

**METODICKÉ POSTUPY DNA ANALÝZ  
PRO OVĚŘOVÁNÍ KLONOVÉ PŘÍSLUŠNOSTI  
A GENETICKÉ DIVERZITY U JAVORU KLENU  
(*ACER PSEUDOPLATANUS L.*)**

**LESNICKÝ PRŮVODCE**



**Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.**  
**Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.**  
**Ing. OLGA TRČKOVÁ**  
**Bc. KATEŘINA VÍTOVÁ**

Certifikované  
**METODIKY**  
PRO PRAKTIKU

**4/2025**

**Metodické postupy DNA analýz pro ověřování  
klonové příslušnosti a genetické diverzity  
u javoru klenu (*Acer pseudoplatanus* L.)**

**Certifikovaná metodika**

**Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.**

**Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.**

**Ing. Olga Trčková**

**Bc. Kateřina Vítová**

## **Lesnický průvodce 4/2025**

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 978-80-7417-296-0

ISSN 0862-7657

# **METHODOLOGICAL PROCEDURES OF DNA ANALYSES FOR VERIFYING CLONAL AFFILIATION AND GENETIC DIVERSITY IN SYCAMORE MAPLE (*ACER PSEUDOPLATANUS L.*)**

## *Abstract*

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses with nuclear microsatellite markers for determining clonal identity and monitoring genetic variability in sycamore maple, in order to verify gene sources of forest reproductive material. The methodology describes the procedures for sampling, DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR) conditions, separation and sizing of amplification products, and molecular data analysis. Two seed orchards were used to develop this methodology. Eleven selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for assessing genetic parameters to verify levels of genetic diversity among different genotypes and for determining clonal identity, enabling potential control of correctly executed planting in the seed orchard. Genetic data processing is more challenging in this tetraploid species. Appropriate representation and spatial arrangement of clones are essential for obtaining high-quality sources of reproductive material and for conservation strategies aimed at preserving the gene pool of sycamore maple.

**Key words:** sycamore maple; DNA analysis; microsatellite markers; clonal identification; genetic diversity

**Oponenti:** Ing. Miroslav Válek, NLI, Brandýs n. L., odbor Hradec Králové  
RNDr. Slavomír Rakouský, CSc., odborný konzultant,  
České Budějovice

*Adresa autorek:*

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

Bc. Kateřina Vítová

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

Strnady 136, Jíloviště 252 02

e-mail: [cvrkova@vulhm.cz](mailto:cvrkova@vulhm.cz)

[machova@vulhm.cz](mailto:machova@vulhm.cz)

[trckova@vulhm.cz](mailto:trckova@vulhm.cz)

[vitova@vulhm.cz](mailto:vitova@vulhm.cz)

*Ilustrační foto:*

Jan Řezáč

# Obsah:

<b>I</b>	<b>CÍL METODIKY .....</b>	<b>7</b>
<b>II</b>	<b>VLASTNÍ POPIS METODIKY .....</b>	<b>8</b>
	<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
	<b>2 METODICKÉ POSTUPY .....</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>19</b>
	<b>2.5 Zpracování molekulárních dat .....</b>	<b>21</b>
<b>III</b>	<b>SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ .....</b>	<b>22</b>
<b>IV</b>	<b>POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY .....</b>	<b>23</b>
<b>V</b>	<b>EKONOMICKÉ ASPEKTY .....</b>	<b>25</b>
<b>VI</b>	<b>DEDIKACE .....</b>	<b>30</b>
<b>VII</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY .....</b>	<b>31</b>
<b>VIII</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE .....</b>	<b>33</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>35</b>
	<b>Příloha .....</b>	<b>37</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 představit postupy analýz DNA s využitím jaderných mikrosatelitových markerů pro získávání genetických charakteristik za účelem objektivního ověřování deklarované příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu) a pro zhodnocení úrovně polymorfismu klonů v semenných sadech nebo směsi klonů javoru kleny. Sledování genetické diverzity se uplatní i při výběru vhodných zdrojů kvalifikovaného reprodukčního materiálu pro zakládání semenných sadů využitelných pro získávání dostatečně variabilních nově zakládaných porostů, které budou odolnější a budou zvyšovat biodiverzitu lesních ekosystémů.



[https://cz123rfcom/profile\\_griffin024](https://cz123rfcom/profile_griffin024)

## II VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 1 Úvod

Javor klen (*Acer pseudoplatanus* L.) je poměrně mohutný strom, s přímým kmenem, dosahuje výšky 35–40 m a průměru kmene až 2 m, v příhodných podmínkách se může dožít 300 až 400 let. Javor klen je polostinnou dřevinou náročnější na půdnu i vzdušnou vlhkost. Roste nejčastěji na humózních vlhčích půdách s vyšším podílem skeletu a na suťových půdách obohacených dusíkem. Kořenový systém srdčitého tvaru je hluboký a dřevinu v balvanité půdě dobře upevňuje (ÚRADNÍČEK et al. 2009). V lesích je nejrozšířenějším druhem javoru, ale i tak jeho procentní zastoupení v našich lesích zůstává v současné druhové skladbě velmi nízké, vyskytuje se jako vtroušená dřevina na celém území ČR od lužních lesů až po horské oblasti. Hlavním těžištěm jeho rozšíření jsou však podhorské a horské polohy, kde roste jako příměs v bučinách i smrčinách. Typický a hojnější je jeho výskyt v chladných úžlabinách a údolích podél potoků v suťových lesích spolu s ostatními suťovými dřevinami. Půdu opadem značně zlepšuje. Daří se mu také na provlhčených štercích. Vyžaduje dostatek vláhy, nesnáší však těžké zamokřené půdy. Jako polostinná dřevina snáší v mládí slabší zástin, stárím se však jeho požadavky na světlo zvyšují. Poskytuje pevné roztroušené pórovité dřevo s cennými vlastnostmi a širokým uplatněním, např. v truhlářství, kolářství, řezbářství a pro výrobu hudebních nástrojů (ÚRADNÍČEK et al. 2009).

Vzhledem k potřebné přeměně druhové skladby lesů ČR s cílem zvýšit jejich ekologickou stabilitu a druhovou diverzitu v reakci na negativní změny klimatu by bylo vhodné větší rozšíření i tohoto druhu dřeviny. Pro navýšené zastoupení javoru kleny v lesních porostech by bylo nutné více využívat umělou výsadbu, při které je důležité sledovat úroveň genetické variability zdrojů reprodukčního materiálu pro možnost zajištění adaptabilnějších budoucích porostů.

Při zakládání semenných sadů nebo směsí klonů je podstatné zjistit genetickou diverzitu vybraných zdrojových jedinců (rodičů rodiny) a u již založených kvalifikovaných zdrojů reprodukčního materiálu mít možnost ověřovat správnou identitu deklarovaných klonů pro zajištění kvalitní produkce dostatečně geneticky diverzifikovaného osiva. Pro klonovou identifikaci a sledování variability dřevin se osvědčily v rámci DNA analýz polymorfní mikrosatelitové markery (Simple Sequence

Repeats – SSR), jejichž využití bylo již popsáno u řady druhů lesních dřevin (SCHULER et al. 2003; VORNAM et al. 2004; MAGHULY et al. 2006; UNGER et al. 2011; WAGNER et al. 2012; PLUETT, MÄÄTTÄNEN 2013; MÁCHOVÁ et al. 2018; DI PIETRO et al. 2020; WÓJKIEWICZ et al. 2021) a někteří autoři, např. PANDEY et al. (2004, 2012), GRAIGNIC et al. (2013) nebo NEOPHYTOU et al. (2019) je uplatnili i pro genetická studia u javoru kleny.

Mikrosatelity představují krátké repetice 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 dvouřetězových 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 získávali jednoznačné a reprodukovatelné PCR produkty. Jejich přesné velikosti, získané pomocí fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru, se statisticky zpracovávají pro získání genetických charakteristik sledovaných dřevin. Specifické jaderné SSR markery mají kodominantní charakter, což umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů. Byly vypracovány metodické postupy DNA analýz 11 mikrosatelitových markerů vhodných pro praktické využití objektivního ověřování klonové příslušnosti a genetické diverzity u javoru kleny (*Acer pseudoplatanus* L.).

## 2 Metodický postup

### 2.1 Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Pro získání kvalitních izolátů DNA je nevhodnějším 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. Pro 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 chladičí tašky s chladičími destičkami), 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 do mrazicích boxů o teplotě nižší než -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 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 nahřívát na 65 °C. V případě výskytu sraženin v pufrách AP1 a AW1 se pro jejich odstranění roztoky před použitím nahřejí.

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

1. Maximální množství výchozího čerstvého rostlinného pletiva je 100 mg, v případě lyofilizovaného pletiva 20 mg. Rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na jemný prášek s využitím homogenizátoru nebo za použití tekutého dusíku aplikovaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách. Utřený materiál se přenese do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

2. K rozdrčenému vzorku se napipetuje 400  $\mu$ l pufru AP1 a následně 4  $\mu$ l 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  $\times$  převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130  $\mu$ l pufru P3, krátce se promíchá pomocí vortexu a inkubuje 5 minut na ledu a poté centrifuguje 5 minut při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
4. Vzniklý lyzát se přepipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 otáček za minutu.
5. Přefiltrovaná frakce se přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a odečte se objem získaného roztoku. 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  $\mu$ l směsi a přemístíme ji 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  $\mu$ l pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
9. Přidáme dalších 500  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 1,5ml s víčky, sušička nebo sterilizátor, případně 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). Vzoroky DNA s koncentrací nad 50 ng/μl je vhodné pro optimální průběh PCR amplifikace naředit AE pufrém.

## **2.2 Postupy PCR amplifikace**

Pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů kvalifikovaného reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů a směsí klonů) a zjišťování úrovně genetické diverzity mezi klony byly optimalizovány postupy DNA analýz s využitím jaderných mikrosatelitových markerů – nuclear simple sequence repeats (nSSR). Z testovaných markerů bylo následně vybráno 11 jaderných mikrosatelitových markerů vhodných pro klonovou identifikaci a zjištění úrovně diverzity mezi klony (Tab. 1). Sekvence primerů zvolených markerů MAP2, MAP9, MAP12, MAP33, MAP34, MAP40, MAP46 byly publikovány autory PANDEY et al. (2004), markerů Aop122, Aop450, Aop943 autory SEGARRA-MORAGUES et al. (2008) a markeru SM21A autory GRAIGNIC et al. (2013). Současně byly optimalizovány koncentrace příslušných chemických komponent reakčních směsí (Tab. 2) a teplotní cykly polymerázových řetězových reakcí (PCR) (Tab. 3, 4) 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 11 vybraných markerů byly sestaveny do tří multiplexů podle velikostí amplifikovaných lokusů a shodnosti reakčních podmínek. Při PCR amplifikaci je nutné chemikálie udržovat v chladu, stejně tak i přípravu reakční směsi je potřebné provádět na ledu nebo chladové destičce. DNA polymerázu musíme neustále uchovávat při -20 °C a pipetujeme ji do reakční směsi jako poslední reagentii.

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

<b>Lokus/motiv repeticce</b>	<b>Sekvence primerů (5'-3')</b>	<b>Velikost PCR produktů (bp)</b>
MAP2 (GT) <sub>23</sub>	F: CATTAAACACATTTAAGCAAAACAAG R: ATCGGTTTGACATTGAGTGG	140—194
MAP9 (GA) <sub>8</sub>	F: ACAATAAAAGAGCCCACATAGATAG R: TCTCTTCAATTGCAAGGCTTC	95—107
MAP12 (GT) <sub>7</sub>	F: CAAAGACCCCAAACTGTAAAGAC R: AAATATAAAGACATCGGAAAGTTGAG	140—218
MAP33 (GT) <sub>18</sub>	F: GCAATGAACACATATACAAACAAGAG R: GCAACAAATGCCCTCTCAAG	146—182
MAP34 (CA) <sub>21</sub>	F: ACCATTCTCACCCCTCCATC R: TAAGTGGGAACATGGCAAGG	129—173
MAP40 (GT) <sub>6</sub>	F: TGCAGGGACACAAATGAATG R: GTGCATGTCTGTTAGGATTTTGG	239—247
MAP46 (GT) <sub>8</sub> GAT(GT) <sub>8</sub>	F: CATAATGTAGGGACACATATGAATG R: GAGCGTCAAAGATTGACTTG	158—204
Aop122 (CT) <sub>11</sub>	F: TCCCTCGTTAGATTTACGGTGGTTT R: TTCTTGATGACGATGATGACGATG	178—208
Aop943 (GA) <sub>8</sub>	F: ACTGTGTAGGAGAGTGAGTGTGAA R: CTTCCCAAAGGTAGGAACCA	134—176
Aop450 (CT) <sub>19</sub>	F: GCTTCACTTGAGACCTATAAATACTAGCC R: TCGTTATGGAACGGGTAAGTGA	134—188
SM21A (GAT) <sub>14</sub>	F: TAGTTGTGCACCAACCATGC R: TCCATCAAACGCTGCTATG	179—197

## Protokoly polymerázové řetězové reakce (PCR):

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

MAP33 F – 2  $\mu$ M (PET), MAP33 R – 2  $\mu$ M

MAP34 F – 2  $\mu$ M (NED), MAP34 R – 2  $\mu$ M

MAP40 F – 2  $\mu$ M (6FAM), MAP40 R – 2  $\mu$ M

MAP46 F – 4  $\mu$ M (VIC), MAP46 R – 4  $\mu$ 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. Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100  $\mu$ l, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů MAP33 F – 2  $\mu$ l, MAP33 R – 2  $\mu$ l, MAP34 F – 2  $\mu$ l, MAP34 R – 2  $\mu$ l, MAP40 F – 2  $\mu$ l, MAP40 R – 2  $\mu$ l, MAP46 F – 4  $\mu$ l, MAP46 R – 4  $\mu$ l, a doplníme 80  $\mu$ l TE pufru).

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

**Tab. 2:** Složení reakční směsi na PCR amplifikaci

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 $\times$ PCR Buffer, minus Mg	1,5 $\mu$ l
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,6 $\mu$ l
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,1 $\mu$ l
Primer mix	0,75 $\mu$ l
Polymerase Platinum Taq	0,075 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,975 $\mu$ l
Přidat 1 $\mu$ l templátové DNA	

(chemikálie Polymerase Platinum Taq, 10  $\times$  PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou Platinum Taq)

**Tab. 3:** Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	5 min	Počáteční denaturace
Následně 35 × opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	64 °C	60 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**

MAP2 F – 3 µM (VIC), MAP2 R – 3 µM

MAP9 F – 2 µM (6FAM), MAP9 R – 2 µM

MAP12 F – 2 µM (NED), MAP12 R – 2 µM

Aop943 F – 2 µM (PET), Aop943 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 MAP2 F – 3 µl, MAP2 R – 3 µl, MAP9 F – 2 µl, MAP9 R – 2 µl, MAP12 F – 2 µl, MAP12 R – 2 µl, Aop943 F – 2 µl, Aop943 R – 2 µl a doplníme 82 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. 4:** 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.	58 °C	50 sec	Annealing (nasednutí primerů)
4.	72 °C	60 sec	Elongace (prodlužování řetězce)
1×			
5.	72 °C	15 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

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

Aop122 F – 1 μM (VIC), Aop122 R – 1 μM

Aop450 F – 16 μM (PET), Aop450 R – 16 μM

SM21A F – 2 μM (6FAM), SM21A 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 Aop122 F – 1 μl, Aop122 R – 1 μl, Aop450 F – 16 μl, Aop450 R – 16 μl, SM21A F – 2 μl, SM21A R – 2 μl a doplníme 62 μl TE pufu).

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.

Teplotní režim PCR je stejný jako u multiplexu 2.

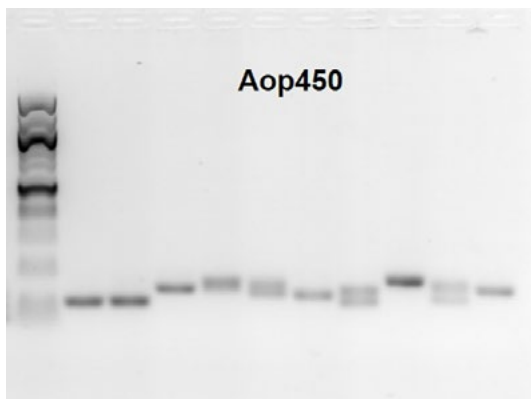
### Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a sterilní špičky, mikroskopavky (stripy, destičky PCR s víčky), chladič box na PCR mikroskopavky, chladič 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  $0,5 \times$  TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k překypění roztoku. K vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se používá fluorescenční barvivo, např. GelRed (GelRed™ Nucleic acid Gel Stain, 10,000X in Water, Biotium, Hayward). GelRed lze přidat hned do rozpuštěného teplého agarózového roztoku v poměru 1:10 000 a po promíchání se gel najeje 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  $0,5 \times$  TBE pufru tak, aby roztok přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do jamek vytvořených po hřebínku (slotů) v gelu se pipetují PCR amplifikáty (15  $\mu$ l) smíchané se 4  $\mu$ l vkladacího 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 testovaného markeru Aop450 u 10 vzorků javoru klenu je uveden na obr. 1.



**Obr. 1:** Elektroforetický záznam na 2% agarózovém gelu s amplifikovanými PCR produkty markeru Aop450. Velikostní standard DNA (100 bp DNA ladder) je umístěn vlevo.

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  $\mu$ l do 96jamkových destiček určených pro analyzátory (např. MicroAmp 96 Well Reaction Plate od ABI Applied Biosystem), pak se ke každému vzorku přidá 11  $\mu$ l 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  $\mu$ l formamidu a 0,4  $\mu$ l 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. Potom 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 zbarvení primerů.

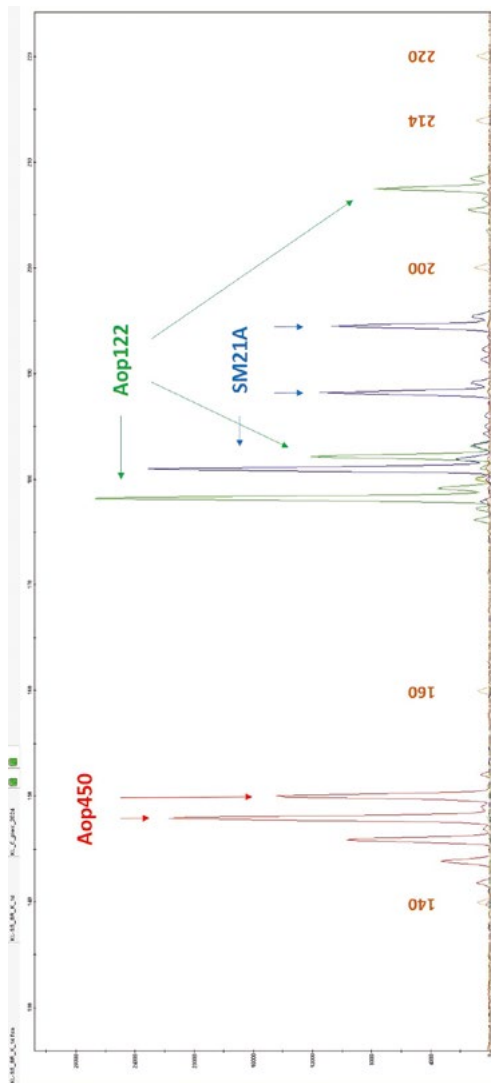
Amplifikáty 11 markerů u každého šetřeného jedince javoru klenu byly získány PCR amplifikací ve třech seskupeních (multiplexech). Fragmentační analýzy podle multiplexů probíhají ve třech bězích. První běh zahrnuje amplifikované lokusy multiplexu 1 (MAP33, MAP34, MAP40, MAP46), v druhém běhu probíhá fragmentační analýza PCR produktů multiplexu 2 (MAP2, MAP9, MAP12, Aop943) a ve třetím běhu multiplexu 3 (Aop122, Aop450, SM21A). Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru (Applied Biosystem 3500) pro jedince javoru klenu multiplexu 3 je uvedena na obr. 2.

Hodnocení velikosti amplifikačních produktů se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems), který z výsledku měření velikostního standardu, jenž je přidáván ke každému vzorku, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

**Obr. 2:** Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru (Applied Biosystems 3500) pro vzorek z ramety KL-SS\_BR\_K 14 u mikrosatelitových markerů 3. multiplexu.



## 2.5 Zpracování molekulárních dat

Jaderné mikrosatelitové markery jsou specifické úseky DNA s kodominantním charakterem. Odečítání velikostí alel je u javoru klenu odlišné, protože jeho buňky mají zdvojenou sadu chromozómů a je tetraploid se čtyřmi sadami chromozómů ( $2n = 4 \times = 52$ ) (DARLINGTON, WYLIE 1955). Při hodnocení velikostí alel se mohou získat k jednomu lokusu až čtyři různé varianty hodnot (PANDEY et al. 2012). V případě homozygota ve všech čtyřech sadách získáme 1 stejnou hodnotu pro všechny 4 alely, pokud se bude jednat o heterozygota ve všech čtyřech sadách, získáme 4 různé velikosti alel. Jestliže bude jedinec ve dvou sadách heterozygot a v dalších dvou homozygot, získáme 3 různé hodnoty velikostí alel. Dvě různé velikosti alel získáme u jedince, který bude homozygot s určitou velikostí alely v první a druhé sadě a ve třetí a čtvrté sadě bude také homozygot, ale s rozdílnou velikostí alel. Vypracovaná multilokusová genotypizace představuje pro každého jedince javoru klenu od každého analyzovaného mikrosatelitového markeru 4 hodnoty alel s různými variantami jejich velikostí.

Pro získání genetických charakteristik a zjištění klonově identických jedinců se velikosti alel hodnocených lokusů statisticky zpracovávají, např. za využití statistických programů GenAlEx 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007), GenoDive (MEIRMANS, VAN TIENDEREN 2004), 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).

V případech ověřování klonové identity 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. Zhodnocení klonové identity a genetické příbuznosti probíhá s využitím statistického programu (např. GenAlEx 6.503) párovým porovnáním získaných multilokusových genotypů u šetřených stromů (Multilocus Matches Analysis for Codominant Data). Pro optimální vypovídací hodnotu pro klonovou identifikaci byl výběr mikrosatelitových markerů zaměřen na dostatečně polymorfní markery. Pro ověření klonové identity se sleduje na výstupech z fragmentačních analýz i grafický charakter velikostně a barevně separovaných píků, který se u totožných klonů shoduje.

### III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Popis metodických postupů DNA analýz s využitím mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity a zjišťování genetické variability mezi jedinci javoru klenu nebyl dosud pro potřeby semenných sadů nebo směsi klonů v ČR publikován. Pro tyto účely bylo celkem vybráno a ověřeno 11 jaderných mikrosatelitových markerů: MAP2, MAP9, MAP12, MAP33, MAP34, MAP40, MAP46 (PANDEY et al. 2004), Aop122, Aop450, Aop943 (SEGARRA-MORAGUES et al. 2008), SM21A (GRAIGNIC et al. 2013), jejichž PCR amplifikace byly optimalizovány i za účelem seskupení jejich analýz do 3 multiplexů. Amplifikace a navazující fragmentační analýzy provedené v multiplexech představují velkou časovou a finanční úsporu. Zhodnocení klonové příslušnosti a variability klonů se provádí na molekulární úrovni přímou analýzou DNA, jejíž struktura je nezávislá na změnách podmínek prostředí, umožňuje proto získání objektivních výsledků. Pro rozlišení klonů a zhodnocení jejich diverzity je potřebné zvolit DNA markery, které vykazují vysokou míru polymorfismu. Mezi nejvariabilnější oblasti genomu patří mikrosatelitové lokusy, které se liší v počtu opakování základního sekvenčního motivu nukleotidových bází. S využitím genetického analyzátoru pro fragmentační analýzy dosáhneme přesného rozlišení alel, například lze zjistit i rozdílnou velikost amplifikačního produktu lišícího se o jednu repetici motivu (u dinukleotidových motivů jen o 2 báze). Nové postupy v předkládané metodice s využitím DNA analýz umožní objektivní ověřování příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu) porovnáním multilokusových genotypů. V případě semenných sadů javoru klenu dosavadní systém kontroly deklarované identity zdrojů reprodukčního materiálu spočíval pouze v dokumentační evidenci, kdy případný omyl nebylo možné zjistit. Popsané metodické postupy byly odzkoušeny při ověřování klonové identity u semenného sadu javoru klenu – CZ-3-3-KL-00181-27-7-M založeného v lokalitě Branná u Šumperka o rozloze 1,50 ha a semenného sadu CZ-3-3-KL-161-14-6-C, LS LČR na lokalitě Vyšší Brod, Jenín o rozloze 1,60 ha.

Výsledkem fragmentačních analýz je vypracovaná databáze, kterou představují u šetřených jedinců (ramet) velikosti alel k jednotlivým lokusům. Po statistickém zpracování genetických veličin porovnáním multilokusových genotypů ve statistickém programu GenAlEx 6.503 získáme zhodnocení genetické příbuznosti mezi rametami a informaci o identických genotypech pro objektivní přiřazení k příslušnému ortetu.

## IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Předložené metodické postupy DNA analýz jsou návodem pro získání velikostí a frekvencí alel mikrosatelitových markerů využitelných pro objektivní ověření příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu) a zhodnocení míry diverzity mezi klony. Přímým studiem genotypů se dále zajistí výběr vhodných, dostatečně variabilních zdrojů reprodukčního materiálu pro zakládání semenných sadů nebo směsí klonů. Metodika se také uplatní pro možnost kontrolního ověření správnosti vysazených ortetů v již založených sadech, aby se po genetické stránce potvrdilo, že se jedná o deklarovaný klon na správném místě pro dosažení plánovaného efektu semenného sadu získávat geneticky kvalitní osivo. Významné uplatnění vypracovaných metodických postupů DNA analýz je při procesu uznávání semenných sadů dle pravidel Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin, kdy jsou povinně odebrány referenční vzorky pro případnou následnou kontrolu správnosti klonů vybraných ortetů na základě DNA analýz. Podmínkou poskytnutí dotačního titulu je odebrání referenčních vzorků pro případnou budoucí kontrolu. U zakládání semenných sadů je nutná vhodná skladba klonů pro získávání kvalitního reprodukčního materiálu použitelného pro umělou obnovu lesa a pro zachování genofondu této dřeviny s cennou kvalitou dřeva. Prověřovat variabilitu reprodukčních zdrojů je důležité také z hlediska převážně roztroušeného výskytu javoru klenu. Pro zakládání porostů odolnějších ke změnám klimatických podmínek je podstatné vycházet z dostatečně geneticky variabilní množitelské základny, kdy úroveň variability lze zjistit právě na základě analýz DNA.

Popsané metodické postupy ověřování genetické identity a diverzity jedinců javoru klenu budou sloužit pro potřeby státní správy (v oblasti lesního a vodního hospodářství (MZe, MŽP) a koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin, kterým je Národní lesnický institut (NLI), pro aplikační využití genetických poznatků při uznávání navrhovaných kvalifikovaných zdrojů reprodukčního materiálu a jejich zařazování do Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin. 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 lesa.

Metodické postupy umožňující získávat poznatky o diverzitě javoru klenu budou také napomáhat plnit cíle nově schválené dlouhodobé strategie pro posílení ochrany a udržitelné biologické rozmanitosti „Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky 2026–2050“ a navazující „Akční plán pro období 2026–2030“. Tyto dokumenty jsou také v souladu s mezinárodními závazky České republiky.

Genetické ověření deklarovaného původu zdrojů reprodukčního materiálu u semenného sadu pomocí 11 vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů umožňuje potvrdit nebo vyvrátit klonovou identitu ramet. Pro každého naroubovaného jedince deklarovaného klonu se musí v analyzovaném souboru mikrosatelitových markerů shodovat všechny velikosti alel, což u tetraploidního javoru klenu znamená prokázat v každém lokusu shodu 4 velikostí alel. Kontrola příslušnosti spočívá v provedení analýz sledovaných vzorků stejným postupem a porovnání velikostí alel. V příloze této metodiky (tabulka 5) je ukázka zpracované multilokusové genotypizace (MLG) pro ramety od ortetů 32, 33, 91 ze semenného sadu javoru klenu – CZ-3-3-KL-00181-27-7-M založeného v lokalitě Branná u Šumperka. K ortetům 33 a 91 prokazují všechny ramety správnou klonovou příslušnost (mají shodné velikosti alel). U ortetu 32 byla nalezena chyba, rameta KL-SS\_BR\_H\_03 má v některých lokusech odlišné velikosti alel, nepřísluší tedy k ortetu 32.

Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat.

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 ke genetickým poznatkům ve formě multilokusové genotypizace jedinců reprodukčních zdrojů javoru klenu je přínos pro lesní hospodářství. Při zakládání semenného sadu (směsi klonů) lze přesně kontrolovat správnost vybraného jedince včetně jeho pozice v sadu za účelem získávání potomstev s vysokou kvalitou a genetickou variabilitou. 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. Současně dochází i k naplňování cílů Národního programu – podporovat kvalitní genetické zdroje s možností ověřovat jejich identitu metodou DNA markerů. Metodické postupy představených DNA analýz genetické identifikace jedinců javoru klenu mají přínos také celospolečenský z hlediska podpory zachrany genofondu této v ČR méně zastoupené dřeviny. Vedle celospolečenských přínosů se dá reálně předpokládat i zvýšení tržeb z prodeje dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu.

Lepší genetická produkční báze zvyšuje kvantitativní těžební potenciál a přispívá tím ke zvýšení ekonomické životaschopnosti a konkurenceschopnosti trvale udržitelného obhospodařování lesů. Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že v době mýtní zralosti porostů bude dosaženo vyšší kvantitativní (objemové) produkce. Rozdíl porostních zásob vztažených k obmýtí u porostů javoru klenu, které se nacházejí v současných genových základnách (GZ) oproti ostatním porostům na území ČR, lze prokázat výsledky analýzy celostátních informací v datovém skladu DS ERMA a DS LHPO.

V závislosti na rostoucím věku těchto porostů v rozmezí 120–130 let činí nárůst objemové produkce v našich podmínkách v průměru cca 37–44 m<sup>3</sup>.ha<sup>-1</sup>, čemuž přibližně odpovídá i objem modelové porostní zásoby mezi dvěma bonitami, zjištěný z růstových (výnosových) tabulek. Zjištěné výsledky vykazují tedy lepší produkční bázi v genových základnách, přestože je v podmínkách ČR počet těchto GZ zatím nedostatečný a získaná data se týkají pouze starších porostů nad 110 let. GZ klenu oproti ostatním porostům klenu také ve věku 120–130 let prokazují lepší bonitu o 1 relativní stupeň (pozn.: obdobně byla lepší bonita porostů v GZ zjištěna u analo-

gicky provedených šetření také u dřeviny smrk, jedle, buk, borovice, dub a modřín), což bezprostředně souvisí s vyšší objemovou produkcí. Produkčním cílem pěstování javoru kleny jsou jednotlivé stromy s co možná největší hmotností a rovným bezsukým kmenem.

Modelová ekonomická kalkulace očekávaných přínosů pěstování javoru kleny z kvalitnějšího reprodukčního materiálu, vztažená k mýtnímu věku 120 let a k produkčnímu rozdílu vzniklému zlepšením relativní bonity o 1 stupeň, využívá produkční ukazatele z růstových (výnosových) tabulek Dolnosaských státních lesů (WBR 86). Modelová kalkulace je založena na rozdílu porostní zásoby buku hlavního porostu mezi dvěma lepšími bonitami (výnosovými třídami), jak vyplývá z následující tabulky, která nejvíce odpovídá zjištěným hodnotám v datovém skladu DS ERMA a DS LHPO.

Věk	Výnosová třída 9		Výnosová třída 8	
	Střední tloušťka cm	Objem m <sup>3</sup> .ha <sup>-1</sup>	Střední tloušťka cm	Objem m <sup>3</sup> .ha <sup>-1</sup>
120	43	460	39	414
Rozdíl v objemu:				
46 m <sup>3</sup>				

*Zdroj: Niedersächsische Landesforste, WBR 86 – Ertragstabel, Tabelle 5*

V modelové kalkulaci se neuvažuje s vyššími náklady na kvalitnější reprodukční materiál. Zde vypočtený ekonomický efekt v Kč.ha<sup>-1</sup> představuje tzv. hrubý výnos vlastníka (tržby z prodeje dřeva bez odpočtu nákladů), který získá vlastník v důsledku tržní realizace většího objemu kulatinových sortimentů surového dříví (46 m<sup>3</sup>.ha<sup>-1</sup> ve 120 letech).

Jelikož nejsou k dispozici žádné informace o sortimentní struktuře mýtních porostů javoru kleny, tak se vychází z podílu pilařských výřezů buku podle porostních sortimentačních tabulek používaných v Dolním Sasku, které platí i pro javor klen.

Tloušťka cm	Objem zvýšené produkce (m <sup>3</sup> .ha <sup>-1</sup> )	Podíl kulatiny z hroubí v % při průměrné kvalitě	Členění kulatiny (= 100 %) podle tloušťkových tříd								Zvýšený objem kulatiny (m <sup>3</sup> .ha <sup>-1</sup> )
			1b	2a	2b	3a	3b	4	5	6+	
43	46	55	1	10	20	23	33	10	3	25,3	

Zdroj: Statistik der Landesforstverwaltung Niedersachsen (WBR 86 – Tabelle 6)

Pro kalkulaci ekonomického přínosu javoru kleny z použití kvalitního genetického zdroje, tj. ze zvýšeného objemu obchodovatelného dříví, nelze vycházet z údajů o domácím obchodu s pilařskou kulatinou javoru kleny na volném trhu, neboť k této dřevině neexistuje ze strany ČSÚ žádná cenová statistika. Z tohoto důvodu je nutné příslušné údaje získat ze zveřejněné statistiky prodejů cenných výřezů formou submisí v sousedních zemích (Německo, Rakousko).

S ohledem na skutečnost, že není k dispozici cenová statistika podle tloušťkových tříd pilařské kulatiny, byly další výpočty provedeny náhradním způsobem, tj. na základě zahraničních informací ze submisí (pozn.: určitý druh aukcí). Počátkem roku 2018 se na volném trhu dosažená cena v závislosti na kvalitě pohybovala v rozpětí 167 až 305 €·m<sup>-3</sup>, a to na základě výsledků z uskutečněných submisí cenných výřezů u javoru kleny, např.:

Merchingen, 22. 3. 2018, průměrná cena za různé kvality 173,00 €·m<sup>-3</sup> b.k.

Forstbetriebsgemeinschaft Günzburg-Krumbach e.V., leden 2018, průměrná cena 298 €·m<sup>-3</sup>

Niedersächsische Landesforsten (Suterode & Liebenburg), 2018, průměrná cena 305 €·m<sup>-3</sup>

Niedersächsische Landesforsten (Vogelbeck), 2018, průměrná cena 167 €·m<sup>-3</sup>

Průměrná cena výřezů javoru kleny byla vypočtena ve výši 235,75 €·m<sup>-3</sup>.

Českou národní bankou vyhlášený kurz české koruny ke dni 17. 5. 2018 byl stanoven takto:

$$1 \text{ €} = 25,560 \text{ CZK.}$$

Výsledná kalkulace hrubého ekonomického přínosu:

Zvýšený objem pilařské kulatiny v obmýti 120 let při lepší bonitě: 25,3 m<sup>3</sup>.ha<sup>-1</sup>;

objem 25,3 m<sup>3</sup>; průměrná cena 235,75 €·m<sup>-3</sup>; kurz 25,560 Kč.€<sup>-1</sup> = 152 452 Kč.ha<sup>-1</sup>

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

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

- Analýza datového skladu ÚHÚL – DS ERMA (Pařízková, Hradec Králové, 2017–2018)
- ČERNÝ M., PAŘEZ J., MALÍK Z.: Růstové a taxační tabulky hlavních dřevin České republiky (smrk, borovice, buk, dub). Ústav pro výzkum lesních ekosys-  
témů (IFER), 1996
- SLABÝ R. (ed.): Závěry a doporučení Koordinační rady k realizaci Národního  
lesnického programu II. ÚHÚL Brandýs nad Labem, 2013
- Statistik der Landesforstverwaltung Niedersachsen (WBR 86 – Tabelle 6)
- Waldbewertungsrichtlinien – WBR 86, Niedersächsische Landesforsten, Druck  
7/1990
- Zahraniční cenové statistiky ze submisí (aukcí) uskutečněných počátkem roku  
2018 v Německu
- Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2006

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 131 Kč.  
Náklady u jedince na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 11 lo-  
kusů přibližně 270 Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle  
uvedených optimalizovaných postupů. Náklady jsou kalkulovány k roku 2025 a je  
nutné zmínit, že cena většiny chemikálií se každoročně navyšuje. V uvedené kal-  
kulaci našich nákladů (výzkumné pracoviště) nejsou zahrnuty doplňkové náklady,  
náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na vývoj me-  
tod, 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 javoru klenu pro zjišťování úrovně diverzity například při výběru vhodných jedinců pro jejich uznání za zdroje reprodukčního materiálu a pro klonovou determinaci. Uvedené postupy DNA analýz klonové identifikace jsou využitelné pro kontrolní mechanismy uživatele, např. pro semenné sady, směsi klonů. Postupy k ověřování genetické diverzity zdrojů reprodukčního materiálu jsou základem pro získávání kvalitního reprodukčního materiálu použitelného pro umělou obnovu lesa a pro zachování genofondu této dřeviny. Cílené zvyšování genetické variability porostů přispívá k jejich lepší odolnosti 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 v rámci podpory na rozvoj výzkumné organizace č. 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

- DARLINGTON C. D., WYLIE A. P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. George Allen and Unwin LTD, London.
- DI PIETRO R., DI MARZIO P., ANTONECCHIA G., CONTE A. L., FORTINI P. 2020. Preliminary characterization of the *Quercus pubescens* complex in southern Italy using molecular markers. *Acta Botanica Croatia*, 79 (1): 15–25.
- 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.
- GRAIGNIC N., TREMBLAY F., BERGERON Y. 2013. Development of polymorphic nuclear microsatellite markers in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) using cross-species transfer and SSR-enriched shotgun pyrosequencing. *Conservation Genetics Resources*, 5 (3): 845–848.
- 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.
- 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.
- MAGHULY F., PINSKER W., PRAZNIK W., FLUCH S. 2006. Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Forest Ecology and Management*, 222: 266–271.
- MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O., CVRČKOVÁ H. 2018. Use of nuclear microsatellite loci for evaluating genetic diversity of selected populations of *Picea abies* (L.) Karst. in the Czech Republic. *Forests*, 9 (92): 1–15. doi:10.3390/f9020092.
- MEIRMANS P.G., VAN TIENDEREN P.H. 2004. GENOTYPE and GENODIVE two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*, 4 (4): 792–794.

- NEOPHYTOU C., KONNERT M., FUSSI, B. 2019. Western and eastern post-glacial migration pathways shape the genetic structure of sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.) in Germany. *Forest Ecology and Management*, 432: 83–93.
- PANDEY M., GAILING O., FISCHER D., HATTEMER H. H., FINKELDEY R. 2004. Characterization of microsatellite markers in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Molecular Ecology Notes*, 4: 253–255.
- PANDEY M., GAILING O., HATTEMER H. H., FINKELDEY R. 2012. Fine-scale spatial genetic structure of sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.). *European Journal of Forest Research* 131: 739–746. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0546-9>
- PEAKALL R., SMOUSE P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- PEAKALL R., SMOUSE P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- PLUESS A. R., MÄÄTTÄNEN K. 2013. Characterization of eighteen novel microsatellite markers and multiplex PCR protocol for *Fagus sylvatica*. *Conservation Genetics Resources*, 5: 311–314.
- PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945–959.
- SEGARRA-MORAGUES J. G., GLEISER G., GONZÁLEZ-CANDELAS F. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Acer opalus* (Aceraceae), a sexually-polymorphic tree, through an enriched genomic library. *Conservation Genetics*, 9 (4): 1059–1062.
- SCHUELER S., TUSCH A., SCHUSTER M., ZIEGENHAGEN B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46: 95–102.
- UNGER G. M., KONRAD H., GEBUREK T. 2011. Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria. *Plant Systematics and Evolution*, 292: 133–141.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 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.

- VORNAM B., DECARLI N., GAILING O. 2004. Spatial distribution of genetic variation in a natural beech stand (*Fagus sylvatica* L.) based on microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 5: 561–570.
- WAGNER S., GERBER S., PETIT R. J. 2012. Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch). *Molecular Ecology Resources*, 12 (4): 717–725. DOI 10.1111/j.1755-0998.2012.03139.x
- WÓJKIEWICZ B., LEWANDOWSKI A., ŽUKOWSKA W. B., LITKOWIEC M., WACHOWIAK W. 2021. Low effective population size and high spatial genetic structure of black poplar populations from Oder valley in Poland. *Annals of Forest Science*, 78: 37. DOI 10.1007/s13595-021-01055-2

## **VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE**

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2015. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. *Lesnický průvodce*, 8: 36 s.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2016. Genetická charakterizace jedle bělokoré pomocí mikrosatelitových markerů. *Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce*, 5: 34 s.
- 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. Lesnický průvodce*, 4: 43 s.

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O. 2019. Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u lípy srdčité (*Tilia cordata* Mill). Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 4: 36 s.
- 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. Lesnický průvodce, 3: 36 s.
- 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. Lesnický průvodce, 4:32s
- CVRČKOVÁ H., ČÍŽKOVÁ L., MÁCHOVÁ P., VÍTOVÁ O. 2022. Metodické postupy charakterizace genetické diverzity u topolu černého (*Populus nigra* L.) s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 8: 34 s.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., ČÍŽKOVÁ L., VÍTOVÁ O., 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: 43 s.
- 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. Lesnický průvodce, 10: 40 s.

# **METHODOLOGICAL PROCEDURES OF DNA ANALYSES FOR VERIFYING CLONAL AFFILIATION AND GENETIC DIVERSITY IN SYCAMORE MAPLE (*ACER PSEUDOPLATANUS L.*)**

## *Summary*

The sycamore maple (*Acer pseudoplatanus L.*) is a relatively large tree with a straight trunk, reaching up to 40 m in height and up to 2 m in diameter. Under favorable conditions, sycamore trees can live for 300 to 400 years. It is a semi-shade-tolerant species that requires relatively high soil and air moisture. It most commonly grows on humus-rich, moist soils with a higher proportion of coarse fragments. Although it is the most widespread maple species in Czech forests, its overall representation is very low, and it occurs only as a scattered tree species. Its main distribution area is in the submontane and montane zones, where it grows as an admixture in beech and spruce stands. Sycamore maple has valuable wood with versatile uses. It has traditionally been used in joinery, wheelwrighting, carving, and woodturning, and specimens with wavy annual rings are used for the manufacture of musical instruments (ÚRADNÍČEK et al. 2009). When establishing seed orchards or clone mixtures, it is essential to determine the genetic diversity of the selected source individuals (plus trees) and, for qualified sources of reproductive material, to be able to verify the correct identity of the declared clones in order to ensure high-quality production of sufficiently diverse seeds for artificial regeneration. Methodological approaches based on DNA analyses using nuclear microsatellite markers can be used to obtain objective information on clonal identity and on the genetic diversity of gene sources in reproductive material. Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSRs), are short repetitive DNA sequences, highly variable markers, and are commonly used in population genetics studies of many forest tree species (SCHUELER et al. 2003; VORNAM et al. 2004; MAGHULY et al. 2006; UNGER et al. 2011; WAGNER et al. 2012; PLUETT, MÄÄTTÄNEN 2013; MÁCHOVÁ et al. 2018; DI PIETRO et al. 2020; WÓJKIEWICZ et al. 2021). Some authors, e.g., PANDEY et al. (2004, 2012), GRAIGNIC et al. (2013), and NEOPHYTOU et al. (2019), have also applied them in genetic studies of sycamore maple. SSRs are codominant markers and can distinguish between homozygotes and heterozygotes. The methodology describes the processes of sampling, DNA isolation, conditions of the polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products, and molecular data processing. Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit

(Qiagen, Hilden, Germany) from 100 mg of fresh young leaves or 20 mg of lyophilized leaves. The SSR method is based on PCR with specific primers. Eleven selected polymorphic nuclear microsatellite markers – MAP2, MAP9, MAP12, MAP33, MAP34, MAP40, MAP46 (PANDEY et al. 2004), Aop122, Aop450, Aop943 (SEGARRA MORAGUES et al. 2008), and SM21A (GRAIGNIC et al. 2013) – proved suitable for determining genetic parameters for verifying levels of genetic diversity among different genotypes and for clonal identification. PCR products were separated by capillary electrophoresis using an Applied Biosystems 3500 genetic analyzer. Genetic data processing is more challenging for this tetraploid species. When evaluating allele sizes, up to four different allele variants can be obtained for a single locus (PANDEY et al. 2012). The selected seed orchards were used to develop this methodology. Appropriate representation and spatial arrangement of clones are essential for obtaining high-quality sources of reproductive material and for conservation strategies of maple genetic resources. The procedures described in this methodology for verifying the genetic identity of clones and the diversity of gene sources will serve the needs of the coordinator of the National Programme for the Protection and Reproduction of the Gene Pool of Forest Tree Species (Czech Forestry Institute), supporting the application of new control methods, the selection of genetic sources, and the subsidy policy of the Czech Republic

## PŘÍLOHA

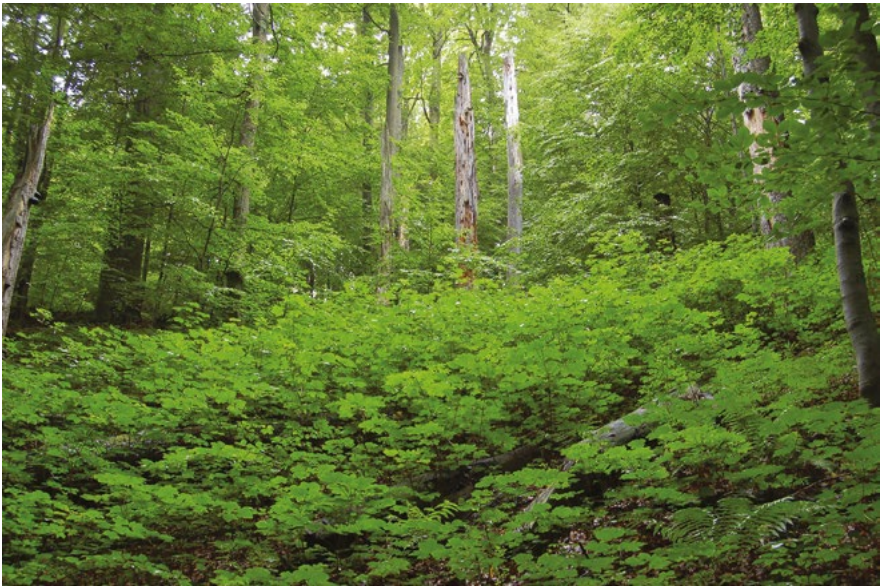


**Tab. 5:** Příklad multilokusové genotypizace (MLG) u javoru kleny v semenném sadu, kterou představují u šestřiných jedinců (ramet) velikosti alel k jednotlivým lokusům. K ortetům 33 a 91 prokazují všechny ramety správnou klonovou příslušnost (mají shodné velikosti alel). U ortetu 32 byla nalezena chyba, rameta KL-SS\_BR\_H\_03 má v některých lokusech odlišné velikosti alel, nepřísluší tedy k ortetu 32.

Ramety	Ortety	MAP33	MAP34	MAP40	MAP46	MAP12	MAP2
KL-SS_BR_A_19		168/168/168/168	131/131/147/147	243/243/245/245	162/162/168/168	150/150/156/156	180/180/180/180
KL-SS_BR_B_11	32	168/168/168/168	131/131/147/147	243/243/245/245	162/162/168/168	150/150/156/156	180/180/180/180
KL-SS_BR_F_14		168/168/168/168	131/131/147/147	243/243/245/245	162/162/168/168	150/150/156/156	180/180/180/180
KL-SS_BR_H_03		164/164/166/166	131/131/131/131	239/239/243/243	164/168/168/174	148/148/152/152	182/182/184/184
KL-SS_BR_C_08		176/176/176/176	133/133/147/147	239/239/245/245	162/166/174/174	150/150/150/150	168/168/168/168
KL-SS_BR_C_21		176/176/176/176	133/133/147/147	239/239/245/245	162/166/174/174	150/150/150/150	168/168/168/168
KL-SS_BR_F_13	33	176/176/176/176	133/133/147/147	239/239/245/245	162/166/174/174	150/150/150/150	168/168/168/168
KL-SS_BR_F_17		176/176/176/176	133/133/147/147	239/239/245/245	162/166/174/174	150/150/150/150	168/168/168/168
KL-SS_BR_I_04		176/176/176/176	133/133/147/147	239/239/245/245	162/166/174/174	150/150/150/150	168/168/168/168
KL-SS_BR_A_08		164/164/168/168	137/137/137/137	239/239/239/239	164/164/174/174	148/148/154/154	162/162/184/184
KL-SS_BR_B_20		164/164/168/168	137/137/137/137	239/239/239/239	164/164/174/174	148/148/154/154	162/162/184/184
KL-SS_BR_E_07	91	164/164/168/168	137/137/137/137	239/239/239/239	164/164/174/174	148/148/154/154	162/162/184/184
KL-SS_BR_I_13		164/164/168/168	137/137/137/137	239/239/239/239	164/164/174/174	148/148/154/154	162/162/184/184
KL-SS_BR_M_09		164/164/168/168	137/137/137/137	239/239/239/239	164/164/174/174	148/148/154/154	162/162/184/184
KL-SS_BR_I_09		164/164/168/168	137/137/137/137	239/239/239/239	164/164/174/174	148/148/154/154	162/162/184/184

**Tab. 5: Pokračování –** Příklad multilokusové genotypizace (MLG) u javoru kleny v semenném sadu, kterou představují u šetřených jedinců (ramet) velikosti alel k jednotlivým lokusům. K ortetům 33 a 91 prokazují všechny ramety správnou klonovou příslušnost (mají shodné velikosti alel). U ortetu 32 byla nalezena chyba, rameta KL-SS\_BR\_H\_03 má v některých lokusech odlišné velikosti alel, nepřísluší tedy k ortetu 32.

Ramety	Ortety	MAF9	Aop943	Aop122	Aop450	SM21A
KL-SS_BR_A_19		95/95/99/99	136/150/156/162	178/178/182/186	134/134/162/162	182/182/188/194
KL-SS_BR_B_11		95/95/99/99	136/150/156/162	178/178/182/186	134/134/162/162	182/182/188/194
KL-SS_BR_F_14	32	95/95/99/99	136/150/156/162	178/178/182/186	134/134/162/162	182/182/188/194
KL-SS_BR_H_03		95/95/99/103	136/136/156/166	178/178/180/180	152/152/168/168	182/182/188/188
KL-SS_BR_C_08		95/95/99/99	134/136/142/152	178/178/182/186	134/134/134/134	182/182/188/194
KL-SS_BR_C_21		95/95/99/99	134/136/142/152	178/178/182/186	134/134/134/134	182/182/188/194
KL-SS_BR_F_13	33	95/95/99/99	134/136/142/152	178/178/182/186	134/134/134/134	182/182/188/194
KL-SS_BR_F_17		95/95/99/99	134/136/142/152	178/178/182/186	134/134/134/134	182/182/188/194
KL-SS_BR_I_04		95/95/99/99	134/136/142/152	178/178/182/186	134/134/134/134	182/182/188/194
KL-SS_BR_A_08		95/95/97/99	134/136/142/142	178/180/180/182	162/162/186/186	179/182/182/188
KL-SS_BR_B_20		95/95/97/99	134/136/142/142	178/180/180/182	162/162/186/186	179/182/182/188
KL-SS_BR_E_07	91	95/95/97/99	134/136/142/142	178/180/180/182	162/162/186/186	179/182/182/188
KL-SS_BR_I_13		95/95/97/99	134/136/142/142	178/180/180/182	162/162/186/186	179/182/182/188
KL-SS_BR_M_09		95/95/97/99	134/136/142/142	178/180/180/182	162/162/186/186	179/182/182/188





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

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

LESNICKÝ PRŮVODCE 4/2025