

HODNOCENÍ GENETICKÉ DIVERZITY A KLONOVÉ IDENTITY MODŘÍNU OPADAVÉHO POMOCÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY AND CLONAL IDENTITY OF EUROPEAN LARCH USING MICROSATELLITE MARKERS

PAVLÍNA MÁCHOVÁ ✉ - HELENA CVRČKOVÁ - OLGA TRČKOVÁ

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

✉ e-mail: machova@vulhm.cz

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the possibility of using SSR markers for assessing clonal identity of European larch (*Larix decidua* Mill.) trees in seed orchards and determine the suitability of markers for the analysis of genetic diversity in populations of European larch in the Czech Republic. Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from young needles taken from 218 sampled trees of two seed orchards. Samples were screened using thirteen selected polymorphic nuclear microsatellite markers. Measuring of the size of amplification products was carried out using Applied Biosystems 3500 genetic analyser. The obtained data was analysed by statistical programs CERVUS and GenAlEx 6.503. 155 different alleles were detected at 13 loci of the 218 larch individuals from two seed orchards. By applying the 13 suitable markers to the 90 clones from model seed orchards we obtained multilocus genotypes (MLG). The obtained results illustrate the utility of the microsatellite loci for assessing spatial patterns of genetic diversity and for individual genotypes identification. 98.24% of the sampled trees could be assigned to the clones represented in the Bílovice seed orchard. The tested genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for clonal identification and genetic diversity evaluation of European larch trees.

For more information see Summary at the end of the article.

Klíčová slova: modřín opadavý; klonální identita; genetická diverzita; mikrosatelity; semenný sad

Key words: European larch; clonal identity; genetic diversity; microsatellites; seed orchard

ÚVOD

Modřín opadavý (*Larix decidua* Mill.) je lesnický významná dřevina, patří mezi nejrychleji rostoucí jehličnaté dřeviny v západní a střední Evropě, schopná v optimálních podmínkách dosáhnout objemové produkce až 10 m³/ha. Jedná se o typickou pionýrskou dřevinu, která má vzhledem ke svému rychlému růstu v juvenilní fázi široké uplatnění v lesnictví a agrolesnictví. Modřín opadavý je světlomilná dřevina, nejlépe roste na hlubokých, živných půdách. Snáší však i mělké kamenité půdy, včetně vápenatých půd se střední hladinou podzemní vody a je středně odolný vůči znečištěnému ovzduší (MATRAS, PÁQUES 2008). Patří mezi jehličnany s velkým genomem (= 11 198 Mb; GREILHUBER 1986).

Areal původního rozšíření je v Evropě omezen na oblast Alp a dále na jednotlivé odloučené výskyty v oblastech Sudet, Vysokých a Nízkých Tater, ojediněle i Slovenska a Rumunska (ŠINDELÁŘ, FRÝDL 2006).

V posledních dvou stoletích došlo v mnoha evropských zemích v souvislosti s rozšiřováním zastoupení modřínu ke vzniku řady jeho kulturních populací. Na základě fenotypových charakteristik byly vylišeny základní ekotypy: alpský, sudetský, polský a slovenský. Modřín opadavý je v České republice původní dřevinou, jde o tzv. modřín opadavý, sudetský, někdy nazývaný jesenický nebo slezský, přirozeně rozšířený na relativně omezeném území části severní Moravy a Slezska. Značná ekvalence modřínu opadavého v podmínkách České republiky umožňuje, aby se s touto dřevinou počítalo jako s významnou složkou porostní skladby v oblastech od nížin, přes pahorkatiny až po nižší stupeň horských poloh (ŠINDELÁŘ et al. 2006; FRÝDL 2017). Podíl modřínu v současném druhovém složení lesů ČR činí 3,8 % z celkové plochy porostní půdy (Zpráva 2020).

V České republice je aktuálně uznáno 606 selektovaných zdrojů reprodukčního materiálu modřínu opadavého, z toho 123 uznaných poros-

tů fenotypové třídy A a 483 uznaných porostů fenotypové třídy B. Pro modřín opadavý je v současnosti evidováno 19 platných semenných sadů a 6 platných genových základech. 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). Problematika identifikace roubovanců a klonů v semenných sadech a v klonových výsadbách lesních dřevin pomocí molekulárních analýz byla řešena i v ČR, a to např. pomocí izoenzymových analýz (IVANEK et al. 2013), nově pomocí analýz mikrosatelitových markerů (MÁCHOVÁ et al. 2014, 2017, 2019).

Genetickou skladbu organismů a jejich variabilitu na úrovni populací a jedinců lze stanovit pomocí DNA markerů, které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí a na rozdíl od izoenzymových markerů nereagují na environmentální změny. Pro získání informací o genetické proměnlivosti studovaných jedinců je nutné vyhledat vysoce polymorfní DNA markery, např. mikrosatelitové (SSR) markery. Mikrosatelity byly poprvé popsány a využity v humánní medicíně (LITT, LUTY 1989; TAUTZ 1989), jejich využití se dále rozšířilo i pro studium dalších organismů a v současnosti metoda SSR markerů patří mezi standardní molekulárně genetické techniky. Vzhledem ke kodominantnímu charakteru v kombinaci s velkým počtem variabilních alel se SSR markery dají využít pro identifikaci klonů a kultivarů rostlin a také pro mapování genomů (HORMAZA 2002; SCHUELER et al. 2003). Mikrosatelitové markery jsou vhodné i pro rozlišení druhů a hybridů u lesních dřevin (BACILIERI et al. 1996), vykazují vysokou úroveň diverzity a jsou vhodné pro populační genetické studie (KHANSA et al. 2000). U modřínu opadavého byla zjištěna vysoká úroveň vnitropopulační i mezipopulační variability, pomocí DNA analýz byly zjištěny i rozdíly mezi základními (alpský a sudetský) ekotypy modřínu opadavého (WAGNER et al. 2015).

MATERIÁL A METODIKA

Mikrosatelitové markery jsou s úspěchem využívány pro identifikaci jedinců, a jsou tedy vhodné i pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů, archivů klonů a směsí klonů). Ověřování vhodných polymorfních mikrosatelitových markerů pro možnost testování klonové identity a genetické variability u modřínu opadavého proběhlo na jedincích modřínu opadavého z vybraných semenných sadů Bílovice a Pabožek. Ze semenného sadu Bílovice CZ-3-3-MD-87-30-3-B bylo analyzováno 170 roubovanců modřínu opadavého, tedy 57 % celého sadu. Při výsadbě v něm bylo evidováno 297 roubovanců (ramet) od 42 klonů (ortetů) modřínu opadavého. Dále byly provedeny analýzy u 48 klonů ze semenného sadu Pabožek CZ-3-3-MD-00053-28-3-S, v tomto případě byl proveden odběr vždy jedné ramety od všech zastoupených ortetů.

Při odběru byl rostlinný materiál označen, uložen v mikrotenových sáčcích do chladových boxů a po převozu do laboratoře ihned zpracován. Část vzorků byla zmrazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a část lyofilizována. Pro izolaci DNA byl použit lyofilizovaný rostlinný materiál třený s tekutým dusíkem. Izolace DNA byla provedena pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) dle dodaného protokolu (DNeasy® Plant Handbook). Množství a kvalita izolované DNA byla měřena pomocí spektrofotometru NanoPhotometr (Implen).

Na základě provedené literární rešerše bylo vytipováno 13 polymorfních (SSR) lokusů. Testování SSR markerů a optimalizace polymerázové řetězové reakce (PCR) byly provedeny na 10 vzorcích modřínu opadavého se specifickými primery k markerům Ld50, Ld30, Ld31, Ld42, Ld45, Ld56, Ld58, Ld101 (WAGNER et al. 2012) a dále s markery bcLK189, bcLK211, bcLK228, bcKL263, bcLK253 vyvinutými původně pro modřín japonský (ISODA, WATANABE 2006). Všechny testované markery se ukázaly jako dostatečně polymorfní a hodnotitelné. Použité markery a sekvence jejich primerů jsou uvedeny v tab. 1. Z testovaných lokusů byly podle získaných velikostí sledovaných alel vytvořeny dva multiplexy pro následné fragmentační analýzy. Multiplex 1 zahrnuje lokusy bcLK189, bcLK211, bcLK228, bcLK253, Ld50, Ld30 a Ld31, multiplex 2 pak lokusy Ld42, Ld45, Ld56, Ld58, Ld101 a bcKL263. Sestavení většího počtu markerů do multiplexů, ve kterých je PCR amplifikace provedena společně snižuje náklady na provádě-

Tab. 1.
Testované SSR lokusy a sekvence primerů
SSR loci tested and sequence of the primers

	Lokus/Locus	Forward primer	Reverse primer
Multiplex 1	bcLK189	ACCATACGCATACCCAATAGA	AGTTTTCTTTCCACACAAT
	bcLK211	CCATTCTCCATAGGTTCAATG	ATGCTCCTTACTAAGTCAGATACAC
	bcLK228	CCCTAACCCCTAGAATCCAATAA	GAGGAAGGCGACAAGTCATT
	bcLK253	AACACCATAGTGCAATGTGC	TCCTCTTGTTGATGCCACTT
	Ld50	GAAGGCGACTTTACATGCC	TCCATCTTTATGTCTCTTCCATGC
	Ld30	TTGTAGGTGTGTATGAAAGTTCTG	TGCCACTCTATTTCTTAATGCC
	Ld31	TTGAACTAGGGAGATCCGGC	AATAAAATAGCATTCCATGTGTAGC
Multiplex 2	Ld42	TCGTATGCATTGTCCAAATTTCC	TCCAAGTGAGGTCACACGAG
	Ld45	TGTGGGAGGTATAGCTTGCC	AGTAGGATGGAATGATGGAAACAC
	Ld56	AGCCATCGTGGTTCTTCTTTG	CTTGTAAGTGTGCACCCACC
	Ld58	AATGGCAAGAGCAGCAATCC	TCCAGGAATGATTTATCGAGAGC
	Ld101	ACACCAAGGACTCTCTGACTAC	GGTGATTCCAGAAGCAGGTG
	bcKL263	CGATTGGTATAGTGGTCATTGT	CCATCATACCTTCTTGAAGAG

né analýzy a zvyšuje jejich přesnost (GUICHOUX et al. 2011a, 2011b; LEFÈVRE et al. 2011).

PCR pro oba multiplexy probíhala pro každý vzorek v celkovém objemu 15 μ l. Pro lokusy bcLK189, bcLK211, bcLK228, bcLK253, Ld31, Ld50, Ld42, Ld45, Ld56, Ld58, Ld101 byla reakce provedena s využitím polymerázy Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) a s ní dodanými komponenty a pro lokusy Ld30, bcLK263 s použitím QIAGEN[®] Multiplex PCR Kitu (Qiagen).

Optimalizovaná PCR reakční směs s použitím polymerázy Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) obsahovala 1,5 μ l 10 \times PCR buffer minus Mg, 0,6 μ l 50mM MgCl₂, 0,2 μ l 10mM směsi dNTP, 0,075 μ l Platinum Taq DNA Polymerase, specifické 2 μ M primery (každý po 0,75 μ l k uvedeným lokusům) a 0,8 μ l izolované DNA. Optimalizovaný průběh PCR cyklu byl: 94 °C 3 min., dále následovalo 35 cyklů: 94 °C 45 s, 59 °C 45 s, 72 °C 45 s; po ukončení cyklů následovalo 72 °C 20 min. Na závěr byly testované vzorky chlazeny na 4 °C. PCR reakční směs pro lokusy Ld30 a bcLK263 s použitím QIAGEN[®] Multiplex PCR Kitu (Qiagen) obsahovala 7,5 μ l Qiagen Multiplex PCR Master Mixu, 1,5 μ l Q-Solution, specifické primery k uvedeným lokusům, každý v koncentraci 0,1 μ M a 1 μ l templátové DNA. Reakční směs byla u každého vzorku doplněna sterilní ultračistou vodou (Sigma-Aldrich, Molecular Biology) do objemu 15 μ l. PCR reakce probíhaly v termocykleru Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystem). Optimalizovaný průběh PCR cyklu byl: 95 °C 15 min. dále následovalo 32 cyklů: 94 °C 30 s, 59 °C 75 s, 72 °C 60 s; po ukončení cyklů následovalo 60 °C 30 min. Na závěr byly testované vzorky chlazeny na 4 °C. Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů bylo provedeno po proběhlé elektroforéze na 2% agarózových gelech v 0,5 \times TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) a získané amplifikační produkty byly vizualizovány pomocí GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) pod UV zářením.

Pro fragmentační analýzu byly PCR reakce s analyzovanými vzorky provedeny s fluorescenčně označenými primery (6FAM, VIC,

NED, PET). Před fragmentační analýzou byla provedena denaturace, ke každému vzorku bylo přidáno 11 μ l Formamidu (Hi-Di[™] Formamide, Applied Biosystems) a 0,4 μ l velikostního standardu (Gene Scan[™] – 600 LIZ Size standard v 2.0, Applied Biosystems). Po inkubaci 4 minuty při teplotě 94 °C byly vzorky rychle zchlazeny na ledu. Odečtení velikostí fragmentů probíhalo na genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500. Hodnocení jejich velikostí bylo provedeno pomocí softwarového programu GeneMapper[®] 4.1 (Applied Biosystems).

Pro posouzení genetických charakteristik a určení klonové identity sledovaných jedinců modřínu opadavého byla získaná data mikrosatelitových markerů zpracována pomocí statistických programů GenAlix 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012) a CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007).

VÝSLEDKY

Pro testování vzorků modřínu opadavého bylo použito 13 mikrosatelitových markerů, které vykazovaly polymorfismus a výsledky jejich analýz byly interpretovatelné. Amplifikační produkty sledovaných lokusů u analyzovaných vzorků dosahovaly velikosti v rozmezí 142–170 párů bazí (bp) u markeru bcLK189, 168–226 bp u markeru bcLK211, 171–213 bp u markeru bcLK228, 186–246 bp u markeru bcLK263, 195–211 bp u markeru bcLK253, 165–191 bp u markeru Ld50, 108–124 bp u markeru Ld30, 106–138 bp u markeru Ld31, 165–189 bp u markeru Ld42, 200–212 bp u markeru Ld45, 221–245 bp u markeru Ld56, 137–187 bp u markeru Ld58 a 184–196 bp u markeru Ld101.

U všech vzorků byly nalezeny maximálně 2 alely pro zkoumané lokusy, což potvrzuje diploidní charakter modřínu opadavého (PLUESS 2011). Pomocí statistického programu CERVUS byly pro použité lokusy stanoveny hodnoty počtu alel, pozorovaná heterozygotnost, očekávaná heterozygotnost, počty heterozygotů a stanoven polymorfní informační obsah (tab. 2). U sledovaných 218 jedinců byl průměrný počet

Tab. 2.

Parametry genetické diversity získané z 218 jedinců ze semenných sadů modřínu opadavého pro použitých 13 mikrosatelitových markerů
Genetic diversity parameters for the working set of 13 microsatellite loci applied to 218 sampled European larch trees of seed orchards

Lokus/Loci	k	H _o	H _e	Počet heterozygotů/ Number of heterozygotes	PIC	HW	F (null)
bcLK211	20	0.688	0.805	150	0.794	***	0.0937
Ld50	9	0.794	0.838	173	0.815	ns	0.0270
bcLK228	18	0.839	0.902	183	0.893	ns	0.0350
bcLK189	13	0.706	0.783	154	0.755	***	0.0603
bcLK253	11	0.697	0.724	152	0.677	***	0.0138
Ld30	8	0.615	0.701	134	0.653	***	0.0571
Ld58	17	0.872	0.906	190	0.896	ns	0.0157
Ld56	13	0.683	0.852	149	0.834	***	0.1158
Ld31	10	0.889	0.849	193	0.829	ns	-0.0247
Ld45	7	0.702	0.780	153	0.745	ns	0.0515
Ld42	6	0.670	0.711	146	0.656	*	0.0249
Ld101	5	0.353	0.376	77	0.338	ns	0.0178
bcLK263	18	0.488	0.866	106	0.850	***	0.2781

k = Počet různých alel/Number of different alleles

H_o = Heterozygotnost pozorovaná/Observed heterozygosity

H_e = Heterozygotnost očekávaná/Expected heterozygosity

PIC = Polymorfní informační obsah/Polymorphism information content

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

signifikantní/not significant, *** = signifikantní na 0,1% úrovni/significant at the 0.1% level, * = signifikantní na 5% úrovni/significant at the 5% level)

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

alel na lokus 11,923 a průměrná hodnota polymorfního informačního obsahu (Polymorphism Information Content, PIC) 0,7489. Vzhledem ke skutečnosti, že markery jsou klasifikovány jako informativní, pokud hodnota PIC je $\geq 0,5$ (SHARMA et al. 2010), je pouze marker Ld101 (PIC = 0,338) málo informativní. Odchyly od Hardy-Weinbergovy rovnováhy při aplikaci Bonferroniho korekce nebyly u lokusů Ld50, bCLK228, bCLK253, Ld58, Ld31, Ld45 a Ld101 signifikantní, u lokusu Ld42 byla odchylna signifikantní na hladině významnosti $P < 0,05$ a u ostatních lokusů byly odchyly signifikantní na hladině významnosti $P < 0,001$. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) u celkového souboru 218 jedinců byla nejvyšší u lokusu Ld31 (0,889), nejvyšší hodnota očekávané heterozygotnosti (0,906) byla u lokusu Ld58. Stupeň polymorfismu stanovený hodnotou PIC byl zjištěn nejnižší (0,338) u lokusu Ld101 a nejvyšší (0,896) u lokusu Ld58. Pomocí statistického programu GenAlEx 6.503 byly zjištěny průměrné hodnoty Shannonova informačního indexu pro jednotlivé sledované lokusy, které se pohybovaly od 0,733 (lokus Ld101) do 2,497 (lokus bCLK228). U porovnávaných souborů vzorků byla zjištěna 100% polymorfnost sledovaných lokusů. U hodnocených 218 jedinců modřínu opadavého pak bylo celkově detekováno 155 rozdílných alel v 13 lokusech. Nejvíce polymorfni se jevil lokus bCLK211, u kterého bylo identifikováno 20 rozdílných alel u sledovaného souboru vzorků, a nejméně polymorfni byl lokus Ld101, u něhož bylo detegováno pouze 5 alel. V souboru zkoumaných jedinců bylo nalezeno 53 unikátních (privátních alel), privátní alely se vyskytovaly ve všech lokusech. U souboru jedinců ze semenného sadu Bílovice byly na rozdíl od semenného sadu Pabožek nalezeny privátní alely u lokusů Ld30, Ld42 a Ld101. Naopak u semenného sadu Pabožek v porovnání s druhým souborem vzorků byly nalezeny privátní alely u lokusů Ld50 a Ld45. Průměrný počet unikátních alel byl u souboru Bílovice 2,385 a u souboru Pabožek 1,692, průměrná pozorovaná heterozygotnost H_o měla u souboru Bílovice hodnotu 0,677 a u souboru Pabožek 0,746. Pomocí analýzy molekulární variance (AMOVA) byla určena 2% diferenciace mezi sledovanými soubory vzorků a 10% diferenciace mezi všemi sledovanými jedinci.

Na základě fragmentační analýzy 13 lokusů u sledovaných 218 jedinců semenných sadů byly získány multilokusové genotypové profily (MLG). V tab. 3 jsou uvedeny multilokusové genotypové profily zkoumaných klonů (ortetů) zastoupených v semenných sadech. U odebraných vzorků od 42 klonů ze semenného sadu Bílovice byla shoda všech zkoumaných genotypů (jedinců, ramet) potvrzena u 31 klonů, tedy 73,81 % všech testovaných klonů bylo v deklarované identitě. U 4 klonů byl nalezen 1 odlišný roubovanec přiřaditelný k jinému klonu v rámci semenného sadu a u 1 klonu byli nalezeni 2 odlišní roubovanci přiřaditelní k jinému klonu v rámci semenného sadu. Dále byly identifikovány 3 unikátní genotypy nezařaditelné v rámci semenného sadu. Ve dvou případech (klony 519 a 331) byly zjištěny vždy 2 různé genotypy zastoupené shodným počtem ramet. U těchto klonů nelze bez znalosti genetického profilu původního donorového stromu (ortetu) dovodit, které z ramet jsou s vyšší pravděpodobností správně deklarované (pozitivně ověřené). U 170 jedinců byla klonová příslušnost v rámci semenného sadu Bílovice potvrzena u 167, tedy u 98,24 % všech zkoumaných jedinců. U semenného sadu Pabožek byly stanoveny multilokusové genotypové profily zastoupených klonů (tab. 3) a bylo zjištěno 8 dvojic shodných genotypů, v rámci 48 deklarovaných zastoupených klonů, tedy 40 rozdílných multilokusových profilů.

DISKUSE

Analýza mikrosatelitových markerů má široké uplatnění v populační genetice a ve šlechtění rostlin, jedná se o vhodnou a široce využívanou metodu pro identifikaci variet u většiny kulturních druhů rostlin (PAN 2010) i dřevin (ROBICHAUD et al. 2006). Využití mikrosatelitových markerů pro získání informací o genetické diverzitě, diferenciaci populací u rodu *Larix* popsali ve svých studiích např. KHASA et al. (2000), ISODA, WATANABE (2006) a ZHANG et al. (2013). Ve studiích

zaměřených na hodnocení semenných sadů modřínů z hlediska genetických parametrů a rodičovských analýz, včetně možnosti identifikace klonů využili SSR markery např. KLÁPŠTĚ et al. (2014), SUN et al. (2017) nebo CHEN et al. (2018). V naší práci jsme pro molekulární analýzy semenných sadů modřínu opadavého využili polymorfni jaderné mikrosatelitové (SSR) markery popsané v práci WAGNER et al. (2012). Pět v této studii popsaných markerů bylo vyvinuto původně pro japonský modřín (ISODA, WATANABE, 2006), 8 markerů bylo nově vyvinuto pro modřín opadavý. Použité lokusy byly využity pro populační studie, provádění rodičovských analýz, rozlišování ekotypů modřínu opadavého (WAGNER et al. 2015) a vzhledem k vysoké polymorfnosti byly vhodné i pro identifikaci klonové identity. Polymorfnost těchto markerů jsme otestovali na vzorcích modřínu opadavého ze dvou semenných sadů. Na rozdíl od studie WAGNER et al. (2012) jsme pro naše vzorky modifikovali podmínky PCR reakce za účelem získání amplifikačních produktů vyšší kvality vhodnější pro následné vyhodnocení fragmentační analýzy, PCR reakce byly u většiny lokusů provedeny s využitím polymerázy Platinum® Taq DNA Polymerase a byl optimalizován i teplotní cyklus PCR.

WAGNER et al. (2012) provedli analýzy pomocí 13 uvedených markerů u 413 jedinců modřínu opadavého z 18 populací vyskytujících se v celém areálu rozšíření modřínu. Nejvíce polymorfni v jejich studii byly markery bCLK263 (31 alel), bCLK211 (28 alel) a Ld58 (25 alel). NARDIN et al. (2015) využili stejné markery pro sledování genetické diferenciace u 788 jedinců modřínu opadavého ze 4 lokalit z rozličných nadmořských výšek francouzských Alp, jako nejvíce polymorfni markery určili bCLK263 (22 alel), Ld58 (17 alel) a bCLK211 (16 alel). GRAMAZIO et al. (2018) pomocí 12 SSR markerů použitých i v naší práci provedli studii sedmi populací modřínu opadavého, nacházejících se na území Rumunska, sledované populace se vyskytují na jihovýchodní hranici rozšíření modřínu opadavého v Evropě, tedy jsou geograficky izolované od hlavní oblasti rozšíření tohoto druhu. Jako nejvíce polymorfni vyhodnotili markery bCLK263 a bCLK253 (11 alel), nejméně polymorfni byl marker Ld42 (4 alely), šetření bylo provedeno u 3 stromů z každé populace. V případě našich 218 vzorků byl nejvíce polymorfni marker bCLK211 (20 alel), markery bCLK228 a bCLK263 měly 18 alel a Ld58 měl 17 alel.

Pro genotypizaci a studium genetické struktury populací modřínu alpského, nacházejících se v údolí Aletsch ve Švýcarských Alpách využila PLUESS (2011) 9 SSR markerů (z nichž 5 bylo použito v našich analýzách), do studie bylo zahrnuto 300 jedinců modřínu opadavého z centrální populace a 430 jedinců pocházejících z 9 subpopulací z okrajových částí sledovaného území. V tomto souboru 730 vzorků autorka zjistila 115 různých alel, z nichž 13 bylo unikátních. Ve studii NARDIN et al. (2015) bylo u 788 jedinců modřínu opadavého pomocí 11 SSR markerů detegováno 125 alel a 11 unikátních. U našeho souboru 218 vzorků ze dvou semenných sadů jsme pomocí 13 markerů zjistili 155 různých alel a 53 alel bylo privátních; vysoký počet alel je dán i původem zkoumaných jedinců, jedná se o tzv. výběrové stromy, tedy o elitní jedince z rozdílných populací.

Průměrný počet alel na lokus byl u 788 stromů ze studie NARDIN et al. (2015) 11,36. V případě rumunské studie (GRAMAZIO et al. 2018) byl průměrný počet alel na lokus u 21 stromů 7,92, průměrná hodnota pozorované heterozygotnosti (H_o) byla 0,738 a u očekávané heterozygotnosti (H_e) byla hodnota 0,542. Ve studii WAGNER et al. (2015) zjistili u 1026 jedinců ze 45 populací z Alp a střední Evropy při použití 13 SSR markerů (shodných s naší prací) průměrně 22 alel na lokus. V případě námi sledovaného souboru jedinců byl zjištěn průměrný počet alel na lokus 11,923, průměrná hodnota pozorované heterozygotnosti (H_o) byla 0,711 a průměrná hodnota očekávané heterozygotnosti (H_e) byla 0,767.

Mikrosatelitové markery pro identifikaci klonů v semenném sadu modřínu dahurského a pro následné rodičovské analýzy použili SUN et al. (2017). Využití mikrosatelitových markerů pro rodičovské analýzy

Tab. 3.
Multilokusové genotypy (MLG) zkoumaných ortetů
Multilocus genotypes (MLG) of tested ortets

Klon/ Clone	Multiplex 1							Multiplex 2					
	bcLK211	Ld50	bcLK228	bcLK189	bcLK253	Ld30	Ld31	Ld58	Ld56	Ld45	Ld42	Ld101	bcLK263
B_41	198/220	179/179	191/191	154/156	201/203	110/118	124/132	147/165	227/227	200/210	177/181	188/190	202/210
B_65	188/198	165/173	185/189	154/156	201/207	110/122	110/126	137/165	229/229	200/212	177/177	188/188	198/198
B_321	188/190	165/175	173/191	154/156	201/205	110/110	110/124	149/159	233/245	210/212	175/177	188/190	204/212
B_322	190/218	173/173	189/195	152/152	201/207	122/122	124/128	165/165	227/227	210/212	175/175	188/188	200/200
B_323	190/218	165/185	189/195	152/152	203/207	122/122	124/134	151/165	227/227	202/212	175/181	188/188	204/204
B_327	188/208	165/185	185/189	152/158	205/217	116/122	126/136	159/163	227/227	200/210	175/181	188/190	202/246
B_330	188/188	175/175	187/191	150/154	201/203	110/118	124/126	147/161	221/233	206/210	177/181	190/190	200/200
B_331 A	190/192	173/173	187/191	152/158	201/201	110/122	110/128	155/161	229/231	202/202	177/181	188/188	198/200
B_331 B	220/220	165/173	185/191	152/158	201/207	110/122	124/134	141/149	229/229	200/202	177/181	188/190	200/200
B_332	192/192	165/173	191/191	152/154	201/203	110/110	124/130	159/161	229/239	200/210	181/189	188/188	202/202
B_337	190/208	175/187	173/201	152/152	201/203	110/118	126/138	147/161	231/239	202/212	175/181	188/188	202/216
B_338	188/188	175/175	185/199	156/156	201/203	110/118	126/132	141/149	227/233	200/210	181/181	188/196	200/202
B_341	188/206	175/187	173/195	152/156	203/207	110/116	124/132	137/161	227/241	202/208	179/181	188/190	198/198
B_345	188/188	179/187	171/189	152/162	201/201	110/110	128/128	161/161	231/231	202/210	165/177	184/188	198/198
B_519 A	188/188	173/173	175/175	152/156	201/213	110/118	126/134	141/165	229/231	208/210	175/177	188/190	198/202
B_519 B	186/200	165/175	175/199	156/156	201/203	110/110	132/136	141/159	229/233	202/206	165/181	188/192	198/200
B_1257	188/188	175/185	183/201	142/158	203/203	110/110	126/126	141/165	231/241	202/210	177/181	188/188	202/204
B_1258	188/220	187/187	183/195	156/158	201/203	110/112	126/132	155/155	223/231	200/202	175/181	188/188	202/204
B_1263	188/212	183/185	191/199	156/158	203/207	118/118	126/132	141/159	229/241	200/202	175/175	188/190	198/210
B_1267	188/188	173/175	191/199	156/156	201/203	110/122	130/132	159/161	229/233	202/202	177/177	188/188	204/216
B_1269	188/188	173/179	171/195	142/152	203/213	110/122	126/134	165/186	231/245	202/202	175/189	184/188	202/204
B_1272	206/218	173/175	193/197	156/158	203/203	110/110	106/134	147/161	229/233	202/210	179/181	188/188	218/224
B_1273	210/226	165/187	173/183	152/166	207/207	110/116	126/126	155/163	227/241	202/202	181/181	190/190	198/198
B_1274	186/188	175/179	189/199	152/158	201/203	110/118	126/134	147/153	233/235	202/202	175/181	188/188	200/200
B_1276	184/206	179/187	191/201	154/156	201/207	118/118	128/132	141/141	227/227	208/208	177/181	188/188	202/202
B_1277	186/210	165/173	191/197	152/162	203/203	118/118	126/132	155/159	235/241	200/208	175/181	188/188	198/234
B_1281	188/188	165/179	187/197	158/158	203/207	110/110	124/126	153/159	239/239	202/212	177/181	188/188	188/204
B_1282	188/206	173/175	173/201	156/164	201/203	110/110	128/132	155/159	223/227	202/210	177/181	188/190	186/212
B_1283	188/188	185/187	189/199	152/152	201/201	110/118	128/134	151/161	233/239	202/208	175/181	188/190	218/218
B_1284	186/202	165/175	199/199	156/156	201/215	110/110	126/128	155/165	229/229	210/210	175/175	188/188	204/204
B_1285	188/188	173/185	183/189	152/158	205/207	110/122	126/126	141/155	227/245	200/210	175/181	188/188	202/202
B_1292	188/190	165/179	187/191	152/158	203/203	110/122	124/126	163/187	227/241	200/206	177/177	188/188	202/202
B_1296	188/208	185/185	191/199	152/152	201/201	118/118	106/126	155/161	229/229	208/208	181/181	188/190	204/204
B_1297	184/210	165/187	195/197	152/164	207/207	110/118	126/130	141/187	227/227	202/202	165/181	188/188	200/200
B_1298	188/188	173/175	185/191	156/160	203/207	110/120	128/134	159/163	223/229	208/210	177/181	188/188	210/210
B_1302	188/188	173/179	175/205	156/160	201/207	118/122	110/124	153/161	229/229	202/206	177/181	188/188	198/198
B_1303	188/188	173/191	191/193	152/154	201/201	110/118	110/132	141/163	229/229	202/202	177/181	188/188	206/206
B_1305	188/216	173/183	187/191	154/156	203/209	108/118	130/134	145/161	229/235	200/208	177/177	188/188	198/202
B_1308	188/194	185/185	193/201	152/152	207/207	118/124	124/126	141/161	227/227	202/202	165/177	188/188	202/218
B_1310	212/220	173/179	183/183	152/152	201/203	112/122	126/132	153/161	231/231	208/208	177/177	188/192	198/204
B_1311	188/188	179/183	191/199	160/170	205/205	110/118	128/132	153/163	227/241	210/210	175/177	188/190	212/212
B_1313	186/218	173/187	191/201	156/156	201/207	118/118	124/134	163/186	233/241	200/202	177/177	188/188	206/206

Tab. 3. – pokračování
 Multilokusové genotypy (MLG) zkoumaných ortetů
 Multilocus genotypes (MLG) of tested ortets

B_1316	220/222	175/187	195/195	152/152	201/203	110/120	126/128	141/161	229/231	208/208	181/181	188/188	198/198
Pab_038	188/224	173/173	191/205	150/160	203/205	118/120	132/136	139/161	225/229	202/208	177/181	188/188	198/210
Pab_039	188/224	173/185	173/195	152/156	203/203	110/118	132/132	139/157	227/229	202/210	175/177	188/188	204/218
Pab_051	188/224	165/185	175/185	156/162	201/215	110/110	110/124	161/161	233/233	200/202	181/181	184/188	186/202
Pab_103	188/224	173/175	189/201	152/154	203/203	118/122	124/132	147/157	225/227	202/202	175/181	184/188	198/198
Pab_104	192/192	165/173	187/189	152/152	205/207	110/120	126/134	137/153	229/229	200/202	181/181	188/190	202/210
Pab_108	212/212	165/185	185/197	150/156	203/209	118/122	126/132	153/157	225/227	202/202	165/181	190/192	200/200
Pab_111	186/210	173/173	173/173	144/152	201/203	110/110	110/126	151/157	225/229	210/212	175/179	188/190	198/202
Pab_112	188/210	183/187	185/199	152/156	201/203	110/110	110/126	139/139	225/229	206/210	177/181	188/188	202/230
Pab_113/185	188/224	165/179	191/199	152/156	203/207	110/118	126/132	149/157	225/231	202/210	175/175	188/188	198/200
Pab_120	190/216	165/173	175/199	150/154	203/209	110/116	124/124	153/161	225/237	208/210	175/181	190/190	198/204
Pab_121	188/218	179/185	199/207	152/168	201/203	118/122	110/132	151/159	221/237	200/202	175/177	188/188	200/202
Pab_123/156	188/208	175/175	189/201	144/152	201/209	122/122	134/134	149/161	221/225	202/206	165/177	188/190	208/208
Pab_124	188/216	165/175	197/201	156/160	201/203	118/118	110/136	139/151	237/237	202/208	177/181	188/188	206/210
Pab_127/190	188/224	179/187	201/203	152/156	201/205	118/118	132/136	157/157	227/229	202/210	175/177	184/188	202/206
Pab_128	192/224	173/173	189/203	154/154	201/203	122/122	126/132	161/161	229/243	202/210	177/181	184/188	200/202
Pab_130/153	206/216	173/187	191/205	152/152	195/201	110/118	124/134	139/161	227/231	200/200	177/181	188/188	204/208
Pab_131	188/212	165/175	183/201	160/162	203/203	110/118	130/134	139/161	225/233	200/202	175/177	188/188	200/200
Pab_132	188/224	175/185	175/203	150/158	201/205	110/118	128/132	147/157	235/235	206/208	177/177	188/190	202/202
Pab_143	184/224	173/183	183/205	152/152	201/203	110/122	110/132	139/151	225/231	202/212	179/181	188/188	0/0
Pab_145/146	188/188	183/191	203/205	150/156	203/203	110/110	124/124	145/157	227/237	210/210	175/181	188/188	200/214
Pab_147/154	186/224	173/173	183/197	142/156	203/203	110/118	126/132	157/157	225/227	202/210	175/177	188/188	198/200
Pab_148	186/206	165/175	185/189	154/156	195/203	110/110	126/132	157/157	225/225	202/212	175/177	188/188	198/202
Pab_149	188/224	173/187	175/189	158/164	201/207	118/118	124/132	139/151	229/233	202/208	181/181	188/188	198/202
Pab_151	224/224	185/187	191/191	152/160	203/207	110/122	110/128	157/183	225/227	200/202	175/181	188/190	186/210
Pab_152	188/210	173/179	183/195	152/152	203/221	110/122	126/132	139/153	221/225	208/210	181/181	188/190	186/200
Pab_155	188/224	175/175	191/201	150/154	201/201	110/116	124/130	139/139	233/233	210/210	181/181	188/188	202/204
Pab_157	184/224	175/183	201/213	150/152	201/201	110/110	124/124	139/151	225/233	202/204	181/181	188/188	202/204
Pab_159	190/224	175/175	185/197	164/168	201/207	112/112	128/128	139/147	229/231	202/210	181/181	188/188	202/202
Pab_163/164	188/200	175/183	189/211	152/156	201/203	118/118	124/132	157/159	225/239	202/210	165/181	188/190	218/218
Pab_166	184/224	165/175	173/197	152/154	201/221	110/118	124/124	157/157	229/231	202/210	177/177	184/188	222/222
Pab_167	168/168	173/173	195/199	154/154	215/215	110/118	0/0	153/161	229/231	202/202	177/181	190/190	206/208
Pab_178	210/224	165/173	185/199	142/156	203/219	110/110	124/124	139/161	225/231	200/202	175/177	190/190	206/206
Pab_182	188/188	165/185	199/201	152/156	203/207	116/120	124/124	151/157	227/227	210/212	181/181	188/188	208/214
Pab_183	184/224	173/175	173/189	152/158	201/203	110/110	124/124	139/139	229/237	200/210	181/181	188/188	200/202
Pab_186	188/188	173/189	173/185	152/162	201/219	110/118	124/136	139/153	225/229	202/206	175/177	188/188	198/206
Pab_187	188/194	173/179	191/195	156/158	207/219	110/116	124/132	145/157	225/231	210/210	177/181	188/188	198/198
Pab_188/239	188/188	179/185	187/201	150/168	205/219	110/116	132/136	159/161	225/243	210/212	175/181	188/188	200/204
Pab_189	208/210	173/175	189/191	152/152	201/207	110/118	124/136	153/157	231/237	200/202	175/181	188/190	202/204
Pab_245	188/224	175/187	175/189	152/152	201/207	110/118	124/134	151/159	227/237	200/210	177/181	184/188	202/204
Pab_246	208/224	175/187	189/189	160/166	203/203	110/110	124/132	157/161	225/227	202/210	177/181	188/188	200/200

u modřinu západního popsali též KLÁPŠTĚ et al. (2014). V námi sledovaných semenných sadech byly SSR markery využity pro identifikaci ortetů modřinu opadavého.

Vybrané markery a optimalizované metodické postupy je možné využít i pro rozlišování ekotypů modřinu opadavého, např. možnost identifikace sudetského ekotypu, který projevuje odolnost vůči rakovině modřinu (WAGNER et al. 2015). Identifikace ekotypu je možná při využití dat získaných z referenčních populací z evropského areálu původního výskytu modřinu opadavého, příslušná databáze je budovaná ve výzkumných stanicích INRA (Pierroton a Orléans).

ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit možnosti využití SSR markerů pro hodnocení klonové identity roubovanců u semenných sadů modřinu opadavého (*Larix decidua* Mill.) a posoudit vhodnost markerů pro sledování genetické diverzity u populací modřinu opadavého. K identifikaci klonové příslušnosti bylo využito 13 polymorfních mikrosatelitových lokusů uspořádaných do dvou multiplexů. Na základě provedených fragmentačních analýz u souboru 218 jedinců ze dvou semenných sadů byly získány statistické charakteristiky 13 mikrosatelitových markerů. Celkově bylo detekováno 155 rozdílných alel v 13 lokusech. Nejvíce polymorfní se jevil lokus bCLK211, u kterého bylo identifikováno 20 rozdílných alel u sledovaného souboru vzorků, a nejméně polymorfní byl lokus Ld101, u něhož bylo detegováno pouze 5 alel. Na základě provedených analýz byly stanoveny multilokusové genotypové profily (MLG) jednotlivých klonů modřinu opadavého v semenných sadech Bílovice a Pabožek. U semenného sadu Bílovice byla shoda genotypových profilů jedinců u sledovaných klonů při použití 13 SSR markerů potvrzena v 73,81 % případů. V analyzovaném souboru bylo možné 167 roubovanců přiřadit k příslušným ortetům, tedy 98,24 % ramet bylo možné přiřadit k ortetům zastoupeným v semenném sadě. V případě semenného sadu Pabožek bylo v rámci 48 deklarovaných zastoupených klonů zjištěno 40 rozdílných multilokusových profilů.

Využití DNA analýz při výběrů stromů do šlechtitelských programů se jeví jako užitečný doplňkový šlechtitelský nástroj, např. pro provedení rodičovských analýz či určení ekotypu modřinu rezistentního vůči rakovině modřinu.

Poděkování:

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0118 a v rámci řešení výzkumného projektu NAZV č. QK1810129.

LITERATURA

- BACILIERI R., DUCOUSO A., KREMER A. 1996. Comparison of morphological characters and molecular markers for the analysis of hybridization on sessile and pedunculate oak. *Annales des Sciences Forestières*, 53: 79–91. DOI: 10.1051/forest:19960106
- BEHM A., KONNERT M. 2002. Proposal for a seed certification scheme. *Dendrobiology*, 47: 105–108.
- FRÝDL J. 2017. Sudetský ekotyp modřinu a jeho kulturní populace v lesním hospodářství ČR. In: Modřín jako součást lesa přírodě blízkého. Sborník příspěvků ze semináře. 11. 4. 2017, Roztoky u Křivokláta. Praha, Česká lesnická společnost: 45–54.
- GRAMAZIO P., PLESA I.M., TRUTA A.M., SESTRAS A.F., VILANOVA S., PLAZAS M., VICENTE O., BOSCAIU M., PROHENS J., SESTRAS R.E. 2018. Highly informative SSR genotyping reveals large genetic diversity and limited differentiation in European larch (*Larix decidua*) population from Romania. *Turkisch Journal of Agriculture and Forestry*, 42: 165–175. DOI: 10.3906/tar-1801-41
- GREILHUBER J. 1986. Severely distorted Feulgen-DNA amounts in *Pinus* (Coniferophytina) after non-additive fixations as a result of meristematic self-tanning with vacuole contents. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 28: 409–415.
- GUICHOUX E., LAGACHE L., WAGNER S., CHAUMEIL P., LÉGER P., LEPAIS O., LEPOITTEVIN C., MALAUSA T., REVARDEL E., SALIN F., PETIT R.J. 2011a. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11: 591–611. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x
- GUICHOUX E., LAGACHE L., WAGNER S., LÉGER P., PETIT R.J. 2011b. Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). *Molecular Ecology Resources*, 11: 578–585. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.02983.x
- HORMAZA J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 321–328.
- CHEN X., SUN X., DONG L., ZHANG S. 2018. Mating patterns and pollen dispersal in a Japanese larch (*Larix kaempferi*) clonal seed orchards: a case study. *Science China Life Sciences*, 61: 1011–1023. DOI: 10.1007/s11427-018-9305-7
- ISODA K., WATANABE A. 2006. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 664–666. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01291.x
- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ P., MATĚJKA K. 2013. Analysis of the genetic structure of a model Scots pine (*Pinus sylvestris*) seed orchard for development of management strategies. *Journal of Forest Science*, 59: 377–385.
- 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.
- KHASA P.D., NEWTON C.H., RAHMAN M.H., JAQUISH B., DANCİK B.P. 2000. Isolation, characterization, and inheritance of microsatellite loci in alpine larch and western larch. *Genome*, 43: 439–448.
- KLÁPŠTĚ J., LSTIBŮREK M., EL-KASSABY Y.A. 2014. Estimates of genetic parameters and breeding values from western larch open-pollinated families using marker-based relationship. *Tree Genetic & Genomes*, 10: 241–249. DOI: 10.1007/s11295-013-0673-1
- KONNERT M., FOFFOVÁ E., FOFF V. 2006. Možnosti kontroly identity lesního reprodukčního materiálu genetickými metodami. In: Sarvaš M., Sušková M. (eds.): Aktuálně problémy lesního školkářství, semenářství 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.
- LEFÈVRE S., WAGNER S., PETIT R.J., DE LAFONTAINE G. 2011. Multiplexed microsatellite markers for genetic studies of beech. *Molecular Ecology Resources*, 12: 484–491. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03094.x
- LITT M., LUTY J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397–401.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J. 2014. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého. *Zprávy lesnického výzkumu*, 59 (4): 243–249.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., POKORNÁ E., TRČKOVÁ O. 2017. Hodnocení semenného sadu třešně ptačí s využitím mikrosatelitových markerů. *Zprávy lesnického výzkumu*, 62 (4): 271–278.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O. 2019. Zhodnocení semenného sadu lípy srdčité pomocí mikrosatelitových markerů. *Zprávy lesnického výzkumu*, 64 (4): 217–223.
- MATRAS J., PÂQUES L. 2008. Technical guidelines for genetic conservation and use for European larch (*Larix decidua*). Rome, Bioversity International: 6 s.
- NARDIN M., MUSCH B., ROUSSELLE Y., GUÉRIN V., SANCHEZ L., ROSSI J.P., GERBER S., MARIN S., PÂQUES L., ROZENBERG P. 2015. Genetic differentiation of European larch along an altitudinal gradient in the French Alps. *Annals of Forest Science*, 72: 517–527. DOI: 10.2007/s13595-015-0483-8
- PAN Y.-B. 2010. Databasing molecular identities of sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers. *American Journal of Plant Sciences*, 1: 87–94.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- PLUESS A.R. 2011. Pursuing glacier retreat: genetic structure of a rapidly expanding *Larix decidua* population. *Molecular Ecology Resources*, 20: 473–485. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04972.x
- ROBICHAUD R.L., GLAUBITZ J.C., RHODES O.E. JR., WOESTW K. 2006. A robust set of black walnut microsatellites for parentage and clonal identification. *New Forests*, 32: 179–196.
- SHARMA M.V., KANTARTZI S.K., STEWART J.M. 2010. Molecular diversity and polymorphism information content of selected *Gossypium hirsutum* accessions. In: Oosterhuis D.M. (ed.): Summaries of Arkansas cotton research 2009. Fayetteville, Arkansas Agricultural Experiment Station: 124–127. Research Series 582.
- SCHUELER S., TUSCH A., SCHUSTER M., ZIEGENHAGEN B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46: 95–102.
- SUN W., YU D., DONG M., ZHAO J., WANG X., ZHANG H., ZHANG J. 2017. Evaluation of efficiency of controlled pollination based parentage analysis in a *Larix gmelinii* var. *principis-rupprechtii* Mayr. seed orchard. *PLoS ONE* 12 (4): e0176483. DOI: 10.1371/journal.pone.0176483
- ŠINDELÁŘ J., FRÝDL J., NOVOTNÝ P. 2006. Původní rozšíření modřínu opadavého (*Larix decidua* Mill.) na území České republiky, jeho uplatnění a další perspektivy v lesním hospodářství. In: Neühoferová P. (ed.): Modřín – strom roku 2006. Sborník recenzovaných referátů z konference. 26. – 27. 10. 2006. Praha, ČZU v Praze; Hradec Králové, LČR: 9–17.
- ŠINDELÁŘ J., FRÝDL J. 2006. Význam modřínu opadavého (*Larix decidua* Mill.) pro lesní hospodářství ČR. In: Modřín opadavý – původní dřevina Jeseníků. Sborník z celostátního semináře. 17. 10. 2006, Krnov. Praha, Česká lesnická společnost: 4–14.
- TAUTZ D. 1989. Hypervariability of a simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463–6471. DOI: 10.1093/nar/17.16.6463
- WAGNER S., GERBER S., PETIT R.J. 2012. Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch). *Molecular Ecology Resources*, 12: 717–725. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2012.03139.x
- WAGNER S., LIEPELT S., GERBER S., PETIT R.J. 2015. Within-range translocations and their consequences in European larch. *PLoS ONE*, 10 (5): e0127516. DOI: 10.1371/journal.pone.0127516
- ZHANG Z., ZHANG H., DU J., ZHANG L. 2013. RAPD and SSR analysis of genetic diversity of natural *Larix gmelinii* population. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27 (4): 3959–3965. DOI: 10.5504/BBEQ.2013.0059
- Zpráva 2020. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2019. Praha, Ministerstvo zemědělství ČR: 124 s. Dostupné na/Available on: http://www.akcr.cz/data_ak/20/v/LesVyrocni2019.pdf

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY AND CLONAL IDENTITY OF EUROPEAN LARCH USING MICROSATELLITE MARKERS

SUMMARY

The aim of the study was to determine the possibility of using SSR markers for assessing clonal identity of European larch trees in seed orchards and determine the suitability of markers for the analysis of genetic diversity in Czech population of European larch (*Larix decidua* Mill.). Microsatellites (SSR) are highly variable markers that are commonly used in population genetic studies for analyses of gene flow, parentage analyses, and studies of genetic diversity (KHASHA et al. 2000; ISODA, WATANABE 2006; GUICHOUX et al. 2011b; LEFÈVRE et al. 2011; PLUËSS 2011; ZHANG et al. 2013; KLÁPŠTĚ et al. 2014). Nuclear simple sequence repeat (SSR) markers have proven to be extremely useful particularly for characterizing cultivars and identifying clones (HORMAZA 2002; SCHUELER et al. 2003; PAN 2010; SUN et al. 2017; CHEN et al. 2018). Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from young needles taken from 218 sampled trees of two seed orchards. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR was optimized for the tested primers that had been found in some publications (ISODA, WATANABE 2006; WAGNER et al. 2012) (Table 1). Thirteen polymorphic nuclear microsatellite markers were selected, and specific primers were fluorescently labelled. Measuring of the size of amplification products was carried out using Applied Biosystems 3500 genetic analyser. The obtained data were analysed by statistical programs CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007) and GenAEx 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012). Altogether 155 different alleles were detected at 13 loci of the 218 larch individuals from two seed orchards, i.e. 11.923 alleles per locus on average. The most polymorphic locus in our set of samples was locus bCLK211, the number of different alleles was estimated to be 20. By applying the 13 suitable markers to the 90 clones from model seed orchards we obtained multilocus genotypes (MLG) shown in Table 3. Table 2 shows number of alleles, observed heterozygosity, expected heterozygosity, number of heterozygotes, Polymorphism Information Content (PIC), significance of deviations from Hardy-Weinberg equilibrium and estimated null allele frequencies (according to van Oosterhout) of loci. Number of alleles at each locus ranged from 5 to 20. Expected heterozygosities ranged between 0.376–0.906 across all loci, and observed heterozygosities ranged from 0.353 to 0.889. Polymorphism Information Content (PIC) ranged from 0.338 to 0.896. The mean PIC value for thirteen selected loci was 0.7489.

These results illustrate the utility of the microsatellite loci for assessing spatial patterns of genetic diversity and for individual identification. The identified genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for assessment of diversity and clonal identification of larch trees. 98.24 % of the sampled trees could be assigned to the clones represented in Bílovice seed orchard.

The application of SSR markers could be an important tool for population genetics and breeding of larch. For example, it would be possible to determine sudetan ecotype of larch, which is particularly cancer-resistant, and then use these selected individuals as source of forest reproductive material (FRM) for establishing seed orchards.

Zasláno/Received: 05. 11. 2020

Přijato do tisku/Accepted: 20. 11. 2020