

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA LESNICKÁ A DŘEVAŘSKÁ
KATEDRA DENDROLOGIE A ŠLECHTĚNÍ LESNÍCH
DŘEVIN



Studium inbrední deprese v souboru příbuzných jedinců
u topolu černého

Disertační práce

Autor: Ing. Kateřina Novotná
Školitel: Prof. Ing. Jaroslav Koblíha, CSc.
Konzultant: Ing. Vojtěch Benetka, CSc.

Praha 2013

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Studium inbrední deprese v souboru příbuzných jedinců u topolu černého“ vypracovala samostatně s využitím citované literatury a pod odborným vedením školitele.

V Průhonicích 22.5.2013

.....
Kateřina Novotná

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat všem, kteří mi pomáhali při zpracování disertační práce. Za pomoc a cenné rady poskytnuté při sběru a vyhodnocování dat děkuji školiteli prof. Ing. Jaroslavu Koblihovi CSc. a konzultantovi Ing. Vojtěchu Benetkovi, CSc.. Poděkování patří i kolegyním Ing. Petře Štochlové, Ph.D. za pomoc při polních a laboratorních pracích a Ing. Miroslavě Křížové za konzultace a pomoc při analýzách DNA. Na závěr bych také ráda poděkovala celé své rodině za podporu a toleranci po celou dobu mého doktorského studia.

ABSTRAKT

Autochtonní evropská dřevina *Populus nigra* L. je typickým druhem lužních ekosystémů. Jednou z příčin ohrožení tohoto druhu je zmenšování jeho populací způsobené lidskou činností, které úzce souvisí s vyšší pravděpodobností příbuzenského křížení a možným následným snížením životaschopnosti.

Cílem této práce bylo zjistit, v jaké míře dochází ke spontánnímu inbrídingu u malých populací *P. nigra* a určit, v jaké míře může docházet v získaných potomstvech k projevu inbrední deprese. Za tímto účelem byly opakovaně (v letech 2009, 2010 a 2011) získávány kontrolovaným opylením příbuzných jedinců *P. nigra* generace I₁, případně generace I₂. Jako kontrola posloužila potomstva vzniklá z volného sprášení stejných matek. U získaných semen byla zjišťována energie klíčení a klíčivost. Ze získaných rostlin byl založen polní pokus metodou znárodněných bloků ve čtyřech opakováních. U jednotlivých semenáčů byl hodnocen zdravotní stav (odolnost potomstev vůči rzi *Melampsora larici-populina* Kleb.) a růstové charakteristiky (tloušťka kmínku a výška rostliny). Byla hodnocena mortalita jedinců.

Na základě výsledků genetických analýz s použitím osmi mikrosatelitních markerů lze konstatovat, že se spontánní inbríding vyskytoval jak v generaci I₁ (31–60 %), tak v generaci I₂ (0–8 %). U potomstev odvozených z příbuzenského křížení byl zaznamenán průkazně vyšší stupeň homozygotnosti oproti potomstvům odvozených z nepříbuzenského křížení. Nejnižší hodnoty energie klíčení a klíčivosti měla potomstva generací I₂ a samosprášení a nejvyšší hodnoty měla potomstva z cizosprášení, naopak potomstva z cizosprášení generací I₀ měla nižší hodnoty v porovnání s generací I₁. Intenzita napadení semenáčů rzi byla závislá na jejich původu (typu křížení). Polní hodnocení prokázala inbrední depresi, tj. vyšší mortalitu i nižší vitalitu semenáčů původem z inbrídingu oproti volnému sprášení. Potomstva odvozená z cizosprášení generace I₁ měla průměrné hodnoty růstových charakteristik průkazně vyšší oproti generaci I₂ a naopak neprůkazně nižší oproti potomstvům z opakovaného cizosprášení. Zajímavý byl nález jednodomých jedinců *P. nigra* schopných reprodukce.

Výsledky této studie přináší nové poznatky pro konzervační genetiku ohrožených populací cizosprašného druhu *P. nigra*.

Klíčová slova: volné sprášení, mikrosatelity, fitness, spontánní inbríding, inbrední deprese, topol černý (*Populus nigra* L.)

ABSTRACT

P. nigra L. as an autochthonous European woody species is a typical pioneer tree species of the riparian forest ecosystem. One of the main factors of black poplar threatening is the fragmentation of populations resulting from human activity which is connected with higher possibility to inbreeding would increase inbreeding and subsequently reduce the mean fitness of individual genotypes.

The aim of this study was both to find out the rate of spontaneous inbreeding in a small population of *P. nigra* and to assess inbreeding depression rate in obtained progenies. For this purpose, controlled pollination was carried out to obtain I₁ generation and I₂ generation in three consecutive years (2009, 2010 and 2011). Progeny derived from open pollination respective mother trees were used as a control. There were determined germination energy and germination capacity of obtained seeds. In a randomized field trial with four repetitions the offspring were evaluated health state (resistance to *Melampsora larici-populina* Kleb.) and growth traits (trunk diameter and plant height). Mortality rate was also observed.

Based on the genetic analysis using eight microsatellite loci, it was concluded that the spontaneous inbreeding occur in I₁ generation (31–60 %) as well as in I₂ generation (0–8 %). Significantly higher homozygosity rate was detected in offspring derived from inbreeding in comparison with offspring derived from crossing between unrelatives. Seeds derived from inbreeding and seeds derived from selfing had the lowest germination energy and germination capability, on the contrary seeds derived from open pollination had lower values in comparison with I₁ generation. Seedlings susceptibility to *M. larici-populina* was dependent on their origin (crossing type). Inbreeding depression was proved in field evaluations, i.e. higher mortality and lower vitality were reported on seedlings derived from inbreeding compared to seedlings derived from open pollinations. Offsprings derived from open pollination I₁ generation had significantly higher mean value of growth traits compared to I₂ generation, on the contrary, they were significantly lower compared to offsprings derived from open pollinations.

Interestingly, monoecious *P. nigra* individuals that were capable of reproduction were found. Results of this paper bring us new informations for conservation genetic in endangered allogamous species *P. nigra*.

Keywords: open pollination, microsatellites, fitness, spontaneous inbreeding, inbreeding depression, black poplar (*Populus nigra* L.)

OBSAH:

1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	10
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	11
3.1 TOPOL ČERNÝ.....	11
3.1.1 <i>Morfologie</i>	11
3.1.2 <i>Variabilita</i>	13
3.1.3 <i>Ekologické nároky</i>	13
3.1.4 <i>Rozšíření</i>	14
3.1.4.1 Celkové rozšíření	14
3.1.4.2 Rozšíření v ČR	14
3.1.5 <i>Pěstování</i>	15
3.1.6 <i>Choroby a škůdci</i>	15
3.1.7 <i>Význam</i>	15
3.1.8 <i>Ohrožení druhu</i>	17
3.1.9 <i>Ochrana druhu</i>	18
3.1.9.1 Konzervace genových zdrojů	18
3.1.9.2 Velikost populace	18
3.1.9.3 Záchrana genofondu v praxi	20
3.2 DOPADY INBRÍDINGU NA POPULACI	23
3.2.1 <i>Inbríding</i>	23
3.2.2 <i>Inbrední deprese</i>	25
3.2.3 <i>Outbrední deprese</i>	26
3.2.4 <i>Heteroze</i>	26
3.2.5 <i>Studie inbrídingu v populaci</i>	27
4 MATERIÁL.....	30
5 METODIKA.....	31
5.1 VÝBĚR RODIČOVSKÝCH KOMPONENT KE KŘÍŽENÍ	31
5.2 FENOLOGIE KVETENÍ	31
5.3 OPYLOVÁNÍ A ZÍSKÁNÍ SEMEN	32
5.4 VOLNÉ OPYLENÍ.....	32
5.5 ZKOUŠKA KLÍČIVOSTI (STANOVENÍ ENERGIE KLÍČENÍ A KLÍČIVOSTI).....	33
5.6 OCHRANA SEMENÁČŮ.....	34
5.7 POLNÍ HODNOCENÍ SEMENÁČŮ	34
5.8 DNA ANALÝZY	35
5.8.1 <i>Příprava materiálu na analýzy DNA</i>	35
5.8.2 <i>Izolace DNA</i>	35
5.8.3 <i>Změření koncentrace DNA</i>	35
5.8.4 <i>Genetické analýzy DNA</i>	36
5.9 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	36
5.9.1 <i>Kvetení</i>	36
5.9.2 <i>Zkouška klíčivosti</i>	37
5.9.3 <i>Polní hodnocení</i>	37
5.9.4 <i>Genetické analýzy</i>	38
6 VÝSLEDKY	40

6.1 POMĚR POHLAVÍ.....	40
6.2 INTENZITA A FENOLOGIE KVETENÍ	42
6.3 ZÍSKÁVÁNÍ SEMEN A SEMENÁČKŮ	44
6.4 ZKOUŠKA KLÍČIVOSTI.....	44
6.4.1 První porost	44
6.4.2 Druhý porost.....	51
6.5 POLNÍ HODNOCENÍ.....	53
6.5.1 <i>Mortalita</i>	53
6.5.1.1 První porost	53
6.5.1.2 Druhý porost.....	56
6.5.2 <i>Zdravotní stav a růstové charakteristiky</i>	58
6.5.2.1 První porost	58
6.5.2.2 Druhý porost.....	69
6.6 GENETICKÉ ANALÝZY.....	73
6.6.1 <i>Rodičovská analýza</i>	73
6.6.1.1 První porost	73
6.6.1.2 Druhý porost.....	75
6.6.2 <i>Genetická diverzita populací</i>	77
6.6.2.1 První porost	77
6.6.2.2 Druhý porost.....	81
6.6.3 <i>F-statistika</i>	84
6.6.3.1 První porost	84
6.6.3.2 Druhý porost.....	85
7 DISKUZE.....	86
7.1 KVETENÍ.....	86
7.1.1 <i>Poměr pohlaví</i>	86
7.1.2 <i>Intenzita a fenologie kvetení</i>	86
7.1.3 <i>Výskyt jednodomých jedinců</i>	87
7.2 ZKOUŠKA KLÍČIVOSTI.....	88
7.3 POLNÍ HODNOCENÍ.....	89
7.3.1 <i>Mortalita</i>	89
7.3.2 <i>Odolnost vůči M. larici-populina</i>	90
7.3.3 <i>Růstové charakteristiky</i>	91
7.4 GENETICKÉ ANALÝZY.....	92
7.4.1 <i>Spontánní inbríding</i>	92
7.4.2 <i>Analýza genetické diverzity</i>	93
8 ZÁVĚR.....	95
9 LITERATURA.....	97
10 SEZNAM GRAFŮ	114
11 SEZNAM TABULEK.....	114
12 PŘÍLOHY.....	117

1 ÚVOD

Druh *Populus nigra* patří mezi evropské autochtonní dřeviny. Je přirozenou součástí lužních lesů, břehových a doprovodných porostů vodních toků a rozptýlené vysoké zeleně v krajině. Původně byl rozšířený na celém území našeho státu, od nížin do podhorských oblastí, nyní se v ČR vyskytuje jen v ojedinělých exemplářích, výjimečně ve skupinách (SLOVÁČEK 2004).

Jedním z hlavních důvodů ohrožení rozšíření populace topolu černého je zanikání a stále větší fragmentace jeho přirozených stanovišť způsobená regulací vodních toků, rozsáhlého odvodnění krajiny a ústupu lužních lesů, zemědělskému hospodaření a urbanizaci. Další příčinou ohrožení druhu je výlučné zavádění rychle rostoucích mezidruhových hybridů topolu na úkor topolu černého a jeho snadná křížitelnost s introdukovanými druhy vedoucí ke genetické erozi původního druhu (LEFÈVRE a kol. 1998).

Stále vyšší fragmentace populací tohoto dvoudomého, cizosprašného a větrosnubného druhu vede k ohrožení jeho genofondu (HEINZE & LEFÈVRE 1999). Zachování druhu *P. nigra* je důležité pro biodiverzitu břehových porostů. Je také nenahraditelným genetickým zdrojem pro šlechtění, je jedním z rodičů u okolo 60 % klonů (FAO 2000) vzniklých mezidruhovým křížením.

Topol černý je považován za modelový organismus při studiu zachování genových zdrojů lesních ekosystémů (LEFÈVRE a kol. 2001a). Mezi faktory, které ovlivňují genetickou variabilitu, patří přírodní selekce, příbuzenské křížení, mutace, migrace a genetický posun a jejich kombinace. Jedním z hlavních faktorů, které vyústí v pokles fitness nebo jsou příčinou vyhynutí (a to druhu, nebo populace) patří inbrední deprese (HEDRICK 2001).

K jevu zvanému inbríding dochází v důsledku příbuzenského opylení (v krajním případě autogamii) u cizosprašných druhů rostlin. Tento jev vede k homozygotizaci (FALCONER 1989, LYNCH & WALSH 1998), což vede v mnoha případech k vyštěpení genů letálních nebo jinak škodlivých (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 1999). Dochází také k narušení balance polygenního systému, a tím pádem dochází ke snížení životnosti a výkonnosti. Z těchto důvodů vitalita potomstev rostlin cizosprašného druhu po samoopylení klesá. Tento pokles vitality se nazývá inbrední deprese (BEDNÁŘ 1997). Pravděpodobnost částečné nebo úplné autogamie se zvyšuje se snižováním velikosti populace.

Studium inbrídingu má význam pro práce spojené s konzervací ohrožených druhů cizosprašných rostlin, především při výběru rodičovských párů pro generativní rozmnožování těchto druhů.

První práce spojené s problematikou zachování genofondu topolu černého v ČR začaly v 50. letech minulého století, kdy tuto práci vedl Špalek. Později v těchto pracích pokračovali hlavně MOTTL a kol. (např. 1989, 1991, 1994, 1996, 1998, 2003) a BENETKA a kol. (např. 1998, 1999, 2002a, 2002b, 2005, 2007, 2008, atd.) ve VÚKOZ, v.v.i. v Průhonicích a ČÍŽEK a ČÍŽKOVÁ ve VÚLHM, v.v.i. v Uherském Hradišti.

Mezinárodní spolupráce na záchranu genofondu topolu černého probíhá v rámci projektu *Populus nigra* Network of the European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN). Započal v roce 1994 a klade důraz na nutnost jednotné strategie zahrnující ochranu genových zdrojů. Je stanovena Mezinárodní topolová komise (International Poplar Commission).

Tato práce navazuje na studium potomstva generace I₁ izolovaných populací *Populus nigra* (BENETKA a kol. 2008). Cílem tohoto výzkumu je zjistit, v jaké míře bude v další generaci docházet ke spontánnímu inbrídingu a jaký dopad bude mít takovýto způsob oplození na další generaci.

Získané poznatky budou využity k výběru vhodných rodičovských párů pro řízenou obnovu populací. Pomocí analýzy mikrosatelitů budeme schopni rozpoznat stupeň homozygotizace rodičovských rostlin. Vzniklé homozygotní linie budou vhodným materiálem pro heterózní křížení, F₁ hybridů. V neposlední řadě mohou výsledky této studie přispět k pochopení populační dynamiky ve stále se zmenšujících populacích ohroženého druhu *P. nigra*.

2 CÍL PRÁCE

Cílem výzkumu je studium inbrední deprese v souboru příbuzných jedinců u *Populus nigra* L. Výsledkem výzkumu bude vytvoření rostlinného materiálu generace I₂, tj. druhého stupně inbrídingu vzniklého cestou kontrolovaného křížení generace I₁ (potomstvo křížení sestra×bratr), a generace I₁ z kontrolovaného křížení, který bude použit k vyhodnocení a následnému porovnání životnosti mezi potomstvy po inbrídingu a z volného sprášení na základě mortality, vybraných růstových znaků (výška rostliny; průměr kmínku) a znaku resistance vůči rzi *Melampsora larici-populina* Kleb. Dalším cílem výzkumu je sledování podílu spontánního inbrídingu u volného opylení těchto generací.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Topol černý

Topol černý (*Populus nigra* L.) je taxonomicky zařazen do čeledi Salicaceae. Je jedním z 29 druhů rodu *Populus* (ECKENWALDER 1996), který se dále dělí do 5 sekcí (FAO 1980); ECKENWALDER (1977) rozlišuje sekci 6 a *P. nigra* náleží sekci *Aigeiros* (CERVERA a kol. 2005).

3.1.1 Morfologie

Populus nigra L. je mohutný strom dorůstající výšek 30–40 m (HEJNÝ & SLAVÍK 1990) a tlouštěk přes 2 m (MEZERA 1989). Má rozkladitou korunou, silné větve a hluboce koření. Může se dožít až 300 let (WEISGERBER 1999 in DICKMANN & KUZOVKINA 2008, WHITE 1993). Je to druh diploidní $2n = 38$ (ZSUFFA 1974).

Kmen je většinou svalcovitý, na bázi s výraznými kořenovými náběhy (HEJNÝ & SLAVÍK 1990). Popelavá kůra se záhy mění v šedohnědou, později černavou, síťově rozpukanou borku (MEZERA 1989). Běl je bělavá, jádro světle hnědé, u dřeně načervenalé (HEJNÝ & SLAVÍK 1990).

Letorosty jsou lysé, lesklé, světlé až žlutohnědé, oblé, starší větévky šedé až šedočerné (krátké větévky uzlovité a kroužkované) (HEJNÝ & SLAVÍK 1990). I bujně rostoucí prýty se vyznačují kruhovitým průřezem, na rozdíl od hybridních topolů sekce *Aigeiros*, které mají výrazné lišty (MOTTL & ÚRADNÍČEK 2003).

Pupeny jsou střídavé, 5–13 mm dlouhé, kuželovité, ostře zašpičatělé, žlutohnědé až hnědé, lesklé, postranní odstávající a zakřivené (MEZERA 1989), mají 4–6 šupin, s lepkavým balzámovým povlakem (HEJNÝ & SLAVÍK 1990), nevonné, koncový pupen letorostu dlouze kuželovitý, značně větší než pupeny postranní (MARTINOVSKÝ 1987), květní jsou větší (HEJNÝ & SLAVÍK 1990).

Listy opadavé, nečleněné, střídavé, kosníkovité až kosníkovitě vejčité; čepel 4 – 10 cm dlouhá, 3–8 cm široká, dlouze zašpičatělá, na bázi široce klínovitá, lysá, na okraji vroubkovaně pilovitá, nebrvitá, na rubu světleji zelená; řapík z boku smáčklý, 2–6 cm dlouhý na bázi bez žlázek (HEJNÝ & SLAVÍK 1990) (na rozdíl od hybridních topolů sekce *Aigeiros*, MOTTL & ÚRADNÍČEK 2003). Listy jsou typicky dimorfní, tj. juvenilní a adultní (ECKENWALDER 1980, MOTTL & ÚRADNÍČEK 2003, DICKMANN & KUZOVKINA 2008). Pozdější rašení ho chrání před pozdními mrazy (SIMANOV & ČÍŽEK 2004). Na rozdíl od balzámových topolů a kříženců odvozených od topolu černého bývají řapíky (příp. střední nerv) adultních listů topolu černého často napadány

mšicí *Pemphigus spyrothecae* Pass., která vytváří háčku několikanásobným stočením zduřelého řapíku (MOTTL & ÚRADNÍČEK 2003). Na tomto druhu neparazituje jmelí listnáčové (*Viscum album* L.).

Kvete v březnu až v dubnu před rašením listů (HEJNÝ & SLAVÍK 1990). Je to větrosnubná (SVOBODA 1957) dvoudomá dřevina (AINSWORTH 2000); byly však nalezeny i odchylky od dvoudomosti (VON MELCHIOR 1967, JOVANOVIĆ & TUCOVIĆ 1962) - v rámci celého rodu *Populus*, který zahrnuje převážně dvoudomé jedince s výjimkou *P. lasiocarpa* Oliv. ze sekce *Leucoides* (FAO 1980), existují i jiné záznamy o výskytu jedinců s různými odchylkami od dvoudomosti, a to nejen v rámci květenství ale i na jedincích z různých druhů a sekcí v rámci rodu (SANTAMOUR 1956, CAMPO 1963, LESTER 1963, STETTLER 1971, ROTTENBERG 2000, ALBA a kol. 2008, ROWLAND a kol. 2002, SLAVOV a kol. 2009 aj.). Jehnědovitá květenství jsou 4–10 cm dlouhá a převislá, listeny pod jednotlivými květy dřípené (MARTINOVSKÝ 1987). Samčí květenství jsou kratší než samičí, mají 20–30 tyčinek s karmínovitými prašníky; samičí květenství s téměř kulovitými, lysými semeníky ze 2 plodolistů, pestík má 4 zelenohnědé dvouzářezové blizny (HEJNÝ & SLAVÍK 1990). Většina dospělých stromů *P. nigra* může být opylena ve vzdálenosti menší než 1 km (POSPÍŠKOVÁ & ŠÁLKOVÁ 2006, RATHMACHER a kol. 2010). Přenos semen *P. nigra* je uskutečňován převážně do vzdálenosti 1–3 km (IMBERT & LEFÈVRE 2003).

Zralé jehnědy jsou 10–15 cm dlouhé (HEJNÝ & SLAVÍK 1990). Plody jsou zelenavě hnědé, špičaté, 4–7 mm dlouhé, vejcovité a zřetelně stopkaté tobolky otevírající se 2 chlopněmi. Podobají se plodům topolu bílého a dozrávají v květnu (MEZERA 1989). Plodit začíná již v 6–12 letech (CAGELLI & LEFÈVRE 1995, CODER 2008, WYCKOFF & ZÁSADA 2002), úroda je každoroční a hojná (PAGAN 1997, WYCKOFF & ZÁSADA 2002).

Semena jsou drobná, ochmýřená, elipsovitě kyjovitá, smáčklá, bělavá, 1,8–2,5 mm dlouhá a při pukání tobolek se uvolňují ve vatovitých chuchvalcích (MARTINOVSKÝ 1987) na konci května (WYCKOFF & ZÁSADA 2002). CAGELLI (1996) uvádí hmotnost tisíce semen 1 g. Klíčivost semen dosahuje 90 % (KARRENBERG & SUTER 2003) a rychle klesá, uchovává se 2 měsíce (PAGAN 1997). Životnost semen (G_{50} , tj. 50% klíčivost) udává VAN SPLUNDER a kol. (1995) 15 dní a KARRENBERG & SUTER (2003) 23 dní. V závislosti na studované ploše trvá rozptyl semen 2–9 týdnů (GUILLOY-FROGET a kol. 2002). V přírodě topoly upřednostňují generativní množení oproti vegetativnímu (LEGIONNET a kol. 1997).

Klíčí epigeicky. Semenáčky mají polodužnaté, lopatkovité dělohy. Prvotní listy jsou vstřícné, úzce vejčité a hrubě pilovité (MEZERA 1989). V prvním roce dorůstají semenáčky až 50–70 cm, v dalších letech přirůstají po 1 m, přírůst vrcholů ve 20–30 letech (SVOBODA 1957).

Kořenový systém je mohutný, dvojího druhu, tj. jednak je pevně zakotven panohovitými kořeny, které sahají až k hladině podzemní vody, v provzdušněných půdách velmi hluboko (až 12 m, SVOBODA 1957), jednak vytváří hustý kořenový systém v živné povrchové vrstvě půdy, většinou až do vzdálenosti odpovídající výšce stromu (PREGITZER & FRIEND 1996, MOTTL 1998). Při zaplavení nebo mechanickém poškození vytváří snadno nové výhony a kořeny (BARSOUM 1998 in BARSOUM 2001). Výmladnost je silná; z přídatných pupenů v kalusu kolem kořenu tvoří pařezové výmladky, ze spících pupenů tvoří kmenové výhonky, tvoří také kořenové odnože. Schopnost zakořenění řízků s věkem rodičovské rostliny klesá, nejlepší je materiál starý 1–2 roky (SVOBODA 1957).

3.1.2 Variabilita

Tato původní euroasijská dřevina vytváří řadu regionálních populací až poddruhů geneticky přizpůsobených místním podmínkám (SVOBODA 1957, MOTTL 1998). V jeho velkém areálu jsou různé ekotypy, zejména klimatypy (MUSIL a kol. 2002).

Z hlediska geografického rozšíření rozlišuje BUGALA (1967) tři poddruhy:

I. *P. nigra* L. ssp. *nigra*, rostoucí v rozsáhlé oblasti ve střední a východní Evropě až na Sibiři. Do tohoto poddruhu patří i pyramidální *P. nigra* L. var. *italica* Duroi. V ČR je původní pouze tento poddruh (MOTTL 1989).

II. *P. nigra* L. ssp. *betulifolia* Purch. W., s drobnějšími listy, rostoucí v západní Evropě, hlavně ve Francii a Anglii (ZSUFFA 1974, WHITE 1993, WINFIELD 1998). Jeho pyramidální formou je *P. nigra* L. var. *plantierensis* Schneider.

III. *P. nigra* L. ssp. *caudina* Ten. Bugala, s ochlupacenými prýty, rostoucí v jižní části areálu od Španělska, pobřeží Afriky, přes Itálii a Balkán do Turecka. Vyžaduje teplejší klima, a proto je v ČR poškozován mrazy.

Deskriptor pro popis druhu *Populus* byl vypracován VAN SLYCKENEM (1995).

3.1.3 Ekologické nároky

Topol černý je typická dřevina lužních lesů (LEFÈVRE 2001a). Jakožto světlomilná dřevina (HEJNÝ & SLAVÍK 1990) kolonizuje po sezónních povodních nově exponovaná místa, především břehy velkých řek na mladých aluviích, poskytující optimální podmínky k vyklíčení semenáček

(DICKMANN & KUZOVKINA 2008). Pomístné zmlazení nalezneme na obnažených bernách a hrázích při úpravách toků, ale i mimo vlastní luh na obnažené půdě po výkopových pracích, i na výsypkách (MOTTTL 1989). Osidluje písčité až hlinité půdy, i štěrkové náplavy na neutrálních až bazických podkladech. Díky schopnosti vytvářet přídatné kořeny i přes silnou borku a značné výmladkové schopnosti snáší dlouhodobé záplavy, až 50 dní (HEJNÝ & SLAVÍK 1990); voda v půdě musí být však pohyblivá, ne stagnující (MOTTTL 1989, REGIER a kol. 2009). Proniká do hor až do 800 m n.m. (MOTTTL & DUŠEK 1991). Dobře snáší i znečištění ovzduší (MOTTTL 1989, HEJNÝ & SLAVÍK 1990).

Topol černý je uváděn prof. ZLATNÍKEM (1976) (pomocí skupin typů geobiocénů) jako jedna z hlavních dřevin ve 3 vegetačních stupních (dubový, bukodubový a dubobukový), trofické řady nitrofilní (obohacená dusíkem) (C) a hydrické řady mokré s tekoucí vodou ((4)5 a).

Podle typologického systému ÚHÚL (MÁLEK 1983) je topol černý jednou z hlavních dřevin souboru lesních typů (VYHLÁŠKA č. 83/1996 SB., PŘÍLOHA č.2.) v topolovém luhu (I. lvs) v řadě obohacené vodou (jasanové), tj. 1U - topolový luh (*Querceto-Populetum vallisum*).

3.1.4 Rozšíření

3.1.4.1 Celkové rozšíření

Rod *Populus* se objevil během doby ledové v pozdním miocénu (před 5-10 miliony let, YIN a kol. 2008, ECKENWALDER 1996) Podle molekulární studie variace chloroplastové DNA se zdá, že *P. nigra* znovu kolonizoval Evropu po době ledové ze dvou hlavních oblastí, a to ze Španělska a Itálie/Balkánu (COTTRELL a kol. 2005). Přirozeně se vyskytuje v mírných a chladných oblastech severní polokoule, od 20° do 70° zeměpisné šířky (CAGELLI & LEFÈVRE 1995). Hlavním výskytem topolu černého je Evropa (s výjimkou severní, těžiště výskytu je ve Středozeří), severozápadní Afrika, Malá Asie, Kavkaz až Elborz, západní Sibiř, na východ po Jenisej a Altaj (HEJNÝ & SLAVÍK 1990). Nyní je tato dřevina (COTTRELL a kol. 2005) na většině území západní Evropy na pokraji vyhynutí a proto byla zařazena do seznamu ohrožených druhů (ANONYMOUS 1990, IUCN 1994, LEFÈVRE & CAGELLI 1994, WINFIELD a kol. 1998, COTTRELL a kol. 2005).

3.1.4.2 Rozšíření v ČR

Výskyt pylový zrn topolu černého na našem území se dochoval až z atlantika, tj. 6000–1300 let př. n. l. (PAGAN 1997). V ČR je topol černý silně ohroženou dřevinou (PROCHÁZKA a kol. 2001, KUBÁT a kol. 2002), ale není zákonem chráněný (PŘÍLOHA č. 2 VYHLÁŠKY č. 395/1992 SB.,

MUSIL a kol. 2002). Rozsáhlá území naší krajiny jsou bez tohoto druhu. Původní lokality se nacházejí kolem řek v záplavových územích, od nížin po hory (MOTTL a kol. 1996). Díky regulaci toků bylo silně omezeno jeho zmlazování na čerstvých náplavech meandrujících toků a tak se u nás zachoval jen v úvalech řek, a to v ojedinělých exemplářích, výjimečně ve skupinách (SLOVÁČEK 2004). Poslední zbytky původních populací topolu černého jsou v Poohří, středním Polabí, Jihomoravském úvalu a Hornomoravském úvalu (HEJNÝ & SLAVÍK 1990, KUBÁT a kol. 2002).

3.1.5 Pěstování

Dříve se pěstovaly topoly v lesích na území ČR jednotlivě nebo ve skupinkách. Díky jejich sklonu k zavětvení dolní části kmene (SIMANOV & ČÍŽEK 2004) a dřívějšímu obmýtí oproti jiným lesním dřevinám se přistoupilo k pěstování topolů v monokulturách (ČÍŽEK 1998). Nyní se porosty zakládají buď na lesní půdě jako silvikultury (lignikultury), anebo na zemědělské půdě jako výmladkové plantáže rychle rostoucích dřevin (RRD, kultury s krátkou dobou obmýtí) (WEGER 2011). Na základě klimatických a později i pedologických poměrů stanoviště byly stanoveny oblasti (rajony) vhodné pro pěstování topolů (MOTTL & ŠPALEK 1954; MOTTL A DUŠEK 1991). Tento seznam je upravován dle nejnovějších poznatků. Pro výsadbu plantáží RRD byla vypracována řada metodik (např. poslední je WEGER 2011).

3.1.6 Choroby a škůdci

Mezi nejvýznamnější patogeny topolu černého patří listové rzi, tj. *Melampsora larici-populina* Kleb. a *Melampsora allii-populina* Kleb., *Marssonina brunnea* (Ell. & Ev.) Magnus., *Dothichiza populea* Sacc. & Briard (TÓTH 1995), *Venturia populina* (Vuill.) Fabric. (CAGELLI 1995).

Významnými fyziologickými a technickými hmyzími škůdci mladých stromů topolů jsou: na listech mandelinka topolová (*Chrysomela populi* L.) a zobonoska topolová (*Byctiscus populi* L.), na kmenech kozlíček topolový (*Saperda carcharias* L.), kozlíček osikový (*Saperda populnea* L.), krytonosec olšový (*Cryptorhynchus lapathi* L.) a nesytka ovádová (*Paranthrene tabaniformis* Rott.) (ČÍŽEK 2007).

3.1.7 Význam

Zachování druhu *P. nigra* je významné pro jeho řadu ekologických a ekonomických přínosů.

a) Zaujímá důležitou roli ve šlechtitelském programu topolů, podle mezinárodního registru je jedním z rodičů u 63 % hospodářsky využívaných mezidruhových hybridů topolů (LEFÈVRE & CAGELLI 1994).

b) Je na seznamu klonů rychle rostoucích dřevin schválených MŽP ČR pro zakládání výmladkových plantáží pro energetické využití (VĚSTNÍK MZE ČR, duben 2004). Dřevo topolu se používá buď jako palivo (BENETKA a kol. 2002a, LAUREYSENS a kol. 2005, BENETKA a kol. 2007, AL AFAS a kol. 2008 atd.) (jako rychle rostoucí dřevina je např. v Turecku pěstován ve 45 % plantážích (LEFÈVRE & CAGELLI 1994) nebo v nábytkářství (velkým opakovaným zmnožením spících pupenů na kmeni a zasycháním slabých výstřelků vzniká esteticky působivý “očkový topol”, VINCENT & ŠPALEK 1954), řezbářství, k výrobě dýh, překližek, sudů a beden. Jeho kůra má lepší vlastnosti než korek (za 3 měsíce se obsah vlhkosti kůry zvýšil nejvýše o 50 %, u korku o 115 %, PAGAN 1997). Topolové listí se používalo jako krmivo pro dobytek (PAGAN 1997).

c) Jeho mohutný kořenový systém stabilizuje břehové linie (MOTTL 1989); břehové porosty slouží jako biokoridorový pás.

d) Ve farmacii je na jednu stranu zdrojem antibakteriálního propolisu (mladé zimní pupeny se využívají při chorobách močových cest, při dně a revmatismu, zevně se používá jako mast při hemoroidech a popáleninách) (ÜNLÜ a kol. 2008, HAVLÍK a kol. 2010), na druhou stranu může způsobovat alergické reakce (pyl a chmýří ze semen).

e) Lineární plantáže kultivarů topolu černého se využívají jako větrolamy (LEFÈVRE & CAGELLI 1994). Například na jižní Moravě v oblasti Hrušek, Tvrdonic a Podivína se nachází 16 km větrolamů (MOTTL 1998) dnes 65letých topolů černých.

f) Měřením koncentrace stopových prvků pomocí atomové absorpční spektrometrie listů zjistili BASLAR a kol. (2005), že je u topolu černého silná asociace mezi stupněm kontaminace a koncentrace, a je tedy vhodným biologickým indikátorem kontaminace těžkých kovů. Vybrané klony tak mohou sloužit k fytořemediaci (CAPUANA 2011).

g) Kořenový systém *P. nigra* je spojován s ektomykorhizními a vesikulárně-arbuskulárními mykorhizálními houbami (PREGITZER & FRIEND 1996).

h) Některé kultivary topolu černého našly uplatnění v okrasném zahradnictví (estetická funkce) a tvorbě krajiny, patří také k našemu kulturnímu bohatství (MOTTI 1989, LEFÈVRE & CAGELLI 1994, BEAN 2000).

3.1.8 Ohrožení druhu

Pracovní skupina genetického monitorování EUFORGEN označila druh *P. nigra* jako jeden z ohrožených druhů na celoevropské úrovni (ANONYMOUS 2012). Rozeznáváme 4 hlavní příčiny ohrožení tohoto druhu:

1) Jedním z hlavních důvodů ohrožení populace topolu černého je zanikání a stále větší fragmentace jeho přirozených stanovišť způsobené regulací vodních toků, rozsáhlého odvodnění krajiny a ústupu lužních lesů, zemědělskému hospodaření a urbanizaci (LEFÈVRE a kol. 1998, HEINZE & LEFÈVRE 1999).

2) Vznikající malé populace jsou vystaveny inbrední depresi (viz kapitola 3.2.2).

3) Další příčinou ohrožení druhu je výlučné zavádění rychle rostoucích mezidruhových hybridů topolu na úkor topolu černého (LEFÈVRE a kol. 1998).

4) Jeho snadná křížitelnost s introdukovanými druhy (nejčastěji s *P. deltoides* Bartr. ex Marsh., *P. maximowiczii* A. Henry, *P. trichocarpa* Torr. & Gray) vede ke genetické erozi druhu (CAGELLI & LEFÈVRE 1995, HEINZE 1997, HEINZE 1998, LEFÈVRE a kol. 1998, BENETKA a kol. 1999, LEFÈVRE 2001b, BENETKA a kol. 2002b, VANDEN BROECK a kol. 2004, VANDEN BROECK a kol. 2005, SMULDERS a kol. 2008a). *P. nigra* je také ohrožen zpětným křížením s *Populus × canadensis* Moench (RAJORA 1986, JANSSEN 1998, BENETKA a kol. 1999, TABBENER & COTTRELL 2003, VANDEN BROECK a kol. 2006) a křížením s *P. nigra* L. cv. 'Italica' (TABBENER & COTTRELL 2003). Jako zástupce sekce *Aigeiros* se nekříží se sekcí *Leuce* (GAGET a kol. 1989, VILLAR a kol. 1989).

3.1.9 Ochrana druhu

3.1.9.1 Konzervace genových zdrojů

Ochrana a následná konzervace genetických zdrojů je předpokladem k jejich dalšímu uchování a využívání. Přirozená obnova genofondu topolu černého je velmi problematická kvůli nesouvislému areálu rozšíření druhu a nedostatku jeho přirozených stanovišť v lužních oblastech (SLOVÁČEK 2004). Při konzervačních strategiích je nutné brát ohled na řadu ekologických (množství srážek, hladina podzemní vody, výskyt povodní, škůdců atd.), demografických (množství semenáčů a dospělých stromů, poměr pohlaví atd.) a genetických (genetická diverzita, odlišení mezi věkovými třídami, introgrese atd.) ukazatelů (LEFÈVRE a kol 2001b). Rozlišujeme dvě základní strategie pro dlouhodobou konzervaci genotypů, a to *in situ* (tj. ochrana genofondu v místě jeho přirozeného výskytu) a *ex situ* (tj. ochrana genofondu mimo místo jeho přirozeného výskytu buď v kolekcích *ex situ* zahrnující klonové archivy, arboreta, semenné sady, semenné či pylové banky, *in vitro* kultury, provenienční testy nebo testy potomstev) (PAULE 1992, EUFORGEN 2001). V případě potřeby maximalizace adaptivního potenciálu druhu jsou před statickou *ex situ* konzervací upřednostňovány buď dynamická *in situ* konzervace nebo dlouhodobé šlechtitelské programy. Konzervační jednotky by měly být rozmístěny po celém areálu výskytu druhu přednostně zahrnující více než jednu lokalitu na jeden říční systém a kandidátní porosty dospělých stromů by měly mít vysokou diverzitu a nízký počet opakujících se klonů. Pozornost by měla být také věnována činnostem, které mají dopad na kvetení a následný proces regenerace, tj. optimalizovat podmínky pro vysemenění a růst semenáčků. Obnovovaný porost by měl být ochráněn před introgresí vytvořením tzv. „buffer“ zóny okolo místních populací obsahujících otcovské stromy (VANDEN BROECK 2003). Péče o genofond by se měla opírat o schopnost obnovy celého lužního ekosystému i o zavedení vhodných strategií hospodaření na obnovených stanovištích (LEFÈVRE a kol 2001b).

3.1.9.2 Velikost populace

Klíčovým problémem při ochraně druhu je odvození minimální velikosti populace, která zabezpečí přežití druhu a jeho trvalou obnovu bez ztráty genetické informace (PAULE 1992). Malé populace jsou ohrožené vyhynutím kvůli demografické stochasticitě (tj. náhodné změně velikosti populace, úspěšnosti přežití jedinců a jejich reprodukci), genetickému driftu a inbrední depresi (HARMON & BRAUDE 2009). SHAFFER (1981) definuje minimální velikost životaschopné populace (MVP) jako malou izolovanou populaci mající 99% šanci přežít 1000 let přes účinky náhodných demografických a environmentálních změn, genetickému driftu a přírodních

katastrof. Jako MVP uvádí FRANKLIN (1980) 500 jedinců. Jeho pravidlo 50/500 znamená, že populace s inbrední efektivní početností populace (N_{ef}) menší než 50 jedinců je ohrožena vyhnutím okamžitě a populace s proměnlivou početností populace (N_{ev}) menší než 500 jedinců je ohrožena vyhnutím v dlouhodobém měřítku.

Inbrední efektivní početnost (N_{ef}) vyjadřuje velikost ideální panmiktické populace, ve které by genetické procesy vlivem selekce nebo driftu probíhaly stejnou rychlostí jako v dané reálné populaci. V zásadě jde o počet jedinců, kteří skutečně přispívají svými geny do dalších generací.

$$N_{ef} = \frac{t}{\frac{1}{N(0)} + \frac{1}{N(1)} + \dots + \frac{1}{N(t-1)}},$$

kde t je počet generací, $N(0)$ je velikost zakládající populace, $N(t-1)$ je velikost populace o jednu generaci zpět (HARMON & BRAUDE 2009).

Metody odhadu N_{ef} pomocí selekce, tj. z driftu ve frekvenci neutrálních alel spočítaných z akumulace pozitivní selekce napříč generacemi nebo na základě stupně inbrídingu s použitím konceptu dlouhodobých genetických příspěvků, jsou shrnuty ve studii NOMURA (1999).

Pokud v populaci není poměr samců a samic 1:1, efektivní početnost (N_s) se vypočítá:

$$N_s = \frac{4N_m N_f}{N_m + N_f},$$

kde N_m je počet samců a N_f počet samic (RELICHOVÁ 2009).

Proměnlivá početnost (N_{ev}) vyjadřuje velikost ideální populace, jejíž početnost se mění z generace na generaci.

$$N_{ev} = \frac{t}{\frac{1}{N(1)} + \frac{1}{N(2)} + \dots + \frac{1}{N(t)}},$$

kde t je počet generací, $N(1)$ je velikost populace po jedné generaci, $N(t)$ je velikost současné populace (HARMON & BRAUDE 2009).

N_{ef} je citlivější k počtu zakladatelů [$N(0)$] a je zaměřena na ztrátu heterozygotnosti způsobenou inbrídingem; N_{ev} je citlivější k počtu současné populace [$N(t)$], je ukazatelem zvýšené proměnlivosti frekvence alel mezi subpopulacemi kvůli driftu a závisí na počtu potomků těchto

zakladatelů, následujících generací až do dnes. V reálných populacích mohou být tyto hodnoty značně rozdílné. Zvětšující se populace má obecně $N_{ef} < N_{ev}$, zmenšující se populace $N_{ef} > N_{ev}$ (HARMON & BRAUDE 2009).

3.1.9.3 Záchrana genofondu v praxi

Mezinárodní spolupráce na záchranu genofondu topolu černého a probíhá v rámci projektu *Populus nigra* Network of the European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN), který byl ustanoven k naplnění rezoluce č. 2 Štrasburské ministerské konference na ochranu lesů v Evropě. Započal v roce 1994 a klade důraz na nutnost jednotné strategie zahrnující ochranu genových zdrojů. Program je koordinován Mezinárodním ústavem pro rostlinné a genetické zdroje (International Plant Genetic Resources Institute, tj. IPGRI) ve spolupráci s lesnickým oddělením FAO (tj. Mezinárodní topolovou komisí = International Poplar Commission = IPC) a je financován účastnickými státy. Nejprve byla v participujících zemích sjednocena ochrana genofondu *ex situ* včetně založení databáze klonů a centrálního klonového archivu, později ochrana *in situ*. Výsledkem spolupráce je odborný bulletin „*In situ* conservation of *Populus nigra*” (LEFÈVRE a kol. 2001b) obsahující informace o péči o genofond.

První práce spojené s problematikou zachování genofondu topolu černého v ČR začaly v 50. letech minulého století, kdy tuto práci vedl Dr. Špalek. Později v těchto pracích pokračovali hlavně MOTTL a kol. (např. 1989, 1991, 1994, 1996, 1998, 2003), ČÍŽEK (např. 1998, 2007) a ČÍŽKOVÁ ve VÚLHM výzkumné stanici Uherské Hradiště a od 90. let BENETKA a kol. (např. 1998, 1999, 2002a, 2002b, 2005, 2007, 2008, atd.) ve VÚKOZ v Průhonicích. Práce probíhaly v rámci výzkumných projektů, např. „Šlechtění rychle rostoucích dřevin”, a výzkumných záměrů „Záchrana populací topolu bílého a topolu černého s důrazem na metody *in situ*” (od MZe) ve VÚLHM nebo „Výzkum (neprodukčních) rostlin a jejich uplatnění v krajině a sídlech budoucnosti“ (od MŽP) ve VÚKOZ.

Do dnešní doby byly provedeny terénní průzkumy a vybráno a na stanovištích označeno přes 200 výběrových stromů kvalitních a druhově pravých (pomocí morfologických znaků a biochemických analýz ověření druhové pravosti a vyloučení případných hybridů) jedinců topolu černého z 6 lužních oblastí Čech a Moravy a 14 jedinců z podhorských oblastí (BENETKA & DUBSKÝ 1998). Tito jedinci byli zaneseni do databáze a ústřední evidence topolu černého. Z vybraných jedinců byly v Uherském Hradišti a Průhonicích založeny matečnice, tzv. *ex-situ* konzervace, pro vegetativní množení výběrových stromů. Pomocí generativního množení

(kontrolovaného křížení) jsou získáváni jedinci, kteří mohou reprezentovat místní populace. Získané semenáče jsou vysazovány na původní lokality (MOTTL a kol. 1996), např. CHKO Labské Pískovce, CHKO Libický Luh, CHKO Litovelské Pomoraví (BENETKA 2005), tzv. *in-situ* konzervace.

Nyní se v ČR nachází celkem 116 uznaných zdrojů reprodukčního materiálu (ZRM) topolu černého na celkové ploše 23 ha (Tab. 1, ÚHÚL 2012). Jedná se konkrétně o porost fenotypové třídy 2C (22 ha), porost fenotypové třídy 2B (0,7 ha), zdroj semen identifikovaného reprodukčního zdroje (1 ks), 94 klonů a 5 směsí klonů kvalifikovaných ZRM. Tyto uznané ZRM leží v 8 přírodních lesních oblastech (Podkrušnohorské pánve, Polabí, Severočeská pískovcová plošina a Český ráj, Podkrkonoší, Hornomoravský úval, Jihomoravské úvaly, Středomoravské Karpaty, Podbeskydská pahorkatina). Činnosti v oblasti uznávání a evidenci ZRM lesních dřevin vykonává podle zákona č. 149/2003 Sb. Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem. ZRM ČR se dají vyhledat také pomocí portálu ERMA (evidence reprodukčního materiálu), tj. <http://erma.uhul.cz/>. Uvádění do oběhu ZRM v ČR se řídí zákonem č. 149/2003 Sb. a jeho prováděcí vyhláškou č. 29/2004 Sb. Podrobnostmi o přenosu sadebního materiálu, evidenci o původu reprodukčního materiálu, obnově lesních porostů a zalesňování se zabývá v ČR vyhláška č. 139/2004 Sb.

Tab. 1 Uzané zdroje topolu černého v ČR členěné dle přírodních lesních oblastí a kategorií reprodukčního materiálu (ÚHÚL 2012)

Topol černý			Kategorie RM																					
			1 (identifikovaný)						2 (selektovaný)				3 (kvalifikovaný)						4 (testovaný)					
			Typ zdroje RM						Typ zdroje RM				Typ zdroje RM						Typ zdroje RM					
			1	2A	2B	2C	2A	2B	3	4	5	6	4	5	6									
			Zdroj semen	Porost fenotypové třídy						Porost fenotypové třídy				Semenný sad	Rodičovský strom	Klon	Směs klonů	Rodičovský strom	Klon	Směs klonů				
PLO	plocha dřeviny v UP celkem ha	počet UJ celkem ks	ks	ha*	ks	ha*	ks	ha*	ks	ha*	ks	ha*	ks	ha	ks	ks	ks	ha	ks	ks	ks	ha	ks	
2	1,5	2	-	-	-	-	-	0,8	1	-	-	0,7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	2,1	8	-	-	-	-	-	2,1	2	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-
18	1,1	2	-	-	-	-	-	1,1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	1,3	2	-	-	-	-	-	1,3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	2,7	3	1	-	-	-	-	2,7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
35	9,1	93	-	-	-	-	-	9,1	1	-	-	-	-	-	-	-	88	1,6	4	-	-	-	-	-
36	4,7	5	-	-	-	-	-	4,7	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	0,6	1	-	-	-	-	-	0,6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
celkem	23,1	116	1	-	-	-	-	22,4	15	-	-	0,7	1	-	-	-	94	1,6	5	-	-	-	-	-

Pozn.: PLO = přírodní lesní oblast, UP = uznaný porost, UJ = uznaná jednotka, RM = reprodukční materiál, * redukovaná plocha dřeviny

3.2 Dopady inbrídingu na populaci

3.2.1 Inbríding

Inbríding je určitý druh nenáhodného plození, při kterém dochází k oplození mezi příbuznými jedinci častěji, než by se dalo očekávat na základě náhodnosti (RELICHOVÁ 2009). Pokud dojde ke křížení mezi sourozenci, nevlastními sourozenci a mezi prvostupňovými bratřenci a sestřenicemi, označujeme potomstvo jako inbrední. Tito jedinci se liší od potomstva nepříbuzných rodičů tím, že dvě kopie genu v určitém lokusu mohou být navzájem identické díky společnému původu, neboť tyto geny pocházejí od jednoho předka (SNUSTAD & SIMMONS 2009).

Základním efektem inbrídingu v populaci je zvyšování četnosti homozygotních genotypů na úkor četnosti heterozygotů (RELICHOVÁ 2009). Účinek inbrídingu je nejvýznamnější v prvních 5 až 8 generacích, po 8 generaci je ve většině případů už zanedbatelný (NEČÁSEK 1979, ACQUAAH 2007). Opakovaným křížením mezi příbuznými jedinci vzniknou zcela uniformní inbrední linie (RELICHOVÁ 2009). V extrémním případě může dojít k úplné absenci heterozygotů (ACQUAAH 2007).

Zachování alel v populaci závisí na tom, zda jsou alely v genové interakci dominantní, intermediální nebo recesivní. Frekvence škodlivých recesivních alel je nejprve rychle redukována, ale poté poklesá pomalu; nejrychleji jsou z populace eliminovány škodlivé alely dominantní, pomaleji intermediální (jsou otevřené selekci proti heterozygotům) a nejpomaleji recesivní (jsou chráněny jejich recesivitou). Výsledkem je to, že škodlivé dominantní nebo intermediální alely jsou v populacích z nepříbuzenského křížení vzácné, zatímco škodlivé recesivní alely vytrvávají (ACQUAAH 2007).

U rostlin existuje řada morfologických a fyziologických mechanismů podporujících samoopylení, např. neotevření květů (kleistogamie) nebo otevření květů až po vyprášení pylu (pšenice *Triticum aestivum* L., ječmen *Hordeum vulgare* L., lupiny *Lupinus* spp.). Relativní omezení cizosprášení způsobené těmito a jinými mechanismy má rozpětí od fakultativního samoopylení k obligátnímu samoopylení (RIEGER a kol 1991). Stupeň samoopylení závisí na charakteru a množství hmyzích opylovačů, proudění vzduchu a teplotě. Samosprašné rostliny jsou schopné i cizosprášení (aby byla rostlina označena za samosprašnou, musí být cizosprášení nižší 4 %, ACQUAAH 2007). U některých druhů může být při mrazových teplotách pyl poškozen.

Rozlišujeme tři základní typy mechanismů zajišťující cizosprašnost – anatomicko-morfologické, fyziologické a genetické bariéry. Mezi první řadíme dvoudomost a inkompatibilitu heteromorfní, tj. buď heterostylie (v rámci druhu se vyskytují dva typy oboupohlavních květů, které se od sebe morfologicky odlišují, např. *Primula* L., *Forsythia* Vahl., *Oxalis* L.) nebo herkogamie (samičí část květu je od samčí oddělena mechanickou bariérou, např. *Medicago* L.) Mezi druhé řadíme protogynii (předčasné dozrávání blizen oproti prašníkům) a protandrii (opak protogynie). Mezi třetí řadíme inkompatibilitu homomorfickou, tj. buď gametofytickou (v pylové láčce se v interakci s bliznou uplatňuje pouze jedna alela samce, Solanaceae Juss., Rosaceae L., Fabaceae Lindl.) nebo inkompatibilita sporofytická (Betulaceae Gray, Brassicaceae Burn.). Opylení cizosprašných druhů je závislé hlavně na větru (*Abies* Mill., *Picea* A. Dietr., *Pinus* L., *Fraxinus excelsior* L., *Larix* Mill., *Negundo aceroides* Moench., *Populus* L.) a hmyzu (*Acer platanoides* L., *Acer pseudoplatanus* L., *Aesculus hippocastanum* L., *Fraxinus ornus* L., *Ligustrum vulgare* L., *Salix* L., *Syringa vulgaris* L.) (PROCHÁZKA a kol. 2003, ACQUAAH 2007).

Koeficient inbrídingu F (poprvé popsal v roce 1921 americký genetik Sewall Wright) vyjadřuje pravděpodobnost, že dvě kopie genu u určitého jedince v rodokmenu jsou identické původem (autozygotní). Tato pravděpodobnost narůstá s vyšší intenzitou inbrídingu. F nabývá hodnot v intervalu od 0 (tj. zcela náhodné křížení bez inbrídingu) do 1 (tj. dlouhotrvající selfing, je dosažena kompletní homozygotnost ve všech lokusech) (RIEGER a kol 1991, ACQUAAH 2007).

Obecný vzorec pro výpočet F pomocí rodokmenu je $F_1 = \sum \left(\frac{1}{2}\right)^i (1 + F_A)$, kde \sum značí součet společných cest přes všechny společné předky, i je počet jedinců na každé cestě a A je společný předek na každé z cest.

Podíl genů, které dva jedinci sdílejí na základě toho, že mají společného předka, vyjadřuje koeficient příbuznosti. $R_{BC} = \left(\frac{1}{2}\right)^s$, kde s je počet kroků od B ke společnému předku a zpět k C (ACQUAAH 2007).

$F = \frac{(H_0 - H)}{H_0}$, kde H_0 je četnost heterozygotů v populaci za předpokladu náhodného oplození a H je aktuální četnost heterozygotů v populaci (RELICHOVÁ 2009).

V idealizované populaci platí, že za jednu generaci disperzivního procesu vzroste koeficient inbrídingu takto: $F_t = \frac{1}{2N} + \left(1 - \frac{1}{2N}\right)F_{t-1}$, kde N je počet reproduktivních jedinců, t je generace (NEČÁSEK 1979).

3.2.2 Inbrední deprese

Výsledkem příbuzenského opylení (v krajním případě autogamii) rostlin dochází k jevu zvanému inbríding a to nejen u cizosprašných druhů. Tento jev vede k narušení balance polygenního systému, a tím pádem dochází ke snížení životnosti a výkonnosti. Dochází také k homozygotizaci, což vede v mnoha případech k vyštěpení genů letálních nebo jinak škodlivých (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 1999, PICÓ a kol. 2007). Z tohoto důvodu vitalita potomstva rostlin po samoopylení klesá. Tento pokles vitality se nazývá inbrední deprese (BEDNÁŘ 1997). Maximální deprese je v prvních generacích. Po několika generacích inbrídingu může dojít k ustálení poklesu fitness, inbrednímu minimu (RIEGER a kol 1991). Jakmile dosáhne deprese určitého minima, není již klesání podstatné (NEČÁSEK a kol. 1979). Nepříznivý vliv inbrídingu je tím větší, čím je škodlivá recesivní alela vzácnější (RELICHOVÁ 2009). Je prokázána negativní korelace mezi inbrední depresí a stupněm samoopylení (HUSBAND & SCHEMSKE 1996).

Ohrožení inbrední depresí se liší druh od druhu. Extrémní je u vojtěšky, u které inbríding produkuje homozygotní rostliny neschopné přežít. Na druhou stranu, rostliny jako je cibule, slunečnice, dýně a žito jsou k inbrídingu více tolerantní s minimálním významem inbrední deprese (ACQUUAH 2007). Může se vyskytnout nejen u cizosprašných, ale i u samosprašných rostlin, u těch buď samoopylením, nebo opylením jiným blízkým příbuzným jedincem (THIELE a kol. 2010). HUSBAND & SCHEMSKE (1996) zjistili, že průměrná hodnota inbrední deprese je statisticky významně nižší u druhů převážně samosprašných než u převážně cizosprašných. Zdá se (AFFRE & THOMPSON 1999), že se u vysoce samosprašných druhů projevuje inbrední deprese v pozdějších stádiích životního cyklu v porovnání s více cizosprašnými druhy.

Inbrední depresi δ je možné vypočítat podle vztahu $\delta = 1 - (W_i/W_0^{-1})$, kde W_i je průměrná hodnota znaku sady inbredních jedinců a W_0 je průměrná hodnota znaku sady jedinců z nepříbuzenského opylení (LANDE & SCHEMSKE 1985). Kladné číslo ukazuje inbrední depresi a záporné číslo ukazuje outbrední depresi (FOX 2005).

3.2.3 Outbrední deprese

Doplnění malých populací jedinci z jiných populací může obohatit genetickou variabilitu a zmírnit inbríding, ale na druhou stranu může způsobit outbrední depresi (ELLSTRAND 1992). Proto není takový umělý genový tok ke konzervaci druhů běžně využíván (WILLI a kol. 2007). Outbrední deprese může vzniknout při křížení geograficky oddělených anebo geneticky odlišných populací (AFFRE & THOMPSON 1999). Jedinci mají totiž jiné chromosomy, enzymové systémy apod. a potomci mohou ztrácet specifické vlastnosti lokálních populací umožňující přežití.

Nejzřejmější účinky tohoto jevu při křížení mezi populacemi jsou v F_2 a následujících generacích (LYNCH 1991). Ačkoliv nechtějí botanikové jev outbrední deprese přijmout (WASER 1993), zoologové se tohoto škodlivého účinku obávají už několik desetiletí a snaží se ho minimalizovat pomocí šlechtitelských programů nebo managementu divokých populací (TEMPLETON 1986).

3.2.4 Heteroze

Po vzájemném křížení inbredních linií, často u těch, které dosáhly inbredního minima (RIEGER a kol 1991), může docházet u hybridů v první generaci ke vzrůstu celkové zdatnosti, projevující se zvýšením vitality a fitness, převyšující tyto charakteristiky u obou rodičů. Tento jev, kdy jsou při selekci proti oběma homozygotním genotypům zvýhodněni heterozygoti, kteří mají tudíž nejvyšší adaptivní hodnotu, se nazývá heteroze nebo hybridní zdatnost (RELICHOVÁ 2009). Tento termín použil poprvé v roce 1914 George Shull (SNUSTAD & SIMMONS 2009). Heteroze byla poprvé popsána Charlesem Darwinem v roce 1876 v pokuse, při kterém získal u kukuřice (*Zea mays*) o 25 % vyšší potomstvo z cizosprášení v porovnání s potomstvem z příbuzenského křížení (DARWIN 1876). Heterozní účinek se využívá u liniového šlechtění, tj. příbuzenským křížením se získává větší počet linií, které se vzájemně kříží, s podstatně omezenou genetickou variabilitou (NEČÁSEK a kol. 1979). K úspěšnému využití heteroze je nevyhnutelné vybrat linie s kombinační schopností, projevující se heterozím efektem (RELICHOVÁ 2009). Molekulárním základem heteroze se zabývá např. HOCHHOLDINGER & HOECKER (2007). V praxi má velký význam využití heterozního efektu například v užitkovém chovu hospodářských zvířat, k získání vysokých výnosů kulturních rostlin a k získání odolnějších jedinců vůči významným patogenům a chorobám.

3.2.5 Studie inbrídingu v populaci

Inbrídung zaujímá významné místo ve šlechtitelské praxi (RELICHOVÁ 2009). Běžně jsou využívány 4 systémy příbuzenského křížení: samoopylení (spojení samčí a samičí gamety téhož jedince), plnorodá potomstva (tj. křížení dvojic v populaci), polorodá potomstva (známe mateřskou rostlinu, zdroj pylu je náhodný) a zpětné křížení (potomstvo F_1 je opakovaně kříženo s jedním z rodičů). Nejextrémnějšími formami inbrídingu jsou samoopylení a zpětné křížení; po čtyřech generacích křížení dosahuje v těchto případech koeficient inbrídingu velikosti 15/16 (ACQUAAH 2007). Se snižováním velikosti populace se zvyšuje pravděpodobnost částečné nebo úplné autogamie. Vliv příbuzenského křížení na potomstvo je sledován v řadě studií jak zvířat, tak i rostlin. CRNOKRAK & ROOF (1999) potvrdili teorii (RALLS a kol. 1988), že mají divoké populace vyšší stupeň inbrední deprese (ID) v porovnání s již šlechtěnými populacemi.

Vztahem efektivní velikostí populace (N_e) a inbrední deprese se u rostlin zabývají například u *Lupinus arboreus* KITTELSON & MARON (2000), GLÉMIN a kol. (2001), KELLER & WALLER (2002) a ANGELONI a kol. (2011). OOSTERMEIER a kol. (1994) našli větší snížení fitness způsobené částečně inbrídinem a částečně stresem prostředí na mateřské rostliny u malé populace *Gentiana pneumonanthe* než u velké populace, MICHAELS a kol. (2008) nenašli rozdíly, THIELE a kol. (2010) pozorovali větší inbrední depresi u velké populace *Silene nutans* než u malé. U *Pulsatilla vulgaris* v závislosti na velikosti populace se měnila produkce semen (HENSEN a kol. 2005). DE VERE a kol. (2009) zjistili, že menší populace *Cirsium dissectum* s menším počtem rostlin mají menší genetickou diverzitu, což má negativní dopad na přežití semenáčů. Také OUBORG a kol. (1991) dokazují existenci genetické eroze v přírodních populacích dvou divokých rostlinných druhů (*Salvia pratensis* $r=0,915$ a *Scabiosa columbaria* $r=0,703$). Došel k závěru, že čím menší je populace, tím menší je fenotypová variabilita. Ztráta genetické variability u malých populací způsobená inbrídinem a vysokým stupněm genetického driftu může vyústit v pokles životnosti a ke zvýšené šanci vyhynutí populace.

U vzácného druhu *Anchusa crisper* Viv., vyskytujícího se v malých populacích o malém počtu jedinců, zjistili QUILICHINI a kol. (2001) relativní účinek inbrídingu; nedostatek inbrední deprese (ID) v F_1 generaci. Naopak outbrední deprese (OD) se projevila jak v generaci F_1 tak i v F_2 . Výsledky ukazují na to, že tento druh byl nejen očištěn od škodlivých alel, ale

pravděpodobně prošel i nějakou formou selekce pro inbríding buď díky koadaptaci mezi lokusy nebo adaptací na místní podmínky.

Ke zjištění účinku velikosti populace, testovaného prostředí, životního cyklu a stupně velikosti inbrední deprese u 13 různých znaků (např. klíčivost, počet vajíček, podíl opylených květů, hmotnost semen, počet semen, podíl oplodněných květů, biomasa (výška rostliny atd.), mortalita, podíl semenáčů schopných reprodukce, schopnost reprodukce semenáčů, kvetení semenáčů atd.) použili ANGELONI a kol. (2011) meta-analýzy ze 116 studií 107 rostlinných druhů. Zjistil, že stupeň ID statisticky významně roste s velikostí populace. Toto zjištění vysvětluje buď vyšší základnou úroveň inbrídingu nebo zvýšeným dopadem předchozího vyčištění škodlivých alel v malých populacích.

Hodnoty ID v jednotlivých stupních životního cyklu (produkce semen, klíčivost, mortalita semenáčů, růst a reprodukce) u 79 populací zahrnujících 54 druhů z 23 rodin cévnatých rostlin stanovili ve své studii HUSBAND & SCHEMSKE (1996). Zjistili, že průměrná ID je průkazně menší u převážně samosprašných druhů ($\delta=0,23$) oproti převážně cizosprašným ($\delta=0,53$). Jeho výsledky také podporují hypotézu, že nejranější projev ID je způsoben letální recesivitou a může být vyčištěn inbrídingem, zatímco velká část pozdějšího projevu ID je způsobena slabě škodlivými mutacemi a je velmi obtížné je vyčistit, dokonce ani extrémním inbrídingem.

U dlouhověkých cizosprašných druhů, např. *Epilobium augustifolium*, se projevuje vysoký stupeň ID v časném stadiu životního cyklu, tj. během zrání semen (HUSBAND & SCHEMSKE 1995).

GLÉMIN a kol. (2001) se zabývali studiem ID v malých populacích vzájemně neslučitelných (self-incompatible, tj. SI) rostlin. Pomocí dvojlokusového modelu studovali účinek SI na lokusu vracejících se škodlivých mutací způsobujících ID. Současně prováděli zhodnocení účinku velikosti populace a spojitosti mezi dvěma lokusy na stupeň ID a genetické zátěže. Dokázali, že ukrytí škodlivých alel ve spojení s lokusem řídícím SI zesiluje účinek ID v malých populacích.

FISCHER & MATTHIES (1997) studovali, zda může být u vysoce samosprašné *Gentianella germanica* redukováno fitness způsobené omezeným opylením a ID. Zjistili, že vyloučení opylovačů silně redukuje nasazení semen. Stupeň klíčivosti, počet listů a velikost rozety potomstev byla nejvyšší při vzájemném křížení rostlin ze vzdálenosti 10 m oproti volnému sprášení, samosprášení, křížení z 1 m a mezipopulačnímu křížení. Po dobu trvání pokusu se počet přeživších rostlin neměnil, zatímco se rozdílly ve velikosti rostlin během vegetace měnily. Výsledky ukazují, že inbrední i outbrední deprese snižují výkon rostlin.

Nejstarší test potomstev po autogamii smrku ztepilého byl založen v roce 1916. Jedinci ze selfingu měli objem kmene o více než polovinu nižší než jedinci z volného (nepříbuzenského) sprášení (ERIKSSON a kol. 2006).

Studium inbrídingu má význam pro práce spojené s konzervací ohrožených druhů (HEDRICK 1994, HEDRICK & KALINOWSKI 2000, ERIKSSON a kol. 2006), u cizosprašných rostlin především při výběru rodičovských párů pro generativní rozmnožování těchto druhů.

4 MATERIÁL

Pro studium inbrední deprese u *P. nigra* byly použity dva porosty založené z geneticky čistých topolů černých na lokalitě Michovky, která je součástí areálu Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i. v Průhonicích (50° 00' 05'' s. š., 14° 33' 18'' v. d., 306 m n. m.).

První porost, založený v roce 2003, se skládá z potomstev 3 matek (označené čísly 2, 3 a 5) opylených třemi způsoby, a to bratrem (označený číslem 4) (tj. první záměrné příbuzenské křížení, varianta S×B), neznámým otcem (tj. cizosprášení, varianta CS) nebo směsí pylu známých matek nepřibuzných otců (B1, B14) (tj. varianta SM). Tyto 3 samičí a 1 samčí strom vznikly křížením výběrových stromů, 30×32 (BENETKA a kol. 2008).

Druhý porost, založený v roce 1996, se skládá z 8 skupin po 4–5 jedincích pocházejících ze záměrného křížení výběrových stromů 60×61, 60×16 [v porostu dvakrát], 60×26, 30×61, 11×15, 11×34, 11×16).

Původ jednotlivých výběrových stromů uvádí Tab. 2.

Tab. 2 Přehled výběrových stromů (prarodičů a rodičů jedinců v pokusných porostech)

Rodičovský strom	Zkratka	Pohlaví*	Lokalita	Okres	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Nadmořská výška (m n.m.)
880011	11	1	Hrušky	Břeclav	48°49′	16°56′	195
880015	15	2	Hrušky	Břeclav	48°49′	16°56′	192
880016	16	2	Hrušky	Břeclav	48°48′	16°56′	192
880026	26	2	Hrušky	Břeclav	48°48′	16°57′	193
880030	30	1	Praha-Slovanský ostrov	Praha	50°05′	15°25′	183
880032	32	2	Praha-Kampa	Praha	50°05′	15°24′	182
880034	34	2	Poděbrady	Nymburk	50°08′	15°07′	185
880060	60	1	Starý Kolín	Kolín	50°01′	15°17′	198
880061	61	2	Starý Kolín	Kolín	50°01′	15°17′	198
006/70	B1	2	Praha-Střelecký ostrov	Praha	50°05′	15°25′	185
021/70	B14	2	Přerov nad Labem	Nymburk	50°11′	14°17′	173

Pozn.: *1 = ♀, 2 = ♂

5 METODIKA

5.1 Výběr rodičovských komponent ke křížení

Z prvního porostu byli vybráni samičí a samčí jedinci (Tab. 3) z potomstev stejných rodičů (typ křížení sestra×bratr, tj. S×B) za účelem získání rodičovských komponent ke kontrolovanému opylení, tj. k získání generace I₂. Jako kontrola sloužilo potomstvo získané: a) z cizosprášení matek, u kterých bylo provedeno druhé příbuzenské křížení, b) z cizosprášení matek z volného sprášení prarodičů a c) v posledním roce bylo získáno i potomstvo z cizosprášení prarodičky.

Nalezené jednodomé stromy byly použity ve třech typech křížení; samostatně jako mateřský, nebo otcovský komponent, nebo bylo provedeno samoopylení.

Z druhého porostu byli k záměrnému křížení vybráni samičí a samčí jedinci ze stejné skupiny sourozenců. Jako kontrola sloužilo potomstvo získané z CS ze samičích stromů použitých ke křížení.

Výběry jednotlivých matek a otců ke křížení a následné opylování byly provedeny v letech 2009, 2010 a 2011.

Tab. 3 Rodičovské kombinace použité ke křížení a jejich potomstva

Rodičovská kombinace		Potomstvo
matka	otec	
S	B	S (I ₁), B (I ₁)
S (I ₁)	B (I ₁)	S (I ₂), B (I ₂)
S (I ₁)	neznámý	S (I ₁) (CS ₁)
M	neznámý	M (CS ₁)
M (CS ₁)	neznámý	M (CS ₂)

Pozn.: S = samičí genotyp z potomstva první generace, B = samčí genotyp z potomstva první generace, M = samičí genotyp z výchozího křížení (P₁), I₁ a I₂ = první a druhá generace z příbuzenského opylení S×B, CS₁ a CS₂ = první a druhá generace cizosprášení

5.2 Fenologie kvetení

V rámci zjišťování pohlaví jednotlivých stromů byla v roce 2011 sledována jejich fenologie kvetení. Pro vyhodnocení intenzity kvetení byly rozlišeny 4 kategorie, a to: nekvete (bez květů), kvete slabě (výskyt několika málo květů), kvete středně a kvete silně (koruna stromu

obalená květy). Zařazení do jednotlivých kategorií bylo prováděno vizuálně. V roce 2011 byl také sledován termín kvetení jednotlivých stromů.

5.3 Opylování a získání semen

Z porostu (ve třech po sobě jdoucích letech) byly ve stádiu před rozkvetem (záviselo na počasí v daném roce) odebrány samičí a samčí květní větve. Samičí větve byly umístěny do chladicího boxu ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Samčí květní větve byly umístěny do lahví s vodou do oddělených místností ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), aby nedošlo ke smíchání pylů. Sebraný pyl byl v řádně označených váženkách opatřených zábrusovým uzávěrem uložen do exsikátoru se silikagelem do lednice ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Poté byly samičí květní větve přeneseny do lahví s vodou do skleníku pro minimalizaci rizika sprášení neznámým pylem. Po celou dobu pokusu byla v intervalu 3–4 dnů měněna voda v lahvích. Jednotlivé větve byly po 3–4 dnech na bazální části zkracovány, aby lépe přijímaly vodu, tj. aby došlo k odstranění části vodivých pletiv ucpaných namnoženými bakteriemi z vody. Krátce před rozkvetem byly větve s květními pupeny izolovány pomocí prodyšných světlých papírových izolátorů (Příloha 1). Druhý den, kdy už byly květy receptivní, proběhlo záměrné kontrolované opylení (KO). Pyl byl do izolátorů foukán pomocí gumového balónku propíchnutým otvorem v izolátoru. Po opylení byl otvor zalepen. Opylení se opakovalo 3–4 krát. Za dva dny po posledním opylení byly izolátory odstraněny. Těsně před prasknutím tobolek byly tobolky izolovány pomocí organýtynových izolátorů k zachycení semen s chmýřím (Příloha 1). Zralá semena s chmýřím byla za účelem lepšího oddělení semen od chmýří uskladněna v bednách (Příloha 1). Do 4 dnů byla semena pomocí foukací pistole a síť separována od chmýří. Jednotlivá získaná semena byla ihned vyseta na povrch zeminy do truhlíků, které byly umístěny do skleníku (Příloha 2).

5.4 Volné opylení

Z vybraných samičích (i jednodomých) stromů použitých ke křížení (KO) byly těsně před uvolněním semen vzniklých z cizosprášení (CS) odebrány větve s tobolkami. Větve byly umístěny do lahví s vodou do skleníku. Postup získání semen a jejich vyšetí byl proveden stejně jako v případě záměrného opylení (viz kapitola 5.3).

5.5 Zkouška klíčivosti (stanovení energie klíčení a klíčivosti)

U semen získaných z jednotlivých variant byla zjišťována energie klíčení a klíčivost dle ČSN 48 1211-Lesní semenářství-sběr, kvalita a zkoušky kvality semenného materiálu lesních dřevin (2006). Zkouškou klíčivosti se podle normy zjišťuje počet čistých semen, která za příznivých podmínek a za uvedenou dobu vyklíčí a pravděpodobně se vyvinou v normální a zdravé semenáčky. Za normálně klíčící semena se rozumí semena, u nichž lze očekávat podle jejich zdravých děloh a kořínků, případně zdravých kořínků a částečně poškozených děloh, že z nich vyrostou normální zdravé semenáčky. V případě *P. nigra*, tj. epigeicky klíčícího druhu, se za normálně klíčící považují semena, jejichž nepoškozený primární kořínek (klíček) společně s hypokotylem je 4 krát delší než je délka semene. Semena a/nebo semenáčky, napadené houbami, se hodnotí jako normálně klíčící, pokud je zřejmé, že zdrojem nákazy není hodnocené semeno.

Zkoušky jsou prováděny na čistých semenech, která se vyberou z celkového množství metodou náhodného výběru a to ve 4 opakováních po 100 ks semen.

Semena *Populus* spp. by měla být, za účelem zaklíčení, kladena na povrch jedné nebo více vrstev filtračního papíru, který je umístěn na Jacobsenových klíčidlech (samostatně nebo na savé podložce) nebo v nádobách v klimatizovaných skříních nebo místnostech. V tomto případě byla semena zakličována na povrchu substrátu (množárenský substrát s perlitem), aby se vyloučila ztráta semenáčů při přemísťování zakořeněných semenáčů z filtračního papíru do zeminy a tím zůstalo zachováno co nejvyšší možné množství semenáčů k dalším pokusům.

Teplota, kterou by měla být semena *Populus* spp. vystavena při jejich umístění na povrchu substrátu, by měla být střídavá, konkrétně 16 hodin potmě při teplotě 20 ± 2 °C a 8 hodin na světle při teplotě 30 ± 2 °C, přičemž by změna teplot neměla trvat déle než 3 hodiny. Jako alternativu uvádí norma inkubaci při stálé teplotě 20 ± 2 °C.

Energie klíčení (germination energy = GE) semen *Populus* spp. se vypočítá jako aritmetický průměr normálně vyklíčených semen ze 4 opakování za 3 dny od začátku zkoušky vyjádřený v procentech všech zaklíčených semen.

Klíčovost (germination capacity = GC) semen *Populus* spp. se vypočítá jako aritmetický průměr normálně vyklíčených semen ze 4 opakování za 10 dnů od začátku zkoušky vyjádřený v procentech všech zaklíčených semen. V případě překročení povoleného rozdílu mezi nejvyšší a nejnižší zjištěnou klíčivostí vypočítaných aritmetických průměrů jednotlivých opakování se musí zkouška klíčivosti opakovat. Výsledek zkoušky klíčivosti se uvádí v procentech jako celé číslo.

5.6 Ochrana semenáčů

Nad získané semenáče byly umístěny leповé desky potřené nevysýchavým lepem Chemstop, které sloužily k odchytu dospělců smutnic *Sciara*, jako prevence proti naklazení jejich larev do substrátu. Larvy škodí žírem kořínků a krčků semenáčků. I přesto bylo na jaře 2009 nutné ještě ošetřit substrát se semenáčky postříkem Regent kvůli vysokému výskytu larev tohoto dvoukřídlého hmyzu. Na jaře 2010 bylo zaznamenáno padání semenáčů způsobené oomycetem *Pythium* a proto byly semenáče ošetřeny roztokem Acrobat MC. Přesazené semenáče bylo také potřeba chránit na venkovní ploše před požíráním slimáky pomocí granulí Ferramol.

5.7 Polní hodnocení semenáčů

Získané semenáče ze všech variant opylení byly v roce křížení (2009, 2010 a 2011) přesazeny do sadbovačů QuickPot typu QP 35T se substrátem (kontejnerovací substrát pro listnáče) do záhonu v uspořádání znáhodněných bloků o 4 opakováních (Příloha 2). Ve druhém roce byly semenáče přesazeny do volné půdy na venkovní experimentální plochu opět v uspořádání znáhodněných bloků ve 4 opakováních (Příloha 2).

Tab. 4 Stupnice intenzity napadení rzí *M. larici-populina* (BENETKA a kol. 2005)

Body	Intenzita napadení
0	listy bez symptomů rzí
1	listy s malými kupičkami rzí na polovině listů
2	malé kupičky rzí na většině listů
3	velké skvrny rzí nebo kompletní pokrytí listu rzí na všech listech
4	list kompletně pokryt rzí, počáteční listová nekróza
5	všechny listy nekrotické nebo opadané

Několikrát během vegetace (druhého, případně třetího a čtvrtého roku hodnocení pokusu) byl hodnocen stupeň napadení rzí *Melampsora larici-populina* Kleb. pomocí šestibodové stupnice (Tab. 4, BENETKA a kol. 2005). Během první vegetace nebyla hodnocena odolnost semenáčů ke rzí, protože byly moc malé a nedal se mezi nimi pozorovat rozdíl v napadení. Na konci vegetačního období byly vždy změřeny růstové znaky, přičemž výška rostlin byla v prvních dvou letech změřena s přesností 0,01 m, ve třetím roce s přesností 0,05 m a ve čtvrtém s přesností na 0,1 m. Tloušťka rostlin byla hodnocena až ve druhém roce života (v prvním

roce byly semenáče velmi tenké a při jejich měření hrozilo nebezpečí jejich mechanického poškození) ve výšce 0,05 m nad zemí s přesností na 0,1 mm, v dalších letech ve výšce 0,5 m s přesností 1 mm. Přehled provedených polních hodnocení uvádí Tab. 5. Průběžně byla také sledována mortalita semenáčů jednotlivých kombinací.

Tab. 5 Přehled provedených polních hodnocení v jednotlivých letech

Polní hodnocení / Rok	2009	2010	2011	2012
Hodnocení napadení rzí	-	S9	S9, S10	S9, S10
Výška	S9	S9, S10	S9, S10, S11	S9, S10, S11
Tloušťka v 0,5m	-	-	S9	S9, S10
Tloušťka v 0,05m	-	S9	S10	S11

Pozn.: S9 = semenáče z roku 2009, S10 = semenáče z roku 2010, S11 = semenáče z roku 2011

5.8 DNA analýzy

5.8.1 Příprava materiálu na analýzy DNA

Během vegetace bylo odebráno do mikrozkmavek 2–5 nejmladších čerstvých listů jednotlivých semenáčů (vybrané semenáče z roku 2009 a 2010 a po 3 vzorcích z různých míst na 2 jednodomých rodičovských stromech) na analýzy DNA. Celkem se jednalo o 860 vzorků. Listy byly zchlazeny, poté zmrazeny v tekutém dusíku a následně lyofilizovány. Od každého vzorku bylo naváženo 20 mg suchých lístků. Po přidání 2-3 skleněných kuliček došlo v oscilačním mlýnku TissueRuptor (Retsch) pomocí rychlého třesení k narušení, rozdrčení a homogenizaci rostlinných pletiv na prach.

5.8.2 Izolace DNA

Z takto připraveného suchého materiálu byla podle návodu výrobce (Příloha 3) extrahována celková DNA pomocí komerční sady DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

5.8.3 Změření koncentrace DNA

U jednotlivých izolátů DNA byla pomocí NanoDrop (Thermo Scientific) změřena koncentrace a čistota vzorků. Dle zjištěné koncentrace byly vzorky naředěny sterilizovanou a deionizovanou destilovanou H₂O do potřebné koncentrace, tj. 5 ng.μl⁻¹, na objem 50 μl na vlastní analýzy DNA.

5.8.4 Genetické analýzy DNA

Na vlastní genetické analýzy bylo použito celkem 8 mikrosatelitových DNA lokusů (simple sequence repeat, tj. SSR), vyvinutých pro druh *P. nigra* L.: WPMS 04, WPMS 07, WPMS 09, WPMS 12 (VAN DER SHOOT a kol. 2000), WPMS 14, WPMS 16, WPMS 20 (SMULDERS a kol. 2001) a PMGC14 dostupný z databáze Poplar Molecular Genetics Cooperative (<http://poplar2.cfr.washington.edu/pmgc>). Všechny lokusy byly jednotlivě amplifikovány pomocí techniky PCR. Pro markery WPMS 04, WPMS 07, WPMS 09, WPMS 12 a PMGC14 byl použit protokol podle VAN DER SHOOTA a kol. (2000), pro markery WPMS 14, WPMS 16, WPMS 20 protokol podle SMULDERSE a kol. (2001) (Tab. 6). Reverzní primery byly značeny fluorescenčními barvivy (FAM, VIC, NED, PET). Po amplifikaci byly smíchány čtyři produkty PCR (čtyři SSR lokusy s různými fluorescenčními barvivy) s deionizovaným formamidem a velikostním standardem GeneScan 500 bp (Applied Biosystems) značeného fluorescenční barvou LIZ a byla provedena fragmentační analýza v automatickém analyzátoru ABI 310 (Applied Biosystems). Pomocí volně stažitelného programu Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems) byly zjištěny velikosti alel.

Tab. 6: Vlastnosti použitých mikrosatelitních markerů a jejich produktů

Mikrosatelitový lokus	Fluorescenční barva	Podmínky amplifikace*	Motiv opakování	Velikost fragmentů bp
WPMS04	PET	NP 55	(GT) ₂₅	245-318
WPMS07	VIC	LP 55	(GT) ₂₄	218-270
WPMS09	PET	LP 60	(GT) ₂₁ (GA) ₂₄	246-298
WPMS12	NED	NP 50	(GT) ₁₉	157-183
WPMS14	VIC	LP 60	(CGT) ₂₈	215-287
WPMS16	FAM	LP 55	(GTC) ₈	140-161
WPMS20	NED	NP 60	(TTCTGG) ₈	222-252
PMGC14	FAM	NP 50	(CTT) _n	178-256

Pozn.: * 50, 55, 60 = teplota nasedání primeru; NP = 1 cyklus 3min 94 °C, 30 cyklů (5 sec 94 °C, 15 sec při teplotě nasedání primeru, 60 sec 72 °C) 10 min 72 °C; LP = 1 cyklus 3min 94 °C, 30 cyklů (45 sec 94 °C, 45 sec při teplotě nasedání primeru, 105 sec 72 °C) 10 min 72 °C

5.9 Vyhodnocení výsledků

5.9.1 Kvetení

V prvním porostu byly pomocí testu dobré shody (χ^2) zjišťovány štěpné poměry zastoupení pohlaví v potomstvech jednotlivých rodičovských kombinací, matek, typů opylení anebo

celého porostu. V případě četností menších než pět byla použita Yatesova korekce. Nalezení jednodomí jedinci nebyli do výpočtu zahrnuti, aby nedošlo ke zkreslení výsledků.

Ve stejném souboru byla testována nulová hypotéza o nezávislosti fenologie kvetení na původu rodičovských stromů.

5.9.2 Zkouška klíčivosti

V případě více než jednoho výsevu semen ze stejného křížení nebo více než jednoho odebraného VS byl upraven počet vyklíčených semen na vážený průměr z provedených výsevů.

Pomocí Mann-Whitneyova anebo Kruskal-Wallisova testu zjištěných hodnot GE a GC byla ověřována možnost statisticky průkazných rozdílů v rámci provedených typů opylení (Příloha 4).

Asociace mezi rozdílnými typy opylení, nebo rozdílnými lety, v rámci GE nebo GC potomstev jednodomých stromů byly analyzovány pomocí testu dobré shody ($\alpha < 0,05$). Síla těchto asociací byla stanovena pomocí Cramerova koeficientu V.

5.9.3 Polní hodnocení

Získaná data z polních hodnocení byla analyzována s použitím programu Statistica 8.0 software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

Pro každý termín hodnocení zdravotního stavu (stupeň napadení rzí) u všech populací byly určeny relativní četnosti. Pro porovnání závislosti původu semenáčů a zastoupení v jednotlivých kategoriích byl použit test dobré shody. Aby teoretické četnosti splňovaly podmínky testovacího kritéria (teoretické četnosti byly větší než 5), byly porovnávány rozdíly mezi odlišnými typy křížení a kategorie napadení rzí byly rozděleny pouze do dvou tříd (interval hodnot $0 \leq x < 3$ a $3 \leq x < 5$; pouze u semenáčů získaných v roce 2009 v prvním porostu byly intervaly hodnot $0 \leq x < 2$ a $2 \leq x < 5$ u hodnocení v roce 2010 a 2011).

Pro jednotlivá hodnocení růstových vlastností (výška, tloušťka) získaných semenáčů byly vypočítány popisné charakteristiky (četnost, aritmetický průměr, směrodatná chyba průměru). V případě splnění podmínek normálního rozdělení dat, tj. normality a homogenity, byla data dále vyhodnocována pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), statisticky významně odlišné skupiny byly následně zjišťovány podle Duncanova testu. V případě nesplnění podmínek ANOVA byla ke zpracování dat použita neparametrická obdoba analýzy rozptylu (Kruskal-Wallisův test), po které následoval test mnohonásobného porovnání. Jako závislé proměnné

byly použity pozorované charakteristiky (výška, tloušťka) a jako nezávislá proměnná byla použita varianta opylení (Příloha 4).

Testy byly prováděny na hladině významnosti $\alpha < 0,05$.

Inbrední deprese δ byla vypočtena podle vztahu $\delta = 1 - (W_i \cdot W_o^{-1})$, kde W_i je průměrná hodnota znaku sady inbredních jedinců a W_o je průměrná hodnota znaku sady jedinců z nepříbuzenského opylení (LANDE & SCHEMSKE 1985).

5.9.4 Genetické analýzy

Ke statistickému zpracování genetických dat byl použit volně stažitelný program Cervus 3.0 (KALINOWSKI a kol. 2007). Pro každý SSR lokus byly vypočteny standardní populačně genetické parametry k určení vypovídací hodnoty lokusů a ke zjištění genetické variability: počet alel (k), pozorovaná (H_{Obs}) a očekávaná (H_{Exp}) heterozygotnost (NEI 1978). Dále polymorfni informační obsah (PIC , tj. polymorphic information content), což je míra informativnosti vztažená k očekávané heterozygotnosti, a frekvenci alel (HEARNE a kol. 1992). Byla také stanovena průkaznost odchylek od Hardy-Weinbergova equilibria. V případě, že Cervus neprovedl Hardy-Weinbergův test, neznamená to problém s daty, ale že bylo testováno příliš málo jedinců. Protože je testováno víc lokusů zároveň, existuje relativně vysoká pravděpodobnost, že přinejmenším jeden z nich může náhodně ukázat průkaznou odchylku na hladině významnosti 5 %, tj. chybu prvního stupně, a proto byla do výpočtu zahrnuta Bonferroniho korekce. Pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) byla testována průkaznost rozdílu hodnot k , H_{Obs} , H_{Exp} mezi semenáči pocházejících z jednotlivých typů křížení. Za účelem potvrzení mateřských i otcovských genotypů byla provedena rodičovská analýza pomocí spolehlivosti LOD skóre (tj. logarithm of the odds score, což je logaritmus hodnoty poměru pravděpodobnosti, že jedinec je rodičem, a pravděpodobnosti, že tento jedinec nejsou příbuzní).

$H_{Obs} = \frac{N_{heteroz}}{N_{heteroz} + N_{homoz}}$, kde $N_{heteroz}$ je počet heterozygotů a N_{homoz} je počet homozygotů

$H_{Exp} = 1 - (p_1^2 + p_2^2 + \dots + p_n^2)$, kde je p frekvence i -té alely z celkového počtu n -alel na lokusu

$PIC = 1 - \sum_{i=1}^l p_i^2 - \sum_{i=1}^{l-1} \sum_{j=i+1}^l 2p_i^2 p_j^2$, kde P_i a P_j jsou frekvence populací i -té a j -té alely

Pro každou populaci byly spočítány: koeficient inbrídingu (F , tj. F_{IS}), průměrná pozorovaná heterozygotnost jedince v subpopulaci (H_I) a očekávaná heterozygotnost jedince v ekvivalentní subpopulaci s náhodným oplozením (H_S).

$$F = \left(\frac{H_{Exp} - H_{Obs}}{H_{Exp}} \right) = F_{IS} = \left(\frac{H_S - H_I}{H_S} \right), \text{ kde } H_{Exp} \text{ je očekávaná a } H_{Obs} \text{ pozorovaná}$$

heterozygotnost, H_S je očekávaná heterozygotnost jedince v ekvivalentní subpopulaci s náhodným oplozením a H_I je průměrná pozorovaná heterozygotnost jedince v subpopulaci

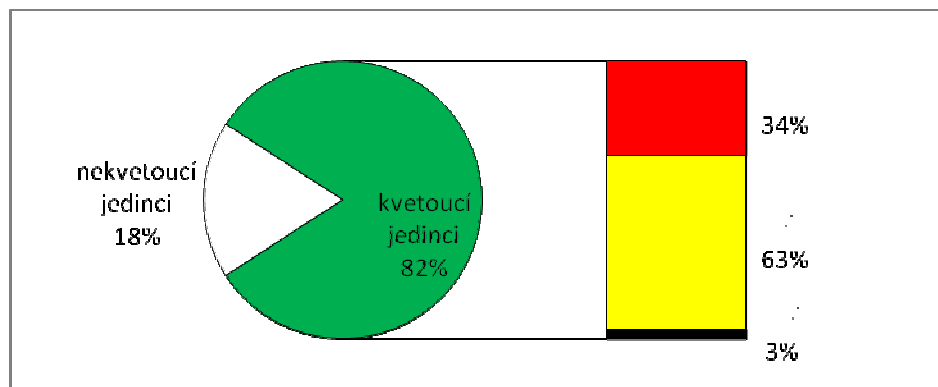
$$H_S = \frac{(H_{Exp1}N_1 + H_{Exp2}N_2 + \dots + H_{ExpN})}{N_{Total}}$$

$$H_I = \frac{(H_{Obs1}N_1 + H_{Obs2}N_2 + \dots + H_{ObsN})}{N_{Total}}$$

6 VÝSLEDKY

6.1 Poměr pohlaví

V prvním porostu bylo během let 2009 až 2011 pozorováno celkem 234 kvetoucích jedinců topolu černého; bylo určeno 65 samičích, 120 samčích a 6 jednodomých stromů (Graf 1, Tab. 7). Na jaře 2011 ještě nekvetlo 43 stromů.



Graf 1: Poměr pohlaví v prvním porostu

Tab. 7: Poměr pohlaví v prvním porostu

Rodičovská kombinace	Počet živých jedinců	Kvetení			
		♀	♂	♀♂	nekvete
2×4	32	7	14	3	8
3×4	36	6	19	1	10
5×4	68	24	29	-	15
2CS	18	8	9	1	-
3CS	10	1	9	-	-
5CS	18	7	9	-	2
2SM	27	7	18	1	1
5SM	25	5	13	-	7
suma	234	65	120	6	43

Pozn.: CS = cizosprášení, SM = opylení směsí pylu B1 a B14

Téměř všichni jednodomí jedinci v porostu, pět z šesti, pocházeli ze semen jednoho mateřského stromu (matka 2), s výjimkou jednoho (matka 3). Jednodomé rostliny vznikly z potomstev různých typů křížení; čtyři z kontrolovaného příbuzenského opylení mezi sestrou a bratrem (Me₁, Me₂, Me₄ a Me₆), jedna z kontrolovaného opylení směsí pylu z nepříbuzných samčích stromů (Me₅), jedna z CS (Me₃). Na jednotlivých jednodomých stromech byly pozorovány různé typy květenství – celé samičí jehnědy, celé samčí jehnědy a jehnědy obsahující oba typy květů najednou (Příloha 5). Abnormální kvetení těchto stromů bylo

rozpoznáváno postupně. První dva (Me₁, Me₂) byly zjištěny v roce 2009, další tři (Me₃, Me₄ a Me₅) v roce 2010 a poslední (Me₆) v roce 2011.

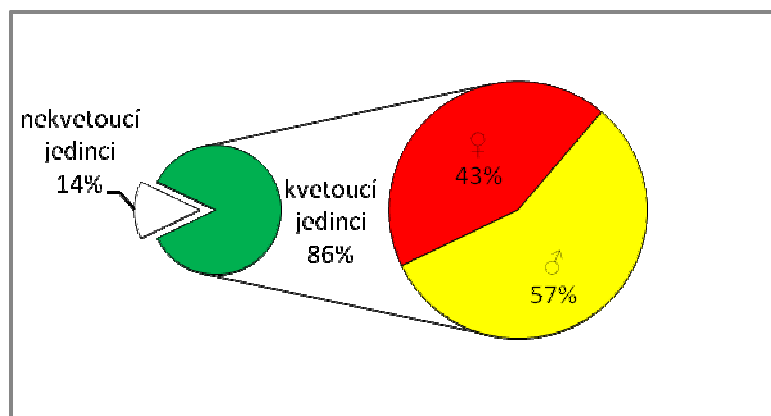
V prvním porostu byly stanoveny štěpné poměry v potomstvech (Tab. 8). Podmínky provedení *chi*-kvadrát testu byly splněny, tj. všechny očekávané četnosti byly větší než jedna a minimálně 80 % hodnot bylo větších než 5. Bylo zjištěno, že předpokládanému poměru pohlaví 1:1 odpovídaly pozorované četnosti potomstev z kombinace 2×4, 5×4, 2CS, 3CS, 5CS a 5SM; potomstva matky 5 a typu opylení CS. Zbylé skupiny potomstev neodpovídaly očekávanému poměru pohlaví ($\chi^2_{(0,05)} = 3,841$, $\chi^2_{(0,01)} = 6,635$, $\chi^2_{(0,10)} = 2,706$). Vždy převládalo samčí pohlaví. Při poměru pohlaví 1:2 se zjištěné četnosti pohlaví v rámci všech skupin potomstev průkazně nelišily na 5 % hladině významnosti ($\chi^2_{(0,05)} = 3,841$) od četností předpokládaných.

Tab. 8: Štěpné poměry pohlaví jednotlivých potomstev topolu černého

Typ opylení	Pohlaví		empirický	Poměr pohlaví			
	♀	♂		teoretický - 1:1		teoretický - 1:2	
	N	N		χ^2	P	χ^2	P
2×4	7	14	1 : 2,0	2,333	0,127	0,000	1,000
3×4	6	19	1 : 3,2	6,760	0,009*	0,980	0,322
5×4	24	29	1 : 1,2	0,472	0,492	3,406	0,065
2CS	8	9	1 : 1,1	0,059	0,808	1,441	0,230
3CS	1	9	1 : 9,0	2,143	0,143	2,449	0,118
5CS	7	9	1 : 1,3	0,250	0,617	0,781	0,377
2SM	7	18	1 : 2,6	4,840	0,028*	0,320	0,572
5SM	5	13	1 : 2,6	3,556	0,059	0,250	0,617
matka 2	22	41	1 : 1,9	5,730	0,017*	0,071	0,789
matka 3	7	28	1 : 4,0	12,600	0,000*	2,800	0,094
matka 5	36	51	1 : 1,4	2,586	0,108	2,534	0,111
KO	37	62	1 : 1,7	6,313	0,012*	0,727	0,394
CS	16	27	1 : 1,7	2,814	0,093	0,291	0,590
SM	12	31	1 : 2,6	8,395	0,004*	0,570	0,450
suma	65	120	1 : 1,8	16,351	0,000*	0,270	0,603

Pozn.: N = počet, KO = kontrolované opylení, CS = cizosprašení, SM = opylení směsí pylu B1 a B14, * pozorovaný počet neodpovídá očekávanému poměru pohlaví 1:1

Ve druhém porostu rostlo 35 jedinců topolu černého (Graf 2, Tab. 9), z čehož bylo během let 2009 až 2011 zjištěno 13 ks (37 %) samičích a 17 ks (49 %) samčích stromů. Na jaře 2011 ještě nekvetlo 5 stromů.



Graf 2: Poměr pohlaví ve druhém porostu

Tab. 9: Poměr pohlaví ve druhém porostu

Rodičovská kombinace	Počet živých jedinců	Kvetení		
		♀	♂	nekvete
60×61	5	1	1	3
60×16	9	5	4	-
60×26	5	1	4	-
30×61	4	1	3	-
11×15	4	1	2	1
11×34	4	2	2	-
11×16	4	2	1	1
suma	35	13	17	5

Pro jednotlivá křížení bylo vybráno z obou porostů celkem 63 rodičovských genotypů, konkrétně 39 samičích a 24 samčích stromů (Příloha 4). V letech 2009–2011 bylo provedeno po řadě 8, 18 a 27 KO a odebráno po řadě 15, 17 a 23 CS.

Většinu křížení nebylo možné ve všech letech opakovat kvůli nízké intenzitě kvetení některých v předešlých letech vybraných komponent pro křížení.

Závěr: V ontogeneticky mladém (7letém) porostu *P. nigra* kvetlo 82 % jedinců, poměr pohlaví byl 1 samičí strom ku 2 samčím. V tomto porostu bylo určeno i 6 jednodomých jedinců.

6.2 Intenzita a fenologie kvetení

Intenzita kvetení stromů v prvním porostu se lišila (Tab. 10). V roce 2011 nekvetla třetina jedinců. Nulová hypotéza o nezávislosti fenologie kvetení na původu (typu křížení) stromů byla zamítnuta na hladině $\alpha=0,05$, a to jak pro jednotlivá křížení ($\chi^2 = 33,009 > \chi^2_{21} (0,05) =$

32,671), tak i pro jednotlivé matky ($\chi^2 = 16,417 > \chi^2_6 (0,05) = 12,592$) a pro typy křížení ($\chi^2 = 14,308 > \chi^2_6 (0,05) = 12,592$).

Termíny kvetení jednotlivých stromů byly odlišné jak mezi sourozeneckými skupinami, tak i uvnitř skupin. Nejdříve kvetli jedinci matky č. 2 a nejpozději jedinci matky č. 5. Nejvíce stromů kvetlo 7. dubna 2011.

Tab. 10: Fenologie kvetení rodičovských stromů v prvním porostu, vyjádřeno v počtech jedinců

Typ opylení	Bohatost kvetení				Termín kvetení									
	nekvete	kvete slabě	kvete středně	kvete silně	3.4.	4.4.	5.4.	6.4.	7.4.	8.4.	9.4.	10.4.	11.4.	12.4.
2×4	9	8	9	6	-	-	3	4	8	4	1	2	1	-
3×4	20	7	6	3	-	-	-	5	4	4	-	-	2	-
5×4	32	13	15	10	-	-	5	7	14	4	2	1	2	3
2CS	2	4	7	5	-	3	3	4	5	-	-	-	1	-
3CS	1	4	2	2	-	-	-	4	3	1	-	-	-	-
5CS	4	3	4	5	-	2	1	4	2	2	-	1	-	-
2SM	4	5	8	10	1	2	5	9	3	1	-	1	-	1
5SM	11	7	4	3	-	-	-	1	2	2	3	2	2	2

Pozn.: KO = kontrolované opylení, CS = cizosprašení, SM = opylení směsí pylu B1 a B14

Tab. 11 ukazuje, že se intenzita kvetení stromů ve druhém porostu se lišila. V roce 2011 nekvetlo 31 % stromů, kvetlo slabě 40 % stromů, kvetlo středně 11 % stromů a kvetlo silně 17 % stromů. Jedinci kvetli od 9. do 11. dubna 2011.

Tab. 11: Fenologie kvetení rodičovských stromů v druhém porostu, vyjádřeno v počtech jedinců

Rodičovská kombinace	Bohatost kvetení				Termín kvetení		
	nekvete	kvete slabě	kvete středně	kvete silně	9.4.	10.4.	11.4.
60×61	5	-	-	-	-	-	-
60×16	2	2	1	4	-	4	3
60×26	-	5	-	-	2	2	1
30×61	2	2	-	-	2	-	-
11×15	1	3	-	-	3	-	-
11×34	-	2	-	2	1	3	-
11×16	1	-	3	-	-	1	2

Závěr: Intenzita kvetení stromů v obou porostech se lišila. Termíny kvetení jednotlivých stromů byly odlišné jak mezi sourozeneckými skupinami, tak i uvnitř skupin.

6.3 Získávání semen a semenáčků

Termíny jednotlivých kroků při získávání semenáčků v jednotlivých letech se lišily v závislosti na počasí – ovlivňovalo fázi kvetení (Tab. 12).

Tab. 12: Termíny jednotlivých činností související se získáním semenáčků v jednotlivých letech.

Aktivita	2009	2010	2011
Sběr květních větví	26.3.–10.4.	30.3.–8.4.	1.–6.4.
Opylování (KO)	14.–18.4.	14.–29.4.	12.–15.4.
Sběr větví s tobočkami (CS)	27.–29.4.	4., 27.5.	2.–10.5.
Sběr zralých semen	6.–15.5.	11.–26.5.	2.–30.5.
Čištění semen	15.–18.5.	13.5.–7.6.	3.–31.5.
Vysetí semen	15.–18.5.	13.5.–7.6.	3.–31.5.
Přepichování semenáčků	16.6.	15.–16.6.	20.–21.6.

Pozn.: KO = kontrolované opylení, CS = cizosprášení

Závěr: Termíny jednotlivých kroků při získávání semenáčků v jednotlivých letech se lišily.

6.4 Zkouška klíčivosti

6.4.1 První porost

V roce 2009 se podařilo získat semena z 5 ze 7 provedených kontrolovaných opylení (KO). Vyklíčila semena pouze ze 3 KO; jejich energie klíčení (GE) se pohybovala v intervalu od 12,5 do 24 %, klíčivost (GC) v intervalu 21 až 83 %. Z tobolek 14 mateřských stromů odebraných z cizosprášení (CS) vyklíčila semena 13 matek; s GE v intervalu 9–86 % a GC v intervalu 11–88 %. V roce 2010 byla získána semena z 8 KO s GE od 3 do 96 % a GC od 1 do 97 %. Semena se nevytvořila v 8 případech provedených KO. Ze všech 8 odebraných CS vyklíčila semena; GE se pohybovalo v intervalu 23–87 % a GC v intervalu 15–85 %. V roce 2011 byla získána semena z 22 ze 25 provedených KO; GE bylo 2–94 % a GC bylo 5–91 %. Semena získaná z 15 CS měla 4–63 % GE a 1–62 % GC. V tomto roce bylo odebráno ještě CS z 1 z mateřských stromů jedinců prvního porostu. Semena měla 42 % GE a 23 % GC. Data z konkrétních křížení uvádí Tab. 13.

Tab. 13: Energie klíčení a klíčivost semen získaných z různých rodičovských kombinací (první porost)

Rok křížení	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Počet semen		Energie klíčení		Klíčivost	
			N	na zkoušky	N	%	N	%
2009	2×4/4 3ř	neznámý	100	100	16	16	16	16
	2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	129	100	0	0	0	0
	2×4/5 4ř	neznámý	214	100	10	10	12	12
	2×4/9 5ř	2×4/9 3ř	13	13	0	0	0	0
	2×4/9 5ř	2×4/7 4ř	48	48	6	12,5	10	21
	2×4/9 5ř	neznámý	77	77	7	9	19	24,7
	5×4/1 3ř	5×4/10 2ř	29	29	7	24	10	83
	5×4/1 3ř	neznámý	153	100	28	28	42	42
	5×4/7 5ř	5×4/10 2ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/7 5ř	neznámý	0	0	-	-	-	-
	5×4/16 5ř	5×4/14 5ř	4	4	2	50	1	25
	5×4/16 5ř	5×4/11 5ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/16 5ř	neznámý	59	59	32	54	36	61
	5×4/10 3ř	neznámý	100	100	83	83	90	90
	5×4/3 4ř	neznámý	79	79	49	62	46	78,5
	5×4/9 5ř	neznámý	10	10	6	60	6	60
	2CS/2 3ř	neznámý	100	100	56	56	62	62
	2CS/7 3ř	neznámý	100	100	86	86	88	88
	3×4/1 5ř	neznámý	46	46	3	6,5	5	11
	5×4/7 4ř	neznámý	100	100	18	18	48	48
5CS/10 2ř	neznámý	100	100	82	82	86	86	
2010	2×4/5 3ř	neznámý	13	13	3	23,1	2	15,4
	2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	84	84	44	52,4	40	47,6
	2×4/5 4ř	2×4/1 5ř	0	0	-	-	-	-
	2×4/5 4ř	5×4/7 4ř	93	93	3	3,2	1	1,1
	2×4/5 4ř	neznámý	43	43	31	72,1	24	55,8
	2×4/5 5ř	2×4/1 5ř	19	19	0	0	0	0
	2×4/5 5ř	2×4/5 4ř	807	135	65,6	80	58,1	71,1
	2×4/5 5ř	3×4/2 3ř	381	100	96	96	97	97
	2×4/5 5ř	5×4/7 4ř	135	100	60	60	52	52
	2×4/5 5ř	neznámý	263	100	73	73	66	66
	2×4/9 5ř	2×4/7 4ř	0	0	-	-	-	-
	2×4/9 5ř	neznámý	84	84	19	22,6	25	29,8
	3×4/4 5ř	5×4/1 5ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/4 3ř	2×4/6 5ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/3 4ř	5×4/10 2ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/3 4ř	neznámý	194	133	59,1	72,2	47,6	57,1
	5×4/2 5ř	5×4/10 2ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/2 5ř	3×4/4 4ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/7 5ř	3×4/10 5ř	146	100	61	61	49	49

Rok křížení	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Počet semen		Energie klíčení		Klíčivost	
			N	na zkoušky	N	%	N	%
2010	5×4/7 5ř	3×4/7 4ř	626	342	31,9	33,9	22,6	24,9
	5×4/16 5ř	5×4/14 5ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/16 5ř	neznámý	121	100	87	87	85	85
	2CS/1 2ř	neznámý	129	100	41	41	35	35
	2SM/5 3ř	neznámý	298	100	87	87	71	71
2011	2×4/6 2ř	2×4/1 2ř	338	100	16	16	13	13
	2×4/6 2ř	3×4/5 5ř	200	100	68	68	66	66
	2×4/6 2ř	neznámý	134	100	12	12	14	14
	2×4/4 3ř	2×4/1 2ř	98	98	43	43,9	21	21,4
	2×4/4 3ř	3×4/4 4ř	11	11	9	81,8	9	81,8
	2×4/4 3ř	neznámý	600	100	15	15	14	14
	2×4/5 3ř	2×4/5 3ř	362	186	72,5	77,4	58,5	62,4
	2×4/5 3ř	neznámý	177	177	21,5	24,3	27,4	32,2
	2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	26	26	12	46,2	10	38,5
	2×4/5 4ř	2×4/9 3ř	193	100	2	2	5	5
	2×4/5 4ř	Kampa	177	100	73	73	56	56
	2×4/5 4ř	neznámý	428	100	31	31	24	24
	2×4/9 5ř	2×4/5 4ř	453	100	83	83	58	58
	2×4/9 5ř	3×4/4 4ř	513	200	61	61	57	57
	2×4/9 5ř	neznámý	381	100	6	6	19	19
	5×4/3 4ř	5×4/10 2ř	49	49	4	8,2	3	6,1
	5×4/3 4ř	2×4/2 3ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/3 4ř	neznámý	147	100	10	10	6	6
	5×4/2 5ř	3×4/4 4ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/2 5ř	3×4/10 5ř	0	0	-	-	-	-
	5×4/7 5ř	5×4/7 4ř	226	200	34	34	39,5	39,5
	5×4/7 5ř	neznámý	439	100	11	11	15	15
	5×4/9 5ř	3×4/1 5ř	79	79	4	5,1	4	5,1
	5×4/10 5ř	5×4/7 4ř	14	14	8	57,1	6	42,9
	5×4/10 5ř	3×4/5 5ř	207	100	64	64	53	53
	5×4/10 5ř	neznámý	292	100	47	47	37	37
	2CS/1 2ř	2CS/1 2ř	386	200	34	34	28	28
	2CS/1 2ř	neznámý	130	100	7	7	13	13
	2CS/7 3ř	neznámý	205	100	32	32	36	36
	3×4/3 5ř	3×4/4 4ř	29	29	13	44,8	13	44,8
	3×4/3 5ř	3×4/5 5ř	34	34	32	94,1	31	91,2
	3×4/3 5ř	neznámý	400	100	4	4	1	1
	3×4/4 5ř	2×4/1 5ř	91	91	75	82,4	70	76,9
	3CS/9 5ř	neznámý	232	100	55	55	62	62
	5×4/18 4ř	5×4/10 2ř	875	266	53,8	54,1	46,7	47
5×4/18 4ř	neznámý	500	100	38	38	38	38	
5CS/19 4ř	neznámý	189	100	63	63	52	52	

Rok křížení	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Počet semen		Energie klíčení		Klíčivost	
			N	na zkoušky	N	%	N	%
2011	2SM/5 3ř	2×4/9 3ř	354	154	48,9	58,4	48,2	57,1
	2SM/5 3ř	2SM/5 3ř	284	100	76	76	71	71
	2SM/5 3ř	neznámý	687	100	8	8	1	1
	30×32/2	neznámý	500	100	42	42	23	23
	02/434	Kampa	700	200	28	28	20,5	20,5

Pozn.: N = počet

Při rozdělení potomstev do skupin podle provedeného typu křížení (rozřazení jednotlivých křížení do skupin znázorňuje Příloha 4) vykazuje v roce 2009 neprůkazně nejnižších hodnot GE/GC potomstvo pocházející ze samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení, v roce 2010 potomstvo z druhého stupně příbuzenského křížení a v roce 2011 potomstvo cizosprášené rostliny z prvního příbuzenského křížení pro GE a potomstvo z cizosprášení kontroly pro GC. Neprůkazně nejvyšší hodnoty GE/GC vykazovala v roce 2009 potomstva z druhého stupně cizosprášení, v roce 2010 potomstva z cizosprášení kontroly a v roce 2011 potomstva ze samosprášené rostliny z prvního příbuzenského křížení pro GE a potomstva z křížení s cílem dosáhnout heterózního efektu pro GC (Tab. 14).

Tab. 14: Energie klíčení (GE) a klíčivost (GC) semen získaných z různých typů křížení v letech 2009–2011 (první porost)

GE		I ₂		I ₁ S		I ₁ CS		H		CS S		CS CS		CS		K CS								
Rok	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE						
2009	3	12,2	6,9	1	0,0		9	32,5	9,4	-	-	-	-	-	-	3	74,7	9,4	-	-	-	2	52,0	2,0
2010	2	40,0	40,0	1	52,4		5	52,6	12,1	5	50,8	15,5	-	-	-	2	64,0	23,0	-	-	-	1	87,0	
2011	10	43,7	9,6	2	61,8	15,6	11	24,7	6,4	6	60,4	11,6	2	55,0	21,0	6	37,2	10,4	1	42,0		1	28,0	
GC		I ₂		I ₁ S		I ₁ CS		H		CS S		CS CS		CS		K CS								
Rok	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE			
2009	3	34,7	24,9	1	0,0		9	42,5	9,7	-	-	-	-	-	-	3	78,7	8,4	-	-	-	2	43,0	18,0
2010	2	35,6	35,6	1	47,6		5	44,8	9,5	5	44,8	16,0	-	-	-	2	53,0	18,0	-	-	-	1	85,0	
2011	10	36,9	8,4	2	50,5	12,0	11	23,3	4,9	6	56,6	11,3	2	49,5	21,5	6	36,9	10,2	1	23,0		1	20,5	

Pozn.: N = počet; SE = směrodatná chyba průměru; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterózního efektu; CS S = samosprášení rostliny pocházející z cizosprášení; CS CS = druhý stupeň cizosprášení; CS = cizosprášení původní matky; K CS = cizosprášení nepříbuzné matky (kontrola)

Šesti nalezeným jednodomým jedincům byla věnována zvláštní pozornost. Bylo zjištěno, že tyto jedinci mohou být využiti buď jako mateřský nebo otcovský komponent pro křížení a navíc jsou samoopylitelní. Ze všech provedených typů křížení byla získána životaschopná semena. Procento vyklíčených semen kolísalo v závislosti na použité metodě opylení (Tab. 15). Hodnoty GE (max 83 % u křížení $S \times Me_1$ v roce 2011) byly u kontrolovaného opylení vždy (a v některých případech volného sprášení) menší než hodnoty GC (max 82 % u křížení $Me_6 \times C$ v roce 2011).

Ve většině případů byla prokázána průkazně nízká nebo středně silná závislost hodnot GE/GC semen odvozených od příslušných jednodomých stromů a provedených typů opylení (Tab. 16). Nejsilnější asociace (0,54-0,63) byla nalezena u Me_1 a Me_5 v letech 2010 a 2011. Průkazné asociace byly také nalezeny mezi GE/GC semen pocházejících z jednotlivých jednodomých stromů a jednotlivých let opylení; a to převážně u semen z CS a samosprášení u Me_1 . Pouze u jedné pětiny provedených křížení byla pozorována slabá asociace ($\Phi = 0,01 - 0,11$).

Tab. 15: Energie klíčení (GE) a klíčivost (GC) potomstev rozdílných typů opylení šesti jednodomých jedinců *P. nigra* var. *nigra*, vyjádřený v procentech

Jednodomý genotyp	Rok	Me _x × Me _x			Me _x ×B			Me _x ×C			S×Me _x			Me _x ^{CS}		
		N	GE	GC	N	GE	GC	N	GE	GC	N	GE	GC	N	GE	GC
Me ₁	2009	129	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	10	12
	2010	84	52	48	93	3	1	-	-	-	135	80	71	143	26	18
	2011	26	46	38	100	2	5	100	73	56	100	83	58	100	31	24
Me ₂	2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46	7	11
Me ₃	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	41	35
	2011	200	34	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	7	13
Me ₄	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	23	15
	2011	186	77	62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	177	24	32
Me ₅	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	87	71
	2011	100	76	71	154	58	57	-	-	-	-	-	-	100	8	1
Me ₆	2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	16	16
	2011	-	-	-	98	44	21	11	82	82	-	-	-	100	15	14

Pozn.: N = počet semen, B = bratr, C = vzdálený příbuzný nebo nepříbuzný samčí strom, S = sestra, x = označení jednodomého stromu (1–6), CS = cizosprášení

Tab. 16: Kramerův koeficient pro energii klíčení (V_{GE}) anebo klíčivost (V_{GC}) v rámci jednotlivých typů opylení anebo let opylování

V_{GE}/V_{GC} Jednodomý genotyp	Typ opylení			Rok opylování			
	2009	2010	2011	$Me_x \times Me_x$	$Me_x \times B$	$S \times Me_x$	Me_x^{CS}
Me_1	0.09/0.11	0.59/0.57	0.63/0.53	0.50/0.46	0.03/0.11	0.04/0.14	0.32/0.23
Me_3	-	-	0.29/0.17	-	-	-	0.40/0.26
Me_4	-	-	0.53/0.30	-	-	-	0.01/0.09
Me_5	-	-	0.54/0.57	-	-	-	0.79/0.72
Me_6	-	-	0.39/0.36	-	-	-	0.30/0.32

Pozn.: Statisticky průkazné asociace odvozené *Chi*-kvadrát testem jsou vyznačeny tučně, B = bratr, S = sestra, CS = cizosprašení, x = označení jednodomého stromu (1–6)

6.4.2 Druhý porost

V roce 2009 bylo provedeno 1 KO. Semena měla 76 % GE a 82 % GC. Semena z CS stejné matky měla 40 % GE a 46 % GC. V roce 2010 byla provedena 2 KO se stejným mateřským genotypem. Získaná semena měla 40–48 % GE a 27–41 % GC. CS stejné matky mělo GE 76 % a GC 75 %. CS odebrané z jiných 6 samičích stromů tohoto porostu mělo 0–42 % GE a 0–29 % GC. V roce 2011 byla provedena stejná KO jako v předchozím roce, semena byla získána z obou křížení, vyklíčila ale jen z jednoho křížení; GE byla 48 % a GC byla 16 %. V případě CS stejné matky měla semena GE 64 % a GC 53 %. Z dalších CS odebraných z 6 jiných mateřských stromů vyklíčilo pouze 4 CS; GE se pohybovala v intervalu 3–25 %, GC v intervalu 3–21 %. Podrobnější údaje jsou v Tab. 17.

Při rozdělení potomstev do dvou skupin podle provedeného typu opylení (tj. inbrídingu a cizosprašení) vykazuje potomstvo z CS neprůkazně nižších hodnot GE/GC oproti příbuzenskému křížení ve všech letech, s výjimkou roku 2011, kdy je to naopak (Tab. 18).

Tab. 17: Energie klíčení a klíčivost semen získaných z různých rodičovských kombinací (druhý porost)

Rok křížení	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Počet semen		Energie klíčení		Klíčivost	
			N	<i>na zkoušky</i>	N	%	N	%
2009	60×16/2	60×16/1	100	100	76	76	82	82
	60×16/2	neznámý	100	100	40	40	46	46
2010	60×16/2	60×16/1	330	200	39,5	39,5	26,5	26,5
	60×16/2	60×16/5	554	138	41,5	47,8	36,8	41,3
	60×16/2	neznámý	169	100	76	76,0	75	75,0
	60×16/3	neznámý	100	100	6	6,0	3	3,0
	60×16/4	neznámý	100	100	2	2,0	0	0,0
	60×61/4	neznámý	26	26	0	0,0	0	0,0
	60×26/1	neznámý	100	100	38	38,0	23	23,0
	30×61/4	neznámý	100	100	4	4,0	4	4,0
	11×15/3	neznámý	100	100	42	42,0	29	29,0
	11×34/1	neznámý	100	100	6	6,0	1	1,0
11×34/4	neznámý	100	100	70	70,0	45	45,0	
2011	60×16/2	60×16/1	136	100	0	0,0	0	0,0
	60×16/2	60×16/5	212	100	48	48,0	16	16,0
	60×16/2	neznámý	395	292	63,0	63,7	52,9	53,4
	60×16/3	neznámý	30	30	1	3,3	1	3,3
	60×26/1	neznámý	327	100	20	20,0	18	18,0
	30×61/4	neznámý	90	90	0	0,0	0	0,0
	11×15/3	neznámý	151	100	0	0,0	0	0,0
	11×34/2	neznámý	358	128	10,8	12,5	8,6	8,6
11×34/4	neznámý	52	52	4,3	25,0	3,8	21,2	

Tab. 18: Energie klíčení (GE) a klíčivost (GC) semen získaných z různých typů křížení v letech 2009–2011 (druhý porost)

Typ křížení	GE	2009			2010			2011		
		N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE
I ₁	1	76,0	-	2	43,7	4,2	2	24	24,0	
CS	1	40,0	-	9	27,1	10,1	7	17,8	8,5	
Typ křížení	GC	2009			2010			2011		
		N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE
I ₁	1	82,0	-	2	33,9	7,4	2	8	8,0	
CS	1	46,0	-	9	20	8,7	7	14,9	7,2	

Pozn.: N = počet; SE = směrodatná chyba průměru; I₁ = první stupeň příbuzenského křížení (bratrský genotyp 60×16/1 a 60×16/5); CS = cizosprášení

Závěr: Nejnižší hodnoty energie klíčení a klíčivosti měla potomstva pocházející z I₂ generací nebo ze samosprášení a nejvyšší hodnoty měla potomstva z cizosprášení, s výjimkou druhého porostu, kde měla potomstva z cizosprášení nižší hodnoty v porovnání s potomstvy z prvního inbrídingu. Bylo zjištěno, že jednodomí jedinci mohou být využiti buď jako mateřský nebo

otcovský komponent pro křížení a navíc jsou schopni autogamie; ze všech provedených typů křížení byla získána životaschopná semena.

6.5 Polní hodnocení

Uvedené počty potomků jednotlivých typů opylení jsou upraveny podle výsledků analýz DNA (tj. jedinci byli přeřazeni do skupin podle zjištěného otcovského genotypu, viz kapitola 1.6). Rozřazení jednotlivých křížení do skupin znázorňuje tabulka v Příloha 4.

6.5.1 Mortalita

6.5.1.1 První porost

První ztráty semenáčů získaných z křížení v roce 2009 vznikly během první zimy a rok od roku se nepatrně zvyšovaly (Tab. 19), přičemž se během druhé zimy, po vysazení semenáčů na pole, jejich mortalita zvýšila výrazněji. Na konci čtvrtého vegetačního období byla neprůkazně nejvyšší mortalita semenáčů (20 %) u rostlin pocházejících z druhého příbuzenského křížení a nejnižší (3 %) u rostlin pocházejících z cizosprášení nepříbuzných matek.

Tab. 19: Podíl živých semenáčů 2009 (v procentech) pocházejících z různých křížení (první porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	2009		2010		2011		2012		
		léto	podzim	jaro	podzim	jaro	podzim	jaro	podzim	
		N	%	%	%	%	%	%	%	
2×4/9 5r	2×4/7 4r	8	100	100	100	100	75	75	75	75
5×4/1 3r	5×4/10 2r	7	100	100	100	100	100	86	86	86
2×4/4 3r	neznámý	16	100	100	100	100	100	100	100	100
2×4/5 4r	neznámý	13	100	100	100	100	92	92	92	92
2×4/9 5r	neznámý	9	100	100	89	89	89	89	78	78
3×4/1 5ř	neznámý	4	100	100	100	100	75	75	75	75
5×4/1 3ř	neznámý	32	100	100	100	100	97	97	97	97
5×4/9 5ř	neznámý	3	100	100	100	100	100	100	100	100
2CS/7 3ř	neznámý	28	100	100	100	100	86	86	86	86
5CS/10 2ř	neznámý	36	100	100	97	97	89	83	83	83
kontrola	neznámý	34	100	100	100	100	97	97	97	97
	I ₂	15	100	100	100	100	87	80	80	80
	I ₁ CS	77	100	100	99	99	95	95	94	94
	CS CS	64	100	100	98	98	88	84	84	84
	K CS	34	100	100	100	100	97	97	97	97

Pozn.: I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; CS CS = druhý stupeň cizosprášení; K CS = cizosprášení nepříbuzné matky (kontrola)

Mortalita semenáčů vzniklých z kontrolovaného i volného opylení vybraných matek z prvního porostu v roce 2010 byla téměř nulová (Tab. 20). Celkem uhynuly pouze 4 rostliny ze 428 vysazených, a to v druhém roce po výsadbě 3 ks a v dalším roce 1 ks. Ani jedna uhynulá rostlina nepocházela z cizosprášení, ale ani ze samosprášení jednodomé rostliny.

Tab. 20: Podíl živých semenáčů 2010 (v procentech) pocházejících z různých křížení (první porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	léto N	2010		2011		2012	
			%	podzim %	jaro %	podzim %	jaro %	podzim %
2×4/5 5ř	2×4/5 4ř	102	100	100	100	100	99	99
2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	35	100	100	100	100	100	100
2×4/5 4ř	neznámý	17	100	100	100	100	100	100
2×4/5 5ř	neznámý	60	100	100	100	100	100	100
5×4/7 5ř	3×4/7 4ř	43	100	100	100	98	98	98
2×4/5 5ř	3×4/2 3ř	128	100	100	99	99	99	99
2×4/5 5ř	5×4/7 4ř	39	100	100	97	97	97	97
5×4/7 5ř	3×4/10 5ř	4	100	100	100	100	100	100
	I ₂	102	100	100	100	100	99	99
	I ₁ S	35	100	100	100	100	100	100
	I ₁ CS	77	100	100	100	100	100	100
	H	214	100	100	99	99	99	99

Pozn.: N = počet jedinců; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterozního efektu

Na konci první vegetace uhynul minimálně jeden semenáček z 90 % (u 34 z celkem 38) rodičovských kombinací a počet přeživších rostlin se v čase snižoval (Tab. 21). Na konci druhého vegetačního období byla nejvyšší mortalita semenáčů u rostlin pocházejících z cizosprášení původního rodiče, nižší u rostlin pocházejících z jednodomých rodičů, pak z rostlin pocházejících z druhého stupně příbuzenského křížení a z rostlin pocházejících ze samosprášení a cizosprášení cizosprášených matek. Nejméně uhynulo semenáčů pocházejících z křížení za účelem dosažení heterozního efektu. Průkazný rozdíl v mortalitě semenáčů byl zjištěn jen mezi skupinami H a CS a to jen na konci roku 2011 a 2012.

Tab. 21: Podíl živých semenáčů 2011 (v procentech) pocházejících z různých křížení (první porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	2011			2012	
		léto		podzim	jaro	podzim
		N	%	%	%	%
2×4/4 3ř	3×4/4 4ř	9	100	100	100	89
2×4/4 3ř	2×4/1 2ř	20	100	85	85	80
2×4/5 3ř	2×4/5 3ř	50	100	80	78	64
2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	10	100	90	90	80
2×4/5 4ř	2×4/9 3ř	3	100	33	33	33
2×4/9 5ř	2×4/5 4ř	44	100	73	66	43
2SM/5 3ř	neznámý	40	100	93	93	93
2SM/5 3ř	2SM/5 3ř	43	100	98	98	98
2SM/5 3ř	2×4/9 3ř	52	100	92	88	81
2CS/1 2ř	neznámý	8	100	75	75	75
2CS/1 2ř	2CS/1 2ř	47	100	68	64	51
2×4/4 3ř	neznámý	11	100	73	73	64
2×4/5 3ř	neznámý	44	100	73	73	66
2×4/5 4ř	neznámý	47	100	87	79	51
2×4/5 4ř	Kampa	33	100	88	85	73
2×4/6 2ř	3×4/5 5ř	42	100	98	95	95
2×4/9 5ř	3×4/4 4ř	40	100	98	93	88
3×4/4 5ř	2×4/1 5ř	46	100	91	91	89
5×4/10 5ř	3×4/5 5ř	40	100	98	98	98
5×4/9 5ř	3×4/1 5ř	4	100	100	75	75
2×4/6 2ř	2×4/1 2ř	36	100	89	89	75
3×4/3 5ř	3×4/5 5ř	28	100	100	100	93
3×4/3 5ř	3×4/4 4ř	11	100	91	91	64
5×4/18 4ř	5×4/10 2ř	46	100	87	80	67
5×4/10 5ř	5×4/7 4ř	7	100	100	100	86
5×4/3 4ř	5×4/10 2ř	2	100	50	0	0
5×4/7 5ř	5×4/7 4ř	40	100	95	85	85
2×4/9 5ř	neznámý	23	100	78	74	48
2CS/7 3ř	neznámý	40	100	95	85	83
2×4/6 2ř	neznámý	11	100	73	73	36
30×32/2	neznámý	40	100	65	63	43
3×4/3 5ř	neznámý	22	100	59	45	41
3CS/9 5ř	neznámý	40	100	75	65	53
5×4/18 4ř	neznámý	40	100	63	55	50
5CS/19 4ř	neznámý	40	100	90	90	78
5×4/10 5ř	neznámý	40	100	95	90	78
5×4/3 4ř	neznámý	6	100	33	17	17
5×4/7 5ř	neznámý	15	100	80	73	13

Typ křížení	2011			2012	
	léto		podzim	jaro	podzim
	N	%	%	%	%
I ₂	237	100	87	82	70
I ₁ S	60	100	82	80	67
I ₁ CS	292	100	77	72	55
H	181	100	96	94	92
CS S	90	100	82	80	73
CS CS	220	100	89	84	77
CS	40	100	65	63	43

Pozn.: N = počet jedinců; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterozního efektu; CS S = samosprášení rostliny pocházející z cizosprášení; CS CS = druhý stupeň cizosprášení; CS = cizosprášení původní matky

Při porovnání mortality semenáčů pocházejících z různých křížení s použitím jednodomých rostlin jako alespoň jednoho rodičovského komponentu (Tab. 22) přežilo do konce druhého vegetačního období nejméně rostlin z druhého stupně příbuzenského křížení a nejvíce rostlin pocházejících z křížení s cílem dosažení heterozního efektu a druhého stupně cizosprášení.

Tab. 22: Podíl živých semenáčů 2011 (v procentech) pocházejících z různých křížení s použitím jednodomých rostlin jako alespoň jednoho rodičovského komponentu (první porost)

Typ křížení	2011			2012	
	léto		podzim	jaro	podzim
	N	%	%	%	%
I ₂	67	100	75	70	54
I ₁ S	60	100	82	80	67
I ₁ CS	135	100	81	78	62
H	13	100	100	92	85
CS S	90	100	82	80	73
CS CS	100	100	91	89	85

Pozn.: N = počet jedinců; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterozního efektu; CS S = samosprášení rostliny pocházející z cizosprášení; CS CS = druhý stupeň cizosprášení

6.5.1.2 Druhý porost

Z tabulky (Tab. 23) je patrné, že se mortalita vyskytla u rostlin vzniklých z příbuzenského křížení provedeného v roce 2009 už v prvním roce výsadby na rozdíl od křížení vzájemně nepříbuzných jedinců. Jedná se o 5 rostlin pocházejících z křížení 60×16/2 × 60×16/1, u nichž nebyla provedena analýza DNA, protože uhynuli dřív, než byly odebrány listy potřebné

k analýze. Počet přeživších semenáčů v tomto křížení byl po třech letech od výsadby o 14 % menší než u rostlin pocházejících z nepřibuzenského křížení. Od založení pokusu uhynulo celkově 26 % semenáčů z prvního příbuzenského křížení (typ S×B) a 12 % jedinců z cizosprášení.

Tab. 23: Podíl živých semenáčů 2009 (v procentech) pocházejících z různých křížení (druhý porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	2009		2010		2011		2012		
		léto	podzim	jaro	podzim	jaro	podzim	jaro	podzim	
		N	%	%	%	%	%	%	%	
60×16/2	60×16/1	81*	100	94	94	94	79	78	78	78
60×16/2	60×16/5	5	100	100	40	40	20	20	20	20
60×16/2	neznámý	16	100	100	88	88	88	88	88	88
60×16/2	60×26/3	16	100	100	94	94	94	88	88	88
	I ₁	86	100	94	91	91	76	74	74	74
	CS	32	100	100	91	91	91	88	88	88

Pozn.: * za předpokladu, že 5 neanalyzovaných semenáčů pocházelo opravdu z provedeného křížení 60×16/2 × 60×16/1; N = počet jedinců; I₁ = první stupeň příbuzenského křížení (bratrský genotyp 60×16/1 a 60×16/5); CS = cizosprášení (tj. rodiče nejsou přímí příbuzní)

Mortalita semenáčů vzniklých z příbuzenského křížení v roce 2010 (Tab. 24) se projevila už od prvního roku výsadby a v dalším roce se zvýšila, na rozdíl od semenáčů z nepřibuzenského křížení – úbytek těchto rostlin byl nulový.

U semenáčů, jejichž původ nebyl analyzován pomocí mikrosatelitních markerů (pro analýzy DNA bylo náhodně vybráno 20 jedinců z potomstva CS), by mohl být jejich úhyn vysvětlen předpokladem možného projevu výskytu spontánního inbrídingu (u analyzovaných potomků z CS byl dokázán 55% výskyt tohoto jevu).

V případě zařazení semenáčů s nejasným původem do skupiny CS, tak z obou typů křížení (příbuzenského, nepřibuzenského) uhynulo 24 % rostlin.

Tab. 24: Podíl živých semenáčů 2010 (v procentech) pocházejících z různých křížení (druhý porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	2010		2011		2012		
		léto	podzim	jaro	podzim	jaro	podzim	
		N	%	%	%	%	%	
60×16/2	60×16/1	34	100	88	85	79	79	79
60×16/2	60×16/5	25	100	84	80	72	72	72
60×16/2	60×26/3	2	100	100	100	100	100	100
60×16/2	CS	7	100	100	100	100	100	100
60×16/2	CS*	37	100	89	78	70	70	70

Typ křížení	2010			2011		2012	
	léto	podzim		jaro	podzim	jaro	podzim
	N	%	%	%	%	%	%
I ₁	59	100	86	83	76	76	76
CS	46	100	91	83	76	76	76

Pozn.: N = počet jedinců; I₁ = první stupeň příbuzenského křížení (bratrský genotyp 60×16/1 a 60×16/5); CS = cizosprášení; CS* = nebyla provedena analýza DNA semenáčů

Přestože nebyl prokázán původ semenáčů získaných v roce 2011 (nebyly provedeny genetické analýzy), projevila se zde inbrední deprese. Semenáče z obou typů křížení hynuly už od prvního roku života a v dalším roce se jejich mortalita zvyšovala (Tab. 25). Na konci hodnocení pokusu zůstalo pouze 52 % rostlin pocházejících z příbuzenského křížení a 78 % rostlin pocházejících z nepříbuzenského opylení.

Tab. 25: Podíl živých semenáčů 2011 (v procentech) pocházejících z různých křížení (druhý porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	2011			2012	
		léto	podzim		jaro	podzim
		N	%	%	%	%
60×16/2	60×16/5	21	100	71	62	52
60×16/2	CS	49	100	90	86	78

Pozn.: N = počet jedinců; CS = cizosprášení; u všech semenáčů nebyla provedena analýza DNA

Závěr: Celkově lze říci, že byl ve všech letech pozorování zaznamenán nižší úbytek rostlin pocházejících z křížení vzájemně nepříbuzných rodičů oproti rostlinám z příbuzenského křížení.

6.5.2 Zdravotní stav a růstové charakteristiky

6.5.2.1 První porost

Semenáče 2009.

Stupeň napadení rzí semenáčků byl v roce 2010 ($\chi^2 = 91,68$), v roce 2011 ($\chi^2 = 17,07$) i v roce 2012 ($\chi^2 = 10,63$) závislý na jejich původu (typu křížení, tj. sourozenecké křížení, nebo nepříbuzenské křížení); $\chi^2_3 (0,05) = 7,82$. Relativní četnosti semenáčků získaných v roce 2009 v jednotlivých kategoriích stupnice intenzity napadení rzí znázorňuje Tab. 26.

Tab. 26: Intenzita napadení rží semenáčů 2009 (první porost)

Datum	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	N	Relativní četnosti (%)				
				0<=x<1	1<=x<2	2<=x<3	3<=x<4	4<=x<5
1.9.2010	2×4/9 5r	2×4/7 4r	8	0	0	100	0	0
	5×4/1 3r	5×4/10 2r	8	0	13	88	0	0
	2×4/4 3r	neznámý	16	0	6	94	0	0
	2×4/5 4r	neznámý	13	0	0	100	0	0
	2×4/9 5r	neznámý	8	0	0	100	0	0
	3×4/1 5ř	neznámý	4	0	50	50	0	0
	5×4/1 3ř	neznámý	32	0	50	50	0	0
	5×4/9 5ř	neznámý	4	0	50	50	0	0
	2CS/7 3ř	neznámý	29	0	52	48	0	0
	5CS/10 2ř	neznámý	34	0	29	71	0	0
	kontrola	neznámý	34	0	18	82	0	0
		I ₂	15	0	7	93	0	0
		I ₁ CS	76	0	28	72	0	0
	CS CS	61	0	39	61	0	0	
	K CS	34	0	18	82	0	0	
4.8.2011	2×4/9 5r	2×4/7 4r	6	33	33	33	0	0
	5×4/1 3r	5×4/10 2r	8	0	38	63	0	0
	2×4/4 3r	neznámý	16	6	88	6	0	0
	2×4/5 4r	neznámý	12	8	25	42	25	0
	2×4/9 5r	neznámý	8	0	0	75	25	0
	3×4/1 5ř	neznámý	3	0	0	100	0	0
	5×4/1 3ř	neznámý	31	10	35	39	16	0
	5×4/9 5ř	neznámý	4	0	25	75	0	0
	2CS/7 3ř	neznámý	25	4	28	48	20	0
	5CS/10 2ř	neznámý	33	15	39	27	18	0
	kontrola	neznámý	33	0	21	30	48	0
		I ₂	13	15	38	46	0	0
		I ₁ CS	73	7	40	40	14	0
	CS CS	56	11	36	36	18	0	
	K CS	33	0	21	30	48	0	
8.8.2012	2×4/9 5r	2×4/7 4r	6	0	0	83	0	17
	5×4/1 3r	5×4/10 2r	7	0	0	14	29	57
	2×4/4 3r	neznámý	16	0	13	50	25	13
	2×4/5 4r	neznámý	12	0	17	67	8	8
	2×4/9 5r	neznámý	7	0	0	14	57	29
	3×4/1 5ř	neznámý	3	0	0	33	67	0
	5×4/1 3ř	neznámý	31	0	0	13	74	13
	5×4/9 5ř	neznámý	4	0	25	50	25	0
	2CS/7 3ř	neznámý	25	0	12	44	32	12
	5CS/10 2ř	neznámý	31	0	13	58	19	10
kontrola	neznámý	33	0	3	33	48	15	

Datum	Typ křížení	N	Relativní četnosti (%)				
			$0 \leq x < 1$	$1 \leq x < 2$	$2 \leq x < 3$	$3 \leq x < 4$	$4 \leq x < 5$
8.8.2012	I ₂	12	0	0	42	17	42
	I ₁ CS	72	0	7	32	49	13
	CS CS	54	0	13	50	26	11
	K CS	33	0	3	33	48	15

Pozn.: N = počet jedinců; x = hodnota stupně napadení rzí; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení, I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení, CS CS = druhý stupeň cizosprášení, K CS = cizosprášení nepříbuzné matky

Průměrné hodnoty změřených výšek a tlouštěk jednotlivých semenáčů se mezi jednotlivými kříženími průkazně lišily (Tab. 27). Průkazně nejnižší hodnoty u obou znaků byly od druhého roku života u rostlin pocházejících z druhého stupně příbuzenského křížení. Rozdíly výšek a tlouštěk mezi jednotlivými typy křížení se rok od roku zvyšovaly.

Tab. 27: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2009 (první porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Výška 2009 (m)				Výška 2010 (m)				Výška 2011 (m)				Výška 2012 (m)			
		N	průměr	SE	ab	N	průměr	SE	cd	N	průměr	SE	cde	N	průměr	SE	cd
2×4/9 5r	2×4/7 4r	8	0,325	0,017	ab	8	0,796	0,079	cd	6	2,308	0,158	cde	6	3,283	0,243	cd
5×4/1 3r	5×4/10 2r	8	0,251	0,027	cde	7	0,729	0,039	d	7	2,121	0,141	d	7	3,014	0,215	d
2×4/4 3r	neznámý	16	0,211	0,012	e	16	0,944	0,05	abc	16	2,725	0,134	abc	16	4,013	0,179	abc
2×4/5 4r	neznámý	13	0,236	0,015	de	13	0,882	0,062	bcd	12	2,871	0,109	a	12	4,208	0,143	a
2×4/9 5r	neznámý	9	0,249	0,033	cde	8	0,894	0,051	abcd	8	2,344	0,136	cde	7	3,429	0,255	bcd
3×4/1 5ř	neznámý	4	0,281	0,02	bcd	3	0,95	0,064	abc	2	2,2	0,2	cd	2	3,7	0,3	abcd
5×4/1 3ř	neznámý	32	0,296	0,011	bcd	29	0,991	0,028	ab	29	2,602	0,072	abcd	29	3,859	0,114	abc
5×4/9 5ř	neznámý	4	0,377	0,019	a	4	1,12	0,04	a	4	2,763	0,191	ab	4	4,075	0,272	ab
2CS/7 3ř	neznámý	29	0,281	0,013	bcd	29	0,94	0,04	abc	25	2,688	0,087	abc	25	3,912	0,121	abc
5CS/10 2ř	neznámý	37	0,283	0,007	bcd	32	1,067	0,039	ab	29	2,895	0,107	a	29	4,017	0,145	abc
kontrola	neznámý	34	0,301	0,011	bc	31	1,091	0,029	ab	30	2,895	0,076	a	30	4,147	0,101	ab
I ₂		15	0,283	0,019	ab	14	0,768	0,048	c	12	2,221	0,113	b	12	3,133	0,173	b
I ₁ CS		77	0,265	0,008	b	72	0,954	0,021	b	70	2,644	0,053	a	69	3,916	0,077	a
CS CS		64	0,283	0,007	ab	59	1,004	0,03	ab	52	2,785	0,073	a	52	3,956	0,098	a
K CS		34	0,301	0,011	a	31	1,091	0,029	a	30	2,895	0,076	a	30	4,147	0,101	a

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Tloušťka 2010 (mm)				Tloušťka 2011 (mm)				Tloušťka 2012 (mm)			
		N	průměr	SE		N	průměr	SE		N	průměr	SE	
2×4/9 5r	2×4/7 4r	8	6,7	0,7	bc	6	18,3	3,2	b	6	28,3	3,4	ab
5×4/1 3r	5×4/10 2r	7	6,5	0,5	c	7	17	1,6	b	7	24,1	2,8	b
2×4/4 3r	neznámý	16	9	0,8	ab	16	22,9	1,7	ab	16	34,9	2,9	ab
2×4/5 4r	neznámý	13	8,3	0,6	bc	12	22,8	1,9	ab	12	39	3,5	a
2×4/9 5r	neznámý	8	7,7	0,5	bc	8	17,1	1,6	b	7	27,4	3,5	ab
3×4/1 5ř	neznámý	3	8,3	1,2	abc	2	28	4	a	2	37	6	ab
5×4/1 3ř	neznámý	29	8,6	0,4	abc	29	22,9	1,1	ab	29	34	1,8	ab
5×4/9 5ř	neznámý	4	10,9	0,5	a	4	22,8	1,5	ab	4	35	6,8	ab
2CS/7 3ř	neznámý	29	7,9	0,4	bc	25	22,6	1,4	ab	25	36,1	2,5	ab
5CS/10 2ř	neznámý	32	8,8	0,4	abc	29	24,3	1,5	ab	29	37,8	2,3	a
kontrola	neznámý	31	9,1	0,3	ab	30	24,1	1	ab	30	36,3	1,7	ab
I ₂		14	6,8	0,4	b	12	17,9	1,8	b	12	26,1	2,4	b
I ₁ CS		72	8,6	0,3	a	70	22,4	0,7	a	69	34,6	1,3	a
CS CS		59	8,3	0,3	a	52	23,4	1,1	a	52	36,9	1,8	a
K CS		31	9,1	0,3	a	30	24,1	1	a	30	36,3	1,7	a

Pozn.: N = počet jedinců; SE = směrodatná chyba průměru; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení, I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení, CS CS = druhý stupeň cizosprášení, K CS = cizosprášení nepříbuzné matky

Koeficient inbrední deprese se pohyboval v intervalu od -0,304 do 0,290 (Tab. 28). Výsledek δ u prvního příbuzenského křížení ukazuje převážný výskyt záporných hodnot, vyvracejících předpoklad výskytu inbrední deprese. Hodnoty jsou však velmi nízké. U druhého příbuzenského křížení byla inbrední deprese prokázána v obou znacích ve všech letech.

Tab. 28: Koeficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 27

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	výška			
		2009	2010	2011	2012
2×4/9 5r	2×4/7 4r	-0,304	0,109	0,015	0,042
5×4/1 3r	5×4/10 2r	0,151	0,265	0,185	0,219
		tloušťka			
		2009	2010	2011	2012
2×4/9 5r	2×4/7 4r	-	0,121	-0,071	-0,033
5×4/1 3r	5×4/10 2r	-	0,242	0,256	0,290

Semenáče 2010.

Stupeň napadení rzí semenáčků byl v obou letech ($\chi^2 = 36,59$ v roce 2011 a $\chi^2 = 84,00$ v roce 2012; $\chi^2_3(0,05) = 7,81$) průkazně odlišný v závislosti na jejich původu. Relativní četnosti semenáčků získaných v roce 2010 v jednotlivých kategoriích stupnice intenzity napadení rzí znázorňuje Tab. 29.

Tab. 29: Intenzita napadení rzí semenáčů 2010 (první porost)

Datum	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	N	Relativní četnosti (%)				
				0<=x<1	1<=x<2	2<=x<3	3<=x<4	4<=x<5
31.8.2011	2×4/5 5ř	2×4/5 4ř	101	2	14	41	44	0
	2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	35	11	40	31	17	0
	2×4/5 4ř	neznámý	17	0	0	53	47	0
	2×4/5 5ř	neznámý	60	2	8	27	63	0
	5×4/7 5ř	3×4/7 4ř	43	14	58	23	5	0
	2×4/5 5ř	3×4/2 3ř	127	2	9	30	59	0
	2×4/5 5ř	5×4/7 4ř	38	5	5	42	47	0
	5×4/7 5ř	3×4/10 5ř	4	0	0	25	75	0
		I ₂	101	2	14	41	44	0
		I ₁ S	35	11	40	31	17	0
	I ₁ CS	77	1	6	32	60	0	
	H	212	5	18	31	46	0	

Datum	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	N	Relativní četnosti (%)				
				0<=x<1	1<=x<2	2<=x<3	3<=x<4	4<=x<5
17.8.2012	2×4/5 5ř	2×4/5 4ř	101	0	1	31	67	1
	2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	34	0	9	24	68	0
	2×4/5 4ř	neznámý	17	0	24	47	29	0
	2×4/5 5ř	neznámý	60	0	13	38	47	2
	5×4/7 5ř	3×4/7 4ř	42	0	19	62	19	0
	2×4/5 5ř	3×4/2 3ř	127	0	3	41	56	0
	2×4/5 5ř	5×4/7 4ř	38	0	3	71	26	0
	5×4/7 5ř	3×4/10 5ř	4	0	0	25	75	0
	I ₂	101	0	1	31	67	1	
	I ₁ S	34	0	9	24	68	0	
	I ₁ CS	77	0	16	40	43	1	
	H	211	0	6	50	44	0	

Pozn.: N = počet jedinců; x = hodnota stupně napadení rzí; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterózního efektu

Pomocí Duncanova testu byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi provedenými typy křížení u všech měřených růstových charakteristik (Tab. 30). Nejvyšší průměrné hodnoty výšek a tlouštěk rostlin na konci jednotlivých vegetačních období mělo v prvním roce života potomstvo z cizosprášení, ve druhém roce se mu už vyrovnalo potomstvo z heterózního křížení a ve třetím roce mělo průkazně nejvyšší průměrné hodnoty potomstvo z heterózního křížení. Naopak průkazně nejnižší průměrné hodnoty růstových znaků byly vždy u příbuzenského křížení, přičemž růstové charakteristiky potomků ze samosprášení byly nejnižší.

Tab. 30: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2010 (první porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Výška 2010 (m)			Výška 2011 (m)			Výška 2012 (m)					
		N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE			
2×4/5 5ř	2×4/5 4ř	102	0,247	0,008	abc	102	0,952	0,027	b	101	1,969	0,045	d
2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	35	0,229	0,013	bc	35	0,868	0,039	b	35	1,646	0,077	e
2×4/5 4ř	neznámý	17	0,277	0,015	ab	17	1,112	0,054	a	17	2,291	0,081	c
2×4/5 5ř	neznámý	60	0,288	0,011	a	60	1,194	0,033	a	60	2,558	0,062	bc
5×4/7 5ř	3×4/7 4ř	43	0,215	0,013	c	42	1,137	0,034	a	42	2,600	0,072	ab
2×4/5 5ř	3×4/2 3ř	128	0,279	0,006	ab	127	1,185	0,019	a	127	2,607	0,036	ab
2×4/5 5ř	5×4/7 4ř	39	0,245	0,011	abc	38	1,252	0,031	a	38	2,783	0,053	ab
5×4/7 5ř	3×4/10 5ř	4	0,218	0,031	c	4	1,215	0,095	a	4	2,888	0,123	a
	I ₂	102	0,247	0,008	bc	102	0,952	0,027	b	101	1,969	0,045	c
	I ₁ S	35	0,229	0,013	c	35	0,868	0,039	c	35	1,646	0,077	d
	I ₁ CS	77	0,285	0,009	a	77	1,176	0,028	a	77	2,499	0,053	b
	H	214	0,259	0,005	ab	211	1,188	0,015	a	211	2,643	0,028	a

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Tloušťka 2011 (mm)				Tloušťka 2012 (mm)			
		N	průměr	SE		N	průměr	SE	
2×4/5 5ř	2×4/5 4ř	102	10,7	0,3	b	101	14,8	0,6	c
2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	35	9,9	0,4	b	35	11,3	0,7	d
2×4/5 4ř	neznámý	17	12,8	0,6	a	17	18,3	1,2	b
2×4/5 5ř	neznámý	60	13,4	0,4	a	60	21,1	0,8	ab
5×4/7 5ř	3×4/7 4ř	-	-	-		42	20,7	0,8	ab
2×4/5 5ř	3×4/2 3ř	-	-	-		127	22,0	0,4	ab
2×4/5 5ř	5×4/7 4ř	-	-	-		38	23,9	0,8	a
5×4/7 5ř	3×4/10 5ř	-	-	-		4	22,0	1,4	ab
	I ₂	102	10,7	0,3	b	101	14,8	0,6	b
	I ₁ S	35	9,9	0,4	b	35	11,3	0,7	c
	I ₁ CS	77	13,3	0,3	a	77	20,4	0,7	a
	H	-	-	-	-	211	22,1	0,3	a

Pozn.: N = počet jedinců; SE = směrodatná chyba průměru; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterózního efektu

Koeficient inbrední deprese (δ) se u jednotlivých znaků a jednotlivých potomstev rok od roku zvyšoval (Tab. 31). U příbuzenského křížení se pohyboval v intervalu od 0,143 do 0,385. Oproti tomu se hodnoty δ potomstev získaných za účelem dosažení heterózního efektu snižovaly a pohybovaly se v intervalu od -0,136 do 0,148.

Tab. 31: Koeficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 30

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Výška			Tloušťka		
		2010	2011	2012	2010	2011	2012
2×4/5 5ř	2×4/5 4ř	0,143	0,203	0,230	-	0,196	0,296
2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	0,172	0,220	0,282	-	0,231	0,385
2×4/5 5ř	3×4/2 3ř	0,028	0,007	-0,019	-	-	-0,044
2×4/5 5ř	5×4/7 4ř	0,148	-0,049	-0,088	-	-	-0,136
	I ₂	0,151	0,209	0,246	-	0,206	0,320
	H	0,091	-0,011	-0,057	-	-	-0,080

Pozn.: I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem heteroze

Semenáče 2011.

U semenáčů získaných v roce 2011 byla změřena pouze výška rostlin na konci prvního vegetačního období a výška a tloušťka rostlin v druhém roce hodnocení (Tab. 32). Během roku 2012 došlo k poškození vysokého počtu semenáčů zvěří (okusem). Pomocí Duncanova testu bylo v rámci všech 38 křížení rozlišeno 10 skupin. Nejnižší průměrné výšky a tloušťky semenáčů byly u rostlin pocházejících z cizosprášení původního rodiče, vyšší u rostlin pocházejících z jednodomých rodičů, pak z rostlin pocházejících z druhého stupně

příbuzenského křížení a nejvyšší u rostlin pocházejících z cizosprášení volně opylených matek a z křížení za účelem dosažení heterozního efektu.

Tab. 32: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2011 (první porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Výška 2011 (m)				Výška 2012 (m)				Tloušťka 2012 (mm)			
		N	průměr	SE	abc	N	průměr	SE	abcde	N	průměr	SE	abcde
2SM/5 3ř	neznámý	37	0,175	0,013	abc	34	0,805	0,03	abcde	34	8,6	0,3	abcde
2SM/5 3ř	2SM/5 3ř	42	0,158	0,01	abcdef	35	0,847	0,041	abc	35	9	0,5	abc
2SM/5 3ř	2×4/9 3ř	47	0,16	0,01	abcdef	37	0,908	0,033	ab	37	9,2	0,4	ab
2CS/1 2ř	neznámý	6	0,14	0,032	bcdefg	5	0,772	0,07	bcdefg	5	7,5	0,7	bcdefgh
2CS/1 2ř	2CS/1 2ř	32	0,104	0,007	defghi	15	0,509	0,056	ghij	15	4,7	0,4	j
2CS/7 3ř	neznámý	38	0,131	0,01	bcdefghi	28	0,656	0,026	bcdefghij	28	6,7	0,2	bcdefghij
2×4/4 3ř	neznámý	8	0,152	0,019	abcdef	7	1,007	0,066	a	7	10,1	0,7	a
2×4/4 3ř	2×4/1 2ř	17	0,132	0,014	bcdefgh	11	0,687	0,058	bcdefgh	11	6,4	0,5	defghij
2×4/4 3ř	3×4/4 4ř	9	0,135	0,017	bcdefg	8	0,729	0,069	bcdefg	8	7,8	0,6	abcdefg
2×4/5 3ř	neznámý	32	0,121	0,01	bcdefghi	27	0,693	0,052	bcdefgh	27	6,6	0,4	cdefghij
2×4/5 3ř	2×4/5 3ř	40	0,105	0,007	defghi	22	0,569	0,041	defghij	22	5,3	0,4	ghij
2×4/5 4ř	neznámý	41	0,128	0,01	bcdefghi	21	0,587	0,034	cdefghij	21	5,8	0,3	ghij
2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	9	0,131	0,013	bcdefghi	4	0,503	0,058	ghij	4	5,4	0,6	ghij
2×4/5 4ř	2×4/9 3ř	1	0,165	0	abcde	1	0,52	0	ghij	1	6,2	0	efghij
2×4/5 4ř	Kampa	29	0,097	0,008	efghi	18	0,581	0,039	cdefghij	18	5,5	0,3	ghij
2×4/6 2ř	neznámý	8	0,102	0,021	defghi	1	0,51	0	ghij	1	5	0	hij
2×4/6 2ř	2×4/1 2ř	32	0,124	0,008	bcdefghi	23	0,607	0,033	cdefghij	23	6,2	0,3	efghij
2×4/6 2ř	3×4/5 5ř	41	0,114	0,008	cdefghi	34	0,656	0,03	bcdefghij	34	6,3	0,3	efghij
2×4/9 5ř	neznámý	18	0,103	0,013	defghi	10	0,584	0,03	cdefghij	10	5,9	0,3	fghij
2×4/9 5ř	2×4/5 4ř	32	0,092	0,009	fghi	20	0,529	0,047	fghij	21	5	0,4	ghij
2×4/9 5ř	3×4/4 4ř	38	0,104	0,007	defghi	29	0,689	0,039	bcdefgh	28	6,7	0,2	bcdefghij
3×4/3 5ř	neznámý	13	0,064	0,014	hij	7	0,417	0,075	ij	7	5,1	0,9	hij
3×4/3 5ř	3×4/5 5ř	28	0,216	0,01	a	15	0,761	0,039	abcdefg	15	7,4	0,3	bcdefghi
3×4/3 5ř	3×4/4 4ř	10	0,17	0,02	abcd	5	0,706	0,111	bcdefgh	5	7,7	1,1	abcdefg
3×4/4 5ř	2×4/1 5ř	42	0,185	0,008	ab	35	0,83	0,025	abcd	35	8,4	0,3	abcdef
3CS/9 5ř	neznámý	29	0,115	0,011	cdefghi	19	0,763	0,045	abcdefg	19	7,5	0,4	bcdefgh
5×4/18 4ř	neznámý	24	0,112	0,015	cdefghi	15	0,625	0,055	cdefghij	15	5,9	0,4	ghij
5×4/18 4ř	5×4/10 2ř	40	0,096	0,007	efghi	21	0,583	0,036	cdefghij	21	5,7	0,3	ghij
5CS/19 4ř	neznámý	36	0,15	0,013	bcdef	26	0,629	0,044	cdefghij	26	7,1	0,5	bcdefghij
5×4/10 5ř	neznámý	38	0,119	0,01	bcdefghi	22	0,578	0,037	cdefghij	22	5,8	0,3	ghij
5×4/10 5ř	3×4/5 5ř	39	0,129	0,006	bcdefghi	35	0,648	0,029	bcdefghij	35	6,9	0,3	bcdefghij
5×4/10 5ř	5×4/7 4ř	7	0,173	0,021	abc	4	0,67	0,131	bcdefghi	4	7,3	1,4	bcdefghij
5×4/3 4ř	neznámý	2	0,063	0,053	ij	1	0,68	0	bcdefghi	1	6,8	0	bcdefghij
5×4/3 4ř	5×4/10 2ř	1	0,02	0	j	-	-	-	-	-	-	-	-
5×4/7 5ř	neznámý	12	0,096	0,02	efghi	10	0,538	0,078	efghij	10	5,7	0,6	ghij
5×4/7 5ř	5×4/7 4ř	38	0,072	0,007	ghij	20	0,451	0,029	hij	20	5,1	0,2	hij
5×4/9 5ř	3×4/1 5ř	4	0,154	0,031	abcdef	2	0,795	0,195	abcdef	2	8,9	0,9	abcd
30×32/2	neznámý	26	0,107	0,01	cdefghi	11	0,4	0,064	j	11	4,8	0,4	ij

Typ křížení	Výška 2011 (m)				Výška 2012 (m)				Tloušťka 2012 (mm)			
	N	průměr	SE		N	průměr	SE		N	průměr	SE	
I ₂	206	0,121	0,005	bc	120	0,596	0,018	b	121	6	0,2	b
I ₁ S	49	0,109	0,006	c	26	0,559	0,036	b	26	5,4	0,3	bc
I ₁ CS	225	0,112	0,004	c	139	0,618	0,019	b	139	6,1	0,2	b
H	173	0,135	0,004	ab	143	0,709	0,016	a	142	7,2	0,2	a
CS S	74	0,134	0,007	ab	50	0,746	0,04	a	50	7,7	0,5	a
CS CS	193	0,148	0,005	a	149	0,766	0,017	a	149	7,9	0,2	a
CS	26	0,107	0,01	c	11	0,4	0,064	c	11	4,8	0,4	c

Pozn.: N = počet jedinců; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterozního efektu; CS S = samosprášení rostliny pocházející z cizosprášení; CS CS = druhý stupeň cizosprášení; CS = cizosprášení původní matky

Při porovnání potomstev získaných v roce 2011 pocházejících z různých křížení s použitím jednodomých rostlin jako alespoň jednoho rodičovského komponentu měla potomstva obdobná pořadí (Tab. 33). Rozdíl mezi nejlepší skupinou (druhý stupeň volného sprášení) a nejhorší skupinou (samosprášení rostlin pocházejících z prvního inbrídingu) byl o 17 % vyšší.

Tab. 33: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2011 pocházejících z různých křížení s použitím jednodomých rostlin jako alespoň jednoho rodičovského komponentu (první porost)

Typ křížení	Výška 2011 (m)				Výška 2012 (m)				Tloušťka 2012 (mm)			
	N	průměr	SE		N	průměr	SE		N	průměr	SE	
I ₂	50	0,107	0,008	c	32	0,583	0,037	c	33	5,5	0,3	b
I ₁ S	49	0,109	0,006	c	26	0,559	0,036	c	26	5,4	0,3	b
I ₁ CS	110	0,119	0,005	bc	73	0,665	0,028	bc	73	6,4	0,3	b
H	13	0,141	0,015	ab	10	0,742	0,063	ab	10	8,0	0,5	a
CS S	74	0,134	0,007	bc	50	0,746	0,040	ab	50	7,7	0,5	a
CS CS	90	0,165	0,008	a	76	0,853	0,022	a	76	8,8	0,2	a

Pozn.: N = počet jedinců; I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem heteroze; CS S = samosprášení rostliny pocházející z cizosprášení; CS CS = druhý stupeň cizosprášení; CS = cizosprášení původní matky

Koeficient inbrední deprese (δ) se během hodnocení pokusu měnil (Tab. 34). U příbuzenského křížení se pohyboval v intervalu od -2,343 do 0,680. Oproti tomu hodnoty δ potomstev získaných za účelem heteroze klesaly a pohybovaly se v intervalu od -1,872 do 0,227.

Tab. 34: Koefficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 32

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Výška		Tloušťka
		2011	2012	2012
2SM/5 3ř	2SM/5 3ř	0,101	-0,052	-0,050
2CS/1 2ř	2CS/1 2ř	0,260	0,341	0,374
2×4/4 3ř	2×4/1 2ř	0,131	0,318	0,368
2×4/5 3ř	2×4/5 3ř	0,132	0,179	0,192
2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	-0,024	0,144	0,063
2×4/5 4ř	2×4/9 3ř	-0,292	0,114	-0,076
2×4/6 2ř	2×4/1 2ř	-0,221	-0,189	-0,234
2×4/9 5ř	2×4/5 4ř	0,102	0,094	0,144
3×4/3 5ř	3×4/5 5ř	-2,343	-0,824	-0,455
3×4/3 5ř	3×4/4 4ř	-1,636	-0,692	-0,527
5×4/18 4ř	5×4/10 2ř	0,143	0,067	0,032
5×4/10 5ř	5×4/7 4ř	-0,457	-0,160	-0,265
5×4/3 4ř	5×4/10 2ř	0,680	-	-
5×4/7 5ř	5×4/7 4ř	0,249	0,163	0,113
2×4/4 3ř	3×4/4 4ř	0,110	0,276	0,227
2×4/6 2ř	3×4/5 5ř	-0,123	-0,285	-0,255
2×4/9 5ř	3×4/4 4ř	-0,016	-0,179	-0,137
3×4/4 5ř	2×4/1 5ř	-1,872	-0,989	-0,666
5×4/10 5ř	3×4/5 5ř	-0,082	-0,122	-0,201

6.5.2.2 Druhý porost

Semenáče 2009.

Stupeň napadení rzí semenáčků byl v roce 2010 ($\chi^2 = 107,00$) a v roce 2011 ($\chi^2 = 10,96$) závislý na jejich původu (sourozenské křížení, nepříbuzenské křížení), v roce 2012 nebyla tato závislost prokázána ($\chi^2 = 1,13$); $\chi^2_1(0,05) = 3,84$. Relativní četnosti semenáčků získaných v roce 2009 v jednotlivých kategoriích stupnice intenzity napadení rzí znázorňuje Tab. 35.

Tab. 35: Intenzita napadení rzí semenáčků 2009 (druhý porost)

Datum	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	N	Relativní četnosti (%)				
				0<=x<1	1<=x<2	2<=x<3	3<=x<4	4<=x<5
1.9.2010	60×16/2	60×16/1	76	0	51	49	0	0
	60×16/2	60×16/5	2	0	50	50	0	0
	60×16/2	60×26/3	15	0	47	53	0	0
	60×16/2	neznámý	14	0	36	64	0	0
		I ₁	78	0	51	49	0	0
		CS	29	0	41	59	0	0
4.8.2011	60×16/2	60×16/1	64	11	22	33	30	5
	60×16/2	60×16/5	1	0	0	100	0	0
	60×16/2	60×26/3	15	13	27	33	27	0
	60×16/2	neznámý	14	7	21	36	21	14
		I ₁	65	11	22	34	29	5
		CS	29	10	24	34	24	7
8.8.2012	60×16/2	60×16/1	63	0	3	51	25	21
	60×16/2	60×16/5	1	0	0	100	0	0
	60×16/2	60×26/3	14	0	36	50	14	0
	60×16/2	neznámý	14	0	0	29	57	14
		I ₁	64	0	3	52	25	20
		CS	28	0	18	39	36	7

Pozn.: N = počet jedinců; x = hodnota stupně napadení rzí; I₁ = první stupeň příbuzenského křížení (bratrský genotyp 60×16/1 a 60×16/5); CS = cizosprášení (tj. rodiče nejsou přímí příbuzní)

Výšky semenáčků se na konci prvního vegetačního období průkazně nelišily (Tab. 36). Na konci druhého i třetího roku byly semenáče z příbuzenského křížení průkazně nižší oproti rostlinám z nepříbuzenského křížení. Rostliny, u nichž došlo k poškození mechanizací nebo zvěří, byly z hodnocení vyloučeny. Průměrné hodnoty tloušťek rostlin pocházejících z příbuzenského křížení byly ve všech letech pozorování průkazně nižší než u rostlin z nepříbuzenského křížení.

Tab. 36: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2009 (druhý porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Výška 2009 (m)			Výška 2010 (m)			Výška 2011 (m)			Výška 2012 (m)						
		N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE				
60×16/2	60×16/1	76	0,294	0,007	a	69	0,841	0,023	b	63	2,363	0,056	a	63	3,254	0,073	a
60×16/2	60×16/5	5	0,179	0,035	a	1	1,240	-	a	1	2,850	-	a	1	4,000	-	a
60×16/2	neznámý	16	0,273	0,019	a	14	0,956	0,069	ab	14	2,554	0,102	a	14	3,593	0,140	a
60×16/2	60×26/3	16	0,280	0,012	a	14	1,112	0,045	ab	14	2,818	0,106	a	14	4,029	0,144	a
I ₁		81	0,287	0,007	a	70	0,847	0,023	b	64	2,370	0,055	b	64	3,266	0,073	b
CS		32	0,276	0,011	a	28	1,034	0,043	a	28	2,686	0,077	a	28	3,811	0,107	a
Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Tloušťka 2010 (mm)			Tloušťka 2011 (mm)			Tloušťka 2012 (mm)									
		N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE							
60×16/2	60×16/1	76	7,0	0,2	b	62	18,3	0,7	b	63	25,8	1,2	b				
60×16/2	60×16/5	2	7,4	3,1	a	1	28,0	-	a	1	44,0	-	a				
60×16/2	neznámý	14	7,8	0,5	b	14	21,2	1,2	ab	14	31,0	2,3	ab				
60×16/2	60×26/3	15	10,3	0,7	a	14	28,4	1,5	a	14	45,7	2,7	a				
I ₁		78	7,0	0,2	b	64	18,3	0,7	b	64	26,1	1,2	b				
CS		29	9,1	0,5	a	28	24,8	1,2	a	28	38,4	2,2	a				

Pozn.: N = počet jedinců; SE = směrodatná chyba průměru; I₁ = první stupeň příbuzenského křížení (bratrský genotyp 60×16/1 a 60×16/5); CS = cizosprášení (tj. rodiče nejsou přímí příbuzní)

Koeficient inbrední deprese se pohyboval v intervalu od -0,199 do 0,351 (Tab. 37). U prvního příbuzenského křížení byla inbrední deprese prokázána v obou znacích ve všech letech. Výjimku tvořila výška v roce 2009. Výsledek δ u druhého příbuzenského křížení ukazující převážný výskyt záporných hodnot vyvracejících předpoklad výskytu inbrední deprese by mohl být zanedbatelný z důvodu nízkého počtu hodnocených potomků (v prvním roce 5 ks, dále jen 1 ks).

Tab. 37: Koeficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 36

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Výška			
		2009	2010	2011	2012
60×16/2	60×16/1	-0,065	0,187	0,120	0,146
60×16/2	60×16/5	0,351	-0,199	-0,061	-0,050
		Tloušťka			
		2009	2010	2011	2012
60×16/2	60×16/1	-	0,235	0,261	0,326
60×16/2	60×16/5	-	0,194	-0,128	-0,147

Semenáče 2010.

Hodnoty testovací statistiky stupně napadení rzí semenáčků byly $\chi^2 = 14,53$ v roce 2011 a $\chi^2 = 4,57$ v roce 2012. V obou případech byla prokázána odlišnost reakce semenáčků na výskyt rzí v jejich původu (sourozenecké křížení, nepříbuzenské křížení), $\chi^2_1 (0,05) = 3,84$. Relativní četnosti semenáčků získaných v roce 2010 v jednotlivých kategoriích stupnice intenzity napadení rzí znázorňuje Tab. 38. Semenáče s neznámým původem (CS*) nebyly do testování zařazeny, aby nedošlo k možnému zkreslení výsledku.

Tab. 38: Intenzita napadení rzí semenáčků 2010 (druhý porost)

Datum	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	N	Relativní četnosti (%)				
				0<=x<1	1<=x<2	2<=x<3	3<=x<4	4<=x<5
31.8.2011	60×16/2	60×16/5	18	6	22	39	33	0
	60×16/2	60×16/1	27	15	33	33	19	0
	60×16/2	CS	7	0	14	57	29	0
	60×16/2	CS*	26	4	4	35	58	0
	60×16/2	60×26/3	2	0	50	50	0	0
		I ₁	45	11	29	36	24	0
	CS	9	0	22	56	22	0	
17.8.2012	60×16/2	60×16/5	17	0	6	47	47	0
	60×16/2	60×16/1	27	0	4	19	70	7
	60×16/2	CS	7	0	14	43	43	0
	60×16/2	CS*	26	0	15	42	42	0
	60×16/2	60×26/3	2	0	0	50	50	0
		I ₁	44	0	5	30	61	5
	CS	9	0	11	44	44	0	

Pozn.: N = počet jedinců; x = hodnota stupně napadení rzí; I₁ = první stupeň příbuzenského křížení (bratrský genotyp 60×16/1 a 60×16/5); CS = cizosprášení; CS* = nebyla provedena analýza DNA semenáčů

Pomocí Duncanova testu byl zjištěn neprůkazný rozdíl mezi provedenými typy křížení u všech měřených růstových charakteristik (Tab. 39), s výjimkou průměrných hodnot výšky a tloušťky rostlin v roce 2012. Na konci vegetačního období ve všech letech pozorování byly neprůkazně vyšší průměrné výšky a tloušťky u křížení typu cizosprášení oproti příbuzenskému křížení (tj. typ S×B).

Tab. 39: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2010 (druhý porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Výška 2010 (m)			Výška 2011 (m)			Výška 2012 (m)					
		N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE			
60×16/2	60×16/5	21	0,235	0,020	a	18	1,098	0,067	a	17	2,312	0,097	ab
60×16/2	60×16/1	30	0,201	0,011	a	27	0,948	0,060	a	27	2,154	0,098	b
60×16/2	CS	7	0,229	0,033	a	7	1,037	0,083	a	7	2,421	0,103	ab
60×16/2	CS*	33	0,205	0,014	a	26	1,058	0,058	a	25	2,198	0,114	ab
60×16/2	60×26/3	2	0,200	0,009	a	2	1,070	0,030	a	2	2,775	0,025	a
	I ₁	51	0,215	0,011	a	45	1,008	0,046	a	44	2,215	0,071	a
	CS	9	0,223	0,026	a	9	1,044	0,064	a	9	2,500	0,094	a
Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Tloušťka 2011 (mm)			Tloušťka 2012 (mm)								
		N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	průměr	SE			
60×16/2	60×16/5	18	11,5	0,7	a	18	17,8	1,3	ab				
60×16/2	60×16/1	27	10,4	0,5	a	27	16,1	1,2	b				
60×16/2	CS	7	11,0	1,1	a	7	19,7	1,2	ab				
60×16/2	CS*	26	11,8	0,6	a	25	17,6	1,4	ab				
60×16/2	60×26/3	2	10,8	0,3	a	2	24,0	-	a				
	I ₁	45	10,9	0,4	a	45	16,8	0,9	a				
	CS	9	10,9	0,8	a	9	20,7	1,1	a				

Pozn.: N = počet jedinců; SE = směrodatná chyba průměru; I₁ = první stupeň příbuzenského křížení (bratrský genotyp 60×16/1 a 60×16/5); CS = cizosprášení; CS* = nebyla provedena analýza DNA semenáčů

Koeficient inbrední deprese se pohyboval v intervalu od -0,055 do 0,219 (Tab. 40). U prvního příbuzenského křížení nebyla inbrední deprese v prvních dvou letech prokázána. Záporná hodnota δ byla však velmi nízká. U druhého příbuzenského křížení byla inbrední deprese prokázána v obou znacích ve všech letech.

Tab. 40: Koeficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 39

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Výška			Tloušťka		
		2010	2011	2012	2010	2011	2012
60×16/2	60×16/1	-0,055	-0,051	0,075	-	-0,055	0,137
60×16/2	60×16/5	0,096	0,093	0,139	-	0,044	0,219

Semenáče 2011.

U semenáčů získaných v roce 2011 byla změřena pouze výška rostlin na konci prvního vegetačního období a výška a tloušťka rostlin v druhém roce hodnocení (Tab. 41). Během roku 2012 došlo k poškození vysokého počtu semenáčů zvěří (okusem). Přestože nebyl analyzován původ semenáčů, průměrné hodnoty všech měření ukazují v roce 2011 průkazně vyšší hodnoty u CS a v roce 2012 neprůkazně vyšší hodnoty u CS u obou sledovaných charakteristik.

Ve všech hodnoceních došlo k projevu inbrední deprese (Tab. 41). Koeficient inbrední deprese se pohyboval v intervalu od 0,044 do 0,424.

Tab. 41: Růstové charakteristiky a koeficient inbrední deprese (δ) semenáčů získaných v roce 2011 (druhý porost)

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	výška 2011 (m)			výška 2012 (m)			tloušťka 2012 (mm)					
		N	průměr	SE	N	průměr	SE	N	Průměr	SE			
60×16/2	60×16/5	15	0,087	0,012	b	7	0,637	0,035	a	7	6,1	0,2	a
60×16/2	CS	44	0,151	0,012	a	31	0,666	0,044	a	31	6,5	0,4	a
δ		0,424			0,044			0,065					

Pozn.: N = počet jedinců; SE = směrodatná chyba průměru; CS = cizosprášení; u všech semenáčů nebyla provedena analýza DNA

Závěr: Polní hodnocení zabývající se zdravotním stavem semenáčů prokázala závislost stupně napadení semenáčů na jejich původu (typu křížení). Výsledek porovnání růstových znaků pozorovaných semenáčů dokazuje nejvyšší vitalitu jedinců pocházejících z křížení nepřibuzných rodičů oproti jedincům z příbuzenského křížení; a tím i výskyt inbrední deprese. Rostliny pocházející z autogamie mají navíc nižší vitalitu než jedinci pocházející z příbuzenského křížení. Potomstva odvozená z cizosprášení generace I_1 mají průměrné hodnoty růstových charakteristik průkazně vyšší oproti generaci I_2 a naopak neprůkazně nižší oproti potomstvům z opakovaného cizosprášení. Potomstva z heterózního křížení měla vyšší vitalitu než potomstva z cizosprášených rostlin z prvního inbrídingu, ale nižší než potomstva z druhého stupně cizosprášení.

6.6 Genetické analýzy

6.6.1 Rodičovská analýza

6.6.1.1 První porost

S použitím 8 mikrosatelitních markerů byly provedeny analýzy 2 jednodomých jedinců (Me_1 a Me_2), vždy po 3 vzorcích z rozdílných míst na stromě. Analýzy identity prokázaly shodnost vzorků v rámci obou testovaných jedinců.

Ani u jednoho zkoušeného potomka z cizosprášení jednodomých stromů nebylo prokázáno samoopylení (Tab. 42).

Tab. 42: Podíl samoopylení náhodně zvolených potomků jednodomých stromů pocházejících z rozdílných křížení (první porost)

Rok křížení	Rodičovská kombinace	Počet získaných potomků	Počet analyzovaných potomků	Podíl samoopylení (%)
2009	Me ₁ ^{CS}	13	13	0
2009	Me ₂ ^{CS}	19	19	0
2009	Me ₆ ^{CS}	4	4	0
2010	Me ₁ ×Me ₁	35	35	100
2010	S×Me ₁	296	35	-
2010	Me ₁ ^{CS}	18	18	0

Pozn.: Me = jednodomý jedinec; S = sesterský genotyp; CS = cizosprášení

Analýzy DNA byly provedeny u všech 214 semenáčů získaných v roce 2009 a u 181 semenáčů (tj. 42 % z celkového počtu v roce 2010) získaných v roce 2010 (Tab. 43).

Tab. 43: Podíl semenáčů 2010 (první porost) odebraných k rodičovským analýzám

Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	semenáče ks	analýzy DNA %
2×4/5 5ř	2×4/5 4ř	102	29,4
2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	35	100,0
2×4/5 4ř	neznámý	17	100,0
2×4/5 5ř	neznámý	60	58,3
5×4/7 5ř	3×4/7 4ř	43	46,5
2×4/5 5ř	3×4/2 3ř	128	15,6
2×4/5 5ř	5×4/7 4ř	39	51,3
5×4/7 5ř	3×4/10 5ř	4	100,0
	I ₂	102	29,4
	I ₁ S	35	100,0
	I ₁ CS	77	67,5
	H	214	29,9

Pozn.: I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterózního efektu

Výsledky rodičovských analýz potomstev pocházejících z cizosprášení provedených v roce 2009 prokázaly výskyt spontánního inbrídingu u potomstva jedné matky z osmi analyzovaných; z 200 potomků byl zjištěn spontánní inbríding u 1,5 % semenáčů. Ani jeden potomek pocházející z cizosprášení z roku 2010 nevznikl ze spontánního inbrídingu (Tab. 44).

Tab. 44: Podíl spontánního inbrídingu u semenáčů pocházejících z cizosprášení (první porost)

Rok	Mateřský genotyp	N	Spontánní inbrídung %	Alespoň 1 kladné LOD u bratra %
2009	2×4/4 3ř	19	0	26,3
	2×4/5 4ř	13	0	7,7
	2×4/9 5ř	9	0	0
	3×4/1 5ř	4	0	0
	5×4/1 3ř	53	0	0
	5×4/10 3ř	61	0	8,2
	5×4/3 4ř	38	7,9	13,2
	5×4/9 5ř	3	0	0
	2×4	41	0	14,6
	3×4	4	0	0
	5×4	155	1,9	6,5
	celkem	200	1,5	8
2010	2×4/5 4ř	18	0	0
	2×4/5 5ř	35	0	2,9
	celkem	53	0	1,9

Pozn.: N = počet analyzovaných jedinců; LOD = logaritmus podílu pravděpodobnosti šancí

6.6.1.2 Druhý porost

Rok 2009. Pro analýzy DNA byla vybrána dvě potomstva od jedné matky; pro KO tvořili rodičovskou kombinaci sourozenci a u CS byl otec neznámý. Pomocí 8 mikrosatelitních markerů byli potvrzeni příslušní rodiče KO (tj. křížení $(60 \times 16/2) \times (60 \times 16/1)$) všech 70 potomků. V případě 35 potomků z CS (Tab. 45) bylo rodičovskou analýzou zjištěno, že u 31 % případů došlo ke spontánnímu inbrídingu. Otec 29 % semenáčů byl 12 m vzdálený nepřibuzný samčí strom. Ve 40 % případech nebyl ze všech analyzovaných otců v porostu otec nalezen (tj. nenacházel se v bezprostřední vzdálenosti studovaných sourozeneckých skupin).

Rok 2010. Všechny provedené analýzy semenáčů z KO (tj. 19 potomků z křížení $(60 \times 16/2) \times (60 \times 16/1)$ a 21 potomků z křížení $(60 \times 16/2) \times (60 \times 16/5)$) mezi sourozenci s použitím stejné matky potvrdily původ semenáčů. Dále bylo analyzováno 150 semenáčů pocházejících z CS. U 3 odebraných CS ze 7 byl zjištěn (Tab. 45) výskyt spontánního inbrídingu (28 % z celkového počtu semenáčů), a to v rozmezí 31–60 % podle mateřské rostliny. 60 % semenáčů bylo získáno z opylení stromů nacházejících se v porostu, zbytek otců (40 %) byl neznámý. Opylení uvnitř porostu proběhlo do vzdálenosti 12 m (u jednoho semenáče možných 34 m vylučují z důvodu

pravděpodobnějšího opylení bližším pylem), i když byla nejvyšší vzdálenost mezi vybraným mateřským a možným otcovským stromem 44 m.

Tab. 45: Výsledky rodičovských analýz semenáčů pocházejících z cizosprášení (druhý porost)

Rok	N	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	
			%	pozn.
2009	35	60×16/2	25,7	SI
			2,9	bud' 60×16/5 (SI), nebo 11×34/1
			2,9	bud' 60×16/5 (SI), nebo 60×26/5
			28,6	60×26/3
			40,0	neznámý
2010	40	60×16/2	60,0	SI
			2,5	bud' 60×16/5 (SI), nebo 60×26/2
			12,5	60×26/3
			25,0	neznámý
	2	60×16/3	100,0	neznámý
	9	30×61/4	11,1	60×26/3
			22,2	11×34/3
			66,7	neznámý
	29	60×26/1	44,8	SI
			55,2	neznámý
	13	11×34/2	30,8	SI
			15,4	11×15/1
			53,8	neznámý
	30	11×34/4	36,7	SI
			3,3	bud' 11×34/3 (SI), nebo 11×15/2
			3,3	11×15/2
			56,7	neznámý
	27	11×15/3	11,1	11×34/3
			11,1	11×34/1
77,8			neznámý	

Pozn.: N = počet analyzovaných vzorků; SI = spontánní inbríding

Závěr: Ani u jednoho zkoušeného potomka z cizosprášení jednodomých stromů nebylo prokázáno samoopylení. U analyzovaných semenáčů pocházejících z cizosprášení byl zjištěn stupeň spontánního inbrídingu 0–8 % v případě porostu složeného z rostlin pocházejících z druhého inbrídingu (první porost) a 31–60 % v případě porostu složeného z rostlin pocházejících z prvního inbrídingu (druhý porost), a to v závislosti na mateřské rostlině a roku hodnocení.

6.6.2 Genetická diverzita populací

6.6.2.1 První porost

Semenáče 2009.

Charakteristiky genetické multicolority a diverzity populací ze čtyř sledovaných typů křížení (I_2 , tj. druhý stupeň příbuzenského křížení; I_1 CS, tj. cizosprášené rostliny z prvního příbuzenského křížení; CS CS, tj. druhý stupeň cizosprášení; K CS, tj. cizosprášení nepřibuzné matky) shrnuje Tab. 46. Všechny lokusy byly polymorfni s počtem alel 2–14 na jeden lokus; průkazně nejvíc alel měly rostliny pocházející z cizosprášení rostlin z prvního příbuzenského křížení (5–14) a průkazně nejméně alel měly rostliny pocházející z opakovaného příbuzenského opylení (2–4). Hodnoty očekávané heterozygotnosti byly neprůkazně vyšší než hodnoty pozorované heterozygotnosti ve všech typech křížení, s výjimkou křížení typu K CS ($p=0,03$). Průměrné hodnoty PIC byly ve všech typech křížení vysoce informativní ($PIC>0,5$).

Vzácné alely, tj. alely mající frekvenci $<0,01$, byly nalezeny pouze ve dvou případech, a to u semenáčů pocházejících z křížení typu I_1 CS a typu CS CS (Tab. 47).

Tab. 46: Analýza frekvence alel jednotlivých markerů a skupin jedinců pocházejících z různých typů opylení v prvním porostu v roce 2009

Locus	I_2						I_1 CS					
	N	k	H_{Obs}	H_{Exp}	PIC	HW	N	k	H_{Obs}	H_{Exp}	PIC	HW
PMS04	18	4	1	0,738	0,667	ND	193	14	0,829	0,828	0,801	**
PMS07	18	3	0,444	0,446	0,386	ND	197	12	0,609	0,58	0,542	NS
PMS09	18	4	0,778	0,708	0,631	ND	195	9	0,841	0,791	0,759	NS
PMS12	18	2	0,611	0,437	0,334	ND	196	5	0,602	0,545	0,496	NS
PMS14	18	3	0,389	0,586	0,505	ND	197	9	0,893	0,799	0,77	***
PMS16	18	2	0,556	0,514	0,375	ND	197	5	0,721	0,641	0,569	*
PMS20	18	3	0,833	0,686	0,593	ND	196	9	0,769	0,748	0,706	NS
PMGC14	18	4	0,889	0,744	0,673	ND	197	7	0,782	0,794	0,761	*
průměr		3,1	0,688	0,607	0,521			8,8	0,756	0,716	0,676	
Locus	CS CS						K CS					
	N	k	H_{Obs}	H_{Exp}	PIC	HW	N	k	H_{Obs}	H_{Exp}	PIC	HW
PMS04	60	10	0,95	0,806	0,769	ND	31	7	0,742	0,645	0,585	NS
PMS07	66	11	0,697	0,618	0,586	NS	34	7	0,588	0,482	0,448	ND
PMS09	65	9	0,862	0,816	0,784	NS	34	7	0,853	0,754	0,703	ND
PMS12	66	6	0,697	0,619	0,567	NS	34	4	0,735	0,557	0,452	NS
PMS14	66	12	0,894	0,857	0,833	ND	34	7	0,794	0,752	0,704	NS
PMS16	66	6	0,818	0,743	0,692	NS	34	4	0,794	0,686	0,606	ND
PMS20	66	7	0,773	0,681	0,639	*	34	6	0,647	0,523	0,491	ND
PMGC14	66	7	0,697	0,68	0,64	NS	34	6	0,735	0,575	0,485	NS
průměr		8,5	0,799	0,728	0,689			6	0,736	0,622	0,559	

Pozn.: I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; CS CS = druhý stupeň cizosprášení; K CS = cizosprášení nepřibuzné matky (kontrola); N = počet jedinců, k = počet alel; H_{Obs} = pozorovaná heterozygotnost; H_{Exp} = očekávaná heterozygotnost; PIC = polymorfní informační obsah; HW = průkazná odchylka od Hardy-Weinbergova equilibria. (NS = neprůkazné; * = průkazné na 5% hladině významnosti, ** = průkazné na 1% hladině významnosti, *** = průkazné na 0,1% hladině významnosti, ND = neprovedené)

Tab. 47: Frekvence alel pro 8 SSR lokusů u jednotlivých populací semenáčů topolu černého získaných v roce 2009 (první porost). Vzácné alely s frekvencí menší než 0,01 jsou vyznačeny tučně.

Typ křížení	Alela	Lokus							
		PMS04	PMS07	PMS09	PMS12	PMS14	PMS16	PMS20	PMGC14
I ₂	1	0,1389	0,0833	0,3056	0,6944	0,25	0,5	0,3333	0,2778
	2	0,2222	0,1944	0,0833	0,3056	0,1667	0,5	0,3333	0,2222
	3	0,3889	0,7222	0,4167		0,5833		0,3333	0,3611
	4	0,25		0,1944					0,1389
I ₁ CS	1	0,1788	0,0051	0,0051	0,6301	0,0736	0,3503	0,3564	0,0228
	2	0,1891	0,0152	0,3103	0,0816	0,1091	0,0051	0,0462	0,2893
	3	0,1891	0,0025	0,0718	0,0663	0,3299	0,0178	0,2974	0,0228
	4	0,2228	0,0025	0,2026	0,2194	0,0508	0,1701	0,1667	0,0964
	5	0,0026	0,0152	0,2359	0,0026	0,1726	0,4569	0,0821	0,2132
	6	0,0052	0,0102	0,0667		0,2081		0,0462	0,2284
	7	0,0492	0,1066	0,0897		0,0178		0,0051	0,1269
	8	0,0052	0,1853	0,0051		0,0025			
	9	0,0026	0,6117	0,0128		0,0355			
	10	0,1373	0,0076						
	11	0,0052	0,0127						
	12	0,0052	0,0254						
	13	0,0052							
	14	0,0026							
CS CS	1	0,0083	0,0076	0,0077	0,5606	0,0076	0,3409	0,0076	0,1439
	2	0,1	0,0076	0,1077	0,1742	0,053	0,0152	0,2045	0,5152
	3	0,2833	0,0076	0,2077	0,0076	0,1667	0,0152	0,0833	0,0227
	4	0,1917	0,0076	0,0077	0,0152	0,0833	0,1818	0,5076	0,053
	5	0,0083	0,0076	0,2846	0,0455	0,0379	0,303	0,0985	0,0909
	6	0,0083	0,0682	0,1154	0,197	0,197	0,1439	0,0909	0,0076
	7	0,1917	0,1288	0,0615		0,1818		0,0076	0,1667
	8	0,0083	0,5909	0,1923		0,0076			
	9	0,0083	0,1212	0,0154		0,0152			
	10	0,1917	0,0227			0,0152			
	11		0,0303			0,1894			
	12					0,0455			

Typ křížení	alela	Lokus							
		PMS04	PMS07	PMS09	PMS12	PMS14	PMS16	PMS20	PMGC14
K CS	1	0,5323	0,1471	0,0441	0,5294	0,3971	0,3235	0,1176	0,5441
	2	0,0484	0,0441	0,0588	0,4118	0,1176	0,0147	0,0294	0,0294
	3	0,1129	0,0147	0,3824	0,0294	0,2647	0,3382	0,0294	0,3676
	4	0,0161	0,0441	0,2206	0,0294	0,0441	0,3235	0,6765	0,0147
	5	0,2581	0,7059	0,0294		0,0294		0,0588	0,0294
	6	0,0161	0,0147	0,0294		0,0294		0,0882	0,0147
	7	0,0161	0,0294	0,2353		0,1176			

Pozn.: I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; CS CS = druhý stupeň cizosprášení; K CS = cizosprášení nepříbuzné matky (kontrola)

Semenáče 2010.

Charakteristiky genetické multicolority a diverzity populací ze čtyř sledovaných typů křížení (I₂, tj. druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S, tj. samosprášené rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS, tj. cizosprášené rostliny z prvního příbuzenského křížení; H, tj. potomci křížení jedinců s cílem dosažení heterozního efektu;) shrnuje Tab. 48. Všechny lokusy byly polymorfni s počtem alel 2–10 na jeden lokus, s výjimkou křížení typu I₁ S, kde byla u markeru PMS16 určena pouze jedna alela u všech těchto jedinců; průkazně nejvíc alel měly rostliny pocházející z cizosprášení rostlin z prvního příbuzenského křížení (5–10) a neprůkazně nejméně alel měly rostliny pocházející z potomstva samosprášené rostliny z prvního příbuzenského křížení (1–2). Hodnoty očekávané heterozygotnosti byly neprůkazně nižší než hodnoty pozorované heterozygotnosti ve všech typech křížení. Průměrné hodnoty PIC byly v případě příbuzenských křížení (typ I₂ a typ I₁ S) dobře informativní (0,5 > PIC > 0,25) a v případech nepříbuzenských křížení (typ I₁ CS a typ H) vysoce informativní (PIC > 0,5).

Vzácné alely, tj. alely mající frekvenci <0,01, byly nalezeny pouze ve dvou případech, a to u semenáčů pocházejících z křížení typu I₁ CS a typu H (Tab. 49).

Tab. 48: Analýza frekvence alel jednotlivých markerů a skupin jedinců pocházejících z různých typů opylení v prvním porostu v roce 2010

Locus	I ₂						I ₁ S					
	N	k	H _{Obs}	H _{Exp}	PIC	HW	N	k	H _{Obs}	H _{Exp}	PIC	HW
PMS04	35	2	0,486	0,501	0,372	NS	35	2	0,543	0,501	0,4	NS
PMS07	34	2	0,706	0,464	0,352	ND	35	2	0,514	0,457	0,3	ND
PMS09	35	3	0,743	0,566	0,497	NS	35	2	0,571	0,437	0,3	ND
PMS12	35	2	0,743	0,504	0,373	NS	35	2	0,514	0,487	0,4	NS
PMS14	35	2	0,486	0,501	0,372	NS	35	2	0,486	0,481	0,4	NS
PMS16	34	2	0,441	0,349	0,285	ND	35	1	0	0	0	ND
PMS20	35	3	0,686	0,626	0,548	NS	35	2	0,629	0,507	0,4	NS
PMGC14	35	2	0,514	0,497	0,37	NS	35	2	0,429	0,506	0,4	NS
průměr		2,3	0,601	0,501	0,396			1,9	0,461	0,422	0,3	

Locus	I ₁ CS						H					
	N	k	H _{Obs}	H _{Exp}	PIC	HW	N	k	H _{Obs}	H _{Exp}	PIC	HW
PMS04	52	8	0,923	0,775	0,732	NS	65	3	0,646	0,606	0,5	NS
PMS07	53	10	0,83	0,705	0,647	NS	65	3	0,662	0,585	0,5	NS
PMS09	51	6	0,706	0,729	0,681	NS	65	4	0,708	0,657	0,6	NS
PMS12	52	5	0,635	0,58	0,523	NS	65	2	0,369	0,429	0,3	NS
PMS14	52	9	0,904	0,777	0,737	NS	65	3	0,662	0,567	0,5	NS
PMS16	53	5	0,623	0,597	0,537	NS	65	2	0,692	0,492	0,4	*
PMS20	53	5	0,83	0,73	0,676	NS	65	5	0,677	0,671	0,6	NS
PMGC14	53	6	0,887	0,707	0,642	**	65	3	0,862	0,647	0,6	***
průměr		6,8	0,792	0,7	0,647			3,1	0,66	0,582	0,5	

Pozn.: I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterózního efektu; N = počet jedinců, k = počet alel; H_{Obs} = pozorovaná heterozygotnost; H_{Exp} = očekávaná heterozygotnost; PIC = polymorfni informační obsah; HW = průkazná odchylka od Hardy-Weinbergova equilibria. (NS = neprůkazné; * = průkazné na 5% hladině významnosti, ** = průkazné na 1% hladině významnosti, *** = průkazné na 0.1% hladině významnosti, ND = neprovedené)

Tab. 49: Frekvence alel pro 8 SSR lokusů u jednotlivých populací semenáčů topolu černého získaných v roce 2010 (první porost). Vzácné alely s frekvencí menší než 0,01 jsou vyznačeny tučně.

Typ křížení	Alela	Lokus							
		PMS04	PMS07	PMS09	PMS12	PMS14	PMS16	PMS20	PMGC14
I ₂	1	0,4429	0,3529	0,2286	0,4571	0,4429	0,2206	0,2571	0,5714
	2	0,5571	0,6471	0,6000	0,5429	0,5571	0,7794	0,5143	0,4286
	3			0,1714				0,2286	
I ₁ S	1	0,4429	0,3429	0,6857	0,4000	0,6143	1,0000	0,4857	0,5286
	2	0,5571	0,6571	0,3143	0,6000	0,3857		0,5143	0,4714
I ₁ CS	1	0,3462	0,0094	0,2451	0,5962	0,0481	0,2264	0,2736	0,0472
	2	0,1827	0,0094	0,4216	0,0962	0,0288	0,0189	0,0849	0,3302
	3	0,0192	0,0094	0,0294	0,0577	0,0481	0,0189	0,2075	0,0094
	4	0,2019	0,0094	0,1176	0,2404	0,1154	0,1604	0,3868	0,0094
	5	0,1923	0,3491	0,1569	0,0096	0,3365	0,5755	0,0472	0,2453
	6	0,0288	0,0377	0,0294		0,2981			0,3585
	7	0,0096	0,3962			0,0096			
	8	0,0192	0,0283			0,0192			
	9		0,1415			0,0962			
	10		0,0094						
H	1	0,5385	0,2538	0,2308	0,3077	0,2462	0,4231	0,3231	0,2154
	2	0,2615	0,1769	0,5	0,6923	0,1615	0,5769	0,0077	0,3462
	3	0,2	0,5692	0,0692		0,5923		0,2385	0,4385
	4			0,2				0,4154	
	5							0,0154	

Pozn.: I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterózního efektu

6.6.2.2 Druhý porost

Semenáče 2009.

Charakteristiky genetické multicolority a diverzity populací ze dvou sledovaných typů křížení (I_1 , tj. $S \times B$, a CS) shrnuje Tab. 50. Všechny lokusy byly polymorfní s počtem alel 2–4 na jeden lokus v případě příbuzenského křížení, resp. s počtem alel 4–7 v případě cizosprášení. Hodnoty očekávané heterozygotnosti (0,41–0,75 pro I_1 , tj. $S \times B$, a 0,64–0,76 pro CS) byly zpravidla nižší než hodnoty pozorované heterozygotnosti (0,42–1,00 pro I_1 a 0,66–0,87 pro CS). Průměrné hodnoty PIC byly v obou typech křížení (typ I_1 a typ CS) vysoce informativní ($PIC > 0,5$).

Ani v jednom typu křížení se nevyskytují vzácné alely (Tab. 51), tj. všechny alely mají frekvenci $> 0,01$. Rozdíly v počtu alel byly průkazné ($p = 0,000$). Rozdíly v očekávané heterozygotnosti, pozorované heterozygotnosti mezi semenáči z křížení typu I_1 a CS nebyly průkazné ($p > 0,05$), hodnota p byla po řadě 0,128 a 0,550.

Tab. 50: Analýza frekvence alel jednotlivých markerů a skupin jedinců pocházejících z příbuzenského a nepříbuzenského opylení ve druhém porostu v roce 2009

Locus	I_1						CS					
	N	k	H_{Obs}	H_{Exp}	PIC	HW	N	k	H_{Obs}	H_{Exp}	PIC	HW
PMS04	79	4	0,949	0,751	0,698	**	32	7	0,844	0,756	0,706	ND
PMS07	81	3	0,926	0,66	0,582	***	31	7	0,871	0,65	0,572	NS
PMS09	80	4	1	0,752	0,7	***	32	5	0,844	0,662	0,582	NS
PMS12	81	2	0,58	0,414	0,327	**	31	4	0,71	0,652	0,572	NS
PMS14	81	3	0,679	0,608	0,537	NS	32	6	0,719	0,642	0,58	NS
PMS16	81	3	0,42	0,51	0,391	NS	31	5	0,806	0,712	0,647	ND
PMS20	80	3	0,763	0,644	0,567	NS	32	5	0,844	0,685	0,617	NS
PMGC14	81	2	0,593	0,503	0,375	NS	32	4	0,656	0,666	0,586	NS
průměr		3	0,739	0,605	0,522			5,4	0,787	0,678	0,608	

Pozn.: I_1 = první stupeň příbuzenského křížení; CS = cizosprášení; N = počet jedinců, k = počet alel; H_{Obs} = pozorovaná heterozygotnost; H_{Exp} = očekávaná heterozygotnost; PIC = polymorfní informační obsah; HW = průkazná odchylka od Hardy-Weinbergova equilibria. (NS = neprůkazné; * = průkazné na 5% hladině významnosti, ** = průkazné na 1% hladině významnosti, *** = průkazné na 0,1% hladině významnosti, ND = neprovedené)

Tab. 51: Frekvence alel pro 8 SSR lokusů u jednotlivých populací semenáčů topolu černého získaných v roce 2009 (druhý porost)

Typ křížení	alela	Lokus							
		PMS04	PMS07	PMS09	PMS12	PMS14	PMS16	PMS20	PMGC14
I ₁	1	0,2532	0,2716	0,2875	0,7099	0,2346	0,4444	0,4625	0,5062
	2	0,2785	0,3148	0,2125	0,2901	0,2284	0,5432	0,3000	0,4938
	3	0,1962	0,4136	0,2500		0,5370	0,0123	0,2375	
	4	0,2722		0,2500					
CS	1	0,0313	0,0161	0,0156	0,1290	0,1719	0,3548	0,4219	0,2344
	2	0,1719	0,0806	0,1719	0,4355	0,5313	0,1613	0,0938	0,3125
	3	0,2188	0,0161	0,4219	0,3871	0,0313	0,0968	0,3594	0,0156
	4	0,3906	0,4355	0,0156	0,0484	0,2344	0,3710	0,0938	0,4375
	5	0,0156	0,4032	0,3750		0,0156	0,0161	0,0313	
	6	0,0156	0,0323			0,0156			
	7	0,1563	0,0161						

Pozn.: I₁ = první stupeň příbuzenského křížení; CS = cizosprášení

Semenáče 2010.

Charakteristiky genetické multicolority a diverzity populací ze dvou sledovaných typů křížení (I₁, tj. S×B, a CS) shrnuje Tab. 52. Všechny lokusy byly polymorfní s počtem alel 4–7 na jeden lokus v případě příbuzenského křížení, resp. s počtem alel 5–13 v případě cizosprášení. Hodnoty očekávané heterozygotnosti (0,51–0,81 pro I₁ a 0,70–0,87 pro CS) byly v polovině případů (markerech) nižší než hodnoty pozorované heterozygotnosti (0,55–0,85 pro I₁ a 0,69–0,94 pro CS). Průměrné hodnoty PIC byly v obou typech křížení (typ I₁ a typ CS) vysoce informativní (PIC>0,5).

Výskyt vzácných alel u semenáčů z nepříbuzenského křížení (Tab. 53) ukazuje vyšší genovou diverzitu oproti příbuzenskému křížení, ve kterém se vzácné alely nevyskytují.

Rozdíly v počtu alel, očekávané heterozygotnosti, pozorované heterozygotnosti mezi semenáči z křížení typu S×B a VS byly průkazné (p>0,05), hodnota p byla po řadě 0,007; 0,020 a 0,045.

Tab. 52: Analýza frekvence alel jednotlivých markerů a skupin jedinců pocházejících z příbuzenského a nepříbuzenského sprášení ve druhém porostu v roce 2010

Locus	I ₁						CS					
	N	k	H _{Obs}	H _{Exp}	PIC	HW	N	k	H _{Obs}	H _{Exp}	PIC	HW
PMS04	94	7	0,809	0,811	0,78	NS	94	13	0,819	0,868	0,848	ND
PMS07	94	4	0,809	0,61	0,527	**	95	11	0,842	0,711	0,661	NS
PMS09	94	7	0,851	0,758	0,715	NS	95	9	0,8	0,77	0,735	NS
PMS12	94	4	0,553	0,511	0,469	NS	94	7	0,787	0,697	0,642	NS
PMS14	93	5	0,677	0,707	0,652	***	93	9	0,935	0,816	0,786	NS
PMS16	93	5	0,624	0,646	0,578	NS	95	5	0,705	0,715	0,675	NS
PMS20	94	4	0,702	0,652	0,587	NS	94	6	0,691	0,742	0,693	*
PMGC14	89	6	0,584	0,617	0,549	NS	85	8	0,918	0,83	0,802	NS
průměr		5,3	0,701	0,664	0,607			8,5	0,812	0,769	0,73	

Pozn.: I₁ = první stupeň příbuzenského křížení; CS = cizosprášení; N = počet jedinců, k = počet alel; H_{Obs} = pozorovaná heterozygotnost; H_{Exp} = očekávaná heterozygotnost; PIC = polymorfni informační obsah; HW = průkazná odchylka od Hardy-Weinbergova equilibria. (NS = neprůkazné; * = průkazné na 5% hladině významnosti, ** = průkazné na 1% hladině významnosti, *** = průkazné na 0.1% hladině významnosti, ND = neprovedené)

Tab. 53: Frekvence alel pro 8 SSR lokusů u jednotlivých populací semenáčů topolu černého získaných v roce 2010 (druhý porost). Vzácné alely s frekvencí menší než 0,01 jsou vyznačeny tučně.

Typ křížení	alela	Lokus							
		PMS04	PMS07	PMS09	PMS12	PMS14	PMS16	PMS20	PMGC14
I ₁	1	0,117	0,117	0,0266	0,1011	0,2151	0,3656	0,4787	0,0393
	2	0,0691	0,3936	0,1117	0,6702	0,0806	0,0591	0,0585	0,5169
	3	0,0213	0,4734	0,016	0,1702	0,2688	0,4624	0,3085	0,0393
	4	0,2979	0,0160	0,3138	0,0585	0,414	0,0699	0,1543	0,0337
	5	0,2181		0,1649		0,0215	0,043		0,0337
	6	0,1489		0,3245					0,3371
	7	0,1277		0,0426					
CS	1	0,1968	0,0105	0,0526	0,4202	0,1882	0,1368	0,3511	0,1412
	2	0,0745	0,0263	0,0789	0,3245	0,2151	0,1316	0,1649	0,2471
	3	0,133	0,0158	0,0053	0,1436	0,2742	0,1684	0,2926	0,1000
	4	0,0372	0,0105	0,3737	0,0106	0,0968	0,4632	0,1596	0,0294
	5	0,2074	0,0316	0,1263	0,0426	0,0699	0,1000	0,0266	0,1471
	6	0,0053	0,0737	0,2526	0,0426	0,0108		0,0053	0,0765
	7	0,0904	0,3737	0,0632	0,016	0,129			0,2353
	8	0,0053	0,3737	0,0421		0,0108			0,0235
	9	0,0957	0,0053	0,0053		0,0054			
	10	0,1117	0,0737						
	11	0,0053	0,0053						
	12	0,0160							
	13	0,0213							

Pozn.: I₁ = první stupeň příbuzenského křížení; CS = cizosprášení

Závěr: Všechny lokusy byly polymorfní s počtem alel 2–14 na jeden lokus, s výjimkou křížení typu $I_1 S$, kde byla u markeru PMS16 určena pouze jedna alela; průkazně nejvíc alel měly rostliny pocházející z cizosprášení rostlin z I_1 generace a průkazně nejméně alel měly rostliny pocházející z opakovaného inbrídingu nebo samoopylení. Hodnoty pozorované a očekávané heterozygotnosti se pohybovaly v intervalu 0,389–1, resp. 0,349–0,868. Průměrné hodnoty PIC byly ve všech typech křížení vysoce informativní. Vzácné alely byly nalezeny pouze u semenáčů pocházejících z cizosprášení.

6.6.3 F-statistika

6.6.3.1 První porost

Celkové výsledky výpočtu koeficientu inbrídingu (F_{IS}) je uvedeno v Tab. 54. Zjištěné F_{IS} mají ve všech typech křížení i obou letech zápornou hodnotu, což ukazuje, že je i přes provedené křížení v potomstvu stále vysoký stupeň heterozygotnosti.

Konkrétní hodnoty heterozygotnosti a hodnoty koeficientu inbrídingu (F_{IS}) pro jednotlivé mikrosatelitní markery u semenáčů z let 2009 a 2010 uvádí Tab. 55.

Tab. 54: Hodnoty F-statistiky potomstev z prvního porostu

Rok	$F_{IS} (I_2)$	$F_{IS} (I_1 S)$	$F_{IS} (I_1 CS)$	$F_{IS} (CS CS)$	$F_{IS} (H)$	$F_{IS} (K CS)$	F_{IS}
2009	-0,132	-	-0,056	-0,098	-	-0,184	-0,081
2010	-0,199	-0,092	-0,132	-	-0,134	-	-0,138

Tab. 55: Hodnoty heterozygotnosti a F-statistiky v potomstvu prvního porostu z let 2009 a 2010

Rok	2009			2010		
	H_I	H_S	F_{IS}	H_I	H_S	F_{IS}
PMS04	0,854	0,799	-0,069	0,674	0,614	-0,098
PMS07	0,616	0,57	-0,081	0,69	0,573	-0,204
PMS09	0,843	0,787	-0,071	0,688	0,618	-0,113
PMS12	0,637	0,556	-0,146	0,54	0,496	-0,089
PMS14	0,854	0,794	-0,075	0,663	0,597	-0,111
PMS16	0,74	0,66	-0,121	0,497	0,404	-0,232
PMS20	0,76	0,706	-0,077	0,713	0,649	-0,099
PMGC14	0,765	0,744	-0,029	0,724	0,61	-0,187
průměr	0,759	0,702	-0,081	0,649	0,57	-0,138

6.6.3.2 Druhý porost

Celkové výsledky výpočtu koeficientu inbrídingu (F_{IS}) je uvedeno v Tab. 56. Zjištěné F_{IS} mají v obou letech i typech křížení (příbuzenské, nepříbuzenské křížení) zápornou hodnotu, což ukazuje, že je i přes provedené křížení v potomstvu stále vysoký stupeň heterozygotnosti.

Konkrétní hodnoty heterozygotnosti a hodnoty koeficientu inbrídingu (F_{IS}) pro jednotlivé mikrosatelitní markery u semenáčů z let 2009 a 2010 uvádí po řadě Tab. 57.

Tab. 56: Hodnoty F-statistiky potomstev z druhého porostu

Rok	$F_{IS}(I_1)$	$F_{IS}(CS)$	F_{IS}
2009	-0,221	-0,160	-0,202
2010	-0,056	-0,057	-0,056

Tab. 57: Hodnoty heterozygotnosti a F-statistiky v potomstvu druhého porostu z let 2009 a 2010

Rok	2009			2010		
	H_I	H_S	F_{IS}	H_I	H_S	F_{IS}
PMS04	0,919	0,752	-0,221	0,814	0,84	0,03
PMS07	0,911	0,657	-0,386	0,826	0,661	-0,249
PMS09	0,955	0,726	-0,315	0,825	0,764	-0,08
PMS12	0,616	0,48	-0,284	0,67	0,604	-0,109
PMS14	0,69	0,618	-0,118	0,806	0,762	-0,058
PMS16	0,527	0,566	0,069	0,665	0,681	0,023
PMS20	0,786	0,656	-0,199	0,697	0,697	0,001
PMGC14	0,611	0,549	-0,112	0,747	0,721	-0,036
průměr	0,752	0,626	-0,202	0,757	0,716	-0,056

Závěr: Zjištěné koeficienty inbrídingu mají ve všech typech křížení, letech i porostech zápornou hodnotu, což ukazuje, že je i přes provedené křížení v potomstvu stále vysoký stupeň heterozygotnosti.

7 DISKUZE

7.1 Kvetení

7.1.1 Poměr pohlaví

U kvetoucích jedinců v prvním (mladém) porostu *P. nigra* byl zjištěn vyšší výskyt samčích stromů oproti samičím. Stejnou odchylku pozoroval např. i PAULEY & MENNEL (1957) nebo VALENTINE (1975) u populace *P. tremuloides* Michaux. Možnou příčinou zkreslení poměru pohlaví 1:1 by mohla být skutečnost, že samčí stromy některých druhů dosahují reprodukční dospělosti dříve než samičí stromy (STANTON & VILLAR 1996). Stejně jako VALENTINE (1975) lze říci, že poměr pohlaví v potomstvu je ovlivněn použitými rodiči při křížení. Podle jiných studií by měla mít na upřednostnění pohlaví specifický vliv lokalita, na které se populace nachází – samičí stromy by měly převažovat na vlhkých a živinově bohatých lokalitách a v nižších nadmořských výškách, samčí naopak (SLAVOV & ZHELEV 2010). Podle FALINSKI (1980) závisí poměr pohlaví potomstva také na vývojovém stupni porostu. Poslední dvě uvedené možnosti však nelze v tomto případě uměle založeného porostu potvrdit či vyvrátit.

7.1.2 Intenzita a fenologie kvetení

Nízký počet silně kvetoucích jedinců v prvním porostu lze vysvětlit mladým věkem rostlin. Byly hodnoceny již v sedmém roku života, přičemž *P. nigra* začíná plodit od 6–12 let (CAGELLI & LEFÈVRE 1995, WYCKOFF & ZÁSADA 2002, CODER 2008). Předpokládá se proto, že se v rámci ontogenetického vývoje jednotlivých stromů bohatost kvetení v dalších letech zvýší.

Intenzita kvetení jedinců je dále pravděpodobně závislá na podmínkách počasí nejen v létě předchozího roku při zakládání květních pupenů (PROCHÁZKA a kol. 2003), ale i v roce kvetení a může rok od roku kolísat (ANDERSON a kol. 2012).

Relativně vysoký podíl (jedna třetina) nekvetoucích jedinců ve druhém (16letém) porostu mohl být zapříčiněn také lokalitou. Porost je umístěn na úpatí svahu, a mohla zde vzniknout mrazová kotlina, která ovlivnila jak množství, tak i intenzitu kvetení dospělých stromů. Což dokazuje také fakt, že v tomto porostu kvetly stromy později. Rozdílný termín kvetení mohl být dán i jejich odlišným genetickým základem.

Nevyrovnanost zastoupení jedinců v jednotlivých kategoriích intenzity kvetení může být také vysvětlena rozdílným původem jednotlivých rostlin. Kvůli různému nástupu kvetení nemají všechny samičí stromy stejnou pravděpodobnost sprášení se všemi samčími stromy (některé

rodičovské kombinace nemohou být realizovány), což má vliv na genetické dispozice budoucích potomstev. Výsledkem rozdílné doby kvetení jednotlivých rodičovských stromů může být vyšší možnost příbuzenského opylení.

7.1.3 Výskyt jednodomých jedinců

Při zjišťování pohlaví u kvetoucích stromů *P. nigra* byl v porostu zjištěn výskyt šesti jednodomých jedinců. Ačkoliv je *P. nigra* obecně označován za dvoudomý, byly v přírodě nalezeny i odchylky od dvoudomosti (VON MELCHIOR 1967, JOVANOVIĆ & TUČOVIĆ 1962) a to u variet *P. nigra* var. *betulifolia* (Pursh) Torr. a *P. nigra* var. *thevestina* (Dode) Bean. Stejně jako ve studii Jovanović & Tučović (1962) byly v tomto případě nalezeny jedinci s třemi typy reprodukční strategie (andromonoická, gynomonoická a trimonoická). V porovnání s VON MELCHIOREM (1967), který pracoval se dvěma klony – první neměl klíčící pyl a druhý mohl být použit jako mateřský i jako otcovský komponent pro křížení a byl i samosprašný – byla získána semena z téměř všech křížení nalezených jednodomých stromů.

Přesná příčina odchylky od dvoudomosti není zatím známa (BRUNNER 2010). V dostupné literatuře však můžeme nalézt některé teorie vysvětlující tento jev; např. JOVANOVIĆ & TUČOVIĆ (1962) uvádějí jako příčinu odchylek somatickou mutaci způsobenou traumatickým poraněním adventivních pupenů. Podle HESLOP-HARRISON (1924) je výskyt hermafroditních forem rodu *Salix* spojen s napadením rostlin drobnými pavoukovci čeledi vlnovníci, Eriophyidae. Stejně jako ve studii LESTERA (1963), u *P. tremuloides*, nebyli ale tyto členovci ve zkoumaném porostu nalezeni. MCLETCHE & TUSKAN (1994) a SANTAMOUR (1956) se přiklánějí k teorii možného genetického ovlivnění pohlaví u druhu *Populus*. Výskyt pohlavních chromozomů je součástí několika nedávných studií (GAUDET a kol. 2008, MARKUSSEN a kol. 2007, YIN a kol. 2008).

Výsledky genetických analýz nalezených jednodomých topolů v Průhonicích nepotvrzují hypotézu mutace jako příčinu jednodomosti. Je ale možné, že mohly být výsledky zkresleny použitím pouze osmi mikrosatelitních markerů, tyto markery se nemusely nacházet v oblastech kódujících pohlaví, a navíc byly testovány pouze dva jednodomé stromy. Příbuzenské křížení mohlo být další příčinou odchylek od dvoudomosti.

Ačkoliv provedené laboratorní testy náhodně vybraných potomků získaných z volného sprášení jednodomých stromů vyloučily výskyt samoopylení, v umělých podmínkách (kontrolované opylení ve skleníku) došlo při samoopylení těchto jedinců k tvorbě semen. Zjištění, zda se získané semenáče dožijí dospělosti, jaké budou mít pohlaví a zda budou schopné reprodukce, bude předmětem dalšího studia. Získané informace by sloužily k dalším možnostem uchování

ohroženého druhu *P. nigra* L. (ANONYMOUS 2012) i jeho možnému využití pro další šlechtění na zvýšení výnosu biomasy do plantáží rychle rostoucích dřevin (LAUREYSENS a kol. 2005, BENETKA a kol. 2007).

7.2 Zkouška klíčivosti

Úspěch kontrolovaného opylení závisí na splnění řady podmínek: načasování sběru květních větví, metoda sběru a uchování pylu (CAGELLI 1996), správné péče o samičí květní větve, zabránění volnému sprášení, kontrole teploty a vlhkosti během tvorby semen a uskladnění, udržování optimálních růstových podmínek během klíčení semen a správné péče o semenáče (STANTON & VILLAR 1996).

Malý počet získaných semen z prvního porostu může být způsoben věkem mateřských jedinců. Kvetení stromů bylo zjišťováno od jejich sedmi let. Minimální věk, kdy začne *P. nigra* plodit, se pohybuje od šesti do dvanácti let jedince a může být zvýšen nevhodnými environmentálními podmínkami (SCHREINER 1974 in WYCKOFF & ZASADA 2002, CAGELLI & LEFÈVRE 1995).

Na klíčivost semen se mimo stáří mateřské rostliny mohly výrazně podílet i vnější podmínky působící na mateřskou rostlinu v době zrání; hlavně teplota, vodní stress, délka dne, kvalita slunečního záření a přístupnost živin (GUTTERMAN 1993, BEWLEY & BLACK 1994, BRADFORD & NONOGAKI 2007).

U většiny křížení provedených v této studii byla získána menší hodnota klíčivosti semen v porovnání s KARRENBURG & SUTER (2003), kteří získali klíčivost u *P. nigra* převyšující 90 %. Tento jev může být vysvětlen použitím jiné metody ke zjišťování klíčivosti, KARRENBURG & SUTER (2003) zjišťovali klíčivost semen na filtračním papíře. Navíc použili stejné jedince *P. nigra* jako KOLLMANN a kol. (1999), kteří připouští, že to mohou být hybridní topoly. To koresponduje s tvrzením Beringena (in SMULDERS a kol. 2008b), že semena *P. ×canadensis* mohou snadněji vyklíčit. Existuje také předpoklad, že by byla klíčivost semen v polních podmínkách nižší z důvodu teplotních a vlhkostních výkyvů (KARRENBURG & SUTER 2003, GUILLOY-FROGET a kol. 2002); KARRENBURG & SUTER (2003) zjišťovali klíčivost na klíčovadlech pro zajištění homogenní teploty a vlhkosti.

V případě prvního porostu měly podle očekávání nejnižší hodnoty klíčivosti semena potomstev z druhého inbrídingu. Stejně tak se i v jiných studiích (LEVIN & BULINSKA-RANDOMSKA 1988) uvádí, že je klíčivost semen cizosprašných rostlin u potomstev ze samosprašení nižší než u

potomstev z cizosprášení. Příčinou nevyklíčení semen mohl být projev inbrední deprese v důsledku homozygotizace letálních recesivních alel.

Potomstva z křížení provedeného za účelem heterozního efektu měla podle předpokladu vyšší hodnoty klíčivosti semen oproti potomstvům získaných z inbredního křížení. Tyto hodnoty byly ale v roce 2010 nižší než u semen z volného sprášení, což lze vysvětlit nízkým stupněm homozygotizace rodičů a v důsledku čehož došlo ke štěpení v potomstvu.

U potomstev z cizosprášení pravděpodobně došlo ke zvýšení heterozygotnosti. U mnoha populací bylo dokázáno (MITTON 1997 in KELLER & WALLER 2002), že heterozygotnější jedinci mnohem lépe rostou, přežívají i se reprodukuje oproti jedincům homozygotnějším.

Výjimkou byl rok 2011, kdy nejméně klíčila semena získaná z volného sprášení. Mohlo to být tím, že u těchto potomstev došlo k vysokému stupni spontánního inbrídingu (viz dále) a následně k inbrední depresi. Ta se může projevit v jakémkoli stupni životního cyklu - letalita je pro mnoho druhů rostlin pravděpodobně koncentrována ve fázi vzniku a vývoje embrya, protože je to doba prvního projevu podstatných genů (HUSBAND & SCHEMSKE 1996).

Semena byla získána z téměř všech provedených křížení s jednodomými jedinci, a proto může být zamítnuta hypotéza možného výskytu bariér zamezujících reprodukci (STEBBINS 1958).

Zdá se, že potomstva pocházející z křížení s použitím jednodomých květů jako mateřského komponentu mají nižší hodnoty klíčení (energii klíčení i klíčivost) v porovnání s použitím jednodomých květů jako otcovského komponentu. To může vysvětlovat buď rozdílná receptivita samičích květů anebo rozdílná klíčivost pylu.

Přestože LIENERT & FISCHER (2004) zjistili zřetelný gradient v redukci produkce semen a procenta klíčivosti od volného sprášení přes cizo-sprášení k samoopylení pro znaky počet semen, podílu semeno/vajíčko, hmotnost semen a procenta klíčivosti v případě proterandrického druhu *Swertia perenis* a ROTTENBERG (2000) pozoroval u oboupohlavného *Populus euphatica* statisticky průkazně nižší klíčivost pylu a plodnost než u normálních jedinců, nebyl tento gradient v této studii zaznamenán.

7.3 Polní hodnocení

7.3.1 Mortalita

Počet uhynulých jedinců během trvání pokusu rostl. V prvních letech mohla být mortalita rostlin způsobena výsadbovým šokem (CLOSE a kol. 2005), nejdříve při přesazení rostlin do sadbovačů (quick-potů) a později na pole. Pro přežití semenáčů byla důležitá nejen kvalita semenáčů, tj.

velikost rostliny anebo podíl nadzemní a podzemní části rostliny, ale i schopnost rostlin příjmu půdní vody a živin (THOMAS 2008). Životnost rostlin byla významně ovlivněna i jejich genetickým základem. To by mohlo vysvětlovat průkazně nižší úbytek rostlin pocházejících z křížení vzájemně nepříbuzných rodičů oproti rostlinám z příbuzenského křížení. Dalším faktorem ovlivňujícím životaschopnost rostlin byl účinek abiotických vlivů. Získané semenáče byly v prvním roce chráněny před suchem a jinými nepříznivými povětrnostními vlivy umístěním v pařeništi, po jejich přesazení na pole to již nebylo možné. Větší škoda na semenáčích vysazených na pole v roce 2012 byla způsobená mechanizací při plečkování a okusem zajíců.

Předpokládá se, že v dalších letech dojde ke zvýšení mortality již vzrostlejších rostlin rovněž kvůli kompetici mezi rostlinami o světlo (tzv. self-thinning; DEBELL a kol. 1996) a živiny (HAWKES 2000, WEINER & FRECKLETON 2010).

7.3.2 Odolnost vůči *M. larici-populina*

Listová rez *Melampsora* Cast. je považována za významný patogen topolů (LAUREYSENS a kol. 2005), přičemž hlavním druhem na topolech ve střední Evropě je *M. larici-populina* Kleb.. U náchylných rostlin způsobuje snížení efektivnosti fotosyntézy, tj. redukci fotosyntetizující plochy listu a následně předčasný opad listů, a zvýšenou náchylnost k dalším škůdcům a chorobám; byla zjištěna statisticky významná negativní korelace mezi intenzitou výskytu rzi a množstvím sušiny biomasy a to u klonů topolu černého až 30 % (BENETKA a kol. 2011).

Ve většině případů této studie se průkazně lišil stupeň napadení semenáčků rzí v závislosti na jejich původu. V prvním roce hodnocení vykazovaly průkazně vyšší odolnost semenáče vzniklé z příbuzenského křížení oproti semenáčům vzniklým z křížení vzájemně nepříbuzenských jedinců. V dalších letech to bylo ovšem naopak. Výsledek zdravotního stavu semenáčů v období první vegetace mohl být zkreslen tím, že byly rostliny relativně malé a intenzita napadení rzí se špatně hodnotila.

Nižší intenzita napadení některých semenáčů rzí může být vysvětlena vhodnou kombinací rodičovských komponent ke křížení, která dá vznik rezistentnějšího potomstva. Citlivost rodičovský stromů ke rzi ale nebyla studována.

Odolnější jedinci mohou být dále využiti jako rodiče pro rezistentní šlechtění (BENETKA a kol. 2005) a ti s vyšším stupněm homozygotnosti k heteróznímu šlechtění.

Rozvoj rzi souvisí se vzrůstající vlhkostí (AL AFAS a kol. 2008), a proto může být velikost průměrné hodnoty napadení rzí ovlivněna počasím předcházejícím době hodnocení sledovaných

rostlin. Z tohoto důvodu byly největší rozdíly v rezistenci jednotlivých semenáčů pozorovány každý rok v jiný termín, tj. na začátku srpna až na začátku září.

Dalším vlivem na vyšší negativní účinek rzi může mít hustší spon výsadby rostlin (BENETKA a kol. 2007). Tento vliv byl ale v této studii eliminován, protože byly rostliny vysázeny dostatečně daleko od sebe a zatím si nekonkurovaly.

7.3.3 Růstové charakteristiky

Na vitalitu potomstev mají vliv v první řadě jejich rodičovské komponenty použité při křížení (ACQUAAH 2007). Snížená životnost hybridů se dá prokázat už během prvních měsíců nebo let růstu semenáčků a projevuje se v postupném slábnutí nebo vývojové disharmonii mladých rostlin (STETTLER & WU 1996).

Nižší hodnoty výšek rostlin a tloušťek kmínku potomstev pocházejících z příbuzenského křížení, jak prvního tak i druhého inbrídingu, v porovnání s cizosprášením by mohly být vysvětleny výskytem inbrední deprese. Ke stejnému závěru došel i BENETKA a kol. (2008) při studiu potomstev z příbuzenského křížení (sestra×bratr) *Populus nigra*. Navíc měla potomstva rostlin po autogamii nižší vitalitu oproti potomstvům pocházejícím z cizosprášení stejných (jednodomých) matek. Pravděpodobně došlo ke zvýšení homozygotizace a tím k vyštěpení škodlivých nebo letálních genů, nebo k narušení balance polygenního systému (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 1999, PICÓ a kol. 2007). Navíc HUSBAND & SCHEMSKE (1996) zjistili, že průměrná hodnota inbrední deprese je statisticky významně vyšší (43 %) u druhů převážně cizosprašných než u převážně samosprašných. Na druhou stranu byla ve studii KITTELSON & MARON (2000) u vytrvalé *Lupinus arboreus* Sims prokázána inbrední deprese pouze u produkce semen oproti mortalitě semenáčů a jejich velikosti ve 12 týdnech (samosprašené versus cizosprašené potomstvo).

Hodnoty koeficientu inbrídingu u potomstev příbuzenského křížení v obou sledovaných porostech se pohybovaly v intervalu od -2,34 do 0,68. Oproti tomu došli BENETKA a kol. (2008) u *P. nigra* k obdobným výsledkům jako CRNOKRAK & ROFF (1999) pro jiné rostlinné druhy, tj. $0,33 \pm 0,04$. Nedostatek důkazů o předpokládaném výskytu inbrední deprese v některých případech této studie (výskyt záporných hodnot δ) může být způsoben tím, že díky příbuzenskému křížení došlo u některých jedinců k homozygotizaci letálních recesivních alel, která způsobila nevyklíčení semen nebo mortalitu semenáčů ihned v prvním roce života. Chybějící údaje růstových charakteristik takových rostlin mohly vést ke zkreslení výsledků.

Značné ovlivnění výsledků mohly také způsobit environmentální podmínky, ve kterých byly rostliny pěstovány. Inbrední deprese by se mohla vyskytnout až ve stresových podmínkách (KALINOWSKI a kol. 1999, CRNOKRAK & ROFF 1999). Dostatek vody a živin by ale měl dovolit genotypům plně rozvinout jejich genetický potenciál (STETTLER a kol. 1996). V neposlední řadě mohl k zavádějícímu výsledku vést relativně malý počet sledovaných rostlin.

Na druhou stranu při křížení nesourozeneckých rodičovských komponent s vyšším stupněm homozygotnosti byla ve většině případů získána vitálnější potomstva oproti potomstvům pocházejícím z různých stupňů inbrídingu. Při tomto křížení s cílem dosáhnout heterózního efektu pravděpodobně došlo ke kombinaci žádoucích znaků ke zvýšení velikosti jedinců (ALLARD 1960 in STETTLER a kol. 1996). Pro zjištění, zda došlo i ke zvýšení produktivity potomstev, bude předmětem dalšího studia. Např. MARRON a kol. (2010) provedli mezidruhová křížení s použitím *Populus deltoides*, *Populus nigra* a *Populus trichocarpa*. Všechna potomstva ukazovala hybridní zdatnost v porovnání s jejich rodiči. Heteroze v produkci biomasy byla přibližně 130 % pro potomstvo *P. deltoides*×*P. nigra* a 178 % ve Francii a 540 % v Itálii pro potomstvo *P. deltoides*×*P. trichocarpa*.

U potomstva pocházejícího z cizosprášení původní matky došlo pravděpodobně (zatím nebyly provedeny analýzy DNA) k vysokému podílu spontánního inbrídingu, jako ve studii BENETKA a kol. (2008). To by vysvětlovalo i nízké hodnoty růstových charakteristik tohoto potomstva.

Potomstva odvozená z cizosprášení rostlin generace I_1 mají průměrné hodnoty růstových charakteristik průkazně vyšší oproti generaci I_2 a neprůkazně nižší oproti potomstvům z opakovaného cizosprášení. Zřejmě zde došlo k převedení homozygotních škodlivých genů zpět do heterozygotního stavu.

7.4 Genetické analýzy

7.4.1 Spontánní inbríding

Výskyt spontánního inbrídingu byl pozorován u sedmi odlišných potomstev ve všech pozorovaných letech, což svědčí o tom, že jde pravděpodobně o jev obecně se vyskytující. Navíc bylo zjištěno, že došlo k opakovanému spontánnímu inbrídingu u volného sprášení generace I_1 .

Absence důkazů o samoopylení testovaných potomků vzniklých z cizosprášení jednodomých stromů by mohla vysvětlovat buď asynchronnost kvetení samičích a samčích stromů anebo upřednostnění cizo-sprášení před samo-sprášením (BATEMAN 1956, ECKERT & BARRETT 1994, ECKERT & ALLEN 1997, MORAND-PRIEUR a kol. 2003). Navíc se mohla při opylování uskutečnit

selektce mezi pylovými zrny a to buď vlivem pylových zrn, nebo mateřskou rostlinou (MARSHALL a kol. 2007). Dále je možné, že se u jedinců vzniklých ze samoopylení jednodomých stromů projevila inbrední deprese při klíčení semen a došlo k jejich časnému uhynutí. Pro analýzy bylo použito pouze osmi mikrosatelitních markerů, což mohlo vést také ke zkreslení výsledků.

Podíl spontánního inbrídingu potomstev z cizosprášení mateřských stromů druhého porostu, tj. potomstvo generace I_1 , odpovídá intervalu 20–76 %, ke kterému došel BENETKA a kol. (2008) při studiu izolované populace *P. nigra*. Podíl příbuzenského křížení byl pravděpodobně ovlivněn rozmístěním stromů v porostu (sourozenci byli sázeni vedle sebe ve skupině), rozdílnou fenologií mezi potomstvy (BATEMAN 1956, ECKERT & BARRETT 1994, ECKERT & ALLEN 1997) anebo intenzitou kvetení.

To, že se nepodařilo určit otce u všech analyzovaných získaných potomků, podporuje tvrzení POSPÍŠKOVÉ & ŠÁLKOVÉ (2006) a RATHMACHERA a kol. (2010), že většina dospělých stromů *P. nigra* může být opylena ve vzdálenosti do 1 km. V tomto případě byly analyzovány pouze samčí stromy uvnitř obou porostů a v jejich bezprostřední vzdálenosti. Tím mohlo dojít k opylení samičích stromů bez znalosti otcovského komponentu ke křížení. Možnost opylení topolu na vyšší vzdálenosti zvyšuje pravděpodobnost přežití druhu i přes nesouvislý areál rozšíření (SLOVÁČEK 2004) a stále se zvyšující fragmentaci jeho přirozených stanovišť (LEFÈVRE a kol. 1998, HEINZE & LEFÈVRE 1999).

7.4.2 Analýza genetické diverzity

Studované populace topolu černého v této práci jsou charakterizované vysokým stupněm genetické diverzity, který je důsledkem vysokého stupně polymorfismu pozorovaném na použitých mikrosatelitních markerech (SSR markerech). Téměř všechny hodnoty PIC byly vyšší než 0,5, tj. vysoce informativní (BOTSTEIN a kol. 1980). Znamená to, že mohou všechny použité markery přispět podstatnou informací ke genetickému a šlechtitelskému výzkumu inbrídingu.

Všechny lokusy ve všech typech křížení byly polymorfní s výjimkou potomstva pocházejícího ze samosprášení u jednoho (z osmi) markeru, kde se vyskytla pouze jedna alela. Takový typ křížení je nejvyšším stupněm příbuzenského křížení a existuje tu nejvyšší pravděpodobnost vzniku homozygotního potomstva. Čím jsou od sebe rodičovské komponenty geneticky vzdálenější, tím je vyšší předpoklad získání heterozygotnějšího potomstva (RELICHOVÁ 2009), což se v této studii potvrdilo, tj. potomstva pocházející z cizosprášení byla průkazně heterozygotnější oproti

potomstvům pocházejícím z opakovaného inbrídingu a nejhomozygotnější byla potomstva pocházející ze samosprašení.

K obdobným hodnotám heterozygotnosti, jako v této studii, došli i jiní autoři; např. POSPÍŠKOVÁ & BARTÁKOVÁ (2004) zjistily při studiu genetické variability pomocí 12 SSR markerů (v této studii bylo použito 8 stejných) u 112 dospělých *P. nigra* na 4 lokalitách podél řeky Moravy $H_{Obs}=0,79$ (pro jednotlivé lokusy 0,67–0,93) a $H_{Exp}=0,83$ (pro jednotlivé lokusy 0,67–0,90). K podobným výsledkům došel i FOSSATI a kol. (2003), který studoval pomocí 6 SSR markerů (v této studii bylo použito 5 stejných) přírodní populace semenáčů *P. nigra* rostoucích podél řeky Ticino v Itálii ($H_{Obs}=0,78$ a $H_{Exp}=0,73$) a 80 stromů *P. nigra* z italské genové banky ($H_{Obs}=0,75$, $H_{Exp}=0,78$). LIESEBACH a kol. (2010) uvádí u sekce *Aigeiros* $H_{Obs}=0,85$.

Stejně tak i u jiných dvoudomých stromů mírného pásma, jako jsou např. buk a jasan, byl zaznamenán srovnatelný stupeň polymorfismu (STREIFF a kol. 1998, MORAND a kol. 2002).

Zjištěná vysoká hodnota heterozygotnosti může být daná stářím populace hodnocených rostlin. Při studiu genetické diverzity *P. nigra* ze 111 míst Francie, bylo zjištěno, že mladší populace prokazovaly nižší genovou diverzitu oproti starším populacím (LEGIONNET & LEFÈVRE 1996). V této práci byly provedeny analýzy jednoletých semenáčků. U tak mladého materiálu se předpokládá, že při stárnutí takovéto populace dojde ke zvýšení heterozygotnosti a to pravděpodobně kvůli selekci jedinců s vyšším fitness (SMULDERS a kol. 2008b). To odpovídá zjištění POSPÍŠKOVÉ & ŠÁLKOVÉ (2004), které uvádějí u 65 dospělých stromů *P. nigra* $H_{Exp}=0,82$ a u 30 semenáčků $H_{Exp}=0,74$.

8 ZÁVĚR

Stále vyšší fragmentace populací druhu *Populus nigra* vede k ohrožení jeho genofondu (HEINZE & LEFÈVRE 1999). Cílem této práce bylo zjistit, v jaké míře dochází u malých populací *P. nigra* ke spontánnímu inbrídingu a určit, v jaké míře se projevuje inbrední deprese v I_1 a I_2 generaci.

V ontogeneticky mladém (7letém) porostu *P. nigra* kvetlo 82 % jedinců, poměr pohlaví byl 1 samičí strom ku 2 samčím. V tomto porostu bylo určeno i 6 jednodomých jedinců.

Intenzita kvetení stromů v obou porostech se lišila. Termíny kvetení jednotlivých stromů byly odlišné jak mezi sourozeneckými skupinami, tak i uvnitř skupin.

Nejnižší hodnoty energie klíčení a klíčivosti měla potomstva pocházející z generací I_2 nebo samosprášení a nejvyšší hodnoty měla potomstva z cizosprášení.

Bylo zjištěno, že jednodomí jedinci mohou být využiti buď jako mateřský nebo otcovský komponent pro křížení a navíc jsou schopni autogamie; ze všech provedených typů křížení byla získána životaschopná semena.

Ve všech letech pozorování a u všech hodnocených znaků byla zaznamenána nepřímá závislost mezi hodnotami těchto znaků a stupněm příbuznosti rodičů sledovaných potomstev. Zaznamenán byl nižší úbytek rostlin pocházejících z křížení vzájemně nepříbuzných rodičů oproti rostlinám z příbuzenského křížení. Polní hodnocení prokázala závislost stupně napadení semenáčů na jejich původu (typu křížení). Výsledek porovnání růstových znaků pozorovaných semenáčů dokazuje nejvyšší vitalitu jedinců pocházejících z křížení nepříbuzných rodičů oproti jedincům z příbuzenského křížení; a tím i výskyt inbrední deprese. Rostliny pocházející z autogamie (jednodomé rostliny) mají nižší vitalitu než jedinci pocházející z příbuzenského křížení. Potomstva po alogamii generace I_1 mají průměrné hodnoty růstových charakteristik průkazně vyšší oproti generaci I_2 a neprůkazně nižší oproti potomstvům z opakovaného cizosprášení. Potomstva z heterózního křížení měla vyšší vitalitu než potomstva z cizosprášených rostlin z prvního inbrídingu, ale nižší než potomstva z druhého stupně cizosprášení.

Ani u jednoho zkoušeného potomka z volného opylení jednodomých stromů nebylo prokázáno samoopylení. U analyzovaných semenáčů pocházejících z cizosprášení byl zjištěn podíl spontánního inbrídingu 0–8 % v případě generace I_2 a 31–60 % v případě generace I_1 .

Všechny hodnocené lokusy byly polymorfni s počtem alel 2–14 na jeden lokus, s výjimkou potomstva po autogamii, kde byla u markeru PMS16 určena pouze jedna alela; průkazně nejvíc alel měly rostliny po alogamii generace I_1 a průkazně nejméně alel měly rostliny pocházející

z opakovaného inbrídingu a autogamie. Hodnoty pozorované a očekávané heterozygotnosti se pohybovaly v intervalu 0,389–1, resp. 0,349–0,868. Vzácné alely byly nalezeny pouze u semenáčů pocházejících z cizosprašení. Zjištěné koeficienty inbrídingu pro hodnocené mikrosatelitové markery mají ve všech typech křížení, letech i porostech zápornou hodnotu, což ukazuje, že je i přes provedené křížení v potomstvu stále vysoký stupeň heterozygotnosti.

Na základě předložených výsledků lze konstatovat, že je v přírodě u malých populací druhu *P. nigra* pravděpodobný výskyt spontánního inbrídingu, přestože jde o dvoudomý cizosprašný druh. Ke spontánnímu inbrídingu může docházet opakovaně. Inbríding je navíc doprovázen inbrední depresí; již po prvním inbrídingu dochází k poklesu životnosti potomstva. Naopak u inbredního potomstva (I_1) se po volném opylení (alogamii) obnovila jeho životnost (fitness) na úroveň potomstev z opakovaného volného opylení (alogamii). Velmi zajímavý byl nález jednodomých jedinců schopných reprodukce. Výsledky této studie přináší nové poznatky pro konzervační genetiku uvnitř stále se zmenšujících populací *P. nigra*.

9 LITERATURA

ACQUAAH, G., 2007: Principles of plant genetics and breeding. Blackwell publishing, 569 s. ISBN 1-4051-3646-4.

AFFRE, L. & THOMPSON, J.D., 1999: Variation in self-fertility, inbreeding depression and levels of inbreeding in four *Cyclamen* species. *Journal of Evolutionary Biology* 12(1): 113–122.

AINSWORTH, CH., 2000: Boys and girl come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* 86(2): 211–221.

AL AFAS, N.A., MARRON, N., VAN DONGEN, S., LAUREYSENS, I., CEULEMANS, R., 2008: Dynamics of biomass production in a poplar coppice culture over three rotations (11 years). *Forest Ecology and Management* 255(5–6): 1883–1891.

ALBA, N., MACAYA, D., MAESTRO, C., CLIMENT J., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C., 2008: Occurrence of hermaphroditism in *Populus alba* L., a mostly dioecious riparian tree. In: *Poplars, willows and people's wellbeing. Abstract of submitted papers, 27–30 October 2008, Beijing, China*, s. 5.

ALLARD, R.W., 1960: Principles of plant breeding. John Wiley and sons, Inc., New York, London. In: *Biology of Populus and its implications for management and conservation. Part I, Chapter 4*. Stettler, R.F., Bradshaw, Jr., H.D., Heilman, P.E., Hinckley, T.M. (eds). NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, s. 87–112.

ANDERSON, J.T., INOUE, D.W., MCKINNEY, A.M., COLAUTTI, R.I., MITCHELL-OLDS, T., 2012: Phenotypic plasticity and adaptive evolution contribute to advancing flowering menology in response to climate change. *Proceedings of the Royal Society* 279: 3843–3852.

ANGELONI, F., OUBORG, N.J., LEIMU, R., 2011: Meta-analysis on the association of population size and life history with inbreeding depression in plants. *Biological Conservation* 144(1): 35–43.

ANONYMOUS, 1990: Ministerial Conference Strasbourg. Actes de la Conférence Ministérielle pour la Protection des Forêts en Europe, 18 Décembre 1990. Strasbourg. Ministère de L'Agriculture et des Forêts, France, 255 s.

ANONYMOUS, 2012: First meeting of the EUFORGEN Working Group on Genetic Monitoring. Maccarese, Rome, Italy, 17-19 January 2012.

BARSOUM, N., 1998: A comparison of vegetative and non-vegetative regeneration strategies in *Populus nigra* L. and *Salix alba* L. PhD Thesis, University of Cambridge, England, UK. In: *EUFORGEN Technical Bulletin: In situ conservation of Populus nigra*. Lefevre, F.,

Barsoum, N., Heinze, B., Kajba, D., Rotach, P., de Vries, S.M.G., Turok, J. (eds). IPGRI, Rome, Italy, s. 16–24.

BASLAR, S., DOGAN, Y., YENIL, N., KARAGOZ, S., BAG, H., 2005: Trace element biomonitoring by leaves of *Populus nigra* L. from Western Anatolia, Turkey. *Journal of Environmental Biology* 26(4): 665–668.

BATEMAN, A.J., 1956: Cryptic self-incompatibility in the wallflower: *Cheiranthus cheiri* L. *Heredity* 10: 257–261.

BEAN, W.J., CLARKE, D.L., TAYLOR, G., 2000: Trees and shrubs hardy in the British Isles. 8th edition, volume 3, John Murray, London, ISBN 0-7195-2427-X.

BEDNÁŘ, J., 1997: Vybrané kapitoly z genetiky rostlin. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno, 123 s.

BENETKA, V., 2005: Konzervace domácího druhu *Populus nigra* L. ssp. *nigra* v podmínkách *in situ* a jeho další využití ve šlechtění a krajině. In: Konzervace domácího druhu *Populus nigra* L. ssp. *nigra* v podmínkách *in situ* a jeho další využití ve šlechtění a krajině. 26. listopadu 2003, CHI s.r.o. Žatec a 24. listopadu 2004, OSEVA PRO s.r.o. VST Zubří, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně, VÚRV Praha, s. 89–91.

BENETKA, V., BARTÁKOVÁ, I., MOTTL, J., 2002a: Productivity of *Populus nigra* L. ssp. *nigra* under short-rotation culture in marginal areas. *Biomass and Bioenergy* 23(5): 327–336.

BENETKA, V., ČERNÝ, K., PILAŘOVÁ, P., KOZLÍKOVÁ, K., 2011: Effect of *Melampsora larici-populina* on growth and biomass yield of eight clones of *Populus nigra*. *Journal of Forest Science* 57(2): 41–49.

BENETKA, V. & DUBSKÝ, M., 1998: Práce na zachování domácího druhu *Populus nigra* L., uskutečněné ve VÚOZ Průhonice. *Acta Průhoniciana* 65: 46–50.

BENETKA, V., MOTTL, J., VACKOVÁ, K., POSPÍSKOVÁ, M., DUBSKÝ, M., 1999: Estimation of the introgression level in *Populus nigra* L. populations by means of isozyme gene markers, *Silvae Genetica* 48(5): 218–223.

BENETKA, V., POSPÍSKOVÁ, M., VRÁTNÝ, F., TKACZYKOVÁ, M., 2008: Inbreeding depression in the full-sib offspring of *Populus nigra* L. *Silvae Genetica* 57(4–5): 202–210.

BENETKA, V., ŠÁLKOVÁ, I., VRÁTNÝ, F., 2005: Selection of clones of *Populus nigra* L. ssp. *nigra* for resistance to *Melampsora larici-populina* Kleb. *Rust. Journal of Forest Science* 51 (4): 161–167.

BENETKA, V., VACKOVÁ, K., BARTÁKOVÁ, I., POSPÍŠKOVÁ, M., RASL, M., 2002b: Introgression in black poplar (*Populus nigra* L. ssp. *nigra*) and its transmission. *Journal of Forest Science* 48(3): 115–120.

BENETKA, V., VRÁTNÝ, F., ŠÁLKOVÁ, I., 2007: Comparison of the productivity of *Populus nigra* L. with an interspecific hybrid in a short rotation coppice in marginal areas. *Biomass and Bioenergy* 31(6): 367–374.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M., 1994: *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum Press, NY, 445 s. ISBN 0-306-44748-7.

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W., 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314–331.

BRADFORD, K.J. & NONOGAKI, H., 2007: *Seed development dormancy and germination*. Blackwell, Oxford, 367 s., ISBN 1-4051-3983-8.

BRUNNER, A.M., 2010: Reproductive development in *Populus*. In: Jansson, S., Bhalerao, R.P., Groover, A.T. (eds): *Genetics and genomics of Populus*, *Plant genetics and genomics: Crops and models* 8. Part III. Springer, New York, USA, ISBN 978-1-4419-1540-5, p. 155–170.

BUGALA, W., 1967: Systematyka euroazjatyckich topoli z grupy *Populus nigra* L. *Arboretum Kornickie* 12:45–220.

CAGELLI, L., 1995: *Populus nigra* genetic resources in Italy. In: *Populus nigra* Network EUFORGEN, Report of the first meeting. Frison, E., Lefèvre, R., de Vries, S., Turok, J., compilers (eds). 3–5 October 1994, Izmit, Turkey, IPGRI, Rome, Italy, s. 19–24.

CAGELLI, L., 1996: Guidelines for seed and pollen storage. In: *Populus nigra* Network EUFORGEN, Report of the third meeting. Turok, J., Lefèvre, F., de Vries, S., Tóth, B., compilers (eds). 5–7 October 1996, Sárvár, Hungary, IPGRI, Rome, Italy, s. 12–13.

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.

CAMPO, E., 1963: Flower morphogenesis and embryogeny in a bisexual *Populus deltoides*. *Giornale Botanico Italiano* 70: 212–219.

CAPUANA, M., 2011: Heavy metals and woody plants – biotechnologies for phytoremediation. *iForest* 4:7–15.

CERVERA, M.T., STORME, V., SOTO, A., IVENS, B., VAN MONTAGU, M., RAJORA O.P., BOERJAN, W., 2005: Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 111(7): 1440–1456.

CLOSE, D.C., BEADLE, C.L., BROWN, P.H., 2005: The physiological basis of containerised tree seedling 'transplant shock': a review. *Australian Forestry* 68(2): 112–120.

CODER, K.D., 2008: Tree sex: Gender & reproductive strategies. *Tree Selection Series*, Warnell School, University of Georgia, Athens, GA, USA. 30 s.

COTTRELL, J.E., KRYSSTUFEK, V., TABBENER, H.E., MILNER, A.D., CONNOLLY, T., SING, L., FLUCH, S., BURG, K., LEFÈVRE, F., ACHARD, P., BORDÁCS, S., GEBHARDT, K., VORNAM, B., SMULDERS, M.J.M., VANDEN BROECK, A.H., VAN SLYCKEN, J., STORME, V., BOERJAN, W., CASTIGLIONE, S., FOSSATI, T., ALBA, N., AGÚNDEZ, D., MAESTRO, C., NOTIVOL, E., BOVENSCHEN, J., VAN DAM, B.C., 2005: Postglacial migration of *Populus nigra* L.: lessons learnt from chloroplast DNA. *Forest Ecology and Management* 206: 71–90.

CRNOKRAK, P. & ROOF, D.A., 1999: Inbreeding depression in the wild. *Heredity* 83: 260–270.

ČÍŽEK, V., 1998: Topoly v lesním hospodářství. *Acta Průhoniciana* 65: 64–68.

ČÍŽEK, V., 2007: Základní předpoklady pro zakládání plantáží a pěstování rychlerostoucích dřevin v podmínkách ČR. *Expertní studie k projektu BRIE – Regionální trh s biomasou*, 39 s.

ČSN 48 1211, 2006: Lesní semenářství-Sběr, kvalita a zkoušky kvality semenného materiálu lesních dřevin.

DARWIN, C.R., 1876: The effects of cross- and self-fertilization in the vegetable kingdom. John Murray, London, 487 s.

DEBELL, D.S., CLENDENEN, G.W., HARRINGTON, C.A., ZÁSADA, J.C., 1996: Tree growth and stand development in short-rotation *Populus* plantings: 7-year results for two clones at three spacings. *Biomass and Bioenergy* 11(4): 253–269.

DE VERE, N., JONGEJANS, E., PLOWMAN, A., WILLIAMS, E., 2009: Population size and habitat quality affect genetic diversity and fitness in the clonal herb *Cirsium dissectum*. *Oecologia* 159(1): 59–68.

DICKMANN, D.I. & KUZOVKINA, J., 2008: Poplars and willows in the World. Chapter 2, Working paper IPC/9-2, FAO, Rome, Italy, 134 s.

ECKENWALDER, J.E., 1977: North American cottonwoods (*Populus*, Salicaceae) of Section Abaso and Aigeiros. *Journal of the Arnold Arboretum* 58(3): 193–208.

ECKENWALDER, J.E., 1980: Foliar heteromorphism in *Populus* (Salicaceae), a source of confusion in the taxonomy of Tertiary leaf remains. *Systematic Botany* 5(4): 366–383.

ECKENWALDER, J.E., 1996: Systematics and evolution of *Populus*. In: Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Part I, Chapter 1. Stettler, R.F., Bradshaw, Jr., H.D., Heilman, P.E., Hinckley, T.M. (eds). NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, s. 7–32.

ECKERT, C.G. & ALLEN, M., 1997: Cryptic self-incompatibility in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *American Journal of Botany* 84(10): 1391–1397.

ECKERT, C.G. & BARRETT, S.C.H., 1994: Post-pollination mechanism and the maintenance of outcrossing in self-compatible, tristylous, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Heredity* 72: 396–411.

ELLSTRAND, N.C., 1992: Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos* 63(1): 77–86.

ERIKSSON, G., EKBERG, I., CLAPHAM, D., 2006: An introduction to forest genetics. Genetic Center, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 186 s. ISBN 91-576-7190-7.

EUFORGEN, 2001: Conservation of genetic resources of black and white poplar in Europe. Leaflet. EUFORGEN, Rome, Italy, 2 s. Dostupné z: http://www.euforgen.org/fileadmin/www.euforgen.org/Documents/PA_material/PoplarsLeaflet.pdf.

FALCONER, D.S., 1989: Introduction to Quantitative Genetics. John Wiley and Sons, New York, 438 s. ISBN 0-470-21162-8.

FALINSKY, J.B., 1980: Vegetation dynamics and sex structure of the populations of pioneer dioecious woody plants. *Vegetatio* 43(1–2): 23–38.

FAO, 1980: Poplars and Willows. Collection FAO: Forest No 10, Rome, 328 s.

FAO, 2000: Directory of poplar and willow experts. Register of *Populus* L. cultivars. Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura. CD-ROM.

FISCHER, M. & MATTHIES, D., 1997: Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany* 84(12): 1685–1692.

FOSSATI, T., GRASSI, F., SALA, F., CASTIGLIONE, S., 2003: Molecular analysis of natural populations of *Populus nigra* L. intermingled with cultivated hybrids. *Molecular Ecology* 12(8): 2033–2043.

FOX, CH.W., 2005: Problems in measuring among-family variation in inbreeding depression. *American Journal of Botany* 11(11): 1929–1932.

FRANKLIN, I.R., 1980: Evolutionary change in small populations. In: Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective. Soule, M.E., Wilcox, B.A. (eds), Sunderland, Mass., Sinauer Associates, s. 135–140.

GAGET, M., VILLAR, M., KERHOAS, C., DUMAS, C., 1989: Sexual reproduction in *Populus* II. Information molecules of the pollen grain. *Annals of Forest Science* 46: 67–71.

GAUDET, M., JORGE, V., PAOLUCCI, I., BERITOGNOLO, I., SCARASCIA MUGNOZZA, G., SABATTI, M., 2007: Genetic linkage maps of *Populus nigra* L. including AFLPs, SSRs, SNPs, and sex trait. *Tree Genetics and Genomes* 4(1): 25–36.

GLÉMIN, S., BATAILLON, T., RONFORT, J., MIGNOT, A., OLIVIERI, I., 2001: Inbreeding depression in small population of self-incompatible plants. *Genetics Society of America* 159(3): 1217–1229.

GUILLOY-FROGET, H., MULLER, E., BARSOU, N., HUGHES, F.M.M., 2002: Dispersal, germination, and survival of *Populus nigra* L. (Salicaceae) in changing hydrologic conditions. *Wetlands* 22(3):478–488.

GUTTERMAN, Y., 1993: Seed germination in desert plants. Adaptions of desert organisms. Springer, Berlin, 253 s. ISBN 3-642-75700-6.

HARMON, L.J. & BRAUDE, S., 2009: Conservation of small populations: effective population sizes, inbreeding, and the 50/500 rule. In: An introduction to methods and models in ecology and conservation biology. Braude, S., Low, B.S. (eds). Princeton University Press, s. 125–138. ISBN 9780691127248.

HAVLÍK, J., DE LA HUEBRA, R.G., HEJTMANKOVA, K., FERNANDEZ, J., SIMONOVA, J., MELICH, M., RADA, V., 2010: Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 132(2): 461–465.

HAWKES, C., 2000: Woody plant mortality algorithms: description, problems and progress. *Ecological Modeling* 126(2–3): 225–248.

HEARNE, C.M., GHOSH, S., TODD, J.A., 1992: Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Ecology and Evolution* 8(8): 288–294.

HEDRICK, P.W., 1994: Purging inbreeding depression and the probability of extinction: full-sib mating. *Heredity* 73: 363–372.

HEDRICK, P.W., 2001: Conservation genetics: where are we now? *TRENDS in Ecology and Evolution* 16(11): 629–636.

HEDRICK, P.W. & KALINOWSKI, S.T., 2000: Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 139–162.

- HEINZE, B., 1997: A PCR Marker for a *Populus deltoides* allele and its use in studying introgression with native European *Populus nigra*. *Belgian Journal of Botany* 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. *Forest Genetics* 5(1): 31–38.
- HEINZE, B. & LEFÈVRE, F., 1999: *In situ* restoration genetics of riparian populations of *P. nigra*. In: *Populus nigra* Network, Report of the fifth meeting. Turok, J., Lefèvre, F., de Vries, S., Heinze, B., Volosyanchuk, R., Lipman, E., compilers (eds). 5–8 May 1999, Kyiv, UkraineSárvár, Hungary, IPGRI, Rome, Italy, s. 43–50.
- HEJNÝ, S. & SLAVÍK, B., 1990: KVĚTENA ČR, díl 2, Academia, Praha, 540 s. ISBN 80-200-1089-0.
- HENSEN, I., OBERPRIELER, C., WESCHE, K., 2005: Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill. (Ranunculaceae) in Central Germany. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 200(1): 3–14.
- HESLOP-HARRISON, J.W., 1924: Sex in the Salicaceae and its modification by eriophyid mites and other influences. *The British Journal of Experimental Biology* 1: 445–472.
- HOCHHOLDINGER, F. & HOECKER, N., 2007: Towards the molecular basis of heterosis. *Trends in Plant Science* 12(9): 427–432.
- HUSBAND, B.C. & SCHEMSKE, D.W., 1995: Magnitude and timing of inbreeding depression in a diploid population of *Epilobium augustifolium* (Onagraceae). *Heredity* 75: 206–215.
- HUSBAND, B.C. & SCHEMSKE, D.W., 1996: Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50(1): 54–70.
- CHARLESWORTH, B. & CHARLESWORTH, D., 1999: The genetic basis of inbreeding depression. *Genetical Research* 74(3): 329–340.
- IMBERT, E. & LEFÈVRE, F., 2003: Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. *Journal of Ecology* 91(3): 447–456.
- IUCN, 1994: IUCN Red List Categories. International Union for Conservation of Nature, Gland, 21 s.
- JANSSEN, A., 1998: Species determination of Black poplar (*Populus nigra* L.) based on isozymes and isozyme analysis of black poplar trees, half-sib offsprings and full sib progenies originating from controlled crosses). In: *Die Schwarzpappel*, Hessischen Landesanstalt für Forsteinrichtung, Waldforschung und Waldökologie. Weisgerber, H., Janssen, A. (eds), s. 32–42.

JONES, A.G. & ARDREN, W.R., 2003: Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12(10): 2511–2523.

JOVANOVIĆ, B. & TUČOVIĆ, A., 1962: An unusual occurrence of monoecism in *Populus nigra* L. *Topola* 6: 46–50.

KALINOWSKI, S.T., HEDRICK, P.W., MILLER, P.S., 1999: No inbreeding depression observed in Mexican and red wolf captive breeding programs. *Conservation Biology* 13(6): 1371–1377.

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(5): 1099–1106.

KARAKET, T. & POOMPUANG, S., 2012: CERVUS vs. COLONY for successful parentage and sibship determinations in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture* 324–325: 307–311.

KARRENBERG, S. & SUTER, M., 2003: Reproductive trade-offs in Salicaceae. *American Journal of Botany* 90(5): 749–754.

KELLER, L.F. & WALLER, D.M., 2002: Inbreeding effects in wild populations. *TRENDS in Ecology & Evolution* 17(5): 230–241.

KITTELSON, P.M. & MARON, J.L., 2000: Outcrossing rate and inbreeding depression in the perennial yellow bush lupine, *Lupinus arboreus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 87(5): 652–660.

KOLLMANN, J., VIELI, M., EDWARDS, P.J., TOCKNER, K., WARD, J.V., 1999: Interaction between vegetation development and island formation in the Alpine river Tagliamento. *Applied Vegetation Science* 2: 25–36.

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.

LANDE, R.D. & SCHEMSKE, W., 1985: The evolution of self fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39(1): 24–40.

LAUREYSENS, I., PELLIS, A., WILLEMS, J., CEULEMANS, R., 2005: Growth and production of a short rotation coppice culture of poplar. III. Second rotation results. *Biomass and Bioenergy* 29(1): 10–21.

LEFÈVRE, F. & CAGELLI, L., 1994: Toward the conservation of Eurasian black poplar, *Populus nigra* L. In: *Populus nigra* Network. Report of the first meeting. Frison, E., Lefèvre, F.,

de Vries, S., Turok, J., compilers (eds). 3–5 October 1994, Izmit, Turkey, IPGRI, Rome, Italy, s. 10.

LEFÈVRE, F., LEGIONNET, A., DE VRIES, S., TUROK, J., 1998: Strategies for the conservation of a pioneer tree species, *Populus nigra* L., in Europe. *Genetics Selection Evolution* 30(1): 181–196.

LEFÈVRE, F., BARSOUM, N., HEINZE, B., KAJBA, D., ROTACH, P., DE VRIES, S.M.G., TUROK, J., 2001a: EUFORGEN Technical bulletin: *In situ* conservation of *Populus nigra*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 59 s. ISBN 92-9043-500-3.

LEFÈVRE, F., KAJBA, D., HEINZE, B., ROTACH, P., DE VRIES, S.M.G., TUROK, J., 2001b: Black poplar: A model for gene resource conservation in forest ecosystems. *Forestry Chronicle* 77(2): 239–244.

LEGIONNET, A., FAIVRE-RAMPANT, P., VILLAR, M., LEFÈVRE, F., 1997: Sexual and asexual reproduction in natural stands of *Populus nigra*. *Botanica Acta* 110: 257–263.

LEGIONNET, A. & LEFÈVRE, F., 1996: Genetic variation of the riparian pioneer tree species *Populus nigra* L. I. Study of population structure based on isozymes. *Heredity* 77: 629–637.

LESTER, D.T., 1963: Variation in Sex Expression in *Populus tremuloides* Michx. *Silvae Genetica* 12(5): 141–151.

LEVIN, D. & BULINSKA-RANDOMSKA, Z., 1988: Effect of hybridization and inbreeding on fitness in *Phlox*. *American Journal of Botany* 75(11): 1632–1639.

LIENERT, J. & FISCHER, M., 2004: Experimental inbreeding reduces seed production and germination independent of fragmentation of populations of *Swertia perennis*. *Basic and Applied Ecology* 5(1): 43–52.

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 Genomic and Genomes* 6(2): 259–269.

LYNCH, M., 1991: The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution* 45(3): 622–629.

LYNCH, M. & WALSH, B., 1998: *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer, Sunderland, MA.

MÁLEK, J., 1983: Typologický systém vojenských lesů pro ČSSR s nástinem biogeocenologie lesa. Ústav pro hospodářskou úpravu vojenských lesů a statků, Praha, 236 s.

MARRON, N., STORME, V., DILLEN, S.Y., BASTIEN, C., RICCIOTTI, L., SALANI, F., SABATTI, M., RAE, A.M., CEULEMANS, R., BOERJAN, W., 2010: Genomic regions involved in productivity of two interspecific poplar families in Europe. 2. Biomass production and its relationships with tree architecture and phenology. *Tree Genetics and Genomes* 6(4): 533–554.

MARKUSSEN, T., PAKULL, B., FLADUNG, M., 2007: Positioning of sex-correlated markers for *Populus* in a AFLP- and SSR-marker based genetic map of *Populus tremula* × *tremuloides*. *Silvae Genetica* 56(3–4): 180–184.

MARSHALL, D.L., SHANER, M.G.M., OLIVA, J.-P., 2007: Effect of pollen load size on seed paternity in wild radish: the roles of pollen competition and mate choice. *Evolution* 61(8): 1925–1937.

MARTINOVSKÝ, J., 1987: Klíč k určování stromů a keřů. SPN, Praha, 207 s.

MCLETCHIE, D.N. & TUSKAN, G.A., 1994: Gender determination in *Populus*. In: Conference: IEA task 8 genetic improvement activity, 8 September 1994, Biri, Norway, p. 12.

MEZERA, A., 1989: Naše stromy a keře. Albatros, Praha, 426 s.

MICHAELS, H.J., SHI, X.J., MITCHELL, R.J., 2008: Effect of population size on performance and inbreeding depression in *Lupinus perennis*. *Oecologia* 154(4): 651–661.

MORAND, M.-E., BRACHET, S., ROSSIGNOL, P., DUFOUR, J., FRASCARIA-LACOSTE, N., 2002: A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. *Molecular Ecology* 11(3): 377–385.

MORAND-PRIEUR, M.E., RAQUIN, C., SHYKOFF, J.A., FRASCARIA-LACOSTE, N., 2003: Males outcompete hermaphrodites for seed siring success in controlled crosses in the polygamous *Fraxinus excelsior* (Oleaceae). *American Journal of Botany* 90(6): 949–953.

MOTTL, J., 1989: Topoly a jejich uplatnění v zeleni. SEMPRA-VŠÚOZ, Průhonice, 204 s. ISBN 80-85116-02-2.

MOTTL, J., 1998: Sortiment topolů vhodný pro krajinářské a sadovnické úpravy. *Acta Průhoniciana* 65: 4–45.

MOTTL, J., BENETKA, V., DUBSKÝ, M., VACKOVÁ, K., CIZKOVÁ, L., 1996: Conservation of genetic resources of *Populus nigra* in the Czech Republic. In: *Populus nigra* Network. Report of the third meeting. Turok, J., Lefèvre, F., de Vries, S., Toth, B. (eds). Sárvár, Hungary, 5–7 October 1996, IPGRI, Rome, 1997, s. 30–33.

MOTTL, J. & DUBSKÝ, M., 1994: Záchrana genofondu domácího topolu černého (*Populus nigra* L.) modelovým řešením návratu jeho reliktních populací do ekosystému lužního lesa. VÚOZ, Průhonice. 27 s.

- MOTTL, J. & DUŠEK, J., 1991: Vymezení pěstebních oblastí topolů pro sadovnické a krajinářské účely. Závěrečná zpráva, VŠÚOZ, Průhonice.
- MOTTL, J. & ŠPALEK, V., 1954: Pěstujeme topoly. SZN, Praha.
- MOTTL, J. & ÚRADNÍČEK, L., 2003: Topoly a jejich listy (Rentgenogramy listů topolů). Acta Průhoniciana 74, VÚKOZ, Průhonice, 128 s.
- MUSIL, I., HAMERNÍK, J., LEUGNEROVÁ, G., 2002: Lesnická dendrologie 4. Návody do cvičení. Sít' ČZU (LF-KDŠLD), Praha 148 s.
- NEČÁSEK, J., CETL, I., a kol., 1979: Obecná genetika. SPN, Praha, 565 s.
- NEI, M., 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3): 583–590.
- NOMURA, T., 1999: On the methods for predicting the effective size of populations under selection. *Heredity* 83: 485–489.
- OOSTERMEIER, J.G.B., VAN EIJCK, M.W., DEN NIJS, J.C.M., 1994. Offspring fitness in relation to population size and genetic variation in the rare perennial plant species *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae). *Oecologia* 97(3): 289–296.
- OUBORG, N.J., VAN TREUREN, R., VAB DAMME, J.M.J., 1991: The significance of genetic erosion in the process of extinction. *Oecologia* 86(3): 359–367.
- PAGAN, J., 1997: Lesnická dendrologia. LF KPL, TU Zvolen, 378 s.
- PAULE, L., 1992: Genetika a šľachtenie lesných drevín. *Príroda a. s.*, Bratislava, 304 s.
- PAULEY, S.S. & MENNEL, G.F., 1957: Sex ratio and hermaphroditism in natural population of quaking aspen. Minnesota Agricultural Experiment Station, Minnesota Forestry Notes 55: 2.
- PICÓ, F.X., MIX, C., OUBORG, N.J., VAN GRONENDAEL, J.M., 2007: Multigenerational inbreeding in *Succisa pratensis*: effect on fitness components. *Biologia Plantarum* 51(1): 185–188.
- 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. *Canadian Journal of Forest Research* 36(5): 1067–1076.
- PREGITZER, K.S. & FRIEND, A.L., 1996: The structure and function of *Populus* root systéme. In: *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Part II, Chapter 14. Stettler, R.F., Bradshaw, Jr., H.D., Heilman, P.E., Hinckley, T.M. (eds). NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, s. 331–354.

PROCHÁZKA, F. (ed.), 2001: Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). Příroda 18: 1–166.

PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK J., a kol., 2003: Fyziologie rostlin. ACADEMIA, Praha, 484 s.

QUILICHINI, A., DEBUSSCHE, M., THOMPSON, J.D., 2001: Evidence for local outbreeding depression in the Mediterranean island endemic *Anchusa crispa* Viv. (Boraginaceae). Heredity 87: 190–197.

RALLS, K., BALLOU, J.D., TEMPLETON, A., 1988: Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. Conservation Biology 2(2): 185–193.

RAJORA, O.P., 1986: Mating systems and fertilizing pollen gene pools of *Populus deltoides* Marsh. and *P. nigra* L. clones located in different compatible species neighbourhoods as inferred from isozyme analysis. In: Proceedings of the 20th Canadian Tree Improvement Association, Part 2, Canadian Forest Service, Ottawa, s. 134–141.

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. Conservation Genetics 11(4): 1327–1338.

REGIER, N., STREB, S., COCOZZA, C., SCHAUB, M., CHERUBINI, P., ZEEMAN, S.C., FREY, B. 2009: Drought tolerance of two black poplar (*Populus nigra* L.) clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defence. Plant, Cell and Environment 32(12): 1724–1736.

RELICHOVÁ, J., 2009: Genetika populací. MUNI PRESS, Brno, 188 s. ISBN 978-80-210-4795-2.

RIEGER, R., MICHAELIS, A., GREEN, M.M., 1991: Glossary of genetics: Classical and molecular. Fifth edition. Springer-Verlag, 553 s. ISBN 0-540-52054-6.

ROTTENBERG, A., 2000: Fertility of exceptional bisexual individuals in four dioecious plant species. Sexual Plant Reproduction 12(4): 219–221.

ROWLAND, D.L., GARNER, R., JESPERSEN, M., 2002: A rare occurrence of seed formation on male branches of the dioecious tree, *Populus deltoides*. American Midland Naturalist 147(1): 185–187.

SANTAMOUR, F.S. 1956: Hermaphroditism in *Populus*. In: Third Northeast Forest Tree Improvement Conference Proceedings, Ithaca, NY, s. 28–30.

SHAFFER, M.L., 1981: Minimum population sizes for species conservation. BioScience 31(2): 131–134.

SIMANOV, V. & ČÍŽEK, V., 2004: Pěstování dřevin pro energetické využití a energetické využití dřeva. MZLU, Brno, 79 s.

SLAVOV, G.T., LEONARDI, S., BURCZYK, J., ADAMS, W.T., STRAUSS, S.H., DIFAZIO, S.P., 2009: Extensive pollen flow in two ecologically contrasting populations of *Populus trichocarpa*. *Molecular Ecology* 18(2): 357–373.

SLAVOV, G.T. & ZHELEV, P., 2010: Salient biological features, systematics, and genetic variation of *Populus*. In: Jansson S. (eds.) *Genetics and genomics of Populus*, Plant genetics and genomics: Crops and models 8, Springer Science, s. 15–38.

SLOVÁČEK, M., 2004: Genové zdroje topolu černého a bílého v ČR. *Lesnická práce* 2: 22–24.

SMULDERS, M.J.M., BERINGEN, R., VOLOSANCHUK, R., VANDEN BROECK, A., VAN DER SCHOOT, J., ARENS, P., VOSMAN, B., 2008a: Natural hybridisation between *Populus nigra* L. and *P. ×canadensis* Moench. Hybrid offspring competes for niches along the Rhine River in the Netherlands. *Tree Genetics and Genomes* 4(4): 663–675.

SMULDERS, M. J. M., COTTRELL, J. E., LEFÈVRE, F., VAN DER SCHOOT, J., a kol., 2008b: Structure of genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: Consequences for conservation and restoration. *Forest Ecology and Management* 255(5–6): 1388–1399.

SMULDERS, M.J.M., VAN DER SCHOOT, J., ARENS, P., VOSMAN, B., 2001: Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Molecular Ecology Notes* 1: 188–190.

SNUSTAD, P.D. & SIMMONS, M.J., 2009: *Genetika*. MUNI PRESS, Brno, 894 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

STANTON, B.J. & VILLAR, M., 1996: Controlled reproduction of *Populus*. In: *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Part I, Chapter 5. Stettler, R.F., Bradshaw, Jr., H.D., Heilman, P.E., Hinckley, T.M. (eds.). NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, s. 113–138.

STEBBINS, G.L., 1958: The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Advance in Genetics* 9: 147–215.

STETTLER, R.F., 1971: Variation in Sex Expression of Black Cottonwood and Related Hybrids. *Silvae Genetica* 20: 42–46.

STETTLER, R.F. & WU, R., 1996: The role of hybridization in the genetic manipulation of *Populus*. In: *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Part I,

Chapter 4. Stettler, R.F., Bradshaw, Jr., H.D., Heilman, P.E., Hinckley, T.M. (eds.). NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, s. 87–112.

STREIFF, R., LABBE, T., BACILIERI, R., STEINKELLNER, H., GLÖSSL, J., KREMER, A., 1998: Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Molecular Ecology* 7(3): 317–328.

SVOBODA, P., 1957: Lesní dřeviny a jejich porosty. Část III. SZN, Praha, 457 s.

TABBENER, H.E. & COTTRELL, J.E., 2003: The use of microsatellite markers to study paternity in seedlings produced by a range of poplar species. *Forest Ecology and Management* 179(1): 363–376.

TEMPLETON, A. R., 1986: Coadaptation and outbreeding depression. In: *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Soulé, M.E. (ed). Sinauer, Sunderland, MA, s. 105–116.

THIELE, J., HANSEN, T., SIEGISMUND, H.R., HAUSER, T.P., 2010. Genetic variation of inbreeding depression among floral and fitness traits in *Silene nutans*. *Heredity* 104(1): 52–60.

THOMAS D.S., 2008: Hydrogel applied to the root plug of subtropical eucalypt seedlings halves transplant death following planting. *Forest Ecology and Management* 255(3–4): 1305–1314.

TÓTH, B., 1995: Black poplar (*Populus nigra*): the situation in Hungary. In: *Populus nigra* Network EUFORGEN, Report of the first meeting. Frison, E., Lefèvre, R., de Vries, S., Turok, J., compilers (eds). 3–5 October 1994, Izmit, Turkey, IPGRI, Rome, Italy, s. 27–28.

ÚHÚL, 2012: Informace o nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin České republiky za rok 2011. ÚHÚL, Brandýs nad Labem, 96 s.

ÜNLÜ, G.V., SILICI, S., UNLÜ, M., 2008: Composition and in vitro antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(7): 1011–1017.

VALENTINE, F.A., 1975: Genetic control of sex ratio, earliness and frequency of flowering in *Populus tremuloides*. In: *Tree improvement and genetics-Northeastern Forest Tree Improvement Conference*, s. 111–129.

VAN DAM, B.C., VORNAM, B., POHL, A., SMULDERS, M.J.M., BOVENSCHEN, J., HATTEMER, H.H., ZIEHE, M. 2002: Conserving genetic variation of black poplar along the Rhine river. In: *Genetic diversity in river populations of European Black Poplar – implications for riparian eco-system management*. VAN DAM, B.C. & BORDICS, S. (eds.). Proceedings of an international symposium, Szekszárd, Hungary, 16–20 May 2001, s. 117–124.

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. *Annals of Forest Science* 63(7): 783–790.

VANDEN BROECK, A., VILLAR, M., VAN BOCKSTAELE, E., VAN SLYCKEN, J., 2005: Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives: evidence and consequences for native poplar populations. *Annals of Forest Science* 62(7): 601–613.

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., STORME, V., COTTRELL, J.E., BOERJAN, W., VAN BOCKSTAELE, E., QUATAERT, P., VAN SLYCKEN, 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 Ecology and Management* 197(1–3): 307–310.

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.). *Theoretical and Applied Genetics* 101(1–2): 317–322.

VAN SLYCKEN, J., 1995: Plant descriptors for *Populus nigra*. In: *Populus nigra* Network EUFORGEN, Report of the second meeting. Turok, J., Lefèvre, F., Cagelli, L., de Vries, S., compilers (eds). 10–12 September 1995, Casale Monferrato, Italy, IPGRI, Rome, Italy, s. 13–25.

VAN SPLUNDER, I., COOPS, H., VOESENEK, L.A.C.J., BLOM, C.W.P.M., 1995: Establishment of alluvial forest species in floodplains: the role of dispersal timing, germination characteristics and water level fluctuations. *Acta Botanica Neerlandica* 44(3): 269–278.

VILLAR, M., GAGET, M., DUMAS, C., 1989: Sexual reproduction in *Populus* I. Some physiological and biochemical events of the progamic phase. *Annals of Forest Science* 46(supplement): 64–66.

VINCENT, G. & ŠPALEK, V., 1954: Topoly jejich pěstování a dřevní produkce. SZN, Praha, 209 s.

VĚSTNÍK MZE ČR, duben 2004, příloha č.2: Seznam klonů rychlerostoucích dřevin schválených MŽP pro zakládání výmladkových plantáží pro energetické využití.

VYHLÁŠKA Č. 395/1992 SB., Vyhláška ministerstva životního prostředí České republiky, kterou se provádějí některá ustanovení zákona České národní rady č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny; příloha č. 2.

VYHLÁŠKA č. 83/1996 SB., Vyhláška ministerstva zemědělství České republiky, o zpracování oblastních plánů rozvoje lesů a o vymezení hospodářských souborů; příloha č. 2.

VYHLÁŠKA č. 29/2004 SB., Vyhláška, kterou se provádí zákon č. 149/2003 Sb., o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin.

VYHLÁŠKA č. 139/2004 SB., Vyhláška, kterou se stanoví podrobnosti o přenosu semen a sazenic lesních dřevin, o evidenci o původu reprodukčního materiálu a podrobnosti o obnově lesních porostů a o zalesňování pozemků prohlášených za pozemky určené k plnění funkcí lesa.

VON MELCHIOR, G.H., 1967: Zwei funde von zwittrigkeit an pappeln der sektion Aigeiros. *Silva Genetica* 16: 77–80.

WASER, N.M., 1993: Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. In: *The natural history of inbreeding and outbreeding: theoretical and empirical perspectives*. Thornhill, N.W. (ed). University of Chicago Press, Chicago, IL, s. 173–199.

WEINER, J. & FRECKLETON, R.P., 2010: Constant final yield. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41: 173–192.

WEISGERBER, H., 1999: *Populus nigra* Linné, 1753. *Enzyklopädie der Holzgewächse* 16, 24 s. In: Dickmann, D.I. & Kuzovkina, J., 2008: *Poplars and willows in the World*. Chapter 2, Working paper IPC/9-2, FAO, Rome, Italy, 134 s.

WEGER, J., 2011: Metodika pro posuzování projektů na založení porostů rychle rostoucích dřevin k energetickému využití na zemědělské půdě z hlediska biodiverzity, ochrany přírody a krajiny. Průhonice, 26 s.

WHITE, J., 1993: Black poplar: the most endangered native timber tree in Britain. Forestry Commission Research Information Note 239, Forestry Commission, Edinburgh.

WILLI, Y., VAN KLEUNEN, M., DIETRICH, S., FISCHER, M., 2007: Genetic rescue persists beyond first-generation outbreeding in small populations of a rare plant. *Proceedings of the Royal Society* 274: 2357–2364.

WINFIELD, M.O., Arnold, G.M., Cooper, F., Le Ray M., White, J., Karp, A., Edwards K.J., 1998: A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. *Molecular Ecology* 7(1): 3–10.

WYCKOFF, G.W. & ZÁSADA, J.C., 2002: *Populus* L., poplar, cottonwood, aspen. In: *Woody plant seed manual*. Dostupné z: <http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm/Populus.pdf>.

YIN, T., DiFazio, S., Gunter L.E., ZHANG, X., a kol., 2008: Genome structure and emerging evidence of an incident sex chromosome in *Populus*. *Genome Research* 18(3): 422–430.

ZÁKON Č. 149/2003 SB., o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnicky významných druhů a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin).

ZLATNÍK, A., 1976: Lesnická fytoecnologie. SZN, Praha, 495 s.

ZSUFFA, L., 1974: The genetics of *Populus nigra* L. Annales Forestales, Zagreb. 6(2): 29-53.

10 Seznam grafů

Graf 1: Poměr pohlaví v prvním porostu	40
Graf 2: Poměr pohlaví ve druhém porostu	42

11 Seznam tabulek

Tab. 1 Uzané zdroje topolu černého v ČR členěné dle přírodních lesních oblastí a kategorií reprodukčního materiálu (ÚHÚL 2012).....	22
Tab. 2 Přehled výběrových stromů (prarodičů a rodičů jedinců v pokusných porostech).....	30
Tab. 3 Rodičovské kombinace použité ke křížení a jejich potomstva	31
Tab. 4 Stupnice intenzity napadení rzí <i>M. larici-populina</i> (BENETKA a kol. 2005).....	34
Tab. 5 Přehled provedených polních hodnocení v jednotlivých letech.....	35
Tab. 6: Vlastnosti použitých mikrosatelitních markerů a jejich produktů	36
Tab. 7: Poměr pohlaví v prvním porostu	40
Tab. 8: Štěpné poměry pohlaví jednotlivých potomstev topolu černého	41
Tab. 9: Poměr pohlaví ve druhém porostu	42
Tab. 10: Fenologie kvetení rodičovských stromů v prvním porostu, vyjádřeno v počtech jedinců.....	43
Tab. 11: Fenologie kvetení rodičovských stromů v druhém porostu, vyjádřeno v počtech jedinců.....	43
Tab. 12: Termíny jednotlivých činností související se získáním semenáčů v jednotlivých letech.	44
Tab. 13: Energie klíčení a klíčivost semen získaných z různých rodičovských kombinací (první porost).45	
Tab. 14: Energie klíčení (GE) a klíčivost (GC) semen získaných z různých typů křížení v letech 2009–2011 (první porost).....	48
Tab. 15: Energie klíčení (GE) a klíčivost (GC) potomstev rozdílných typů opylení šesti jednodomých jedinců <i>P. nigra</i> var. <i>nigra</i> , vyjádřené v procentech.....	50
Tab. 16: Kramerův koeficient pro energii klíčení (V_{GE}) anebo klíčivost (V_{GC}) v rámci jednotlivých typů opylení anebo let opylování	51
Tab. 17: Energie klíčení a klíčivost semen získaných z různých rodičovských kombinací (druhý porost)52	
Tab. 18: Energie klíčení (GE) a klíčivost (GC) semen získaných z různých typů křížení v letech 2009–2011 (druhý porost).....	52
Tab. 19: Podíl živých semenáčů 2009 (v procentech) pocházejících z různých křížení (první porost).....	53

Tab. 20: Podíl živých semenáčů 2010 (v procentech) pocházejících z různých křížení (první porost).....	54
Tab. 21: Podíl živých semenáčů 2011 (v procentech) pocházejících z různých křížení (první porost).....	55
Tab. 22: Podíl živých semenáčů 2011 (v procentech) pocházejících z různých křížení s použitím jednodomých rostlin jako alespoň jednoho rodičovského komponentu (první porost)	56
Tab. 23: Podíl živých semenáčů 2009 (v procentech) pocházejících z různých křížení (druhý porost).....	57
Tab. 24: Podíl živých semenáčů 2010 (v procentech) pocházejících z různých křížení (druhý porost).....	57
Tab. 25: Podíl živých semenáčů 2011 (v procentech) pocházejících z různých křížení (druhý porost).....	58
Tab. 26: Intenzita napadení rzí semenáčů 2009 (první porost)	59
Tab. 27: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2009 (první porost)	61
Tab. 28: Koeficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 27	63
Tab. 29: Intenzita napadení rzí semenáčů 2010 (první porost)	63
Tab. 30: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2010 (první porost)	64
Tab. 31: Koeficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 30	65
Tab. 32: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2011 (první porost)	66
Tab. 33: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2011 pocházejících z různých křížení s použitím jednodomých rostlin jako alespoň jednoho rodičovského komponentu (první porost).....	67
Tab. 34: Koeficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 26	68
Tab. 35: Intenzita napadení rzí semenáčů 2009 (druhý porost)	69
Tab. 36: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2009 (druhý porost)	70
Tab. 37: Koeficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 36	71
Tab. 38: Intenzita napadení rzí semenáčů 2010 (druhý porost)	71
Tab. 39: Růstové charakteristiky semenáčů získaných v roce 2010 (druhý porost)	72
Tab. 40: Koeficient inbrední deprese (δ) charakteristik uvedených v Tab. 39	72
Tab. 41: Růstové charakteristiky a koeficient inbrední deprese (δ) semenáčů získaných v roce 2011 (druhý porost).....	73
Tab. 42: Podíl samoopylení náhodně zvolených potomků jednodomých stromů pocházejících z rozdílných křížení (první porost)	74
Tab. 43: Podíl semenáčů 2010 (první porost) odebraných k rodičovským analýzám.....	74
Tab. 44: Podíl spontánního inbrídingu u semenáčů pocházejících z cizosprášení (první porost).....	75

Tab. 45: Výsledky rodičovských analýz semenáčů pocházejících z cizosprášení (druhý porost)	76
Tab. 46: Analýza frekvence alel jednotlivých markerů a skupin jedinců pocházejících z různých typů opylení v prvním porostu v roce 2009	77
Tab. 47: Frekvence alel pro 8 SSR lokusů u jednotlivých populací semenáčů topolu černého získaných v roce 2009 (první porost). Vzácné alely s frekvencí menší než 0,01 jsou vyznačeny tučně.	78
Tab. 48: Analýza frekvence alel jednotlivých markerů a skupin jedinců pocházejících z různých typů opylení v prvním porostu v roce 2010	79
Tab. 49: Frekvence alel pro 8 SSR lokusů u jednotlivých populací semenáčů topolu černého získaných v roce 2010 (první porost). Vzácné alely s frekvencí menší než 0,01 jsou vyznačeny tučně.	80
Tab. 50: Analýza frekvence alel jednotlivých markerů a skupin jedinců pocházejících z příbuzenského a nepříbuzenského opylení ve druhém porostu v roce 2009	81
Tab. 51: Frekvence alel pro 8 SSR lokusů u jednotlivých populací semenáčů topolu černého získaných v roce 2009 (druhý porost).....	82
Tab. 52: Analýza frekvence alel jednotlivých markerů a skupin jedinců pocházejících z příbuzenského a nepříbuzenského sprášení ve druhém porostu v roce 2010.....	83
Tab. 53: Frekvence alel pro 8 SSR lokusů u jednotlivých populací semenáčů topolu černého získaných v roce 2010 (druhý porost). Vzácné alely s frekvencí menší než 0,01 jsou vyznačeny tučně.	83
Tab. 54: Hodnoty F-statistiky potomstev z prvního porostu.....	84
Tab. 55: Hodnoty heterozygotnosti a F-statistiky v potomstvu prvního porostu z let 2009 a 2010	84
Tab. 56: Hodnoty F-statistiky potomstev z druhého porostu	85
Tab. 57: Hodnoty heterozygotnosti a F-statistiky v potomstvu druhého porostu z let 2009 a 2010.....	85

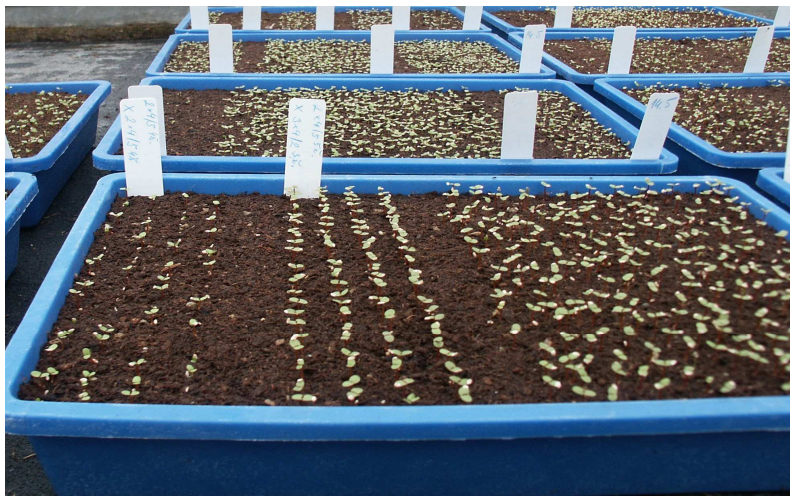
12 Přílohy

Příloha 1: Získávání semen <i>Populus nigra</i> : papírové izolátory samičích květenství (nahore), organotypové izolátory tobolek (uprostřed), sušení semen s chmýřím (dole) (foto Novotná)	118
Příloha 2: Výsev semen (nahore), výsadba semenáčů do sadbovačů (uprostřed) a výsadba ročních semenáčů do polního pokusu, vše <i>Populus nigra</i> (dole) (foto Novotná).....	119
Příloha 3: Protokol izolace DNA z rostlinných tkání pomocí DNeasy Plant Mini Kit Qiagen	120
Příloha 4: Rozřazení jednotlivých křížení do skupin (typů křížení)	121
Příloha 5: Květenství jednodomého <i>Populus nigra</i> : samičí a samčí jehnědy na jedné větvi jednodomého stromu (nahore), samičí a samčí květy na jedné jehnědě před otevření květů (uprostřed) a při otevření květů (dole) (foto Novotná)	123

Příloha 1: Získávání semen *Populus nigra*: papírové izolátory samičích květenství (nahore), organtýnové izolátory tobolek (uprostřed), sušení semen s chmýřím (dole) (foto Novotná)



Příloha 2: Výsev semen (nahore), výsadba semenáčů do sadbovačů (uprostřed) a výsadba ročních semenáčů do polního pokusu, vše *Populus nigra* (dole) (foto Novotná)



Příloha 3: Protokol izolace DNA z rostlinných tkání pomocí DNeasy Plant Mini Kit Qiagen

Použité roztoky a chemikálie:

Buffer AP1, Buffer AP2, Buffer AP3, Buffer AW, Buffer AE, RNase A.

Před prvním použitím je nutné do koncentrátů Buffer AP3 a Buffer AW přidat přiměřené množství etanolu (96 až 100 %).

Vlastní postup:

1. nahřejeme si vodní lázeň na teplotu 65°C. V lázni necháme nahřát Buffer AE na teplotu 65°C.
2. do zkumavky 75 mg rozdrcených listů, nepipetujeme 400 µl Buffer AP1 a 4 µl RNasy A. Obsah intenzivně protřepeme ve vortexu tak, aby nevznikaly sraženiny.
3. směs inkubujeme 10min při 65°C, během inkubace 2-3x protřepeme (dochází k lyzi buněk)
4. přidáme 130 µl Buffer AP2, směs promícháme (krátce ve vortexu) a necháme inkubovat 5min na ledu (dojde k vysrážení proteinů a polysacharidů)
5. centrifugujeme 5min při 14000 ot/min, opatrně vyndáme
6. lyzát přepipetujeme do fialové kolony (650µl) umístěné v 2ml mikrozkuhavce a centrifugujeme 2min při 14000 ot/min.
7. fázi, která prošla kolonou, opatrně přepipetujeme (450µl) do nové mikrozkuhavky. Dáváme pozor, abychom nenabrali sraženinu vzniklou při centrifugaci (fialová kolona se vyhodí)
8. přidáme 1,5x větší množství Buffer AP3 (650µl) než je vzorku, pipetou promícháme 2-3x
9. polovinu vzniklého roztoku přelijeme na bílou kolonku a centrifugujeme 1min při 8000 ot/min (DNA se zachytává na koloně – kapalinu prošlou kolonou odstraníme)
10. na kolonu přelijeme zbytek vzorku a centrifugujeme za stejných podmínek jako v kroku 9, kapalinu opět odstraníme.
11. kolonu přemístíme do nové 2ml mikrozkuhavky. Na kolonu přidáme 500 µl Buffer AW a centrifugujeme 1min při 8000 ot/min, fázi prošlou kolonou odstraníme (vylejeme)
12. na kolonu opět přidáme 500 µl Buffer AW a centrifugujeme 2min při 14000 ot/min, aby byla membrána na koloně suchá, kolonu se zachycenou DNA opatrně vyjmeme tak, aby se nedotkla AW pufru, který prošel kolonou, fázi prošlou kolonou odstraníme
13. kolonu se zachycenou DNA umístíme do nové 1,5ml mikrozkuhavky a přidáme 100 µl předehřátého Buffer AE přímo na membránu kolony, necháme inkubovat 5min při pokojové teplotě, centrifugujeme 1min při 8000 ot/min.
14. krok 13 zopakujeme, vyhodíme kolonku (fáze prošlá kolonou obsahuje rozpuštěnou DNA – její koncentraci určíme pomocí kontrolní elektroforézy)
15. izolované roztoky DNA byly uloženy do lednice při teplotě 4 °C

Příloha 4: Rozřazení jednotlivých křížení do skupin (typů křížení)

Rok Křížení	2009			2010			2011		
	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Typ křížení	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Typ křížení	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Typ křížení
1	2×4/9 5ř	2×4/7 4r	I ₂	2×4/5 4ř	2×4/1 5ř	I ₂	2×4/4 3ř	2×4/1 2ř	I ₂
2	2×4/9 5ř	2×4/9 3ř	I ₂	2×4/5 5ř	2×4/1 5ř	I ₂	2×4/5 4ř	2×4/9 3ř	I ₂
3	5×4/1 3ř	5×4/10 2r	I ₂	2×4/5 5ř	2×4/5 4ř	I ₂	2×4/9 5ř	2×4/5 4ř	I ₂
4	5×4/7 5ř	5×4/10 2ř	I ₂	2×4/9 5ř	2×4/7 4ř	I ₂	2×4/6 2ř	2×4/1 2ř	I ₂
5	2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	I ₁ S	5×4/2 5ř	5×4/10 2ř	I ₂	3×4/3 5ř	3×4/5 5ř	I ₂
6	2×4/4 3ř	neznámý	I ₁ CS	5×4/3 4ř	5×4/10 2ř	I ₂	3×4/3 5ř	3×4/4 4ř	I ₂
7	2×4/5 4ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	I ₁ S	5×4/18 4ř	5×4/10 2ř	I ₂
8	2×4/9 5ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/5 3ř	neznámý	I ₁ CS	5×4/10 5ř	5×4/7 4ř	I ₂
9	3×4/1 5ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/5 4ř	neznámý	I ₁ CS	5×4/3 4ř	5×4/10 2ř	I ₂
10	5×4/1 3ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/5 5ř	neznámý	I ₁ CS	5×4/7 5ř	5×4/7 4ř	I ₂
11	5×4/10 3ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/9 5ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/5 3ř	2×4/5 3ř	I ₁ S
12	5×4/3 4ř	neznámý	I ₁ CS	5×4/3 4ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/5 4ř	2×4/5 4ř	I ₁ S
13	5×4/7 4ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/5 4ř	5×4/7 4ř	H	2×4/4 3ř	neznámý	I ₁ CS
14	5×4/7 5ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/5 5ř	3×4/2 3ř	H	2×4/5 3ř	neznámý	I ₁ CS
15	5×4/9 5ř	neznámý	I ₁ CS	2×4/5 5ř	5×4/7 4ř	H	2×4/5 4ř	neznámý	I ₁ CS
16	2CS/2 3ř	neznámý	CS CS	3×4/4 5ř	5×4/1 5ř	H	2×4/5 4ř	Kampa	I ₁ CS
17	2CS/7 3ř	neznámý	CS CS	5×4/2 5ř	3×4/4 4ř	H	2×4/9 5ř	neznámý	I ₁ CS
18	5CS/10 2ř	neznámý	CS CS	5×4/4 3ř	2×4/6 5ř	H	2×4/6 2ř	neznámý	I ₁ CS
19	K	5×4/11 5ř	K CS	5×4/7 5ř	3×4/7 4ř	H	3×4/3 5ř	neznámý	I ₁ CS
20	K	5×4/14 5ř	K CS	5×4/7 5ř	3×4/10 5ř	H	5×4/18 4ř	neznámý	I ₁ CS
21	K	neznámý	K CS	2CS/1 2ř	neznámý	CS CS	5×4/10 5ř	neznámý	I ₁ CS
22				2SM/5 3ř	neznámý	CS CS	5×4/3 4ř	neznámý	I ₁ CS
23				K	5×4/14 5ř	K CS	5×4/7 5ř	neznámý	I ₁ CS
24				K	neznámý	K CS	2×4/4 3ř	3×4/4 4ř	H
25							2×4/6 2ř	3×4/5 5ř	H
26							2×4/9 5ř	3×4/4 4ř	H
27							3×4/4 5ř	2×4/1 5ř	H
28							5×4/3 4ř	2×4/2 3ř	H
29							5×4/2 5ř	3×4/4 4ř	H
30							5×4/2 5ř	3×4/10 5ř	H
31							5×4/9 5ř	3×4/1 5ř	H
32							5×4/10 5ř	3×4/5 5ř	H
33							2SM/5 3ř	2SM/5 3ř	CS S
34							2CS/1 2ř	2CS/1 2ř	CS S
35							2SM/5 3ř	2×4/9 3ř	CS CS
36							2SM/5 3ř	neznámý	CS CS
37							2CS/1 2ř	neznámý	CS CS
38							2CS/7 3ř	neznámý	CS CS

Rok	2009			2010			2011		
Křížení	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Typ křížení	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Typ křížení	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Typ křížení
39							3CS/9 5ř	neznámý	CS CS
40							5CS/19 4ř	neznámý	CS CS
41							30×32/2	neznámý	CS
42							02/434	Kampa	K CS

Pozn.: I₂ = druhý stupeň příbuzenského křížení; I₁ S = samosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; I₁ CS = cizosprášení rostliny z prvního příbuzenského křížení; H = křížení jedinců s cílem dosažení heterózního efektu; CS S = samosprášení rostliny pocházející z cizosprášení; CS CS = druhý stupeň cizosprášení; CS = cizosprášení původní matky; K CS = cizosprášení nepříbuzné matky (kontrola)

Příloha 5: Květenství jednodomého *Populus nigra*: samičí a samčí jehnědy na jedné větvi jednodomého stromu (nahore), samičí a samčí květy na jedné jehnědě před otevření květů (uprostřed) a při otevření květů (dole) (foto Novotná)

