

VYUŽITÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ PRO OVĚŘOVÁNÍ KLONOVÉ IDENTITY U TŘEŠNĚ PTAČÍ

LESNICKÝ PRŮVODCE



Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.

Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.

Ing. OLGA TRČKOVÁ

Ing. EVA ŽIŽKOVÁ, Ph.D.

10/2017

Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u třešně ptačí

Certifikovaná metodika

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

Ing. Eva Žižková, Ph.D.

Lesnický průvodce 10/2017

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

www.vulhm.cz

Publikace vydané v řadě Lesnický průvodce jsou dostupné v elektronické verzi na:

http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce

Vedoucí redaktor: Ing. Jan Řezáč; e-mail: rezac@vulhm.cz

Výkonná redaktorka: Miroslava Valentová; e-mail: valentova@vulhmop.cz

Grafická úprava a zlom: Klára Šimerová; e-mail: simerova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-152-9

ISSN 0862-7657

USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR CLONAL IDENTITY VERIFICATION IN WILD CHERRY

Abstract

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers to obtain genetic characteristics, and to introduce procedures for verifying the clonal identity of this species. The methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of the polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products, and molecular data calculations. The selected seed orchard of wild cherry was used to develop this methodology. Ten selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for finding the genetic parameters and verifying the clonal identity.

Key words: wild cherry, seed orchard, DNA analysis, simple sequence repeats, clonal identity

Oponenti: Ing. Miloš Pařízek, ÚHUL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové
RNDr. Radka Podlipná, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AV
ČR, v. v. i.

Foto na obálce:

Třešeň ptačí, Zbirožsko (ing. F. Beran)

Adresa autorek:

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

Ing. Eva Žižková, Ph.D. (Pokorná)

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Strnady 136, Jíloviště 252 02

e-mail: machova@vulhm.cz

cvrckova@vulhm.cz

trckova@vulhm.cz

pokorna@vulhm.cz

Obsah:

I	CÍL METODIKY	7
II	VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
1	ÚVOD	7
2	METODICKÉ POSTUPY	10
a	Odběr vzorků a postupy izolace DNA	10
b	Postupy PCR amplifikace	12
c	Postupy elektroforézy v agarózovém gelu	19
d	Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů	20
e	Zpracování molekulárních dat	21
III	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	22
IV	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	23
V	EKONOMICKÉ ASPEKTY	26
VI	DEDIKACE	30
VII	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	31
VIII	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	34
	Summary	35
	Příloha	37

Zkratky použité v textu:

DNA deoxyribonukleová kyselina

nSSR nuclear Simple Sequence Repeats (jaderné mikrosatelity)

SSR Simple Sequence Repeats (mikrosatelity)

PCR Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

I CÍL METODIKY

Cílem metodiky je představit postupy analýz DNA s využitím jaderných mikrosatelitových lokusů pro získání genetických charakteristik za účelem ověřování deklarované příslušnosti ramet (jedinců) náležejícím k určitému ortetu (klonu) a zhodnocení úrovně polymorfismu zastoupených klonů na modelovém semenném sadu třešně ptačí.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 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 1992). 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 obmýti 55–70 let (ĎURKOVIČ 2006). Roztroušeně pórovité dřevo vyniká pevností a dekorativní červenohnědou kresbou. Využívá se v řezbářství, stolařství, při výrobě různých nástrojů a zpracování dýhy. Z těchto důvodů se v lesním hospodářství uvažuje o jejím rozšíření (ÚRADNÍČEK et al. 2009).

Přestože se z evropského hlediska nejedná o ohroženou dřevinu, její převážně ojedinelý a vtroušený výskyt v oblastech rozšíření je základem pro její zařazení do programů konzervace genových zdrojů, či do šlechtitelských programů mnoha evropských zemí. Zachování vhodného genofondu tohoto druhu dřeviny probíhá v současné době i s podporou vyhlášeného Národního programu ochrany a repro-

dukce genofondu lesních dřevin. 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). 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.). Národní 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). V České republice byl systém kontroly reprodukčního materiálu lesních dřevin a jejich zdrojů doposud založen na kontrole evidenčních záznamů. Objektivní ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů, archivů klonů a směsí klonů) lze uskutečňovat DNA analýzami s využitím mikrosatelitových markerů, které jsou s úspěchem využívány pro identifikaci jedinců. Přímým studiem genomu pomocí DNA analýz se ověřuje také genetická kvalita zdrojů reprodukčního materiálu, která je základním předpokladem pro budoucí výnos, adaptační schopnosti a ekologickou stabilitu lesa. Vyhledávají se DNA markery (lišící se úseky DNA), které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí nebo délce fragmentů DNA. Aby bylo možné získat ze zkoumaných vzorků optimální informace o genetické proměnlivosti studovaných jedinců, je potřebné vyhledat DNA markery, které vykazují vysoký polymorfismus. Pro ověřování klonové identity a polymorfismu třešně ptačí byly zvoleny jako DNA markery jaderné mikrosatelity - nuclear simple sequence repeats (nSSR). Mikrosatelitové markery jsou složeny z mnohokrát se opakujících krátkých motivů nukleotidů zpravidla 2–5 báze dlouhých (SCHMIDT, HESLOP-HARRISON 1996). Mikrosatelitové lokusy patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu, kdy je polymorfismus dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu nukleotidů. Abychom je mohli detekovat, jsou amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. Kodominantní charakter markerů SSR umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů. Mikrosatelitové markery již byly široce použity v mnoha genetických výzkumech např. pro sledování genetické diversity, analýzy toku genů, genového mapování, identifikace jedinců, určení rodičovství apod. (PFEIFFER et al. 1997; CHRISTIAKOV et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2006). U třešně byly mikrosatelitové markery využity pro identifikaci jedinců a kultivarů např. autory 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). Pro populační studie tohoto druhu je využili CLARKE, TOBUTT (2003), VAUGHAN, RUSSELL (2004), SCHUELER et al. (2003), CIPRIANI et al. (1999) a TESTOLIN et al. (2000). Účelem zpracovávaných metodických postupů bylo vybrat vhodné polymorfní mikrosatelitové markery a optimalizovat postupy polymerázové řetězové reakce (PCR) pro získání jednotlivých reprodukovatelných amplifikátů a po statistickém zpracování velikostí alel získat genetické charakteristiky šetřených klonů k studovaným lokusům. Z důvodu časových a finančních úspor při provádění DNA analýz u velkých souborů vzorků byly také postupy získávání PCR produktů a odečítání jejich velikostí při fragmentační analýze zaměřeny na seskupování vybraných mikrosatelitových lokusů do multiplexů, kdy probíhají amplifikace a fragmentační analýzy několika lokusů najednou. S využitím vypracovaných postupů metodiky lze získat znalosti o úrovni genetické diverzity, diferenciaci, heterozygotnosti a dalších genetických charakteristik šetřených klonů nebo porostů. Poznatky o genetických charakteristikách jsou významné k efektivnějšímu využívání stávajících genetických zdrojů reprodukčního materiálu pro zkvalitňování genetické struktury populací a pro zachování biodiverzity. Na základě stanovení úrovně genetické diverzity lze předpovídat průběh dalšího vývoje populací. Tato zjištění přispějí k zachování biologické rozmanitosti lesních ekosystémů a prosazování zásad trvale udržitelného obhospodařování, což je jedním z prioritních úkolů státní lesnické politiky.

Cílem uplatnění popsanych metodických postupů pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů, archivů klonů a směsí klonů) je s využitím DNA markerů zajistit objektivní metodou jasnou identifikaci klonů. Zjištění dalších genetických charakteristik, jako např. úrovně diverzity vysazených ortetů v semenném sadu je významné z hlediska očekávané kvality osiva. Aplikace nových kontrolních metod klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu by měla státní správě poskytnout podkladový materiál pro formulace dotační politiky v oblasti podpory zachování a reprodukce genofondu lesních dřevin.

2 Metodické postupy

a Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Nejvhodnějším rostlinným materiálem pro získání eluátů DNA jsou pupeny nebo čerstvě vyrašené lístky. Při získávání DNA ze starších listů se z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů snižuje kvalita i kvantita vyzolované DNA, což může zkomplikovat průběh navazující PCR amplifikace. Při manipulaci se vzorky je nutná evidenční kontrola, aby nedošlo k záměně mezi vzorky. Vzorky se při odběru označí, uloží do mikrotenového sáčku, udržují se při nízké teplotě (chladové tašky s namraženými destičkami) a co nejrychleji se přepraví ke zpracování v laboratoři. Vzhledem k následným analýzám je důležité vzorky držet stále při nízké teplotě. DNA lze izolovat okamžitě z čerstvě odebraných vzorků. V případě, že izolace DNA není provedena ihned po přijmutí vzorků, je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevidování, úpravy na vhodnou velikost apod.) uložit minimálně do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Další možností jak uchovat vzorky, je jejich vysušení za pomoci lyofilizátoru a poté je vzduchotěsně uzavřít v nádobách (např. lze použít plastové falkonky, scintilační lahvičky s dobře těsnícím uzávěrem). Takto zpracovaný (lyofilizovaný) materiál je snadněji zpracovatelný při následném tření vzorků, odpadá nutnost držet homogenizované vzorky na ledu. Pro izolaci DNA u lesních dřevin se na našem pracovišti nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Touto metodou lze v krátkém časovém úseku získat kvalitní eluáty DNA. Před zahájením vlastního postupu izolace je nutné přidat etanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. V případě výskytu sraženin v pufrch AP1 a AW1 se roztoky nahřejí. Inkubační lázeň se nechá nahřívát na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby byla připravena pro 2. krok pracovního postupu.

Protokol izolace DNA z rostlinných pletiv s použitím Dneasy Plant Mini Kitu:

1. Maximální množství výchozího čerstvého rostlinného pletiva je 100 mg, v případě lyofilizovaného pletiva 20 mg, rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na prášek, například použitím tekutého dusíku aplikovaného na rostlinný materiál v třecích miskách. Rozdrcený materiál se přenesení do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrcenému vzorku se napipetuje 400 µl pufru AP1 a následně 4 µl RnazyA, pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se ne-

- chá inkubovat 10 minut při 65 °C, během inkubace se musí promíchávat 2–3 × převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130 ml pufru P3, krátce se promíchá pomocí vortexu a inkubuje 5 minut na ledu a poté centrifuguje 5 minut při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
 4. Vzniklý lyzát se přepipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm.
 5. Přefiltrovaná frakce se s odečtením získaného objemu přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Dáváme pozor, abychom nenabrali případný pelet.
 6. Přidáme pufr AW1 v množství odpovídajícímu 1,5násobku objemu odebrané frakce a ihned opakovaným nasáváním a vypouštěním z mikropipety vzniklou směs promícháme.
 7. Odpipetujeme 650 ml směsi a přemístíme do Dneasy Mini spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.
 8. Dneasy Mini spin kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 ml pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
 9. Přidáme dalších 500 ml pufru AW2 a centrifugujeme 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm. Poté vyndáme opatrně Dneasy Mini spin kolonku ze zkumavky, abychom se nedotkli proteklé kapaliny.
 10. Přeneseme Dneasy Mini spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
 11. Přidáme 100 ml AE pufru, který aplikujeme přímo na membránu Dneasy Mini spin kolonky. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 minutu při rychlosti 8 000 rpm.
 12. Opakujeme krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, chladicí blok na mikrozkumavky (- 20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, sterilní mikrozkumavky 1,5 ml s víčky, sušička nebo sterilizátor

U vyzolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/μl a čistotu (na základě poměru absorbcí při 260 nm a 280 nm) přístrojem Nanophotometer (Implen). Koncentrace DNA testovaných vzorků se průměrně pohybovaly v hodnotách kolem 20 ng/μl. Hodnoty optimální čistoty by se měly pohybovat v rozmezí 1,7–1,9, nižší nebo vyšší hodnoty indikují přítomnost dalších látek (proteinů, fenolických látek). Čistota a koncentrace eluátů DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. Vzorky DNA s vyšší koncentrací byly pro PCR reakce naředěny na hodnotu cca 20 ng/μl.

b Postupy PCR amplifikace

Pro ověřování klonové identity třešně ptačí na základě DNA analýz byla zvolena metoda nuclear simple sequence repeats (nSSR) – jaderné mikrosatelity. Z testovaných mikrosatelitových markerů bylo vybráno 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů EMPA014, EMPA015, EMPA018 (CLARKE, TOBUTT 2003), EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12 (VAUGHAN, RUSSELL 2004), UDP97-403 (CIPRIANI et al. 1999), UDP98-410, UDP98-411 a UDP98-412 (TESTOLIN et al. 2000), viz Tab. 1. Pro získání amplifikačních produktů těchto lokusů byly optimalizovány reakční směsi a teplotní cykly polymerázové řetězové reakce (PCR) a vypracovány protokoly. PCR s vybranými lokusy byly sestaveny do tří multiplexů (I, II, III) kromě lokusu UDP98-410, jehož amplifikace musí pro specifické podmínky PCR probíhat odděleně a až fragmentační analýzu na genetickém analyzátoru lze provést společně s amplifikovanými lokusy multiplexu III. Rovněž fragmentační analýzu amplifikačních produktů u multiplexu I a II lze provést zároveň v jednom běhu. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo namražené chladové destičce, DNA polymerázu je nutné stále uchovávat při -20 °C, dáváme ji proto do směsi nakonec přímo z mrazicího boxu.

1. Multiplex I: lokusy EMPA014, EMPA015, EMPA018
2. Multiplex II: lokusy EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12
3. Multiplex III: lokusy UDP97-403, UDP98-411, UDP98-412
4. Lokus UDP98-410 specifická PCR

Tab. 1: Vybrané mikrosatelitové lokusy a sekvence primerů

Lokusy	Sekvence primerů (5´-3´)	Velikost PCR produktů (bp)
EMPA014	F: ATTTGCCTATTGGGTTCTCTG R: TGAATGATCACAGAACATCCAG	212–225
EMPA015	F: TTTTGGTCAATCTGCTGCTG R: CTCTCATCTTCCCCTCCTC	210–248
EMPA018	F: TCCAAGAACAAAGCCAAAATC R: AATTTCAATGCATTCTGGATAG	94–110
EMPaS10	F: GCTAATATCAAATCCCAGCTCTC R: TGAAGAAGTATGGCTTCTGTGG	144–176
EMPaS11	F: ACCACTTTGAGGAACTTGGG R: CTGCCTGGAAGAGCAATAAC	60–100
EMPaS12	F: TGTGCTAATGCCAAAAATACC R: ACATGCATTTCAACCCACTC	122–145
UDP97-403	F: CTGGCTTACAACCTCGCAAGC R: CGTCGACCAACTGAGACTCA	118–140
UDP98-410	F: AATTTACCTATCAGCCTCAAA R: TTTATGCAGTTTACAGACCG	119–133
UDP98-411	F: AAGCCATCCACTCAGCACTC R: CCAAAAACCAAAACCAAAGG	151–165
UDP98-412	F: AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC R: GCTGAAGACGACGATGATGA	111–125

Protokoly PCR:

1. Multiplex I (názvy SSR lokusů, koncentrace jejich primerů a fluorescenční označení forward primerů):

EMPA014 – (forward), 1 μ M, VIC

EMPA014 – (revers), 1 μ M

EMPA015 – (forward), 1 μ M, 6FAM

EMPA015 – (revers), 1 μ M

EMPA018 – (forward), 2 μ M, NED

EMPA018 – (revers), 2 μ M

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace (100 pmol/ μ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μ l, napipetujeme ze zásobních 100 μ M roztoků

primerů: EMPA014 F – 1 μ l, EMPA014 R – 1 μ l, EMPA015 F – 1 μ l, EMPA015 R – 1 μ l, EMPA018 F – 2 μ l, EMPA018 R – 2 μ l a doplníme 80 μ l TE pufru).

Příprava TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA): 10 ml roztoku připravíme z 10 μ l 1M Tris – HCl a 0,2 μ l 0,5M EDTA, doplníme H₂O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich) do 10 ml.

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) s reakční směsí v celkovém objemu 15 μ l na 1 vzorek

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 μ l
50mM MgCl ₂	0,6 μ l
10mM dNTPs (2,5mM each)	0,1 μ l
Primers mix	0,75 μ l
Polymerase Platinum Taq	0,075 μ l
H ₂ O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,975 μ l
Přidat 1 μ l templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 x PCR Buffer minus Mg, 50mM MgCl₂, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou)

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	90 sec	Počáteční denaturace
10 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	10 sec	Denaturace
3.	60 °C – 0,5 °C/ cyklus	45 sec	Annealing Teplotní gradient
4.	72 °C	60 sec	Elongace
25 x opakovat od kroku 5. do kroku 7.			
5.	94 °C	30 sec	Denaturace
6.	55 °C	45 sec	Annealing
7.	72 °C	60 sec	Elongace
1 x			
8.	72 °C	20 min	Finální elongace
9.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

2. Multiplex II (názvy SSR lokusů, koncentrace jejich primerů a fluorescenční označení forward primerů):

EMPaS10 – (forward), 2 μM , NED

EMPaS10 – (revers), 2 μM

EMPaS11 – (forward), 2 μM , 6FAM

EMPaS11 – (revers), 2 μM

EMPaS12 – (forward), 2 μM , VIC

EMPaS12 – (revers), 2 μM

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 μM koncentrace (100 pmol/ μl) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μl , napipetujeme ze zásobních 100 μM roztoků primerů: EMPaS10 F – 2 μl , EMPaS10 R – 2 μl , EMPaS11 F – 2 μl , EMPaS11 R – 2 μl , EMPaS12 F – 2 μl , EMPaS12 R – 2 μl a doplníme 88 μl TE pufru).

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) s reakční směsí v celkovém objemu 15 μl na 1 vzorek

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 μl
50 mM MgCl_2	0,6 μl
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,1 μl
Primers mix	0,75 μl
Polymerase Platinum Taq	0,075 μl
H_2O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,975 μl
Přidat 1 μl templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 \times PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl_2 , jsou dodány výrobcem společně s polymerázou)

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	15 min	Počáteční denaturace
10 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	30 sec	Denaturace
3.	60 °C -1 °C/ cyklus	90 sec	Annealing Teplotní gradient
4.	72 °C	60 sec	Elongace
25 x opakovat od kroku 5. do kroku 7.			
5.	94 °C	30 sec	Denaturace
6.	48 °C	90 sec	Annealing
7.	72 °C	60 sec	Elongace
1 x			
8.	60 °C	30 min	Finální elongace
9.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

3. Multiplex III (názvy SSR lokusů, koncentrace jejich primerů a fluorescenční označení forward primerů):

UDP97-403 - (forward), 4 μM, NED

UDP97-403 - (revers), 4 μM

UDP98-411 - (forward), 4 μM, PET

UDP98-411 - (revers), 4 μM

UDP98-412 - (revers), 2 μM, VIC

UDP98-412 - (forward), 2 μM

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100μM koncentrace (100 pmol/μl) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μl, napipetujeme ze zásobních 100μM roztoků primerů: UDP97-403 F – 4 μl, UDP97-403 R – 4 μl, UDP98-411 F – 4 μl, UDP98-411 R – 4 μl, UDP98-412 F – 2 μl, UDP98-412 R – 2 μl a doplníme 80 μl TE pufru).

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) s reakční směsí v celkovém objemu 15 µl na 1 vzorek

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 µl
50mM MgCl ₂	0,6 µl
10mM dNTPs (2,5mM each)	0,1 µl
Primers mix	0,75 µl
Polymerase Platinum Taq	0,075 µl
H ₂ O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,975 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 × PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl₂, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou)

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	4 min	Počáteční denaturace
30 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	60 °C	45 sec	Annealing
4.	72 °C	30 sec	Elongace
1 x			
5.	72 °C	20 min	Finální elongace
6.	4 °C	úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Lokus UDP98-410

UDP98-410 – (forward), 1 µM, 6FAM

UDP98-410 – (revers), 1 µM

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100µM koncentrace (100 pmol/µl) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme roztok z forward a revers primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 µl, napipetujeme ze zásobních 100µM roztoků primerů: UDP98-410 F – 1 µl, UDP98-410 R – 1 µl a doplníme 98 µl TE pufru).

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) s reakční směsí v celkovém objemu 15 µl na 1 vzorek

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 µl
50 mM MgCl ₂	0,6 µl
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,1 µl
Primers mix	0,75 µl
Polymerase Platinum Taq	0,075 µl
H ₂ O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,975 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 × PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl₂, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou)

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	4 min	Počáteční denaturace
30 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	52 °C	45 sec	Annealing
4.	72 °C	30 sec	Elongace
1 x			
5.	72 °C	20 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, sterilní mikrozkušavky (stripy, destičky PCR 0,2 ml s víčkem), chladicí box na PCR mikrozkušavky, chladicí destička, centrifuga, teplotní cyklovač

c Postupy elektroforézy v agarózovém gelu

Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů se provádí pomocí horizontální elektroforézy na 2% agarózových gelech. Agaróza (Agarose SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) se rozpouští zahříváním v $0,5 \times$ TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k překypění roztoku. K vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se používá fluorescenční barvivo GelRed (GelRedTMNucleic acid Gel Stain, 10,000X in Water, Biotium, Hayward). GelRed se přidává do zahřátého agarózového roztoku v poměru 1 : 10 000. Po ztuhnutí gelu se přilije do vany pro elektroforézu $0,5 \times$ TBE pufr tak, aby přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se nanáší PCR amplifikáty (15 μ l) smíchané s 4 μ l pufru (gel loading buffer, Sigma – Aldrich). Pro možnost zjištění orientačních velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1 μ l standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4 μ l destilované vody a 2 μ l pufru (gel loading buffer).

V elektrickém poli se pohybují záporné fragmenty DNA ke kladné elektrodě, jejich migrační schopnost závisí na jejich relativní hmotnosti (velikosti amplifikátu). Potřebná doba trvání procesu elektroforézy je kolem 30 minut při napětí 40 V a dalších 120–150 minut při napětí 90 V. Po proběhlé elektroforéze se gely dokumentují pod UV zářením pomocí kamerového systému. DNA fragmenty se v gelovém nosiči projevují jako fluoreskující proužky.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrovlnná trouba, vortex, horizontální elektroforéza se zdrojem, dokumentační systém s UV transluminátorem, temnou komorou (Darkroom), snímací kamerou a softwarem pro zobrazení gelů

d Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů

Přesné zjištění velikostí amplifikovaných fragmentů v hodnotách párů bází se provádí na genetickém analyzátoru (např. typu Applied Biosystem 3500). Polymerázová řetězová reakce musí být provedena s fluorescenčně označenými primery (pro uvedený typ analyzátoru na 5' konci s modifikacemi 6FAM, VIC, NED, PET). PCR amplifikáty (většinou postačuje 1 μ l) se nanáší do 96 jamkových destiček pro sekvencátory a před fragmentační analýzou jsou denaturovány. Ke každému vzorku se přidá krátce promíchaná (pomocí vortexu) směs formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystem) o objemu 11 μ l na jeden vzorek a velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ' Size standard v 2.0, Applied Biosystem) – 0,4 μ l na jeden vzorek. Destička se krátce stočí na centrifuze a provede se inkubace 4 minuty při teplotě 94 °C, pak následuje prudké zchlazení na ledu po dobu minimálně dvou minut.

Genetický analyzátor pracuje na principu elektroforetického rozdělení fragmentů DNA v tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Polymer i zkoumaný vzorek je do kapiláry naplňován automaticky. Detekce fragmentovaných úseků je založena na hodnocení fluorescence z fluorescenčně označených primerů po excitaci laserem. Přístroj je schopen souběžně detekovat vícebarevnou fluorescenci, což umožňuje v multiplexovém uspořádání hodnotit najednou více markerů. Hodnocení velikosti alel se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper™ 4.1 (Applied Biosystems), který z výsledku měření velikostního standardu, jenž je přidáván ke každému vzorku, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů.

Z důvodu finančních a časových úspor je výhodné amplifikované lokusy pro fragmentační analýzy seskupit. Pro jejich správnou identifikaci po proběhlé analýze je nutné jejich kombinaci sestavit z hlediska velikosti jejich alel a fluorescenčního zbarvení primerů.

Deset vybraných lokusů lze seskupit pro fragmentační analýzu do 2 běhů. Pro první běh se skupina skládá z PCR produktů multiplexu I a II jednotlivých rostlinných vzorků, kdy se od každého multiplexu napipetuje po 1 μ l, objem směsi formamidu a velikostního standardu se sníží na 10 μ l, aby se pro jamku zachoval celkový objem 12 μ l. V druhém běhu probíhá zároveň fragmentační analýza PCR produktů III. multiplexu a amplifikačního produktu lokusu UDP98-410 pro jednotlivé rostlinné vzorky. Příprava probíhá stejně jako u prvního běhu, do jamek destiček pro analyzátor se pipetuje po 1 μ l multiplexu III a po 1 μ l amplifikačního produktu lokusu UDP98-410, dále se napipetuje po 10 μ l objem směsi formamidu a velikostního standardu.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, vortex, teplotní cyklovač, centrifuga, genetický analyzátor

e Zpracování molekulárních dat

Třešeň ptačí má diploidní sadu chromozomů ($2n = 16$) (HEJNÝ, SLAVÍK 1992). U sledovaného lokusu získáme pro každého jedince dvě stejné hodnoty alel pokud se jedná o homozygota, nebo v případě heterozygota dvě různé hodnoty alel. Pro získání genetických charakteristik se velikosti alel z hodnocených lokusů pro sledované soubory vzorků statisticky zpracovávají, např. za využití statistických programů GenALEX 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007), GENPOP 4.0 (ROUSSET 2008). Pro identifikaci a opravu genotypových chyb v mikrosatelitových datech lze využít software Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004). V případě ověřování klonové identity se porovnávají hodnoty alel sledovaných lokusů u jedinců (ramet) příslušných klonů na základě multilokusové genotypizace (MLG) – vypracovaného přehledu hodnot alel zvolených lokusů pro šetřené klony. Deklarovaná příslušnost jedince ke klonu je ověřená, pokud jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů. Na základě získaných genetických charakteristik lze hodnotit a porovnávat úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, genetické diferenciacce, genetické vzdálenosti, heterozygotnost apod.

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodické postupy u třešně ptačí pro ověřování identity klonů a získání genetických charakteristik pomocí jaderných mikrosatelitových markerů nebyly dosud pro podmínky České republiky popsány. Z důvodu ekonomických i časových úspor při zpracování velkého počtu vzorků byly metodické postupy analýz polymorfních SSR markerů také optimalizovány z hlediska jejich seskupení do multiplexů. Významnost nových postupů v předkládané metodice spočívá ve využití DNA analýz pro objektivní ověřování příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu). V případě semenných sadů dosavadní systém kontroly deklarované identity zdrojů reprodukčního materiálu spočíval pouze v dokumentační evidenci, kdy případný omyl nebylo možné zjistit. Objektivní kontrola klonové identity spočívá v přímé analýze genomů jedinců, s využitím DNA markerů, jejichž složení je zděděné a je nezávislé na podmínkách prostředí. Výstupem těchto analýz je zpracovaná multi-locusová genotypizace (MLG), což představuje databázi velikostí alel hodnocených lokusů ověřovaných klonů. Příslušnost jedince ke klonu je potvrzena, pokud se hodnoty alel shodují u všech analyzovaných lokusů. Pro získání informací o genetické příslušnosti a proměnlivosti bylo potřebné vyhledat DNA markery, které vykazují vysoký polymorfismus. Mezi nejvariabilnější oblasti genomu patří mikrosatelitové lokusy, které se liší v počtu opakování základního motivu. S využitím automatického sekvenátoru získáme vynikající rozlišení alel, například lze zjistit i rozdílnou velikost amplifikačního produktu o jednu repetici motivu (u dinukleotidových motivů jen o 2 báze). Za účelem ověření klonální identity a zjištění genetických charakteristik u třešně ptačí bylo pro DNA analýzy vybráno 10 jaderných mikrosatelitových markerů EMPA014, EMPA015, EMPA018, EMPaS10, EMPaS11, EMPaS12, UDP97-403, UDP98-410, UDP98-411 a UDP98-412, jejichž PCR amplifikace byly optimalizovány i za účelem seskupení jejich analýz do multiplexů. Amplifikace a navazující fragmentační analýzy provedené v multiplexech představují velkou časovou a finanční úsporu. Popsané metodické postupy byly odzkoušeny při ověřování klonové identity u semenného sadu třešně ptačí – CZ-3-3-TR-00152-38-T (dle evidence ERMA2 – ÚHÚL), založeného v lokalitě Čeladná.

IV POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Uplatnění předkládané metodiky spočívá v objektivním ověření příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu). Vypracované metodické postupy ověřování klonové identity na základě DNA analýz s využitím mikrosatelitových markerů se uplatní např. při procesu uznávání semenných sadů dle pravidel Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a také při ověřování klonové správnosti v již dříve založených semenných sadech, klonových archivech apod. Vypracovanou metodiku lze také uplatnit pro získávání podrobnějších poznatků o genetických charakteristikách porostů (populací), jako jsou např. genetická diverzita, heterozygotnost, diferenciacie, genetické vzdálenosti apod. Poznatky o genetické struktuře zdrojů reprodukčního materiálu přinášejí podstatné informace pro management správných postupů při zakládání semenných sadů nebo při zalesňování; např. provedením analýz SSR markerů je možné při zakládání semenných sadů zařadit genotypově vhodné jedince. V populacích třešně ptačí se běžně vyskytují tzv. klonové shluky vznikající vegetativním množením pomocí kořenových výstřelků, tím dochází v populacích ke snížení genetické variability, uplatněním analýz SSR markerů je možné vyřadit klonově shodné jedince při zakládání semenných sadů.

Poznatky o genetické struktuře umožňují předpověď dalšího vývoje populací (porostů). Genetická rozmanitost populací je podstatná pro přežití jejich zástupců a přizpůsobení se změnám životních podmínek na stanovišti. Znalost úrovně genetické diverzity, diferenciacie, heterozygotnosti a ostatních genetických charakteristik porostů, které se využívají nebo plánují využívat jako zdroj reprodukčního materiálu, je významná pro efektivnější využívání stávajících genetických zdrojů, pro zkvalitňování genetické struktury populací a pro zachování biodiverzity. Povinnost zachovávat a reprodukovat genetické zdroje lesních dřevin vyplývá mimo jiné z mezinárodních závazků ČR, přijetí Úmluvy o biologické rozmanitosti dne 5. června 1992 v Rio de Janeiru a naplnění závěrů ministerských konferencí o ochraně lesů Forest Europe (Štrasburk 1990, Helsinky 1993, Lisabon 1998, Vídeň 2003, Varšava 2007, Oslo 2011 a Madrid 2015). Ochrana biologické rozmanitosti představuje také naplnění cílů aktualizované Státní politiky životního prostředí České republiky 2012–2020 schválené usnesením vlády č. 6 ze dne 9. ledna 2013 a Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky schválené usnesením vlády ČR č. 193 ze dne 9. března 2016. Znalosti o genetických charakteristikách by bylo účelné uplatňovat také z důvodu převažující umělé obnovy lesa, kdy je zajištění kvality zdrojů

reprodukčního materiálu lesních dřevin základním předpokladem pro budoucí výnos, adaptační schopnosti a ekologickou stabilitu lesa. Předložené metodické postupy nacházejí také uplatnění v rámci uznávání zdrojů reprodukčního materiálu a jejich zařazování do Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin včetně zařazování vzorků z těchto zdrojů do Národní banky osiva a explantátů lesních dřevin, kdy především na základě míry genetické diverzity lze rozhodnout, které populace, porosty, rodiče rodiny (v případě třešně ptačí) zařadit jako cenné zdroje. Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat. Vybrané lokusy prokázaly dostatečný polymorfismus pro zjištění genetických rozdílů mezi klony. V příloze (Tab. 3 a Tab. 4) jsou uvedeny příklady výstupů genetického šetření u semenného sadu třešně ptačí – CZ-3-3-TR-00152-38-T (dle evidence ERMA2 – ÚHÚL), založeného v lokalitě Čeladná. Reprodukovatelnost této metody potvrzují shodné výsledky při opakovaných analýzách sledovaných lokusů a zkušenosti i jiných laboratoří, např. ASP – Bavarian Office for Forest Seedling and Planting Teisendorf, Institute of Biosciences and Bioresources – National Research Council of Italy, BFW Department of Genetics molecular laboratory Vídeň při využití metody analýzy mikrosatelitů. Možnosti uplatnění těchto postupů v dalších laboratořích může komplikovat finanční náročnost přístrojového vybavení pro fragmentační analýzy, zejména genetického analyzátoru. Fragmentační analýzy si však lze objednat na zakázku u komerčních firem (např. SEQme, Genomac, Amplicon).

Genetické ověření deklarovaného původu reprodukčního materiálu u semenného sadu pomocí 10 vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů umožňuje potvrdit nebo vyvrátit klonovou identitu ramet. Pro každý deklarovaný klon musí být analyzován soubor lokusů a odečteny hodnoty alel k jednotlivým lokusům. Kontrola příslušnosti spočívá v provedení analýz sledovaných vzorků stejným postupem a porovnání velikosti alel. V tabulce 2 je ukázka zpracované multilokusové genotypizace (MLG) pro 5 jedinců od klonů 217 a 239 ze semenného sadu třešně ptačí – CZ-3-3-TR-00152-38-T, přičemž klonovou identitu prokazuje klon 239. Jedinci deklarovaní ke klonu 217 nevykazují klonovou identitu (rameta TR_SS_217_3 má ve stejných lokusech odlišné velikosti alel).

Tab. 2: Ukázka zpracované multilokusové genotypizace (MLG)

Ramety	Lokusy						
	EMPA014	EMPA015	EMPaS10	EMPaS11	UDP97-403	UDP98-410	UDP98-411
TR_SS_217_1	221/223	220/220	156/156	60/72	118/118	133/133	163/165
TR_SS_217_2	221/223	220/220	156/156	60/72	118/118	133/133	163/165
TR_SS_217_3	225/225	224/224	156/164	72/72	122/122	119/127	151/163
TR_SS_217_4	221/223	220/220	156/156	60/72	118/118	133/133	163/165
TR_SS_217_5	221/223	220/220	156/156	60/72	118/118	133/133	163/165
TR_SS_239_1	225/225	222/222	164/164	60/72	118/118	125/133	151/159
TR_SS_239_2	225/225	222/222	164/164	60/72	118/118	125/133	151/159
TR_SS_239_3	225/225	222/222	164/164	60/72	118/118	125/133	151/159
TR_SS_239_4	225/225	222/222	164/164	60/72	118/118	125/133	151/159
TR_SS_239_5	225/225	222/222	164/164	60/72	118/118	125/133	151/159

Metodické postupy ověřování identity klonů/ortetů pro semenné sady (popř. klonové archivy) a zjišťování genetických charakteristik třešně ptačí budou sloužit pro potřeby státní správy v oblasti lesního a vodního hospodářství (MZe, MŽP) a koordinátora Národního programu (ÚHÚL), přičemž se předpokládá jejich promítnutí do legislativních předpisů a dotační politiky ČR.

V EKONOMICKÉ ASPEKTY

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů vedoucích k poznatkům o genetické kvalitě je přínos celospolečenský. Současně dochází i k naplňování cílů Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin – podporovat kvalitní genetické zdroje a ověřovat jejich identitu metodou DNA markerů. Reprodukce genově bohatších populací zaručuje získání stabilnějších a odolnějších porostů, které budou zvyšovat biologickou rozmanitost, lépe se přizpůsobovat možným změnám klimatu, a tím přispívat k ochraně životního prostředí. Vedle celospolečenských přínosů se dá reálně předpokládat i zvýšení těžby dřeva u vlastníků lesů a z toho plynoucí budoucí zvýšené výnosy z porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu.

Třešeň ptačí lze pěstovat ve smíšených porostech jako jednotlivě nebo hloučkově vtroušenou dřevinu, nebo jako dřevinu hlavní (tvorba porostních směsí). Třešeň je rovněž vhodnou dřevinou pro plantážní způsob pěstění, do středních lesů a dvoumýtných porostů. Kvalitní kmeny poskytují vysoce ceněné výřezy. Problematická je dosud pravidelná a větší produkce. Třešeň má také ceněné mimoprodukční funkce – meliorační, estetickou, plodonosnou, pro včely, krajnotvornou, je vhodná pro zalesňování zemědělských půd a do rekultivací. Hodnotíme-li zastoupení třešně v současných porostech ČR, jde o dřevinu vtroušenou, málo kvalitní. Cílem pěstování je, aby se stala kvalitní dřevinou hlavní a ve věku cca 50 až 60 let se vypěstoval strom o výšce až 30 m (1/3 kvalitní bezsuký kmen bez větví, 2/3 koruna) o výčetní tloušťce min. cca 50 cm. Ve středním lese lze ve věku 80 let dosáhnout produkci třešně až $70 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ (MAUER, HOUŠKOVÁ 2016).

V našich podmínkách má třešeň z hlediska hospodářského uplatnění značný ekonomický potenciál do budoucna, neboť dřevo tohoto druhu svými vlastnostmi může například v nábytkářském průmyslu částečně nahradit import dřeva a dřevařských výrobků tropických druhů dřevin do EU, které podléhají režimu licencí FLEGT, jež vydala Evropská komise v roce 2003 k boji proti nezákonné těžbě v lesích rozvojových zemí světa.

Třešeň může v našich podmínkách rovněž sehrát významnou roli při zavádění agrolesnických systémů (např. pěstování dřevin na zemědělské půdě spolu s efekty, které přináší pro sociální stránku systému).

Lepší genetická produkční báze třešně zvyšuje kvantitativní těžební potenciál a přispívá tím ke zvýšení ekonomické životaschopnosti a konkurenceschopnosti trvale udržitelného obhospodařování lesů, což je jeden z cílů Národního lesnického programu II (2012).

Při reprodukci porostů třešně z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že v době mýtní zralosti těchto porostů bude dosaženo vyšší kvantitativní (objemové) produkce, ať již bude třešeň pěstována:

- a plantážním způsobem,
- b ve středním lese,
- c ve dvoumýtných porostech.

Rozdíl porostních zásob vztažených k obmýtí u porostů třešně, které se nacházejí v současných genových základnách (GZ), oproti ostatním porostům na území ČR, lze prokázat výsledky analýzy celostátních informací v datovém skladu. V závislosti na rostoucím věku těchto porostů činí v rozmezí 100–130 let nárůst objemové produkce cca 22–45 m³.ha⁻¹. Zjištěné výsledky vykazují tedy lepší produkční bázi v genových základnách, přestože je v podmínkách ČR počet těchto GZ zatím nedostatečný a získaná data se týkají pouze starších porostů nad 100 let, které v tomto věku již překračují technickou zralost dřeviny. GZ třešně oproti ostatním porostům třešně také prokazují zlepšení bonity o 2–3 stupně (pozn.: obdobně byla zvýšena bonita porostů v GZ zjištěna u analogicky provedených šetření u dřeviny smrk, jedle, buk, borovice a dub), což bezprostředně souvisí s vyšší objemovou produkcí.

Za účelem zvýšení objektivnosti ekonomických propočtů bylo provedeno srovnání modelové produkce podle našich a zahraničních růstových tabulek. Nedostatečné znalosti o průběhu růstu třešně a nevhodnost používání růstových tabulek buku také pro třešeň způsobilo, že byly v Německu zpracovány růstové tabulky samostatně pro dřevinu třešeň (Röss 1994). Tyto růstové tabulky byly využity i pro následnou modelovou ekonomickou kalkulaci.

Produkčním cílem pěstování třešně jsou jednotlivé stromy s co možná největší hmotností se zdravým, rovným a bezsukým kmenem pro dýhárenské a nábytkářské sortimenty. Technická zralost třešně je většinou uváděna v cca 50–80 letech a těžba se předpokládá ve věku kolem 60 let po dosažení cílové hmotnosti přesahující 2 m³. Jelikož je cílem vypěstovat kmen určitých tloušťkových dimenzí, často se nerealizuje těžba plošná, ale spíše jednotlivá těžba podle cílových tloušťek.

Modelová ekonomická kalkulace očekávaných přínosů pěstování třešně z kvalitnějšího reprodukčního materiálu, vztažená k mýtnímu věku 60 let a k produkčnímu rozdílu vzniklému změnou bonity o 1 stupeň, využívá produkční ukazatele z růstových tabulek třešně (Röss 1994). Poněvadž jsou tyto německé růstové tabulky konstruovány pro 3 bonity, tak je modelová kalkulace založena na rozdílu porostní zásoby hlavního porostu průměrné a lepší bonity (pozn.: bonita je vyjádřena horní výškou porostu), jak vyplývá z následující tabulky:

Věk	Bonita s horní výškou 26 m (I.0 tř.)		Bonita s horní výškou 23 m (II.0 tř.)	
	Počet stromů ks.ha ⁻¹	Objem m ³	Počet stromů ks.ha ⁻¹	Objem m ³
60	135	287	180	252
Rozdíl v objemu: 35 m ³				

V modelové kalkulaci se neuvažuje s vyššími náklady na kvalitnější reprodukční materiál, ani s těžebními náklady či náklady na vyvětňování (pozn.: pro pěstování dlouhého kmene třešně bez suků je rozhodující/nejúčinnější umělé vyvětňování, jehož cílem je vytvořit minimálně 5–9 m dlouhý rovný kmen bez suků). Zde vypočtený ekonomický efekt v Kč/ha představuje tzv. hrubý výnos vlastníka (tržby z prodeje dřeva bez odpočtu nákladů), který získá vlastník v důsledku tržní realizace většího objemu cenných výřezů třešně.

Jelikož nejsou k dispozici žádné informace o sortimentní struktuře mýtních porostů třešně (pozn.: není známa ani kvalita těchto porostů), tak vzhledem ke skutečnosti, že se třešeň pěstuje především za účelem produkce cenných výřezů, po nichž je na trhu dlouhodobě značná poptávka, tak do další kalkulace vstupuje odhadem pouze 50 % těchto cenných výřezů ze zvýšeného objemu produkce 35 m³, tj. pouze 17 m³. Ostatní hmota bude mít jiné využití.

Obchodované objemy cenných výřezů třešně v současnosti v ČR jsou zatím nepatrné a příslušné informace rovněž nejsou k dispozici (pozn.: o domácím obchodu s cennými výřezy třešně na volném trhu neexistuje žádná cenová statistika, neboť ve státním ani v resortním statistickém výkaznictví se třešeň samostatně nesleduje). Pro kalkulaci ekonomického přínosu třešně z použití kvalitního genetického zdroje, tj. ze zvýšeného objemu obchodovatelného dříví, je tedy nezbytné vycházet především ze zkušeností a údajů publikovaných v zahraničí.

Jako náhradní řešení k získání tržních cen cenných výřezů třešně byly použity informace ze submisí (pozn.: určitý druh aukcí) v Německu, z nichž jsou příslušné informace zveřejňovány na internetu nebo v odborných lesnických časopisech. Z analýzy těchto údajů vyplývá, že se ceny výřezů třešně (společně s dalšími cennými listnáči jako je např. dub, jilm, javor aj.), dosažené při submisích v Bavorsku, v závislosti na kvalitě nacházely v uplynulém období na vzestupném cenovém trendu. Ze zprávy za soukromé, obecní a státní lesy v Oberfranken o výsledcích prodeje cenných výřezů formou submisí vyplývá, že průměrná cena u cenných listnatých výřezů v roce 2015 byla cca 288 €.m⁻³, přičemž u třešně činila 312 €.m⁻³ (pozn.: nejvyšší nabídka u třešně činila 509 €.m⁻³).

Českou národní bankou vyhlášený kurz české koruny ke dni 18. 10. 2017 byl stanoven takto: 1 € = 25,705 CZK.

Výsledná kalkulace hrubého ekonomického přínosu z vyššího objemu cenných výřezů třešně: objem výřezů 17 m³, průměrná cena 312 €·m⁻³, kurz 25,705 CZK = 136 339 Kč/ha.

Je nutno rovněž připomenout, že provedená kalkulace se zabývá pouze oceněním změny v kvantitativních parametrech (v objemu). Jen z důvodu současné neznalosti řady dalších ekonomických veličin nejsou do výpočtů zařazeny také dodatečné ekonomické efekty vyplývající z lepších kvalitativních parametrů porostů, které by se mohly projevit např. v lepší sortimentaci těžebního fondu a v následném vyšším zpeněžení cenných výřezů surového dříví na trhu.

Kalkulace hrubého ekonomického přínosu (tzv. „genetického zisku“) byla založena na následujících informačních zdrojích:

- Akční plán EU pro vymahatelnost práva, správu a obchod v lesnictví (*Forest Law Enforcement, Governance nad Trade – FLEGT*) vydaný Evropskou komisí v roce 2003 a nařízení Rady (ES) č. 2173/2005 o zavedení režimu licencí FLEGT pro dovoz dřeva do Evropské unie
- Analýza datového skladu ÚHÚL – DS ERMA (Pařízková, Hradec Králové, 2017)
- ČERNÝ, M., PAŘEZ, J. MALÍK, Z: Růstové a taxační tabulky hlavních dřevin České republiky (smrk, borovice, buk, dub), IFER, 1996
- Laubwertholzsubmission Pretzfeld 2015, Forstwirtschaftliche Vereinigung Oberfranken
- MAUER, O., HOUŠKOVÁ, K.: Zakládání a výchova třešně ptačí. In: Třešeň ptačí – dřevina roku 2016. Česká lesnická společnost, 2016
- STEJSKAL, J., DOVRTĚL, J.: Pěstování třešně ptačí na lesním závodě Židlochovice. In: Třešeň ptačí – dřevina roku 2016. Česká lesnická společnost, 2016
- Röss, M.: Ertragstafel für Wildkirche (*Prunus avium L.*) in Nordwest-Deutschland. Allgemeine Forst- und Jagdzeitung, ročník 165, 1994, str. 13–18

Náklady na postupy genetických analýz uvedených v metodice jsou kalkulovány na spotřební materiál a chemikálie s předpokladem přístrojového laboratorního vybavení pro analýzy DNA. Na izolaci DNA vzorku z jednoho stromu jsou průměrné náklady 106,- Kč. Náklady u jednoho vzorku (stromu) na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 10 lokusů 154,- Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. V předložené kalkulaci našich nákladů (výzkumné pracoviště) nejsou zahrnuty doplňkové náklady, náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace vybavenosti (materiální i personální)

pracoviště. Při využití služeb komerčních laboratoří jsme při průzkumu na tuzemském trhu zjistili výhodné cenové nabídky od firmy SEQme. Předpokládaná cena na analýzu jednoho vzorku je 242,- Kč včetně DPH a zahrnuje PCR amplifikaci a fragmentační analýzu jednoho multiplexu. Tato cena je kalkulována při vlastním dodání vysoce kvalitní DNA a vypracovaných metodických postupů (nebude nutno dopracovávat jakékoliv optimalizace PCR). Na postupy optimalizace PCR komerční firmy nevedou ceníky, např. firma SEQme si tyto práce účtuje hodinovou sazbou, a to 1 500,- Kč bez DPH/hod. Fragmentační analýza při dodání vlastních PCR amplifikátů v destičce vychází na 72,- Kč pro jeden vzorek (z 1 stromu 1 multiplex).

VI DEDIKACE

Metodika je výsledkem řešení poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0117 (č. j. 6779/2017-MZE-14151.) z 40 % a výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV č. QJ1330240 z 60 %.

Podíl práce autorů na vypracované metodice:

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D. podíl 30 %, Ing. Helena Cvrčková, Ph.D. podíl 30 %, Ing. Olga Trčková podíl 30 %, Ing. Eva Žižková, Ph.D. podíl 10 %.

VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- 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.
- ĎURKOVIČ J. 2006. Rapid micropropagation of mature wild cherry. *Biologia Plantarum*, 50 (4): 733–736.
- 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.
- HEJNÝ, S., SLAVÍK, B. (eds.) 1992. Květena České republiky 3. Praha, Academia: 542 s.
- CHRISTIAKOV D.A., HELLEMANS B., VOLCKAERT F.A.M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1–29.
- 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.
- 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.
- 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.
- OLIVEIRA E.J., PÁDUA J.G., ZUCCHI M.I., VENCovsky R., VIEIRA M.L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294–307.
- 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.
- PFEIFFER A.M., OLIVIERY A.M., MORGANTE M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40: 411–419.
- ROUSSET F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- RUSSELL K. 2003. EUFORGEN Technical Quidelines for genetic conservation and use for wild cherry (*Prunus avium*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy: 6 s.

- SCHMIDT T., HESLOP-HARRISON J.S. 1996. The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (16): 8761–8765.
- 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.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.
- 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.
- 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.

VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J.: Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého (Evaluation of Norway spruce seed orchard using microsatellite markers). Zprávy lesnického výzkumu, 59, 2014 (4): 243–249.

(Dedikace: institucionální podpora č. RO0114 (č.j. 8653/2014- MZE-17011) a výzkumný projekt NAZV č. QJ 1330240)

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P.: Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. Lesnický průvodce, 2015, 8: 36 s.

(Dedikace: institucionální podpora č. RO0115 (č.j. 5774/2015-MZE-17011), výzkumný projekt NAZV č. QJ 1230334, výzkumný projekt NAZV č. QJ 1330240)

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P.: Genetická charakterizace jedle bělokoré pomocí mikrosatelitových markerů. Lesnický průvodce, 2016, 5: 34 s.

(Dedikace: institucionální podpora č. RO0116 (č.j. 10462/2016-MZE-17011), výzkumný projekt NAZV č. QJ 1230334, výzkumný projekt NAZV č. QJ 1330240)

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O.: Hodnocení genetických charakteristik u borovice lesní s využitím mikrosatelitových markerů. Lesnický průvodce, 2017, 4: 43 s.

(Dedikace: institucionální podpora č. RO0117 (č.j. 6779/2017-MZE-14151), výzkumný projekt NAZV č. QJ1330240, výzkumný projekt NAZV č. QJ 1230334)

MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., POKORNÁ E., TRČKOVÁ O.: Hodnocení semenného sadu třešně ptačí s využitím mikrosatelitových markerů. Zprávy lesnického výzkumu 62 (4): 271–278.

(Dedikace: institucionální podpora č. RO0117 (č.j. 6779/2017-MZE-14151), výzkumný projekt NAZV č. QJ1330240)

USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR CLONAL IDENTITY VERIFICATION IN WILD CHERRY

Summary

This methodology presents the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for clonal identification and genetic characterization of *Prunus avium* (L.). Wild cherry is an interspersed species in forest stands, occurs throughout Europe, with the exception of the most southern regions (HEJNÝ, SLAVÍK 1992). This species belongs to fast-growing trees, it is highly valued for wood quality and for a short rotation period of 55–70 years (ĎURKOVIČ 2006). Wood is remarkable for strength and decorative red-brown painting. It is used in carving, carpentry, in the production of various tools and in the processing of veneers. For these reasons, forestry is considering expanding this species (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Wild cherry populations usually have a relatively small number of individuals, so the most effective conservation strategies of gene sources are seed orchards and clone banks (RUSSELL 2003). To acquire more detailed knowledge of the genetic quality of wild cherry sources and to verify the clonal identity by an objective method, it is possible to use DNA analyses with nuclear microsatellite markers. Nuclear microsatellites are highly polymorphic, selectively neutral and codominant markers that enable to differentiate homozygotes from heterozygotes. Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSR), are small repetitive DNA sequences that are highly variable markers and commonly used in population genetic studies for gene flow analyses, parentage analyses, studies of genetic diversity, gene mapping and for individual identification (PFEIFFER et al. 1997; CHRISTIAKOV et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2006). Microsatellite markers were used for clonal identification of cherry trees (WÜNSCH, HORMAZA 2002; SCHUELER et al. 2003; LACIS et al. 2009; JARNI et al. 2012; FERNANDEZ-CRUZ et al. 2014; FASAD, ESNA-ASHARI 2016; NAJAFZADEH et al. 2016) and for genetic evaluating of wild cherry populations (CLARKE, TOBUTT 2003; VAUGHAN, RUSSELL 2004; SCHUELER et al. 2003; CIPRIANI et al. 1999; TESTOLIN et al. 2000). This methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products and calculations of molecular data. Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) from buds (100 mg fresh or 20 mg lyophilized). The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR was optimized with the tested primers, whose oligonucleotide sequences had been published by CIPRIANI et al.

(1999), TESTOLIN et al. (2000), CLARKE, TOBUTT (2003), VAUGHAN, RUSSELL (2004). The selected seed orchard of wild cherry was used to develop this methodology. Clear, reproducible PCR products were produced for all ten microsatellite loci, so they proved suitable for finding genetic parameters and verifying the clonal identity.

Příloha

Příklady výstupů hodnocení klonové identity a genetických parametrů mikrosatelitových markerů u vybraného semenného sadu třešně ptačí

Tab. 3: Multiplikusové genotypy (MLG) zkoumaných ortetů

Ortet/ ortet.	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

Tab. 4: Parametry genetické diverzity pro použitých 10 mikrosatelitových markerů

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

Ho = Heterozygnost pozorovaná

He = Heterozygotnost očekávaná

PIC = Polymorfni informační obsah

HW – Signifikantnost odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy

(ns = není signifikantní, *** = signifikantní na 0,1% úrovni)

F(null) – Ohodnocená frekvence nulových alel dle van Oosterhouta



Výzkumný ústav
lesního hospodářství
a myslivosti, v. v. i.

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 10/2017