

**METODICKÉ POSTUPY OVĚŘOVÁNÍ  
KLONOVÉ IDENTITY A CHARAKTERIZACE  
GENETICKÉ DIVERZITY U JEŘÁBU BŘEKU  
(*SORBUS TORMINALIS* (L.) CRANTZ)  
S VYUŽITÍM MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ**

**LESNICKÝ PRŮVODCE**



**Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.  
a kol.**



**1/2025**

**Metodické postupy ověřování klonové identity  
a charakterizace genetické diverzity  
u jeřábu břeku (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz)  
s využitím mikrosatelitových markerů**

**Certifikovaná metodika**

**Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.**

**Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.**

**Mgr. Martina Komárková, Ph.D.**

**Ing. Olga Trčková**

**Bc. Kateřina Vítová**

**doc. Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.**

# Lesnický průvodce 1/2025

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

[www.vulhm.cz](http://www.vulhm.cz)

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

[http://www.vulhm.cz/lesnicky\\_pruvodce](http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce)

**Vedoucí redaktor:** Ing. Jan Řezáč; e-mail: [rezac@vulhm.cz](mailto:rezac@vulhm.cz)

**Výkonná redaktorka:** Miroslava Valentová; e-mail: [valentova@vulhmop.cz](mailto:valentova@vulhmop.cz)

**Grafická úprava a zlom:** Klára Šimerová; e-mail: [k.simerova@vulhm.cz](mailto:k.simerova@vulhm.cz)

ISBN 978-80-7417-293-9

ISSN 0862-7657

# USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR CLONAL IDENTITY VERIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY IN WILD SERVICE TREES

## *Abstract*

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers to obtain genetic characteristics, and introduce procedures for verifying the clonal identity of wild service trees. 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 wild service trees from localities of Moravia and Bohemia were used to develop this methodology. Fourteen selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for finding the genetic parameters and for determination of clonal identity in case of vegetative propagation by root suckers of wild service trees. The wild service tree (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz) is a minor scattered broadleaf deciduous species widely distributed across Europe, and has a role in stabilization and enrichment of forest and woodland ecosystems. It is considered as one of the trees that may increase in importance for both biodiversity protection and forestry practices in the future. This species is very appreciated in the wood industry (furniture veneering). Using the presented methodology of DNA analysis, it will be possible to verify the genetic parameters of phenotypically high-quality individuals, and select suitable clones ensuring sufficient diversity for conservation strategies.

**Key words:** wild service tree; DNA analysis; microsatellite markers; genetic diversity; clonal identification

**Oponenti:** Ing. Miroslav Válek, Národní lesnický institut, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové

prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D., Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

*Adresy autorů:*

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Mgr. Martina Komárková, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

Bc. Kateřina Vítová

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

Strnady 136, Jíloviště 252 02

e-mail: machova@vulhm.cz

cvrckova@vulhm.cz

komarkova@vulhm.cz

trckova@vulhm.cz

vitova@vulhm.cz

doc. Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.

Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Zemědělská 1, 613 00 Brno

e-mail: pavel.hanacek@mendelu.cz

# Obsah:

<b>I</b>	<b>CÍL METODIKY .....</b>	<b>7</b>
<b>II</b>	<b>VLASTNÍ POPIS METODIKY .....</b>	<b>7</b>
	<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
	<b>2 METODICKÝ POSTUP .....</b>	<b>10</b>
	<b>2.1 Odběr vzorků a postupy izolace DNA .....</b>	<b>10</b>
	<b>2.2 Postupy PCR amplifikace .....</b>	<b>12</b>
	<b>2.3 Postupy elektroforézy v agarózovém gelu .....</b>	<b>17</b>
	<b>2.4 Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR         produktů .....</b>	<b>18</b>
	<b>2.5 Zpracování molekulárních dat .....</b>	<b>19</b>
<b>III</b>	<b>SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ .....</b>	<b>21</b>
<b>IV</b>	<b>POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY .....</b>	<b>22</b>
<b>V</b>	<b>EKONOMICKÉ ASPEKTY .....</b>	<b>24</b>
<b>VI</b>	<b>DEDIKACE .....</b>	<b>25</b>
<b>VII</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY .....</b>	<b>26</b>
<b>VIII</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE .....</b>	<b>31</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>33</b>
	<b>Příloha .....</b>	<b>35</b>

*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 popsat postupy DNA analýz s využitím polymorfních mikrosatelitových markerů pro možnost sledování úrovně genetické diverzity a zjišťování klonové identity u jeřábu břeku jako málo doceněné dřeviny představující složku zvyšující druhovou pestrost lesních ekosystémů. Ověřování identity klonů např. v semenných sadech nebo ve směsích klonů a sledování genetické diverzity přispěje ke zvyšování kvality reprodukčních zdrojů.

## II VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 1 Úvod

Jeřáby patří k okrajovým a ekonomicky méně významným dřevinám, takže jim je v lesnické praxi i výzkumu věnována jen malá pozornost. Z lesnického hlediska je ze všech druhů našich jeřábů zdaleka nejvýznamnější jeřáb břek (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz), který se řadí mezi vzácné druhy lesních dřevin (BURIÁNEK, NOVOTNÝ 2019). V Evropě sahá jeho rozšíření na sever do severozápadní německé nížiny, východního Polska a jižní části Ruska, v těchto oblastech se vyskytuje do nadmořské výšky 600 m, v ČR se nachází až do nadmořské výšky 760 m. V České republice je nejhojnější ve středočeské silursko-devonské pánvi, v Českém středohoří a na jižní Moravě. Vzácněji zasahuje do přechodných společenství mezi bučinami a doubravami (habřiny s jedlí), kde se může udržet jen na místech se zvláštními půdními podmínkami (na sutích, slunných mělkých hřebenech a kamenitých vrcholech). Stejně zastoupení v nejteplejších variantách doubrav a šipákových hájů má po celé střední Evropě (FÉR 1994). V lesních společenstvech se vyskytuje jen vtroušeně, netvoří čisté porosty, má malou konkurenční schopnost, plody jsou oblíbenou potravou zvěře (HEJNÝ, SLAVÍK 1990). Optimum výskytu leží v oblasti doubrav, v nichž zaujímá nejteplejší polohy. Podle dat z LHP se jeřáb břek nachází

v zastoupení vyšším než 1 % na 4350 ha lesních porostů. MADĚRA et al. (2013) současně odhadují rozlohu porostů se zastoupením nižším než 1 % na 26 924 ha a celkový počet stromů rostoucích v ČR na více než 220 tisíc. Jedná se o pomalu rostoucí strom, který může v 80–100 letech dosáhnout až výšky 20–25 m (DEMESURE-MUSCH, ODDOU-MURATORIO 2004). Tento druh se řadí k cenným listnáčům s velkým potenciálem pro případné využití v lesnictví, patří mezi nejvíce ceněné druhy v dřevařském průmyslu (DEMESURE et al. 2000).

Pro jeřáb břek byly v Česku realizovány některé projekty týkající se inventarizace (BURIÁNEK 1994; PRUDIČ 1998; BURIÁNEK, ČÍŽKOVÁ 2003) a opatření na záchranu genetických zdrojů (ČÍŽKOVÁ, BENEDÍKOVÁ 1999; BENEDÍKOVÁ, KYSELÁKOVÁ 2001, 2005), kdy byly vyhledány zdroje reprodukčního materiálu. V evropském měřítku byly v rámci aktivit EUFORGEN publikovány technické směrnice na ochranu a využívání genetických zdrojů jeřábu břeku (DEMESURE-MUSCH, ODDOU-MURATORIO 2004), určené především praktickým lesním hospodářům a pracovníkům státní správy. V uvedeném materiálu se doporučuje při konzervaci genových zdrojů u tohoto druhu dřeviny orientace na kvalitní jedince. Pro výběr kvalitních zdrojů reprodukčního materiálu je důležité zohlednit nejen fenotypové charakteristiky, ale i genetické charakteristiky. Vzhledem k výskytu kořenových výmladků u jeřábu břeku je možnost identifikace klonově stejných jedinců využívaných pro zakládání účelových výsadeb zásadní. I proto se v evropských státech realizují genetické studie zaměřené na výzkum genetické struktury a variability populací jeřábu břeku (ANGELONE et al. 2004; BEDNORZ et al. 2006; BELLETTI et al. 2008; DEMESURE et al. 2000; HOEBEE et al. 2006; KUČEROVÁ et al. 2010; ODDOU-MURATORIO et al. 2004, 2005; RASMUSSEN, KOLLMANN 2007, 2008; SARAVI et al. 2008; GEORGE et al. 2015; VYHNANEK et al. 2025). Pro genetická studia lze s úspěchem využít vhodné polymorfnní mikrosatelitové markery (Simple Sequence Repeats – SSR), jejichž postupy analýz tato metodika podrobně popisuje. Metodické postupy analýz 9 mikrosatelitových markerů zpracovali pro jeřáb břek ODDOU-MURATORIO et al. (2001). JANKOWSKA-WROBLEWSKA et al. (2016) použila SSR markery pro sledování genetické struktury populací jeřábu břeku v Polsku, v jižním Německu KAVALIUSKAS et al. (2021) využili tyto markery k rozlišení provenienčních oblastí a k identifikaci zdrojů reprodukčního materiálu jeřábu břeku.

Mezi nejefektivnější strategie konzervace genových zdrojů lesních dřevin patří semenné sady. V ČR jsou v současnosti pro jeřáb břek evidovány pouze 4 platné semenné sady. 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 aplikují například v SRN (BEHM, KONNERT 2002; KONNERT 2006). V České republice byl systém kontroly reprodukčního materiálu lesních dřevin a jejich zdrojů doposud založen na kontrole evidenčních záznamů. Objektivní ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů, archivů klonů a směsí klonů) lze uskutečňovat DNA analýzami s využitím mikrosatelitových markerů, které jsou s úspěchem využívány pro identifikaci jedinců.

Mikrosatelity (SSR) představují krátké repeticity nejčastěji složené ze 2–4 bází nukleotidových motivů, které se u jedinců liší jejich počtem, tedy délkou mikrosatelitových lokusů. Pro vyhodnocení jejich délky, která se u většiny markerů pohybuje mezi 100–300 bázemi, je nutné specifické úseky v rámci celého genomu rozpoznat, což se děje jejich namnožením v mnohonásobné kopie pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). K PCR amplifikaci jsou nezbytné primery (krátké oligonukleotidy většinou dlouhé kolem 20 bází), které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem, enzym polymeráza řídící proces amplifikace, stavební jednotky nukleotidy a pufrů upravující prostředí probíhající reakce. PCR reakce probíhají v teplotních cyklech za účelem rozdělení DNA dvoušroubovic na jednotlivá vlákna (při teplotě kolem 94 °C), nasednutí primerů na specifická místa (většinou mezi 50–60 °C) a tvorbu nových cílených dvouřetězcových úseků (nejčastěji při 72 °C). Opakováním těchto cyklů exponenciálně přibývají kopie specifického úseku DNA – mikrosatelitového lokusu. Postupy PCR (koncentrace reakčních složek, teploty a časy cyklů) je nutné optimalizovat, abychom dostávali jednoznačné a reprodukovatelné PCR produkty. Jejich přesné velikosti, zjištěné pomocí fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru, se statisticky zpracovávají za účelem získání genetických charakteristik sledovaných dřevin. Specifické jaderné SSR markery mají kodominantní charakter, což umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů.

Uvedené metodické postupy jsou vhodné nejen pro určení klonové identifikace zdrojů reprodukčního materiálu, ale jsou využitelné i pro rozlišení genetických struktur u souborů jedinců jeřábu břeku, pocházejících z geograficky odlišných lokalit výskytu.

## 2 Metodický postup

### 2.1 Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Pro získání kvalitních izolátů DNA je nejvhodnějším termínem odběru rostlinného materiálu jarní období, kdy lze odebírat pupeny nebo mladé listy. Při použití starých 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. Při zpracování vyššího počtu vzorků je výhodnější odebírat mladé listy, protože zpracování pupenů je časově náročnější. Při manipulaci 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 chladicími vložkami), abychom zabránili degradaci DNA. Ideální je vzorky co nejrychleji přepravit ke zpracování do laboratoře. DNA lze izolovat z čerstvého, zmrazeného nebo lyofilizovaného rostlinného materiálu. V případě, že izolace DNA není provedena ihned po přijmutí vzorků, je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevidování, nastříhání 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, protože odpadá nutnost držet vzorky na ledu. Pro izolaci DNA u lesních dřevin se v naší laboroři 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 tak 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 pufrách 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 čerstvého rostlinného pletiva je 100 mg, v případě lyofilizovaného pletiva 20 mg, rostlinné pletivo je třeba homogenizovat rozdrcením na prášek, například za použití tekutého dusíku aplikovaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách, případně využít homogenizátor vzorků (např. Precellys Evolution Bertin Technologies). Homogenizovaný materiál se přenesse se do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

2. K rozdrčenému vzorku se pipetuje 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 × převrácením 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 (rpm).
4. Vzniklý lyzát se pipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
5. Přefiltrovaná frakce se pipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky s odečtením získaného objemu. Je nezbytné se vyvarovat odebrání případné sraženiny.
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, chladicí blok na mikrozkuhavky (-20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, třecí misky a tloučky, sada pipet a příslušné sterilní špičky, sterilní mikrozkuhavky Eppendorf 1,5 ml s víčky, sušička nebo sterilizátor, případně homogenizátor vzorků

Kvalita extrahované DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR produktů. 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 zjišťování úrovně genetické diverzity a klonové identifikace jedinců jeřábu břeku byly optimalizovány postupy DNA analýz s využitím jaderných mikrosatelitových markerů – nuclear simple sequence repeats (nSSR). Při vypracovávání metodických postupů bylo testováno 17 markerů vybraných na základě zpracované literární rešerše (GIANFRANCESCHI et al. 1998; LIEBHARD et al. 2002; ODDOU-MURATORIO et al. 2001; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al. 2010). Pro optimální postupy hodnocení a získání objektivních výsledků analýz byl výběr zaměřen na dostatečně polymorfni mikrosatelitové markery vhodné pro sledování klonové identity, genetické diverzity a rozlišování genetických struktur. Vybráno bylo 14 jaderných mikrosatelitových markerů: CH01h01, CH02B12, CH02c09, Ms14H03, MSS1, MSS4, MSS5, MSS6, MSS9, MSS13, MSS16, SA01, SA07 a SA14. Byly optimalizovány koncentrace reakčních směsí příslušných chemických komponent a teplotní cykly polymerázových řetězových reakcí (PCR) pro získání jednoznačných a velikostně příslušných amplifikátů zvolených lokusů. Optimalizace probíhaly i za účelem seskupení PCR amplifikací do multiplexů, aby z důvodu časových a finančních úspor mohly probíhat analýzy minimálně dvou a více markerů najednou. PCR amplifikace 14 vybraných markerů byly sestaveny do 3 multiplexů podle velikostí amplifikovaných lokusů. Optimalizované PCR reakční podmínky byly pro všechny zvolené lokusy shodné. PCR chemikálie je nutné udržovat v chladu, stejně tak je potřebné připravit reakční směsi na ledu nebo na chladové destičce.

**Tab. 1:** Vybrané mikrosatelitové lokusy, sekvence primerů a rozmezí velikostí v počtu bází sledovaných lokusů

Lokus/motiv repeticce	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
MSS1 (GA) <sub>15</sub>	F: ATGTTTCGGTAGTCATCCCCT R: GCTCAGATAGCCACTCCCC	125–185
MSS4 GT = (CA) <sub>15</sub>	F: AAGTGGTATTTGAGGGTGGG R: GTATGTAATGTGCCTTCGTGC	260–320
MSS5 (GA) <sub>19</sub>	F: CCCCACAACATTTTTCTCC R: CCTCTCGCTCTTGCCTCT	110–145
MSS6 GT = (CA) <sub>14</sub>	F: CGAAACTCAAAAACGAAATCAA R: ACGGGAGAGAAACTCAAGACC	220–300
MSS9 CT = (GA) <sub>19</sub>	F: AAGTTTTCAAGCCATTTTCATT R: CTTACCATTTTTGTTGTGTGT	190–270
MSS13 (CA) <sub>12</sub>	F: TATGCGTCTTTCCATTCCG R: GCGTTTGACTCACTCAGATTG	225–280
MSS16 CT = (GA) <sub>28</sub>	F: CTCCCCTTGTGTGATGCC R: TTGCCCTCAAAGAATGCC	140–215
CH01h01 (AG) <sub>25,5</sub>	F: GAAAGACTTGCAGTGGGAGC R: GGAGTGGGTTTGAGAAGTT	90–165
CH02B12 (AG) <sub>20</sub>	F: GGCAGGCTTTACGATTATGC R: CCCACTAAAAGTTCACAGGC	110–180
CH02c09 GA	F: TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC R: AGAAGCAGCAGAGGAGGATG	220–260
Ms14H03 (CT) <sub>23</sub>	F: CGCTCACCTCGTAGACGT R: ATGCAATGGCTAAGCATA	90–155
SA01 (GA) <sub>13</sub>	F: ATGGAGTTGAGCTCCACATC R: GGTGGAGGGACAATTGTGTC	195–265
SA07 (GA) <sub>15</sub>	F: ACGTTTTCAGTATGATGGCC R: CTTCGCAGTTCATTAAGCAC	330–380
SA14 (TC) <sub>30</sub>	F: ATGGATTAGGTTAACAGTTGTC R: GAGGTAAAACCTACCAGTATAC	140–225

## Protokoly polymerázové řetězové reakce (PCR):

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

CH01h01 F – 2  $\mu$ M (PET), CH01h01 R – 2  $\mu$ M

CH02c09 F – 1  $\mu$ M (PET), CH02c09 – 1  $\mu$ M

MSS1 F – 2  $\mu$ M (NED), MSS1 R – 2  $\mu$ M

MSS5 F – 2  $\mu$ M (6FAM), MSS5 R – 2  $\mu$ M

MSS6 F – 2  $\mu$ M (VIC), MSS6 R – 2  $\mu$ M

### Ředění primerů:

Příprava TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA) – 10 ml roztoku připravíme z 10  $\mu$ l 1M Tris – HCl a 0,2  $\mu$ l 0,5M EDTA, doplníme H<sub>2</sub>O (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich) do 10 ml.

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 $\mu$ M koncentrace (100 pmol/ $\mu$ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris - HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100  $\mu$ l, pipetujeme ze zásobního roztoku primerů CH01h01 F – 2  $\mu$ l, CH01h01 R – 2  $\mu$ l, CH02c09 F – 1  $\mu$ l, CH02c09 R – 1  $\mu$ l, MSS1 F – 2  $\mu$ l, MSS1 R – 2  $\mu$ l, MSS5 F – 2  $\mu$ l, MSS5 R – 2  $\mu$ l, MSS6 F – 2  $\mu$ l, MSS6 R – 2  $\mu$ l a doplníme 82  $\mu$ l TE pufru).

Optimalizovaný protokol v celkovém objemu 15  $\mu$ l na 1 vzorek s využitím QIAGEN<sup>®</sup> Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

<b>Reakční směs</b>	<b>Objem na 1 vzorek</b>
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7,5 $\mu$ l
primer mix	1,5 $\mu$ l
RNase – free water	2 $\mu$ l
Q-Solution	3 $\mu$ l
Přidat 1 $\mu$ l templátové DNA	

(reagencie 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, RNase – free water, Q-Solution jsou dodány výrobcem v rámci kitu QIAGEN<sup>®</sup> Multiplex PCR Kit )

## Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	5 min	Počáteční denaturace
10 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	95 °C	30 sec	Denaturace
3.	60 °C	90 sec (-0,5 °C / 1 cyklus)	Annealing
4.	72 °C	30 sec	Elongace
25 x opakovat od 5. do 7. kroku			
5.	95 °C	30 sec	Denaturace
6.	55 °C	90 sec	Annealing
7.	72 °C	30 sec	Elongace
1x			
8.	60 °C	30 min	Finální elongace
9.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

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

CH02B12 F – 2 μM (VIC), CH02B12 R – 2 μM

MSS4 F – 2 μM (NED), MSS4 R – 2 μM

MSS9 F – 2 μM (6FAM), MSS9 R – 2 μM

MSS16 F – 2 μM (NED), MSS16 R – 2 μM

Ms14H03 F – 2 μM (6FAM), Ms14H03 R – 2 μM

SA14 F – 2 μM (PET), SA14 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<sub>2</sub>O (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 analyzo-

vaných vzorků (např. pro objem 100  $\mu$ l, pipetujeme ze zásobního roztoku primerů CH02B12 F – 2  $\mu$ l, CH02B12 R – 2  $\mu$ l, MSS4 F – 2  $\mu$ l, MSS4 R – 2  $\mu$ l, MSS9 F – 2  $\mu$ l, MSS9 R – 2  $\mu$ l, MSS16 F – 2  $\mu$ l, MSS16 R – 2  $\mu$ l, Ms14H03 F – 2  $\mu$ l, Ms14H03 R – 2  $\mu$ l, SA14 F – 2  $\mu$ l, SA14 R – 2  $\mu$ l a doplníme 76  $\mu$ l TE pufru).

Složení reakční směsi a teplotní podmínky pro PCR amplifikaci jsou stejné jako u multiplexu 1.

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

MSS13 F – 4  $\mu$ M (VIC), MSS13 R – 4  $\mu$ M

SA01 F – 2  $\mu$ M (6FAM), SA01 R – 2  $\mu$ M

SA07 F – 6  $\mu$ M (NED), SA07 R – 6  $\mu$ M

#### **Ředění primerů:**

Příprava TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA) – 10 ml roztoku připravíme z 10  $\mu$ l 1M Tris – HCl a 0,2  $\mu$ l 0,5M EDTA, doplníme H<sub>2</sub>O (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich) do 10 ml.

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 $\mu$ M koncentrace (100 pmol/ $\mu$ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100  $\mu$ l, pipetujeme ze zásobního roztoku primerů MSS13 F – 4  $\mu$ l, MSS13 R – 4  $\mu$ l, SA01 F – 2  $\mu$ l, SA01 R – 2  $\mu$ l, SA07 F – 6  $\mu$ l, SA07 R – 6  $\mu$ l a doplníme 76  $\mu$ l TE pufru).

Složení reakční směsi a teplotní podmínky pro PCR amplifikaci jsou stejné jako u multiplexu 1.

#### **Požadované přístrojové a materiálové vybavení:**

vortex, sada pipet a sterilní špičky, mikrozkuhavky (stripy, destičky PCR s víčky), chladič box na PCR mikrozkuhavky, chladič deska 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  $0,5 \times$  TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k vyvření 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 rozpouštěného teplého agarózového roztoku v poměru 1:10 000 a po promíchání se gel naleje do formy. Do tekutého gelu se ihned vloží hřebeny s vhodným počtem hrotů dle počtu testovaných vzorků. Ztuhlý gel se opatrně přemístí do vany pro elektroforézu, vyjmu se hřebeny a přilije se  $0,5 \times$  TBE pufru tak, aby roztok přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se pipetují PCR amplifikáty (15  $\mu$ l) smíchané se 4  $\mu$ l pufru (gel loading buffer, Sigma-Aldrich). Pro porovnání velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1  $\mu$ l standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4  $\mu$ l destilované vody a 2  $\mu$ l pufru (gel loading buffer).

V elektrickém poli se pohybují záporné fragmenty DNA ke kladné elektrodě, jejich migrační schopnost závisí na jejich relativní hmotnosti (velikosti amplifikátu). Potřebná doba trvání 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 CH01h01 a CH02c09 je uveden v příloze (obr. 1).

### 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 stáhl ke dnu jamky, a pak se destička inkubuje 4 minuty při teplotě 94° C, následuje prudké zchlazení na ledu po dobu minimálně 2 minut. Po provedené denaturaci se destička vkládá do genetického analyzátoru.

Genetický analyzátor pracuje na principu elektroforetického rozdělení 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 analyzovaných lokusů je nutné jejich kombinaci sestavit z hlediska velikosti alel a fluorescenčního zabarvení primerů.

Amplifikáty 14 vybraných lokusů lze dle jejich velikosti a fluorescenčního značení primerů seskupit pro fragmentační analýzy do 3 běhů. První běh zahrnuje amplifikované lokusy multiplexu 1 (CH01h01, CH02c09, MSS1, MSS5, MSS6). Do 96jamkových destiček určených pro analyzátory se nanáší po 1 µl z PCR směsi amplifikovaných fragmentů multiplexu 1. V druhém běhu probíhá stejným způsobem fragmentační analýza PCR produktů multiplexu 2 (amplifikované lokusy CH02B12, MSS4, MSS9, MSS16, Ms14H03, SA14). Ve třetím běhu pomocí stejných postupů probíhá fragmentační analýza PCR produktů multiplexu 3 (amplifikované lokusy MSS13, SA01, SA07).

Hodnocení velikosti amplifikačních produktů se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems), který z výsledku měření veli-

kostního standardu, jenž je přidáván ke každému vzorku, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů. Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru pro jedince jeřábu břeku u multiplexu 2 je uvedena v příloze (obr. 2).

#### 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 jeřábu břeku s diploidní sadou chromozómů ( $2n = 34$ ) 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.

Pro získání genetických charakteristik a zjištění klonově identických jedinců se velikosti alel hodnocených lokusů statisticky zpracovávají, např. za využití statistických 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 kontrolu velikostí odečtených hodnot mikrosatelitových lokusů včetně ohodnocení frekvence nulových alel lze použít software Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004).

Na základě získaných hodnot genetických charakteristik lze u sledovaných skupin (místních populací) jeřábu břeku hodnotit a porovnávat úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, genetické diferenciacce mezi populacemi, hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, odvození populačních struktur apod. Jedna z nejvýznamnějších genetických charakteristik je ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi, které lze vypočítat na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972). V případě ověřování klonové identity se porovnávají hodnoty alel sledovaných lokusů u jedinců (ramet) příslušných klonů. Výsledkem je zpracovaná genotypizace – přehled hodnot alel analyzovaných lokusů pro šetřené klony. Příslušnost jedince ke klonu je deklarovaná, když jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů. V případě použití vysoce polymorfních markerů lze počet sledovaných markerů snížit, a tím snížit i náklady na analýzy. V případě populací jeřábu břeku vyskytujících se

na okraji areálu přirozeného rozšíření použili RASMUSSEN a KOLLMANN (2008) pro identifikaci klonově stejných jedinců pouze 5 polymorfních SSR markerů.



Jeřáb břek, památný strom, České středohoří, Lovoš  
(Lesnický průvodce 7/2019 RNDr. – Václav Buriánek; Bc. Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.)

### III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Popis metodických postupů DNA analýz s využitím mikrosatelitových markerů pro ověřování genetických charakteristik u jeřábu břeku nebyl dosud pro podmínky ČR publikován. Pro možnost sledování genetické diverzity a klonové identifikace jedinců jeřábu břeku bylo vybráno 14 jaderných mikrosatelitových markerů: CH01h01, CH02B12, CH02c09, Ms14H03, MSS1, MSS4, MSS5, MSS6, MSS9, MSS13, MSS16, SA01, SA07 a SA14 (GIANFRANCESCHI et al. 1998; LIEBHARD et al. 2002; ODDOU-MURATORIO et al. 2001; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al. 2010). Optimalizované postupy DNA analýz uvedených markerů jsou v metodice podrobně uvedeny a velikosti jejich alel byly získány fragmentační analýzou na genetickém analyzátoru Applied Biosystem 3500 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

V posledních dvou desetiletích jsou mikrosatelity (SSR) nejrozšířenějšími molekulárními markery používanými v genetických studiích, využívají se např. při záchraně genových zdrojů, v populační genetice, pro rodičovskou analýzu atd. SSR jsou kodominantní a multialelické, vysoce reprodukovatelné a mají velkou rozlišovací schopnost. V současné době je použití těchto markerů vzhledem k relativně nízkým nákladům a širokým možnostem jejich aplikace velmi efektivní (ARAVANOPOULOS 2011; KAVALIAUSKAS et al. 2021). Genetické markery, jako jsou SSR, nám umožňují charakterizovat genotypy jedinců a mohou být použity jako důležitý pomocný nástroj při zavádění opatření na zachování genových zdrojů, při výběru zdrojů reprodukčního materiálu, případně při vymezení provenienčních oblastí (RAJORA, MOSSELER 2001; KLEINSCHMIT et al. 2004; CABALLERO et al. 2010; KAVALIAUSKAS et al. 2021). Pro sledování diverzity mezi porosty s výskytem jeřábu břeku a možnost identifikace jedinců se stejným genotypem (klony) byl vybrán soubor SSR markerů otestovaný na 318 jedincích z 12 lokalit výskytu v ČR. Výsledkem fragmentačních analýz je vypracovaná databáze, kterou představují u šetřených jedinců velikosti alel k jednotlivým lokusům (tab. 2 – příloha). Po statistickém zpracování genetických veličin získáme zhodnocení genetických charakteristik sledovaných porostů a informaci o identických genotypech v případě vegetativně namnožených stromů. Pro záchranu a reprodukci druhů je podstatné zastoupení co nejširšího spektra genotypů, kdy lze předpokládat i výskyt genů s potenciálem přizpůsobit se změnám a výkyvům životních podmínek. Z důvodu ekonomických i časových úspor při zpracování většího počtu vzorků jsou metodické postupy analýz mikrosatelitových markerů optimalizovány i z hlediska jejich seskupení do multiplexů. DNA analýzy 14 vybraných markerů se shodnými reakčními podmínkami jejich PCR amplifikace byly optimalizovány podle velikostí amplifikovaných lokusů do 3 multiplexů.

## IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Zvýšení počtu využívaných druhů lesních dřevin v lesním hospodářství, např. vyšším zastoupením vzácných listnáčů, může hrát důležitou roli v ochraně stability lesních porostů před možnými riziky, jako jsou výskyt škůdců a patogenů, lesní požáry a ztráta biotopů (HEMERY et al. 2010). V důsledku probíhajících klimatických změn se vlastníci lesů snaží zvýšit odolnost a rezilienci svých porostů a usilují o zakládání smíšených lesů, aby minimalizovali rizika a škody způsobené nepředvídatelnými událostmi (DORREN et al. 2004; KNOKE et al. 2008; aj.). Z těchto důvodů je jeřáb břek (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz) stále více v centru zájmu vlastníků lesů ve střední Evropě, a to i díky hodnotnému dřevu (LOEWE-MUÑOZ et al. 2020) a vysoké toleranci vůči suchu a patogenům (HEMERY et al. 2010; KUNZ et al. 2016; aj.).

Popsané metodické postupy ověřování klonové identity jedinců a ověřování genetické diverzity porostů jeřábu břeku budou sloužit pro potřeby státní správy a koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin (NLI), uplatní se např. při procesu uznávání semenných sadů dle pravidel Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a také při ověřování klonové správnosti v již dříve založených semenných sadech, klonových archivech apod. Vypracovanou metodiku lze také uplatnit pro získávání podrobnějších poznatků o genetických charakteristikách porostů (populací), jako jsou např. genetická diverzita, heterozygotnost, diferenciaci, genetické vzdálenosti apod. Poznatky o genetické struktuře zdrojů reprodukčního materiálu přináší podstatné informace pro management správných postupů při zakládání semenných sadů nebo při zalesňování. Provedením analýz SSR markerů je možné např. při zakládání semenných sadů zařadit genotypově vhodné jedince a vyloučit vegetativně namnožené identické genotypy jeřábu břeku, které se mohou na lokalitách s výskytem této dřeviny nacházet (RASMUSSEN, KOLLMANN 2007).

Další uplatnění získaných znalostí o geneticky podmíněné proměnlivosti se předpokládá při aktualizaci souvisejících legislativních předpisů v oblasti ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a nakládání s reprodukčním materiálem a jako podkladů pro aktualizace oblastních plánů rozvoje lesů. Poznatky o diverzitě populací také napomáhají plnit cíle Státní politiky životního prostředí ČR, Strategie ochrany biologické rozmanitosti ČR 2016–2025, Státní program ochrany přírody a krajiny České republiky pro období 2020–2025 a mezinárodní závazky České republiky při ochraně biologické rozmanitosti. Jsou v souladu i se schválenou kon-

cepcí Státní lesnické politiky do roku 2035 a se Strategií resortu MZe ČR s výhledem do roku 2030.

Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat. Příklady výstupů DNA analýz jsou uvedeny v příloze.

Možnosti uplatnění může komplikovat finanční náročnost přístrojového vybavení především genetického analyzátoru pro fragmentační analýzy; 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

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

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 následně fragmentační analýzy činí pro 14 lokusů přibližně 190 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 společnost SEQme s. r. o., Genomac výzkumný ústav, s. r. o., či BIOCEV.

Přínosy pro uživatele metodiky budou spočívat ve finanční úspoře vynaložených prostředků na vývoj metodických postupů analýz DNA u jeřábu břeku, využitelných například při výběru vhodných 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. v semenných sadech. Postupy k ověřování genetické diverzity jsou základem cíleného zvyšování genetické 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. QK23020020 (Využití analýz DNA pro účely zachování žádoucí genetické diverzity uznaných zdrojů kvalifikovaného reprodukčního materiálu a pro genetickou charakterizaci populací méně běžných autochtonních druhů lesních dřevin).



## VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ANGELONE S., HILFIKER K., HOLDEREGGER R., BERGAMINI A., HOEBEE S. E. 2007. Regional population dynamics define the local genetic structure in *Sorbus torminalis*. *Molecular Ecology*, 16: 1291–1301.
- ARAVANOPOULOS F. A. 2011. Genetic monitoring in natural perennial plant populations. *Botany*, 89(2): 75–81. <https://doi.org/10.1139/b10-087>
- BEDNORZ L., MYCZKO L., KOSINSKI P. 2006. Genetic variability and structure of the wild service tree (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz) in Poland. *Silvae Genetica*, 55 (4–5): 197–202.
- BEDNORZ L. 2007. Conservation of genetic resources of *Sorbus torminalis* in Poland. *Dendrobiology*, 58: 3–7.
- BEHM A., KONNERT M. 2002. Proposal for a seed certification scheme. *Dendrobiology*, 47: 105–108.
- BELLETTI P., MONTELEONE C. I., FERRAZZINI C. D. 2008. A population genetic study in a scattered forest species, wild service tree [*Sorbus torminalis* (L.) Crantz], using RAPD markers. *European Journal of Forest Research*, 127: 103–114.
- BENEDÍKOVÁ M., KYSELÁKOVÁ J. 2001. Záchrana jeřábu břeku a oskeruše. *Lesnická práce*, 80 (7): 304–305.
- BENEDÍKOVÁ M., KYSELÁKOVÁ J. 2005. Záchrana genofondu jeřábu břeku a jeřábu oskeruše na jihovýchodní Moravě. *Lesnická práce*, 84 (9): 15–17.
- BURIÁNEK V. 1994. Výsledky inventarizace genových zdrojů některých vzácnějších dřevin. *Zprávy lesnického výzkumu*, 39 (2): 15–21.
- BURIÁNEK V., ČÍŽKOVÁ L. 2003. Aktuální výsledky inventarizačního průzkumu jabloně lesní, hrušně polníčky, třešně ptačí a jeřábu břeku v ČR. *Zprávy lesnického výzkumu*, 48 (1): 14–20.
- BURIÁNEK V., NOVOTNÝ P. 2019. Metodická příručka k určování domácích druhů jeřábů. *Certifikovaná metodika*. Strnady, VÚLHM: 100 s. *Lesnický průvodce* 7/2019.
- CABALLERO A., RODRIGUEZ-RAMILO S. T., AVILA V., FERNANDEZ J. 2010. Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. *Conservation Genetics*, 11 (2): 409–419.

- CABI Compendium. (2019). *Sorbus torminalis* (Rowan). CABI Compendium. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.50761#tab-contributors>
- ČÍŽKOVÁ L., BENEDÍKOVÁ M. 1999. Záchrana genofondu vybraných listnatých dřevin v přírodních lesních oblastech Jihomoravských úvalů a Moravských Karpat. Výroční zpráva. Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti: 64 s.
- DEMESURE B., LE GUERROUE B., LUCCHI G., PRAT D., PETIT R. J. 2000. Genetic variability of a scattered temperate forest tree: *Sorbus torminalis* L. (Crantz). *Annals of Forest Science*, 57: 63–71.
- DEMESURE-MUSCH B., ODDOU-MURATORIO S. 2004. EUFORGEN technical guidelines for genetic conservation and use for wild service tree (*Sorbus torminalis*). Rome, International Plant Genetic Resources Institute: 6 s.
- DORREN L. K. A., BERGER F., IMESON A. C., MAIER B., REY F. 2004. Integrity, stability and management of protection forests in the European Alps. *Forest Ecology and Management*, 195 (1-2): 165–176.
- 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.
- FÉR F. 1994. Lesnická dendrologie. 2. část. Listnaté stromy. Praha – VŠZ, Lesnická fakulta; Písek, Matice lesnická: 163 s.
- GEORGE J.-P., KONRAD H., COLLIN E., THEVENET J., BALLIAN D., IDZOJTIC M., KAMM U., ZHELEV P., GEBUREK T. 2015. High molecular diversity in the true service tree (*Sorbus domestica*) despite rareness: data from Europe with special reference to the Austrian occurrence. *Annals of Botany*, 115(7): 1105–1115. <https://www.jstor.org/stable/26525695>
- GIANFRANCESCHI L., SEGLIAS N., TARCHINI R., KOMJANC M., GESSLER C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 96 (8): 1069–1076.
- GONZÁLEZ-GONZÁLEZ E. A., GONZÁLEZ-PÉREZ M. A., RIVERO E., SOSA P. A. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Sorbus aria* (Rosaceae). *Conservation Genetics Resources*, 2 (Suppl 1): 341–343. <https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s12686-010-9238-x>

- HEJNÝ S., SLAVÍK B. (eds.) 1990. Květena České republiky 2. Praha, Academia: 540 s.
- HEMERY G. E., CLARK J. R., ALDINGER E., CLAESSENS H., MALVOLI M. E., O'CONNOR E., RAFTOYANNIS Y., SAVILL P. S., BRUS R. 2010. Growing scattered broadleaved tree species in Europe in a changing climate: a review of risks and opportunities, *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 83 (1): 65–81. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpp034>
- HOEBEE S. E., MENN C., ROTACH P., FINKELDEY R., HOLDEREGGER R. 2006. Spatial genetic structure of *Sorbus torminalis*: The extent of clonal reproduction in natural stands of a rare tree species with a scattered distribution. *Forest Ecology and Management*, 226 (1–3): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.12.024>
- 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.
- JANKOWSKA-WROBLEWSKA S., MEYZA K., SZTUPECKA E., KUBERA L., BURCZYK J. 2016. Clonal structure and high genetic diversity at peripheral populations of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. *iForest – Biogeosciences and Forestry*, 9 (6): 892–900. doi: 10.3832/ifer1885-009
- 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.
- KAVALIAUSKAS D., ŠEHO M., BAIER R., FUSSI B. 2021. Genetic variability to assist in the delineation of provenance regions and selection of seed stands and gene conservation units of wild service tree (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz) in southern Germany. *European Journal of Forest Research*, 140: 551–565. <https://doi.org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s10342-020-01352-x>
- KLEINSCHMIT J. R., KOWNATZKI D., GREGORIUS H. R. 2004. Adaptational characteristics of autochthonous populations—consequences for provenance delineation. *Forest Ecology and Management* 197(1–3): 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.05.037>
- KNOKE T., AMMER C., STIMM B., MOSAND R. 2008. Admixing broadleaved to coniferous tree species: a review on yield, ecological stability and economics. *European Journal of Forest Research*, 127: 89–101. <https://doi.org/10.1007/s10342-007-0186-2>
- 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.

- KUNZ J., RADER A., BAUHUS J. 2016. Effects of drought and rewetting on growth and gas exchange of minor European broadleaved tree species. *Forests*, 7: 239, <https://doi.org/10.3390/f7100239>
- KUČEROVÁ V., HONEC M., PAULE L., ZHELEV P., GÖMÖRY D. 2010. Genetic differentiation of *Sorbus torminalis* in Eastern Europe as determined by microsatellite markers. *Biologia*, 65: 817–821. <https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.2478/s11756-010-0082-y>
- LIEBHARD R., GIANFRANCESCHI L., KOLLER B., RYDER C. D., TARCHINI R., VAN DE WEG E., GESSLER C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, 10 (4): 217–241. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1020525906332>
- LOEWE-MUÑOZ V., DEL RÍO R., DELARD C., BALZARINI M. 2020. Mixed *Pyrus pyraeaster* and *Sorbus torminalis* plantations including companion species enhance high-quality timber production. *European Journal of Forest Research*, 139: 655–664. <https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s10342-020-01278-4>
- MADĚRA P., KOHOUTEK M., ŠENFELDR M., ŘEPKA R. 2012. The population structure and regeneration of wild service tree in Hádecká planinka National Nature Reserve (Czech Republic). *Dendrobiology*, 68: 63–68.
- MADĚRA P., TICHÁ S., ŘEPKA R. 2013. Distribution and ecological requirements of wild service tree in the Czech Republic. *Dendrobiology*, 69: 59–68.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–392.
- 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.
- ODDOU-MURATORIO S., ALIGON C., DECROOQ S., PLOMION C., LAMANT T., MUSH-DEMESURE B. 2001. Microsatellite primers for *Sorbus torminalis* and related species. *Molecular Ecology Notes*, 1: 297–299. <https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1046/j.1471-8278.2001.00116.x>
- ODDOU-MURATORIO S., DEMESURE MUSH B., PÉLISSIER R., GOUYON P.-H. 2004. Impacts of gene flow and logging history on the local genetic structure of a scattered tree species, *Sorbus torminalis* L. Crantz. *Molecular Ecology*, 13: 3689–3702. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02373.x
- ODDOU-MURATORIO S., KLEIN E. K., AUSSTERLITZ F. 2005. Pollen flow in the wild service tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent–offspring analysis. *Molecular Ecology*, 14: 4441–4452. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02720.x

- 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: 945–959.
- PRUDIČ Z. 1998. Růst a rozšíření jeřábu oskeruše a břeku v Moravských Karpatech. *Lesnictví*, 44 (1): 32–38.
- RAJORA O. P., MOSSELER A. 2001. Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources. *Euphytica*, 118: 197–212. <https://doi.org/10.1023/A:1004150525384>
- RASMUSSEN K. K., KOLLMANN J. 2004. Poor sexual reproduction on the distribution limit of the rare tree *Sorbus torminalis*. *Acta Oecologica*, 25: 211–218. doi:10.1016/j.actao.2004.02.001
- RASMUSSEN K. K., KOLLMANN J. 2007. Genetic diversity, spatial patterns, and growth of root sprouts in a temperate tree at the northern distribution limit. *Ecoscience*, 14 (2): 250–258.
- RASMUSSEN K. K., KOLLMANN J. 2008. Low genetic diversity in small peripheral populations of a rare European tree (*Sorbus torminalis*) dominated by clonal reproduction. *Conservation Genetics*, 9: 1533–1539. <https://doi.org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/s10592-007-9492-y>
- 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.
- SARAVI A. T., TABARI M., ESPAHBODI K., NODOUSHAN H. M., ENAYATI B. 2008. Phenotypic correlation between selected characters of parent trees and progenies in wild service tree (*Sorbus torminalis* L. Crantz.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(6): 579–583.
- VAN OOSTERHOUT C., HUTCHINSON W. F., WILLS D. P. M., SHIPLEY P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in micro-satellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.

## VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2015. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. 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. Lesnický průvodce, 8: 35 s.
- 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 klonové 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. Strnady, VÚLHM: 43 s. Lesnický průvodce 2/2024.

- 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., 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.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O., BERAN F. 2024. Metodické postupy klonové identifikace a stanovení genetické diverzity dubu červeného (*Quercus rubra* L.) na základě analýz mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 33 s. Lesnický průvodce 4/2024.
- VYHNÁNEK T., HANÁČEK P., HOUSKOVÁ K., MENDEL P., MÁCHOVÁ P., MADĚRA P. 2025. The contribution made by molecular biology to our knowledge of the ecology and silviculture of wild service trees (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz). Dendrobiology, 93: 1–17.



Jeřáb břek, České středohoří  
(Lesnický průvodce 7/2019 – RNDr. Václav Buriánek; Bc. Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.)

# USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR CLONAL IDENTITY VERIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY IN WILD SERVICE TREES

## *Summary*

This study presents a methodology employing nuclear microsatellite markers for the genetic characterization and clonal identity verification of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. The wild service tree is a minor, scattered broadleaved species in Europe, contributing to the stabilization and enrichment of forest and woodland ecosystems. *S. torminalis* is a deciduous, slow-growing tree valued for its high-quality timber. It typically occurs in central and southern Europe up to elevations of 1000 m in mixed forests, and also extends into North Africa, Asia Minor, the Caucasus, and Crimea (CABI Compendium 2019). In the Czech Republic, MADĚRA et al. (2013) estimated the species' representation at less than 1% of 26,924 ha of forest stands, with a total of over 220,000 individual trees. *S. torminalis* is expected to gain importance in the future for both biodiversity conservation and forestry practices. Effective conservation requires action beyond local scales, emphasizing landscape-level or regional strategies. For the long-term preservation of its genetic resources, forest management should focus on individual trees (DEMESURE-MUSCH, ODDOU-MURATORIO 2004). For example BEDNORZ (2007) recommended approximately 250–300 previously selected trees should be protected *ex situ* in seedling and clonal seed orchards. Vegetative propagation via root suckers is known in this species (DEMESURE-MUSCH, ODDOU-MURATORIO 2004), and high proportions of vegetatively derived individuals have been reported in certain stands (HOEBEE et al. 2006). Clonal reproduction often dominates in peripheral populations under environmental stress (RASMUSSEN, KOLLMANN 2004; JANKOWSKA-WROBLEWSKA et al. 2016) or in coppice woodlands (MADĚRA et al. 2012).

To obtain detailed insights into the genetic quality of wild service tree populations and to objectively verify clonal identity, nuclear microsatellite (SSR) markers were employed. Microsatellites are highly polymorphic, selectively neutral, codominant markers capable of distinguishing homozygotes from heterozygotes. They are widely used in population genetics for assessing gene flow, parentage, genetic diversity, gene mapping, and individual identification (ANGELONE et al. 2004; BEDNORZ et al. 2006; BELLETTI et al. 2008; DEMESURE et al. 2000; HOEBEE et al. 2006; KUČEROVÁ et al. 2010; ODDOU-MURATORIO et al. 2004, 2005; RASMUSSEN, KOLLMANN 2007, 2008; SARAVI et al. 2008; GEORGE et al. 2015; VYHNÁNEK et al. 2025).

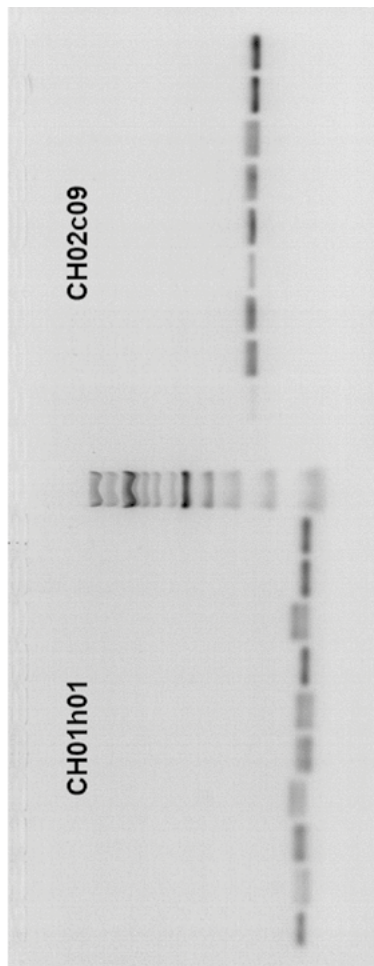
This methodology includes protocols for sample collection, DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) conditions, separation and sizing of amplification products, and calculation of molecular parameters. Total genomic DNA was extracted from 100 mg fresh or 20 mg lyophilized buds or leaves using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands). PCR was optimized with primers previously published by GIANFRANCESCHI et al. (1998), LIEBHARD et al. (2002), ODDOU-MURATORIO et al. (2001) and GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al. (2010).

A total of 318 wild service trees from 12 localities in Moravia and Bohemia were analysed. Fourteen variable microsatellite loci (CH01h01, CH02B12, CH02c09, Ms14H03, MSS1, MSS4, MSS5, MSS6, MSS9, MSS13, MSS16, SA01, SA07, and SA14; Table 1) were selected following preliminary screening. Clear and reproducible PCR products were obtained for all loci, confirming their suitability for assessing genetic parameters and verifying clonal identity. PCR products were separated using capillary electrophoresis on an Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser.

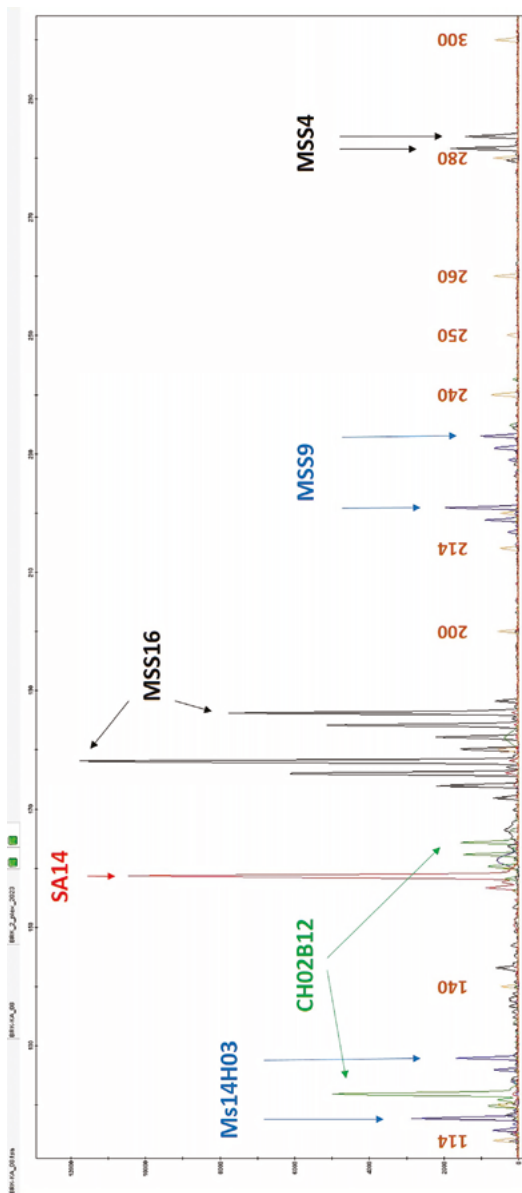
This methodology enables the verification of genetic parameters in phenotypically superior individuals and supports the selection of appropriate clones to ensure sufficient genetic diversity for conservation strategies. These procedures will assist to coordinator of the National Programme for the Protection and Reproduction of the Gene Pool of Forest Tree Species (Czech Forestry Institute) in implementing new monitoring approaches, selecting genetic resources, and shaping subsidy policies in the Czech Republic.

## PŘÍLOHA

### Příklady výstupů genetických analýz u jeřábu břeku



**Obr. 1:** Ukázka elektroforetického záznamu amplifikačních produktů testovaných markerů CH01h01 a Ch02c09



**Obr. 2:** Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru pro jedince jeřábu břeku u mikrosatelitových markerů multiplexu 2 (CH02B12, MSS4, MSS9, MSS16, Ms14H03, SA14)

**Tab. 2:** Příklad multilokusové genotypizace (MLG) u vybraných jedinců jeřábu břeku

Označení genotypu	CH01h01	CH02c09	MS91	MS99	MS96	SA01	SA07	CH02B12	MS94	MS99	MS93	MS916	MS14H03	SA14
BRK-KA_01	106/116	239/239	150/154	124/126	281/281	208/208	347/361	122/146	280/282	235/239	243/243	166/180	116/128	203/203
BRK-KA_02	104/116	233/239	150/150	122/124	247/251	208/208	357/361	122/122	282/284	217/241	235/247	174/180	114/120	175/213
BRK-KA_03	106/114	239/239	168/168	120/124	245/281	234/234	347/347	122/140	284/284	213/239	235/247	166/178	106/124	201/205
BRK-KA_04	116/116	239/239	150/160	124/124	247/247	208/226	347/363	122/122	282/282	211/221	243/247	166/166	120/122	159/159
BRK-KA_05	104/116	239/239	154/158	124/124	245/247	224/234	347/363	122/142	282/282	233/239	243/243	166/180	120/126	167/207
BRK-KA_06	104/116	245/247	148/160	124/130	247/277	208/226	361/361	122/122	282/282	223/241	243/247	172/178	116/120	159/159
BRK-KA_07	116/126	247/247	150/150	122/124	277/281	208/224	347/347	122/140	282/282	235/237	235/247	174/184	120/120	175/213
BRK-KA_08	104/114	247/247	150/150	134/134	247/247	226/234	361/361	122/164	282/284	221/233	235/243	178/186	118/128	159/159
BRK-KA_10	104/104	233/233	168/168	124/130	245/281	208/234	347/357	122/122	282/282	219/235	247/247	186/186	114/124	159/159
BRK-KA_12	104/116	239/239	150/154	130/134	247/311	208/234	347/361	122/142	284/284	229/235	247/249	174/202	120/128	159/205
BRK-KA_13 (14,39-24)	104/116	239/239	168/168	124/124	245/245	208/234	361/361	144/164	280/284	223/235	243/245	154/174	114/132	203/203
BRK-KA_15	106/116	239/239	150/158	120/124	245/275	208/234	347/361	140/164	280/306	235/245	245/245	166/174	120/132	203/203
BRK-KA_16-1	106/116	239/239	150/154	120/126	245/245	208/234	347/361	122/144	282/282	223/239	243/243	166/174	128/132	199/205



Jeřáb břek – podzimní zbarvení listů, České středohoří  
(Lesnický průvodce 7/2019 – RNDr. Václav Buriánek; Bc. Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.)



Jeřáb břek – podzimní zbarvení listů, České středohoří  
(Lesnický průvodce 7/2019 – RNDr. Václav Buriánek; Bc. Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.)



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

[www.vulhm.cz](http://www.vulhm.cz)

LESNICKÝ PRŮVODCE 1/2025