recombinant hybrids maintains reproductive isolation in hybridizing *Populus* species despite F1 fertility and recurrent gene flow. – *Molecular Ecology* 25: 2482–2498.
- Isebrands J. G., Richardson J. (2013): Poplars and willows: trees for society and the environment. – FAO, Rome. ISBN 9781780641089.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. (2001): Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. – *Nucleic Acids Research* 29: e25. DOI: 10.1093/nar/29.4.e25.
- King R. C., Stansfield W. D., Mulligan P. K. (2006): A dictionary of genetics. 7th ed. New York: – Oxford University Press. ISBN 9780195307610.
- Korbelář J., Endris Z. (1981): Naše rostliny v lékařství. – Avicenum, Praha.
- Kuzovkina Y., Quigley M. F. (2005): Willows beyond wetlands: Uses of *Salix L.* Species for environmental projects. – *Water, Air and Soil Pollution* 162: 183–204.
- Lewontin R. C., Birch L. C. (1966): Hybridization as a source of variation for adaptation to new environments. – *Evolution* 20:315–336.
- Lexer C., Fay M. F., Joseph J., Nica M. S., Heinze B. (2005): Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): The role of ecology and life history in gene introgression. – *Molecular Ecology* 14: 1045-1057.
- Liesebach H., Schneck V., Ewald E. (2010): Clonal fingerprinting in the genus *Populus L.* by nuclear microsatellite loci regarding differences between sections, species and hybrids. – *Tree Genetics and Genomes* 6: 259–269.
- Litt M., Luty J. M. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. – *American Journal of Human Genetics* 44:397–401.
- Mallet J. (2005): Hybridization as an invasion of the genome. – *Trends in Ecology and Evolution* 20: 229–237.
- Martin N., Bouck A., Arnold M. (2006): Detecting adaptive trait introgression between *Iris fulva* and *I. brevicaulis* in highly selective field conditions. – *Genetics* 172: 2481–2489.
- Martinsen G. D., Whitham T. G., Turek R. J., Keim P. (2001): Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. – *Evolution* 55: 1325–1335.

- Mitchell N., Campbell L.G., Ahern J.R., Paine K.C., Giroldo A.B., Whitney K.D. (2019): Correlates of hybridization in plants. – *Evolution Letters*, 3: 570-585.
- Morgante M., Vogel J. (1994): Compound microsatellite primers for the detection of genetic polymorphisms. US Patent Application No. 08/326456
- Newsholme Ch. (2003): *Willows: the genus Salix*. – Timber Press, Portland. ISBN 9780881925654.
- Orians C., Fritz R. (1995): Secondary chemistry of hybrid and parental willows: phenolic glycosides and condensed tannins in *Salix sericea*, *S. eriocephala*, and their hybrids. – *Journal of Chemical Ecology* 21: 1245–1253.
- Ouborg N. J., Piquot Y., van Groenendael J. M. (1999): Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. – *Journal of Ecology* 87: 551–568.
- Parida S. K., Kalia S. K., Sunita K., Dalal V., Hemaprabha G., Selvi A., Pandit A., Singh A., Gaikwad K., Sharma T. R., Srivastava P. S., Singh N. K., Mohapatra T. (2009): Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. – *Theoretical and Applied Genetics* 118: 327–338.
- Paul F., Käab A., Maisch M., Kellenberger T., Haeberli W. (2004): Rapid disintegration of Alpine glaciers observed with satellite data. – *Geophysical Research Letters* 31: 12–15.
- Powell W., Machray G. C., Provan J. (1996): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. – *Trends in Plant Sciences* 1: 215–222.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. – *Genetics* 155: 945–959.
- Provan J., Powell W., Hollingsworth P. M. (2001): Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. – *Trends in Ecology and Evolution* 16: 142–147.
- Przyborowski J. A., Sulima P., Kuszewska A., Załuski D., Kilian A. (2013): Phylogenetic relationships between four *Salix L.* species based on DArT markers. – *International Journal of Molecular Sciences* 14: 24113–24125. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms141224113>
- Ramasamy R. K., Ramasamy S., Bindroo B. B., Naik V. G. (2014): STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. – *SpringerPlus* 3: 431. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-431>

- Rieseberg L. H. (1997): Hybrid origins of plant species. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359–389.
- Rieseberg L. H., Carney S. E. (1998): Plant hybridization. – *The New Phytologist* 140: 599–624.
- Rieseberg L. H., Raymond O., Rosenthal D. M., Lai Z., Livingstone K., Nakazato T., Durphy J. L., Schwarzbach A. E., Donovan L. A., Lexer C. (2003): Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. – *Science* 301: 1211–1216.
- Rieseberg L. H., Willis J. H. (2007): Plant speciation. – *Science* 317: 910–914.
- Semagn K., Bjornstad Å., Ndjiondjop M. N. (2006): An overview of molecular marker methods for plants. – *African Journal of Biotechnology* 5: 2540–2568.
- Skvortsov A. K. (1999): Willows of Russia and adjacent countries. – University of Joensuu, Joensuu (Finland).
- Sochor M. (2009): Molekulární markery pro studium vysokohorských druhů vrb (*Salix*). – Bakalářská práce, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Sochor M., Vašut R. J., Stanovská E., Majeský E., Mráček J. (2013): Can gene flow among populations counteract the habitat loss of extremely fragile biotope? An example from population genetic structure in *Salix daphnoides*. – *Tree Genetics and Genomes* 9: 1193–1205.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. (1999): An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. – *Genome* 42: 158–161.
- Stamati K., Blackie S., Brown W. S., Russell J. (2003): A set of polymorphic SSR loci for subarctic willow (*Salix lanata*, *S. lapponum* and *S. herbacea*). – *Molecular Ecology Notes* 3: 208–282.
- Stebbins G. (1959): The role of hybridization in evolution. – *Proceedings of the American Philosophical Society* 103: 231–251.
- Suarez-Gonzales A., Hefer C. A., Christe C., Corea O., Lexer C., Cronk Q. C. B., Douglas C. J. (2016): Genomic and functional approaches reveal a case of adaptive introgression from *Populus balsamifera* (balsam poplar) in *P. trichocarpa* (black cottonwood). – *Molecular Ecology* 25: 2427–2442.
- Šimíček V. (1992): Vrby při úpravách vodních toků a ekologické obnově krajiny. – Agrospoj, Praha

- Triest L., de Greef B., de Bondt R., van Slycken J. (2000): RAPD of controlled crosses and clones from the field suggests that hybrids are rare in the *Salix alba*-*Salix fragilis* complex. – *Heredity* 84: 555–563.
- Triest L., de Greef B., de Bondt R., vanden Bossche D., D'Haeseleer M., van Slycken J., Coart E. (1997): Use of RAPD markers to estimate hybridization in *Salix alba* and *Salix fragilis*. – *Belgian Journal of Botany* 129: 140–148.
- Úradníček L., Čáp J., Jelínek B., Koutecký T., Maděra P., Řepka R., Tichá S., Vahalík P. (2017): Červená kniha dřevin České republiky. – Lesnická práce, Kostelec nad Černými lesy.
- Úradníček L., Maděra P., Tichá S., Koblížek J. (2009): Dřeviny České republiky. 2. přepracované vydání. Kostelec nad Černými lesy. – Lesnická práce, Kostelec nad Černými lesy.
- Vašut R. J. (2019): 99. Salicaceae Mirb. – vrbovité. – In: Kaplan Z. & Danihelka J. [eds.], Klíč ke Květeně ČR, pp. 564–580.
- Vašut R. J., Sochor M., Hroneš M. (2013): Vrby České republiky. – Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Waltz A., Whitham T. (1997): Plant development affects arthropod communities: opposing effects of species removal. – *Ecology* 78: 2133–2144.
- Wagner N. D., He L., Hörandl E. (2020): Phylogenomic Relationships and Evolution of Polyploid *Salix* Species Revealed by RAD Sequencing Data. – *Frontiers in Plant Sciences* 11: #1077 [DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01077>]
- Wenzl P., Carling J., Kudrna D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinhofs A., Kilian A. (2004): Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101: 9915–9920.
- Whitham T. G., Morrow P. A., Potts B. M. (1991): Conservation of hybrid plants. – *Science* 254: 779–780.
- Whitney K. D., Ahern J. R., Campbell L. G., Albert L. P., King M. S. (2010): Patterns of hybridization in plants. – *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12: 175–182.
- Whitney K. D., Randell R. A., Rieseberg L. H. (2006): Adaptive introgression of herbivore resistance traits in the weedy sunflower *Helianthus annuus*. – *American Naturalist* 167: 794–807.
- Wittenberg A. H., van der Lee T., Cayla C., Kilian A., Visser R. G., Schouten H. J. (2005): Validation of the high-throughput marker technology DArT using the model plant

- Arabidopsis thaliana*. – Molecular Genetics and Genomics 274: 30–39.
<https://doi.org/10.1007/s00438-005-1145-6>
- Wu J., Nyman T., Wang D., *et al.* (2015): Phylogeny of *Salix* subgenus *Salix s.l.* (*Salicaceae*): delimitation, biogeography, and reticulate evolution. – BMC Evolutionary Biology 15: 31. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0311-7>.
- Wynn A. H. (1986): Linkage disequilibrium and a contact zone in *Plethodon cinereus* on the Del-Mar-Va Peninsula. – Evolution 40: 44–54.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. – Molecular Ecology 11: 1–16.