

# HODNOCENÍ SEMENNÉHO SADU TŘEŠNĚ PTAČÍ S VYUŽITÍM MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

## EVALUATION OF WILD CHERRY SEED ORCHARD USING MICROSATELLITE MARKERS

PAVLÍNA MÁCHOVÁ ✉ - HELENA CVRČKOVÁ - EVA POKORNÁ - OLGA TRČKOVÁ

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

✉ e-mail: machova@vulhm.cz

### ABSTRACT

The Simple Sequence Repeats (SSR) method of DNA analyses was used to clonal identification of trees in a model wild cherry (*Prunus avium* L.) seed orchard. Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from buds taken from 91 sampled trees of the seed orchard. Samples were screened using selected ten polymorphic nuclear microsatellite markers. Measuring of the size of amplification products was carried out using the genetic analyser Applied Biosystems 3500. The obtained data were analysed by statistical programs CERVUS, GenAEx 6.501 and Micro-Checker. There were detected 65 different alleles at 10 loci in the 91 wild cherry individuals from seed orchard. By applying of the 10 suitable markers to the 18 clones from model seed orchard we obtained multilocus genotypes (MLG). The obtained results illustrate the utility of the microsatellite loci for assessing spatial patterns of genetic diversity and for individual genotypes identification. Declared clone affiliation was confirmed in 94% of sampled trees. The identified genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for clonal identification of wild cherry trees.

**Klíčová slova:** třešeň ptačí; klonální identita; mikrosatelity; semenný sad

**Key words:** wild cherry; clone identity; microsatellites; seed orchard

### ÚVOD

Třešeň ptačí je dřevina rozšířená téměř po celé Evropě s výjimkou nejjižnějších oblastí, dále zasahuje až do střední Asie a do severozápadní Afriky (HEJNÝ, SLAVÍK 1990). V lesních porostech se vyskytuje vtroušeně a velmi vzácně vytváří přirozené populace. Podle dostupných archeologických nálezů se předpokládá, že její původní výskyt byl v severozápadní a střední Evropě (RUSSELL 2003). Jako druh upřednostňuje propustné, dobře provzdušněné půdy bohaté na živiny, preferuje bazické podklady, ale uspokojivě roste i na mírně kyselých půdách. Jedná se o dřevinu nízkých poloh, ale její výskyt byl zaznamenán i v nadmořské výšce 1900 m ve Francii. V České republice je její výškové maximum 890 m v Krkonoších (Benecko). Je považovaná za pionýrský druh a využívá se i k rekultivacím. Třešeň ptačí řadíme mezi rychle rostoucí dřeviny, je vysoce hodnocená pro kvalitní dřevo a krátkou dobu obměty 55–70 let (ĎURKOVIC 2006). Třešeň ptačí má diploidní genom malé velikosti (338 Mbp) (AVRAMIDOU et al. 2010), velikost jejího genomu je jen dvakrát větší ve srovnání s genomem hušeničky *Arabidopsis thaliana* (DIRLEWANGER et al. 2002). Projevuje se

u ní gametofytická autoinkompatibilita, jedná se o geneticky podmíněný mechanismus (je kodován na S-locusu), který brání samooplození (SHARMA et al. 2017).

Přestože se z evropského hlediska nejedná o ohroženou dřevinu, její převážně ojedinělý a vtroušený výskyt v oblastech rozšíření je základem pro její zařazení do programů konzervace genových zdrojů či do šlechtitelských programů mnoha evropských zemí. Vzhledem k tomu, že třešeň ptačí tvoří většinou populace s relativně malým počtem jedinců, patří mezi nejefektivnější strategie konzervace genových zdrojů semenné sady a klonové banky (RUSSELL 2003).

Na území České republiky se semenné sady začaly zakládat již v roce 1956 (MUSIL et al. 2007). V současné době je zde evidováno 106 uznávaných (platných) semenných sadů, přičemž nejvíce uznaných semenných sadů s platnou registrací je pro borovici lesní (26). Pro třešeň ptačí je v současnosti evidováno 8 platných semenných sadů a 3 semenné sady jsou registrované. Semenné sady jako účelové výsadby podléhají aktuálně platným právním předpisům týkajícím se oblasti využívání reprodukčního materiálu lesních dřevin (zákon č. 149/2003 Sb.). Ná-

rodní legislativa je v souladu i se směrnicí Rady 1999/105/ES, o uvádění reprodukčního materiálu lesních dřevin na trh, kterou je Česká republika jako členský stát Evropské unie povinna respektovat. V této směrnici je zakotvena i povinnost členských států Evropské unie vybudovat funkční kontrolní systém reprodukčního materiálu lesních dřevin. Pro kontrolní systém reprodukčního materiálu lesních dřevin lze využívat i molekulárně-genetické metody, které využívají například v SRN (BEHM, KONNERT 2002; KONNERT 2006, 2011; KONNERT et al. 2006; KOTRLA et al. 2008). Problematika identifikace roubovanců a klonů v semenných sadech a v klonových výsadbách lesních dřevin pomocí molekulárních analýz byla řešena i v ČR, a to např. pomocí izoenzymových analýz (IVANEK et al. 2013).

Genetickou skladbu organismů a její variabilitu na úrovni populací a jedinců lze stanovit pomocí DNA markerů, které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí a na rozdílu od izoenzymových markerů nereagují na environmentální změny. Pro získání informací o genetické proměnlivosti studovaných jedinců je nutné vyhledat vysoce polymorfní DNA markery, např. SSR (mikrosatelitové) markery. Mikrosatelitové markery jsou s úspěchem využívány pro identifikaci jedinců a jsou tedy vhodné i pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů, archivů klonů a směsí klonů).

## MATERIÁL A METODIKA

V populační genetice a ve šlechtění rostlin nacházejí stále širší uplatnění DNA analýzy využívající mikrosatelitové markery. Vzhledem ke kodominantnímu charakteru v kombinaci s velkým počtem variabilních alel se SSR markery dají využít i pro identifikaci klonů a kultivarů rostlin a také pro mapování genomů (HORMAZA 2002; SCHUELER et al. 2003).

Ověřování klonové identity bylo provedeno na semenném sadu třešně ptačí – CZ-3-3-TR-00152-38-T (dle evidence ERMA2 – ÚHŮL) o rozloze 0,80 ha. Jedná se o uznaný semenný sad založený v lokalitě Čeladná, v nadmořské výšce 420 m n. m., který byl založen v roce 1999. Při inventarizaci provedené v roce 2004 v něm bylo evidováno 211 roubovanců (ramet) od 73 klonů (ortetů) třešně ptačí z rodičovských stromů. Klony pocházejí z PLO 38 (3.–4. LVS) a PLO 39 (4. LVS).

Odběr výchozího materiálu byl proveden v dubnu 2013 a v únoru 2016, byly odebírány pupeny z roubovanců od 26 vybraných klonů (ortetů). Počet odebraných ramet od jednotlivých ortetů se pohyboval

v závislosti na rostoucích jedincích od 2 do 6, celkem bylo odebráno 91 vzorků.

Odebraný rostlinný materiál byl po odběru zamražen a část byla lyofilizována. Izolace DNA byla provedena pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) dle dodaného protokolu (DNeasy® Plant Handbook).

Pro prvotní testování primerů bylo použito 20 vzorků ze semenného sadu třešně ptačí, byly odzkoušeny druhově specifické primery EMPA014, EMPA015, EMPA018 (CLARKE, TOBUTT 2003) vyvinuté pro kultivary třešně ptačí a dále markery pro planou formu třešně ptačí EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12 (VAUGHAN, RUSSELL 2004). Na základě prací SCHUELER et al. (2003) a WÜNSCH, HORMAZA (2002) byly pro testování použity i primery původně vyvinuté pro *Prunus persica* L. (Batsch), a to UDP97-403 (CIPRIANI et al. 1999), UDP98-410, UDP98-411 a UDP98-412 (TESTOLIN et al. 2000). Použité primery a jejich sekvence jsou uvedeny v tab. 1. Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů bylo provedeno po proběhlé elektroforéze na 2% agarózových gelech v 0,5 × TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B. V.) a amplifikáty byly vizualizovány pomocí GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Všechny testované mikrosatelitové markery vykazovaly vyšší stupeň polymorfismu, proto byly pro ně optimalizovány podmínky PCR reakcí. Z důvodu časových a finančních úspor při provádění DNA analýz byly vybrané mikrosatelitové lokusy seskupeny do multiplexů, kdy amplifikace a následná fragmentační analýza několika lokusů probíhají najednou. PCR reakce probíhaly formou 3 multiplexů, pro lokus UDP98-410 probíhala z důvodu odlišného teplotního režimu PCR reakce zvlášť. Do multiplexu 1 byly vybrány lokusy EMPA014, EMPA015, EMPA018, multiplex 2 tvořily lokusy EMPaS10, EMPaS11 a EMPaS12, do multiplexu 3 byly zařazeny lokusy UDP97-403, UDP98-411, UDP98-412. PCR amplifikace probíhala v celkovém objemu 15 µl pro každý vzorek s použitím polymerázy Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies) a s ní dodanými komponenty. Reakční směs pro PCR obsahovala 1,5 µl 10xPCR pufru, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,067 mM směsi dNTP, 0,37 jednotek Platinum Taq DNA Polymerase, specifické primery (0,05 µM k lokusům EMPA014 a EMPA015, 0,1 µM k lokusům EMPA018, EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12, UDP98-410, UDP98-411, UDP98-412, 0,2 µM k lokusu UDP97-403), 5–50 ng/µl izolované DNA a sterilní ultračistou vodou (Sigma – Aldrich) byla reakční směs doplněna do objemu 15 µl. PCR reakce probíhaly v termocyklu Veriti Thermal cycler, teplotní režimy pro jednotlivé multiplexy jsou uvedeny v tab. 2, na závěr byly všechny testované vzorky chlazeny na 4 °C.

Tab. 1.

SSR lokusy a sekvence primerů  
SSR loci and sequence of the primers

	Lokus/Locus	Forward primer	Reverse primer
Multiplex 1	EMPA014	ATTTGCCTATTGGGTTCTCTG	TGAATGATCACAGAACATCCAG
	EMPA015	TTTTGGTCAATCTGCTGCTG	CTCTCATCTTCCCCCTCCTC
	EMPA018	TCCAAGAACAAAGCCAAAATC	AATTTCAATGCATTCTGGATAG
Multiplex 2	EMPaS10	GCTAATATCAAATCCCAGCTCTC	TGAAGAAGTATGGCTTCTGTGG
	EMPaS11	ACCACTTTGAGGAACTTGGG	CTGCCTGGAAGAGCAATAAC
	EMPaS12	TGTGCTAATGCCAAAATACC	ACATGCATTTCAACCCACTC
Multiplex 3	UDP97-403	CTGGCTTACAACCTCGCAAGC	CGTCGACCAACTGAGACTCA
	UDP98-411	AAGCCATCCACTCAGCACTC	CCAAAAACCAAAACCAAGG
	UDP98-412	AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC	GCTGAAGACGACGATGATGA
	UDP98-410	AATTTACCTATCAGCCTCAA	TTTATGCAGTTTACAGACCG

Pro fragmentační analýzu byly PCR reakce provedeny s fluorescenčně označenými primery (6FAM, VIC, NED, PET) a u získaných amplifikačních produktů byla provedena fragmentační analýza na genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500. Pro zefektivnění procesu fragmentace byly provedeny společně analýzy pro multiplex 1 a 2 a společně pro multiplex 3 a primer UDP98-410, což bylo umožněno odlišnou velikostí sledovaných lokusů. Před fragmentační analýzou byla provedena denaturace, ke každému vzorku bylo přidáno 11  $\mu$ l Formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) a 0,4  $\mu$ l velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ' Size standard v 2.0, Applied Biosystems). Po inkubaci 4 minuty při teplotě 94 °C byly vzorky rychle zchlazeny na ledu. Odečtení velikostí fragmentů probíhalo na genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500. Hodnocení jejich velikostí bylo provedeno pomocí softwarového programu GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems).

Pro posouzení genetických charakteristik sledovaných jedinců třešně ptačí byla získaná data mikrosatelitových markerů zpracována pomocí statistických programů GenAlEx 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007) a Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004).

## VÝSLEDKY

Pro testování vzorků třešně ptačí bylo použito 10 mikrosatelitových markerů, které vykazovaly polymorfismus a výsledky jejich analýz byly interpretovatelné. Amplifikační produkty sledovaných lokusů u analyzovaných vzorků dosahovaly velikosti v rozmezí 212–225 bp u markeru EMPA014; 210–248 bp u markeru EMPA015; 94–110 bp u markeru EMPA018; 144–176 bp u markeru EMPaS10; 60–100 bp u markeru EMPaS11; 122–145 bp u markeru EMPaS12; 118–140 bp u markeru UDP97-403; 119–133 bp u markeru UDP98-410; 151–165 bp u markeru UDP98-411; 111–125 bp u markeru UDP98-412.

Pomocí statistického programu CERVUS byly pro použité lokusy stanoveny hodnoty počtu alel, pozorovaná heterozygotnost, očekávaná heterozygotnost, počty heterozygotů, a stanoven polymorfní informační obsah (tab. 3). U sledovaných 91 jedinců byl průměrný počet alel na lokus 6,5, průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,6743 a průměrná hodnota polymorfního informačního obsahu (Polymorphism Information Content, PIC) 0,6234. Vzhledem ke skutečnosti, že markery jsou klasifikovány jako informativní, pokud hodnota PIC je  $\geq 0,5$  (SHARMA et al. 2010), jsou markery EMPA014 (PIC = 0,487)

**Tab. 2.**

Průběh optimalizovaných PCR pro vybrané SSR markery  
Stages of optimized PCR for the selected SSR markers

Krok/Step	Počáteční denaturace/ Initial denaturation		Počet cyklů/ Number of cycles	Denaturace/ Denaturation		Annealing		Elongace/ Elongation		Finální elongace/ Final elongation	
	T (°C)	Čas		T (°C)	Čas (s)	T (°C)	Čas (s)	T (°C)	Čas (s)	T (°C)	Čas (min)
Multiplex 1	94	90 s	10	94	10	60 (-0,5°C/1 cyklus)	45	72	60	72	5
			25	94	30	55	45	72	60		
Multiplex 2	95	15 min	10	94	30	60 (-1°C/1 cyklus)	90	72	60	60	30
			25	94	30	48	90	72	60		
Multiplex 3	95	4 min	30	94	45	60	45	72	30	72	20
UDP98-410	95	4 min	30	94	45	52	45	72	30	72	20

**Tab. 3.**

Parametry genetické diverzity pro použitých 10 mikrosatelitových markerů  
Genetic diversity parameters for the working set of 10 microsatellite loci

Lokus/Loci	Na	Ho	He	Počet heterozygotů/ Number of heterozygotes	PIC	HW	F (null)
EMPA014	6	0,429	0,527	39	0,487	***	0,1625
EMPA015	11	0,385	0,802	35	0,774	***	0,3594
EMPA018	7	0,582	0,689	53	0,658	ns	0,0944
EMPaS10	8	0,451	0,753	41	0,707	ns	0,2405
EMPaS11	5	0,604	0,513	55	0,438	ns	-0,0892
EMPaS12	5	0,681	0,634	62	0,558	ns	-0,0463
UDP97-403	6	0,308	0,676	28	0,613	***	0,3908
UDP98-410	7	0,725	0,754	66	0,707	ns	0,0174
UDP98-411	4	0,582	0,640	53	0,583	ns	0,0328
UDP98-412	6	0,824	0,755	75	0,710	ns	-0,0487

Na = Počet různých alel/Number of different alleles

Ho = Heterozygotnost pozorovaná/Observed Heterozygosity

He = Heterozygotnost očekávaná/Expected Heterozygosity

PIC = Polymorfní informační obsah/Polymorphism information content

HW = Signifikantnost odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy/Significance of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium

(ns = není signifikantní/not significant, \*\*\* = signifikantní na 0,1% úrovni/significant at the 0.1% level)

F(null) – Ohodnocená frekvence nulových alel dle van Oosterhouta/Estimated null allele frequency (according to van Oosterhout)

a EMPaS11 (PIC = 0,438) málo informativní. Odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy při aplikaci Bonferroniho korekce byly u lokusů EMPA014, EMPA015 a UDP97-403 signifikantní na hladině významnosti  $P < 0,001$ , což je pravděpodobně důsledek přítomnosti nulových alel. Přítomnost nulových alel v lokusech byla určena pomocí programu Micro-Checker, odhadované frekvence nulových alel v jednotlivých lokusech dle metody van Oosterhouta jsou uvedeny v tab. 4. Pozorovaná heterozygotnost ( $H_o$ ) u celkového souboru 91 jedinců byla nejvyšší u lokusu UDP98-412 (0,824), nejvyšší hodnota očekávané heterozygotnosti byla u lokusu EMPA015. Stupeň polymorfismu stanovený hodnotou PIC byl zjištěn nejnižší (0,438) u lokusu EMPaS11 a nejvyšší (0,774) u lokusu EMPA015. Pomocí fragmentační analýzy 10 lokusů u sledovaných 91 jedinců semenného sadu byly získány multilokusové genotypové profily (MLG), které jsou uvedeny v tab. 4. U 18 klonů (ortetů) byly genotypy všech deklarovaných jedinců (ramet) shodné, u 5 klonů (192, 217, 226, 229, 237) byl 1 genotyp odlišný, ale vždy se dal přiřadit k jinému ortetu v rámci semenného sadu. U klonu 261 byly 2 genotypy odlišné a bylo možné je přiřadit k příslušným ortetům. U klonu 258 byly určeny 3 odlišné genotypy, dva genotypy bylo možné přiřadit k jiným ortetům a jeden genotyp byl unikátní. U klonu 263 (5 ramet) byly všechny ramety genotypově odlišné a pouze 1 genotyp bylo možné přiřadit k ortetu 261. Na základě provedené multilokusové genotypizace byla zjištěna shoda velikostí alel všech šetřených lokusů u dvojic klonů 214 a 215, dále byly shodné klony 217 a 218 a stejné genotypové profily měly i klony 225 a 226.

Pro statistické zhodnocení variability ortetů ve sledovaném semenném sadu byly ze souboru vzorků vyřazeny ramety příslušející k ortetu 263, vzhledem k neprůkaznosti určení genotypu tohoto klonu. U hodnocených 86 jedinců ze semenného sadu pak bylo celkově detekováno 59 rozdílných alel v 10 lokusech. Nejvíce polymorfni se jevil lokus EMPA015 u kterého bylo identifikováno rozdílných 10 alel u sledovaného souboru vzorků, a nejméně polymorfni byly lokusy EMPaS11 a UDP98-411, u nichž byly detegovány pouze 4 alely. Privátní alela byla zjištěna pouze u ortetů 189 a 229. Pomocí statistického programu GenAlEx 6.51 byly zjištěny průměrné hodnoty Shannonova informačního indexu pro jednotlivé sledované lokusy, které se pohybovaly od 0,487 (lokus EMPA014) do 0,882 (lokus UDP98-412). Podle kvalitativní interpretace hodnot  $F_{st}$  (WRIGHT 1943) byla mezi některými sledovanými klony zjištěna velmi vysoká genetická divergence (0,451 mezi klony 225 a 234), ale např. mezi klony 215 a 217 byla zjištěna hodnota  $F_{st}$  0,011, tedy malá genetická divergence.

Shoda genotypových profilů jedinců u sledovaných klonů byla při použití deseti SSR markerů potvrzena v 69 % případů, v 19 % byl odlišný 1 roubovanec a ve 12 % (3 ortety) byla detekována neshoda ve více než 1 rameti. Ve zkoumaném souboru bylo možné 10 roubovanců přiřadit k příslušným ortetům (došlo tedy k jejich chybnému označení), lze tedy konstatovat, že z celkových 91 zkoumaných jedinců jich 86 lze přiřadit k ortetům zastoupeným v rámci semenného sadu. Tedy 94 % ramet je možné přiřadit ke zkoumaným ortetům.

## DISKUSE

Analýzy mikrosatelitových markerů mají široké uplatnění v populační genetice a ve šlechtění rostlin. Vzhledem k jejich kodominantnímu charakteru v kombinaci s velkým počtem variabilních alel se dají účelně využít i pro identifikaci klonů a kultivarů rostlin a také pro mapování genomů (HORMAZA 2002; ARANZANA et al. 2003; SCHUELER et al. 2003). Analýza SSR markerů se jeví jako vhodná metoda pro identifikaci variet u většiny kulturních druhů rostlin (PAN 2010) i dřevin (ROBICHAUD et al. 2006). Jaderné mikrosatelitové markery použili pro identifikaci klonů a kultivarů japonských okrasných třešní KATO et al. (2012), variabilitu SSR markerů pro identifikaci jedinců a kultivarů u třešní využili také WÜNSCH, HORMAZA (2002); SCHUELER et al. (2003); LACIS et al. (2009); JARNI et al. (2012); FERNANDEZ-CRUZ et al. (2014); FASAD, ESNA-ASHARI (2016) a NAJAFZADEH et al. (2016).

V naší studii jsme pro molekulární analýzy semenného sadu třešně ptačí využili polymorfni jaderné mikrosatelitové (SSR) markery vybrané z prací CLARKE, TOBUTT (2003); VAUGHAN, RUSSELL (2004); SCHUELER et al. (2003); CIPRIANI et al. (1999) a TESTOLIN et al. (2000). Použité lokusy byly v uvedených pracích využity nejen pro populační studie, ale vzhledem k vysoké polymorfnosti byly vhodné i pro identifikaci jedinců.

CLARKE a TOBUTT (2003) uvádějí, že použitím kombinace 3 markerů EMPA014, EMPA015 a EMPA018 lze spolehlivě identifikovat 14 kultivarů třešně, u těchto markerů zjistili 6 rozdílných alel pro EMPA014, 7 alel pro EMPA015 a 5 alel pro marker EMPA018, hodnoty očekávané heterozygotnosti ( $H_e$ ) byly 0,65–0,76. U našich sledovaných vzorků byl zjištěn u těchto markerů vyšší počet alel (tab. 4), přičemž hodnoty  $H_e$  byly v rozsahu 0,527–0,802. Ve studii zaměřené na 2 britské populace třešně ptačí VAUGHAN et al. (2007) zjistili počet alel v rozmezí 5–13 a hodnoty  $H_e$  v rozsahu 0,593–0,703. U markerů specifických pro planou formu třešně (EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12) stanovili VAUGHAN, RUSSELL (2004) počet alel v rozsahu 4–6 a hodnoty  $H_e$  0,54–0,74, i u těchto markerů byl počet alel u našich vzorků vyšší a hodnoty  $H_e$  byly v rozmezí 0,513–0,753. Při použití markerů EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12 ve studii zaměřené na sledování diverzity 5 jedinců plané formy třešně ptačí (jedinci ze tří italských populací třešně, ze slovinské a chorvatské populace) a 87 kultivarů třešně zjistili GUARINO et al. (2009) počet alel 12–14 a hodnoty  $H_e$  v rozmezí 0,691–0,831. Autoři v této studii použili 28 SSR markerů a průměrná očekávaná heterozygotnost u těchto lokusů byla 0,56, u námi použitých 10 SSR markerů byla průměrná očekávaná heterozygotnost u těchto lokusů vyšší (0,6743). Markery EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12 použili pro sledování genetické diverzity u 5 řeckých populací třešně ptačí a pro rozlišení kulturních a planých forem třešně ptačí i GANOPOULOS et al. (2011, 2013), autoři u těchto markerů našli 13–15 alel. U analyzovaných 11 italských populací detekovali DE ROGATIS et al. (2013) u těchto markerů 11–25 alel, uváděný počet alel byl vyšší ve srovnání s naší studií. U markerů UDP97-403, UDP98-410, UDP98-411 a UDP98-412 uvádí SCHUELER et al. 2003 u analyzovaných vzorků z německé populace Ratzeburg počet alel v rozmezí 6–9, hodnoty heterozygotnosti v rozsahu 0,379–0,775, tedy pro uvedené lokusy hodnoty vyšší než u našich vzorků.

V populacích třešně ptačí se běžně vyskytují tzv. klonové shluky vznikající vegetativním množením pomocí kořenových výstřelků, čímž dochází v populacích ke snížení genetické variability (RUSSELL 2003). Podle dřívějších studií založených na izoenzymových analýzách se může výskyt těchto klonových shluků objevit v oblastech o rozloze 20–5000 m<sup>2</sup> (KOBILHA 2002). Kořenovou výmladností u zdrojových jedinců (ortetů) je možné vysvětlit v naší laboratoři zjištěnou shodu genotypových profilů u tří dvojic klonů 214 a 215, 217 a 218, 225 a 226, zařazených ve sledovaném semenném sadě. Využití jaderných mikrosatelitových markerů pro identifikaci rozdílných jedinců a detekci jedinců pocházejících z kořenových výstřelků u autochtonní populace třešně ptačí v Ratzeburgu (Německo) popsali SCHUELER et al. (2003). Autoři pomocí provedených SSR analýz identifikovali čtyři páry stromů se shodným genotypem, rostoucích 15 metrů od sebe, a uvádějí, že pro zjištění genetické identity vegetativně množných jedinců postačuje využít sedm SSR markerů. LACIS et al. (2009, 2011) na základě studia kolekce genetických zdrojů třešně ptačí ve Švédsku a Litvě uvádějí, že v případě použití vysoce polymorfni markerů lze genetickou variabilitu u genetických zdrojů třešně sledovat již pouze třemi SSR markery. Pomocí mikrosatelitových markerů určovali VAUGHAN et al. (2007) výskyt a rozšíření vegetativně rozmnožených jedinců třešně ptačí ve dvou populacích nacházejících se v Kentu (Velká Británie), na základě provedených analýz 13 SSR markerů zjistili výskyt klonově identických jedinců v 48 % a v 65 % z celkových zkoumaných jedinců, tedy při provedení analýz 551 jedinců z obou populací detekovali pouze 246 rozlišných genotypů. Výskyt vegetativně množných jedinců ve dvou populacích třešně ptačí v Německu popsali i HÖLTGEN, GRE-

**Tab. 4.**  
Multilokusové genotypy (MLG) zkoumaných ortetů  
Multilocus genotypes (MLG) of tested ortets

Ortet	počet rameť/ number of ramets	EMPA014	EMPA015	EMPA018	EMPaS10	EMPaS11	EMPaS12	UDP97-403	UDP98-410	UDP98-411	UDP98-412
12	3	221/225	222/224	106/106	164/164	60/72	136/136	118/118	127/133	151/163	111/117
189	4	221/223	218/220	98/106	156/164	60/60	143/145	120/120	125/125	151/163	117/123
191	3	225/225	214/224	102/106	150/156	60/72	136/136	120/122	125/127	163/163	111/123
192	1 (226)	219/221	220/220	98/98	150/150	72/72	136/138	120/136	127/133	163/165	117/123
192	2	225/225	220/224	106/108	156/164	72/72	136/136	118/122	127/133	151/151	123/123
200	3	225/225	220/220	96/108	152/164	60/72	136/136	120/120	127/127	159/159	117/123
204	3	225/225	214/214	102/108	164/164	60/72	136/138	120/122	123/127	151/163	123/125
208	2	225/225	214/214	96/102	164/164	60/72	136/138	120/120	127/127	163/163	123/125
214*	2	225/225	224/224	106/106	156/164	72/72	136/138	122/122	119/127	151/163	111/117
215*	3	225/225	224/224	106/106	156/164	72/72	136/138	122/122	119/127	151/163	111/117
217	1 (214)	225/225	224/224	106/106	156/164	72/72	136/138	122/122	119/127	151/163	111/117
217**	5	221/223	220/220	102/108	156/156	60/72	136/138	118/118	133/133	163/165	119/123
218**	3	221/223	220/220	102/108	156/156	60/72	136/138	118/118	133/133	163/165	119/123
220	2	225/225	220/220	98/106	150/164	72/72	122/122	120/122	125/133	165/165	119/123
225***	2	219/221	220/220	98/98	150/150	72/72	136/138	120/136	127/133	163/165	117/123
226***	4	219/221	220/220	98/98	150/150	72/72	136/138	120/136	127/133	163/165	117/123
226	1 (192)	225/225	220/224	106/108	156/164	72/72	136/136	118/122	127/133	151/151	123/123
229	2	225/225	218/220	106/106	144/156	60/72	122/136	120/120	125/127	163/163	121/123
229	1 (191)	225/225	214/224	102/106	150/156	60/72	136/136	120/122	125/127	163/163	111/123
232	3	225/225	224/224	106/106	150/164	60/72	136/136	118/122	127/133	163/163	117/123
234	4	225/225	224/224	106/106	150/164	60/98	138/143	118/118	125/125	151/163	117/119
236	3	225/225	222/222	106/106	150/164	72/72	138/138	118/118	125/133	151/163	123/123
237	2	223/225	236/238	106/106	164/164	60/72	136/143	118/118	125/133	151/165	117/123
237	1 (239)	225/225	222/222	106/106	164/164	60/72	138/143	118/118	125/133	151/159	117/117
239	5	225/225	222/222	106/106	164/164	60/72	138/143	118/118	125/133	151/159	117/117
253	3	225/225	220/220	94/106	164/176	72/72	138/138	120/120	127/129	163/165	119/121
255	3	225/225	246/248	98/106	150/150	60/72	136/138	120/120	125/129	151/151	111/119
258	1 (259)	221/225	210/218	106/110	176/176	72/100	136/138	118/118	129/133	163/163	117/119
258	2	225/225	218/220	106/110	176/176	72/72	136/138	118/138	125/127	163/163	119/119
258	1	225/225	218/220	106/110	176/176	72/72	136/138	118/138	125/127	165/165	119/119
258	1 (226)	219/221	220/220	98/98	150/150	72/72	136/138	120/136	127/133	163/165	117/123
259	6	221/225	210/218	106/110	176/176	72/100	136/138	118/118	129/133	163/163	117/119
261	2	215/225	210/218	106/110	176/176	72/72	138/138	120/120	125/125	163/163	119/123
261	1 (259)	221/225	210/218	106/110	176/176	72/100	136/138	118/118	129/133	163/163	117/119
261	1 (253)	225/225	220/220	94/106	164/176	72/72	138/138	120/120	127/129	163/165	119/121
263	1	219/225	216/216	94/102	150/150	60/72	136/143	138/140	125/125	151/163	123/125
263	1 (261)	215/225	210/218	106/110	176/176	72/72	138/138	120/120	125/125	163/163	119/123
263	1	221/225	220/220	94/98	150/156	60/72	138/138	120/120	119/133	163/163	119/119
263	1	223/223	218/218	106/106	156/156	60/72	136/138	118/120	127/129	151/163	121/123
263	1	212/215	210/210	94/102	160/164	72/82	138/143	122/122	121/129	159/159	121/123

\*, \*\*, \*\*\* Označení shodných multilokusových genotypů/designation of identical multilocus genotypes

GORIUS (2006), kteří pro určení klonové identity použili 6 SSR markerů a našli až 14 jedinců stejného genotypu v populaci. GANOPOULOS et al. (2013) uvádí, že při odběru jedinců třešně ptačí, vzdálených minimálně 150 m od sebe, nenalezli ve sledovaných řeckých populacích klonově shodné jedince. Autoři dále uvádějí, že mezi řeckými populacemi třešně ptačí byla zjištěna střední hodnota divergence Fst (0,097), což je nižší ve srovnání s některými klony v naší studii. Využití analýz 9 SSR markerů při identifikaci klonů (určení multilokusových genotypů – MLG) u výběrových stromů třešně ptačí pro jejich zařazení do šlechtitelských programů ve Španělsku popsali FERNANDEZ-CRUZ et al. (2014). MARIETTE et al. (2006) použili analýzy 6 SSR markerů pro doplnění informací o jedincích třešně ptačí použitých pro založení 3 experimentálních semenných sadů ve Francii.

Využití DNA analýz při výběru stromů do šlechtitelských programů se v případě třešně ptačí jeví jako velmi užitečný doplňkový šlechtitelský nástroj, např. provedením analýz SSR markerů je možné vyřadit klonově shodné jedince při zakládání semenných sadů. Vhodným šlechtitelským nástrojem se jeví i provedení DNA analýz pro určení alel na S-locusu pro identifikaci autointokompatibility.

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit možnosti využití SSR markerů pro hodnocení klonové identity roubovanců semenného sadu třešně ptačí *Prunus avium* L. U 10 mikrosatelitových lokusů (EMPA014, EMPA015, EMPA018, EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12, UDP97-40, UDP98-410, UDP98-411 a UDP98-412) vykazovaly amplifikační produkty polymorfismus, byly interpretovatelné, a proto byly užity ke studiu klonové identity vybraného semenného sadu. Na základě molekulárních dat zjištěných ze souboru 91 jedinců ze semenného sadu byly získány statistické charakteristiky 10 mikrosatelitových markerů. Celkově bylo detekováno 65 rozdílných alel v 10 lokusech. Nejvíce polymorfni se jevil lokus EMPA015, u kterého bylo identifikováno 11 rozdílných alel. Na základě provedených analýz byly stanoveny multilokusové genotypové profily (MLG) jednotlivých klonů třešně ptačí v semenném sadu Čeladná. Při sledování klonové identity roubovanců semenného sadu byla deklarovaná klonová příslušnost potvrzena u 94% roubovanců, což významně převyšuje předpokládanou 20% toleranční hodnotu pro nehomogenitu ramet s deklarovaným klonem (IVANEK et al. 2010). Ojedinelé byly zjištěny klonově shodné ortety, tato skutečnost se dá vysvětlit existencí kořenové výmladnosti u třešně ptačí.

## Poděkování:

Výzkum byl financován z poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0117 (č. j. 6779/2017-MZE-14151) a vznikl v rámci řešení výzkumného projektu NAZV č. QJ1330240.

## LITERATURA

- ARANZANA M.J., PINEDA A., COSSON P., DIRLEWANGER E., ASCASIBAR J., CIPRIANI G., RYDER C.D., TESTOLIN R., ABBOTT A., KING G.J., IEZZONI A.F., ARÚS P. 2003. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 819–825.
- AVRAMIDOU E., GANOPOULOS I.V., ARAVANOPOULOS F.A. 2010. DNA fingerprinting of elite Greek wild cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using microsatellite markers. *Forestry*, 83 (5): 527–533.
- BEHM A., KONNERT M. 2002. Proposal for a seed certification scheme. *Dendrobiology*, 47: 105–108.
- CIPRIANI G., LOT G., HUANG W.G., MARRAZZO M.T., PETERLUNGER E., TESTOLIN R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 65–72.
- CLARKE J.B., TOBUTT K.R. 2003. Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. *Molecular Ecology Notes*, 3: 578–580.
- DE ROGATIS A., FERRAZZINI D., DUCCI F., GUERRI S., CARNEVALE S., BELLETTI P. 2013. Genetic variation in Italian wild cherry (*Prunus avium* L.) as characterized by nSSR markers. *Forestry*, 86: 391–400.
- DIRLEWANGER E., COSSON P., TAVAUD M., ARANZANA M.J., POIZAT C., ZANETTO A., ARÚS P., LAIGRET F. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 127–138.
- ĎURKOVIČ J. 2006. Rapid micropropagation of mature wild cherry. *Biologia Plantarum*, 50 (4): 733–36.
- FASAD A., ESNA-ASHARI M. 2016. Genetic diversity of some iranian sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars using microsatellite markers and morphological traits. *Cytology and Genetics*, 50 (1): 8–19.
- FERNANDEZ-CRUZ J., FERNANDEZ-LOPEZ J., MIRANDA-FONTAÍÑA M.E., DIAZ R., TOVAL G. 2014. Molecular characterization of Spanish *Prunus avium* plus trees. *Forest Systems*, 23 (1): 120–128.
- GANOPOULOS I., ARAVANOPOULOS F.A., ARGIRIOU A., KALIVAS A., TSAFTARIS A. 2011. Is the genetic diversity of small scattered forest tree populations at the southern limits of their range more prone to stochastic events? A wild cherry case study by microsatellite-based markers. *Tree Genetics and Genomes*, 7: 1299–1313.
- GANOPOULOS I., ARAVANOPOULOS F.A., TSAFTARIS A. 2013. Genetic differentiation and gene flow between wild and cultivated *Prunus avium*: An analysis of molecular genetic evidence at a regional scale. *Plant Biosystems*, 147 (3): 678–685.
- GUARINO C., SANTORO S., DE SIMONE L., CIPRIANI G. 2009. *Prunus avium*: nuclear study in wild populations and sweet cherry cultivars. *Genome*, 52: 320–337.
- HEJNÝ S., SLAVÍK B. (eds.) 1990. Květena České republiky 3. Praha, Academia: 540 s.
- HORMAZA J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 321–328.
- HÖLTKEN A.M., GREGORIUS H.R. 2006. Detection local establishment strategies of wild cherry (*Prunus avium* L.). *BMC Ecology* 6: 13 s. <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/6/13>
- IVANEK O., NOVOTNÝ P., FRÝDL J. 2010. Metodika zakládání semenných sadů 1,5. generace. Certifikovaná metodika. Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti: 29 s. Lesnický průvodce 7/2010.

- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ P., MATĚJKA K. 2013. Analysis of the genetic structure of a model Scots pine (*Pinus sylvestris*) seed orchard for development of management strategies. *Journal of Forest Science*, 59: 377–385.
- JARNI K., DE CUYPER B., BRUS R. 2012. Genetic variability of wild cherry (*Prunus avium* L.) seed stands on Slovenia as revealed by nuclear microsatellite loci. *Plos ONE* 7(7): e41231. DOI:10.1371/journal.pone.0041231
- KALINOWSKI S.T., TAPER M.L., MARSHALL T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099–1106.
- KATO S., MATSUMOTO A., YOSHIMURA K., KATSUKI T., IWAMOTO K., TSUDA Y., ISHIO S., NAKAMURA K., MORIWAKI K., SHIROISHI T., GOJOBORI T., YOSHIMARU H. 2012. Clone identification in Japanese flowering cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) cultivars using nuclear SSR markers. *Breeding Science*, 62: 248–255.
- KOBLIHA J. 2002. Wild cherry (*Prunus avium* L.) breeding program aimed at the use of this tree in the Czech forestry. *Journal of Forest Science*, 48: 202–218.
- KONNERT M., FOFFOVÁ E., FOFF V. 2006. Možnosti kontroly identity lesného reprodukčného materiálu genetickými metódami. In: Sarvaš M., Sušková M. (eds.): Aktuálne problémy lesného škôlkárstva, semenárstva a umelej obnovy lesa. 22. – 23. 3. 2006, Liptovský Mikuláš. Zvolen, Národné lesnícke centrum: 69–74.
- KONNERT M. 2006. Proof of identity of forest reproductive material based on reference samples. *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt der Forst- und Holzwirtschaft (BFH)*, 221: 61–71.
- KONNERT M. 2011. Certification of forest reproductive material based on reference samples and genetic methods. In: Applied Forestry Research in the 21st Century. International conference held on the occasion of the 90th anniversary of the Forestry and Game Management Research Institute. Prague-Průhonice, Sept. 13–15, 2011: book of abstracts. Jíloviště, Forestry and Game Management Research Institute: 58.
- KOTRLA P., PAŘÍZEK M., CAFOUREK J. 2008. Kontrola identity RM pomocí genetických markerů. *Lesnická práce*, 87: 622–623.
- LACIS G., RASHAL I., RUISA S., TRAJKOVSKI V., IEZZONI A.F. 2009. Assessment of genetic diversity of Latvian and Swedish sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources collection by using SSR (microsatellite) markers. *Scientia Horticulturae*, 121: 451–457.
- LACIS G., RASHAL I., TRAJKOVSKI V. 2011. Implementation of a limited set of SSR markers for screening of genetic variability in Latvian and Swedish sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genetic resources collections. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 65 (1/2) (672/673): 21–28. DOI: 10.2478/v100046-011-0014-4
- MARIETTE S., BALSEMIN E., STOECKEL S., TAVAUD M., LE BOULER H., SANTI F., VERGER M. 2006. Parental participation in progeny and effective population sizes in experimental seed orchards of wild cherry *Prunus avium* L. (Batsch). *Annual Forest Sciences*, 64: 533–539.
- MUSIL J., NOVÁK P., ŠEFL J. 2007. Semenné sady v České Republice. In: Aktuálne problémy lesného škôlkárstva, semenárstva a umelej obnovy lesa. Zborník referátov z medzinárodného seminára, ktorý sa konal 27.-28. marca 2007 v Liptovskom Jáne. Zvolen, Národné lesnícke centrum: 37–43.
- NAJAFZADEH R., ARZANI K., BOUZARI N., SAEI A. 2016. Genetic variation and identification of promising sour cherries inferred from microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 52 (1): 64–73.
- PAN Y.-B. 2010. Databasing molecular identities of Sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers. *American Journal of Plant Sciences*, 1: 87–94.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2012. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- ROBICHAUD R.L., GLAUBITZ J.C., RHODES O.E. JR., WOESTW K. 2006. A robust set of black walnut microsatellites for parentage and clonal identification. *New Forests*, 32: 179–196.
- RUSSELL K. 2003. EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use for wild cherry (*Prunus avium*). Rome, Italy, International Plant Genetic Resources Institute: 6 s.
- SHARMA K., KORECKÝ J., SOLDATESCHI E.D.P., SEDLÁK P. 2017. S-genotype diversity in wild cherry populations in the Czech Republic, *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48 (1): 92–97.
- SHARMA M.V., KANTARTZI S.K., STEWART J.M. 2010. Molecular diversity and polymorphism information content of selected *Gossypium hirsutum* accessions. In: Oosterhuis D.M. (ed.): Summaries of Arkansas Cotton Research 2009. Fayetteville, Arkansas Agricultural Experiment Station: 124–127. Research Series 582.
- SCHUELER S., TUSCH A., SCHUSTER M., ZIEGENHAGEN B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46: 95–102.
- TESTOLIN R., MARRAZZO T., CIPRIANI G., QUARTA R., VERDE I., DETTORI M.T., PANCALDI M., SANSAVINI S. 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, 43: 512–520.
- VAN OOSTERHOUT C.V., HUTCHINSON W.F., WILLS D.P.M., SHIPLEY P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, 4: 535–538.
- VAUGHAN S.P., RUSSELL K. 2004. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Molecular Ecology Notes*, 4: 429–431.
- VAUGHAN S.P., COTTRELL J.E., MOODLEY D.J., CONNOLLY T., RUSSELL K. 2007. Clonal structure and recruitment in British wild cherry (*Prunus avium* L.). *Forest Ecology and Management*, 242: 419–430. DOI: 10.1016/j.foreco.2007.01.059
- WRIGHT S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.
- WÜNSCH A., HORMAZA J.I. 2002. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) SSR sequences. *Heredity*, 89: 56–63.

## EVALUATION OF WILD CHERRY SEED ORCHARD USING MICROSATELLITE MARKERS

### SUMMARY

The clonal identification in model seed orchard of wild cherry was studied by DNA analyses using the Simple Sequence Repeats (SSR) method. Microsatellites (SSR) are highly variable markers that are commonly used in population genetic studies for analyses of gene flow, parentage analyses, and studies of genetic diversity. In particular nuclear simple sequence repeat (SSR) markers have proven to be extremely useful for characterizing cultivars and identifying clones (WÜNSCH, HORMAZA 2002; SCHUELER et al. 2003; LACIS et al. 2009; KATO et al. 2012; FERNANDEZ-CRUZ et al. 2014; FASAD, ESNA-ASHARI 2016; NAJAFZADEH et al. 2016). Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from buds taken from 91 sampled wild cherry trees of seed orchard. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR was optimized for the tested primers that have been scanned in publications (CIPRIANI et al. 1999; TESTOLIN et al. 2000; CLARKE, TOBUTT 2003; VAUGHAN, RUSSELL 2004) (Tab. 1, 2). Ten polymorphic nuclear microsatellite markers (EMPA014, EMPA015, EMPA018, EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12, UDP97-40, UDP98-410, UDP98-411 and UDP98-412) were selected and specific primers were fluorescently labelled. Measurement of the size of amplification products was carried out on the genetic analyzer Applied Biosystems 3500. The obtained data were analysed by means of the statistical programs CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007), GenAEx 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012) and Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004). Altogether 65 different alleles were detected at 10 loci of the 91 wild cherry individuals from seed orchard, i.e. 6.5 alleles per locus in average. The most polymorphic locus over our set of samples was locus EMPA015, where the number of different alleles was estimated to 11. By applying of the 10 suitable markers to the 18 clones from model seed orchard we obtained multilocus genotypes (MLG) shown in Tab. 4. In the wild cherry seed orchard we identified identical genotypes at all ten loci for following ortets with Nos. 214 and 215, 217 and 218, 225 and 226. It could be caused by root suckering of vegetatively derived plus trees, which were used for establishment of the seed orchard. Table 3 shows number of alleles, observed heterozygosity, expected heterozygosity, number of heterozygotes, Polymorphism Information Content (PIC), significance of deviations from Hardy-Weinberg equilibrium and estimated null allele frequencies (according to van Oosterhout) of loci. Allelic richness (number of alleles) at each locus ranged from 4 to 11. Expected heterozygosities ranged between 0.513–0.802 across all loci and observed heterozygosities ranged from 0.308 to 0.824, Polymorphism Information Content (PIC) ranged from 0.438 to 0.774. The mean PIC value for ten selected loci was 0.6234.

These results illustrate the utility of the microsatellite loci for assessing spatial patterns of genetic diversity and for individual identification. The identified genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for clonal identification of wild cherry trees. Declared clone affiliation was confirmed in 94% of sampled trees in tested seed orchard.

The application of SSR markers could be an important tool for population genetics and breeding of wild cherry, for example it would be possible to unequivocally identify with unique DNA fingerprints all suitable genotypes for the establishment of a seed orchard.

*Zasláno/Received: 31. 08. 2017*

*Přijato do tisku/Accepted: 17. 10. 2017*