

Výzkumný ústav Silva Taroucy
pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i.



Metodika identifikace topolu černého pomocí DNA markerů

Certifikovaná metodika



Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i.

Metodika identifikace topolu černého pomocí DNA markerů

Certifikovaná metodika, Osvědčení MZE-73785/2024-16222/M286

Autorský kolektiv:

Mgr. Kateřina Podrábská (podrabska@vukoz.cz)

Ing. Hana Drahošová, Ph.D. (drahosova@vukoz.cz)

Ing. Kateřina Novotná, Ph.D. (novotna@vukoz.cz)

Doc. Ing. Daniel Zahradník, Ph.D. (zahradnik@vukoz.cz)

Ing. Petra Štochllová, Ph.D. (stochlova@vukoz.cz)

Autoři fotografií:

Kateřina Novotná, Petra Štochllová, Kateřina Podrábská

Odborný oponent ze státní správy:

Mgr. Tomáš Gremlica, Oddělení vodohospodářského plánování,
Ministerstvo zemědělství, Odbor vodohospodářské politiky

Odborný oponent z oboru:

prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D., Laboratoř růstových regulátorů,
Univerzita Palackého v Olomouci a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Dedikace:

Tato metodika (Metodika identifikace topolu černého pomocí DNA markerů) je výsledkem řešení výzkumného projektu QK22010142, s názvem: Záchrana populace topolu černého a jeho využití ve vodohospodářství a lesnictví, a byla vytvořena s finanční podporou Ministerstva zemědělství, Národní agentury pro zemědělský výzkum.

© Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., Průhonice, 2024

ISBN 978-80-87674-52-9 (vázáno)

ISBN 978-80-87674-54-3 (online; pdf)

Abstrakt:

Tato metodika je určena k ověření druhové čistoty topolu černého a jeho odlišení od topolu kanadského a jejich kříženců na základě fragmentační analýzy 8 markerů (6 diagnostických SSR markerů, 1 informativní SSR marker, 1 STS marker) seskupených do dvou multiplexů. Pomocí této metodiky a zjištěných velikostí specifických alel topolu bavlíkového lze v testovaném porostu topolů dále zaznamenat možný genetický tok mezi topolem černým a topolem kanadským, které se mezi sebou v přírodě hojně kříží. První generaci kříženců (topol bavlíkový × topol černý, tj. topoly kanadské) lze detekovat snadno již pomocí 1 markeru. Avšak v hybridních populacích můžeme očekávat různé stupně křížení mezi jedinci. Již u první generace zpětných kříženců (BC1, tj. kříženci mezi topolem kanadským a topolem černým) a druhé generace kříženců (topol kanadský × topol kanadský) je situace složitější a nestačí použít jednoho markeru. Kvůli mendelistické segregaci alel může u diagnostických markerů nastat s určitou pravděpodobností záměna BC1 kříženců, druhé generace kříženců a dalších generací za topol černý. Tato pravděpodobnost se snižuje s použitím vyššího počtu markerů. Senzitivita testu při použití 6 diagnostických markerů je u první generace kříženců 100 %, u druhé generace kříženců 99,98 % a BC1 kříženců 98,44 %.

Klíčová slova: *Populus nigra*, *Populus xcanadensis*, *Populus deltoides*, SSR marker, odlišení druhu

Abstract:

The aim of this methodology is to describe the method of distinguishing black poplar from Euramerican poplar and its hybrids using DNA fragment analysis. Eight markers (six diagnostic SSR markers, one informative SSR marker and one STS marker) were grouped into two multiplexes. Described Eastern cottonwood specific alleles can also be used to study possible gene flow between the black poplar and the Euramerican poplar that cross abundantly in nature. The first generation of interspecific hybrids (Eastern cottonwood × black poplar, i.e. Euramerican poplars) can be easily detected with just one marker. However, the different generations of crossings can be expected in poplar populations. The situation is already more complicated in the hybrids of the second generation (Euramerican poplar × Euramerican poplar) and the first generation of backcrosses (BC1, i.e. crosses between Euramerican poplar and black poplar) when the use of just one marker is insufficient. Due to Mendelian segregation of alleles, there is a certain probability of confusion that BC1 hybrids, the hybrids of the second or higher generation of crossing would be determined with diagnostic markers as black poplar. This probability decreases with higher number of used markers. The sensitivity of the test using six diagnostic markers is 100% for the first generation hybrids, 99.98% for the second generation hybrids and 98.44% for BC1 hybrids.

Keywords: *Populus nigra*, *Populus xcanadensis*, *Populus deltoides*, SSR marker, species differentiation

Obsah

1	Cíl metodiky	5
2	Vlastní popis metodiky	5
2.1	Úvod.....	5
2.2	Odběr vzorků a laboratorní postupy	7
2.2.1	Odběr a uskladnění vzorků	7
2.2.2	Homogenizace materiálu, extrakce izolačními sadami, stanovení čistoty, koncentrace a integrity DNA, ředění DNA	8
2.2.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR), kontrola PCR produktu na gelu	9
2.2.4	Fragmentační analýza na sekvenátoru	14
2.3	Vyhodnocení fragmentační analýzy	14
2.4	Ověření metody a statistické vyhodnocení	17
2.4.1	Charakteristiky zvoleného výběru markerů	17
2.4.2	Ověření zvoleného výběru markerů	18
2.4.3	Senzitivita a specifická testu.....	20
3	Srovnání novosti postupů	22
4	Popis uplatnění metodiky	23
5	Ekonomické aspekty	23
6	Seznam použité literatury.....	24
7	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	28
8	Přílohy.....	29

1 Cíl metodiky

Cílem předložené metodiky je vytvořit postup k odlišení jedinců topolu černého (*Populus nigra* L.) od jedinců topolu kanadského (*P. ×canadensis* Moench, tj. *P. deltoides* Bartr. ex Marsh. × *P. nigra*) a jejich kříženců pomocí analýz DNA s využitím mikrosatelitových markerů. Pro urychlení a zlevnění procesu identifikace vybrané markery seskupit do multiplexů a optimalizovat podmínky PCR reakce. Správná identifikace druhu je klíčová pro uznávání zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin. Použití ověřeného výsadbového materiálu povede k delší životnosti lesních a břehových porostů a výsledkem bude vyšší stabilita celých ekosystémů.

Součástí metodiky je literární rešerše řešené problematiky a podrobně rozepsaný popis jednotlivých činností vedoucích k odlišení druhu.

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Úvod

Topol černý (*Populus nigra* L.) je euroasijská dřevina s rozsáhlým areálem rozšíření, který zahrnuje Evropu s výjimkou severských zemí, středomořské pobřeží severní Afriky, západní a centrální Asii, včetně Kavkazu a rozsáhlé části Středního východu. Nalezeme ho od 30°N po 64°N na Sibiři a od nadmořské výšky 0 m. n. m. až po 4 000 m. n. m. (Van den Broeck 2003, de Rigo et al. 2016). V uvedeném areálu je jeho přirozené zastoupení velmi mezernaté, vázané na lužní lesy, břehové a doprovodné porosty vodních toků. Na celoevropské úrovni je řazen mezi kriticky ohrožené druhy. Ve značné části jeho přirozeného výskytu je dnes na pokraji vyhynutí. Mezi hlavní příčiny ohrožení druhu patří fragmentace a devastace přirozených stanovišť, upřednostňování výsadby mezidruhových kříženců a následně pak vyšší riziko introgrese genů z často pěstovaných nepůvodních druhů topolů do genofondu topolu černého (Lefèvre et al. 1998). Zmenšující se populace čelí také vyššímu riziku poklesu kondice v důsledku příbuzenského křížení (Benetka et al. 2008, Novotná 2013).

V České republice se tato dříve velmi častá pionýrská dřevina nyní vyskytuje pouze ve zbytkách původních populací v Poohří, středním Polabí, Dolnomoravském úvalu a Hornomoravském úvalu (Chmelař a Koblížek 1990, Kubát et al. 2002) a je zařazena v Červeném seznamu cévnatých rostlin (Grulich 2017) mezi kriticky ohrožené a ustupující taxony (kategorie C1t), není zákonem chráněna.

Topol černý se využívá v lužních lesích nižších poloh, kde může být použit jako základní cílová nebo přípravná dřevina. Jako dřevina meliorační a zpevňující může být použit nejen v lužních lesích, ale i na olšových a jasanových stanovištích na podmáčených a lužních půdách (vyhláška č. 298/2018 Sb.). Své uplatnění by mohl nalézt také jako přípravná dřevina pro rychlou obnovu lesního prostředí na rozsáhlých holinách (Čížková et al. 2020). Při výsadbě je nutné vzít v úvahu, že se jedná o světlomilnou dřevinu a výsadbu realizovat na vhodném stanovišti. Význam topolu černého, jakožto možné náhradní dřeviny v lužních lesích nebo břehových a doprovodných porostech, značně vzrostl v posledních letech, neboť došlo k významné redukci populací jilmů, olší a jasanů v důsledku šíření grafiozy, fytoftorové hniloby olší a nekrózy jasanu (Havrdová et al. 2016, Novotná et al. 2017, Chumanová et al. 2021). Zvýšením diverzity klíčových druhů těchto společenstev by došlo k zvýšení stability celých těchto ekosystémů.

Topol černý je dokonale přizpůsoben našemu klimatu. Neprojevují se u něj poškození při povětrnostních výkyvech, která jsou častá u řady importovaných kříženců s topolem bavlníkovým (*P. deltoides* Bartr. ex Marsh.), tj. topolů kanadských (*P. ×canadensis* Moench, tj. *P. deltoides* × *P. nigra*) (Mottl 1989) a na rozdíl od nich jde o středněvěkou dřevinu. Na rozdíl od ostatních domácích druhů topolů vytváří hluboký kořenový systém (Kovandová a Franková 2014), který může dosahovat do hloubky 10 m (Mottl 1989). I přes tyto výhody byl topol černý v minulosti vytlačěn z pěstování v důsledku masového šíření topolů kanadských.

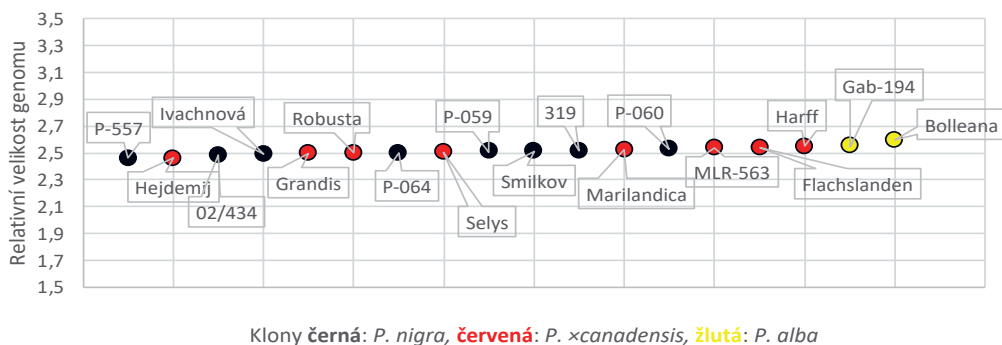
Topol černý je na základě morfologických znaků a křížitelnosti s dalšími druhy topolů řazen do sekce Aigeiros. S dalšími druhy této sekce a druhy ze sekce Tacamahaca se snadno kříží. Nejčastěji se jedná o křížence s topolem bavlníkovým a zpětné křížence s topolem kanadským, kdy topol kanadský je matka získaných semenáčů (Benetka et al. 2002, Vanden Broeck et al. 2004). Ke křížení v opačném směru (tj. *P. nigra* × *P. xcanadensis*) ve volné přírodě dochází většinou ojediněle (Benetka et al. 2002, Vanden Broeck et al. 2021) a to v závislosti na podílu a vzdálenosti výskytu samčích jedinců topolu kanadského oproti topolu černému rostoucích v blízkosti samičího topolu černého (Benetka et al. 2002, Vanden Broeck et al. 2004, Bialozyt et al. 2012) a dále na fenologii kvetení jedinců (Bialozyt 2012), proudění větru, reliéfu terénu atd. První spontánní kříženec (*P. xcanadensis* 'Serotina') vznikl okolo roku 1700 pravděpodobně ve Francii, odkud se rozšířil do dalších částí Evropy (Mottl 1989). Méně často se topol černý kříží s topolem Maximovičovým (*P. maximowiczii* A. Henry) a topolem chlupatoplodým (*P. trichocarpa* Torr. & Gray.). S ostatními našimi domácími topoly, jakožto se zástupci jiných sekcí, tj. topolem bílým (*P. alba* L.), topolem šedým (přirozený kříženec *P. alba* × *P. tremula*, tj. *P. xcanescens* Smith.) a topolem osikou (*P. tremula* L.), se ve volné přírodě nekříží (Cagelli a Lefèvre 1995, Eckenwalder 1996).

Dospělé stromy topolu černého mají široké, husté koruny s více či méně rovným kmenem nesoucím tlusté boule a těžké větve. Starší jedinci dorůstají do výšky 20–40 m a průměru 60–100 (nebo dokonce i 200) cm. Stromy mohou dosahovat stáří až 400 let, častěji však 200–300 let (Allegrí 1971). Technické stáří v břehových porostech uvádí Válek (1977) 40–50 let. Topol černý může být vysoký a rovný nebo s širokou korunou, nebo pokroucený nebo dokonce vícekmenný (Richardson et al. 2014).

Topol černý je v České republice součástí poměrně široké středoevropské populace. Velikost, tvar a charakter listů jsou dosti variabilní a od listů dalších našich domácích druhů se významně liší (Buriánek a Novotný 2016). Čepel juvenilních listů topolu černého je obvykle plochá, ale též až silně po okrajích zvlněná. Okraje čepele jsou mělce, často nepravidelně vroubkované až vroubkovaně zubaté. U bujně rostoucích listů se může vyskytnout u řapíku slabě srdčité nasazení. Adultní listy mají čepel více či méně blízko kosníkovitého tvaru, zakončenou úzkou špičkou. Čepel je plošně menší, zhruba 1/3 velikosti listu juvenilního. Svrchu je tmavě zelená, lesklá, vespod matně světle zelená, lysá, kožovitá a plochá. Ke konci vegetačního období bývají listy napadány rzí, zdravé listy se před opadem barví žlutě (Mottl a Úradníček 2003). Na rozdíl od topolů kanadských a jejich zpětných kříženců se u topolu černého na přechodu řapíku v listovou čepel nikdy nevyskytují žlázky, bujně rostoucí prýty mají kruhovitý průřez a nikdy na něm neparazituje jmelí listnáčové (*Viscum album* L.) (Mottl a Úradníček 2003). Potomci pocházející z mezidruhového křížení mohou více či méně zdědit některé typické znaky rodičovských druhů. Z tohoto důvodu bývá identifikace mezidruhových nebo zpětných kříženců od čistého druhu topolu černého na základě morfologických znaků obtížná. Navíc zmíněné znaky mohou při termínu hodnocení chybět (záleží na stáří stromu a době vegetace). Základní rozlišující znaky, které mohou posloužit k prvotnímu odlišení topolu černého od topolu kanadského jsou shrnuty v tabulce Příloha č. 1.

K determinaci taxonů a jejich kříženců se u některých druhů využívá metoda průtokové cytometrie, např. u břízy (Karlík et al. 2010, Kuneš et al. 2019) a jeřábu (Lepší et al. 2015). Tato metoda je v porovnání s ostatními metodami relativně rychlá a levná (Suda 2005), ale pro odlišení topolu černého a kanadského se v našich předběžných testech ukázala jako nevhodná. Ve spolupráci s týmem na Katedře botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy bylo zjištěno, že na základě relativní velikosti genomu není možné tyto druhy průkazně odlišit (Obr. 1; Urfus et al., nepublikováno).

Populus



Klony černá: *P. nigra*, červená: *P. xcanadensis*, žlutá: *P. alba*

Obr. 1 Relativní velikost genomu u jednotlivých testovaných klonů topolů černých (*P. nigra*), kanadských (*P. xcanadensis*) a bílých (*P. alba*).

Pro odlišení druhů a kříženců v rámci rodu *Populus* se dříve hojně používaly izoenzymové analýzy (např. Rajora 1990, Janssen 1997, Benetka et al. 1999, Benetka et al. 2002), které jsou jednoduché na vyhodnocení a jsou relativně finančně nenáročné (Vacková et al. 1998). Metoda má však svá omezení. Zatímco čisté rodičovské druhy a křížence 1. generace dokáže odlišit, identifikace druhu v dalších generacích nebo u zpětných kříženců je často obtížná z důvodu nízkého stupně polymorfismu (Heinze 1997, Benetka et al. 1999). Pokud je použit vyšší počet enzymových systémů, zvyšuje se i pravděpodobnost odlišení mezidruhových kříženců (Heinze 1997, Janssen 1997).

Další velmi vhodné metody pro odlišení druhů jsou metody na principu analýzy DNA. Využití chloroplastových (cpDNA) markerů je omezené, protože jsou děděny po matce, a proto nejsou schopné odlišit křížence v případě opylení topolu černého topolem bavlínikovým nebo hybridem (Heinze 1998, Ziegenhagen et al. 2008). Heinze (1997) úspěšně otestoval marker WIN3 (Bradshaw et al. 1994) a našel specifickou alelu pro topol bavlínikový, ale upozornil na to, že použití pouze jednoho markeru pro odlišení mezidruhových kříženců nestačí a další markery je třeba nalézt. Následně byly vytvořeny další markery na různých principech analýzy DNA (např. Meirmans et al. 2007, Fladung a Buschbom 2009, Alexandrov a Karlov 2018, atd.). Velmi vhodné se dále ukázaly mikrosatelitní markery (Simple Sequence Repeats markery; SSR markery). Jsou kodominantní, vysoce polymorfní a výsledky mezi laboratořemi jsou srovnatelné (až na malé odchylky ve velikosti alel) (Jones et al. 1997). Kromě odlišení druhů jsou účinným nástrojem pro studium genového toku (Vanden Broeck et al. 2004, Rathmacher et al. 2010), stupně introgrese (Pospíšková a Šálková 2006, Smulders et al. 2008, Chenault et al. 2011), určování rodičovství (Pospíšková a Šálková 2006, Vanden Broeck et al. 2006) a genetické diverzity topolů (např. Pospíšková a Bartáková 2004, Smulders et al. 2008, Politov et al. 2015, Cvrčková et al. 2022).

2.2 Odběr vzorků a laboratorní postupy

Laboratorní postup od odběru listů, přes PCR reakci, po fragmentační analýzu je shrnut v bodech přílohy (Příloha č. 2).

2.2.1 Odběr a uskladnění vzorků

Požadované materiálové vybavení a chemikálie: plastové krabičky, čajové sáčky, silika gel

Rostlinný materiál je vhodné odebírat v jarním období. Mladé, všeobecně méně napadené listy obsahují větší množství DNA a menší množství polysacharidů a jiných látek, které negativně ovlivňují výtěžek i kvalitu vyizolované DNA a následné molekulární metody.

Při odběru vzorků v terénu lze využít následující postupy. Mladé a zdravé listy se ihned po odebrání vloží do mikrotenových sáčků, uloží se do chladicího boxu s namraženými destičkami

oddělenými savým materiálem od vzorků. Vzorky se mohou krátkodobě uchovávat v lednici (4 °C), pro delší uchování je vhodnější mražení (-20 °C nebo -80 °C). Nejvhodnější je rychlé mražení čerstvého materiálu. To může být provedeno v tekutém dusíku s následným sušením v lyofilizátoru a drcením v oscilačním mlýnu nebo rovnou drcením čerstvého materiálu v tekutém dusíku v misce s tloučkem s následnou izolací. Další z možností je použití silikagelu. Vysoušení silikagelem je velmi praktické a efektivní. Rychle absorbuje vlhkost a je možné ho dovézt na místo odběru a přímo na místě začít sušení. Vzhledem k praktičnosti a dosažení optimálního výtěžku, kvality a čistoty vyizolované DNA byla tato metoda použita pro sušení všech odebraných vzorků topolů.

Mladý, zdravý a čistý list se po odebrání v terénu ihned vloží do popsaného čajového sáčku a uloží do plastové krabičky se silikagelem (Silica Gel Orange, 2–5 mm, perform; Roth). Po návratu z terénu se vzorky jeden po druhém přeskládají do krabičky a přesypou menší vrstvou čerstvého silikagelu. Silikagel se mění pravidelně do úplného vysušení vzorků, kdy je list vysoce lámavý. Takto vysušené listy je možné dlouhodobě skladovat nejlépe ve vzduchotěsných a vodotěsných krabičkách (např. Lock & Lock). Čas od času je vhodné zkontrolovat indikátor vlhkosti silikagelu a v případě potřeby silikagel vyměnit.

2.2.2 Homogenizace materiálu, extrakce izolačními sadami, stanovení čistoty, koncentrace a integrity DNA, ředění DNA

Požadované materiálové a technické vybavení a chemikálie: sterilní mikrozkušavky a špičky, pipety, skleněné kuličky, stojánky na zkumavky; analytické váhy, oscilační mlýn, termoblok, centrifuga, vortex, spektrofotometr, mikrovlnná trouba, horizontální elektroforéza se zdrojem, transiluminátor, fotodokumentační zařízení; izolační sada, ethanol, isopropanol, ultračistá voda, agaróza, interkalační barvivo, elektroforetický pufr, nanášecí pufr, velikostní marker

Ve zvláště vyčleněném prostoru pro izolaci DNA se naváží přibližně 20 mg vysušeného rostlinného materiálu v 2 ml zkumavce s kulatým dnem a bezpečnostním zámkem. Do každé zkumavky se přidají 3 skleněné kuličky o průměru 3 mm a zkumavky se rovnoměrně umístí do homogenizačních krabiček a vloží do oscilačního mlýnu (Retsch MM 400, Retsch). Oscilátor se nastaví na frekvenci 30 kmitů za sekundu na 6 minut. Po uplynutí této doby se krabičky vyjmou z oscilátoru a zkumavky zkontrolují. Pokud není materiál rozmělněný na jemný prášek, předešlý krok se znovu opakuje. Pokud by se nepodařilo tímto způsobem materiál rozmělnit, je možné použít k rozrušení pletiv např. sterilní skleněnou tyčinku a krok opakovat znovu.

K izolaci DNA je možné použít některou z komerčně dodávaných izolačních sad (Invisorb® Spin Plant Mini Kit, Stratec; DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen; E.Z.N.A.® Plant DNA Kit, Omega Biotek; apod.). Srovnání jednotlivých vyzkoušených sad je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1 Přehled testovaných izolačních kitů a průměrných hodnot sledovaných veličin/charakteristik na základě testování 5 druhů topolů s počátečními navážkami 20 mg.

název izolačních kitů	výrobce	způsob izolace	koncentrace DNA	$A_{(260)}/A_{(280)}$	$A_{(260)}/A_{(230)}$	uživatelská přívětivost*	délka izolace*
Invisorb® Spin Plant Mini Kit	Stratec	kolonky	834 ng·μl ⁻¹	2,1	2	1	2
E.Z.N.A.® Plant DNA Kit	Omega Bio-tek	precipitace DNA/ kolonky	108 ng·μl ⁻¹	1,9	1,9	3	3
DNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen	kolonky	40 ng·μl ⁻¹	1,9	1,3	2	1

* 1 = výborná/nejkratší, 3 = nejhorší/nejdélejší

Pro izolaci byl vybrán izolační kit Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Stratec). Oproti ostatním zkoušeným sadám je uživatelsky přívětivější, s mnohonásobně vyššími výtěžky a dostatečnou čistotou DNA. Postup se provádí podle návodu od výrobce s následujícími změnami (tučně zvýrazněné):

K homogenizovanému materiálu se přidá 400 µl lyzačního pufru P a 20 µl proteinázy S, směs se krátce zvortexuje a inkubuje 30 min při 65 °C. **Během inkubace se obsah zkumavek 2-3x promíchá jejich převrácením. Po inkubaci se zkumavky stočí 3 min při otáčkách 14 000 rpm.** Následně se lyzát bez sedimentu přelije/přepipetuje na Prefiltr kolonku a centrifuguje 1 min při 11 000 rpm. Po stočení se kolonka odstraní. K filtrátu se přidá 200 µl vazebného pufru A. Směs se důkladně promíchá, přelije/přepipetuje na kolonku Spin Filter a inkubuje 1 min při pokojové teplotě. Směs se centrifuguje 2 min při 11 000 rpm a poté se filtrát odstraní. Na kolonku se napipetuje 550 µl promývacího pufru I. a vše se stočí na 1 min při 11 000 rpm a poté se filtrát odstraní. Na kolonku se napipetuje 550 µl promývacího pufru II., centrifuguje 1 min při 11 000 rpm a následně se filtrát odstraní. Především promývací krok s pufrem II. se zopakuje, filtrát se odstraní a k vysušení membrány kolonky Spin Filter se provede centrifugace po dobu 4 min při 11 000 rpm. Kolonka se vloží do nové 1,5 ml sběrné zkumavky, na ní se napipetuje **50 µl elučního pufru, inkubuje se 10 min** a následně centrifuguje 1 min při 11 000 rpm. **Eluční krok se znovu opakuje**, poté se odstraní Spin Filter kolonka, sběrná zkumavka se umístí do lednice do další manipulace. Dlouhodobě se DNA uchovává v mrazáku při teplotě -20 °C nebo -80 °C.

Koncentrace a čistota DNA ($A_{(260)}/A_{(280)}$, $A_{(260)}/A_{(230)}$) se změří pomocí spektrofotometru (Nanodrop 2000, ThermoScientific). Doporučované hodnoty pro čistotu DNA $A_{(260)}/A_{(280)}$ jsou v rozmezí 1,8–2,0 a pro $A_{(260)}/A_{(230)}$ 1,8–2,2. Nižší hodnoty značí kontaminaci (např. proteiny, polyfenoly a další látky).

Integrita vyizolované DNA se ověří pomocí elektroforézy (Biometra Compact XL system, Analytic Jena; zdroj powerPRO300, Cleaver Scientific) na 0,8% agarózovém gelu s použitím 1× TBE pufru (Příloha č. 2).

Vzorky se ředí v ultračisté vodě ($S = 0,05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) na koncentraci $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

2.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR), kontrola PCR produktu na gelu

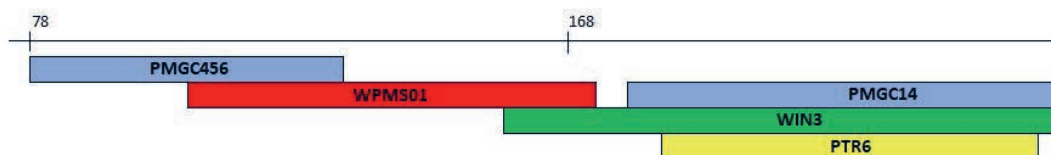
Požadované materiálové a technické vybavení a chemikálie: sterilní mikrozkušavky, PCR destičky, stripy a špičky; fólie na destičky, pipety, stojánky na zkumavky, led/chladicí destičky; centrifuga, vortex, termocykler, váhy, mikrovlnná trouba, horizontální elektroforéza se zdrojem, transiluminátor, fotodokumentační zařízení; primery, PCR pufr, MgCl_2 , dNTP, polymeráza, ultračistá voda, DNA, agaróza, interkalační barvivo, elektroforetický pufr, nanášecí pufr, velikostní marker

Pro správné odlišení topolu černého od topolu kanadského a jejich vzájemných kříženců byly v této metodice vyvinuty 2 panely genetických markerů (multiplexy). Na základě klasické PCR a fragmentační analýzy 10 topolů černých, 10 topolů kanadských a 10 topolů bavlníkových bylo vybráno z 23 testovaných (Bradshaw et al. 1994, Heinze 1997, Dayanandan et al. 1998, Rahman et al. 2000, Van Der Schoot et al. 2000, Smulders et al. 2001, Fossati et al. 2003, Tuskan et al. 2004, International Populus Genome Consortium 2005, Khasa et al. 2005, Liesebach et al. 2010), 6 diagnostických mikrosatelitních markerů (WPMS15, PMGC2163, WPMS01, PMGC14, PMGC456, PTR6), 1 diagnostický STS marker (WIN3) a 1 informativní (WPMS17). Těchto 8 stabilně amplifikujících markerů (Tab. 2) vykazujících kvalitní profil elektroforeogramů bylo na základě rozdílných annealingových teplot primerů a velikostí PCR produktů zařazeno do dvou multiplexů (Obr. 2, Obr. 3). Sestavené multiplexy byly ověřeny na dalších 63 vzorcích topolů černých, kanadských, bavlníkových a zpětných kříženců (BC1, topol kanadský × topol černý).

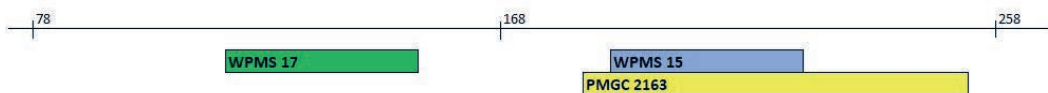
Tab. 2 Všeobecná charakteristika použitých mikrosatelitních markerů a rozsah velikostí fragmentů u topolů ze sekce Aigeiros.

lokus	motiv opakování	sekvence primerů (F/R)	rozsah velikostí fragmentů v testovaném souboru (bp)	rozsah velikostí fragmentů podle literatury (bp)	zdroj
WPMS01	GA	5'-AACCACTATGCCACCTTCTT-3'	118–170	137–169	van der Schoot et al. 2000
		5'-AACTAACTCCATTATTGCTAAA-3'			
WPMS15	CCT	5'-CAACAAACCAATCAATGAAGAAGAC-3'	196–217	197–218	Smulders et al. 2001, Liesebach et al. 2010
		5'-AGAGGGTGTGGGGGTGACTA-3'			
WPMS17	CAC	5'-ACATCCGCCAATGCTTCGGTGT-3'	119–149	119–152	Smulders et al. 2001
		5'-GTGACGGTGGTGGCGGATTTCTT-3'			
PMGC14	CTT	5'-TTCAGAATGTCATGATGG-3'	189–222	192–225	PMGC*, Fossati et al. 2003, Liesebach et al. 2010
		5'-GTGATGATCTCACCGTTG-3'			
PMGC456	GA	5'-TGTAGGAGATATCCACGTGG-3'	76–86	78–86	PMGC*, Khasa et al. 2005, Liesebach et al. 2010
		5'-AACAAATATGCTTCATAGCACAG-3'			
PMGC2163	GA	5'-CAATCGAAGGTAAGGTTAGTG-3'	189–249	185–261	PMGC*, Khasa et al. 2005, Liesebach et al. 2010
		5'-CGTTGGACATAGATCACAG-3'			
PTR6	AT	5'-AGAAAAGCAGATTGAGAAAAGAC-3'	189–197	186–194	Rahman et al. 2000, Khasa et al. 2005
		5'-CTAGTATAGAGAAAGAAGAAGCAGAAA-3'			
WIN3	-	5'-CCCGAAGTGCCAGAGC-3'	162–254	160–264	Bradshaw et al. 1994, Heinze 1997, Holderegger et al. 2005, Khasa et al. 2005, Ziegenhagen et al. 2008
		5'-CCCACTCAAATAGTCTAC-3'			

*PMGC = Poplar Molecular Genetics Cooperative (International Populus Genome Consortium 2005)



Obr. 2 Schéma amplifikačních profilů jednotlivých markerů pro topoly napříč sekcemi Tacamahaca, Aigeiros a Populus (Leuce) převzatých z literatury a použitých pro multiplex PCR (MULT1).



Obr. 3 Schéma amplifikačních profilů jednotlivých markerů pro topoly napříč sekcemi Tacamahaca, Aigeiros a Populus (Leuce) převzatých z literatury a použitých pro multiplex PCR (MULT2).

Složení a podmínky PCR reakcí jsou převzaty od Dayanandana et al. (1998), van der Schoota et al. (2000), Smulderse et al. (2001), Khasy et al. (2005) a následně upraveny a optimalizovány. Multiplex PCR se připraví podle rozpisů v Tab. 3 a Tab. 4. Podmínky amplifikace jsou uvedeny v Tab. 5 a Tab. 6. Souhrn vybraných primerů, zvolených fluorescenčních barev a použitých PCR rozpisů a programů je uveden v Tab. 7 a Tab. 8 .

Tab. 3 Složení multiplex PCR a koncentrace jednotlivých PCR komponentů (MULT1).

PCR komponenty	koncentrace zásobních roztoků	koncentrace komponentů v reakci	objem na 1 reakci
Taq Buffer s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10×	1×	1 μl
dNTP Mix	1 mM	100 μM	1 μl
MgCl_2	25 mM	2 mM	0,8 μl
F primer (WPMS456)	2 μM	0,16 μM	0,8 μl
R primer (WPMS456)	2 μM	0,16 μM	0,8 μl
F primer (WPMS01)	2 μM	0,1 μM	0,5 μl
R primer (WPMS01)	2 μM	0,1 μM	0,5 μl
F primer (WIN3)	2 μM	0,04 μM	0,2 μl
R primer (WIN3)	2 μM	0,04 μM	0,2 μl
F primer (PMGC14)	2 μM	0,1 μM	0,5 μl
R primer (PMGC14)	2 μM	0,1 μM	0,5 μl
F primer (PTR6)	2 μM	0,14 μM	0,7 μl
R primer (PTR6)	2 μM	0,14 μM	0,7 μl
Taq DNA Polymerase	5U. μl^{-1}	1 U	0,2 μl
DNA	5ng. μl^{-1}	8 ng	1,6 μl
Celkem			10 μl

Tab. 4 Složení multiplex PCR a koncentrace jednotlivých PCR komponentů (MULT2).

PCR komponenty	koncentrace zásobních roztoků	koncentrace komponentů v reakci	objem na 1 reakci
Taq Buffer s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10×	1×	1 μl
dNTP Mix	1 mM	100 μM	1 μl
MgCl_2	25 mM	2 mM	0,8 μl
F primer (WPMS17)	2 μM	0,16 μM	0,8 μl
R primer (WPMS17)	2 μM	0,16 μM	0,8 μl
F primer (PMGC2163)	2 μM	0,18 μM	0,9 μl
R primer (PMGC2163)	2 μM	0,18 μM	0,9 μl
F primer (WPMS15)	2 μM	0,2 μM	1 μl
R primer (WPMS15)	2 μM	0,2 μM	1 μl
Taq DNA Polymerase	5U. μl^{-1}	0,1 U	0,02 μl
H_2O			0,18 μl
DNA	5ng. μl^{-1}	8 ng	1,6 μl
Celkem			10 μl

Tab. 5 Podmínky amplifikace programů 50LP 35x použité v multiplexu MULT1.

kroky PCR	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	94 °C	3 min	1
denaturace	94 °C	45 s	35
nasedání primerů	50 °C	45 s	
syntéza DNA	72 °C	105 s	
konečná syntéza DNA	72 °C	10 min	1

Tab. 6 Podmínky amplifikace programů 60LP 30x použité v multiplexu MULT2.

kroky PCR	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	94 °C	3 min	1
denaturace	94 °C	45 s	30
nasedání primerů	60 °C	45 s	
syntéza DNA	72 °C	105 s	
konečná syntéza DNA	72 °C	10 min	1

Tab. 7 Přehled vybraných primerů použitých v multiplex PCR MULT1, PCR program a zvolené fluorescenční barvy.

lokus	složení multiplex PCR (Tab. 3)	podmínky amplifikace multiplex PCR (Tab. 5)	fluorescenční barva
WPMS01	MULT1	50LP 35×	PET
PMGC14	MULT1	50LP 35×	FAM
PMGC456	MULT1	50LP 35×	FAM
PTR6	MULT1	50LP 35×	NED
WIN3	MULT1	50LP 35×	VIC

Tab. 8 Přehled vybraných primerů použitých v multiplex PCR MULT2, PCR program a zvolené fluorescenční barvy.

lokus	složení multiplex PCR (Tab. 4)	podmínky amplifikace multiplex PCR (Tab. 6)	fluorescenční barva
WPMS15	MULT2	60LP 30×	FAM
WPMS17	MULT2	60LP 30×	VIC
PMGC2163	MULT2	60LP 30×	NED

Všechny komponenty PCR se rozmrazí (kromě polymerázy). Do PCR zkumavek či destiček se napipetuje 1,6 μl DNA (5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Z kompletně rozmražených komponentů (ThermoScientific) se po promíchání a stočení na centrifuze připraví zásobní mix dle rozpisu multiplexů v Tab. 3 a Tab. 4 (objem se napočítá na množství vzorků + 1 negativní kontrola + 10 % objemu navíc). Polymeráza (Taq polymeráza, ThermoScientific) se vyjme z mrazáku jako poslední, jemně promíchá, stočí a ihned napipetuje do směsi a vrátí zpět do mrazáku. Kompletní mix se následně promíchá pipetou, stočí a 8,4 μl této směsi se pipetuje do každé PCR zkumavky či jamky v destičce s DNA. Směs DNA a PCR chemikálií se ihned lehce promíchá, stočí a vloží do termocykleru (Eppendorf Mastercycler EP Gradient S, Eppendorf; Biometra TAdvanced 96 G, Analytic Jena). Spustí se příslušný program amplifikace (Tab. 5, Tab. 6).

Úspěšnost amplifikace DNA se ověří pomocí elektroforézy (Biometra Compact XL system, Analytic Jena; zdroj powerPRO300, Cleaver Scientific) na 1,5% agarózovém gelu s použitím 1 \times TBE pufru (Příloha č. 2).

Pokud je na agarózovém gelu patrný PCR produkt o očekávané velikosti (Tab. 2), můžeme s jistotou provést fragmentační analýzu.

2.2.4 Fragmentační analýza na sekvenátoru

Požadované materiálové a technické vybavení a chemikálie: sterilní mikrozkušavky, destičky do sekvenátoru, stripy a špičky; septa, fólie na destičky, pipety, stojánky na zkumavky, led/chladicí destičky; centrifuga, vortex, termocykler, sekvenátor s vybavením, digestoř; formamid, velikostní standard, pufr, polymer, ultračistá voda, PCR produkt

Podle množství testovaných vzorků se rozmrazí vhodná alikvóta formamidu (HiDi™, Applied Biosystems). Po rozmrazení formamidu se z lednice vyjme velikostní standard (GeneScan™ 500 (-250) LIZ™, Applied Biosystems) a obě chemikálie se lehce zvortexují a stočí. Podle počtu vzorků se v digestoři na ledu smíchá zásobní mix (12 μl formamidu + 0,25 μl velikostního standardu na jednu reakci). Tento mix se rozpipetuje do mikrozkušavek či destiček kompatibilních se sekvenátorem (SeqStudio™, Applied Biosystems). Jelikož je formamid toxická chemikálie, teratogen a iritant, používáme vhodné ochranné prostředky (nitrilové rukavice, plášť, brýle) a pracujeme v digestoři. K mixu se do každé jamky připipetuje 1 μl PCR produktu, celá směs se lehce zvortexuje, stočí a vloží do termocykleru na 2 min při 95 °C (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems). Po dokončení denaturace se vzorky dají na několik min k ledu a poté se vloží septy do sekvenátoru. V programu dodaném k sekvenátoru SeqStudio™ (Plate Manager 2.0, Applied Biosystems) se vytvoří seznam vzorků s unikátním názvem (injection list) a nastaví se použitý velikostní standard, barevná sada (G5 (6-FAM, VIC, NED, PET) s maticí DS-33™) a modul pro provedení analýzy (FragAnalysis). Podle tohoto souboru proběhne v sekvenátoru fragmentační analýza. Velikosti alel se odečtou v programu dodaném k SeqStudio™ (GeneMapper, Applied Biosystems). Do sekvenátoru se použijí speciální kazety (SeqStudio™ Cartridge v2, Applied Biosystems) a nádoba s pufrům (SeqStudio™ Cathode Buffer Container, Applied Biosystems).

2.3 Vyhodnocení fragmentační analýzy

Z výsledného elektroforeogramu získaného v programu GeneMapper se odečtou velikosti alel a porovnají se se specifickými alelami pro topol bavlníkový uvedenými v Tab. 9. Pokud jsou ve vzorku přítomny tyto alely, nejedná se o čistý topol černý, nýbrž o topol kanadský či jejich křížence. V případě, že je v každém testovaném lokusu přítomna právě jedna specifická alela pro topol bavlníkový (Tab. 9), pak se jedná o topol kanadský. Pokud jsou zjištěny specifické alely jen v některých lokusech, jedná se s největší pravděpodobností o druhou nebo další generaci kříženců nebo o zpětné křížence (BC1). V Tab. 10 jsou uvedené všechny alely, které se lišily mezi testovanými druhy s tučně vyznačenými diagnostickými alelami specifickými pro topol bavlníkový.

Navíc, s pomocí tabulky v příloze (Příloha č. 5), která uvádí velikosti alel testovaných klonů topolu kanadského (Příloha č. 3) u sledovaných markerů, lze díky kombinaci lokusů WPMS17, PMGC2163, WPMS01, PMGC14 a WIN3 odlišit většinu těchto klonů, přestože mikrosatelitní lokusy byly primárně vybírány k odlišení topolu černého od topolu kanadského.

Tab. 9 Seznam diagnostických alel určených k odlišení topolu černého od topolu kanadského a jeho kříženců u 8 testovaných markerů.

lokus	alely specifické pro topol bavlníkový (bp)
WPMS17	143
WPMS15	196
PMGC2163	189
WPMS01	118, 120
PMGC14	189, 192
WIN3	254
PMGC456	86
PTR6	197

Tab. 10 Seznam velikostí alel (bp) lišících se u topolu černého (N), kanadského (C) a bavlníkového (D) získaných na základě fragmentační analýzy 23 topolů černých, 18 topolů kanadských a 18 topolů bavlníkových (Příloha č. 3) pomocí osmi vybraných markerů. Uvedené velikosti alel slouží k odlišení dvojice zkoumaných druhů (např. N/C – alela se vyskytuje u topolu černého, ale není přítomna u topolu kanadského).

lokus	topol černý (N)	topol kanadský (C)	topol bavlníkový (D)
WPMS17	119 N/C	143 C/N	143 D/N
	119, 140 N/D	140 C/D	
WPMS15	205, 211, 217 N/C	196 C/N	196 D/N
	205, 211, 214, 217 N/D	214 C/D	
PMGC2163	217, 225, 227, 229, 237, 241, 245 N/C	189 C/N	189 D/N
	217, 219, 223, 225, 227, 229, 237, 239, 241, 243, 245, 249 N/D	219, 223, 239, 243 249 C/D	
WPMS01	134, 140, 142, 150, 152, 154, 162, 168, 170 N/C	118, 120 C/N	118, 120 D/N
	134, 138, 140, 142, 144, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160 162, 168, 170 N/D	138, 144, 148, 156, 158, 160 C/D	
PMGC14	198, 213, 219 N/C	189, 192 C/N	189, 192 D/N
	198, 201, 204, 207, 210, 213, 219, 222 N/D	201, 204, 207, 210, 222 C/D	
WIN3	162, 166 N/D	254 C/N	254 D/N
		162, 166 C/D	
PMGC456	76, 80 N/C	86 C/N	86 D/N
	76, 78, 80 N/D	78 C/D	
PTR6	189 N/C	197 C/N	197 D/N
	189, 191 N/D	191 C/D	

2.4 Ověření metody a statistické vyhodnocení

2.4.1 Charakteristiky zvoleného výběru markerů

Pomocí fragmentační analýzy 23 standardních vzorků topolů černých zahrnujících klony z ČR, Slovenska, Itálie, Belgie a Nizozemska; 18 vzorků topolů kanadských s klony z Belgie, Francie, Nizozemska, Itálie, Německa, Maďarska a Sev. Ameriky; 18 vzorků topolů bavníkových z Francie, Maďarska, Polska a USA (Příloha č. 3) bylo identifikováno celkem 60 alel, 48 specifických pro topol černý a 10 specifických pro topol bavníkový a 2 nespecifické (Tab. 11). Frekvence alel u testovaných topolů (t. černých, t. kanadských, BC1 kříženců) pro jednotlivé testované lokusy jsou uvedeny v tabulkách přílohy (Příloha č. 4).

Vzhledem k vyšší variabilitě v souboru vzorků topolů černých byly k určení topolů kanadských vybírány alely specifické pro topol bavníkový. Lokusy WPMS15, PMGC2163, WIN3, PMGC456 a PTR6 byly pro topoly bavníkové monomorfní, všech 18 jedinců bylo v těchto lokusech homozygotních se specifickými alelami (Příloha č. 4).

Tab. 11 Alelová diverzita topolů černých a topolů bavníkových v osmi vybraných mikrosatelitových lokusech a počet specifických alel u topolů kanadských zděděných od topolů černých (N) a topolů bavníkových (D).

lokus	alely	topol černý		topol kanadský				topol bavníkový	
	celkem	celkem	spec.	celkem	spec.	N	D	celkem	spec.
WPMS17	5	4	2	4	2	1	1	3	1
WPMS15	5	4	4	2	2	1	1	1	1
PMGC2163	13	12	12	6	6	5	1	1	1
WPMS01	17	15	15	8	8	6	2	2	2
PMGC14	10	8	8	7	7	5	2	2	2
WIN3	3	2	2	3	3	2	1	1	1
PMGC456	4	3	3	2	2	1	1	1	1
PTR6	3	2	2	2	2	1	1	1	1
celkem alel	60	50	48	34	32	22	10	12	10
počet jedinců	59	23		18				18	

2.4.2 Ověření zvoleného výběru markerů

Vzhledem k běžnému výskytu zpětných kříženců topolů černých s topoly kanadskými ve volné přírodě byla ověřena správnost výběru 8 markerů na 34 jedincích BC1 získaných z kontrolovaného opylení.

Pro BC1 křížení byl použit stejný pyl topolu černého ('P-059') k opylení různých klonů topolu kanadského. Celkem bylo hodnoceno 16 jedinců křížených s klonem 'Flachslanden', 11 jedinců křížených s klonem 'Pannonia', 6 jedinců křížených s klonem 'Grandis' a 1 jedinec s klonem 'Marilandica'. Počet diagnostických alel na lokus se pohyboval od 15 do 27. Nejnižší podíl diagnostických alel vykazoval lokus PMGC14 (22,1 %). Nejvyšší podíl diagnostických alel vykazoval lokus WIN3 (39,7 %) a PMGC2163 (29,4 %). Počet správně určených kříženců jediným lokusem se nacházel v rozmezí od 15 (PMGC14, 44,1 %) do 20 (PMGC2163, 58,82 %). Pomocí 8 vybraných lokusů se podařilo správně určit 100 % kříženců (Tab. 12). Při použití menšího počtu markerů by mohlo dojít k chybnému určení, protože u dvou kříženců byla pozorována pouze jedna specifická alela pocházející z topolu bavlíkového. BC1 kříženci vykazovaly všech 10 specifických alel pro topol bavlíkový a 20 specifických alel pro topol černý (Tab. 13). V lokusu WIN3 se u některých topolů kanadských nacházely 3 alely (Příloha č. 5).

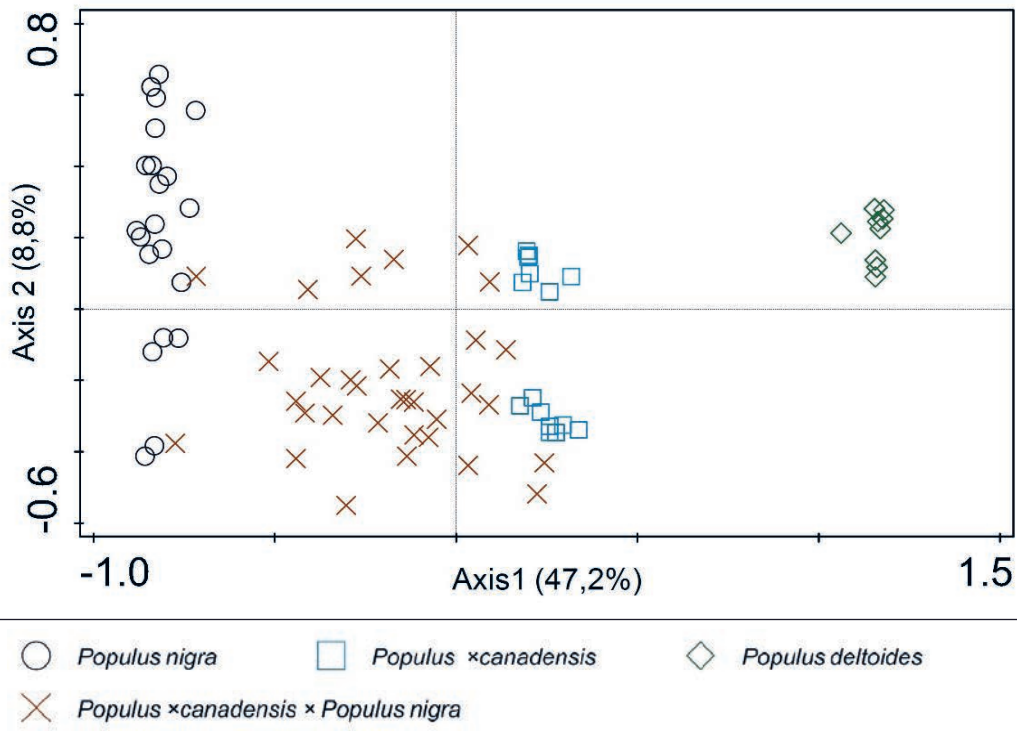
Tab. 12 Počet diagnostických alel u 8 vybraných lokusů, množství a podíl správně zařazených jedinců topolů kanadských a BC1 kříženců.

lokus	topol kanadský		BC1: topol kanadský × topol černý	
	počet (podíl) diagnostických alel na lokus	počet (podíl) správně zařazených jedinců	počet (podíl) diagnostických alel na lokus	počet (podíl) správně zařazených jedinců
WPMS17	18 (50 %)	18 (100 %)	16 (23,5 %)	16 (47,1 %)
WPMS15	18 (50 %)	18 (100 %)	19 (27,9 %)	19 (55,9 %)
PMGC2163	18 (50 %)	18 (100 %)	20 (29,4 %)	20 (58,82 %)
WPMS01	18 (50 %)	18 (100 %)	16 (23,5 %)	16 (47,1 %)
PMGC14	18 (50 %)	18 (100 %)	15 (22,1 %)	15 (44,1 %)
WIN 3	18 (40 %)	18 (100 %)	27 (39,7 %)	19 (55,9 %)
PMGC456	18 (50 %)	18 (100 %)	19 (27,9 %)	19 (55,9 %)
PTR6	18 (50 %)	18 (100 %)	18 (26,5 %)	18 (52,9 %)
celkem	144 (48 %)	18 (100 %)	150 (27,6 %)	34 (100 %)

Tab. 13 Alelová diverzita BC1 kříženců v osmi vybraných mikrosatelitových lokusech. Alely zděděné od topolu černého jsou značené N, od topolu bavlíkového D.

	BC1: topol kanadský × topol černý			
lokus	celkem	spec.	N	D
WPMS17	4	2	1	1
WPMS15	2	2	1	1
PMGC2163	5	5	4	1
WPMS01	7	7	5	2
PMGC14	6	6	4	2
WIN3	3	3	2	1
PMGC456	2	2	1	1
PTR6	3	3	2	1
celkem alel	32	30	20	10
počet jedinců	34			

K vyjádření odlišností mezi druhy byla použita analýza hlavních koordinát (PCoA). Analyzováno bylo celkem 93 vzorků topolů (23 topolů černých, 18 topolů kanadských, 18 topolů bavlíkových a 34 BC1 kříženců). Z původních délek PCR fragmentů byla vytvořena matice pomocí metriky Bruvo distance (zohledňující mutace) pomocí programu R skriptem POLYSAT (Clark a Jasieniuk 2011, Clark a Schreier 2017, R Core Team 2018). Na základě této matice byla poté v programu Canoco (Šmilauer a Lepš 2014) provedena PCoA a její výsledky graficky znázorněny pomocí průmětu jednotlivých vzorků topolů do prvních dvou komponent PCoA (Obr. 4).



Obr. 4 Zobrazení průmětu mikrosatelitových dat do prvních dvou komponent PCoA. Použita byla metrika Bruvo distance pro 93 jedinců a 8 markerů. Komponenta 1 vysvětluje 47,2 % variability, komponenta 2 8,8 % celkové variability.

2.4.3 Senzitivita a specifita testu

V případě diagnostických markerů může docházet u zpětných kříženců a kříženců druhé (topol kanadský × topol kanadský) a dalších generací k záměně za topol černý. Od druhé poloviny minulého století, kdy docházelo k masovému vysazování různých klonů topolu kanadského a k postupnému ubývání topolu černého, lze teoreticky odhadovat, že se ve volné přírodě mohou vyskytovat kříženci 3. až 4. generace. Správné odlišení topolu černého od mezidruhových hybridů závisí na počtu použitých diagnostických markerů. Pravděpodobnost správného určení vzrůstá s vyšším počtem použitých markerů (Boecklen a Howard 1997).

V dalším textu budeme předpokládat, že testovaný jedinec může být buď topolem černým (dále označovaným N), křížencem topolu černého a topolu bavlíkového (C1), křížencem topolu černého a topolu kanadského (BC1), nebo křížencem dvou topolů kanadských (C2) a obdobně i v dalších generacích. Přestože se k analýze využívá 8 markerů, pro vypočítání pravděpodobnosti správného určení topolů kanadských a jeho kříženců a jejich záměny za topol černý (falešně negativní výsledek) se počítá pouze se šesti markery. Je vynechán STS marker WIN3, který se v genomu vyskytuje pravděpodobně ve více kopiích a při zpětném křížení nevykazuje klasické štěpné poměry (Heinze 1997). Dále je z propočtů vyřazen informativní marker WPMS17, u kterého vždy nemusí platit níže zmíněná rovnost $P(B|A_{C1}) = 1$ u topolů kanadských, jelikož se v genomu rodičovských druhů nacházejí 2 sdílené nespecifické alely. Níže uvedené pravděpodobnosti by tudíž u těchto dvou markerů nebyly pravdivé.

Senzitivitou testu rozumíme pravděpodobnost, že test označí hybridního jedince za hybridního. Pro identifikaci topolu kanadského a jeho hybridů postačuje nález alespoň jedné specifické alely topolu bavlíkového ve vyšetřovaných markerech.

Podle Mendelových zákonů dědičnosti (Bialozyt et al. 2012) se tak stane s pravděpodobností

$$P(B|A_{BC1}) = 1 - \left(\frac{1}{2}\right)^n,$$

kde $P(B|A_{BC1})$ je pravděpodobnost, že test označí topol za hybridní, pokud jde o jedince vzniklého zpětným křížením topolu kanadského a topolu černého, a n je počet použitých diagnostických markerů.

V případě jedince vzniklého křížením dvou topolů kanadských je

$$P(B|A_{C2}) = 1 - \left(\frac{1}{4}\right)^n.$$

Topol kanadský (C1) obsahuje vždy alely topolu bavlníkového, tedy

$$P(B|A_{C1}) = 1.$$

S pravděpodobnostmi doplňkovými $P(\bar{B}|A) = 1 - P(B|A)$ test označí hybridní jedince za topoly černé, dosáhne tedy falešně negativního výsledku.

Specifitou testu rozumíme pravděpodobnost, že test dosáhne v případě topolu černého negativního výsledku (tj. správně označí takového jedince za nehybridního), je rovna jedné

$$P(\bar{B}|A_N) = 1.$$

Senzitivita testu při použití 6 markerů a výše uvedených vzorců je u C1 hybridů stanovena na 100 %, u C2 hybridů na 99,98 % a BC1 hybridů na 98,44 % (Tab. 14). Dva markery vyřazené z pravděpodobnostních výpočtů jsou v multiplexech ponechány, jelikož ještě dále zvyšují senzitivitu testů.

Tab. 14 Pravděpodobnosti pozitivních a negativních výsledků testu u hybridních topolů při použití 6 markerů; N - topol černý, C - topol bavlníkový, C1 - topol kanadský.

testovaný jedinec	rodičovská kombinace	senzitivita testu	falešně negativní výsledek
C1	C × N	100,00 %	0,00 %
C2	C1 × C1	99,98 %	0,02 %
C3	C2 × C2	99,98 %	0,02 %
BC1	C1 × N	98,44 %	1,56 %
BC2	BC1 × N	82,20 %	17,80 %
BC1 × BC1	(C1 × N) × (C1 × N)	96,83 %	3,17 %
BC1 × C1	(C1 × N) × (C × N)	99,72 %	0,28 %
BC1 × C2	(C1 × N) × (C1 × C1)	99,72 %	0,28 %
C2 × N	(C1 × C1) × N	98,44 %	1,56 %

3 Srovnání novosti postupů

Do dnešní doby byly publikovány metodiky na odlišení topolu černého od jiných topolů především na základě morfologie listů (Mottl a Úradníček 2003, Buriánek a Novotný 2016). Identifikace topolu černého na základě fenotypových znaků může být obtížná a nedostačující, neboť topol černý se snadno kříží s dalšími topoly ze sekce Aigeiros a Tacamahaca, převážně s topolem bavlníkovým, s jejich kříženci (topolem kanadským) a zpětnými hybridy. Tito potomci mohou zdědit některé typické znaky rodičovských druhů. Aby bylo možné tyto jedince odlišit od topolu černého, je zapotřebí vyšší počet druhově specifických markerů. K publikaci se chystá metodika zabývající se druhovou determinací a stanovením genetické diverzity topolu černého s využitím mikrosatelitních markerů (Cvrčková, osobní sdělení), která k odlišení využívá 5 markerů zakomponovaných do 3 multiplexů.

Předkládaná metodika jasně prezentuje postup, jak odlišit čistý druh topol černý od topolu kanadského a jejich kříženců pomocí moderní metody s použitím DNA markerů. Na základě přítomnosti specifických alel (Tab. 9) pro topol bavlníkový je možné křížence odlišit i v dalších generacích. Navíc metodika zahrnuje fotografickou přílohu, podle níž lze provést prvotní rozlišení topolu černého od topolu kanadského.

Na základě analýz DNA souboru jedinců z českých a moravských populací topolu černého bylo vybráno pro odlišení čistého druhu 8 dříve publikovaných markerů, které byly seskupeny do dvou multiplexů a podmínky PCR reakce byly optimalizovány. Jedná se o nové, dříve nepublikované multiplexy. Pro jejich validaci byly použity topoly z několika kontrolovaných opylení mezi

topolem černým a kanadským i topoly černé ze zahraničí (Slovensko, Slovinsko, Bosna a Hercegovina) včetně nejběžněji pěstovaných klonů topolu kanadského a jiných druhů topolů. Díky použitému počtu markerů je senzitivita zvolené metody 100 % v případě kříženců mezi topolem černým a topolem bavlníkovým, minimálně 99,98 % u kříženců mezi dvěma topoly kanadskými a 98,44 % u kříženců mezi topolem černým a topolem kanadským. I u dalších možných typů křížení a dalších generací je senzitivita zvolené metody vyšší než 96 % s výjimkou druhé generace zpětného křížení, které však ve volné přírodě není tak časté.

Zvolená metoda analýz DNA s využitím mikrosatelitních markerů je vhodná pro rutinní využití a je dobře reprodukovatelná. Díky zařazení nejběžněji pěstovaných klonů topolu kanadského lze jednoznačně identifikovat jednotlivé alely daných lokusů (Příloha č. 5) při testech na dalších pracovištích a nebo jiných sekvenátorech.

4 Popis uplatnění metodiky

Metodika představuje soubor postupů pro spolehlivé odlišení jedinců topolu černého od blízce příbuzného topolu kanadského a jejich kříženců (další generace nebo zpětných kříženců). Je využitelná v lesnictví, vodohospodářství i v ochraně přírody. Určení druhové čistoty lze využít při výběru původních geneticky cenných jedinců pro uznání jako zdroje reprodukčního materiálu v lesích, při plánování revitalizací vodních toků, při obnově a péči o stávající zbytkové porosty topolu černého. Metodika bude mít uplatnění především na lokální a na celostátní úrovni, ale může být použita také v zahraničí. Analýzu vzorků lze zpracovat na základě pracovního postupu uvedeného v metodice, buď přímo v dotčené organizaci s potřebným laboratorním vybavením nebo v komerční firmě.

5 Ekonomické aspekty

Topol černý je nedílnou součástí naší přírody, především lužních lesů a břehových porostů. Je využíván také jako významný krajinný prvek. V poslední době, kdy jsou silně ohroženy jiné dřeviny (olše, jasany, jilmy) invazními patogeny, narůstá jeho význam jako náhradní dřeviny. Identifikace čistého topolu černého a péče o takové stromy je velmi důležitá. Významným ekonomickým přínosem nejen v lesním a vodním hospodářství je minimalizace možné záměny topolu černého za topol kanadský nebo jeho křížence (druhé generace kříženců topolů kanadských nebo zpětných kříženců). Použitím výsadbového materiálu čistého topolu černého lze docílit delší stability a životnosti jednotlivých lesních a břehových porostů i liniových výsadeb. Dojde tak často i k zajištění stabilizace ohrožených ekosystémů. Tento význam je ekonomicky nevyčíslitelný. Nepřímým ekonomickým dopadem je pak i pozitivní vliv na životní prostředí.

Při využití mikrosatelitových markerů pro stanovení druhové pravosti je největším nákladem vybavení laboratoře a následně výběr vhodných mikrosatelitových markerů a jejich seskupení do multiplexů. Předkládaný postup sníží náklady standardně vybavených laboratoří, kdy je nutný pouze nákup doporučených mikrosatelitových markerů. Využití dvou multiplexů vede k ušetření nákladů na použitých chemických ingrediencích a času. Při potvrzení druhové pravosti z předem vytipovaných jedinců, kde je potřeba pouze ověřit druhovou pravost topolu černého či topolu kanadského stačí využít jen jednoho z multiplexů (případně pouze jeden či dva mikrosatelitové markery).

Náklady na chemikálie (kit Invisorb) a spotřební materiál pro izolaci DNA jsou cca 100 Kč na jeden vzorek. Náklady na chemikálie a spotřební materiál potřebné pro přípravu PCR produktu a fragmentační analýzu v sekvenátoru Seqstudio jsou při cenách z roku 2024 cca 220 Kč na jeden vzorek. Tyto náklady zahrnují přípravu PCR produktu u jednotlivých multiplexů (cca 23 Kč u multiplexu 1 a cca 13 Kč u multiplexu 2), kdy rozdíl u multiplexů je dán především odlišným počtem použitých lokusů a různým množstvím polymerázy, a náklady na chemikálie použité v sekvenátoru Seqstudio, které jsou cca 90 Kč za jednu fragmentační analýzu. Cena fragmentační analýzy se řídí převážně cenou cartridge. Do nákladů není započten nákup přístrojového vybavení ani jeho amortizace, doplňkové náklady na provoz laboratoře ani náklady osobní.

6 Seznam použité literatury

Alexandrov O.S., Karlov G.I. (2018): Development of 5S rDNA-Based Molecular Markers for the Identification of *Populus deltoides* Bartr. ex Marshall, *Populus nigra* L., and Their Hybrids. *Forests* 9 (10): 604.

Allegri E. (1971): Identification of species and varieties of poplar indigenous in Italy. *Annali dell' Istituto Sperimentale per la Selvicoltura, Arezzo* 2.. In: Isebrands J.G., Richardson J. (eds.). *Poplars and willows: trees for society and the environment*. FAO and CABI, Rome. s. 1–62. ISBN 978-1-78064-108-9.

Benetka V., Mottl J., Vacková K., Pospíšková M. (1999): Estimation of the introgression level in *Populus nigra* L. populations by means of isozyme gene markers. *Silvae Genet.* 48 (5): 218–223.

Benetka V., Pospíšková M., Vrátný F., Tkaczyková M. (2008): Inbreeding depression in the full-sib offspring of *Populus nigra* L. *Silvae Genet.* 57 (4–5): 202–210.

Benetka V., Vacková K., Bartáková I., Pospíšková M., Rasl M. (2002): Introgression in black poplar (*Populus nigra* L. ssp. *nigra*) and its transmission. *J. For. Sci.* 48: 115–120.

Bialozyt R. (2012): Gene flow in poplar - experiments, analysis and modeling to prevent transgene outcrossing. *iForest* 5: 147–152.

Bialozyt R., Rathmacher G., Niggemann M., Ziegenhagen B. (2012): Reconstructing explicit mating schemes in poplar hybrids – a case study in the *Populus nigra* L. – *Populus ×canadensis* Moench complex. *Silvae Genet.* 61 (4-5): 157–167.

Boecklen W. J., Howard D. J. (1997): Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology* 78 (8): 2611–2616.

Bradshaw H.D., Villar M., Watson B.D., Otto K.G., Stewart S., Stettler R.F. (1994): Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 89: 167–178.

Buriánek V., Novotný P. (2016): Metodická příručka k určování domácích druhů topolů. Certifikovaná metodika. *Lesnický průvodce* 11/2016. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady. 37 s. ISBN 978-80-7417-134-5.

Cagelli L., Lefèvre F. (1995): The conservation of *Populus nigra* L. and gene flow with cultivated poplars in Europe. *Forest Genetics* 2 (3): 135–144.

Clark L.V., Jasieniuk M. (2011): Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 11 (3): 562–566.

Clark L.V., Schreier A.D. (2017): Resolving microsatellite genotype ambiguity in populations of allopolyploid and diploidized autopolyploid organisms using negative correlations between allelic variables. *Mol. Ecol. Resour.* 17 (5): 1090–1103.

Cvrčková H., Čížková L., Máchová P., Vítová K. (2022): Metodické postupy charakterizace genetické diversity u topolu černého (*Populus nigra* L.) s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. *Lesnický průvodce* 8/2022. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady. 36 s. ISBN 978-80-7417-242-7.

Čížková L., Cvrčková H., Máchová H. (2020): Možnosti využití domácích druhů rodu *Populus* v lesnické praxi. *Lesnický průvodce* 2/2020. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady. 33 s. ISBN 978-80-7417-202-1.

Dayanandan S., Rajora O.P., Bawa K.S. (1998): Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theor. Appl. Genet.* 96: 950–956.

- de Rigo D., Enescu C.M., Houston Durrant T., Caudullo G. (2016): *Populus nigra* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J., de Rigo D., Caudullo G., Houston Durrant T., Mauri A. (Eds.). European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e0182a4+.
- Eckenwalder J.E. (1996): Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler R.F., Bradshaw Jr. H.D., Heilman P.E., Hinckley T.M. (eds). Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Part I, Chapter 1. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON. s. 7–32. ISBN: 978-0-660-16506-6.
- Fladung M., Buschbom J. (2009): Identification of single nucleotide polymorphisms in different *Populus* species. *Trees* 23: 1199–1212.
- Fossati T., Grassi F., Sala F., Castiglione S. (2003): Molecular analysis of natural populations of *Populus nigra* L. intermingled with cultivated hybrids. *Mol. Ecol.* 12 (8): 2033–2043.
- Grulich V. (2017): Červený seznam cévnatých rostlin ČR. *Příroda* 35: 75–132.
- Havrdová L., Novotná K., Zahradník D., Buriánek V., Pešková V., Šrůtka P., Černý K. (2016): Differences in susceptibility to ash dieback in Czech provenances of *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathol.* 46 (4): 281–288.
- Heinze B. (1997): A PCR marker for a *Populus deltoides* allele and its use in studying introgression with native European *Populus nigra*. *Belg. J. Bot.* 129 (2): 123–130.
- Heinze B. (1998): PCR-based chloroplast DNA assays for the identification of native *Populus nigra* and introduced poplar hybrids in Europe. *For. Genet.* 5: 31–38.
- Holderegger R., Angelone S., Brodbeck S., Csencsics D., Gugerli F., Hoebee S.E., Finkeldey R. (2005): Application of genetic markers to the discrimination of European Black Poplar (*Populus nigra*) from American Black Poplar (*P. deltoides*) and Hybrid Poplars (*P. ×canadensis*) in Switzerland. *Trees* 19: 742–747.
- Chenault N., Arnaud-Haond S., Juteau M., Valade R., Almeida J.-L., Villar M., Bastien C., Dowkiw A. (2011): SSR-based analysis of clonality, spatial genetic structure and introgression from the Lombardy poplar into a natural population of *Populus nigra* L. along the Loire River. *Tree Genet. Genomes* 7: 1249–1262.
- Chmelař J., Koblížek J. (1990): *Populus* L. – topol. – In: Hejný S., Slavík B., Hroudá L., Skalický V. (eds). Květena České republiky 2. , Academia, Praha. s. 489–495.
- Chumanová E., Černý K., Brestovanská T., Haňáčková Z., Havrdová L., Zýka V. (2021): Atlas potenciální distribuce vybraných druhů invazních patogenů dřevin a jejich impaktu na lesní ekosystémy v ČR. Specializovaná mapa s odborným obsahem. Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i., Průhonice. 103 s. ISBN 978-80-87674-45-1.
- International Populus Genome Consortium (2005): *Populus* SSR primer sets. Dostupné na: http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm. In: Khasa D., Pollefeys P., Navarro-Quezada A., Perinet P., Bousquet J. (2005): Species-specific microsatellite markers to monitor gene flow between exotic poplars and their natural relatives in eastern North America. *Mol. Ecol. Notes* 5 (4): 920–923; 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 Genet. Genomes* 6 (2): 259–269.
- Janssen A. (1997): Unterscheidung der beiden Schwarzpappelarten *Populus nigra* L. und *P. deltoides* Marsh. sowie ihrer Arthybride *P. × euroamericana* (Dode) Guinier mit Hilfe von Isoenzymmustern. *Die Holzzucht* 55: 17–23.

- Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeier G., Vosnam B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevski A., Marmioli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding* 3: 381–390.
- Karlík P., Ešnerová J., Urfus T., Kuneš I., Baláš M., Vítámvás J., Koňasová T., Kubešová M., Fér T., Vít P. (2010): Problematika určování druhů bříz *Betula* L. ve světle průtokové cytometrie. Bříza-strom roku 2010. Kostelec nad Černými lesy, 23.9.2010. s. 51–56.
- Khasa D., Pollefeys P., Navarro-Quezada A., Perinet P., Bousquet J. (2005): Species-specific microsatellite markers to monitor gene flow between exotic poplars and their natural relatives in eastern North America. *Mol. Ecol. Notes* 5 (4): 920–923.
- Kovandová L., Franková I. (2014): Metodika posouzení stavu břehových porostů v intravilánech měst a obcí. Povodí Labe, s.p., OPVZ. 49 s.
- Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J., Štěpánek, J. (eds.) (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha, 928 s. ISBN 978-80-200-0836-7.
- Kuneš I., Linda R., Fér T., Karlík P., Baláš M., Ešnerová J., Vítámvás J., Bílý J., Urfus T. (2019): Is *Betula carpatica* genetically distinctive? A morphometric, cytometric and molecular study of birches in the Bohemian Massif with a focus on Carpathian birch. *PLoS ONE* 14 (10): e0224387.
- Lefèvre F., Legionnet A., De Vries S., Turok J. (1998): Strategies for the conservation of a pioneer tree species, *Populus nigra* L., in Europe. *Genet. Sel. Evol.* 30 (Suppl. 1): S181–S196.
- Lepší M., Lepší P., Koutecký P., Bílá J., Vít P. (2015): Taxonomic revision of *Sorbus* subgenus *Aria* occurring in the Czech Republic. *Preslia* 87: 109–162.
- 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 Genet. Genomes* 6 (2): 259–269.
- Meirmans P.G., Lamothe M., Périnet P., Isabel N. (2007): Species-specific single nucleotide polymorphism markers for detecting hybridization and introgression in poplar. *Can. J. Bot.* 85: 1082–1091.
- Mottl J. (1989): Topoly a jejich uplatnění v zeleni. SEMPRA-VŠÚOZ, Průhonice, 204 s. ISBN 80-85116-02-2.
- Mottl J., Úradníček L. (2003): Topoly a jejich listy (rentgenogramy listů topolů). *Acta Průhoniciana* 74. Průhonice. 30 s. ISBN: 80-85116-X.
- Novotná K. (2013): Studium inbrední deprese v souboru příbuzných jedinců u topolu černého. Diplomová práce. FLD, ČZU, Praha. 123 s.
- Novotná K., Štochlová P., Havrdová L., Černý K. (2017): Současná ohrožení vybraných klíčových dřevin lužních lesů a břehových porostů a možnosti jejich eliminace. *Ochrana přírody* 6: 24–27.
- Politov D.V., Belokon M.M., Belokon Y.S., Polyakova T.A., Shatokhina A.V., Mudrik E.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*). *Int. J. Plant Genomics* 2015: 261518.
- Pospíšková M., Bartáková I. (2004): Genetic diversity of a black poplar population in the Morava river basin assessed by microsatellite analysis. *Forest Genetics* 11 (3-4): 257–262.
- Pospíšková M., Šálková I. (2006): Population structure and parentage analysis of black poplar along the Morava River. *Can. J. For. Res.* 36: 1067–1076.

- R Core Team (2018): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rahman M.H., Dayanandan S., Rajora O.P. (2000): Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. *Genome* 43: 293–297.
- Rajora O. P. (1990): Marker allozyme genes and alleles for differentiation of *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximowiczii*, and their interspecific hybrids. *Can. J. Bot.* 68: 990–998.
- Rathmacher G., Niggemann M., Köhnen M., Ziegenhagen B., Bialozyt R. (2010): Short-distance gene flow in *Populus nigra* L. accounts for small-scale spatial genetic structures: implications for in situ conservation measures. *Conserv. Genet.* 11: 1327–1338.
- Richardson J., Isebrands J.G., Ball J.B. (2014): Ecology and Physiology of Poplars and Willows. In: Isebrands J.G., Richardson J. (eds.). *Poplars and willows: trees for society and the environment*. FAO and CABI, Rome. p. 92–123. ISBN 978-1-78064-108-9.
- Smulders M.J.M., Beringen R., Volosyanchuk R., Vanden Broeck A., Van der Schoot J., Arens P., Vosman B. (2008): Natural hybridisation between *Populus nigra* L. and *P. ×canadensis* Moench. Hybrid offspring competes for niches along the Rhine River in the Netherlands. *Tree Genet. Genomes* 4: 663–675.
- Smulders M.J.M., van der Schoot J., Arens P., Vosman B. (2001): Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Mol. Ecol. Notes* 1: 188–190.
- Suda J. (2005): Co se skrývá za průtokovou cytometrií. *Živa* 1/2005: 46–48.
- Šmilauer P., Lepš J. (2014): *Multivariate Analysis of Ecological Data using Canoco 5*. – 2nd ed. Cambridge University Press. 376 s. ISBN: 9781107694408.
- Tuskan G.A., Gunter L.E., Yang Z.K., Yin T., Sewell M.M., DiFazio S.P. (2004): Characterization of microsatellites revealed by genomic sequencing of *Populus trichocarpa*. *Can. J. Forest Res.* 34 (1): 85–93.
- Vacková K., Pospíšková M., Benetka V. (1998): Rozlišení některých druhů rodu *Populus* L. na základě izoenzymové analýzy. *Acta Pruhoniciana* 66: 43–51.
- Válek Z. (1977): *Lesní dřeviny jako vodohospodářský a protierozní činitel*. SZN, Praha, 203 s.
- Van der Schoot J., Pospíšková M., Vosman B., Smulders M. J. M. (2000): Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theo. Appl. Genet.* 101: 317–322.
- Vanden Broeck A. (2003): EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for European black poplar (*Populus nigra*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 6 s.
- Vanden Broeck A., Cottrell J., Quataert P., Breyne P., Storme V., Boerjan W., Van Slycken J. (2006): Paternity analysis of *Populus nigra* L. offspring in a Belgian plantation of native and exotic poplars. *Ann. For. Sci.* 63 (7): 783–790.
- Vanden Broeck A., Cox K., Van Braeckel A., Neyrinck S., De Regge N., Van Looy K. (2021): Reintroduced native *Populus nigra* in restored floodplain reduces spread of exotic poplar species. *Front. Plant Sci.* 11: 580653.
- Vanden Broeck A., Storme V., Cottrell J.E., Boerjan W., Van Bockstaele E., Quataert P., Van Clycken J. (2004): Gene flow between cultivated poplars and native black poplar (*Populus nigra* L.): a case study along the river Meuse on the Dutch-Belgian border. *Forest Ecol. Manag.* 197: 307–310.
- Vyhlaška č. 298/2018 Sb., o zpracování oblastních plánů rozvoje lesa a o vymezení hospodářských souborů.

Ziegenhagen B., Gneuss S., Rathmacher G., Leyer I., Bialozyt R., Heinze B., Liepelt S. (2008): A fast and simple genetic survey reveals the spread of poplar hybrids at a natural Elbe river site. *Conserv. Genet.* 9 (2): 373–379.

7 Seznam publikací, které předcházely metodice

Benetka V., Mottl J., Vacková K., Pospíšková M. (1999): Estimation of the introgression level in *Populus nigra* L. populations by means of isozyme gene markers. *Silvae Genet.* 48 (5): 218–223.

Benetka V., Novotná K., Štochlová P. (2012): Wild populations as a source of germplasm for black poplar (*Populus nigra* L.) breeding programmes. *Tree Genet. Genomes* 8 (5): 1073–1084.

Benetka V., Vacková K., Bartáková I., Pospíšková M., Rasl M. (2002): Introgression in black poplar (*Populus nigra* L. ssp. *nigra*) and its transmission. *J. For. Sci.* 48: 115–120.

Meyer M., Štochlová P., Novotná K., Kováč B., Morgenstern K., Reiche B., Krabel D., Schildbach M., Tröber U. (2023): Populationsgenetischer Status von Vorkommen und Erhaltungsmaßnahme für die Europäische Schwarz-Pappel. *FowiTa 2023, Dresden, 11.-13. 9. 2023.*

Novotná K., Štochlová P., Havrdová L., Černý K. (2017): Současná ohrožení vybraných klíčových dřevin lužních lesů a břehových porostů a možnosti jejich eliminace. *Ochrana přírody* 6/2017: 24–27.

Pospíšková M., Bartáková I. (2004): Genetic diversity of a black poplar population in the Morava river basin assessed by microsatellite analysis. *Forest Genetics* 11 (3-4): 257–262.

Pospíšková M., Šálková I. (2006): Population structure and parentage analysis of black poplar along the Morava River. *Can. J. For. Res.* 36: 1067–1076.

Šedivá J., Dostálek J., Frantík T., Podrábská K., Pospíšková M., Drahošová H. (2021): Genetická variabilita a struktura populací významných původních dřevin – výzkumná zpráva za rok 2020. VÚKOZ, v.v.i., Průhonice. 34 s.

Šedivá J., Dostálek J., Frantík T., Podrábská K., Pospíšková M., Rašmanová P. (2020): Genetická variabilita a struktura populací významných původních dřevin – výzkumná zpráva za rok 2021. VÚKOZ, v.v.i., Průhonice. 26 s.

Šedivá J., Dostálek J., Frantík T., Pospíšková M. (2019): Genetická variabilita a struktura populací významných původních dřevin – výzkumná zpráva za rok 2019. VÚKOZ, v.v.i., Průhonice. 17 s.

Šedivá J., Podrábská K., Drahošová H., Pekařová M. (2022): Genetická variabilita a struktura populací významných původních dřevin – výzkumná zpráva za rok 2022. VÚKOZ, v.v.i., Průhonice. 21 s.

Šedivá J., Podrábská K., Drahošová H., Pekařová M. (2023): Testování genetické diverzity a původnosti populací dřevin v chráněných územích pro účely jejich ochrany pomocí molekulárních markerů – výzkumná zpráva za rok 2023. VÚKOZ, v.v.i., Průhonice. 27 s.

Štochlová P., Novotná K., Černý K. (2021): Možnosti reintrodukce a přirozené obnovy topolu černého v břehových porostech. *Vodní hospodářství* 2/2021: 18–23.

Štochlová P., Novotná K., Podrábská K., Drahošová H., Zýka V., Zahradník D., Šetinová D., Strnadová V., Štochl M., Černý K. (2024): Expansion of black poplar genetic resources to ensure sustainability and stability of carr and riparian forests. 26th IUFRO World Congress – Forest and Society Towards 2050, Stockholm, 24.-29. 6. 2024.

8 Přílohy

Příloha č. 1 Vybrané charakteristiky pro odlišení topolu černého od topolu kanadského	30
Příloha č. 2 Laboratorní postup v bodech.....	36
Příloha č. 3 Přehled použitých klonů topolů k analýzám DNA.....	39
Příloha č. 4 Frekvence alel u klonů topolu černého, kanadského, bavlníkového a BC1 kříženců pro lokusy WPMS17, WPMS15, PMGC2163, WPMS01, PMGC14, PMGC456 a PTR6.....	40
Příloha č. 5 Velikosti alel u testovaných 18 klonů topolů kanadských pomocí fragmentační analýzy 8 vybraných markerů s modře vyznačenými hodnotami diagnostických alel topolu bavlníkového	44

Topol černý

Habitus



na bázi kmene bývají
u starších stromů boule,
často kmenové výstřelky

Borka



Tvar:

brázdy často propletené

Barva: načernalá

Mladé výhony



Tvar průřezu:

kulatý, hladký

Topol kanadský

Habitus



častěji křivý kmen, bez
boulí, bez výstřelků,
často rozdvojený v horní
třetině kmenu

Borka



Tvar:
svislé rovné rýhy

Barva: skořicová, nahnědlá

Mladé výhony



Tvar průřezu:
hranatý, lišty

Topol černý

List
(na loňském
výhonu
uprostřed)



Tvar:
kosníkovitý

Velikost:
menší

Ozubení okraje čepele:
drobné

**Přítomnost žlázek
v místě spojení řapíku
a báze listu:**

ne

Topol kanadský

List
(na loňském
výhonu
uprostřed)



Tvar:
srdčitý, trojboký

Velikost:
často velké

Ozubení okraje čepele:
pilovitý, vroubkovaný,
zubatý

**Přítomnost žlázek
v místě spojení řapíku
a báze listu:**

u některých klonů

Topol černý

Květ, plod



Vzdálenost mezi jednotlivými bobulkami, délka plodenství:

malá

Přítomnost parazita



Jmelí:

ne



Mšice:

může být

Výskyt

vzácný

Topol kanadský

Květ, plod



Vzdálenost mezi jednotlivými bobulkami, délka plodenství:

větší

Přítomnost parazita



Jmelí:
může být



Mšice:
výjimečně

Výskyt

častý

Odběr vzorků:

- mladé, nekontaminované listy odebrat v jarním období v terénu do čajových sáčků a ihned uložit do dobře těsnící plastové krabičky (Lock & Lock) se silikagelem (Silica Gel Orange, 2 – 5 mm, perlform; Roth)
- v laboratoři každý čajový sáček se vzorkem, jeden po druhém, zasypat v krabičce menší vrstvou čerstvého silikagelu
- po několika dnech silikagel vyměnit a vyzkoušet křehkost listu, dobře vysušené (dostatečně křehké) listy jsou připraveny k izolaci DNA

Homogenizace materiálu:

- 20 mg vysušeného rostlinného materiálu navážit v 2 ml zkumavce s kulatým dnem a bezpečnostním zámkem, přidat 3 skleněné kuličky o průměru 3 mm
- zkumavky rovnoměrně umístit do homogenizačních krabiček oscilačního mlýnu (Retsch MM 400, Retsch), krabičky aretovat, uzavřít bezpečnostní víko oscilátoru, frekvenci nastavit na 30 kmitů za sekundu a spustit drcení na 6 min
- krabičky vyjmout a zkontrolovat obsah mikrozksamavek
- pokud je z rostlinných pletiv jemný prášek, ukončit homogenizaci, pokud ne, opakovat drcení za stejných podmínek jako výše. Pokud se vytvoří shluk pletiv, je potřeba narušit jeho strukturu např. skleněnou sterilní tyčinkou a homogenizaci za stejných podmínek opakovat.

Izolace DNA extrakčním kitem Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Stratec; tučně označený text = modifikace oproti návodu od výrobce):

- k homogenizovanému materiálu přidat 400 µl lyzačního pufru P a 20 µl proteinázy S, směs krátce zvortexovat a inkubovat 30 min při 65 °C, **během inkubace obsah zkumavek 2–3x promíchat jejich převrácením**
- **po inkubaci zkumavky stočit na 3 min při 14 000 rpm**
- lyzát bez sedimentu přelít/přepipetovat na Prefiltr kolonku a centrifugovat 1 min při 11 000 rpm, poté kolonku odstranit
- k filtrátu přidat 200 µl vazebného pufru A, směs důkladně zvortexovat, převést na kolonku Spin Filter a inkubovat 1 min při pokojové teplotě, centrifugovat 2 min při 11 000 rpm, odstranit filtrát
- na kolonku napipetovat 550 µl promývacího pufru I., centrifugovat na 1 min při 11 000 rpm a poté filtrát odstranit
- na kolonku napipetovat 550 µl promývacího pufru II., centrifugovat 1 min při 11 000 rpm a odstranit filtrát
- předešlý promývací krok s pufrům II. zopakovat, filtrát odstranit
- k vysušení membrány kolonky Spin Filter provést centrifugaci na 4 min při 11 000 rpm
- kolonku převést do nové 1,5 ml sběrné zkumavky, napipetovat **50 µl elučního pufru, inkubovat 10 min** a následně centrifugovat 1 min při 11 000 rpm
- **eluční krok znovu opakovat**, poté odstranit Spin Filter kolonku, sběrnou zkumavku umístit do lednice do další manipulace, dlouhodobě uchovávat DNA v mrazáku při teplotě -20 °C nebo -80 °C

Stanovení koncentrace, čistoty a integrity DNA, ředění DNA:

- nanést 2 μl slepého vzorku a poté 2 μl eluátu každého vzorku na detekční okénko spektrofotometru (Nanodrop 2000, ThermoScientific) a změřit koncentraci a čistotu DNA
- integritu vyzolované DNA ověřit pomocí elektroforézy na 0,8% agarózovém gelu (malý gel: 0,8 g agarózy rozpuštěno ve 100 ml 1 \times TBE, přidáno 10 μl GelRed®(Biotinum); velký gel: 2,4 g agarózy rozpuštěno ve 300 ml 1 \times TBE, přidáno 30 μl GelRed®(Biotinum))
- rozpuštěnou agarózu s přidaným interkalačním barvivem nalít do připravené elektroforetické vaničky s hřebeny a ponechat 30 min tuhnout
- gel umístit do elektroforetické vany s 1 \times TBE pufrem
- 5 μl nanášecího pufru napipetovat na parafilm a smíchat s 5 μl DNA, směs nanést do jamek agarózového gelu, nakonec napipetovat 2 μl velikostního standardu MassRuller™ DNA Ladder Mix (ready to use, Fermentas)
- vzorky elektroforeticky separovat 30 min při 150 V
- DNA vizualizovat pomocí transiluminátoru (TFX – 35M, Life Technologies) a fotodokumentačního zařízení (CCDMiniBis Camera, program GelCapture v7 ;DNR Bio Imagining System)
- vzorky naředit v ultračisté vodě na koncentraci 5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$

Polymerázová řetězová reakce (PCR):

- všechny komponenty PCR rozmrazit (kromě polymerázy), promíchat a stočit
- podle tabulek (Tab. 3, Tab. 4) v mikrozkuhavce na ledu namíchat PCR zásobní roztok o objemu 8,4 μl na jednu reakci (polymerázu vyjmout z mrazáku těsně před použitím, lehce promíchat, stočit a pipetovat do směsi poslední)
- do PCR mikrozkuhacek či destiček napipetovat 1,6 μl DNA a 8,4 μl PCR zásobního roztoku
- směs s DNA lehce promíchat, stočit a vložit do cykleru (Eppendorf Mastercycler EP Gradient S, Eppendorf; Biometra TAdvanced 96 G, Analytic Jena), vybrat vhodný program podle výběru primerů a multiplexu (Tab. 5, Tab. 6)

Kontrola PCR produktu:

- úspěšnost amplifikace ověřit pomocí elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu (malý gel: 1,5 g agarózy rozpuštěno ve 100 ml 1 \times TBE, přidáno 10 μl GelRed®(Biotinum); velký gel: 4,5 g agarózy rozpuštěno ve 300 ml 1 \times TBE, přidáno 30 μl GelRed®(Biotinum))
- rozpuštěnou agarózu s přidaným interkalačním barvivem nalít do připravené elektroforetické vaničky s hřebeny a ponechat 30 min tuhnout.
- gel umístit do elektroforetické vany s 1 \times TBE pufrem
- 5 μl nanášecího pufru nanést na parafilm a smíchat s 5 μl DNA, směs nanést do jamek agarózového gelu, nakonec napipetovat 2 μl velikostního standardu MassRuller™ DNA Ladder Mix (ready to use, Fermentas)
- vzorky elektroforeticky separovat 1 hodinu při 150 V, DNA vizualizovat pomocí transiluminátoru (TFX – 35M, Life Technologies) a fotodokumentačního zařízení (CCDMiniBis Camera, program GelCapture v7; DNR Bio Imagining System)

Fragmentační analýza na sekvenátoru:

- rozmrazit vhodnou alikvótu HiDi™ formamidu, z lednice vyjmout velikostní standard (GeneScan™ 500 (-250) LIZ™, Applied Biosystems), chemikálie lehce zvortexovat a stočit
- v digestoři na ledu smíchat zásobní mix podle počtu vzorků (12 µl formamidu + 0,25 µl velikostního standardu na jeden vzorek)
- mix rozpipetovat do zkumavek či destiček a přidat k němu 1 µl PCR produktu, směs jemně zvortexovat a stočit
- zkumavky/destičky se směsí vložit do termocykleru na 2 min při 95 °C (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems), ihned poté několik min chladit na ledu
- vzorky následně vložit do sekvenátoru (SeqStudio Genetic Analyzer™, Applied Biosystems)

Příloha č. 3 Přehled použitých klonů topolů k analýzám DNA.

topol černý				topol kanadský				topol bavlníkový			
jméno	synonymum	původ	jméno	synonymum	původ	jméno	synonymum	původ			
Italica Bud.		Itálie	'Brabantica'	NL-2069	Nizozemsko	'Purple Tower'	-	Polsko			
'Verecken'	NL-1844, NL-2111, N432	Nizozemsko	'Marilandica'	-	záp. Evropa	'Fuego'	-	USA			
'Achnilles'	97/157, 97-18-157	ČR	'1-214'	J-214-Casale	Itálie	D371	-	Francie			
'Rosice'	97/161, 97-18-161	ČR	'Harff'	-	Německo	D062	-	Francie			
'Héllos'	02/477, 02-24-477	ČR	'Blanc du Portou'	AFO-089, PE57-019, PE78-020	Francie	D878	-	Francie			
'Héraklès'	02/455, 02-24-455	ČR	'Robusta'	-	Francie	D131	-	Francie			
'Herkules'	KI.202, 202	ČR	'Ogy'	Unal5, S.4-38 x Ogy-17, PE71-066	Belgie	D916	-	Francie			
'Smilkov'	KI.206, 206	ČR	'Pannonia'	H-490-3	Maďarsko	D226	-	Francie			
KI.301	880092	ČR	NL-B-264	-	Nizozemsko	D248	-	Francie			
880112	-	ČR	I-45-368/67	-	Itálie	D863	-	Francie			
P-30	880030	ČR	NL-B-132b	-	Nizozemsko	D717	-	Francie			
P-32		ČR	'Frachslanden'	-	Německo	'Oglio'	PE 19/66, PE 66019, Mississi-ppi H402	Maďarsko			
P-059	-	ČR	'Grandis'	-	Francie	D156	-	Francie			
P-577	880032	ČR	'Heidemij'	NL-2087	Sev. Amerika	D257	-	Francie			
Ivachnová	-	Slovensko	'Selys'	-	Belgie?	D127	-	Francie			
GEN A	-	Belgie	P145 (145 348/67)	-	Itálie	D198	-	Francie			
GEN D	-	Belgie	'Serotina'	-	Francie	D300	-	Francie			
GEN E	-	Belgie	'Virginiana de Frignicourt'	-	Francie	D121	-	Francie			
GEN I	-	Belgie									
GEN M	-	Belgie									
GEN O	-	Belgie									
GEN T	-	Belgie									
GEN U	-	Belgie									

Příloha č. 4 Frekvence alel u klonů topolu černého, kanadského, bavlíkového a BC1 kříženců pro lokusy WPMS17, WPMS15, PMGC2163, WPMS01, PMGC14, PMGC456 a PTR6. Barevné odlišení v tabulkách se váže ke specifickým alelám rodičovských druhů.

lokus WPMS17					
alely	celkem	topol černý	topol kanadský	topol bavlíkový	BC1: topol kanadský × topol černý
119	0,10	0,04			0,25
137	0,13	0,09	0,19	0,19	0,10
140	0,05	0,20	0,03		
143	0,33		0,50	0,78	0,24
149	0,38	0,67	0,28	0,03	0,41
počet alel	5	4	4	3	4
počet jedinců	93	23	18	18	34

lokus WPMS15					
alely	celkem	topol černý	topol kanadský	topol bavlíkový	BC1: topol kanadský × topol černý
196	0,39		0,50	1,0	0,28
205	0,02	0,07			
211	0,07	0,28			
214	0,52	0,63	0,50		0,72
217	0,01	0,02			
počet alel	5	4	2	1	2
počet jedinců	93	23	18	18	34

lokus PTR6					
alely	celkem	topol černý	topol kanadský	topol bavlíkový	BC1: topol kanadský × topol černý
189	0,10	0,07			0,22
191	0,52	0,93	0,50		0,51
197	0,39		0,50	1,00	0,26
počet alel	3	2	2	1	3
počet jedinců	93	23	18	18	34

lokus PMGC2163					
alely	celkem	topol černý	topol kanadský	topol bavlníkový	BC1: topol kanadský × topol černý
189	0,40		0,50	1,00	0,29
217	0,01	0,02			
219	0,04	0,11	0,06		
223	0,09	0,07	0,19		0,09
225	0,02	0,07			
227	0,01	0,04			
229	0,10	0,02			0,26
237	0,02	0,07			
239	0,12	0,33	0,14		0,04
241	0,01	0,02			
243	0,03	0,09	0,03		
245	0,01	0,02			
249	0,17	0,15	0,08		0,32
počet alel	13	12	6	1	5
počet jedinců	93	23	18	18	34

lokus PMGC456					
alely	celkem	topol černý	topol kanadský	topol bavlníkový	BC1: topol kanadský × topol černý
76	0,01	0,02			
78	0,59	0,91	0,50		0,72
80	0,02	0,07			
86	0,39		0,50	1,00	0,28
počet alel	4	3	2	1	2
počet jedinců	93	23	18	18	34

lokus WPMS01					
alely	celkem	topol černý	topol kanadský	topol bavlňkový	BC1: topol kanadský × topol černý
118	0,12		0,08	0,31	0,12
120	0,26		0,42	0,69	0,12
134	0,01	0,04			
138	0,02	0,07	0,03		
140	0,03	0,11			
142	0,01	0,04			
144	0,05	0,13	0,08		0,01
148	0,05	0,09	0,08		0,04
150	0,01	0,04			
152	0,01	0,02			
154	0,01	0,02			
156	0,12	0,09	0,14		0,21
158	0,15	0,09	0,14		0,26
160	0,03	0,11	0,03		
162	0,01	0,02			
168	0,10	0,04			0,24
170	0,02	0,09			
počet alel	17	15	8	2	7
počet jedinců	93	23	18	18	34

lokus PMGC14					
alely	celkem	topol černý	topol kanadský	topol bavlníkový	BC1: topol kanadský × topol černý
189	0,15		0,28	0,36	0,06
192	0,23		0,22	0,64	0,16
198	0,02	0,09			
201	0,16	0,22	0,06		0,25
204	0,10	0,22	0,14		0,06
207	0,05	0,20	0,03		
210	0,19	0,17	0,06		0,37
213	0,01	0,02			
219	0,01	0,02			
222	0,10	0,07	0,22		0,10
počet alel	10	8	7	2	6
počet jedinců	93	23	18	18	34

Příloha č. 5 Velikosti alel (bp) u testovaných 18 klonů topolů kanadských pomocí fragmentační analýzy 8 vybraných markerů s modře vyznačenými hodnotami diagnostických alel topolu bavlíkového.

klony	WPMS17	WPMS15	PMGC 2163	WPMS01	PMGC14	WIN3	PMGC 456	PTR6
'Brabantica'	140 143	196 214	189 239	120 160	192 204	166 254	78 86	191 197
'Marilandica'	143 149	196 214	189 239	120 144	189 204	166 254	78 86	191 197
'I-214'	143 149	196 214	189 239	120 148	189 207	166 254	78 86	191 197
'Harff'	137 143	196 214	189 223	120 158	192 210	162 166 254	78 86	191 197
'Blanc du Poitou'	137 143	196 214	189 243	120 138	192 204	162 254	78 86	191 197
'Robusta'	137 143	196 214	189 223	120 156	189 222	166 254	78 86	191 197
'Ogy'	143 149	196 214	189 239	120 148	192 204	166 254	78 86	191 197
'Pannonia'	143 149	196 214	189 249	118 156	192 222	162 166 254	78 86	191 197
NL-B-264	143 149	196 214	189 249	120 158	189 222	166 254	78 86	191 197
I-45-368/67	137 143	196 214	189 223	118 158	189 222	162 166 254	78 86	191 197
NL-B-132b	143 149	196 214	189 249	120 158	189 222	166 254	78 86	191 197
'Flachslan- den'	137 143	196 214	189 223	120 156	192 210	162 166 254	78 86	191 197
'Grandis'	143 149	196 214	189 239	120 148	189 204	166 254	78 86	191 197
'Heidemij'	137 143	196 214	189 223	120 156	189 222	162 166 254	78 86	191 197
'Selys'	143 149	196 214	189 219	120 144	192 201	162 166 254	78 86	191 197
P145 (145 348/67)	137 143	196 214	189 223	118 158	189 222	162 166 254	78 86	191 197
'Serotina'	143 149	196 214	189 219	120 144	192 201	162 166 254	78 86	191 197
'Virginiana de Frignicourt'	143 149	196 214	189 223	120 156	189 222	162 166 254	78 86	191 197

