

METODICKÝ POSTUP URČENÍ GENOTYPŮ DUBŮ S VYUŽITÍM JADERNÝCH MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

LESNICKÝ PRŮVODCE



**Ing. EVA POKORNÁ, Ph.D.
a kol.**

**Certifikované
METODIKY
PRO PRAXI**

6/2019

Metodický postup určení genotypů dubů s využitím jaderných mikrosatelitových markerů

Certifikovaná metodika

Ing. Eva Pokorná, Ph.D.

Mgr. Martina Komárková

Ing. Martin Fulín, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Lesnický průvodce 6/2019

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 978-80-7417-195-6

ISSN 0862-7657

METHODOLOGICAL PROCEDURE FOR DETERMINATION OF OAK GENOTYPES USING NUCLEAR MICROSATELLITE MARKERS

Abstract

This method is focused on genotypes determination in oak trees, *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. collected in the Czech Republic at localities with variable habitat conditions. The potential selective effects of diverse environments on genetic structure as well as genetic variability in oak species was determined based on nuclear Simple Sequence Repeats (nSSRs) method. In total, 11 highly polymorphic nuclear microsatellite markers were applied in selected oak individuals. Before the evaluation of genetic traits, several proceedings including a) isolation of DNA from collected plant materials, b) application of SSR markers based on their previous testing and optimalization for PCR conditions, c) running PCR reactions followed by d) DNA denaturation and fragmentation analysis and data analysis using the statistical program GenAlEx 6.503 had to be done. In addition, discrimination of oak genotypes using nSSR markers resulted in selection of valuable oak individuals to preserve them and support a biodiversity in the forest ecosystems. Therefore, vegetative reproduction of targeted oak individuals via *in vitro* clonal propagation was established and briefly summarized in this methodology as well.

Key words: oak (*Quercus spp.*); DNA isolation; genotype; SSR markers; plant tissue cultures

Oponenti: Ing. Karel Müller, Ph.D., Ústav experimentální botaniky
AV ČR, v. v. i., Laboratoř hormonálních regulací u rostlin
Ing. Vlasta Knorová, Ministerstvo zemědělství,
Oddělení ochrany lesa

Adresy autorů:

Ing. Eva Pokorná, Ph.D.

Mgr. Martina Komárková

Ing. Martin Fulín, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

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

Strnady 136

Jíloviště 252 02

email: pokorna@vulhm.cz

komarkova@vulhm.cz

fulin@vulhm.cz

machova@vulhm.cz

cvrckova@vulhm.cz

Obsah

1 ÚVOD	7
2 CÍL METODIKY	9
3 VLASTNÍ POPIS METODIKY	10
a) Princip metody	10
b) Materiální a technické zabezpečení pro stanovení genotypů dubů	11
c) Materiální a technické zabezpečení pro založení explantátových kultur dubů	19
d) Zakládání primárních kultur, mikropropagace a multiplikace dubu zimního a letního	20
4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	23
5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	24
6 EKONOMICKÉ ASPEKTY	25
7 DEDIKACE	27
8 PODĚKOVÁNÍ	27
8 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	28
9 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	30
SUMMARY	31

1 ÚVOD

Duby (*Quercus* L.) patří k našim hospodářsky i ekologicky nejvýznamnějším porostotvorným lesním dřevinám. Jsou vůdčími dřevinami prvních dvou lesních vegetačních stupňů, ačkoliv se na příhodných stanovištích vyskytují i daleko výše (BURJÁNEK et al. 2013). Podíl listnatých dřevin (zejména buku a dubu) v České republice ve srovnání s jehličnatými dřevinami trvale narůstá. Zastoupení dubů představuje již 7,3 % porostní plochy (Zpráva o stavu lesa 2018, MZe). Hlavní význam pěstování dubů je v mnohostranném použití tvrdého, pevného a velmi trvanlivého dřeva např. při výrobě dýh, v lodním stavitelství, jako stavební dříví, k výrobě pražců, parket, sudů a nábytku (ÚRADNÍČEK et al. 2009).

Dub letní (*Quercus robur* L.) je teplomilná a světlomilná dřevina s vyššími nároky na světlo než má dub zimní (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.). Rozšíření dubu letního souvisí s požadavky na vláhu, podle kterých rozlišujeme dva ekotypy. Běžně rozšířený ekotyp nalezneme v lužních lesích, kde snáší i jarní záplavy ve srovnání s druhým ekotypem, který roste na mělkých i silně vysýchavých půdách v lesostepních lokalitách. Dub letní je náročný na půdní stanoviště, roste nejlépe na minerálně bohatých, hlubokých, hlinitých půdách, jaké nacházíme v lužních lesích nebo na spraších. Na minerální živiny je náročnější než dub zimní. Na našem území má přirozené rozšíření převážně pásovitého charakteru, daný průběhem toků řek. Mezi častá místa výskytu dubu letního patří například Polabí a Poohří, úvaly Hornomoravský, Dolnomoravský a Dyjskosvratecký, Třeboňská pánev a dále pak většina nižších poloh. Pro svou toleranci k imisím se mu daří i v podmínkách velkých měst.

Dub zimní roste v podmínkách značného nedostatku vláhy a vydrží i na vysýchavých stanovištích. Roste i na výrazně sušších lesostepních stanovištích, na spraších nebo na skalnatých podkladech. Z důvodu vysoké citlivosti na kolísání hladiny spodní vody a její vystoupání nad půdní povrch se dub zimní téměř vůbec nevyskytuje v záplavových oblastech. Nároky na půdu jsou skrovné, roste na chudých kyselých a bazických horninách, mělkých půdách nebo šterkových terasách. Vzrůst závisí spíše na množství přístupné vody než na živnosti půdy. V ČR se dub zimní vyskytuje ve všech teplejších pahorkatinách s hlavním zastoupením na jižní Moravě, dále zasahuje do Českomoravské a Dražanské vysočiny, do okolí povodí Berounky, dolního Povltaví, Polabí a Poohří. Je rovněž zastoupen v nižší části Oderských a Vsetínských vrchů včetně Beskyd (UHLÍŘOVÁ, KAPITOLA 2004; ÚRADNÍČEK et al. 2009).

Se stanovištními podmínkami a působením klimatických změn úzce souvisí i adaptace druhů na měnící se prostředí. Působení těchto faktorů ve vztahu ke

genetickým vlastnostem jedinců je v současné době věnováno mnoho pozornosti, avšak volba vhodné metody k charakterizaci genotypů je zcela zásadní. Například ve své práci PINA-MARTINS et al. (2018) porovnávali evoluční vztah genotypů dubu korkového (*Quercus suber* L.) v rámci rozsáhlého geografického šetření a jejich adaptaci na podmínky prostředí pomocí metody sekvenování jedno-nukleotidových polymorfismů (SNPs metoda). Navzdory velkým geografickým vzdálenostem u analyzovaných vzorků byla s využitím SNPs zjištěna nízká genetická diverzita ve srovnání s jiným metodickým postupem.

Genetické vlastnosti dubů je možné vyhodnotit podle již dříve ověřených postupů, kterými jsou např. stanovení polymorfismu na základě: 1) délky restričních fragmentů, tzv. RFLP metoda (BURG et al. 1993), 2) amplifikace mikrosatelitních oblastí s výskytem krátkých opakujících se motivů, tzv. SSR metoda (DZIALUK et al. 2005), 3) jedno-nukleotidových polymorfismů, tzv. SNPs metoda (HIPPEL et al. 2019) nebo 4) sekvenování nové generace, tzv. NGS metoda (LEROY et al. 2017). V porovnání s předchozími metodami jsou jaderné mikrosatelitové markery (nSSR markery) používány již 20 let, nejčastěji při genotypizaci rostlin. Hlavními výhodami použití nSSR markerů je vysoká informovanost, kodominantnost, využití více alelových genetických markerů, vysoká reprodukovatelnost a genotypování i jiných příbuzných rostlinných druhů (VIEIRA et al. 2016).

V lesním hospodářství mají biotechnologické metody zaměřené na výzkum genetických vlastností a určení genotypů dubů značný význam nejen z hlediska charakterizace jedinců a populací dubů, ale např. i pro podpoření biodiverzity v lesních ekosystémech a uchování cenných genotypů. Možným způsobem zachrany vybraných jedinců dubů je využití vegetativní reprodukce metodou *in vitro* organogeneze. Postup založení explantátových kultur včetně specifikace živného média pro multiplikaci dubů je proto nezbytnou součástí uvedené metodiky.

2 CÍL METODIKY

Záměrem metodiky je popsání postupu použití biotechnologických metod pro stanovení genetických vlastností dubů (letního a zimního) a jejich vegetativní množení v *in vitro* podmínkách. Uvedená metodika obsahuje standardizované postupy využití analýz jaderných mikrosatelitových markerů pro zjištění zastoupení jednotlivých genotypů dubů z vybraných lokalit v ČR. Získané poznatky kultivace dubů formou explantátových kultur lze uplatnit i pro práci s ohroženými a cennými druhy dubů.

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

a) Princip metody

Výchozí matricí pro určení genetických vlastností a zastoupení genotypů u vybraných jedinců dubů letního a zimního je deoxyribonukleová kyselina (DNA) získaná v laboratorních podmínkách izolací z odebraných vzorků. Na základě dostupné literatury byly testovány a následně vybrány jaderné mikrosatelitové markery (nSSR markery) vykazující vysokou variabilitu ve velikostech PCR produktů u testovaných vzorků. Pro stanovení genetických charakteristik dubů byly použity fluorescenčně značené nSSR primery uspořádané do dvou multiplexů. Fragmentační analýza mikrosatelitových lokusů probíhala na genetickém analyzátoru, na kterém byly naměřené hodnoty velikosti alel rovněž zpracovány pro finální zhodnocení.

Vegetativní reprodukce dubů (*Quercus spp.*) metodou *in vitro* organogeneze je významná z hlediska uchování geneticky identického materiálu a např. pro záchranu ohrožených a cenných jedinců je zcela nepostradatelná. Princip metody spočívá v založení primárních kultur z dormantních pupenů vybraných donorových jedinců dubů, které jsou po povrchové sterilizaci přeneseny do aseptických podmínek na agarová živná média, na nichž je cíleně stimulována organogeneze, zejména tvorba výhonů. Při dostatečném nárůstu nadzemní části rostlin jsou explantátové kultury pasážovány a multiplikovány v pravidelných intervalech. Vypěstované mikrořízky mohou být dále stimulovány k zakořenění, aklimatizovány v semi-sterilních podmínkách a dopěstovány ve skleníku pro získání výsadby schopných sazenic.

V souhrnu metodika popisuje postup charakterizace genotypů dubů na základě použití nSSR markerů navržených pro detekci mikrosatelitových lokusů u DNA získané z odebraného rostlinného materiálu a postup založení explantátových kultur dubů.

b) Materiální a technické zabezpečení pro stanovení genotypů dubů

Přístrojové vybavení a drobné pomůcky:

analytické váhy, digitální suchá lázeň na mikroskopické vlny, vortex, centrifuga, chladič blok na mikroskopické vlny, chladnička, mrazicí box, lyofilizátor, sada pipet se semi-sterilními špičkami, sterilní mikroskopické vlny, stojánky na mikroskopické vlny, mikrovlnná trouba, horizontální elektroforéza se zdrojem napětí, dokumentační systém s UV transiluminátorem, temnou komorou, snímací kamerou a softwarem pro vizualizaci gelů, horkovzdušný sterilizátor, přístroj na měření čistoty a kvality DNA (např. Nanophotometer, Implem), přístroj pro PCR reakce (např. Veriti Thermo cycler, Applied Biosystem), genetický analyzátor (např. Applied Biosystem 3500), destičky na PCR s 96 pozicemi

Chemikálie:

DNA Plant Mini kit (QIAGEN), ultra-čistá voda (Sigma-Aldrich s. r. o.), destilovaná voda, agaróza (Agarose SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg), EDTA pufr (Duchefa Biochemie B. V.), 0,5 M TBE pufr (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B. V.), Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen by Life Technologies), TE pufr (1 mM Tris HCl a 0,01 mM EDTA, pH 8,0), GelRed™ Nucleic acid Gel Stain (Biotium, Hayward), Loading dye (Sigma-Oldrich), DNA ladder (New England Biolabs), nSSR primery („forward“ a „reverse“ primery, viz Tabulka 1).

Reagencie na fragmentační analýzu: fluorescenčně značené nSSR primery na 5' konci s modifikacemi 6FAM, VIC, NED a PET, Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystem), Gene Scan™ - 600LIZ Lize Size Standard v 2,0 (Applied Biosystem)

Rostlinný materiál:

dormantní pupeny nebo mladé listy dubu zimního (*Quercus robur* L.) a dubu letního (*Q. petraea* (Matt.) Liebl)

Odběr vzorků, izolace DNA, amplifikace lokusů pomocí nSSR markerů

Odběr vzorků vybraných jedinců dubu letního a zimního je prováděn v jarních měsících, vzorky jsou po odběru neprodleně uloženy do chladových tašek. Po převezení do laboratoře se vzorky krátkodobě uloží do chladničky. Následně probíhá lyofilizace vzorků, jejich homogenizace ve třecí misce a získání rostlinný materiál

v množství 20 mg je odvážen do řádně označených mikrozkušavek. Z rostlinných vzorků byla izolována DNA za použití protokolu uvedeného výrobcem a přiloženého u komerčně dostupného izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit.

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

Maximální množství výchozího čerstvého rostlinného materiálu je 100 mg, v případě lyofilizovaného rostlinného materiálu 20 mg. Rostlinný materiál musí být řádně zhomogenizován v třecích miskách s použitím kapalného dusíku. Odvážený vzorek se následně přenesse do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

1. K zhomogenizovanému vzorku napipetujeme 400 µl pufru AP1 a následně 4 µl RnázýA. Obsah důkladně protřepeme pomocí vortexu. Získanou směs inkubujeme 10 min při 65 °C (během inkubace směs promícháváme 2–3x převrácením zkumavek).
2. Následně přidáme 130 µl pufru P3, krátce promícháme pomocí vortexu a inkubujeme 5 min na ledu. Poté směs centrifugujeme 5 min při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
3. Vzniklý lysát přepipetujeme do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné ve 2 ml zkumavce (collection tube) a centrifugujeme 2 min při rychlosti 14 000 rpm.
4. Přefiltrovanou frakci po odečtení získaného objemu přepipetujeme do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Dáváme pozor, abychom nenabrali případný pelet.
5. K izolátu přidáme pufr AW1 v množství odpovídající 1,5násobku objemu odebrané frakce a ihned vzniklou směs promícháme opakovaným nasátím a vypuštěním ze špičky mikropipety.
6. Odpipetujeme 650 µl směsi a přemístíme ji do Dneasy Mini spin kolonky umístěné ve 2ml zkumavce (collection tube) a centrifugujeme 1 min při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.
7. Dneasy Mini spin kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 µl pufru AW2 a centrifugujeme 1 min při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
8. Opětovně přidáme 500 µl pufru AW2 a centrifugujeme 2 min při rychlosti 14 000 rpm. Vyndáme opatrně Dneasy Mini spin kolonku ze zkumavky tak, abychom zabránili kontaktu s kapalinou.

9. Přeneseme Dneasy Mini spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkuševky.
10. Přidáme 100 µl AE pufru, který nanese přímo na membránu Dneasy Mini spin kolonky. Necháme inkubovat 5 min při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 min při rychlosti 8 000 rpm.
11. Pro získání druhého eluátu opakujeme postup od bodu 9.

U získaného izolátu se měří výsledná koncentrace DNA, včetně čistoty, např. na přístroji Nanophotometer (Implen), která se průměrně pohybovala u vzorků dubů okolo 50 ng/µl. Z dostupné literatury byly vybrány nSSR markery pro testování polymorfismu mikrosatelitových lokusů u vzorků. Celkově bylo vybráno pro genetické analýzy 11 polymorfních nSSR markerů: QrZAG11, QrZAG20, QrZAG65, QrZAG87, QrZAG96, QrZAG112, QpZAG15, QpZAG104, QpZAG110, MsQ13 a GOTT066 (DOW et al. 1995; STEINKELLNER et al. 1997; KAMPFER et al. 1998). Forward i reverse primery nSSR markerů byly ředěny TE puftrem (1 mM Tris – HCl, pH 8, 0 a 0,01 mM EDTA) na 100 µM koncentraci. Připravili jsme si mix primerů pro Multiplex I v celkovém objemu 200 µl ze zásobních 100 µM roztoků forward a reverse primerů, ze kterých jsme napipetovali 4 µl QrZAG65, 4 µl QrZAG87, 2 µl QrZAG96, 2 µl QrZAG112, 4 µl QpZAG104 a 2 µl MsQ13 a doplnili 164 µl TE puftrem. Mix primerů pro Multiplex II jsme připravili stejným způsobem, tedy ze zásobních 100 µM roztoků forward a reverse primerů jsme napipetovali 4 µl QrZAG11, 2 µl QrZAG20, 2 µl QpZAG15, 4 µl QpZAG110 a 4 µl GOTT066 a doplnili 168 µl TE puftrem. Získání amplifikačních produktů od jednotlivých testovaných nSSR primerů bylo optimalizováno na základě citovaných a námi optimalizovaných podmínek polymerázové řetězové reakce (PCR) v uvedené literatuře (viz výše). Předběžné hodnocení amplifikačních produktů bylo provedeno na 2% agarózovém gelu pomocí horizontální elektroforézy. Agarózový gel byl připraven z 0,5 x TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B. V.) a agarózy při zahřátí v mikrovlnné troubě do čirého roztoku. Pro vizualizaci amplifikovaných produktů byl použit GelRed v poměru 1 : 10 000. Ztuhlý gel byl přemístěn do elektroforézy obsahující 0,5 x TBE pufr. Amplifikáty PCR produktů (15 µl) byly naneseny na gel společně s gel loading dye puftrem (4 µl). Velikost PCR produktů byla porovnána s naneseným DNA ladderem, připraveným v objemu 1 µl 100 bp DNA ladder, 4 µl destilované vody a 2 µl gel loading dye puftrem. Podmínky elektroforézy byly nastaveny na 40 V/ 30 min s následným zvýšením na 90 V/ 120–150 min. Po uplynutí uvedené doby byly získané PCR produkty vizualizovány pod UV zářením, zdokumentovány kamerovým systémem a pořízené snímky byly uloženy do souborů. V Tabulce 1, 2 a 3 jsou uvedeny námi ověřené složení reakčních směsí, výsledné

podmínky PCR reakce a rozdělení jednotlivých nSSR primerů do dvou multiplexů (Multiplex I a Multiplex II). Reakční směsi byly připravovány na ledu s přidáním enzymu Platinum® Taq DNA polymerase, které proběhlo velmi rychle po odpipetování všech uvedených předchozích složek, aby se zabránilo znehodnocení aktivity enzymu.

Tab. 1: Seznam nSSR (nuclear simple sequence repeats) markerů se sekvencemi jejich primerů použitých pro PCR reakci a následně s fluorescenčním značením (6FAM, VIC, NED a PET) uspořádaných do Multiplexu I a Multiplexu II pro fragmentační analýzu.

Multiplex I	sekvence primerů forward (F) a reverse (R)	velikost PCR produktu	fluorescenční značení
QrZAG87	F: TCCCACCACTTTGGTCTCTCA	101-141	NED
	R: GTTGTGACAGTGGGATGGGTA		
MSQ13	F: AACTCAGACCCACCATTTTTCC	191-233	NED
	R: TGGCTGCACCTATGGCTCTTAG		
QrZAG96	F: GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA	137-191	6-FAM
	R: GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA		
QrZAG65	F: CAGTGGTGTCAACTCCTCCAG	249-306	6-FAM
	R: GTCAGGTGACCATTCAAACCTAGAA		
QpZAG104	F: ATAGGGAGTGAGGACTGAATG	183-249	VIC
	R: GATGGTACAGTAGCAACATTC		
QrZAG112	F: TTCTTGCTTTGGTGCGCG	71-139	VIC
	R: GTGGTCAGAGACTCGGTAAGTATTC		
Multiplex II	sekvence primerů forward (F) a reverse (R)	velikost PCR produktu	fluorescenční značení
QpZAG110	F: GGAGGCTTCTTCAACCTACT	192-266	NED
	R: GATCTCTTGTGTGCTGTATTT		
QpZAG15	F: CGATTTGATAATGACACTATGG	108-152	6-FAM
	R: CATCGACTCATTGTTAAGCAC		
GOT066	F: TCCCTAGATGATGGGGATGA	210-250	6-FAM
	R: TTTTACGTCGGCCAACTTTT		
QrZAG20	F: CCATTAAGAAGCAGTATTTTGT	155-195	VIC
	R: GCAACACTCAGCCTATATCTAGAA		
QrZAG11	F: CTTGAACTCGAAGGTGTCC	227-288	VIC
	R: TGGTTGACTAAAGTATGAACTGTTTG		

Tab. 2: Optimalizované složení PCR reakční směsi.

PCR mix	Objem na 1 vzorek (μl)
10 x PCR pufr, minus Mg	1,5
50 mM MgCl ₂	0,6
10 mM dNTPs	0,1
Mix primerů	1
Polymerase Platinum® Taq	0,075
H ₂ O	9,725
templátová DNA	1
Celkový objem	15 μL

Tab. 3: Optimalizovaný teplotní program PCR reakce pro získání cílových produktů s využitím fluorescenčně značených primerů Multiplexu I a Multiplexu II (viz Tabulka 1).

Teplotní program PCR reakce	
94 °C	5 min
35 x cyklus	
94 °C	45 s denaturace
59 °C	45 s annealing primerů
72 °C	55 s elongace
1 x cyklus	
72 °C	15 min finální elongace
4 °C	chlazení PCR amplifikátů

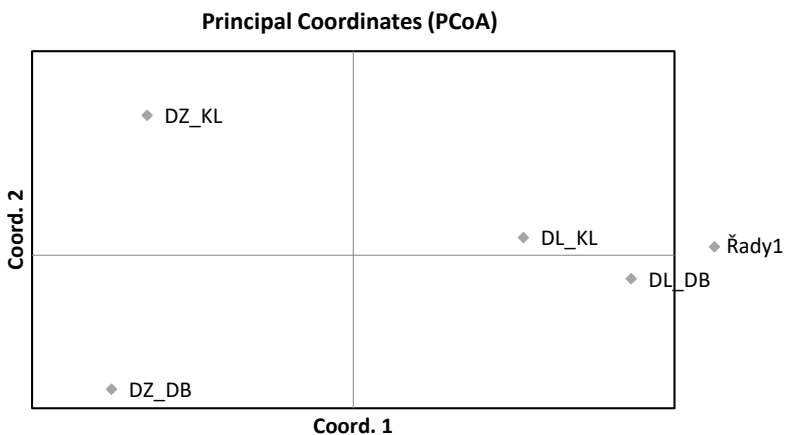
Fragmentační analýzy pomocí nSSR markerů, hodnocení PCR produktů a zpracování molekulárních dat

U získaných amplifikačních PCR produktů byla provedena denaturace, kdy byl každý vzorek (1 μl) přenesen do 96jamkové destičky, k němuž bylo přidáno 11 μl Formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) a 0,4 μl velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ' Size standard v 2.0, Applied Biosystems). Po inkubaci 4 minut při teplotě 94 °C byly vzorky neprodleně zchlazeny na ledu. Destička byla umístěna do genetického analyzátoru, ve kterém byl nastaven program pro fragmentační analýzu. Hodnocení velikosti amplifikačních produktů se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems).

Dub patří mezi dřeviny s diploidní sadou chromozómů ($2n = 24$) (HEJNÝ, SLAVÍK 1992), proto při hodnocení vybraného lokusu získáme u sledovaného jedince dvě stejné hodnoty alel (homozygot) nebo dvě různé hodnoty alel (heterozygot). Genetické charakteristiky u námi sledovaných dvou populací dubu letního a dvou populací dubu zimního byly vyhodnoceny z dat fragmentačních analýz s využitím mikrosatelitových nSSR markerů a následně zpracovány pomocí statistického programu GenAlEx 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012). Na základě získaných genetických charakteristik, jako jsou např. N_a – počet rozdílných alel, I – Shannonův informační index nebo H_o a H_e – průměrné hodnoty pozorované a očekávané heterozygotnosti pro jednotlivé lokusy ze všech sledovaných vzorků, lze vyhodnotit a porovnávat nejen úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, ale i genetické diference a vzdálenosti.

Příklad hodnocení genetických charakteristik u námi sledovaných populací dubů

Pro genetickou charakterizaci byly vybrány celkem čtyři populace dubů zimního (DZ) a letního (DB), které byly odebrány na lokalitách s vhodnými stanovištními podmínkami (Klánovice, Cholupická Bažantice) s označením populací DZ_KL, DL_KL a DL_DB a na lokalitě s limitujícími podmínkami pro optimální růst (nedostatek spodní vody, extrémní teploty) odebrané z lokality Petrov s označením vzorků DZ_DB. Zhodnocení genetických vzdáleností mezi sledovanými populacemi bylo kalkulováno na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972). Získané hodnoty (Tabulka 4) byly zpracovány pomocí analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinates Analysis, PCoA) a graficky znázorněny na Obrázku 1. Na základě hodnocení Neiových standardních genetických vzdáleností (Tabulka 4) se odlišily populace dubu zimního (DZ_KL a DZ_DB) od dubu letního (DL_KL a DL_DB), přičemž geneticky nejbližší (0,095) si byly populace dubu letního z lokalit s vhodnými stanovištními podmínkami. Geneticky vzdálenější 0,130 byly sledované populace dubů zimních, které se nacházely na lokalitě s vhodnými podmínkami a s extrémními podmínkami. Tabulka 5 uvádí přehled genetických vlastností stanovených pomocí 11 jaderných mikrosatelitových markerů. Průměrné hodnoty počtu rozdílných alel N_a pro všechny lokusy ze všech analyzovaných vzorků dubu letního a dubu zimního charakterizuje jednoduchou formou jejich genetickou rozmanitost. Číselné vyjádření genetické diverzity lokusů zhodnocuje Shannonův informační index I , který nezahrnuje do výpočtu alely s malými četnostmi.



Obr. 1: Grafické znázornění genetických vzdáleností sledovaných populací dubu letního (DL_KL a DL_DB) a dubu zimního (DZ_KL a DZ_DB).

Tab. 4: Neiovy standardní genetické vzdálenosti mezi sledovanými populacemi dubu letního (DL_KL a DL_DB) a dubu zimního (DZ_KL a DZ_DB).

	DZ_DB	DL_DB	DL_KL	DZ_KL
DZ_DB	0.000			
DL_DB	0.758	0.000		
DL_KL	0.512	0.095	0.000	
DZ_KL	0.130	0.679	0.435	0.000

Tab. 5: Průměrné hodnoty genetických charakteristik u sledovaných populací dubu letního (DL_KL a DL_DB) a dubu zimního (DZ_KL a DZ_DB), získaných na základě použití 11 mikrosatelitových (nSSR) markerů. *N* – počet analyzovaných stromů u sledovaných populací, *Na* – průměrný počet rozdílných alel u sledovaných populací, *Ne* – průměrný počet účinných alel u sledovaných populací, *I* – Shannonův informační index – zhodnocení genetické diverzity jednotlivých populací, *Ho* – průměrné hodnoty pozorované heterozygotnosti pro sledované populace, *He* – průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti pro sledované populace, *F* – fixační index.

Populace		<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>
DZ_DB	průměr	30.00	12.27	6.62	1.97	0.68	0.78	0.13
	SE	0.00	1.67	1.11	0.20	0.07	0.05	0.05
DL_DB	průměr	29.73	11.27	6.20	1.85	0.59	0.74	0.18
	SE	0.14	1.62	1.22	0.20	0.06	0.06	0.07
DL_KL	průměr	28.73	11.82	6.12	1.85	0.67	0.74	0.08
	SE	0.27	1.67	1.34	0.20	0.04	0.05	0.04
DZ_KL	průměr	30.00	11.36	6.16	1.89	0.70	0.76	0.06
	SE	0.00	1.62	1.03	0.20	0.07	0.06	0.07

c) Materiální a technické zabezpečení pro založení explantátových kultur dubů

Přístrojové vybavení:

analytické váhy, autokláv, horkovzdušný sterilizátor, laboratorní míchačka, lednička, kultivační box, laminární box, sterilizátor laboratorních nástrojů, pH metr, kahan

Chemikálie:

médium LLOYD a McCOWN (1981) komerčně dostupné pod názvem McCown Woody Plant Medium (Duchefa Biochemie), glycin, glutamin, casein, indol-3-máselná kyselina, benzylaminopurin, destilovaná voda, sacharóza, agar, hydroxid draselný, ethanol, komerčně dostupné dezinfekční činidlo Mucosol™ (Sigma-Aldrich).

Laboratorní pomůcky:

pinzeta, skalpel, lžičky, váženky, pipety a špičky, magnetické míchadlo, odměrný válec, stojánek na nástroje, Petriho miska skleněná 15 cm, kruhové filtrační papíry 12,5 cm, sirky, buničina, sterilní nádoby pro kultivaci *in vitro* explantátů, mikroténové sáčky, chladicí taška

Rostlinný materiál:

Výchozím materiálem pro založení explantátových kultur dubů (*Quercus spp.*) jsou rouby (čerstvé vitální větvičky, nejvhodněji z terminálních výhonů s počtem cca 5–10 pupenů) z vybraných donorových jedinců (sběr cca 30 pupenů od každého) odebrané v jarním období před vyrašením pupenů (konec března/ začátek dubna v závislosti na klimatických podmínkách). Odebraný rostlinný materiál se řádně označí, vloží do mikroténových sáčků, uchovává se v chladicí tašce pro převoz do laboratoře, kde je uskladněn při teplotě 4 °C do následného zpracování (materiál by měl být zpracován neprodleně během několika dní).

Kultivační médium:

Založení primárních kultur a multiplikaci *in vitro* rostlin provádíme na Woody Plant Medium (WPM), které připravíme buď rozpuštěním komerčně dostupné směsi McCown WPM (Duchefa Biochemie), nebo jednotlivých makroelementů

a mikroelementů ve složení a koncentraci uvedených podle LLOYD a McCOWN (1981; viz Tabulka 6) v destilované vodě a obohacené o glutamin (200 mg.l^{-1}), glycin (2 mg.l^{-1}), casein (200 mg.l^{-1}), indol-3-máselnou kyselinu ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$), benzylaminopurin ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$) a sacharózu (30 g.l^{-1}). Agar se přidává v množství 7 g.l^{-1} a $\text{pH} = 5,8$ se upravuje pomocí 1 M KOH . Kultivační médium rozléváme do připravených kultivačních nádob, které byly před použitím umístěny do horkovzdušného sterilizátoru ($160^\circ\text{C}/ 2 \text{ h}$). Živné médium obsahující všechny komponenty včetně fytohormonů sterilizujeme při 120°C v autoklávu po dobu 20 minut. Před použitím uchováváme médium při laboratorní teplotě.

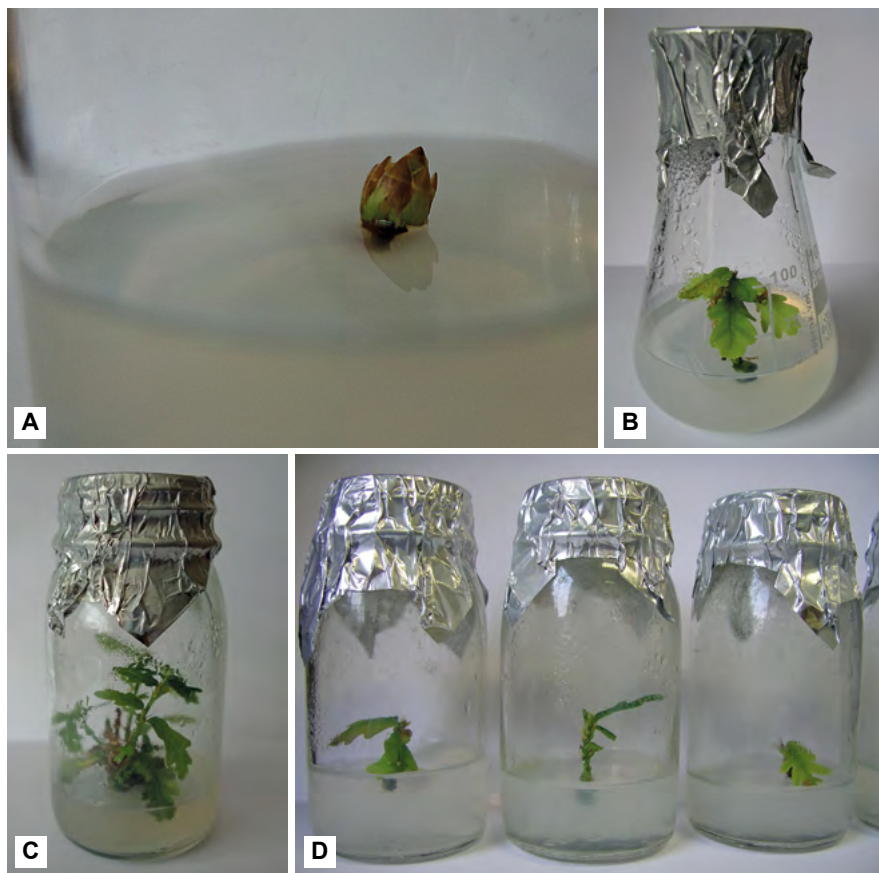
d) Zakládání primárních kultur, mikropropagace a multiplikace dubu zimního a letního

Uvedený postup je zcela shodný pro dub zimní i letní, kdy pupeny dubů se sterilizují 20 min v saponátu Tween[®]20 (2 kapky na 10 ml), 20 min v dezinfekčním roztoku MucosolTM (50 ml/ 500 ml destilované vody), následně se promývají 20 min pod tekoucí vodou, na 20 min jsou ponořeny do roztoku HgCl_2 (1 mg.l^{-1}) a na závěr jsou v laminárním flow-boxu 3 x ponořeny na 15 min do sterilní destilované vody. Takto ošetřené pupeny se přemístí do sterilní nádoby naplněné sterilní destilovanou vodou, kde setrvávají pro následnou manipulaci. Z pupenů se odstraní ve sterilním prostředí na Petriho misce pomocí skalpelu a pinzety povrchové šupinky. Při převádění dormantních pupenů z *ex vitro* do *in vitro* podmínek je nezbytné dodržovat aseptické podmínky při manipulaci s rostlinným materiálem v laminárním flowboxu, aby byla s nejvyšší účinností eliminována případná externí kontaminace.

Opracované pupeny se umístí do sterilních nádob obsahujících živné médium (Obr. 2A). Pro úspěšnou organogenezi je důležité nepoškodit vzrostný vrchol, který obsahuje meristematické buňky schopné buněčného dělení, tedy růst a vývoj rostlinných orgánů (zejména prýťů). Založené explantátové kultury (Obr. 2B a 2D) se udržují v řízených světelných i teplotních podmínkách (21°C , 16 h/ 8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Po 4–6 týdnech dochází k proliferaci nasazených explantátů v prýty (Obr. 2C). Do období zajištění požadovaného množství mikrořízků jsou axilární případně adventivní výhony multiplikovány na živném médiu (zpravidla 2 mikrořízky ve sterilní nádobě) s přibližným intervalem regenerace 3–4 týdny.

Tab. 6: Složení LLOYD a McCOWN (1981) kulturačního média nebo-li Woody Plant medium (WPM) používané pro založení *in vitro* primárních kultur dubů.

		WPM
		mg.l⁻¹
Makroelementy	chemikálie	
	Ca(NO₃)₂·4H₂O	556
	NH₄NO₃	400
	CaCl₂·2H₂O	96
	MgSO₄·7H₂O	370
	K₂SO₄	990
Mikroelementy	KH₂PO₄	170
	Na₂EDTA	37,3
	FeSO₄·7H₂O	27,8
	H₃BO₃	6,2
	MnSO₄·H₂O	22,3
	ZnSO₄·7H₂O	8,6
	Na₂MoO₄·2H₂O	0,25
Vitamíny a organické látky	CuSO₄·5H₂O	0,25
	Myo-inositol	100
	Thiamin	1
	Kyselina nikotinová	0,5
	Pyridoxin HCl	0,5
	Glutamin	200
	Casein	200
Fytohormony	Glycin	2
	BAP	0,2
	IBA	0,1



Obr. 2: Mikropropagace dubu letního (*Quercus robur* L.) v *in vitro* podmínkách. Růst apikálních výhonů na živném McCown Woody Plant Médiu (LLOYD, McCOWN 1981).

Fig. 2: Micropropagation of oak (*Quercus robur* L.) in *in vitro* conditions. Growth of apical shoots on nutrient McCown Woody Plant Mediu (LLOYD, McCOWN 1981).

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Standardizovaná metodika určení genotypů dubu letního a zimního (*Quercus robur* L. a *Q. petraea* (Matt.) Liebl.) pomocí jaderných mikrosatelitových markerů (nSSR markery) umožňuje s vysokou spolehlivostí zjistit genetickou diverzitu a variabilitu u studovaných populací. Využití nSSR markerů bylo publikováno jako jedno z velmi účinných metod stanovení genetických charakteristik zejména u velkých souborů jedinců, a to nejen u dubů (DZIALUK et al. 2005), ale i u jiných lesních dřevin, jimiž jsou např. jablň domáci (URRESTARAZU et al. 2016), smrk ztepilý (ANDROSIUK et al. 2013), smrk černý a červený (SHI et al. 2014), slivoň africká (KADU et al. 2013) a topol osika (POLITOV et al. 2015). Na základě literárních zdrojů odráží uvedená metodika informace o použití nSSR markerů s ohledem na uplatnění jejich vysokého polymorfismu, který je pro determinaci genetických vlastností klíčovým faktorem. Metodické postupy analýzy mikrosatelitových markerů u dubů sp. nebyly dosud pro podmínky České republiky popsány. Významným přínosem uvedeného postupu fragmentační analýzy je uspořádání vybraných nSSR markerů do dvou Multiplexů I a II a optimalizace PCR reakce pro všechny použité lokusy do shodných podmínek, což je významné z hlediska ekonomických i časových úspor při zpracování většího počtu vzorků. Metodický postup určení genotypů dubů byl vyzkoušen celkem u 4 populací dubu letního a zimního, pocházejících záměrně z lokalit s odlišnými stanovištními podmínkami. Naše výsledky ukázaly, že s využitím nSSR markerů je možné určit nejen genotypy uvnitř populace, ale i odlišit jednotlivé populace na základě genetických vzdáleností u pozorovaných společenstev. Vzhledem ke značnému zájmu Arcibiskupství pražského uchování cenných populací dubů, byly uplatněny komplexnější biotechnologické postupy, které v oboru lesního hospodářství nebyly dosud v takovém rozsahu publikovány.

5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodické postupy jsou zpracovány v přehledné formě za účelem poskytnout získané zkušenosti a poznatky při 1) charakterizaci genotypu dubu letního a dubu zimního a 2) při založení explantátových kultur formou vegetativního množení. Uplatnění postupu stanovení genetické rozmanitosti dubů pomocí nSSR markerů předpokládáme na pracovištích zabývajících se danou problematikou (výzkumné organizace a vysoké školy), případně individuální zájemci z řad vlastníků lesů. Neboť znalostí genetické struktury populací dubů, které představují důležitou složku lesních společenstev, se významně přispěje k podpoře a zvýšení biodiverzity lesních porostů a rovněž se napomáhají plnit cíle Státní politiky životního prostředí a mezinárodní závazky ČR při ochraně biologické rozmanitosti. Uvedený postup založení primárních kultur a multiplikace mikrořízků je možné využít pro následné zakořeňování, aklimatizaci mikrořízků až po získání výsadby schopných výpěstků, jak již bylo publikováno např. pro reprodukci autochtonních druhů jilmů (MALÁ et al. 2010), pro jeřáb břek (MALÁ et al. 2009) či pro topol šedý (ŽIŽKOVÁ et al. 2017). Metoda *in vitro* mikropropagace může být uplatněna pracovníky z lesního provozu, státní správy, výzkumných institucí, univerzit, školkařských firem, ale i individuálními zájemci o danou problematiku. Výslovný zájem o využití uvedených biotechnologických postupů z hlediska zachování cenných dubových populací projevilo Arcibiskupství pražské.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou odvislé od skutečnosti, jestli se zavádí zcela nový provoz pro určení genotypů a mikropropagaci dubů, nebo se uvedená metodika implementuje na pracovištích s již zavedeným provozem genetických analýz a tkáňových kultur. Náklady na postupy genetických analýz uvedených v metodice jsou kalkulovány na spotřební materiál a chemikálie s předpokladem přístrojového vybavení pro analýzy DNA. Na izolaci DNA z jednoho vzorku činí průměrné náklady cca 110,-Kč. Náklady jednoho vzorku na PCR produkty, včetně fragmentačních analýz s použitím 10 nSSR markerů, činí cca 160,-Kč. V předložené kalkulaci však nejsou zahrnuty doplňkové náklady, náklady na přístrojové vybavení, osobní náklady a náklady na vývoj metod.

Náklady na zavedení metodického postupu v laboratoři, která již pracuje s explantáty v aseptických podmínkách, jsou určeny nákupem běžných chemikálií pro přípravu kultivačních médií a potřebného spotřebního materiálu. V druhém případě, kdy se zavádí zcela nový provoz pro práci s *in vitro* kulturami, se náklady značně navyšují o vybavení pro sterilizaci materiálu a kultivačních médií: autokláv a horkovzdušný sterilizátor (od 150 tis. Kč), práci s tkáňovými kulturami: kultivační box a laminární box (od 450 tis. Kč), přístroje pro přípravu a uchování kultivačních médií: analytické váhy, stolní pH-metr, laboratorní míchačka, chladnička a pipety (od 95 tis. Kč), spotřební materiál související s prací v laboratoři: sklo, plasty, chemikálie, pinzety, nůžky a skalpely (60 tis. Kč).

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů vedoucích k poznatkům o genetické kvalitě, především diverzitě a heterozygotnosti populací nebo porostů získaných na základě DNA analýz, je přínos celospolečenský. 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. Předpokládá se, že informace o genetických charakteristikách porostů budou využity jako podklady pro rozhodovací řízení, strategické plánování a legislativní činnost státní správy v oblasti ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a nakládání s reprodukčním materiálem. Poznatky o diverzitě populací také napomáhají plnit cíle Státní politiky životního prostředí a mezinárodní závazky ČR při ochraně biologické rozmanitosti. Vedle celospolečenských přínosů se dá reálně předpokládat i zvýšení tržeb z těžby dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů dubových porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu.

Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů (např. genové základny) je vyšší záruka, že bude v době mýtní zralosti lesních porostů dosaženo současně i vyšší objemové produkce. Rozdíl porostních zásob vztažených k obmýtní u dubových porostů (pozn.: konkrétně u dubu zimního) nacházejících se v současných genových základnách (GZ) oproti ostatním dubovým porostům na území ČR, zjištěný na základě analýzy celostátních informací v datovém skladu, činí v objemovém vyjádření cca 116 m³/ha a jednoznačně reprezentuje lepší produkční bázi v genových základnách. Zlepšená genetické produkční báze 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). Zvýšené tržby z prodeje dřeva činí u kvalitnějších dubových porostů v GZ v době obmýtní částku 219 300 Kč/ha. Tento hrubý výnos po odpočtu celkových těžebních nákladů ve výši 49 200 Kč/ha (průměrné celostátní náklady činí 423 Kč/m³) pak představuje pro vlastníka zvýšený čistý výnos ve výši 170 100 Kč/ha. Tato částka je tvořena především značným rozdílem v objemu porostních zásob v GZ oproti celostátnímu průměru porostních zásob dubových porostů a příznivými cenami na trhu se surovým dřívím (VLASÁK et al. 2016).

7 DEDIKACE

Metodika byla zpracována skupinou autorů ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., v rámci řešení výzkumného projektu TA ČR TJ01000385 „*Genetická charakterizace populací dubů s omezenou možností přirozené obnovy a efektivní reprodukce místních genotypů metodou organogeneze pro podporu udržení těchto druhů v jejich přirozených společenstvech*“ a ústavního výzkumného projektu financovaného na základě institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0118.

8 PODĚKOVÁNÍ

S pomocí při odběrech rostlinného materiálu děkujeme kolegům Jaroslavu Dostálovi, Jiřímu Čápovi a Václavu Buriánkovi. Za pomoc při manipulaci s *in vitro* kulturami dubu letního a zimního děkujeme Jakubovi Hradečnému a Matějovi Semerákovi. Za pomoc s fragmentačními analýzami děkujeme kolegyni Olze Trčkové.

9 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ANDROSIUK P., SHIMONO A., WESTIN J., LINDGREN D., FRIES A., WANG. X. 2013. Genetic status of Norway spruce (*Picea abies*) breeding populations from northern Sweden. *Silvae Genetica* 62: 127-136.
- BURG K., ZECHMEISTER-MACHHART M., GLÖSSL J., SCHMIDT J. 1993. Oak chloroplast-DNA polymorphisms detected by restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Annals of Forest Science* 50: 66-69.
- BURIÁNEK V., BENEDÍKOVÁ M., FRÝDL J., NOVOTNÝ P. 2013. Metodická příručka k určování domácích druhů dubů. *Lesnický průvodce*, 8: 42 s.
- DOW B.D., ASHLEY M.V., HOWE H.F. 1995. Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 137-141.
- HEJNÝ S., SLAVÍK B. (eds.) 1992. Květena České republiky 3. Praha, Academia: 542 s.
- HIPP A.L., WHITTERMORE A.T., GARNER M., HAHN M., FITZEK E., GUICHOUX E., CAVENDER-BARES J., GUGGER P.F., MANOS P.S., PEARSE I.S. CANNON C.H. 2019. Conserved DNA polymorphisms distinguish species in the eastern North American white oak syngameon: Insights from an 80-SNP oak DNA genotyping toolkit. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 104 (3): 455-477, doi:10.3417/2019434.
- KADU C. A. C., KONRAD H., SCHUELER S., MULUVI G. M., EYOG-MATIG O., MUCHUGI A., WILLIAMS V. L., RAMAMONJISOA L., KAPINGA C., FOAHOM B., KATSVANGA C., HAFASHIMANA D., OBAMA C., GEBUREK T. 2013. Divergent pattern of nuclear genetic diversity across the range of the Afromontane *Prunus africana* mirrors variable climate of African highlands. *Annals of Botany* 111: 47-60.
- KAMPFER S., LEXER C., GLÖSSL J., STEINKELLNER H. 1998. Characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas* 129: 183-186.
- LEROY T., ROUX C., VILLATE L., BODÉNÈS C., ROMIGUIER J., PAIVA J.A.P., DOSSAT C., AURY J.M., PLOMION C., KREMER A. 2017. Extensive recent secondary contacts between four European white oak species. *New Phytologist* 214: 865-878.
- LLOYD G., MCCOWN B. H. 1981. Woody Plant Medium (WPM) – A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience* 16: 453-453.

- MALÁ, J., CVRČKOVÁ, H., MÁCHOVÁ, P. 2009. Mikropropagace jeřábu břeku (*Sorbus torminalis* (L.) CRANTZ). Lesnický průvodce, č. 4: 19 s.
- MALÁ, J., MÁCHOVÁ, P., CVRČKOVÁ, H. 2010. Využití mikropropagace pro reprodukci autochtonních druhů jilmu (*Ulmus glabra* HUDS., *Ulmus minor* GLED. a *Ulmus laevis* PALL.). Lesnický průvodce, č. 4: 17 s.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist 106: 283-392.
- 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.
- PINA-MARTINS F., BAPTISTA J., PAPPAS G. JR., PAULO O.S. 2018. New insight into adaptation and population structure of cork oak using genotyping by sequencing. Global Change Biology, doi:10.1111/gcb.14497.
- POLITOV D.V., BELOKON M.M., POLYAKOVA T.A., SHATOKHINA A.V., MUDRIK E.A., AZAROVA A.B., FILIPPOV M.V., SHESTIBRATOV K.A. 2015. Application of Microsatellite loci for molecular identification of elite genotypes, analysis of clonality, and genetic diversity in aspen *Populus tremula* L. (Salicaceae). International Journal of Plant Genomics 2015:261518, doi: 10.1155/2015/261518.
- SHI Y.Z., FORNERIES N., RAJORA O.P. 2014. Highly informative single-copy nuclear microsatellite DNA markers developed using an AFLP-SSR approach in black spruce (*Picea mariana*) and red spruce (*P. rubens*). PLoS One 9: e103789, doi: 10.1371/journal.pone.0103789.
- STEINKELLNER H., FLUCH S., TURETSCHKE E., LEXER C., STREIFF R., KREMER A., BURG K., GLÖSSL J. 1997. Identification and characterization of (GA/CT)_n-microsatellite loci from *Quercus petraea*. Plant Molecular Biology 33: 1093-1096.
- UHLÍŘOVÁ H., KAPITOLA P. a kolektiv. 2004. Poškození lesních dřevin. Lesnická práce: 288 s.
- URRESTARAZU J., DENANCÉ C., RAVON E., GUYADER A., GUISEL R., FEUGEY L., PONCET C., LATEUR M., HOUBEN P., ORDIDGE M., FERNANDEZ-FERNANDEZ F., EVANS K.M., PAPERSTEIN F., SEDLAK J., NYBOM H., GARKAVA-GUSTAVSSON L., MIRANDA C., GASSMANN J., KELLERHALS M., SUPRUN I., PIKUNOVA A.V., KRASOVA N.G., TORUTAIEVA E., DONDINI L., TARTARINI S., LAURENS F., DUREL C.E. 2016. Analysis of the genetic diversity and structure across a wide range of germplasm reveals prominent gene flow in apple at the European level. BMC Plant Biology 16: 130.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Lesnická práce: 294 s.

- VIEIRA M.L.C., SANTINI L., DINIZ A.L., MUNHOZ C.F. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39: 312-328.
- VLASÁK J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2016. Chloroplastová sekvenační haplotypizace dubu pro stanovení původu a homogenity populací. *Strnady, VÚLHM, Lesnický průvodce*, 2016, č. 9/2016: 25 s.
- ZPRÁVA. 2019. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2018. Ministerstvo zemědělství, Praha.
- ŽIŽKOVÁ E., KOMÁRKOVÁ M., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H. 2017. Metoda rychlé regenerace topolu šedého (*Populus canescence* Aiton Sm.) s využitím *in vitro* organogeneze. *Strnady, VÚLHM: 20 s. Lesnický průvodce*, 5/2017.

10 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- VLASÁK J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P.: Chloroplastová sekvenační haplotypizace dubu pro stanovení původu a homogenity populací. *Strnady, VÚLHM, Lesnický průvodce*, 2016, č. 9/2016: 25 s.

METHODOLOGICAL PROCEDURE FOR DETERMINATION OF OAK GENOTYPES USING NUCLEAR MICROSATELLITE MARKERS

Summary

This work describes two methods in biotechnology, genetic characterization and micropropagation applied in oak trees, *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. Genetic variability was assayed in four oak populations using nuclear Simple Sequence Repeat (nSSR) markers, which were selected according to their high polymorphism. To evaluate the effects of environment on oak genotypes, individual trees were collected at localities with diverse habitat conditions in the Czech Republic, mainly at dry area with a low-nutrient availability and forest area with a well moisture conditions and enriched soils. Detail proceedings of DNA isolation from collected oak trees, testing the nSSR markers with optimization of PCR conditions, PCR reactions followed by DNA denaturation and fragmentation analysis were carried out with a high attention to get highly informative genetic traits from studied oak populations. For calculation of genetic diversity parameters, statistical program GenAlEx 6.503 was used. Data revealed differentiation among the oak populations as demonstrated genetic distance. While closest genetic distance (0,095) was found among the populations of *Quercus robur* L. characterized by individuals with selected qualitative phenotype traits, a longer genetic distance (0,130) were specified among the populations of *Q. petraea* (Matt.) Liebl. showing that using nSSR markers determines not only genotypes but also genetic variability among the oak populations based on their genetic distance.

In addition, micropropagation technique was developed to preserve the valuable oak genotypes determined by 11 nSSR markers. Vegetative reproduction of oaks including stimulation of organogenesis and multiplication is briefly described as well. We suppose that investigated biotechnology methods will be mainly used for preservation and protection of oak species to support biodiversity in forest ecosystem.



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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 6/2019