LESNICKÝ PRŮVODCE

METODICKÉ POSTUPY KLONOVÉ IDENTIFIKACE A STANOVENÍ GENETICKÉ DIVERZITY DUBU ČERVENÉHO (*QUERCUS RUBRA* L.) NA ZÁKLADĚ ANALÝZ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ



Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.
Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.
Ing. OLGA TRČKOVÁ
Ing. FRANTIŠEK BERAN

Certifikované METODIKY PRO PRAXI

4/2024

Metodické postupy klonové identifikace a stanovení genetické diverzity dubu červeného (*Quercus rubra* L.) na základě analýz mikrosatelitových markerů

Certifikovaná metodika

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.
Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.
Ing. Olga Trčková
Ing. František Beran

Strnady 2024

Lesnický průvodce 4/2024

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 978-80-7417-277-9
ISSN 0862-7657

METHODOLOGICAL PROCEDURES FOR CLONAL IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY OF RED OAK (*QUERCUS RUBRA* L.) BASED ON ANALYZES OF MICROSATELLITE MARKERS

Abstract

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for monitoring the genetic variability and for determination of the clonal identity in species red oak. The red oak (*Quercus rubra* L.) is a tree native to the eastern and central parts of the USA. In the Czech Republic, it is used in forestry from the lowlands to the hills, as one of the most common introduced trees, which grows faster than czech native oaks in favourable habitats and gives good yields. It is also introduced into forest stands on poor, acidic and degraded soils as a soil protection and melioration tree. The methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of the polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products, and molecular data calculations. The selected trees of red oak from 4 localities (Hraběšín, Chlumec n. C., Svatá Anna, Oslov) were used to develop this methodology. Fifteen selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for finding the genetic parameters for verifying the levels of genetic diversity between different red oak genotypes, and they can be used to determine the clonal identity. Although this species is considered invasive, it is more resistant to climate change and grows better than native oaks, and could therefore be used as a replacement tree for wood production. Using the presented methodology of DNA analysis, it will be possible to verify the genetic parameters of phenotypically high-quality individuals and to select suitable clones ensuring sufficient diversity for the establishment of propagation stands, for potentially economically use this trees species in changing environmental conditions.

Key words: red oak; introduced species; DNA analysis; microsatellite markers; genetic diversity; clonal identification

Oponenti: Ing. Vlasta Knorová, DiS., Ministerstvo zemědělství ČR, odbor hospodářské úpravy a ochrany lesů

RNDr. Radka Podlipná, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Adresa autorů:

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

Ing. František Beran

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

e-mail: machova@vulhm.cz
cvrckova@vulhm.cz
trckova@vulhm.cz
beran @vulhm.cz

Obsah:

I CÍL METODIKY 7

II VLASTNÍ POPIS METODIKY 8

1 ÚVOD 8

2 METODICKÉ POSTUPY 11

2.1 Odběr vzorků a postupy izolace DNA 11

2.2 Postupy PCR amplifikace 13

2.3 Postupy elektroforézy v agarózovém gelu 21

2.4 Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů 22

2.5 Zpracování molekulárních dat 23

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ 26

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY 27

V EKONOMICKÉ ASPEKTY 29

VI DEDIKACE 36

VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY 37

VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 43

SUMMARY 45

PŘÍLOHA 47

Zkratky použité v textu:

DNA	deoxyribonukleová kyselina
nSSR	nuclear Simple Sequence Repeats (jaderné mikrosatelity)
SSR	Simple Sequence Repeats (mikrosatelity)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

I CÍL METODIKY

Cílem metodiky je představit postupy DNA analýz s využitím polymorfních mikrosatelitových markerů pro sledování úrovně genetické diverzity a zjišťování klonové identity u dubu červeného jako potenciálně hospodářsky využitelné dřeviny vzhledem ke schopnosti zdárně odrůstat v měnících se podmínkách prostředí. Pomocí představených postupů DNA analýz lze u rostoucích porostů dubu červeného ověřovat hodnoty genetické diverzity a vybírat variabilní zdroje reprodukčního materiálu pro zvýšení adaptačního potenciálu této dřeviny.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Úvod

Dub červený (*Quercus rubra* L.) je dřevina původem z východní a střední části USA a její areál rozšíření částečně zasahuje i do jižní centrální části Kanady. Hraniční linie výskytu tvoří v USA na západě státy Minnesota a Missouri, na jihu pak stát Alabama. Východní hranicí přirozeného rozšíření je pobřeží Atlantického oceánu. V Kanadě se vyskytuje v pásu od oblasti Velkých jezer až po ostrovy prince Edwarda. Ve své domovině se vyskytuje ve smíšených porostech na značné škále stanovištních podmínek a po dubu bahenním (*Q. palustris*) je to druhý zde nejčastěji rostoucí druh dubu. Bývá označován jako severní dub červený, aby se odlišil od jižního dubu červeného (*Q. falcata*) (Nelson et al. 2014).

Do Evropy se dostal kolem roku 1700, kdy byl pravděpodobně poprvé dovezen do Francie (Hickel 1932). Jeho první využití bylo v zámeckých zahradách a parcích. Později se postupně rozšířil po celé západní a střední Evropě. Kolonizoval některé oblasti Belgie, Francie, Německa, Polska a v některých případech se stal invazivním druhem. V Německu se jedná o nejrozšířenější nepůvodní listnatou dřevinu, jejíž rozloha činí 55 000 ha (Burkardt et al. 2021). V evropských lesích se vyskytuje především na okrajích lesních porostů, tam kde je dostupnost světla a dostatek taninu, což jsou nejdůležitější podmínky pro přežití tohoto druhu a jeho dlouhověkost. První bližší poznatky o růstu dubu červeného v porostech pochází právě z Německa koncem 19. století.

V ČR je lesnicky využíván od nížin po kopcoviny, vzácně i v podhorském stupni (max. Loučná nad Desnou, 610 m n. m.) jako jedna z nejčastějších introdukovaných dřevin, která roste na příznivých stanovištích rychleji než naše domácí duby a dává dobré výnosy. Do lesních porostů je zaváděn i na chudé, kyselé a degradované půdy jako půdoochranná a meliorační dřevina. Je vhodný k zalesňování průmyslových oblastí, např. při rekultivaci hald (Novotný et al. 2022). Jde o dřevinu rychle rostoucí, částečně tolerující zástin, zcela mrazuvzdornou, snášející i pozdní mrazy. Uspokojivě odolává znečištěnému ovzduší a omezeně i krátkodobé záplavě. Dobře prosperuje i na méně bohatých písčitohlinitých, ale dostatečně hlubokých a vlhkých půdách, kde může alternovat naše hlavní duby, oproti nimž má nižší nároky na úrodnost půdy a světlo a značně je převyšuje objemovou produkcí (např. Křivánek 2006; Vacek et al. 2009; Miltner 2017; Kupka, Podrázský 2019; Kupka, Vopálka-Melicharová 2020), byť o něco méně kvalitního dřeva. V posledních letech dochází v ČR k mírnému zvýšení rozšíření dubu červeného (DBC). V roce 2010 zaujímala plocha tohoto druhu dubu kolem 6000 ha a celková zásoba

byla odhadována na 900 000 m³ (Kouba, Zahradník 2011). V roce 2018 pak rozloha dosáhla 6101 ha a zásoba činila 1 138 000 m³ (Beran 2018). V inventarizaci za rok 2023 ÚHÚL (2024) eviduje zastoupení DBC na ploše 6719 ha, což představuje 0,25 % porostní plochy lesů. Porostní zásoba 1 493 543 m³ je 0,21 % celkové zásoby dřevní hmoty. Průměrný věk porostů dubu červeného je necelých 53 let. Největší zastoupení této dřeviny je v lesích na území hlavního města Prahy (3,12 %) a dále ve Středočeském kraji (0,75 %). V lesích hlavního města Prahy je také evidován nejstarší průměrný věk (62 let), naopak nejmladší průměrný věk DBC je v Moravskoslezském kraji (46 let). Více jak 40 % porostů se zastoupením dubu červeného se nachází v 5. a 6. věkovém stupni.

Dub červený je považován za dřevinu potencionálně schopnou zdárně odrůstat v měnících se podmínkách prostředí (Úradníček 2014). Z předchozích, především zahraničních studií je zřejmé, že na určitých stanovištích předčí v mladším věku domácí druhy dubů v růstu a později i v celkové produkci dřevní hmoty. Dle platné legislativy je považován za dřevinu meliorační a zpevňující, schopnou plnit požadované funkce lesa v široké škále stanovištních a porostních podmínek. Nověji byl však dub červený v rámci legislativně nezávazného odborného návrhu zařazen na tzv. černý národní seznam invazních nepůvodních druhů (Pergl et al. 2016a, 2016b). Při hodnocení trvalých výzkumných ploch VÚLHM, v. v. i., byla invazivnost zjištěna pouze na 2 plochách z 33 založených (Beran et al. 2024). V zahraniční literatuře (Chmura 2013) bývá zmiňován negativní vliv tohoto druhu na biodiverzitu určitých skupin organismů.

Dosavadní poznatky o dubu červeném vychází z neúplných informacích o této dřevině z dřívější doby. Použití zahraničních poznatků pro domácí podmínky je velmi omezené a rozsáhlejší řešení problematiky DBC nebylo dosud v ČR realizováno. V rámci ČR existují dílčí studie zabývající se dubem červeným z různých hledisek, jako je morfologie (Buriánek et al. 2013), škůdci (Dolejský 1996), produkce semen a obnova (Miltner, Kupka 2016), produkce dřeva (Réh, Réh 1997) a vliv na stav lesních půd (Miltner et al. 2017; Podrázský, Kupka 2024). Vzhledem k uvedeným skutečnostem by bylo vhodné zabývat se všemi klíčovými aspekty spojenými s hospodářským využitím DBC v podmínkách zejména chudých až degradovaných stanovišť nižších a středních poloh, kde lze z hlediska potenciální produkce očekávat lepší výsledky v porovnání s domácími druhy dubů. S uplatněním DBC jako substituční dřevinou se zatím nepočítá, pokud by však nastalo rozsáhlé hynutí původních druhů dubů, nelze jeho využívání v budoucnu vyloučit (Stuchlíková 2021a, 2021b). Vzhledem k dlouhodobosti lesnického hospodaření v kontrastu s intenzitou klimatických extremit v současnosti je řešení a hledání optimalizovaných přístupů k DBC potřebné.

Informace o genetických charakteristikách populací i jedinců dubu červeného získané na základě aplikace molekulárních analýz mohou rozšířit poznatky o tomto druhu lesní dřeviny. První práce zaměřené na studium genetické variability dubu červeného byly publikovány již v roce 1987 (Manos, Fairbrothers), jednalo se o studium populací dubů v USA pomocí izoenzymových markerů, v roce 1993 Daubree a Kremer sledovali s využitím 4 izoenzymatických systémů genetickou variabilitu populací dubu červeného ve Francii. V roce 2002 byl pro dub červený publikován panel polymorfních jaderných SSR lokusů (Aldrich et al.). Další panel vysoce polymorfních SSR markerů popsali Sullivan et al. (2013). EST-SSR markery pro dub červený využitelné i pro další druhy dubů vyvinuli Müller, Gailing v roce 2018. Identifikaci haplotypů dubu červeného na základě PCR–RFLP analýzy realizovali např. Aldrich et al. (2003), Magni et al. (2005), Birchenko et al. (2009) nebo Pettenkofer et al. (2020). Zhang et al. (2015) a Pettenkofer et al. (2019) využili pro genetická studia dubu červeného chloroplastové mikrosatelitové markery. V roce 2022 publikovali ve své práci Götz, Gailing sadu nově vytvořených polymorfních chloroplastových mikrosatelitových markerů.

SSR markery byly využity pro studium genetické variability u provenincí dubu červeného (Kim et al. 2021), genetické diversity a struktury u populací dubu červeného (Borkowski et al. 2017; Lind, Gailing 2013; Gerwein, Kesseli 2006), pro sledování toku genů mezi populacemi (Collins et al. 2015), pro určení klonové identity a příbuznosti v rámci semenného sadu (Alexander, Woeste 2017) i pro určení genetické podobnosti introdukovaných populací dubu červeného v Evropě s původními populacemi v USA (Pettenkofer et al. 2020). Burkardt et al. (2021) využily vybrané EST-SSR markery pro genetickou charakterizaci morfologicky rozdílných jedinců dubu červeného. V roce 2024 Gómez Quijano et al. na základě SNP analýzy provedli hodnocení kvantitativních znaků a diferenciace u 30 amerických populací dubu červeného.

Na základě provedeného testování 33 v literatuře uvedených SSR markerů na vzorcích dubu červeného z porostů v ČR byly vybrány polymorfní SSR lokusy využitelné pro hodnocení genetické diversity, diferenciace, příbuznosti i klonové identifikace pro jedince i populace dubu červeného. Optimalizované metodické postupy SSR analýz jsou představeny v následujících kapitolách.

2 Metodické postupy

2.1 Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Pro získání kvalitních izolátů DNA je nejvhodnějším termínem odběru rostlinného materiálu jarní období, kdy lze odebírat rašící pupeny nebo čerstvé listy. Při použití starších listů se z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů snižuje kvalita i kvantita izolované DNA. Nevyhovující kvalita výchozího DNA eluátu může zkomplikovat nebo znemožnit navazující analýzy. Během manipulace se vzorky jednotlivých stromů je nutné pečlivé vedení evidence, aby nedošlo k záměně mezi vzorky. Vzorky se již při odběru označí, uloží do mikroténového sáčku a udržují při nízké teplotě přibližně 4 °C (např. lze použít chladicí tašky s namraženými destičkami), abychom zabránili degradaci DNA. Ideální je vzorky co nejrychleji přepravit ke zpracování do laboratoře. DNA lze izolovat z čerstvého, zmraženého nebo lyofilizovaného rostlinného materiálu. V případě, že izolace DNA není provedena ihned po přijmutí vzorků, je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevidování, nastřihání na vhodnou velikost apod.) uložit minimálně do - 20 °C. Další možností, jak dlouhodobě uchovat vzorky, je jejich vysušení s využitím lyofilizátoru a poté jejich vzduchotěsné uzavření. Lyofilizovaný materiál lze skladovat při pokojové teplotě a snadněji se s ním manipuluje před homogenizací. Pro izolaci DNA u lesních dřevin se v naší laboratoři nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN (Qiagen, Hilden, Germany) dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Tato metoda izolace je poměrně časově nenáročná a získají se dostatečně kvalitní DNA eluáty. Před zahájením vlastního postupu izolace se přidá ethanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. Inkubační lázeň se nechá nahřívat na 65 °C. V případě výskytu sraženin v pufrech AP1 a AW1 se roztoky nahřejí pro odstranění těchto sraženin.

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

1. Maximální množství výchozího rostlinného materiálu pro jeden vzorek je 100 mg čerstvého pletiva nebo 20 mg lyofilizovaného pletiva. Rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na prášek, například za použití tekutého dusíku aplikovaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách, případně lze využít homogenizátor rostlinného materiálu (např. Precellys´ Evolution Touch, Bertin Technologies, France). Utřený materiál se přenese se do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

2. K rozdrcenému vzorku se napipetuje 400 µl pufru AP1 a následně 4 µl RNázy A. Pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se nechá inkubovat 10 minut při 65 °C, během inkubace se musí směs promíchávat 2–3 × převracením zkumavek.
3. Přidá se 130 µl pufru P3, krátce se promíchá pomocí vortexu a inkubuje 5 minut na ledu a poté centrifuguje 5 minut při rychlosti 14 000 otáček za minutu (dále jen „rpm“).
4. Vzniklý lyzát se přepipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm.
5. Přefiltrovaná frakce se přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky s odečtením získaného objemu. Dáváme pozor, abychom nenabrali případný pelet.
6. Přidáme pufr AW1 v množství odpovídajícímu 1,5násobku objemu odebrané frakce a ihned opakovaným nasáváním a vypouštěním pomocí mikropipety vzniklou směs promícháme.
7. Odpipetujeme 650 µl směsi a přemístíme do DNeasy Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.
8. DNeasy Mini Spin kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 µl pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
9. Přidáme dalších 500 µl pufru AW2 a centrifugujeme 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm. Poté vyndáme opatrně DNeasy Mini Spin kolonku ze zkumavky, abychom se nedotkli proteklé kapaliny.
10. Přeneseme DNeasy Mini Spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Přidáme 100 µl AE pufru, který aplikujeme přímo na membránu DNeasy Mini Spin kolonky. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 minutu při rychlosti 8 000 rpm. Získáme 100 µl prvního eluátu.
12. Opakujeme krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu. Vzorky DNA skladujeme při -20 °C, pro dlouhodobé uchování při -80 °C.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

Kvalita extrahované DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. U izolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/µl a čistotu na základě poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm s využitím spektrofotometru na mikroobjemy. Hodnoty pro optimální čistotu by se měly pohybovat v rozmezí 1,7–1,9, nižší nebo vyšší hodnoty indikují přítomnost dalších nežádoucích látek (např. proteinů, fenolických látek). Vzorky DNA s koncentrací nad 50 ng/µl je vhodné pro optimální průběh PCR amplifikace naředit AE pufrem.

2.2 Postupy PCR amplifikace

Pro sledování genetických rozdílů na základě DNA analýz mezi zkoumanými stromy musí být využity vhodné polymorfní markery. Pro dub červený bylo ověřováno 33 mikrosatelitových markerů – nuclear simple sequence repeats (nSSR) a byly vybrány mikrosatelity quru-GA-0C11, quru-GA-0E09 a quru-GA-1F07 z publikace Aldrich et al. (2002), 1P10, 2P24, 3A05, 3D15, FIR030, FIR031, FIR048 a POR003 z publikace Sullivan et al. (2013), GOT004, PIE099 a QpZAG15 z publikace Lin, Gailing (2013) a marker Qr0237 z publikace Müller, Gailing (2018). Celkem bylo vybráno 15 polymorfních markerů vhodných pro sledování klonové identity, genetické diverzity a rozlišování genetických struktur porostů různého původu. Mikrosatelity představují krátké repetice nejčastěji složené ze 2–4 bází nukleotidových motivů, které se u jedinců liší jejich počtem, tedy délkou mikrosatelitových lokusů. Tyto specifické markery mají kodominantní charakter, což umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů. Pro možnost analýzy těchto markerů u izolované DNA jednotlivých stromů musí proběhnout jejich amplifikace s využitím PCR (polymerázové řetězové reakce) a detekce velikostí PCR produktů v počtu párů bází (bp). Délka mikrosatelitového lokusu bývá obvykle mezi stem až třemi sty párů bází, a aby bylo možné tento specifický úsek na chromozomu detegovat mezi miliardami ostatních nukleotidů DNA je nutné získat jeho mnohonásobné kopie. PCR probíhá s využitím primerů (krátké oligonukleotidy 20–30 bp), které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. Směs, v níž PCR probíhá, obsahuje templátovou DNA, forward a reverse primery, nukleotidtrifosfá-

ty, termostabilní polymerázu a reakční pufr. Jejich koncentrace a vzájemné poměry jsou pro průběh PCR klíčové. Velmi často je nezbytné optimalizovat složení reakční směsi tak, aby výtěžky namnožených úseků DNA byly dostatečně vysoké a spolehlivé. PCR je třístupňový proces opakovaný v několika cyklech. Tyto stupně zahrnují denaturaci, při které jsou obvykle při 94 °C obě vlákna DNA od sebe oddělena, přichycení primerů (annealing) k oběma koncům jednotlivých vláken DNA většinou při teplotě mezi 50–60 °C podle komplementarity nukleotidů a prodlužování řetězce při teplotě 72 °C, kdy termostabilní polymeráza přidává k vláknům s přichycenými primery podle komplementarity nukleotidy dodané v reakční směsi. Nové DNA sekvence slouží jako předloha pro další cykly amplifikace. PCR se provádí v automatizovaných teplotních cyklovačích.

Motivy repetic mikrosatelitových markerů, sekvence primerů a rozmezí získaných velikostí jejich amplifikátů v počtu párů bází jsou uvedeny v tabulce 1.

Pro PCR amplifikaci vybraných markerů byly optimalizovány koncentrace reakčních směsí příslušných chemických komponent (Tab. 2) a teplotní cykly polymerázových řetězových reakcí jednotlivých multiplexů (Tab. 3, 4) pro získání reprodukovatelných a velikostně příslušných amplifikátů použitých lokusů. Pro odečtení velikostí amplifikovaných specifických DNA úseků v párech bází (bp) na genetickém analyzátoru se musí použít fluorescenčně značené primery, získané syntézou u komerční firmy. Optimalizace reakcí probíhaly i za účelem seskupení PCR amplifikací do multiplexů, aby z důvodu časových a finančních úspor mohly probíhat analýzy několika markerů najednou. Podmínkou společné amplifikace je stejný průběh PCR podmínek a barevné rozlišení velikostně se překrývajících mikrosatelitových lokusů. PCR amplifikace 15 vybraných markerů byly sestaveny do tří multiplexů podle velikostí amplifikovaných lokusů a nastavení reakčních podmínek. První multiplex se skládá z markerů QpZAG15, quru-GA-0C11, FIR048, GOT004, POR003, druhý multiplex z markerů quru-GA-0E09, quru-GA-1F07, FIR030, FIR031 a třetí multiplex z markerů 1P10, 2P24, 3A05, 3D15, PIE099, Qr0237. Reakční chemikálie je nutné udržovat v chladu a přípravu reakční směsi je potřebné dělat na ledu nebo chladové destičce. DNA polymerázu musíme neustále uchovávat při -20 °C a pipetujeme ji do reakční směsi až nakonec jen s krátkým vyjmutím z mrazicího boxu.

Tab. 1: Vybrané mikrosatelitové lokusy, motivy repetic, sekvence primerů a rozmezí velikostí v počtu párů bází sledovaných lokusů, získané ze sledovaných stromů dubu červeného

Lokusy	Motivy repetic	Sekvence primerů (5´-3´)	Rozmezí velikostí PCR produktů (bp)
quru-GA-0C11	$(GA)_{15}$	F: ATACCCAGCTCCCATGACCA R: TCCCCAAATTCAGGTAGTGT	198–228
quru-GA-0E09	$(GA)_{16}$	F: TGCCATCCCTATACACAACCA R: CCTCCATCACAAAGTTGCC	172–222
quru-GA-1F07	$(GA)_{22}$	F: CCGGTCAAAGAAGTTATCAGA R: GGGTGGATTGGGTTTCTACCTA	303–351
1P10	$(TG)_{12}GCC(TG)_3$	F: ATTTCTGATGCAGGGTGTCG R: TAGGCCAAGGACCAGAGACC	237–258
2P24	$(CA)_{14}$	F: GCAAGAGATCACACACAAACTAGC R: CTTTGGGTTCACCAAACAGC	140–168
3A05	$(CA)_{11}(CT)_2$	F: AACGTGACCTCTCTCACAGC R: AGTGCTGGAGTGCTCATGG	132–156
3D15	$(CA)_{15}$	F: GGTGGTGGCAGATACACTGG R: GACTCAGACAACCAACTTCAGG	210–228
FIR030	$(AG)_7$	F: GGACATATTTATCTAGGAGACGAGGT R: ATGTCCCATAGCACAGAGCA	158–178
FIR031	$(TC)_7$	F: ACGAGTCCAACGGAAGTTGT R: CACAACTTCACAAGGCAAGG	137–169
FIR048	$(CT)_9$	F: TGCACCAAAATTGGAGGATG R: TTGATGCAAGGTGCAGTTTC	187–209
POR003	$(CT)_8$	F: CTCGCTCTCCTCCCCTAATC R: AGCTTTGATCGAGTCCGAAA	90–114

Tab. 1: Pokračování – Vybrané mikrosatelitové lokusy, motivy repetic, sekvence primerů a rozmezí velikostí v počtu párů bází sledovaných lokusů, získané ze sledovaných stromů dubu červeného

GOT004	$(TG)_{12}$	F: GGGCATATTGATCGCTTAGG R: TGACGATTCATACATTCCATGAT	268–290
PIE099	$(TC)_{9}$	F: GTAAAACGACGGCCAGTGTGGCTACCGACTACTA R: CCACTTCCGGTGGACCCAATATGTAAC	204–230
QpZAG15	$(AG)_{23}$	F: CGATTTGATAATGACACTATGG R: CATCGACTCATTGTTAAGCAC	100–132
Qr0237	CGC	F: GTCTGTTGCTGTTGGGGAAT R: ATCGCAGAGCAGGTTATCGT	95–116

Protokoly polymerázové řetězové reakce (PCR):

Multiplex 1 (SSR lokusy, koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):

QpZAG15 F – 8 μM (6FAM), QpZAG15 R – 8 μM

quru-GA-0C11 F – 1 μM (VIC), quru-GA-0C11 R – 1 μM

FIR048 F – 2 μM (NED), FIR048 R – 2 μM

GOT004 F – 6 μM (6FAM), GOT004 R – 6 μM

POR003 F – 2 μM (VIC), POR003 R – 2 μM

Ředění primerů:

Příprava TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA) – 10 ml roztoku připravíme z 10 μl 1M Tris – HCl a 0,2 μl 0,5M EDTA, doplníme H_2O (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich) do 10 ml.

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100μM koncentrace (100 pmol/μl) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μl, ze zásobního roztoku primerů napipetujeme QpZAG15 F − 8 μl, QpZAG15 R − 8 μl, quru-GA-0C11 F − 1 μl, quru-GA-0C11 R − 1 μl, FIR048 F − 2 μl, FIR048 R − 2 μl, GOT004 F − 6 μl, GOT004 R − 6 μl, POR003 F – 2 μl, POR003 R – 2 μl a doplníme 62 μl TE pufru).

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

Tab. 2: Složení reakční směsi na PCR amplifikaci

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 × PCR Buffer, minus Mg	1,5 µl
50 mM $MgCl_2$	0,6 µl
10 mM dNTP mix (2,5 mM každý)	0,1 µl
Primer mix	0,75 µl
Platinum Taq DNA Polymerase	0,075 µl
H_2O (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich)	10,975 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	

(chemikálie Platinum® Taq DNA Polymerase, 10 × PCR Buffer minus Mg, 50 mM $MgCl_2$, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou Platinum Taq), 10 mM dNTP mix (Invitrogen by Life Technologies)

Tab. 3: Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	5 min	Počáteční denaturace
		35 × opakovat od 2. do 4. kroku	
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	60 °C	45 sec	Annealing (nasednutí primerů)
4.	72 °C	55 sec	Elongace (prodlužování řetězce)
		1×	
5.	72 °C	15 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Multiplex 2 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):

quru-GA-0E09 F − 1 μM (VIC), quru-GA-0E09 R − 1 μM

quru-GA-1F07 F − 2 μM (6FAM), quru-GA-1F07 R − 2 μM

FIR030 F − 2 μM (NED), FIR030 R − 2 μM

FIR031 F − 2 μM (PET), FIR031 R − 2 μM

Ředění primerů:

Provedeme naředění primerů na zásobní roztoky 100μM koncentrace jako u multiplexu 1.

Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μl, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů quru-GA-0E09 F − 1 μl, quru-GA-0E09 R − 1 μl, quru-GA-1F07 F − 2 μl, quru-GA-1F07 R − 2 μl, FIR030 F − 2 μl, FIR030 R − 2 μl, FIR031 F – 2 μl, FIR031 R – 2 μl, a doplníme 86 μl TE pufru).

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

Složení reakční směsi a teplotní režim pro PCR amplifikaci jsou stejné jako u multiplexu 1 (Tab. 2, 3).

Multiplex 3 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):

1P10 F − 2 μM (VIC), 1P10 R − 2 μM

2P24 F − 2 μM (6FAM), 2P24 R − 2 μM

3A05 F − 1 μM (NED), 3A05 R − 1 μM

3D15 F − 1 μM (NED), 3D15 R − 1 μM

PIE099 F − 8 μM (PET), PIE099 R − 8 μM

Qr0237 F − 2 μM (VIC), Qr0237 R − 2 μM

Ředění primerů:

Provedeme naředění primerů na zásobní roztoky 100μM koncentrace dle příkladu multiplexu 1. Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μl napipetujeme ze zásobního roztoku primerů 1P10 F – 2 μl, 1P10 R – 2 μl, 2P24 F − 2 μl, 2P24 R − 2 μl, 3A05 F − 1 μl, 3A05 R − 1 μl, 3D15 F − 1 μl, 3D15 R − 1 μl, PIE099 F − 8 μl, PIE099 R − 8 μl, Qr0237 F − 2 μl, Qr0237 R − 2 μl a doplníme 68 μl TE pufru).

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

Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci je stejné jako u multiplexu 1 (Tab. 2).

Tab. 4: Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 ºC	5 min	Počáteční denaturace
		35 × opakovat od 2. do 4. kroku	
2.	94 ºC	45 sec	Denaturace
3.	62 ºC	45 sec	Annealing (nasednutí primerů)
4.	72 ºC	55 sec	Elongace (prodlužování řetězce)
		1×	
5.	72 ºC	15 min	Finální elongace
6.	4 ºC	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a sterilní špičky, mikrozkumavky (stripy, destičky PCR s víčky), chladicí box na PCR mikrozkumavky, chladicí destička nebo ledová tříšť, centrifuga, teplotní cyklovač

2.3 Postupy elektroforézy v agarózovém gelu

Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů se provádí pomocí horizontální elektroforézy na 2% agarózových gelech. Agaróza (Agarose SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) se rozpouští zahříváním v 0,5 × TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B. V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k překypění roztoku. K vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se používá fluorescenční barvivo např. GelRed (GelRed™Nucleic acid Gel Stain, 10,000XinWater, Biotium, Hayward). GelRed lze přidat hned do rozpuštěného teplého agarózového roztoku v poměru 1:10 000 a po promíchání se gel nalije do formy. Do tekutého gelu se ihned vloží hřebínky s vhodným počtem hrotů dle počtu testovaných vzorků. Ztuhlý gel se opatrně přemístí do vany pro elektroforézu, vyjmou se hřebínky a přilije se 0,5 x TBE pufru tak, aby roztok přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se pipetují PCR amplifikáty (15 µl) smíchané se 4 µl pufru (gel loading buffer, Sigma-Aldrich). Pro porovnání velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1 µl standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4 µl destilované vody a 2 µl pufru (gel loading buffer).

V elektrickém poli se pohybují záporné fragmenty DNA ke kladné elektrodě, jejich migrační schopnost závisí na jejich relativní hmotnosti (velikosti amplifikátu). Potřebná doba trvání procesu elektroforézy je zpočátku 30 minut při napětí 60 V a dalších 120–150 minut při napětí 100 V. Po proběhlé elektroforéze se gely dokumentují pod UV zářením pomocí kamerového systému. DNA fragmenty se v gelovém nosiči projevují jako fluoreskující proužky. Příklad elektroforetického záznamu amplifikačních produktů testovaných markerů 1P10 a 2P24 je uveden v příloze (Obr. 4).

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, sada pipet a sterilní špičky, mikrovlnná trouba, vortex, horizontální elektroforéza se zdrojem, fluorescenční dokumentační systém gelů

2.4 Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů

Zjištění přesné velikosti amplifikovaných fragmentů v hodnotách párů bází se provádí na genetickém analyzátoru (např. typu Applied Biosystem 3500). Polymerázová řetězová reakce musí být provedena s fluorescenčně označenými primery (pro uvedený typ analyzátoru na 5´ konci s modifikacemi 6FAM, VIC, NED, PET) a PCR amplifikáty musí být před fragmentační analýzou následujícím způsobem denaturovány na jednovláknové fragmenty. Nejprve se PCR produkty jednotlivých vzorků napipetují po 1 µl do 96jamkových destiček určených pro analyzátory (např. MicroAmp 96 Well Reaction Plate od ABI Applied Biosystem), pak se ke každému vzorku přidá 11 µl směsi připravené z Formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystem) a velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ® Size standard v 2.0, Applied Biosystem). Směs se připravuje v objemech 11 µl Formamidu a 0,4 µl velikostního standardu na jeden vzorek a pomocí vortexu se krátce promíchá. Po napipetování směsi k amplifikátům se destička krátce stočí na centrifuze, aby se roztok usadil na dnu jamky, a pak se destička inkubuje 4 minuty při teplotě 94 °C, následuje prudké zchlazení na ledu po dobu minimálně 2 minut.

Genetický analyzátor pracuje na principu elektroforetického rozdělení jednovláknových fragmentů DNA v tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Polymer i fragmenty DNA zkoumaného vzorku jsou do kapiláry naplňovány automaticky. Detekce fragmentovaných úseků je založena na hodnocení fluorescence z fluorescenčně označených primerů po excitaci laserovým zářením. Přístroj je schopen souběžně detekovat vícebarevnou fluorescenci, a to umožňuje v multiplexovém uspořádání hodnotit najednou více markerů, což je z časových i finančních důvodů velmi výhodné. Pro správnou identifikaci amplifikátů analyzovaných lokusů je nutné jejich kombinaci sestavit z hlediska velikosti alel a fluorescenčního zabarvení primerů.

Amplifikace 15 mikrosatelitových markerů jsou sestaveny do tří multiplexů a navazující fragmentační analýzy probíhají podle multiplexů ve třech bězích. První běh zahrnuje amplifikované lokusy multiplexu 1 (QpZAG15, quru-GA-0C11, FIR048, GOT004, POR003), v druhém běhu probíhá fragmentační analýza PCR produktů multiplexu 2 (quru-GA-0E09, quru-GA-1F07, FIR030, FIR031) a ve třetím běhu multiplexu 3 (1P10, 2P24, 3A05, 3D15, PIE099, Qr0237).

Po provedené denaturaci se destička vkládá do genetického analyzátoru. Ukázky výstupů fragmentačních analýz z genetického analyzátoru jsou uvedeny v příloze (Obr. 5).

Odečtení velikostí v hodnotách párů bází (bp) u amplifikovaných lokusů se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems), který

z výsledku měření velikostního standardu, který je přidáván ke každému vzorku, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

sada pipet a sterilní špičky, vortex, teplotní cyklovač, centrifuga, 96jamkové destičky příslušné k analyzátoru, genetický analyzátor

2.5 Zpracování molekulárních dat

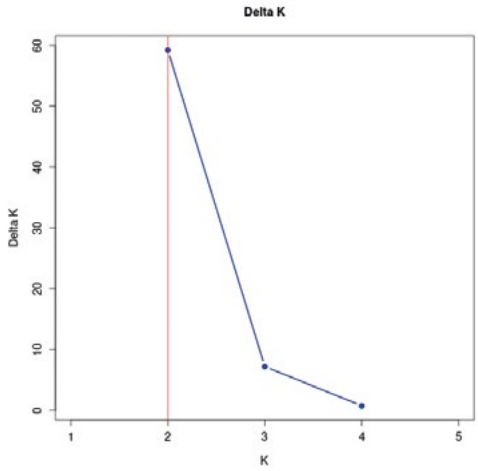
Jaderné mikrosatelitové markery jsou specifické úseky DNA s kodominantním charakterem. U dubu červeného s diploidní sadou chromozómů (2n) to znamená, že u sledovaného lokusu získáme pro každého jedince dvě shodné velikosti alel v případě homozygota a v případě heterozygota dvě různé hodnoty alel. Rozmezí velikostí alel získaných pro jednotlivé lokusy jsou uvedena v tabulce 1.

Získaný přehled hodnot alel u hodnocených lokusů pro jednotlivé stromy dubu červeného (vypracovaná multilokusová genotypizace – MLG) se statisticky zpracovává, např. za využití programů GenAlEx 6.503 (Peakall, Smouse 2006, 2012), CERVUS (Kalinowski et al. 2007), GENEPOP 4.2 (Raymond, Rousset 1995; Rousset 2008), STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003, 2007; Hubisz et al. 2009) pro získání genetických charakteristik sledovaných stromů, porostů a mikrosatelitových markerů. Pro kontrolu správnosti odečtení velikostí mikrosatelitových lokusů včetně ohodnocení frekvence nulových alel lze použít software Micro-Checker (Van Oosterhout et al. 2004).

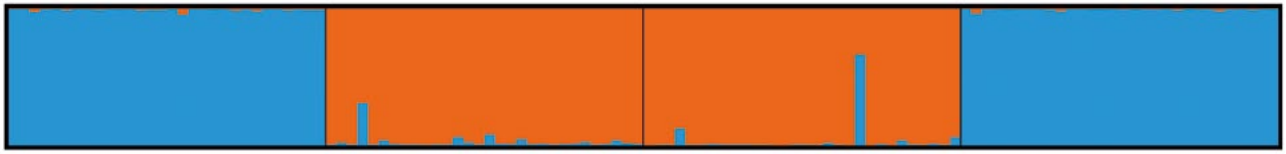
Statistickým zpracováním výsledků analýz vybraných 15 mikrosatelitových markerů lze v porostech dubu červeného sledovat úroveň genetické diverzity, alelické varianty, frekvence alel, genetické diferenciace, hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, odvození populačních struktur apod. Ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi (porosty) lze vypočítat na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (Nei 1972). V případě ověřování klonové identity ve směsi klonů nebo semenném sadu se porovnávají hodnoty alel sledovaných lokusů u jedinců (ramet) příslušných klonů (ortetů) v rámci vypracované multilokusové genotypizace (MLG) – přehled hodnot alel sledovaných lokusů – pro šetřené klony. Příslušnost jedince ke klonu je deklarovaná, když jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů. Pro získání variabilních zdrojů reprodukčního materiálu (ZRM) je potřebné v porostech zhodnotit vzájemnou genetickou příbuznost mezi stromy a vyloučit geneticky identické

nebo blízké stromy. Hodnocení probíhá na základě párového porovnání získaných multilokusových genotypů u šetřených stromů s využitím statistického programu (např. GenAlEx 6.503).

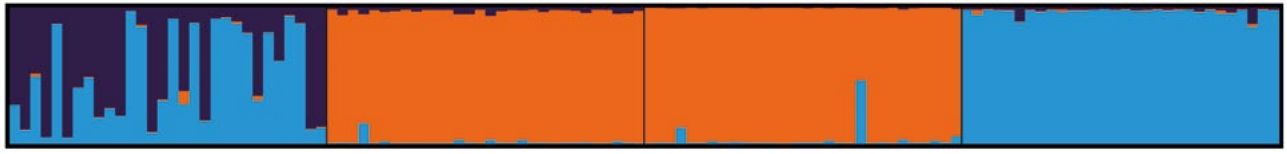
Sledovat genetické rozdíly mezi porosty dubu červeného lze také na základě porovnávání genetických struktur. K odvození struktur se využívá Bayesianská klastrová metoda implementovaná v softwaru STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003, 2007; Hubisz et al. 2009). Podkladem pro STRUCTURE analýzu jsou multilokusová data vybraných polymorfních mikrosatelitových markerů a výsledkem jsou profily genetických struktur barevně rozlišené podle počtu klastrů (K). Optimální hodnotu K lze stanovit na základě výsledků programu STRUCTURE SELECTOR (Li, Liu 2018). Genetické struktury se kvantifikují procentuálními podíly získaných klastrů (znázorněné různými barvami). Pro rozlišení sledovaných porostů dubu červeného byla zpracovaná analýza STRUCTURE, jejíž výsledek při optimální hodnotě K = 2 (nejvyšší hodnota v grafickém výstupu výsledků programu STRUCTURE SELECTOR, Obr. 1) dokumentuje Obr. 2. Výraznější barevné rozlišení sledovaných porostů poskytl výsledek při K = 3 (druhá nejvyšší hodnota z hodnocení STRUCTURE SELECTOR), kdy se v provedené analýze jednotlivé porosty strukturovaly do barevně odlišných profilů (Obr. 3). Genetická podobnost se projevila nejvíce mezi porosty 2 (z plochy Hraběšín) a 3 (z lokality Oslov).



Obr. 1: Graficky znázorněný výstup programu STRUCTURE SELECTOR pro optimální hodnotu K



Obr. 2: Výsledky Structure analýzy při K = 2 pro 4 porosty dubu červeného



Obr. 3: Výsledky Structure analýzy při K = 3 pro 4 porosty dubu červeného

DBC-CH: porost dubu červeného z plochy Chlumec n. C., DBC-HR: porost dubu červeného z plochy Hraběšín, DBC-O: porost: dubu červeného z lokality Oslov, DBC-SA: porost dubu červeného z lokality Svatá Anna

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodické postupy zjišťování genetických charakteristik na základě DNA analýz u mikrosatelitových markerů nebyly dosud pro porosty dubu červeného rostoucích v podmínkách České republiky publikovány. Metodické postupy byly zpracované na základě provedení analýz 120 stromů ze 4 porostů z různých PLO (z plochy Hraběšín, PLO 10 – Středočeská pahorkatina; z plochy Chlumec n. C., PLO 17 – Polabí; z polesí Svatá Anna, PLO 8a – Křivoklátsko; z lokality Oslov, PLO 16 – Českomoravská vrchovina) a pro DNA analýzy bylo vybráno 15 otestovaných polymorfních mikrosatelitových markerů: quru-GA-0C11, quru-GA-0E09 a quru-GA-1F07 z publikace Aldrich et al. (2002), 1P10, 2P24, 3A05, 3D15, FIR030, FIR031, FIR048, a POR003 z publikace Sullivan et al. (2013), GOT004, PIE099 a QpZAG15 z publikace Lind, Gailing (2013) a marker Qr0237 z publikace Müller, Gailing (2018). Metodika podrobně popisuje optimalizované postupy DNA analýz pro získání reprodukovatelných výsledků, zahrnující odběry rostlinných vzorků, získání eluátů DNA, postupy PCR amplifikací vybraných mikrosatelitových lokusů, postupy fragmentačních analýz na genetickém analyzátoru a zpracování molekulárních dat. Pro možnost analyzování velkých souborů vzorků byly postupy analýz také zaměřeny na seskupení vybraných mikrosatelitových lokusů do multiplexů, kdy probíhají PCR amplifikace a fragmentační analýzy několika lokusů najednou, což přináší úsporu času potřebného pro provedení analýz a celkovou úsporu finančních nákladů. PCR amplifikace a fragmentační analýzy byly optimalizovány pro analýzy 15 markerů do tří multiplexů. S využitím genetického analyzátoru získáme přesné rozlišení alel, například lze zjistit i rozdílnou velikost amplifikačního produktu o jednu repetici motivu (u dinukleotidových motivů jen o 2 báze). Výstupem fragmentačních analýz je vypracovaná databáze velikostí alel 15 mikrosatelitových lokusů u šetřených jedinců dubu červeného. Po statistickém zpracování genetických veličin získáme informace o genetických charakteristikách u hodnocených porostů, jako jsou např. úroveň genetické diverzity, diferenciace, heterozygotnosti, genetické vzdálenosti. Zhodnocení genetické příbuznosti uvnitř porostu lze provést párovým porovnáním získaných multilokusových genotypů a tím také získat informace o identických nebo geneticky blízkých genotypech. Získané poznatky mohou být využity pro výběr vhodných zdrojů reprodukčního materiálu nebo také pro klonovou identifikaci např. v semenných sadech nebo směsích klonů.

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Genetická diverzita populací lesních dřevin má podstatný vliv na jejich kvalitu a schopnost adaptace a hraje zásadní roli při zajišťování schopnosti porostů odolávat různým biotickým a abiotickým stresům v měnících se podmínkách prostředí. Je proto důležité vybírat jako zdroje reprodukčního materiálu pro založení variabilní množitelské základny v proveniencích nebo porostech dubu červeného geneticky odlišné stromy. Úroveň polymorfismu introdukovaného dubu červeného rostoucího na území ČR souvisí s variabilitou v minulosti dováženého osiva. Předložené metodické postupy umožní ověřovat úroveň genetické diverzity v porostech nebo na založených provenienčních plochách v rámci České republiky a na základě výsledků DNA analýz vybírat dostatečně variabilní zdroje reprodukčního materiálu. Metodické postupy také umožní v porostech zjistit geneticky totožné jedince v případě vegetativní obnovy pařezovými výmladky (Nicolescu et al. 2020). Dub červený je považován za potencionálně invazní druh, jehož šíření se musí v lesích korigovat, ale z hlediska jeho lepší odolnosti ke změnám klimatu především k vyšším teplotám a nedostatku srážek v porovnání s domácími druhy dubů a také vzhledem k větší schopnosti růstu v méně příznivých podmínkách, může kontrolované pěstování tohoto druhu i v blízké budoucnosti zajistit pro lesní hospodářství významnou náhradu v produkci dřeva. Popsané metodické postupy se uplatní při zajištění kvalitních genetických zdrojů reprodukčního materiálu dubu červeného s dostatečnou variabilitou pro případné širší uplatnění v lesním hospodářství, kde vedle vyšších produkčních schopností se tento druh uplatní i jako meliorační a zpevňující dřevina. V případě založení semenných sadů nebo směsí klonů se metodické postupy analýz uvedených 15 mikrosatelitových markerů (quru-GA-0C11, quru-GA-0E09, quru-GA-1F07, 1P10, 2P24, 3A05, 3D15, FIR030, FIR031, FIR048, POR003, GOT004, PIE099 QpZAG15 a Qr0237) uplatní pro objektivní ověřování příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu).

Míra invazivního šíření jedinců dubu červeného může být ovlivněna i genetickými predispozicemi. Na 33 v ČR založených výzkumných plochách VÚLHM, v. v. i., s dubem červeným bylo invazní šíření zjištěno pouze na 2 plochách (Beran et al. 2024). Genetické studie zaměřené na možnost využití DNA analýz s příslušnými DNA markery k identifikaci potenciálně invazivních genotypů by mohly být s úspěchem využity v lesnické praxi.

Popsané metodické postupy pro ověřování úrovně genetické diverzity budou využity pro potřeby vlastníků lesa při rozšířeném pěstování dubu červeného v případě dopadu nepříznivých ekologických změn. Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat. Metodické postupy byly odzkoušeny na vybraných 4 porostech z různých PLO. Příklady výstupů DNA analýz jsou uvedeny v příloze (Obr. 4, Obr. 5, Tab. 10, Tab. 11).

Možnosti uplatnění může komplikovat finanční náročnost přístrojového vybavení především genetického analyzátoru pro fragmentační analýzy, ale ty je možné si objednat na zakázku u komerčních firem (např. SEQme s.r.o., Genomac výzkumný ústav, s.r.o., BIOCEV).

V EKONOMICKÉ ASPEKTY

Vyšší produkční schopnost u dubu červeného a další výhody této dřeviny jako je např. vyšší odolnost ke klimatickým změnám, možnost zalesnění i méně příznivých stanovišť nebo meliorační využití lze zařadit mezi ekonomické aspekty pěstování dubu červeného.

V odborné literatuře z roku 2011 dle Kouby a Zahradníka je uvedeno, že plocha dubu červeného (*Quercus rubra, L.*) zaujímá v České republice 5 131 ha, což představuje 0,20 % porostní plochy s porostní zásobou přibližně 900 000 m^3.

Podle údajů SLHP k roku 2023 (Tab. 5) však činí k roku 2023 tato plocha již 6 719 ha se zásobou 1 493 503 m^3, což svědčí o nárůstu zastoupení dubu červeného v dřevinné skladbě ČR.

Tab. 5: Dub červený – zastoupení ploch a porostních zásob podle věkových stupňů

Věkový stupeň	Porostní plocha (ha)	Zásoba dřeviny celkem (m^3)
0 - holina	0	0
1 - 1. věk.st.	280,55	144
2 - 2. věk.st.	317,23	9 866
3 - 3. věk.st.	732,33	88 169
4 - 4. věk.st.	706,57	124 521
5 - 5. věk.st.	1 192,93	255 370
6 - 6. věk.st.	1 594,68	406 254
7 - 7. věk.st.	577,65	164 903
8 - 8. věk.st.	245,54	75 782
9 - 9. věk.st.	363,84	121 564
10 - 10. věk.st.	290,46	99 951
11 - 11. věk.st.	205,86	71 286
12 - 12. věk.st.	118,43	41 830
13 - 13. věk.st.	53,25	19 446
14 - 14. věk.st.	22,38	8 315
15 - 15. věk.st.	10,47	3 627
16 - 16. věk.st.	2,53	877
17 - 17. věk.st.	4,31	1 598
CELKEM	6 719,01	1 493 503

Zdroj: ÚHÚL, SIL 2023

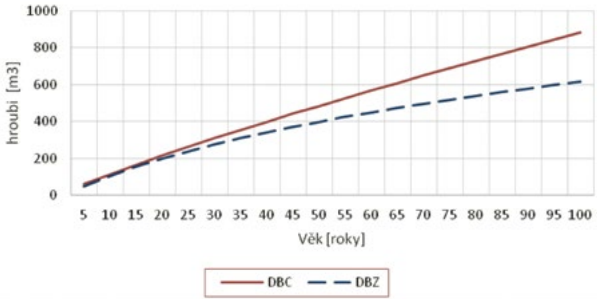
VYŠŠÍ PRODUKČNÍ SCHOPNOST DUBU ČERVENÉHO

Jak domácí, tak i zahraniční údaje dokládají vyšší produkci dubu červeného vzhledem k domácím druhům (Seidel, Kenk 2003). Po provedení průzkumu zdravotního stavu v 80. letech minulého století v porostech dubu červeného (pozn.: v oblasti Polabí) se potvrdilo, že se jedná o dřevinu, která je minimálně poškozená v důsledku tracheomykózního onemocnění (Štefančík, Strmeň 2011).

Výsledky získané na vybraném souboru výzkumných ploch jednoznačně dokumentují produkční převahu dubu červeného nad domácím dubem zimním na stejných stanovištích. Rozdíl ve vývoji výšek obou srovnávaných druhů se projevuje od nejmladších stadií porostu a s rostoucím věkem se zvětšuje. Rozdíly se ještě zvyšují, uvažujeme-li pouze hlavní porost. Podobně se vyvíjí i porostní tloušťka a kruhová výčetní základna porostu. Rozdíly mezi oběma dřevinami s rostoucím věkem porostů se stále více zvětšují a dokládají tak výraznější růstovou dynamiku u dubu červeného.

Pro účely vyjádření ekonomického rozdílu v produkci to pak nejlépe dokumentuje vývoj hektarové zásoby sdruženého porostu a rozdíly mezi oběma druhy dubu. Tato skutečnost je potvrzena i staršími poznatky získanými jinými autory doma i v zahraničí (Kouba, Zahradník 2011).

Ze získaných poznatků vyplývá, že v období tyčkovin a tyčovin jsou hodnoty zásoby hroubí hlavního porostu (1.–3. stromová třída) velmi blízké, ale zhruba od věku 40 let se začíná projevovat větší produkční potenciál dubu červeného a na konci obmýtí rozdíl už představuje více než 200 m^3/ha (Graf 1).



Graf 1: Grafické znázornění vývoje zásoby sdruženého porostu dubu červeného a dubu zimního

Vedle objemových parametrů produkce této dřeviny byly vyhodnocovány i kvalitativní parametry, protože jednou z častých námitek proti této dřevině je, že dub červený vykazuje nižší kvalitu kmene z hlediska přímosti a točivosti. Šetření prokázalo, že rozdíly ve zdravotním stavu na sledovaných plochách jsou zanedbatelné, a to jak u mladých, tak i dospělých porostů. K tomu, aby byl vyloučen vliv podúrovňových a potlačených stromů, jejichž kvalita je samozřejmě výrazně nižší, byly do celkového hodnocení vzaty v úvahu jen stromy první a třetí stromové třídy.

VSTUPY PRO VÝPOČET ZVÝŠENÉHO FINANČNÍHO EFEKTU

Výpočet k vyjádření vyššího ekonomického potenciálu dubu červeného oproti domácímu dubu zimnímu ke srovnatelnému obmýtí 100 let je založen na následujících skutečnostech:

1) porostní zásoba dubu červeného ve 100 letech, vyplývající z dosavadních výzkumných šetření, je vyšší o 200 m^3/ha,
2) byla použita variantní sortimentace listnatého surového dříví podle údajů ČSÚ vycházející z dodávek dříví za rok 2023 a ze sortimentace kulatinových sortimentů s uplatněním cenných výřezů, vyplývající s detailního sortimentačního členění,
3) ceny surového dříví pro dub odpovídají zveřejněné cenové statistice ČSÚ za rok 2023,
4) ceny surových výřezů pro dub I.–II. tř. jakosti byly dosaženy na veřejné dražbě v Deblicích konané na jaře roku 2024,
5) průměrné těžební náklady byly převzaty z podkladů pro Zelenou zprávu za rok 2023.

Vzhledem k nedostatku jiných obdobných informací i k neexistenci růstových tabulek pro dub červený v podmínkách ČR byla za základ následných ekonomických kalkulací vzata informace o rozdílu produkčního potenciálu dubu červeného oproti dubu zimnímu ve výši **200 m^3/ha** (graf 1). Jedná se o výsledky studií ze šetření na výzkumných plochách v PLO Polabí provedených FLD ČZÚ v Praze (Miltner et al. 2016; Miltner, Kupka 2016; Miltner et al. 2017).

Cenové informace týkající se cen jednotlivých sortimentů surového dříví byly vybrány ze zdrojů ČSÚ, kde bylo uvedeno členění na jednotlivé třídy a jakosti kulatinových sortimentů. Z časové řady klouzavých cenových průměrů byly z důvodu

aktuálnosti zvoleny poslední hodnoty v časové řadě, tedy pro výpočet byly použity ceny za klouzavý průměr 3Q/23 – 2Q/24 (Tab. 6).

Tab. 6: Klouzavé průměrné ceny listnatého surového dříví (dub) pro tuzemsko za ČR za vlastníky (Kč/m³)

Název sort.	4Q/22-3Q/23	1Q/23-4Q/23	2Q23-1Q/24	3Q/23-2Q/24
Výřezy III. A/B tř. jakosti	5210	5212	5370	5427
Výřezy III. C tř. jakosti	4228	4303	4349	4269
Výřezy III. D tř. jakosti	3308	3351	3314	3264
Dříví V. tř. jakosti (buničina)	1873	1688	1606	1456
Dříví VI. tř. jakosti (palivo)	1810	1761	1708	1644

Zdroj: ČSÚ

Pro potřeby zjištění ceny I.–II. jakostní třídy u dubové kulatiny byly použity údaje z vyhodnocení dražby v Deblicích konané na jaře roku 2024 (Tab. 7).

Tab. 7: Průměrné ceny vysoutěženého objemu dubu zimního a dubu červeného na dražbách konaných firmou DEBLICE – lesy s.r.o.

Dřevina	Draženo m³	Vysoutěženo m³	Průměrná cena Kč/m³		Nejvyšší vítězná cena v Kč/m³
			Vyvolávací	Vítězná	
DB – I. tř.j.	16,61	16,61	18 000	25 320	38 891
DB – II. tř.j.	404,83	404,83	11 604	17 345	33 154
DB – III. tř.j.	1 110,09	1 110,90	7 031	11 908	35 934
Celkem DB	1 531,53	1 531,53	8 359	13 491	38 891
DBC	27,31	27,31	2 224	3 149	7 076

Zdroj: Zpráva z vyhodnocení dražby, která se konala 14. – 20. března 2024, firma DEBLICE – lesy s.r.o.

VÝPOČET FINANČNÍHO EFEKTU

Objem porostní zásoby **200 m³/ha** rozdělený na podíly jednotlivých listnatých sortimentů podle údajů ČSÚ byl pro účely výpočtu rozdělen do dvou variant (varianta 1 a varianta 2), přičemž

1) **varianta 1** vychází z dodávek dříví v roce 2023 rozdělených na 3 hlavní sortimenty, tj. na kulatinu, vlákninu a palivo včetně přiřazení průměrných cen surového dříví v Kč/m³
2) **varianta 2** používá detailnější členění u kulatinových sortimentů surového dříví**,** ke kterým byly přiřazeny klouzavé cenové průměry (pozn.: s výjimkou výřezů I.–II. tř. jakosti, kde se uplatnila dosažená cena v dražbě).

Výsledky výpočtu podílu sortimentů na celostátní úrovni podle jednotlivých variant jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8: Procentické zastoupení podílu sortimentů z celostátních dodávek listnatého surového dříví podle dvou variant sortimentace

Název sort.	Podíl sortimentů z dodávek dříví (varianta 1)		Podíl sortimentů v rámci kulatiny (varianta 2)	
	m³	%	m³	%
Dodávky listnaté celkem	1 893 316	100,0		
Kulatina celkem	610 130	32,2		100
Výřezy I.–II. tř. jak.			48 810	8
Výřezy III. A/B tř. jak.			213 546	35
Výřezy III. C tř. jak.			189 140	31
Výřezy III. D tř. jak.			158 634	26
Vláknina a ost. prům. dříví	653 148	34,5		
Dříví V. tř. jak. (buničina)				
Palivové dříví	630 038	33,3		
Dříví VI. tř. jak. (palivo)				

Zdroj: ČSÚ, vlastní výpočet

Výpočet objemu jednotlivých sortimentů v m^3 vztažený jen na 200 m^3/ha a výpočet celkových tržeb v Kč je dokumentován v Tab. 9.

Tab. 9: Výpočet objemu sortimentů surového dříví a zvýšeného finančního efektu pro 200 m^3/ha dubu červeného podle dvou variant sortimentace na základě uskutečněných dodávek dříví za ČR

Název sortimentu	Podíl sortimentů z dodávek dříví (1. varianta)		Prům. cena surového dříví	Cena celkem	Podíl sortimentů v rámci kulatiny (2. varianta)		Prům. cena surového dříví	Cena celkem
	m^3	%	Kč/m^3	Kč	m^3	%	Kč/m^3	Kč
Zvýšená produkce dubu červeného	200			464 242	200			559 742
Kulatina celkem	64	32,2	3435	221 214	64			349 787
Výřezy I.–II. tř. jak.					5	8	17 000*)	87 584
Výřezy III. A/B tř. j.					23	35	5 427	122 325
Výřezy III. C tř. jak.					20	31	4 269	85 226
Výřezy III. D tř. jak.					17	26	3 264	54 652
Vláknina a ost. průmyslové dříví	69	34,5	1861	128 409				
Dříví V. tř. jak. (buničina)					69	69	1 456	100 464
Palivové dříví	67	33,3	1721	114 619				
Dříví VI. tř. jak. (palivo)					67	67	1 644	109 490

Zdroj: ČSÚ, vlastní výpočty

*) Z důvodu neexistence tržní ceny výřezů I.–II. tř. *jakosti* v údajích ČSÚ za rok 2023 byla použita *vítězná cena u dubu II. tř. jakosti dosažená při dražbě konané dne 14.–20. 3. 2024 v Deblicích. Zároveň je nutno upozornit na skutečnost, že v současné době se na našem území nenachází dostatečné zastoupení mýtně zralých porostů dubu červeného, aby se to mohlo projevit v nabídce významnějších objemů a silných sortimentů dubu červeného v dražbách, a to analogicky jako je tomu dnes u plošně rozšířeného dubu (pozn.: viz cenové úrovně ČSÚ pro nejlepší kvality dubu, tj. pro I.–II. tř. jakosti). Tento fakt je doložen dnešní věkovou strukturou dubu červeného vyjádřený plochou a zásobou na základě dat SIL (tabulka 5).*

Z uvedených dvou variant ekonomických kalkulací vyplývá, že při použití detailnější sortimentace a ocenění jednotlivých kulatinových sortimentů (viz varianta 2) lze dospět k lepšímu ekonomickému výsledku, než když se vychází pouze z průměrných celostátních hodnot o cenách (viz varianta 1). Vzhledem k tomu, že varianta 2 je plně v souladu se situací na trhu se surovým dřívím a všechny vstupní kalkulační předpoklady jsou dostatečně odůvodněny, můžeme považovat vyšší výsledek dosažený u varianty 2 za zcela reálný.

Na základě provedených kalkulačních výpočtů lze přijmout závěr, že na stejné ploše lesního pozemku lze při pěstování dubu červeného oproti dubu zimnímu dosáhnout ve 100 letech výrazně **vyššího ekonomického výsledku (vyšších tržeb z prodeje dříví)**, který překračuje při obvyklém hospodaření

a) ve variantě 1 částku cca 460 000 Kč

b) ve variantě 2 částku cca 560 000 Kč.

Jedná se tedy o finanční efekt, který dub červený ve srovnání s dubem zimním vyprodukuje navíc ve stejném věku. Po odpočtu těžebních nákladů ve výši přibližně 600 Kč/m^3, což vztaženo k objemu 200 m^3 představuje 120 000 Kč nákladů, by se **celkový** čistý výnos pohyboval v rozmezí cca **340 000–440 000 Kč.**

Tento zvýšený ekonomický efekt reprezentuje finanční zhodnocení produkčních možností stanoviště vhodného pro pěstování dubu červeného. Vytvořené dodatečné finanční prostředky při pěstování této dřeviny tak mohou vlastníkům lesa významně přispět k zajištění ekonomické životaschopnosti lesních majetků v budoucnosti.

Náklady na postupy genetických analýz uvedených v metodice jsou kalkulovány na spotřební materiál a chemikálie s předpokladem vlastnictví laboratorního vybavení pro analýzy DNA. Na izolaci DNA vzorku z jedince jsou průměrné náklady 129 Kč. Náklady u jedince na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 15 lokusů přibližně 268 Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. Náklady jsou kalkulovány k roku 2024 a je nutné zmínit, že cena chemikálií se stále navyšuje. V uvedené kalkulaci našich nákladů (výzkumné pracoviště) nejsou zahrnuty doplňkové náklady, náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace vybavenosti (materiální i personální) pracoviště. Při využití služeb komerčních laboratoří je možné se obrátit například na společnosti SEQme s.r.o., Genomac výzkumný ústav, s.r.o., BIOCEV.

Přínosy pro uživatele metodiky budou spočívat ve finanční úspoře vynaložených prostředků na vývoj metodických postupů analýz DNA u dubu červeného pro zjišťování úrovně diverzity například při výběru vhodných ověřených jedinců pro jejich uznání za zdroje reprodukčního materiálu a pro klonovou determinaci totožných klonů. Uvedené postupy DNA analýz klonové identifikace jsou využitelné pro kontrolní mechanismy uživatele např. ve směsích klonů nebo při reprodukci klonů potřebných vlastností. Postupy k ověřování genetické diverzity jsou základem cíleného zvyšování genové variability porostů, které budou stabilnější a odolnější k možným chorobám, škůdcům a nepříznivým podmínkám klimatu. Také lze předpokládat zvýšený ekonomický přínos z těžby dřeva u vlastníků lesů ze zvýšených budoucích výnosů z porostů založených z kvalitních ověřených zdrojů reprodukčního materiálu.

VI DEDIKACE

Metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0123 a výzkumného projektu NAZV č. QK22020045 (Potenciál geograficky nepůvodních druhů dřevin v lesním hospodářství ČR).

VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Aldrich P. R., Michler C. H., Sun W. L., Romero-Severson J. 2002. Microsatellite markers for northern red oak (Fagaceae: *Quercus rubra*). Molecular Ecology Notes, 2: 472–474.

Aldrich P. R., Parker G. R., Michler C. H., Romero-Severson J. 2003. Whole-tree silvic identifications and the microsatellite genetic structure of a red oak species complex in an indiana old-growth forest. Canadian Journal of Forest Research, 33 (11): 2228–2237.

Alexander L., Woeste K. 2017. Pollen gene flow, male reproductive success, and genetic correlations among offspring in a northern red oak (*Quercus rubra* L.) seed orchard. PLoS ONE, 12 (2): e0171598. doi:10.1371/journal.pone.0171598

Beran F. 2018. Introdukované dřeviny v lesním hospodářství ČR. Přehled. In: Vacek, Z., Podrázský, V. (eds.): Introdukované dřeviny jako součást českého lesnictví, ČLS, Kostelec nad Černými lesy 17. dubna 2018, Praha, ČLS: 7–16.

Beran F., Fulín M., Dostál J. 2024. Produkční schopnosti dubu červeného (*Quercus rubra* L.) na různých stanovištích v českých lesích. Zprávy lesnického výzkumu, 69 (4): 278–291.

Birchenko I., Feng Y., Romero-Severson J. 2009. Biogeographical Distribution of Chloroplast Diversity in Northern Red Oak (*Quercus rubra* L.). The American Midland Naturalist, 161 (1): 134–145.

Borkowski D. S., Hoban S. M., Chatwin, W., Romero-Severson J. 2017. Rangewide population differentiation and population substructure in *Quercus rubra* L.. Tree Genetics & Genomes, 13: 67. https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s11295-017-1148-6

Buriánek V., Benedíková M., Frýdl J., Novotný P. 2013. Metodická příručka k určování domácích druhů dubů. Lesnický průvodce 8: 42 s.

Burkardt K., Pettenkofer T., Ammer C., Gailing O., Leinemann L., Seidel D., Vor T. 2021. Influence of heterozygosity and competition on morphological tree characteristics of *Quercus rubra* L.: a new single-tree based approach. New Forests, 52: 679–695. https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s11056-020-09814-1

Collins E., Sullivan A. R., Gailing O. 2015. Limited effective gene flow between two interfertile red oak species. Trees, 29: 1135–1148. https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s00468-015-1194-3

Daubree J. B., Kremer A. 1993. Genetic and phenological differentiation between introduced and natural populations of *Quercus rubra* L. Annales des sciences forestières, 50: 271–280.

Dolejský V. 1996. Dub červený a jeho škůdci. Zprávy lesnického výzkumu, 41 (3): 13–16.

e-Agri. 2024. Informace o stavu lesa a myslivosti v ČR [online] [cit. 3. 7. 2024].

Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, 164 (4): 1567–1587.

Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Molecular Ecology, 7 (4): 574–578.

Gerwein J. B., Kesseli R. V. 2006. Genetic diversity and population structure of *Quercus rubra* (*Fagaceae*) in old-growth and secondary forests in southern New England. Rhodora, 108 (933): 1–18.

Götz J., Gailing O. 2022. A novel set of polymorphic chloroplast microsatellite markers for northern red oak (*Q. rubra* L.). Plant Genetic Resources, 20 (2): 174–177. https://doi.org/10.1017/S1479262122000156

Gómez Quijano M. J., Gross B. L., Etterson J. R. 2024. Genetic differentiation across a steep and narrow environmental gradient: Quantitative genetic and genomic insights into Lake Superior populations of *Quercus rubra*. Molecular Ecology, 33: e17483. https://doi.org/10.1111/mec.17483.

Hickel R. 1932. Dendrologie forestière. Paris, Lechevalier: 255 s.

Hubisz M. J., Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Molecular Ecology Resources, 9(5): 1322–1332.

Chmura D. 2013. Impact of alien tree species *Quercus rubra* L. on understorey environment and flora: a study of the Silesian Upland (southern Poland). Polish Journal of Ecology, 61: 431–442.

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.

Kim K. W., Lee K. M., Kwon S. H., Park J. M., Kim Y. G., Kang H. I., Yum D. B., Kang K. S. 2021. Performance and genetic diversity of 23 provenances of northern red oak (*Quercus rubra* L.) after 25 years of growth in South Korea. Journal of Forestry Research, 32: 2181–2188. https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s11676-020-01283-8

Kouba J., Zahradník D. 2011. Produkce nejdůležitějších introdukovaných dřevin v ČR podle lesnické statistiky. In: Prknová H. (ed.): Aktuality v pěstování méně častých dřevin v České republice 2011. Sborník z konference. Kostelec nad Černými lesy 25. listopadu 2011, Praha, ČZU: 52–66.

Křivánek M. 2006. *Quercus rubra* L., 1753 dub červený. In: Mlíkovský, J. Stýblo, P. (eds.): Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky. Praha, ČSOP: 155–156.

Kupka I., Podrázský V. 2019. Dub červený – jedná se o perspektivní dřevinu? In: Introdukované dřeviny – potenciál a rizika jejich pěstování. Sborník příspěvků. Kostelec nad Černými lesy, Truba, 25. 4. 2019. Brno, Česká lesnická společnost: 24–30.

Kupka I., Vopálka Melicharová L. 2020. Northern red oak (*Quercus rubra* L.) as a species suitable for the upcoming seasons with frequent dry periods. Central European Forestry Journal, 66 (2): 97–103.

Lind J. F., Gailing O. 2013. Genetic structure of *Quercus rubra* L. and *Quercus ellipsoidalis* E. J. Hill populations at gene-based EST-SSR and nuclear SSR markers. Tree Genetics & Genomes, 9: 707–722. https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s11295-012-0586-4

Li Y. L., Liu J. X. 2018. StructureSelector: A web based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. Molecular Ecology Resources, 18: 176–177.

Magni C. R., Ducousso A., Caron H., Petit R. J., Kremer A. 2005. Chloroplast DNA variation of *Quercus rubra* L. in North America and comparison with other Fagaceae. Molecular Ecology, 14: 513–524. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02400.x

Manos P. S., Fairbrothers D. E. 1987. Allozyme Variation in Populations of Six Northeastern American Red Oaks (*Fagaceae: Quercus* Subg. *Erythrobalanus*). Systematic Botany, 12 (3): 365–73.

Miltner S. 2017. Pěstování dubu červeného (*Quercus rubra* L.) v podmínkách České republiky. Disertační práce. Praha, FLD ČZU v Praze: 162 s.

Miltner S., Kupka I. 2016. Silvicultural potential of northern red oak and its regeneration – Review. Journal of Forest Science, 62 (4): 145–152.

Miltner S., Kupka, I., Třeštík M. 2016. Effects of Northern red oak (*Quercus rubra* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* (Mattusch.) Liebl.) on the forest soil chemical properties. Forestry Journal, 62. DOI: 10.1515/forj-2016-0020.

Miltner S., Podrázský V., Baláš M., Kupka I. 2017. Vliv dubu červeného (*Quercus rubra* L.) na lesní stanoviště. Zprávy lesnického výzkumu, 62 (2): 109–115.

Müller M., Gailing O. 2018. Characterization of 20 new EST-SSR markers for northern red oak (*Quercus rubra* L.) and their transferability to *Fagus sylvatica* L. and six oak species of section *Lobatae* and *Quercus*. Annals of Forest Research, 61(2): 211–222. https://doi.org/10.15287/afr.2018.1191

Nei M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283–392.

Nelson G., Earle C. J., Spellenberg R. 2014. Trees of Eastern North America. Princeton University Press, Volume 93 in the series Princeton Field Guides, doi.org/10.1515/9781400852994

Nicolescu V. N., Vor V., Mason W. L., Bastien J. Ch., Brus R., Henin J. M., Kupka I., Lavnyy V., La Porta N., Mohren F., Petkova K., Rédei K., Štefančik I., Wąsik R., Perić S., Hernea C. 2020. Ecology and management of northern red oak (*Quercus rubra* L. syn. *Q. borealis* F. Michx.) in Europe: a review. Forestry (Oxford), 93 (4): 481–494. DOI:10.1093/forestry/cpy032

Novotný P., Fulín M., Bažant V. 2022. Katalog taxonů introdukovaných dřevin s potenciálem lesnického využití na stanovištích s nižší dostupností vláhy. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 196 s. Lesnický průvodce 1/2022.

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.

Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155 (2): 945–959.

Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity, 86: 248–249.

Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 8: 103–106.

Pergl J., Sádlo J., Petrusek A., Laštůvka Z., Musil J., Perglová I., Šanda R., Šefrová H., Šíma J., Vohralík V., Pyšek P. 2016a. Black, grey and watch lists of alien species in the Czech Republic based on environmental impacts and management strategy. NeoBiota, 28: 1–37. doi: 10.3897/neobiota.28.4824

Pergl J., Sádlo J., Petrusek A., Pyšek P. 2016b. Seznam prioritních invazních druhů pro ČR. Ochrana přírody, 71 (2): 29–33, XVIII–IXX.

Pettenkofer T., Burkardt K., Ammer C., Vor T., Finkeldey R., Müller M., Krutovsky K., Vornam b., Leinemann L., Gailing O. 2019. Genetic diversity and differentiation of introduced red oak (*Quercus rubra*) in Germany in comparison with reference native North American populations. European Journal of Forest Research. 2019, 38 (2): 275–285. https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s10342-019-01167-5

Pettenkofer T., Finkeldey R., Müller M., Krutovsky K. V., Vornam B., Leinemann L., Gailing O. 2020. Genetic variation of introduced red oak (*Quercus rubra*) stands in Germany compared to North American populations. European Journal of Forest Research, 139: 321–331. https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s10342-019-01256-5

Podrázský V., Kupka I. 2024. Vliv dubu červeného (*Quercus rubra* L.) na stav lesních půd – případová studie. Zprávy lesnického výzkumu, 69 (2): 143–148.

Réh J., Réh R. 1997. Dub červený *(Quercus rubra* L.), jeho vývoj, štruktúra a rastové procesy vplyvom prebierok a možnosti využitie jeho dreva v drevospracujúcom priemysle. Vedecké štúdie 12/1997/A. Zvolen, TU Zvolen: 71 s.

Seidel J., Kenk G. 2003. Wachstum und Wertleistung der Eichenarten in Baden-Württemberg. Der Wald, 58 (1): 28–31.

Stuchlíková L. 2021a. Závazné stanovisko k návrhu oblastního plánu rozvoje lesů pro přírodní lesní oblast č. 31 – Českomoravské mezihoří. Praha, Ministerstvo životního prostředí: 22 s. [cit. 2021-11-30] Dostupné z WWW: <http://www.uhul.cz/images/oprl/plo_31/Zavazne_stanovisko_k_zavadeni_GND_v_PLO_31.pdf>

Stuchlíková L. 2021b. Závazné stanovisko k návrhu oblastního plánu rozvoje lesů pro přírodní lesní oblast č. 32 – Slezská nížina. Praha, Ministerstvo životního prostředí: 17 s. [cit. 2021-11-30] Dostupné z WWW: <http://www.uhul.cz/images/oprl/plo_32/Zavazne_stanovisko_MZP_z_zavadeni_GND_v_PLO32.pdf>

Sullivan A. R., Lind J. F., McCleary T. S., Romero-Severson J., Gailing O. 2013. Development and characterization of genomic and gene-based

microsatellite markers in North American red oak species. Plant Molecular Biology Reporter, 31: 231–239. https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s11105-012-0495-6

Štefančík I., Strmeň S. 2011. Vývoj dubového porastu (*Quercus petraea* Liebl.) postihnutého v minulosti hromadným hynutím. In: Jurásek (ed.): Proceedings of Central European Silviculture – 12th International Conference, Opočno, VÚLHM Jíloviště-Strnady, p. 101–112.

Úradníček L. 2014. Lesnická dendrologie II. Brno, MENDELU v Brně: 127 s.

Vacek S., Kobliha J., Kupka I., Poleno Z., Mikeska M., Baláš M. 2009. Lesní semenářství. In: Poleno, Z. et al.: Pěstování lesů III. Praktické postupy pěstování lesů. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 14–47 s.

Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes, 4: 535–538.

Zhang R., Hipp A. L., Gailing O. 2015. Sharing of chloroplast haplotypes among red oak species suggests interspecific gene flow between neighboring populations. Botany, 93 (10): 691–700.

VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Cvrčková H., Máchová P. 2015. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 36 s. Lesnický průvodce 8/2015.

Cvrčková H., Máchová P. 2016. Genetická charakterizace jedle bělokoré pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 34 s. Lesnický průvodce 5/2016.

Cvrčková H., Máchová P., Poláková L., Trčková O., Žižková E. 2016. Studium variability populací buku lesního pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 35 s. Lesnický průvodce 8/2016.

Cvrčková H., Máchová P., Poláková L., Trčková O. 2017. Evaluation of the genetic diversity of selected *Fagus sylvatica* L. populations in the Czech Republic using nuclear microsatellites. Journal of Forest Science, 63: 53–61.

Cvrčková H., Máchová P., Poláková L., Trčková O. 2017. Hodnocení genetických charakteristik u borovice lesní s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 43 s. Lesnický průvodce 4/2017.

Cvrčková H., Máchová P., Trčková O. 2019. Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u lípy srdčité (*Tilia cordata Mill*). Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 36 s. Lesnický průvodce 4/2019.

Cvrčková H., Máchová P., Trčková O. 2020. Určování klonově identických jedinců modřínu opadavého (*Larix decidua* Mill.) a sledování jejich diverzity na základě analýz u mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 36 s. Lesnický průvodce 3/2020.

Cvrčková H., Máchová P., Trčková O. 2021. Metodické postupy ověřování genetické diverzity a klonové identity u břízy bělokoré (*Betula pendula* Roth) s využitím mikrosatelitových markerů**.** Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 32 s. Lesnický průvodce 4/2021.

Cvrčková H., Máchová P., Čížková L., Vítová K., Trčková O. 2024. Metodické postupy druhové determinace a stanovení genetické diverzity topolu černého (*Populus nigra* L.) na základě genetických analýz s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 2: 44 s.

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

Máchová P., Cvrčková H., Trčková O., Žižková E. 2017. Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u třešně ptačí. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 40 s. Lesnický průvodce 10/2017.

METHODOLOGICAL PROCEDURES FOR CLONAL IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY OF RED OAK (*QUERCUS RUBRA* L.) BASED ON ANALYZES OF MICROSATELLITE MARKERS

Summary

The red oak (*Quercus rubra* L.) is a tree native to the eastern and central parts of the USA and partially extends into the south central part of Canada. It arrived in Europe around 1700, when it was probably first imported to France. Its first use was in chateau gardens and parks. Later, it gradually spread throughout western and central Europe. It colonized some areas of Belgium, France, Germany, Poland and in some cases has became an invasive species.

In the Czech Republic, it is used in forestry from the lowlands to the hills, as one of the most common introduced tree species, which grows faster than our native oaks in favourable sites and gives good yields. It is also introduced into forest stands on poor, acidic and degraded soils as a soil protection and melioration tree. It is suitable for afforestation of industrial areas, e. g. during the heap reclamation (Novotný et al. 2022). This species is satisfactorily resistant to air pollution and, to a limited extent, to short-term flooding. It also thrives well on less rich loamy soils, but sufficiently deep and moist, where it can alternate with our main oaks (*Quercus robur, Quercus petraea*), compared to which it has lower requirements for soil fertility and light, and significantly exceeds them in volume production (e. g. Křivánek 2006; Vacek et al. 2009; Miltner 2017; Kupka, Podrázský 2019; Kupka, Vopálka-Melicharová 2020), albeit of slightly lower quality wood.

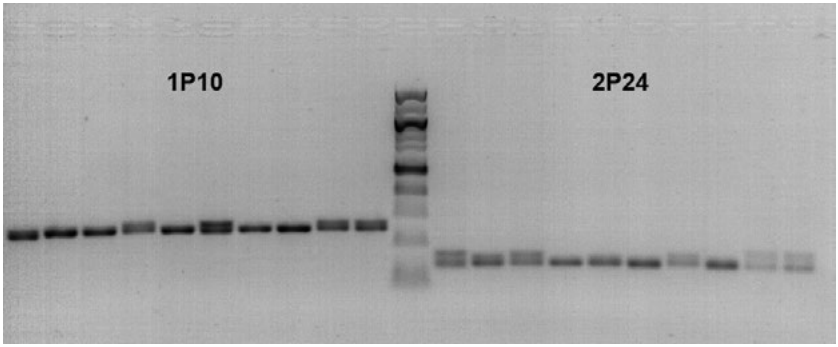
Recently, however, red oak in the Czech Republic has been included in the national blacklist of invasive non-native species as part of a non-binding expert proposal (Pergl et al. 2016a, 2016b). In the evaluation of the permanent research plots of the FGMRI, invasiveness was detected in only 2 out of 33 established plots (Beran et al. 2024). Although this species is considered invasive, it is more resilient to climate change and grows better than native oaks, and could therefore be used as a replacement species for wood production. Red oak represents a potentially economically useful forest tree species due to its better adaptability. The use of red oak as a replacement tree species is not yet considered, but if large-scale mortality of native oaks occurs, its use in the future cannot be ruled out (Stuchlíková 2021a, 2021b). Given the intensity of climatic extremes, optimised approaches should be sought for the use of this tree species.

For reproductive purposes, it is important to represent the widest possible range of genotypes, where the occurrence of genes with increased potential for adaptation to changes and climatic fluctuations in environmental conditions can be assumed.

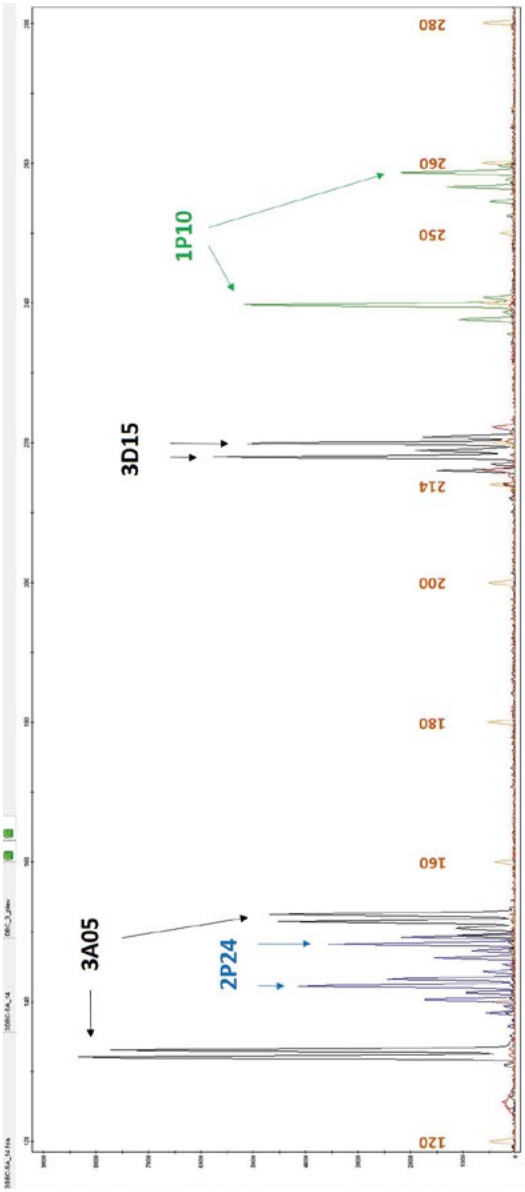
The presented methodological procedures will allow to verify the level of genetic diversity in stands or established provenance plots within the Czech Republic and, based on the results of DNA analyses using microsatellite markers, to select sufficiently variable sources of reproductive material. The methodology describes procedures for sample collection, DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR) conditions, separation and sizing of amplification products, and molecular data calculations. 120 selected red oak trees from 4 sites (Hraběšín, Chlumec n. C., Svatá Anna, Oslov) were used to develop this methodology. Fifteen selected polymorphic nuclear microsatellite markers: quru-GA-0C11, quru-GA-0E09, quru-GA-1F07 (Aldrich et al. 2002), 1P10, 2P24, 3A05, 3D15, FIR030, FIR031, FIR048, POR003 (Sullivan 2013), GOT004, PIE099, QpZAG15 (Lind, Gailing 2013), Qr0237 (Müller, Gailing 2018) have been shown to be suitable for determining of genetic parameters, verifying the level of genetic diversity, distinguishing genetic structures and can be used to determine clonal identity. Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSRs), are small repetitive DNA sequences, highly variable markers, and are commonly used in population genetics in many forest tree species including red oak (Pettenkofer et al. 2020; Borkowski et al. 2017; Collins et al. 2015; Lind, Gailing 2013; Gerwein, Kesseli 2006). SSRs are codominant markers and can therefore distinguish between homozygotes and heterozygotes. Total genomic DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) from 100 mg of fresh young leaves or 20 mg of freeze-dried leaves. The SSR method is based on polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. Based on a previous screening of 33 SSR markers, 15 of them were selected for DNA analysis. PCR products were separated by capillary electrophoresis using the Applied Biosystems 3500 genetic analyser. The developed DNA analysis procedures for the objective determination of genetic diversity and clonal identity will contribute to the quality of the reproductive material of red oak, whose widespread cultivation would be used for replacement production in the event of a gradual deterioration of climatic conditions for the cultivation of native oak species. Genetically verified polymorphic and morphologically high quality red oak trees could be used as sources of reproductive material.

PŘÍLOHA

Příklady výstupů genetických analýz u dubu červeného



Obr. 4: Ukázka elektroforetického záznamu na 2% agarozovém gelu amplifikačních produktů mikrosatelitových markerů 1P10 a 2P24 u jedinců dubu červeného



Obr. 5: Ukázka výstupu fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru (Applied Biosystems 3500) pro jedince dubu červeného u mikrosatelitových markerů z multiplexu 3

Tab. 10: Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro sledované porosty dubu červeného získané analýzami 15 mikrosatelitových markerů

Porosty	N	Na	Ne	I	H_o	H_e
DBC-CH	30	10,8	5,17	1,89	0,74	0,79
DBC-HR	30	8	4,59	1,67	0,74	0,75
DBC-O	30	8,3	4,81	1,71	0,73	0,76
DBC-SA	30	11,07	6,48	1,99	0,73	0,80

DBC-CH: porost dubu červeného z plochy Chlumec n. C. DBC-HR: porost dubu červeného z plochy Hraběšín, DBC-O: porost: dubu červeného z lokality Oslov, DBC-SA: porost dubu červeného z lokality Svatá Anna

N: počet vzorků, Na: průměrný počet různých alel, Ne: průměrný počet efektivních alel, I: Shannonův informační index, H_o: průměrná pozorovaná heterozygotnost H_e: průměrná očekávaná heterozygotnost

Tab. 11: Hodnoty F_{ST} – vyjadřující vzájemné genetické diferenciace mezi porosty

	DBC-CH	DBC-HR	DBC-O	DBC-SA
DBC-CH	0			
DBC-HR	0,032	0		
DBC-O	0,033	0,021	0	
DBC-SA	0,021	0,034	0,028	0









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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 4/2024