

**METODICKÉ POSTUPY CHARAKTERIZACE  
GENETICKÉ DIVERZITY POROSTŮ  
DUBU PÝŘITÉHO (*QUERCUS PUBESCENS* WILLD.)  
S VYUŽITÍM DNA ANALÝZ**

**LESNICKÝ PRŮVODCE**



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

Certifikované  
**METODIKY**  
PRO PRAXI

**2/2026**

**Metodické postupy charakterizace  
genetické diverzity porostů dubu pýřitého  
(*Quercus pubescens* Willd.)  
s využitím DNA analýz**

**Certifikovaná metodika**

**Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.**

**Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.**

**Ing. Olga Trčková**

**Bc. Kateřina Vítová**

## **Lesnický průvodce 2/2026**

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 978-80-7417-304-2

ISSN 0862-7657

**METHODOLOGICAL PROCEDURES  
FOR CHARACTERIZING THE GENETIC DIVERSITY  
OF DOWNY OAK STANDS  
(*QUERCUS PUBESCENS* WILLD.) USING DNA ANALYSES**

*Abstract*

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses with nuclear microsatellite markers to characterize the genetic diversity of downy oak stands for the possibility of wider use of this more resistant tree species in times of climate change. The methodology describes the procedures for sampling, DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR) conditions, separation and sizing of amplification products, and molecular data analysis. Five downy oak stands were used to develop this methodology. Ten selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for assessing genetic parameters to select variable sources of reproductive material. Knowledge about the genetic diversity of this less represented and legally protected tree species, obtained using developed methodological procedures, will also contribute to the preservation of the pubescent oak gene pool.

**Key words:** pubescent oak; DNA analysis; microsatellite markers; genetic diversity; sources of reproductive material

**Oponenti:** prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.  
Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci  
a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.  
Ing. Miroslav Válek  
NLI, Brandýs n. L., odbor Hradec Králové

T A  
Č R

## Program Prostředí pro život

Tato metodika „Metodické postupy charakterizace genetické diverzity porostů dubu pýřitého (*Quercus pubescens* Willd.) s využitím DNA analýz“ byla vytvořena se státní podporou Technologické agentury ČR v rámci Programu „Prostředí pro život.“

*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: [cvrckova@vulhm.cz](mailto:cvrckova@vulhm.cz)

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

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

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

# 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>16</b>
	<b>2.4 Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR</b> <b>produktů</b> .....	<b>18</b>
	<b>2.5 Zpracování molekulárních dat</b> .....	<b>20</b>
<b>III</b>	<b>SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ</b> .....	<b>23</b>
<b>IV</b>	<b>POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY</b> .....	<b>24</b>
<b>V</b>	<b>EKONOMICKÉ ASPEKTY</b> .....	<b>26</b>
<b>VI</b>	<b>DEDIKACE</b> .....	<b>28</b>
<b>VII</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY</b> .....	<b>29</b>
<b>VIII</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY</b> <b>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 mikrosatelitových markerů pro možnost sledování genetické diverzity u porostů dubu pýřitého a identifikaci případných geneticky totožných jedinců. Pro rozšířené využití této dřeviny v lesnictví se sledování genetické diverzity uplatní při výběru vhodných zdrojů reprodukčního materiálu pro možnost zakládání dostatečně variabilních porostů, které budou odolnější a budou zvyšovat biodiverzitu lesních ekosystémů. Podpora geneticky variabilních zdrojů také přispívá k záchraně genofondu této zákonem chráněné dřeviny.

## II VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 1 Úvod

Dub pýřitý (*Quercus pubescens* Willd.) je světlomilná a teplomilná dřevina rostoucí v nejteplejších oblastech Čech a na jižní Moravě převážně na bazických, mělkých, vysychavých půdách. Dosahuje až 20 m výšky a roste i na exponovaných stanovištích, kde je nižšího a spíše keřovitého vzrůstu. Má křivý kmen a silnou hrubě kostkovitě rozpukanou borku. Obvejčitá, peřenolačná až peřenodílná čepel listů je proměnlivého tvaru, řapík je tužší, delší a úzce vejcovité žaludy jsou na kratičkých stopkách. U tohoto druhu se rozlišují rozmanité zeměpisné typy (SVOBODA 1955; HEJNÝ, SLAVÍK 1990; ÚRADNÍČEK et al. 2009). Rozlišujícími znaky skupiny dubu pýřitého, které jsou nejvíce zřetelné brzy na jaře, jsou plstnaté pupeny, mladé letorosty a ruby listů (BURIÁNEK et al. 2013). Pro rozvíjející se zemědělskou výrobu byly již od dávné minulosti porosty dubů především v hospodářsky příznivějších podmínkách vytlačovány a v současné době patří tento druh k zákonem chráněným dřevinám (ÚRADNÍČEK et al. 2009). V Červeném seznamu cévnatých rostlin ČR (GRULICH 2017) je řazen do kategorie NT – téměř ohrožený druh. Vyskytuje se převážně v lesích ochranného charakteru, často v rezervacích, kde má nezastupitelný ekologický význam. Hlubokým kořenovým systémem chrání půdu před erozí zejména na suťových odlesněných svazích, kde jiné druhy dřevin nerostou. Jeho dřevo je odolné, velmi těžké, trvanlivější a tvrdší než dřevo dubu zimního, ale málo pružné, méně tuhé a hůře štípatelné, využívá se především na palivo, dále ke stavbě lodí nebo výrobě zemědělského nářadí (BORDÁCS et al. 2019; NOVOTNÝ, BURIÁNEK 2026).

Dub pýřitý je pomaleji rostoucí teplomilná dřevina vyžadující dostatek světla a upřednostňující vápnité podklady. Nenáročnost, vysoká odolnost vůči suchu a teplu a schopnost prospívat i na chudých půdách skýtá potenciál jeho širšího využití ve specifických podmínkách, kde se jiným dřevinám nedaří (NOVOTNÝ, BURIÁNEK 2026). Vzhledem k dlouhodobým periodám sucha a vysokým teplotám, které se v posledních letech vyskytují na převažujícím území nižších poloh ČR, by bylo vhodné pro zachování lesních ekosystémů tento druh začít využívat v širším měřítku. Pro rozšíření a případné využití v lesním hospodářství tohoto v současnosti nízce zastoupeného druhu na českých lokalitách by bylo nutné získat a využívat vhodné zdroje reprodukčního materiálu. Rozšířené zastoupení dubu pýřité-

ho by přispělo k potřebné přeměně druhové skladby lesů ČR s cílem zvýšit jejich ekologickou stabilitu a druhovou diverzitu v reakci na negativní změny klimatu. Pro navýšené zastoupení dubu pýřitého 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.

Pro 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 (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; WÓJKIEWICZ et al. 2021), včetně různých druhů dubů (DOW et al. 1995; ISAGI, SUHANDONO 1997; STEINKELLNER et al. 1997; KAMPFER et al. 1998; LEXER et al. 1999; DZIALUK et al. 2005; BURGER et al. 2022; THUNDER et al. 2022; KOONTZ et al. 2024), a také dubu pýřitého (BRUSCHI et al. 2000; DI PIETRO et al. 2020).

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). Objevitelem principu postupu PCR v laboratorních podmínkách byl K. B. MULLIS (1990). 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 pufr 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. V dalším textu jsou prezentovány metodické postupy DNA analýz s optimalizací pro 10 mikrosatelitových markerů vhodných pro praktické využití objektivního ověřování genetické diverzity a struktury u porostů dubu pýřitého.

## 2 Metodický postup

### 2.1 Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Nejvhodnějšími rostlinnými vzorky pro získání kvalitních izolátů DNA jsou čerstvě vyrašené listy nebo narašené pupeny. Při použití vyzrálých listů se z důvodu voskového povrchu listů a vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů snižuje kvalita i kvantita izolované DNA. Nevyhovující kvalita výchozího DNA eluátu může zkomplikovat nebo znemožnit navazující analýzy vybraných DNA markerů. Při manipulaci se vzorky jednotlivých stromů je nutné již od odběrů pečlivě vést evidenci. Po odběru se označené vzorky uloží do mikroténového sáčku a udržují při nízké teplotě přibližně 4 °C (např. lze použít chladicí tašky s chladicími destičkami), abychom zabránili degradaci DNA. Ideální je vzorky co nejrychleji přepravit ke zpracování do laboratoře, kde jsou nejprve převedeny do laboratorního režimu (zavedování, nastříhání na vhodnou velikost apod.), důležité je vzorky stále udržovat v chladu. DNA lze izolovat z čerstvého, zmrazeného nebo lyofilizovaného rostlinného materiálu. V případě, že izolace DNA není provedena ihned po přijmutí vzorků do laboratoře, musí se uložit do mrazících boxů o teplotě nižší než -20 °C. Další možností, jak dlouhodobě uchovat vzorky je jejich vysušení s využitím lyofilizátoru a poté je vzduchotěsně uzavřít. Podstatnou ekonomickou výhodou je, že lyofilizovaný materiál lze skladovat při pokojové teplotě a nejsou potřebné provozně nákladné mrazící boxy. S lyofilizovaným materiálem se také snadněji manipuluje před izolací DNA při homogenizaci vzorků, protože není nutné 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 nahřívat 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 apliko-

vaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách. Utřený materiál se přeneso 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 pufrem.

## **2.2 Postupy PCR amplifikace**

Pro sledování genetické diverzity u porostů dubu pýřitého a identifikaci případných geneticky totožných jedinců byly optimalizovány postupy DNA analýz s využitím jaderných mikrosatelitových markerů – nuclear simple sequence repeats (nSSR). Pro DNA analýzy bylo otestováno 29 vybraných specifických polymorfních mikrosatelitových markerů, u kterých byly získávány kvalitní amplifikační produkty. K testování bylo využito 5 porostů dubu pýřitého ze čtyř lokalit z Čech a jeden porost z Moravy. Pro praktické a ekonomicky výhodnější využití DNA analýz bylo z testovaných markerů následně vybráno 10 jaderných mikrosatelitových markerů vhodných pro rozlišování genetických struktur různých porostů dubu pýřitého. Sekvence primerů zvolených markerů MSQ13, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG96 byly publikovány autory GUICHOUX et al. (2011), markerů PIE095, PIE102, PIE141, PIE243, PIE253 autory DURAND et al. (2010) a markeru QQMy50 autory BODÉNÈS et al. (2012). Syntézu fluorescenčně značených primerů provádí komerční firmy (např. Life Technologies Czech Republic s. r. o.). Charakteristiky markerů [(názy, motiv repetece, sekvence primerů, velikosti PCR produktů v počtech párů bází (bp)] jsou uvedeny v tabulce 1. Mezi analyzovanými jedinci se sledují rozdíly v délce těchto lokusů. Pro vyhodnocení jejich délky musí být provedena amplifikace mikrosatelitových lokusů, která se provádí pomocí polymerázových řetězových reakcí (PCR). Pro získání kvalitních a velikostně příslušných amplifikátů zvolených lokusů bylo nutné optimalizovat koncentrace příslušných chemických komponent reakčních směsí (Tab. 2) a teplotní cykly polymerázových

řetězových reakcí (PCR) (Tab. 3). Optimalizace probíhaly i za účelem seskupení PCR amplifikací do multiplexů, aby z důvodu časových a finančních úspor mohly probíhat analýzy více markerů najednou. PCR amplifikace 10 vybraných markerů byly sestaveny do dvou 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 reagensii. Postupy PCR amplifikací 1. a 2. multiplexu jsou uvedeny v následujících protokolech.

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

Lokus/motiv repetice	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
MSQ13 (TC)	F: ACACTCAGACCCACCATTTTTCC R: TGGCTGCACCTATGGCTCTTAG	186–228
QrZAG11 (TC)	F: CTTGAACTCGAAGGTGTCC R: TGGTTGACTAAAGTATGAACTGTTTG	224–266
QrZAG20 (TC)	F: CCATTAAGAAGAAGCAGTATTTTGT R: GCAACTCAGCCTATATCTAGAA	154–188
QrZAG96 (TC)	F: CCCAGTCACATCCACTACTGTCC R: GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA	135–179
PIE095 (TC)	F: GAAAGTGAAACCCTTAATTCTCC R: CCTTGACGAATCCAAATCC	453–563
PIE102 (AG)	F: ACCTTCCATGCTCAAAGATG R: GCTGGTGATACAAGTGTTTGG	141–173
PIE141 (CT)	F: CGCTGTTCTAGTTTTTGC R: TTGCTGGTCTTTGCGTGTG	124–174
PIE243 (AG)	F: GGGGTCAGTAGGCAAGTCTTC R: GAGCTGCATATTTTCCTTAGTCAG	202–236
PIE253 (CT)	F: CCAGACACTTCACACCTCCAC R: AAGGGCTAAGAAAAGCACCAG	199–223
KQMy50 (CCT) <sub>3</sub> (CCG)(CCT)(CCA)(CCT) <sub>2</sub>	F: CGGGCTTTGGATACGGATTC R: CCCGATTTCCCTTCCCTGCT	255–288

## Protokoly polymerázové řetězové reakce (PCR):

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

PIE095 F – 10  $\mu\text{M}$  (NED), PIE095 R– 10  $\mu\text{M}$

PIE102 F – 0,25  $\mu\text{M}$  (VIC), PIE102 R– 0,25  $\mu\text{M}$

PIE141 F – 0,5  $\mu\text{M}$  (NED), PIE141 R– 0,5  $\mu\text{M}$

PIE243 F – 0,75  $\mu\text{M}$  (PET), PIE243 R– 0,75  $\mu\text{M}$

KQMy50 F – 1  $\mu\text{M}$  (6FAM), KQMy50 R– 1  $\mu\text{M}$

### Ředění primerů:

Pro ředění primerů si připravíme roztok TE pufru.

Příprava TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA): 10 ml roztoku připravíme z 10  $\mu\text{l}$  1M Tris – HCl a 0,2  $\mu\text{l}$  0,5M EDTA, doplníme  $\text{H}_2\text{O}$  (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich) do 10 ml.

Forward (F) i revers (R) primery markerů PIE095 a KQMy50 naředíme na zásobní roztoky 100 $\mu\text{M}$  koncentrace (100 pmol/ $\mu\text{l}$ ) pomocí TE pufru. Forward (F) i revers (R) primery markerů PIE102, PIE141, PIE243 naředíme na zásobní roztoky 10 $\mu\text{M}$  koncentrace (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) pomocí TE pufru. Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100  $\mu\text{l}$ , napipetujeme ze zásobního roztoku primerů PIE095 F – 10  $\mu\text{l}$ , PIE095 R – 10  $\mu\text{l}$ , PIE102 F – 2,5  $\mu\text{l}$ , PIE102 R – 2,5  $\mu\text{l}$ , PIE141 F – 5  $\mu\text{l}$ , PIE141 R – 5  $\mu\text{l}$ , PIE243 F – 7,5  $\mu\text{l}$ , PIE243 R – 7,5  $\mu\text{l}$ , KQMy50 F – 1  $\mu\text{l}$ , KQMy50 R – 1  $\mu\text{l}$  doplníme 48  $\mu\text{l}$  TE pufru).

Optimalizovaný protokol PCR v celkovém objemu 15  $\mu\text{l}$  na 1 vzorek s Type-it® Microsatellite PCR Kitem (Qiagen, Hilden, Germany).

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

PCR mix:	Objem na 1 vzorek ( $\mu\text{l}$ )
Type-it® Microsatellite PCR Kit	7,5
Primers mix	1
Q-Solution	1,5
$\text{H}_2\text{O}$ RNase – free	4
Přidat 1 $\mu\text{l}$ templátové DNA	

Uvedené chemikálie kromě primerů jsou součástí komerční sestavy Type-it® Micro-satellite PCR Kit.

**Tab. 3:** Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	5 min	Počáteční denaturace
Následně 32× opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	95 °C	30 sec	Denaturace
3.	57 °C	90 sec	Annealing (nasednutí primerů)
4.	72 °C	30 sec	Elongace (prodlužování řetězce)
1×			
5.	60 °C	30 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

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

MSQ13 F – 1 µM (NED), MSQ13 R – 1 µM

PIE253 F – 1 µM (PET), PIE253 R – 1 µM

QrZAG11 F – 2 µM (VIC), QrZAG11 R – 2 µM

QrZAG20 F – 1 µM (VIC), QrZAG20 R – 1 µM

QrZAG96 F – 1 µM (6FAM), QrZAG96 R – 1 µM

### **Ředění primerů:**

Provedeme naředění primerů na zásobní roztoky 100µM koncentrace (100 pmol/µl) s využitím TE pufru.

Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 µl, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů MSQ13 F – 1 µl, MSQ13 R – 1 µl, PIE253 F – 1 µl, PIE253 R – 1 µl, QrZAG11 F – 2 µl, QrZAG11 R – 2 µl, QrZAG20 F – 1 µl, QrZAG20 R – 1 µl, QrZAG96 F – 1 µl, QrZAG96 R – 1 µl a doplníme 88 µl TE pufru).

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

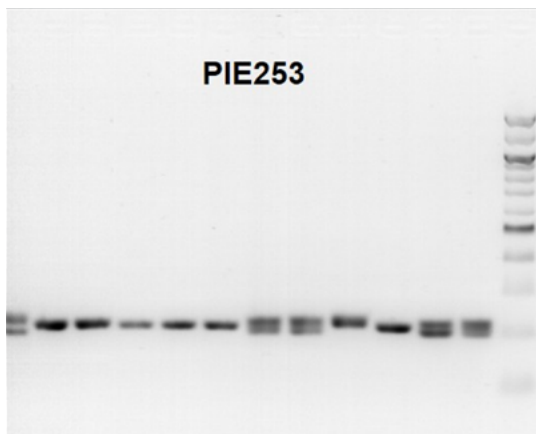
### Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a sterilní špičky, mikrozkumavky (stripy, destičky PCR s víčky), chladič box na PCR mikrozkumavky, 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 mikrovlnou 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 naleje 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 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 PIE253 je uveden na obr. 1.



**Obr. 1:** Elektroforetický záznam na 2% agarózovém gelu s amplifikovanými PCR produkty markeru PIE253. Standard molekulových hmotností DNA (100 bp DNA ladder) je umístěn vpravo

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.

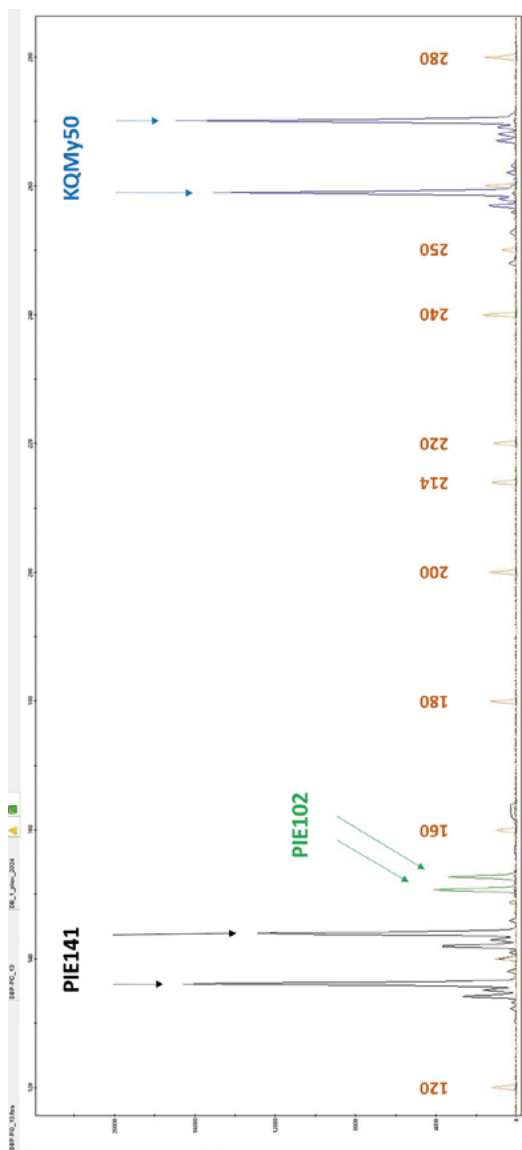
Genetický analyzátor pracuje na principu elektroforetického rozdělení fragmentů DNA v tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Polymer i fragmenty DNA zkoumaného vzorku jsou do kapiláry naplňovány automaticky. Detekce fragmentovaných úseků je založena na hodnocení fluorescence z fluorescenčně označených 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 10 markerů u každého šetřeného jedince dubu pýřitého byly získány PCR amplifikací ve dvou seskupeních (multiplexech), sestavených podle velikostí lokusů a fluorescenčního označení primerů, aby následující fragmentační analýzy mohly probíhat také jen ve dvou bězích. První běh zahrnuje amplifikované lokusy multiplexu 1 (PIE095, PIE102, PIE141, PIE243, KQMy50), v druhém běhu probíhá fragmentační analýza PCR produktů multiplexu 2 (MSQ13, PIE253, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG96). Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru (Applied Biosystem 3500) pro jedince dubu pýřitého 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, který 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 dubu pýřitého u mikrosatelitových markerů PIE141, PIE102 a KQMy50

## 2.5 Zpracování molekulárních dat

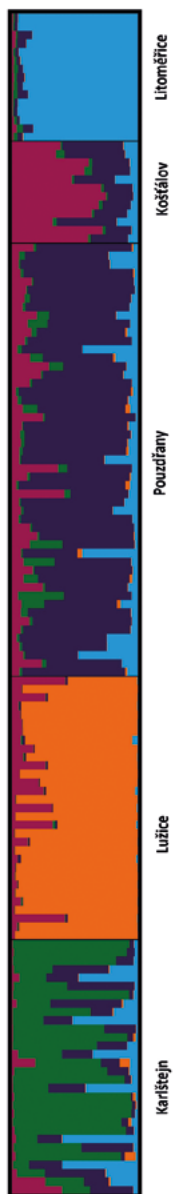
Ohodnocené velikosti amplifikovaných fragmentů získané fragmentační analýzou na genetickém analyzátoru představují velikosti alel uvedené v počtu bp analyzovaných mikrosatelitových lokusů. Mikrosatelitové markery jsou specifické úseky DNA s kodominantním charakterem, což znamená, že u organismů s diploidní sadou chromozómů jako je dub pýřitý získáme v každém lokusu 2 velikosti alel a rozlišíme heterozygoty od homozygotů. U homozygotů jsou zjištěny v lokusu dvě shodné velikosti alel, v případě heterozygota jsou zjištěny dvě různé hodnoty alel. Rozmezí velikostí alel u jednotlivých lokusů získaná analýzami 139 stromů dubu pýřitého jsou uvedena v tabulce 1. Získaný přehled hodnot alel u hodnocených lokusů pro jednotlivé stromy (vypracovaná multilokusová genotypizace – MLG) se statisticky zpracovává, např. za využití programů GenALEX 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007), GENEPOP 4.2 (RAYMOND, ROUSSET 1995; ROUSSET 2008). Pro kontrolu velikostí odečtených hodnot mikrosatelitových lokusů včetně ohodnocení frekvence nulových alel lze použít software Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004).

Z výsledků statistického zpracování lze hodnotit úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, Shannonův informační index, genetické diferenciaci, hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, odvození populačních struktur apod. Ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi (porosty) lze vypočítat na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972). Příklady zhodnocení genetických charakteristik u porostů dubu pýřitého jsou uvedeny v příloze v tabulkách 4, 5 a na obrázku 4.

Sledovat příbuznost, popřípadě zjistit genetickou identitu analyzovaných jedinců lze párovým porovnáním získaných multilokusových genotypů u šetřených stromů s využitím statistického programu např. GenALEX 6.503, analýzou Multilocus Matches Analysis for Codominant Data. Pro optimální vypovídací hodnotu DNA analýz byl výběr mikrosatelitových markerů zaměřen na dostatečně polymorfni markery. Na výstupech z fragmentačních analýz se vizuálně sleduje grafický charakter velikostně a barevně separovaných křivek (píků), u geneticky totožných jedinců (klonů) je tvar křivek shodný.

Sledovat genetické rozdíly mezi porosty dubu pýřitého lze také na základě porovnávání genetických struktur. K odvození struktur se využívá Bayesiánská klastrová metoda implementovaná v softwaru STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009). Podkladem pro STRUCTURE analý-

zu jsou multilokusová data vybraných polymorfních jaderných mikrosatelitových markerů a výsledkem jsou profily genetických struktur barevně rozlišené podle počtu klastrů ( $K$ ). Optimální hodnotu  $K$  lze stanovit na základě výsledků programu STRUCTURE SELECTOR (LI, LIU 2018). Genetické struktury se kvantifikují procentuálními podíly získaných klastrů (znázorněných různými barvami). Pro rozlišení sledovaných 5 porostů dubu pýřitého z lokalit Karlštejn, Lužice, Litoměřice, Košťálov a Pouzdřany byla zpracovaná analýza Structure, jejíž výsledek dokumentuje obr. 3. Při použití softwarově stanovené optimální hodnoty  $K = 5$  se v provedené analýze sledované porosty strukturovaly do barevně odlišných profilů. Nejvýrazněji odlišný profil vykazoval porost se zastoupením velmi starých jedinců z lokality Lužice, který lze považovat za autochtonní.



**Obr. 3:** Genetická struktura 5 populací dubu pýřitého (139 jedinců): Karlštejn, Lužice, Pouzdřany), Košťálov, Litoměřice

### III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Představené metodické postupy DNA analýz s využitím mikrosatelitových markerů pro sledování genetické diverzity u porostů dubu pýřitého nebyly dosud v ČR publikovány. Pro účelná a ekonomicky výhodnější genetická šetření bylo na základě výsledků ze statických analýz vybráno 10 vhodných polymorfních mikrosatelitových markerů MSQ13, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG96 (GUICHOUX et al. 2011), PIE095, PIE102, PIE14, PIE243, PIE253 (DURAND et al. 2010) a KQMy50 (BODÉNÈS et al. 2012). PCR amplifikace lokusů byly z hlediska možností jejich velikostní kombinace seskupeny do 2 multiplexů. Amplifikace a navazující fragmentační analýzy provedené v multiplexech představují velkou časovou a finanční úsporu. Genetická šetření dřevin prováděná na molekulární úrovni přímou analýzou DNA, jejíž struktura je nezávislá na změnách podmínek prostředí, umožňují získání objektivních výsledků. Pro zhodnocení diverzity populací je potřebné zvolit DNA markery, které vykazují vysokou míru polymorfismu. Mezi nejvariabilnější oblasti genomu patří mikrosatelitové lokusy, které se u jedinců 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 umožňují objektivní ověřování diverzity u vyhledávaných porostů dubu pýřitého za účelem získávání variabilních zdrojů reprodukčního materiálu. Popsané metodické postupy byly vypracovány a ověřeny s využitím vyhledaných 5 porostů dubu pýřitého z lokalit v Čechách – Karlštejn, Lužice, Litoměřice, Košťálov a moravské lokality Pouzdřany.

Výsledkem fragmentačních analýz mikrosatelitových markerů je vypracovaná databáze velikostí alel příslušných lokusů pro jedince sledovaných porostů. Následuje statistické zhodnocení a získání genetických charakteristik pro posouzení genetické diverzity mezi porosty i v rámci porostů, které může být vodítkem při výběru vhodných zdrojů reprodukčního materiálu pro lesnické využití a záchranu genových zdrojů této zákonem chráněné dřeviny.

## IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Předložené metodické postupy DNA analýz jsou návodem pro získání velikostí a frekvencí alel mikrosatelitových markerů jako genetických informací využitelných pro objektivní ověřování diverzity porostů dubu pýřitého. Přímým studiem genotypů lze selektovat dostatečně variabilní zdroje reprodukčního materiálu pro získání genově bohatšího potomstva a u z něho založených porostů lze předpokládat lepší adaptační schopnost, vyšší budoucí výnos a dosažení ekologické stability lesa. Poznátky o genetické struktuře porostů vybraných jako zdroje reprodukčního materiálu se mohou významně uplatnit pro management správných postupů zalesňování. Metodiku lze využít při zakládání semenného sadu dubu pýřitého pro možnost výběru vhodné skladby ortetů a kontrolního ověření správnosti vysazených ramet. V případě uznávání semenných sadů dle pravidel Národního programu ochrany a reprodukce genofundu lesních dřevin je podmínkou poskytnutí dotačního titulu odebrání referenčních vzorků z rodičovských stromů (rodičů rodin) pro budoucí následnou kontrolu deklarované identity klonů vybraných ortetů na základě DNA analýz.

Metodické postupy DNA analýz vyvinuté pro zjišťování genetických charakteristik jako jsou úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, heterozygotnosti, genetické diferenciacie, vzdálenosti a struktury mohou být využity pro rozšiřování genetických poznatků u dalších porostů dubu pýřitého a budou sloužit pro potřeby státní správy (MŽP, MZe). Významné uplatnění bude také pro koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofundu lesních dřevin, kterým je Národní lesnický institut (NLI), pro aplikační využití genetických poznatků při uznávání navrhovaných zdrojů reprodukčního materiálu a jejich zařazování do Národního programu ochrany a reprodukce genofundu lesních dřevin. Další uplatnění získaných znalostí o geneticky podmíněné proměnlivosti se předpokládá při aktualizaci souvisejících legislativních předpisů v oblasti ochrany a reprodukce genofundu lesních dřevin a nakládání s reprodukčním materiálem a jako podkladů pro aktualizace Oblastních plánů rozvoje lesa.

Genetická rozmanitost populací je podstatná pro přežití jejich zástupců a přizpůsobení se změnám životních podmínek na stanovišti. Znalost úrovně genetické diverzity populací, které se plánují využívat jako zdroj reprodukčního materiálu, je významná k efektivnějšímu využívání stávajících genetických zdrojů pro zkvalitňování genetické struktury populací a k zachování biodiverzity. Metodické postu-

py umožňující získávat poznatky o diverzitě dubu pýřitého 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.

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

Možnosti uplatnění může komplikovat finanční náročnost pořízení potřebného 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 diverzitě porostů dubu pýřitého je přínos pro lesní hospodářství v možnosti využívání ověřených zdrojů reprodukčního materiálu. Dub pýřitý, který je přizpůsobený růstu na teplých a suchých stanovištích, by bylo účelné více využívat vzhledem ke změněným klimatickým podmínkám. Reprodukce z genově bohatších výchozích zdrojů zaručuje získání stabilnějších a odolnějších porostů, které budou zvyšovat biologickou rozmanitost, lépe se přizpůsobovat změnám klimatu a tím přispívat k ochraně životního prostředí. Genetickým prověřováním stávajících porostů současně dochází i k naplňování cílů Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin – podporovat kvalitní reprodukční zdroje. Metodické postupy představených DNA analýz u dubu pýřitého mají přínos také celospolečenský z hlediska podpory záchrany genofondu této v ČR méně zastoupené dřeviny. Pokud by se v budoucím období z důvodu nepříznivého vývoje klimatických podmínek projevila nutnost rozšířeného pěstování tohoto druhu dřeviny i za účelem náhradního hospodářského využívání, lze očekávat zvýšenou produkci u porostů založených z kvalitních ověřených zdrojů reprodukčního materiálu. Významný je dub pýřitý i z ekologického hlediska pro zajištění stability lesních ekosystémů, kdy prostřednictvím hlubokého kořenového systému chrání půdu před erozí a lze jej využít i jako meliorační dřevinu.

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 133 Kč. Náklady u jedince na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 10 lokusů ca 190 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 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., BIOCEV.

Přínosy pro uživatele metodiky budou spočívat ve finanční úspoře vynaložených prostředků na vývoj metodických postupů analýz DNA u dubu pýřitého pro zjiš-

řování úrovně diverzity při výběru vhodných zdrojů reprodukčního materiálu pro jejich uznání a pro ověření genetické identity (např. vzhledem k dobré regeneraci dubu pýřitého z pařezů). Uvedené postupy DNA analýz by mohly být také aplikovány pro determinaci klonů při zakládání semenných sadů. Postupy k ověřování genetické diverzity zdrojů reprodukčního materiálu jsou základem pro získávání kvalitního reprodukčního materiálu použitelného pro umělou obnovu lesa a pro zachování genofondu dubu pýřitého. Cílené zvyšování genetické variability porostů přispívá k jejich lepší odolnosti k možným chorobám, škůdcům a nepříznivým podmínkám klimatu.

## **VI DEDIKACE**

Metodika byla zpracována v rámci řešení výzkumného projektu TA ČR č. SS06010209 „Zhodnocení potenciálu širšího lesnického uplatnění teplomilných druhů dubů v souvislosti s adaptací na probíhající změnu klimatu“ a institucionální podpory MZE-RO0123.

## VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- BODÉNÈS C., CHANCEREL E., GAILING O., VENDRAMIN G. G., BAGNOLI F., DURAND J., GOICOECHEA P. G., SOLIANI C., VILLANI F., MATTIONI C., KOELEWIN H. P., MURAT F., SALSE J., ROUSSEL G., BOURY C., ALBERTO F., KREMER A., PLOMION C. 2012. Comparative mapping in the Fagaceae and beyond with EST-SSRs. *BMC Plant Biology* 12: 153. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-153>
- BORDÁCS S., ZHELEV P., SCHIRONE B. 2019. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use of pubescent oak (*Quercus pubescens*). European Forest Genetic Resources Programme (EUFOR GEN), European Forest Institute: 6 s.
- BRUSCHI P., VENDRAMIN G. G., BUSSOTTI F., GROSSONI P. 2000. Morphological and Molecular Differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in Northern and Central Italy. *Annals of Botany* 85 (3): 325–333. <http://www.jstor.org/stable/42770646>
- BURGER K., GAILING O. 2022. Genetic variability of indigenous (*Quercus robur* L.) and late flushing oak (*Quercus robur* L. subsp. *slavonica* (Gáyer) Mátyás) in adult stands compared with their natural regeneration. *European Journal of Forest Research*, 141: 1073–1088. <https://doi.org/10.1007/s10342-022-01491-3>
- 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.
- DOW B. D., ASHLEY M. V., HOWE H. F. 1995. Characterization of highly variable (GA/CT) n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *TAG. Theoretical and applied genetics*, 91: 137–141.
- DURAND J., BODÉNÈS C., CHANCEREL E. et al. 2010. A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC Genomics*, 11: 570. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-570>
- DZIALUK A., CHYBICKI I., BURCZYK J. 2005. PCR multiplexing of nuclear microsatellite loci in *Quercus* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23: 121–128. <https://doi.org/10.1007/BF02772702>
- 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.
- GRULICH V. 2017. Červený seznam cévnatých rostlin ČR. In: Grulich V., Chobot K. (eds.): Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Cévnaté rostliny. *Příroda*, 35: 75–132.
- GUICHOUX E., LAGACHE L., WAGNER S., LÉGER P., PETIT R. J. 2011. Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus spp.*). *Molecular Ecology Resources*, 11: 578–585.
- HEJNÝ S., SLAVÍK B. (eds.) 1990. Květena České republiky 2. Praha, Academia: 540 s.
- HUBISZ M. J., FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9 (5): 1322–1332.
- ISAGI Y., SUHANDONO S. 1997. PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology*, 6: 897–899.
- 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.
- KAMPFER S., LEXER C., GLÖSSL J., STEINKELLNER H. 1998. Characterization of (GA)<sub>n</sub> Microsatellite Loci from *Quercus Robur*. *Hereditas*, 129: 183–186.
- KOONTZ A. C., SCHUMACHER E. K., SPENCE E. S., HOBAN S. M. 2024. Ex situ conservation of two rare oak species using microsatellite and SNP markers. *Evolutionary Applications*, 17: e13650. <https://doi.org/10.1111/eva.13650>
- LEXER C., HEINZE B., STEINKELLNER H., KAMPFER S., ZIEGENHAGEN B., GLÖSSL J. 1999. Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 185–191.
- LI Y. L., LIU J. X. 2018. Structure Selector: A web based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18: 176–177.
- MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O., CVRČKOVÁ H. 2018. Use of nuclear microsatellite loci for evaluating genetic diversity of selected populations of *Picea abies* (L.) Karsten in the Czech Republic. *Forests*, 9 (92): 1–15. doi:10.3390/f9020092

- 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.
- MULLIS K. B. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262: 56–65.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–392.
- PEAKALL R., SMOUSE P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- 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.
- 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.
- 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.
- STEINKELLNER H., LEXER C., TURETSCHKE E., GLÖSSL J. 1997. Conservation of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci between *Quercus species*. *Molecular Ecology*, 6: 1189–1194.
- SVOBODA P. 1955. Lesní dřeviny a jejich porosty. Část II. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- THUNDER R., CONRAD A. O., BURDINE CH., YANG J., LHOTKA J. M., ABBOTT A. G., NELSON C. D. 2022. White oak (*Quercus alba* L.) microsatellite markers for genetic diversity studies. *Research Note*: 6 s. <https://doi.org/10.2737/SRS-RN-26>

- 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., ŻUKOWSKA 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

- BURIÁNEK V., BENEDÍKOVÁ M., FRÝDL J., NOVOTNÝ P. 2013. Metodická příručka k určování domácích druhů dubů. Lesnický průvodce, 8: 40 s.
- 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: 32 s.

- 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.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O., VÍTOVÁ K. 2025. Metodické postupy DNA analýz pro ověřování klonové příslušnosti a genetické diverzity u javoru kleny (*Acer pseudoplatanus* L.). Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 4: 39 s.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J. 2014. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého (Evaluation of Norway spruce seed orchard using microsatellite markers). Zprávy lesnického výzkumu, 59 (4): 243–249.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E. 2017. Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u třešně ptačí. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 10: 40 s.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., KOMÁRKOVÁ M., TRČKOVÁ O., VÍTOVÁ K., HANÁČEK P. 2025. Metodické postupy ověřování klonové identity a charakterizace genetické diverzity u jeřábu břeku (*Sorbus torminalis* L. Crantz). Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 4: 39 s.
- NOVOTNÝ P., BURIÁNEK V. 2026. Přehled a potenciál využití autochtonních druhů teplomilných dubů v měnících se klimatických podmínkách. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 1: 112 s.

# **METHODOLOGICAL PROCEDURES FOR CHARACTERIZING THE GENETIC DIVERSITY OF DOWNY OAK STANDS (*QUERCUS PUBESCENS* WILLD.) USING DNA ANALYSES**

## *Summary*

Downy oak (*Quercus pubescens* Willd.) is a light-demanding and thermophilous tree species that grows in the warmest regions of Bohemia and in southern Moravia, predominantly on base-rich, shallow, and drought-prone soils. It reaches heights of up to 20 m and also occurs on exposed sites, where it attains a lower, more shrub-like growth form. It has a crooked trunk and thick bark deeply fissured into coarse, blocky plates. Stands of downy oak (*Quercus pubescens* Willd.) were displaced mainly in sites with more favorable economic conditions, and at present this species is classified as a legally protected tree species (ÚRADNÍČEK et al. 2009). With its deep root system, it protects the soil against erosion, particularly on scree-covered deforested slopes where other tree species do not grow. Low maintenance, high resistance to drought and heat, and the ability to thrive even in poor soils offer potential for its broader use in specific conditions where other woody plants do not succeed (NOVOTNÝ, BURIÁNEK 2026). Given the long-term periods of drought and high temperatures that have occurred in recent years across most lowland areas of the Czech Republic, it would be appropriate to begin using this species on a larger scale for the preservation of forest ecosystems.

For the expanded use of this species in forestry, monitoring genetic diversity is important in the selection of suitable sources of reproductive material, in order to establish sufficiently variable new stands that will be more resilient and enhance the biodiversity of forest ecosystems. Supporting genetically variable sources also contributes to the conservation of the gene pool of this legally protected tree species.

Methodological procedures for DNA analyses using microsatellite markers are presented for genetic studies to obtain objective information 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;

WÓJKIEWICZ et al. 2021) including various oak species (ISAGI, SUHANDONO 1997; STEINKELLNER et al. 1997; KAMPFER et al. 1998; LEXER et al. 1999; DZIALUK et al. 2005; BURGER et al. 2022; THUNDER et al. 2022; KOONTZ et al. 2024) as well as downy oak (BRUSCHI et al. 2000; DI PIETRO et al. 2020).

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. Ten selected polymorphic nuclear microsatellite markers MSQ13, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG96 (GUICHOUX et al. 2011), PIE095, PIE102, PIE141, PIE243, PIE253 (DURAND et al. 2010) and KQMy50 (BODÉNÈS et al. 2012) proved suitable for verifying levels of genetic diversity of downy oak stands. PCR products were separated by capillary electrophoresis using an Applied Biosystems 3500 genetic analyzer. Allele sizing was performed using GeneMapper<sup>®</sup> 4.1 software (Applied Biosystems). Five downy oak stands were used to develop this methodology. Verification of genetic diversity is essential for obtaining high-quality sources of reproductive material and for developing effective conservation strategies for this species. The procedures described in this methodology for verifying the genetic diversity of downy oak 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 preservation of the gene pool of downy oak. A targeted increase in the genetic variability of stands contributes to their improved resistance to potential diseases, pests, and adverse climatic conditions.

# PŘÍLOHA

## Příklady zhodnocení genetických charakteristik u porostů dubu pýřitého

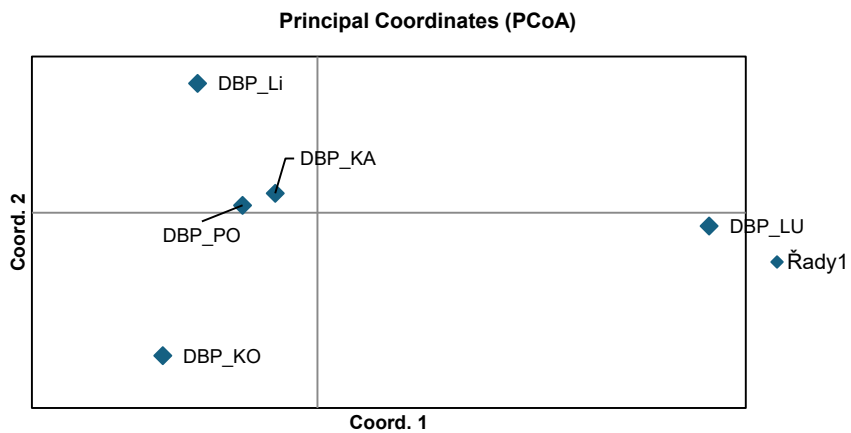
**Tab. 4:** Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro sledované porosty dubu pýřitého

Pop	Na	Ne	I	Ho	He
DBP-KA	12,3	7,67	2,18	0,59	0,85
DBP-LU	7,1	4,1	1,53	0,57	0,70
DBP-PO	15,2	8,49	2,3	0,67	0,86
DBP-KO	8,5	5,77	1,86	0,74	0,80
DBP-Li	9,8	6,62	2,03	0,72	0,84

Porosty dubu pýřitého: DBP-KA (Karlštejn), DBP-LU (Lužice), DBP-PO (Pouzdrány), DBP-KO (Košťálov), DBP-Li (Litoměřice)

**Tab. 5:** Hodnoty vzájemné diference  $F_{ST}$  mezi sledovanými porosty dubu pýřitého

	DBP_KA	DBP_LU	DBP_PO	DBP_KO	DBP_Li
DBP_KA	0,000				
DBP_LU	0,059	0,000			
DBP_PO	0,016	0,063	0,000		
DBP_KO	0,033	0,083	0,028	0,000	
DBP_Li	0,029	0,077	0,026	0,040	0,000



**Obr. 4:** Grafické znázornění genetických diferenciací pomocí analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis, PCoA)



Dub pýřitý v PP Lužické šipáky, CHKO České středohoří, LS Litoměřice (V. Buriánek)



Dub pýřitý na polesí Valtice, LZ Židlochovice (L. Čížková)



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

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

LESNICKÝ PRŮVODCE 2/2026