

# CHARAKTERIZACE GENETICKÉ VARIABILITY LOKÁLNÍ POPULACE TOPOLU ŠEDÉHO (*POPULUS* × *CANESCENS* AITON SM.) S VYUŽITÍM SSR MARKERŮ A FENOTYPOVÉHO HODNOCENÍ

## CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY OF LOCAL POPULATION OF GREY POPLAR (*POPULUS* × *CANESCENS* AITON SM.) USING SSR MARKERS AND PHENOTYPIC EVALUATION

EVA POKORNÁ ✉ - LUŽKA ČÍŽKOVÁ - PAVLÍNA MÁCHOVÁ - HELENA CVRČKOVÁ - VÁCLAV BURIÁNEK - MARTINA KOMÁRKOVÁ - JAROSLAV DOSTÁL - JIŘÍ ČÁP - MARTIN FULÍN

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady 136, 252 02 Jíloviště, Czech Republic

✉ e-mail: pokorna@vulhm.cz

### ABSTRACT

The main goal of the presented study was to evaluate genotypes of unique population of grey poplar (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.), which has been selected for its valuable parameters and limited reproduction ability by classical methods of vegetative propagation for gene pool preservation and restoration at Dyjákovice village (South Moravia Region, Czech Republic). Nuclear microsatellite (SSR) analyses using 14 SSR markers together with phenotype characterization determined that 90 sampled trees of female bias belonged to one clone. According to these results, the collection of grey poplars has been extended for 155 individuals in totally including both female and male bias (120 and 35, respectively) to discriminate their genetic diversity. Our data revealed occurrence of 6 unique genotypes among all female samples while higher genetic variability pattern exhibited male samples among which 27 genotypes have been detected. These findings about species genetic identity as well as genetic variability indicate the importance of SSR method for selection of valuable grey poplar genotypes as a source of reproductive material for further reforestation.

For more information see Summary at the end of the article.

**Klíčová slova:** topol šedý (*Populus* × *canescens*); fenotyp; genotyp; SSR markery

**Key words:** grey poplar (*Populus* × *canescens*); phenotype; genotype; SSR markers

### ÚVOD

V posledních letech získal rod *Populus* výjimečné postavení v ekologii, komerčním využití i v oblasti vědy a výzkumu. Význam topolů rychle vzrostl nejen po zveřejnění sekvencí genomu topolu chlupatoplodého (*Populus trichocarpa* L.), který se stal modelovou dřevinou v oblasti rostlinné biologie, ale i z ekonomického hlediska v důsledku zdokonalených metod pěstování, zavedením nových hybridů s žádoucími vlastnostmi, zájmu v oblasti produkce biomasy a rovněž i potenciálu pro fyto-remediační účely, přestože jejich používání bylo v městských výsadbách omezeno (TUSKAN et al. 2006; STOBRAWA 2014). Na základě vysoké diverzity rodu *Populus*, který zahrnuje 29 druhů rozdělených do 6 sekcí rostoucích na kontinentech Evropy, Asie, Severní Ameriky a východní Afriky (ECKENWALDER 1996), není dosud taxonomie

topolů zcela jednoznačná, neboť dochází k mezidruhovému křížení v rámci rodu. Tímto příkladem je i přirozeně vzniklý kříženec topol šedý (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.) vyskytující se zpravidla na lokalitách obou rodičovských druhů topolu bílého a topolu osiky (*Populus alba* L. × *Populus tremula* L.). V České republice se jako autochtonní druh nachází topol šedý v moravských úvalech a v údolích řek Svratky a Odry, přirozeně roste poměrně vzácně v lužních lesích a pobřežních křovinách (CHMELÁŘ, KOBLÍŽEK 1990; ÚRADNÍČEK et al 2009; BURIÁNEK, NOVOTNÝ 2016). Při detailní rekonstrukci aktuálního výskytu domácích druhů topolů na území Moravy v povodí řek Bečvy, Jihlavy, Moravy byl topol šedý zjištěn jako vtroušená dřevina zejména v malých lesních celcích, remízích, břehových porostech a lokalitách podléhajících zvláštnímu režimu dle zákona o ochraně přírody (zákon č. 114/1992 Sb. v platném znění), kde neprobíhalo intenzivní ce-

loplošné lesnické hospodaření a zachovala se bohatá druhová skladba (ČÍŽKOVÁ 2007).

Unikátní lokální populace topolu šedého se nachází u obce Dyjákovice v izolovaném lesním komplexu Lužný les na ploše přibližně 15 ha (Lesní správa LČR, s. p., Znojmo, revír Jaroslavice). Jedinečné je nejen vysoké kvantitativní zastoupení topolu šedého v druhové skladbě porostů, ale také kvalitativní charakteristika fenotypů s rovným průběžným kmenem při současném dobrém čištění kmene, které se v populaci vyskytují. Z důvodu probíhajícího rozpadu porostů v důsledku hynutí jasanů a olší je topol šedý perspektivní dřevinou pro obnovení stability ekosystému lužního lesa. Je adaptován na dané stanoviště, vykazuje výborný zdravotní stav a vysoký výnosový potenciál k plnění hospodářské funkce lesa v krátkém časovém horizontu, takže se dostává do popředí zájmu vlastníků lesa. Stabilita ekosystému je dána mj. jeho vysokou biodiverzitou, proto je nutné poznat strukturu populace a zastoupení jednotlivých genotypů dřívě, než bude zahájena jejich reprodukce.

Pro charakterizaci elitních genotypů, určení klonové identity nebo genetické variability, případně zjištění původu jednotlivých druhů topolů, jsou často využívány mikrosatelitové markery. Mikrosatelity neboli Single Sequence Repeats (SSRs) jsou krátké tandemové repetice nukleotidů (1–10), které se nacházejí napříč genomem prokaryot i eukaryot, přičemž u eukaryot jsou zastoupené obzvláště v euchromatinu a v kódujících i nekódujících částech jaderné i organelové DNA (VIERA et al. 2016). Na základě lišícího se počtu opakujících se sekvencí jsou SSRs často vysoce polymorfní. Vzhledem k příbuznosti topolů je převážná část SSR markerů všestranně využívána pro genetickou charakterizaci druhů, kdy např. LEXER et al. (2005) uvádí značnou variabilitu u sledovaných lokusů použitých shodně pro topol šedý i oba jeho rodiče. Stejně tak SCHOOT et al. (2000), SMULDERS et al. (2001) nebo TUSKAN et al. (2004) vyvinuli SSR markery, které je možné použít nejen pro jeden konkrétní druh topolu. V porovnání s metodami využívajícími izoenzymy nebo „AFLP“ (amplified fragment-length polymorphism) markery mají jaderné mikrosatelity mnohem vyšší rozlišovací schopnost pro určení genotypu (CERVERA et al. 2005). Pomocí SSR markerů je možné odhalit i strategii rozmnožování topolů vegetativním nebo generativním způsobem. FUSSI et al. (2012) například překvapivě zjistili u 28 stromů topolu bílého odebraných v porostech odlišných údolí na různých ostrovech Malty, že se jedná o shodný genotyp. Analýza jaderných mikrosatelitů ukázala blízkou příbuznost se vzorky z jižní Itálie s malým podílem alel typických pro vzorky ze severní Afriky. Na základě těchto poznatků popsali jako nejpravděpodobnější variantu rozšíření klonu topolu bílého záměrný přenos lidskou činností z Itálie na Maltu a jeho následně postupné šíření přirozenou vegetativní reprodukcí.

Základní rozmnožovací strategií topolů je generativní reprodukce, která začíná již okolo 10. – 15. roku věku (STANTON, VILLAR 1996). Topoly kvetou obvykle před olistěním a semena dozrávají v závislosti na druhu 3 týdny až 3–5 měsíců (BRAATNE et al. 1996). Semena si uchovávají životaschopnost pouze 1–2 týdny, klíčí v teple a vlhku na holém minerálním substrátu, ale mortalita semenáčků je vysoká z důvodu nestability podmínek na většině stanovišť (BRAATNE et al. 1996; KARRERBERG et al. 2002). Alternativní strategií přežití a udržení topolů v ekosystémech je vegetativní reprodukce v různých formách. Pro některé druhy sekce *Populus* je typické šíření kořenovými výmladky (PERALA 1990). Je popsán obrovský klon topolu osikovitěho (*Populus tremuloides* Michx.) vyskytující se na ploše 43,3 ha s počtem 47 tis. raamet v oblasti severního dolního Michiganu (KEMPERMAN, BARNES 1976; DEWOODY et al. 2008). BARNES (1969) detailně popisuje fenotypové znaky u 31 klonů topolu osikovitěho a 21 klonů topolu hrubozubého (*Populus grandidentata* Michx.), podle nichž určuje variabilitu mezi klony a v rámci jednotlivých klonů. Ve zkoumaných populacích zjistil enormně vysokou interklonální proměnlivost, ale doporučuje primárně zkoumat také proměnlivost fenotypových znaků uvnitř klonu.

Hlavním cílem této práce bylo zhodnotit fenotypové a genotypové charakteristiky unikátní populace topolu šedého, která byla zvolena pro své cenné vlastnosti a omezené možnosti vegetativní reprodukce klasickými metodami k záchraně a obnově na Lesní správě LČR, s. p., Znojmo, v revíru Jaroslavice na lokalitě Lužný les severně od Dyjákovice. Byla provedena detailní inventarizace porostů a selekce 200 nejvyšších jedinců topolu šedého, vybraných na základě standardních kritérií hodnocení fenotypu pro uznávání zdrojů lesního reprodukčního materiálu. Pro zhodnocení genetické variability bylo použito u celkem 155 jedinců 14 SSR markerů určujících zastoupení jednotlivých genotypů. Získané výsledky byly jedním z kritérií při výběru konkrétních jedinců topolu šedého k jejich uznání jako zdrojů reprodukčního materiálu pro generativní i vegetativní reprodukci.

## MATERIÁL A METODIKA

Pro charakterizaci genetické variability topolu šedého byla provedena inventarizace celé populace v lokalitě Lužný les u obce Dyjákovice na Lesní správě LČR, s. p., Znojmo v revíru Jaroslavice. Součástí inventarizace byla selekce zaměřená na hodnocení fenotypových znaků tvar kmene, čištění kmene, délka koruny a na hodnocení zdravotního stavu stromů. Cílem selekce bylo vytvořit soubor neidentických jedinců vhodných ke sběru reprodukčního materiálu a zachování cenné populace. V souladu s požadavky na fenotypovou kvalitu zdrojů lesního reprodukčního materiálu byli do evidence zahrnuti pouze jedinci s výborným zdravotním stavem, s tvarem kmene „rovný“, čištěním kmene „výborné“ a „dobré“, s délkou koruny „krátká“. U každého evidovaného jedince bylo určeno pohlaví. Byl zohledněn také věk porostů tak, aby byly v evidenci zastoupeny všechny vyskytující se věkové třídy, tj. 6. – 9. třída. Vzhledem k očekávanému výskytu klonality v porostech byly sledovány specifické fenotypové charakteristiky, které mohou být typické pro určitý genotyp, a to úhel větvení, výskyt silných větví v koruně, hustota koruny. Na základě uvedeného postupu bylo zaevidováno 200 jedinců topolu šedého, kteří byli označeni čísly, u 155 z nich byly provedeny analýzy mikrosatelitů jaderné DNA. Výchozím rostlinným materiálem pro analýzy byly apikální pupeny ve fázi dormance nebo mladé listy topolu šedého. Během odběru vzorků byly stromy v terénu zaměřeny pomocí GPS, přičemž rostlinný materiál byl řádně označen, uložen v mikrotenových sáčcích do chladových boxů a při předání do laboratoře krátkodobě uložen do chladničky, než byl zpracován. Vzorky byly lyofilizovány a postupně homogenizovány (100 mg č.h. nebo 20 mg s.h.) v kapalném dusíku (-196 °C) pro následnou izolaci DNA za použití kitu Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Německo) a dodržení postupu uvedeného výrobcem. Množství a čistota získané DNA byly ověřeny na spektrofotometru NanoPhotometer (Implen).

Genetická diverzita u odebraných vzorků topolu šedého byla stanovena 15 mikrosatelitovými markery (SSR markery) na základě dostupné literatury pro SSR analýzy, které byly uspořádány pro účely fragmentačních analýz do 4 multiplexů: Multiplex 1: lokusy WPMS5, WPMS15, ORPM14, ORPM16 a ORPM20, Multiplex 2: lokusy ORPM30, ORPM60, ORPM127 a ORPM312, Multiplex 3: lokusy WPMS16, ORPM193 a ORPM220, Multiplex 4: lokusy WPMS18, WPMS19 a WPMS20 ([http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr\\_resource.htm](http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm); SCHOOT et al. 2000; SMULDERS et al. 2001; TUSKAN et al. 2004; LOO et al. 2008; POLITOV et al. 2015). Polymerázové řetězové reakce (PCR) reakce pro Multiplex 1, 2 a 3 probíhaly při teplotních cyklech 1 × 94 °C/ 3 min; 35 × 94 °C/ 45 s, 55 °C/ 45 s, 72 °C/ 45 s; 1 × 72 °C/ 20 min s následným ochlazením na 4 °C/ 30 min za použití fluorescenčně značených primerů pro výše uvedené lokusy. U Multiplexu 4 byla PCR nastavena shodně s výjimkou tzv. „annealingové“ teploty 62 °C/ 45 s namísto 55 °C/ 45 s. Výsledné produkty PCR reakce byly použity k fragmentační analýze, které předcházela denaturace DNA při 94 °C/ 4 min, kdy k 1 µl PCR produktu bylo přidáno 11 µl for-

mamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) a 0,4 μl velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ Size standard 2.0, Applied Biosystems). Vzorky byly následně okamžitě zchlazeny v termoregulačních bločcích (-20 °C/ 2 min) a vloženy do genetického analyzátoru (Applied Biosystems 3500), kde probíhala kapilární elektroforéza s detekcí jednotlivých alel u sledovaných lokusů. Velikosti alel byly vyhodnoceny softwarem GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems). Výsledky byly statisticky zpracovány v programu GenAlEx 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2012) a CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007). Klonová diverzita populace (R) byla vypočtena jako  $R = (G - 1)/(N - 1)$ , kde G je počet klonů a N je počet jedinců (ramet) (DORKEN, ECKERT 2001).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

### Genetická charakterizace topolu šedého metodou SSRs

Na základě inventarizace porostů cenné populace topolu šedého na lokalitě Lužný les severně od obce Dyjákovice (LS LČR, s. p., Znojmo, revír Jaroslavice), která se nachází v přírodní oblasti 35 Jihomoravské úvaly v I. lesním vegetačním stupni v nadmořské výšce 192 m a vyznačuje se převažujícím souborem lesních typů jilmový luh (1L), bylo podle výše uvedených fenotypových charakteristik vybráno devadesát jedinců (ortetů) za účelem zjištění genetické diverzity mezi jedinci. U 90 vybraných topolů šedých (TPE 1 – 90) byl překvapivě zjištěn shodný genotyp určený pomocí SSR markerů (tab. 1). Při sběru vzorků ve fázi dormantních pupenů nebylo možné určit pohlaví sbíraných jedinců. V období květu stromů bylo tedy následně určeno samičí pohlaví u všech vybraných jedinců (TPE 1 – 90). Naše výsledky dokazují u těchto vzorků topolu šedého vegetativní způsob rozmnožování na dané lokalitě. ECKERT (2002) uvádí, že způsob rozmnožování se významně projevuje nejen u genetické variability, ale i ve struktuře populace, přičemž shrnuje, že nepohlavním rozmnožováním vzniká geneticky shodné potomstvo v poměrně blízké vzdálenosti od rodiče. Tento závěr potvrdily i výsledky naší inventarizace, když byly nalezeny četné skupiny jedinců stejného pohlaví s počtem od několika kusů do několika desítek kusů stromů, jejichž prostorové uspořádání zřetelně naznačovalo výmladkový původ jak samičích, tak samčích klonů. Sníženou možnost generativního rozmnožování vlivem limitujících podmínek prostředí na úkor převažujícího výskytu jedinců se shodným genotypem uvádí i v rámci jednoděložných rostlin BINKS et al. (2015). Je však pozoruhodné, že genetickou uniformitou se vyznačovaly i vzorky topolu šedého odebrané z jedinců vzdálených od sebe až 3 km v případě samičích jedinců a 2,5 km v případě samčích jedinců, v porostech oddělených v současné době náspem s pevnou komunikací a vodním tokem. Naše výsledky o klonové identitě topolů z rozsáhlejší oblasti sběru vzorků jsou ve shodě s pozorováním např. GOM a ROOD (1999) nebo FUSSI et al. (2012). Nízkou klonovou diverzitu u topolu bílého zaznamenali DERING et al. (2015), kteří shrnují, že tvorba identických jedinců je životní strategií významně se podílející na prostorové genetické struktuře.

Kombinace genetické uniformity s diverzitou se vyskytovala ve všech porostech s topolem šedým v Dyjákovících. Možnost použití specifických fenotypových charakteristik celkového habitu stromů při vyhledávání odlišných genotypů byla ověřována jako okulární metoda při inventarizaci samičích jedinců. Výsledky srovnávací analýzy pomocí provedených DNA analýz vybraných genotypů potvrdily, že v daném souboru jedinců se odlišují právě ty genotypy, které se ve fenotypovém projevu liší ve znacích úhel větvení, výskyt silných větví v koruně a hustota koruny, pokud se tito jedinci nacházeli ve starších porostech se sníženým zakmeněním. Jednalo se o genotypy TPE 107, 108, 109, 151, 199, 200 (tab. 2). Tuto metodu však nebylo možné použít ve výmladkových skupinách s vysokým zakmeněním, které byly v minulých desetiletích určujícím faktorem vývoje populace. Velká hustota a vzájemná konkurence jedinců ve skupinách vede k redukci korun

a nedovoluje rozvinutí fenotypových projevů genotypu. Hodnocení těchto specifických fenotypových znaků bylo proto použito pouze jako pomocná metoda při inventarizaci. K určení genetické diverzity v populaci bylo nezbytné potvrdit odlišnost v základních fenotypových charakteristikách (tvar kmene, čištění kmene, délka koruny) vybraných kvalitních jedinců vhodných k reprodukci genetickou analýzou (tab. 3). Obdobně se ve starší práci BARNES (1969) zmiňuje o problémech dlouhodobého výzkumu možností identifikace klonů topolů a uvádí nutnost použití multivariační analýzy velkého množství fenotypových znaků k rozlišení klonů v lokální populaci *Populus tremuloides* a *P. grandidentata*.

### Multilokusová analýza a srovnání genetických parametrů u samičích a samčích jedinců

Získané výsledky o klonové identitě vzorků TPE 1 – 90 včetně potvrzení polymorfismu použitých SSR markerů byly ověřeny při doplňujícím odběru 65 jedinců topolu šedého z téže lokality ve fázi mladých větviček. Bylo odebráno 30 jedinců samičího a 35 jedinců samčího pohlaví různého stáří, z různých porostů. Ze získaných dat multilokusové srovnávací analýzy se podařilo nalézt na dané lokalitě dalších 5 odlišných samičích genotypů (celkem tedy 6 samičích genotypů) a 27 rozdílných samčích genotypů topolu šedého (tab. 1). I při druhém sběru rostlinného materiálu byla nalezena genetická identita 23 samičích jedinců se vzorky TPE 1 – 90. Geneticky uniformní byli např. i samičí jedinci s označením TPE 151, 179 a 201 nebo samčí jedinci TPE 125, 126 a 130 (viz tab. 1). Ve skupině samičích jedinců byli zjištěni pouze 4 jedinci s neopakujícím se genotypem (3 %), nejvíce zastoupený genotyp se objevoval v 94 % této skupiny (113 stromů). Mezi samčími jedinci bylo zjištěno 24 jedinců s unikátním genotypem (69 %), u samčích jedinců byla tedy detekována výrazně vyšší variabilita. V celém souboru jedinců topolu šedého zkoumané populace bylo pouze 18 % unikátních genotypů, tedy jedinců, jejichž genotyp byl v lokalitě zjištěn pouze jednou. Loo et al. (2008) ve své studii zaměřené na populace topolu šedého a bílého vyskytující se v lužních lesích u Dunaje (Rakousko, Slovensko) zjistili výskyt unikátních genotypů v populacích topolu šedého v 76 %. Ramety nejvíce zastoupeného klonu samičího jedince v naší zkoumané populaci byly od sebe vzdáleny až 3 km, Loo et al. (2008) identifikovali klonově shodné jedince topolu šedého ve vzdálenosti až 186 m od sebe, v případě topolu bílého byla vzdálenost mezi rametami do 132 m. BRUNDU et al. (2008) zjistili ve své prvotní studii populace topolu bílého na Sardinii výskyt pouze 3 odlišných klonů v souboru 93 odebraných jedinců. Genetické parametry uvádějící počet alel (*Na*), počet účinných alel (*Ne*), Shanonův informační index (*I*), pozorovanou (*Ho*) a očekávanou (*He*) heterozygotnost včetně fixačního indexu (*F*) topolu šedého pro jednotlivé lokusy jsou v naší práci uvedeny souhrnně pro jedince samičího (tab. 4A) a samčího pohlaví (tab. 4B).

Z vyhodnocení velikostí alel se ukázalo, že použitý SSR lokus ORPM14 byl v daném souboru vzorků topolu šedého uniformní, všichni sledovaní jedinci byli v tomto lokusu homozygotní s velikostí alel 141 párů bazí (bp), a proto jsme jej vyřadili z následného statistického vyhodnocení. Pouze 3 rozdílné alely byly nalezeny u lokusů WPMS20 a ORPM220. Naše výsledky jsou částečně ve shodě s prací Loo et al. (2008), kteří zaznamenali při použití lokusu ORPM14 výskyt pouze dvou alel u 127 odlišných genotypů topolů šedých, pro lokus ORPM220 uvádějí počet alel 4, což je o jednu alelu více než jsme zaznamenali my. U lokusu WPMS20 zjistili Fussl et al. (2012) výskyt 4 alel o velikosti 227 bp – 235 bp u vzorků z jedinců topolu bílého z oblastí u Středozemního moře, přičemž u tohoto lokusu jsme v naší zkoumané populaci topolu šedého zaznamenali výskyt 3 alel o velikosti 170 bp – 178 bp. Nejvíce polymorfni se jevil mikrosatelitový lokus ORPM30, pomocí něhož jsme odhalili nejvyšší zastoupení alel u obou skupin (tab. 4A a 4B). Hodnoty polymorfního informačního indexu (PIC) pro sledované lokusy se pohybovaly od 0,044 (ORPM127)

**Tab. 1.** Multilokusové genotypy (MLGs) 155 jedinců topolu šedého (*Populus × canescens* Aiton Sm.) pocházejících z lokality Lužný les severně od obce Dyjálkovic (LS LČR Znojmo, revír Jaroslavice); samičí pohlaví (f), samčí pohlaví (m)  
 Multilocus genotypes (MLGs) of 155 individuals of grey poplars (*Populus × canescens* Aiton Sm.) originating from floodplain forest north from Dyjálkovic village; female bias (f), male bias (m)

Označení stromu/ Individual tree	Sex	Microsatellite markers													
		ORPM16	WPMS5	WPMS15	ORPM20	ORPM127	ORPM30	ORPM312	ORPM60	WPMS16	ORPM193	WPMS20	WPMS18	WPMS19	ORPM220
TPE 1-90, 109, 111, 113, 120, 122, 124, 133, 135-137, 155, 157, 159, 163, 165, 166, 168-170, 174, 187, 190, 196	f	223/223	298/298	189/192	180/196	189/189	221/229	195/195	200/206	165/171	175/190	178/178	222/228	195/204	217/229
TPE 107	f	217/223	290/310	186/195	209/209	189/189	209/215	195/195	206/206	177/183	190/190	174/178	219/225	186/216	217/229
TPE 108	f	223/235	290/290	186/195	188/196	189/189	209/215	195/195	206/206	177/183	190/190	174/178	219/225	186/216	217/229
TPE 151, 179, 201	f	223/229	276/298	189/198	188/209	189/189	207/213	183/183	203/206	171/177	175/190	174/178	219/228	192/204	217/223
TPE 199	f	223/223	310/310	189/199	189/201	189/189	215/217	195/195	206/206	171/171	180/190	178/178	225/228	186/186	217/217
TPE 200	f	223/223	276/310	189/192	197/201	189/189	207/219	195/195	206/206	165/171	175/190	178/178	219/222	186/186	217/217
TPE 101	m	223/235	304/304	183/186	196/201	189/189	207/215	183/183	206/206	165/171	185/190	178/178	222/228	195/216	217/223
TPE 102	m	223/223	304/304	183/186	196/201	189/189	207/215	183/183	206/206	166/177	175/190	178/178	228/231	192/216	217/223
TPE 103	m	223/235	298/298	192/192	205/209	189/189	219/229	186/186	206/206	150/171	190/190	178/178	222/222	192/252	217/223
TPE 116	m	217/223	300/300	189/192	201/201	189/189	217/235	189/198	206/206	144/171	175/190	178/178	222/225	195/195	217/217
TPE 117	m	223/235	310/310	186/189	188/201	189/189	217/235	189/201	203/203	144/171	190/190	178/178	222/225	195/195	217/217
TPE 119	m	223/235	298/298	180/186	196/201	189/189	213/217	192/192	206/206	171/171	185/190	178/178	228/228	192/216	217/217
TPE 123	m	211/223	298/310	189/198	188/201	189/189	223/227	225/225	203/206	171/171	190/190	178/178	225/225	186/192	217/217
TPE 125, 126, 130	m	223/223	292/298	180/198	188/196	189/189	217/221	195/195	206/206	171/183	175/190	170/178	219/225	192/216	217/217
TPE 127	m	205/205	300/300	189/198	188/209	217/217	217/217	198/198	206/206	168/171	185/190	178/178	228/228	192/216	217/217
TPE 128	m	205/205	300/300	189/198	188/209	191/191	217/217	198/198	206/206	168/171	185/190	178/178	228/228	192/216	217/217
TPE 131	m	205/205	300/300	189/198	188/209	191/191	217/217	198/198	206/206	168/171	185/190	178/178	228/228	192/216	217/217
TPE 132	m	223/235	290/290	186/192	205/209	189/189	209/225	183/183	206/215	171/189	190/190	170/178	225/228	186/252	217/223
TPE 134	m	223/235	290/310	186/192	205/209	189/189	209/225	183/183	206/215	171/189	190/190	170/178	225/228	186/252	217/223
TPE 139, 140, 149, 150, 162, 191	m	223/235	298/298	180/186	196/201	189/189	213/217	192/192	206/206	153/171	185/190	174/178	222/228	192/222	217/229
TPE 141	m	223/235	298/310	186/198	188/201	189/189	217/225	201/225	203/203	171/171	190/190	178/178	222/225	171/192	217/217
TPE 144	m	223/235	276/310	198/198	193/196	189/189	217/223	189/189	203/206	168/171	185/190	178/178	219/225	174/216	217/229
TPE 164, 192	m	223/235	300/310	186/192	188/201	189/189	217/219	195/195	206/206	168/171	175/190	178/178	219/225	186/216	217/229
TPE 167	m	223/235	298/300	186/192	180/196	189/189	217/221	195/195	200/206	165/168	175/190	170/178	222/225	195/195	217/229
TPE 175	m	217/223	290/304	189/189	209/209	189/189	207/209	183/183	206/206	168/171	185/190	178/178	219/225	192/216	217/229
TPE 180	m	217/223	308/310	186/186	188/196	189/189	217/229	195/195	206/206	171/171	190/190	178/178	222/228	186/195	217/217
TPE 184	m	223/223	276/310	186/192	196/201	189/189	217/229	195/195	206/206	165/171	185/190	178/178	222/228	195/216	217/229
TPE 185	m	211/217	298/298	189/189	188/188	189/189	217/223	189/198	206/206	171/171	190/190	178/178	222/228	195/195	217/217
TPE 186	m	223/235	302/304	192/195	180/196	189/189	219/221	183/185	206/206	165/171	185/190	178/178	222/228	195/216	217/223
TPE 188	m	223/235	300/310	192/192	196/201	189/189	217/221	192/192	206/206	156/171	215/215	178/178	213/222	174/213	217/229
TPE 189	m	217/217	300/300	189/198	188/209	189/209	217/217	198/198	206/206	168/171	185/190	178/178	228/228	192/216	217/217
TPE 194	m	217/223	300/300	186/195	188/201	189/189	217/219	192/192	203/206	165/171	180/190	170/178	219/228	192/216	217/223
TPE 193	m	223/223	292/298	180/198	188/196	189/189	217/221	195/195	206/206	183/195	175/190	170/178	219/225	192/216	217/217

do 0,699 (ORPM30) (data neuvedena). U souboru samičích jedinců bylo 92,86 % testovaných lokusů polymorfních, u souboru samčích jedinců byly testované lokusy 100% polymorfní. Soubor 14 použitých polymorfních markerů je dostatečně reprezentativní pro interpretaci genetických charakteristik u sledovaných lokusů pro obě skupiny topolu šedého rozdělené podle pohlaví, neboť je mnoho prací (SMULDERS et al. 2001; LUKÁŠOVÁ, WEGER 2009; LIESEBACH et al. 2010; KADU et al. 2013), v nichž se uvádí použití i méně než 13 SSR markerů pro zhodnocení genetické variability. BRUNDU et al. (2008)

uvádí jako dostatečný počet pro identifikaci rozdílných jedinců u topolu bílého pět vysoce polymorfních markerů; pro svou studii využili lokusy WPMS05, WPMS14, WPMS15, WPMS18 a WPMS20. FOSSATI et al. (2004) určili diagnostické alely dvou SSR markerů WPMS20 a WPMS12 pro rozlišení *P. tremula* a *P. alba* a jejich hybridu *Populus* × *canescens* Aiton Sm.

U skupiny samčích jedinců byly průměrné hodnoty počtu rozdílných alel *N<sub>a</sub>* (6,786) i efektivních alel *N<sub>e</sub>* (3,360) vyšší ve srovnání se samičími jedinci (*N<sub>a</sub>* 4,071 a *N<sub>e</sub>* 1,745), což odpovídá zjištění, že sku-

**Tab. 2.**

Fenotypové charakteristiky odlišující genotypy pestíkových jedinců topolu šedého (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.)  
Phenotype characteristics distinguishing genotypes of grey poplar (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.) pistil individuals

Genotyp/ Genotype	Úhel větvení ve stupních/ Branching angle in degrees	Tloušťka větvi/ Thickness of branches	Hustota koruny/ Crown density	Tvar koruny/ Crown form	Počet jedinců daného genotypu/ Number of individuals with identic genotype
TPE 107	45–60	tenké/thin	hustá/dense	kulovitá/spherical	1
TPE 108	30–40	tenké/thin	řídká/sparse	metlovitá/birch	1
TPE 109	30	silné/thick	hustá/dense	oválná/oval	113
TPE 151	45	tenké/thin	řídká/sparse	kulovitá/spherical	3
TPE 199	45	tenké/thin	hustá/dense	kulovitá/spherical	1
TPE 200	40–45	tenké/thin	řídká/sparse	vějířovitá/fan	1

**Tab. 3.**

Charakteristika jedinců topolu šedého (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.) uznaných jako zdroj reprodukčního materiálu; samičí pohlaví (f), samčí pohlaví (m)  
Characteristics of grey poplar (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.) individuals determined as a source of forest reproductive material; female bias (f), male bias (m)

Označení stromu/ Individual tree	Pohlaví/ Sex	Výška / Height (m)	Výčetní tloušťka/ Diameter at breast height (cm)	Tvar kmene/ Stem form	Čištění kmene/ Natural pruning	Tvar koruny/ Crown form	Délka koruny/ Crown length	Identický jedinec/ Identic individual tree
TPE 169	f	24	44	1	1	1	1	TPE 1-90, 109, 111, 113, 120, 122, 124, 133, 135, 136, 137, 155, 157, 159, 163, 165, 166, 168, 170, 174, 187, 190, 196
TPE 107	f	31	70	1	1	8	1	
TPE 108	f	28,5	70	1	1	8	2	
TPE 151	f	24	55	1	2	8	1	TPE 179, 201
TPE 199	f	35	103	1	1	8	1	
TPE 200	f	23	54	1	1	8	1	
TPE 101	m	25	52	2	1	8	1	
TPE 102	m	26	47	2	1	8	1	
TPE 103	m	28,5	55	1	1	1	1	
TPE 127	m	25	39	1	1	6	1	
TPE 130	m	25	37	1	1	5	1	TPE 125, 126
TPE 132	m	28	55	2	1	8	2	
TPE 150	m	25	58	1	1	8	1	TPE 139, 140, 149, 162, 191
TPE 164	m	26	66	1	1	8	1	TPE 192
TPE 186	m	30	53	2	1	1	1	
TPE 194	m	23	36	1	1	8	1	

Vysvětlivky/Captions: tvar kmene/stem form: 1 – rovný/straight, 2 – mírně zakřivený/slightly crooked; čištění kmene/natural pruning: 1 – výborné/excellent, 2 – dobré/good; tvar koruny/crown form: 1 – oválná/oval, 5 – opakvejčitá/reverse egg-shaped, 6 – deštníkovitá/umbrella-shaped, 8 – kulovitá/spherical; délka koruny/crown length: 1 – krátká/short, 2 – střední/medium

pina samčích jedinců je více geneticky variabilní. Průměrná hodnota pozorované heterozygotnosti *Ho* byla o něco vyšší v vzorků samičího pohlaví (0,645) než v vzorků samčího pohlaví (0,606). Průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti *He* vykazovaly opačný trend (0,357 a 0,619). Lokusy WPMS15, WPMS18 a ORPM30 byly u všech samičích jedinců heterozygotní. U nejméně zastoupeného genotypu ve sledovaném souboru samičích jedinců bylo zjištěno 9 heterozygotních lokusů. Průměrný koeficient inbreedingu *Fis* (-0,174) pro použité lokusy indikuje jejich převažující heterozygotnost ve sledované populaci (data neuvedena). V souvislosti s větší diverzitou samičích jedinců bylo v této hodnocené skupině zjištěno 10× více zastoupených privátních alel (3,071) oproti skupině samičích jedinců (0,357). SANTOS-DEL-BLANCO et al. (2013) uvádí hodnotu 0,3 zastoupení privátních alel v populacích topolu šedého z oblasti řeky Duoro ve Španělsku. Negativní hodnoty fixačního indexu (tab. 4A a 4B) u sledovaných lokusů ve zkoumaných skupinách (tab. 4A a 4B) svědčí o jejich převažující heterozygotnosti. Lokus ORPM127 byl v souboru samičích jedinců uniformní (výskyt 1 alely) a homozygotní, zatímco lokus ORPM312 byl v této skupině pouze homozygotní (*F* = 1). V souboru všech jedinců zkoumané populace byla průměrná hodnota *Ho* 0,625 a *He* 0,488. Vyšší zastoupení homozygotů v rámci sledovaných lokusů u populace topolu šedého z Podunají s převažujícím zastoupením identicky shodných jedinců uvádí Loo et al. (2008) pro 185 jedinců topolu šedého, u nichž bylo rozlišeno celkem 123 genotypů, ale průměrná hodnota *Ho* dosahovala 0,42. BRUNDU et al. (2008) na svých datech demonstruje, že pozorovaná heterozygotnost se může lišit vzhledem k velikosti sledované populace i lokalitě sběru rostlinného materiálu, neboť pro analyzované populace topolu bílého na Sardinii a v oblastním parku Ticino, byla hodnota *Ho* 0,7, respektive 0,55. Hodnoty Shanonova informačního indexu pro topol šedý v rámci samičího pohlaví se pohybovaly v rozmezí 0,101–0,978, zatímco u samčích jedinců bylo rozmezí 0,421–1,976, kdy hodnota  $\geq 1,5$  se obecně interpretuje jako vyšší výskyt druhové biodiverzity ve společenstvu (MAGURRAN

2004). Vypočtená hodnota klonové diverzity *R* byla pro sledovanou populaci topolu šedého nižší (0,207), nižší hodnota klonové diverzity je důsledkem převažujícího vegetativního množení v rámci populace. Podobnou hodnotu klonové diverzity (0,3) pro španělské populace topolu šedého uvádějí SANTOS-DEL-BLANCO et al. (2013), pro populace topolu bílého zjistili hodnotu klonové diverzity 0,138. Nízkou hodnotu klonové diverzity *R* = 0,12 pro populaci topolu bílého na území o velikosti 26,6 ha u řeky Visly uvádějí DERING et al. (2015), obdobně nízkou hodnotu (0,163) zjistili u populace topolu bílého na Sardinii BRUNDU et al. (2008). Naopak, neobvykle vysokou klonovou bohatost *R* = 0,76 zjistili LOO et al. (2008) u populace topolu šedého z Podunají v Rakousku, výsledek však mohl být ovlivněn provedením experimentu, neboť odběr vzorků z velmi rozsáhlého území ( ) byl uskutečněn ne zcela vyčerpávajícím způsobem, vzdálenost mezi sledovanými jedinci byla až 90 km (DERING et al. 2015).

## ZÁVĚR

Na Lesní správě LČR, s. p., Znojmo, v revíru Jaroslavice na lokalitě Lužný les severně od Dyjákovice bylo provedeno fenotypové zhodnocení unikátní populace topolu šedého (*Populus × canescens* Aiton Sm.), na jehož základě byl proveden výběr cenných jedinců s cílem určit genetickou variabilitu s využitím metody jaderných mikrosatelitových markerů. Ze 155 odebraných vzorků samičího (120) a samčího pohlaví (35) byla zjištěna výrazná převaha identického genotypu u 113 vzorků samičího pohlaví. V celém souboru jedinců topolu šedého jsme identifikovali u samičích jedinců pouze 6 odlišných genotypů, avšak 27 odlišných genotypů samčích (tab. 1). Vyšší genetické variabilitě ve skupině jedinců se samčím pohlavím odpovídají i zjištěné genetické parametry (tab. 4A a 4B). Samičí jedinci odlišní na základě provedených SSR analýz měli i rozdílné fenotypové charakteristiky (tab. 2).

Tab. 4.

Porovnání genetické variability mezi 120 samičími (A) a 35 samčími (B) jedinci topolu šedého (*Populus × canescens* Aiton Sm.) pocházejícími z lokality Lužný les severně od obce Dyjákovice (LS LČR Znojmo, revír Jaroslavice) s použitím 14 mikrosatelitových markerů  
Comparison of genetic variability between 120 female (A) and 35 male (B) individuals of grey poplars (*Populus × canescens* Aiton Sm.) originating from floodplain forest north from Dyjákovice village using 14 microsatellite markers

A							B						
Lokus/Loci	Na	Ne	S	Ho	He	F	Lokus/Loci	Na	Ne	S	Ho	He	F
ORPM16	4	1,043	0,121	0,042	0,041	-0,015	ORPM16	5	2,806	1,238	0,714	0,644	-0,110
WPMS5	4	1,098	0,236	0,042	0,089	0,531	WPMS5	9	4,554	1,757	0,457	0,780	0,414
WPMS15	6	2,138	0,860	1,000	0,532	-0,879	WPMS15	7	5,224	1,747	0,829	0,809	-0,025
ORPM20	7	2,232	0,943	0,992	0,552	-0,797	ORPM20	7	4,430	1,613	0,914	0,774	-0,181
ORPM127	1	1,000	0,000	0,000	0,000	ND	ORPM127	4	1,228	0,421	0,029	0,186	0,846
ORPM30	9	2,252	0,978	1,000	0,556	-0,799	ORPM30	13	4,321	1,976	0,886	0,769	-0,152
ORPM312	2	1,051	0,117	0,000	0,049	1,000	ORPM312	9	5,349	1,852	0,171	0,813	0,789
ORPM60	3	2,046	0,751	0,967	0,511	-0,891	ORPM60	4	1,429	0,610	0,229	0,300	0,238
WPMS16	4	2,119	0,822	0,992	0,528	-0,878	WPMS16	11	3,329	1,696	0,857	0,700	-0,225
ORPM193	3	2,016	0,717	0,983	0,504	-0,951	ORPM193	5	2,327	1,070	0,743	0,570	-0,303
WPMS20	2	1,043	0,101	0,042	0,041	-0,021	WPMS20	3	1,514	0,637	0,400	0,340	-0,178
WPMS18	4	2,155	0,851	1,000	0,536	-0,866	WPMS18	6	3,804	1,439	0,800	0,737	-0,085
WPMS19	5	2,192	0,893	0,983	0,544	-0,808	WPMS19	9	4,920	1,792	0,886	0,797	-0,112
ORPM220	3	2,049	0,751	0,983	0,512	-0,921	ORPM220	3	1,803	0,783	0,571	0,445	-0,283

Vysvětlivky/Captions: Na – počet alel; Ne – počet účinných alel; S – Shanonův informační index; Ho – pozorovaná heterozygotnost; He – očekávaná heterozygotnost; F – fixační index; ND – není k dispozici/Na – number of different alleles; Ne – number of effective alleles; S – Shanon's information index; Ho – observed heterozygosity; He – expected heterozygosity; F – fixation index; ND – not available

Naše poznatky o genetické uniformitě, stejně jako o diverzitě topolu šedého v lokalitě Dyjákovice byly využity k uznání 16 neidentických samičích a samčích genotypů jako zdrojů reprodukčního materiálu a jsou velmi významné nejen pro obnovu a záchranu této populace a zachování biodiverzity porostů, ale i pro následná lesnická opatření.

#### Poděkování:

Příspěvek byl finančně podpořen v rámci řešení projektu Ministerstva zemědělství ČR – NAZV QJ1520297 s názvem „Záchrana a reprodukce cenné populace topolu šedého“ a poskytnuté institucionální podpory MZe – RO0118. Autoři rovněž děkují za laboratorní pomoc Jakubu Chromému při přípravě vzorků pro provedení fragmentačních analýz.

## LITERATURA

- BARNES B.V. 1969. Natural variation and delineation of clones of *Populus tremuloides* and *P. grandidentata* in Northern lower Michigan. *Silvae Genetica*, 18: 130–142.
- BINKS R.M., MILLAR M.A., BYRNE M. 2015. Contrasting patterns of clonality and fine-scale genetic structure in two rare sedges with differing geographic distributions. *Heredity*, 115: 235–242. DOI: 10.1038/hdy.2015.32
- BRAATNE J.H., ROOD S.H., HEILMAN P.E. 1996. Life history, ecology, and conservation of riparian cottonwoods in North America. In: Stettler R.F. et al. (eds.): *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. (Part I), Chapter: 3. Ottawa, NRC Research Press: 57–85.
- BRUNDU G., LUPI R., ZAPPELLI I., FOSSATI T., PATRIGNANI G., CAMARDA I., SALA F., CASTIGLIONE S. 2008. The origin of clonal diversity and structure of *Populus alba* in Sardinia: Evidence from nuclear and plastid microsatellite markers. *Annals of Botany*, 102: 997–1006. DOI: 10.1093/aob/mcn192
- BURIÁNEK V., NOVOTNÝ P. 2016. Metodická příručka k určování domácích druhů topolů. Strnady, VÚLHM: 35 s. Lesnický průvodce, 11/2016.
- CERVERA M.T., STORME V., SOTO A., IVENS B., MONTAGU M. VAN, RAJORA O.P., BOERJAN W. 2005. Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. *TAG Theoretical Applied Genetics*, 111: 1440–1456. DOI: 10.1007/s00122-005-0076-2
- ČÍŽKOVÁ L. 2007. Možnosti ochrany genových zdrojů domácích druhů topolů. In: Dreslerová, J., Packová, P. (ed.): *Ohrožené dřeviny České republiky. Sborník příspěvků z konference konané dne 8. a 9. února v Brně*. Brno, Kostelec nad Černými lesy: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Lesnická práce: 57–60. Geobiocenologické spisy, 12.
- DERING M., CHYBICKÝ I. J., RĄCZKA G. 2015. Clonality as a driver of spatial genetic structure in populations of clonal tree species. *Journal of Plant Research*, 128: 731–745. DOI: 10.1007/s10265-015-0742-7
- DEWOODY J., ROWE C.A., HIPKINS V.D., MOCK K. E. 2008. „Pando“ lives: molecular genetic evidence of a giant aspen clone in central Utah. *Western North American Naturalist*, 68: 493–497. DOI: 10.3398/1527-0904-68.4.493
- DORKEN M.E., ECKERT C.H.G. 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology*, 89: 339–350. DOI: 10.1046/j.1365-2745.2001.00558.x
- ECKENWALDER J.E. 1996. Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler R.F. et al. (eds.): *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. (Part I), Chapter: 1. Ottawa, NRC Research Press: 7–32.
- ECKERT C.G. 2002. The loss of sex in clonal plants. *Evolution Ecology*, 15: 501–520. DOI: 10.1023/A:1016005519651
- FOSSATI T., PATRIGNANI G., ZAPPELLI I., SABATTI M., SALA F., CASTIGLIONE S. 2004. Development of molecular markers to assess the level of introgression of *Populus tremula* into *P. alba* natural populations. *Plant Breeding*, 123: 382–385. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2004.00979.x
- FUSSI B., BONELLO J., CALLEJA E., HEINZE B. 2012. Combining the use of molecular techniques and archival documentary evidence to trace the origin of *Populus alba* in a Central Mediterranean archipelago. *European Journal of Forest Research*, 131: 347–354. DOI: 10.1007/s10342-011-0506-4
- GOM L.A., ROOD S.B. 1999. The discrimination of cottonwood clones in a mature grove along the Oldman River in Southern Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 77: 1084–1094. DOI: 10.1139/cjb-77-8-1084
- CHMELÁŘ J., KOBLÍŽEK J. 1990. *Populus* L. – topol. In: Hejný, S., Slavík, B. (ed.): *Květena České republiky 2*. Praha, Academia: 489–495.
- KADU C.A. C., KONRAD H., SCHUELER S., MULUVI G.M., EYOG-MATIG O., MUCHUGI A., WILLIAMS V.L., RAMAMONJISOA L., KAPINGA C., FOAHOM B., KATSVANGA C., HAFASHIMANA D., OBAMA C., GEBUREK T. 2013. Divergent pattern of nuclear genetic diversity across the range of the Afromontane *Prunus africana* mirrors variable climate of African highlands. *Annals of Botany*, 111: 47–60.
- KALINOWSKI S.T., TAPER M.L., MARSHALL T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099–1106.
- KARREBERG S., EDWARDS P.J., KOLLMANN J. 2002. The life history of salicaceae living in the active zone of floodplains. *Freshwater Biology*, 47: 733–748. DOI: 10.1046/j.1365-2427.2002.00894.x
- KEMPERMAN J.A., BARNES B.V. 1976. Clone size in American aspens. *Canadian Journal of Botany*, 54: 2603–2607.
- LEXER C., FAY M.F., JOSEPH J.A., NIS 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. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02469.x
- 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 & Genomes*, 6: 259–269. DOI: 10.1007/s11295-009-0246-5
- LOO M. VAN, JOSEPH J.A., HEINZE B., FAY M.F., LEXER C. 2008. Clonality and spatial genetic structure in *Populus x canescens* and its sympatric backcross parent *P. alba* in a Central European hybrid zone. *New Phytologist*, 177: 506–516.
- LUKÁŠOVÁ M., WEGER J. 2009. Možnosti genetické identifikace klonů a kříženců topolu Simonova, černého, bavlníkového a Maximovičova (*Populus simonii*, *P. nigra*, *P. deltoides*, *P. maximowiczii*) metodou simple sequence repeat. *Acta Pruhoniciana*, 92: 19–25.

- MAGURRAN A.E. 2004. Measuring biological diversity. Malden, Blackwell: 256 s.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- PERALA D.A. 1990. *Populus tremuloides* Michx. quaking aspen, *Salicaceae*, Willow family. In: Burns R. M and Honkala. B. H. (technical coordinators) *Silvics of North America*. Vol. 2. Hardwoods. Washinton, U. S. Dept. of Agriculture, Forest Service: 555–569. *Agricultural Handbook* 654.
- POLITOV D.V., BELOKON M.M., BELOKON Y.S., POLYAKOVA T.A., SHATOKHINA A.V., MUDRIK A.A., AZAROVA A.B., FILIPPOV M.V., SHESTIBRATOV K.A. 2015. Application of microsatellite loci for molecular identification of elite genotypes, analysis of clonality, and genetic diversity in aspen *Populus tremula* L. (*Salicaceae*). *International Journal of Plant Genomics*: Article ID 261518. DOI: 10.1155/2015/261518
- SANTOS-DEL-BLANCO L., DE LUCAS A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S.C., SIERRA-DE-GRADO R., HIDALGO E. 2013. Extensive clonal assemblies in *Populus alba* and *Populus x canescens* from the Iberian Peninsula. *Tree Genetics & Genomes*, 9: 499–510. DOI: 10.1007/s11295-012-0574-8
- SCHOOT J. VAN DER, POSPIŠKOVÁ M., VOSMAN B., SMULDERS M.J.M. 2000. Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 317–322. DOI: 10.1007/s001220051485
- SMULDERS M.J.M., SCHOOT J VAN DER., ARENS P., VOSMAN B. 2001. Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Molecular Ecology Notes*, 1: 188–190. DOI: 10.1046/j.1471-8278.2001.00071.x
- STANTON B. J., VILLAR M. 1996. Controlled reproduction of *Populus*. In: Stettler R.F. et al. (eds.): *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. (Part I), Chapter: 5. Ottawa, NRC Research Press: 113–138.
- STOBRAWA K. 2014. Poplars (*Populus* spp.): Ecological role, applications and scientific perspectives in the 21<sup>st</sup> century. *Baltic Forestry*, 20: 204–213.
- TUSKAN G.A., GUNTER L.E., YANG Z.K., YIN T.M., SEWELI M.M., DIFAZIO S.P. 2004. Characterization of microsatellites revealed by genomic sequencing of *Populus trichocarpa*. *Canadian Journal of Forest Research*, 34: 85–93. DOI: 10.1139/x03-283
- TUSKAN G.A., DIFAZIO S., JANSSON S., BOHLMANN J., GRIGORIEV I., HELLSTEN U., PUTNAM N., RALPH S., ROMBAUTS S., SALAMOV A. et al. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313: 1596–1604. DOI: 10.1126/science.1128691
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.
- VIEIRA M.L.C., SANTINI L., DINIZ A.L., MUNHOZ C.F. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39: 312–328. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027



## CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY OF LOCAL POPULATION OF GREY POPLAR (*POPULUS* × *CANESCENS* AITON SM.) USING SSR MARKERS AND PHENOTYPIC EVALUATION

### SUMMARY

Autochthonous species of poplars are irreplaceable in forest ecosystems. They were usually the main component of tree floor of floodplain forests, which are now considered as the most threatened ecosystems in Europe. Therefore it is necessary to modify forest strategies in the landscape farming to conserve these ecosystems *via* implementation of the well adapted tree species such as grey poplar (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.). Besides its effects on ecological stability of ecosystem, the grey poplar has importance for production function of the forest.

For this purpose, we focus in this study on unique population of grey poplar located at Dyjákovice village (South Moravia Region, Czech Republic) with the aim to characterize its phenotype and genotype traits based on which valuable individuals will be selected as a source of reproductive material for further forest utilization.

According to the SSR method, 14 nuclear microsatellite markers (SSR markers) were used for genetic variability determination among grey poplar individuals. Firstly, clonal identity for 90 samples of grey poplars collected from distant area at the phase of dormant buds was detected, which suggested the representation of only one sex bias (female) in our group. Therefore additional 65 samples including both female and male sex (30 and 35, respectively) were collected during flowering time to discriminate genetic diversity. Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) from buds and leaves taken from 155 sampled grey poplar trees. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR was optimized for the tested primers that were scanned in publications ([http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr\\_resource.htm](http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm); SCHOOT et al. 2000; SMULDERS et al. 2001; TUSKAN et al. 2004; LOO et al. 2008; POLITOV et al. 2015). Fourteen selected polymorphic nuclear microsatellite markers (ORPM16, ORPM20, ORPM30, ORPM60, ORPM127, ORPM193, ORPM220, ORPM312, WPMS5, WPMS15, WPMS16, WPMS18, WPMS19, WPMS20) were selected, and specific primers were fluorescently labelled. Measurement of the size of amplification products was carried out on the genetic analyzer Applied Biosystems 3500. The obtained data were analysed by means of the statistical programs CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007) and GenAEx 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2012). The most polymorphic locus over our set of samples was ORPM30, where the number of different alleles was estimated to 13. By applying 14 suitable markers to the 155 grey poplar trees from studied population we obtained multilocus genotypes (MLGs) shown in Table 1. Our data revealed occurrence of 6 unique genotypes among all samples of female sex, while higher genetic variability pattern exhibit group of male sex among which 27 genotypes were found. Tables 4A and 4B show number of different alleles, number of effective alleles, observed heterozygosity, expected heterozygosity, Shannon's Information Index and Fixation Index of studied loci for female and male trees. Number of alleles at each locus ranged from 3 to 13. The mean expected heterozygosity for 155 trees of studied population was 0.488 across all loci, and the actual mean observed heterozygosity was 0.625. Polymorphism Information Content (PIC) for loci ranged from 0.044 to 0.699. The mean PIC value from 14 selected loci was 0.4168 (data not shown). The observed low level of clonal diversity ( $R = 0.207$ ) in our studied population indicates that clonal propagation is the dominant way for reproduction in this case. We identified identical genotype at all fourteen loci for 113 samples from 155 sampled individuals (72.9 %).

These results illustrate the utility of the microsatellite loci for assessing spatial patterns of genetic diversity and for individual identification. The identified genetic loci were verified as polymorphic and could be further used for clonal identification of grey poplar trees.

According to above mentioned findings we can conclude that combinations of both phenotype and genotype analyses are very useful methods for detailed characterization of grey poplar populations. Female genotypes were typically different in phenotype traits characterizing crown of trees (Table 2).

We assume that our findings regarding the grey poplar species genetic identity as well as genetic variability will be decisive not only for selection of valuable grey poplar genotypes as a source of reproductive material but also for preservation and restoration of floodplain forest ecosystems. Next, sixteen different genotypes were selected as source of seeds for forestry and established as forest tree genetic resource by authorized person (Table 3).

Zasláno/Received: 25. 10. 2018

Přijato do tisku/Accepted: 21. 11. 2018