

České zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



Analýza populační struktury semenného sadu třešně ptačí *Prunus avium* L.

Diplomová práce

Autor: Bc. Anna Krejzková

Vedoucí práce: Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

2016

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Anna Krejzková

Lesní inženýrství

Název práce

Analýza populační struktury semenného sadu třešně ptačí *Prunus avium* L.

Název anglicky

Analysis of population structure in the seed orchard of wild cherry *Prunus avium* L.

Cíle práce

Cílem práce je analyzovat a popsat populační strukturu semenného sadu třešně ptačí v lokalitě Čejkovka, LS LČR Lužná. K dosažení cíle budou použita molekulární data (detekované alely S-lokusu a mikrosatelitová data) a údaje o fenologii kvetení a plodnosti sadu. Data budou analyzována, interpretována a diskutována především za účelem posouzení příčin nízké plodnosti semenného sadu a budou navrženy postupy vedoucí k vyšší produkci osiva ze zastoupených klonů.

Metodika

Součástí diplomové práce bude literární rešerše zahrnující témata semenné sady, využití a charakteristika třešně ptačí jako druhu a rozbor základních principů populační genetiky s využitím molekulárních dat a problematiky autoinkompatibility.

Bude provedena revize aktuálního stavu semenného sadu (mortalita, zdravotní stav) a všichni jedinci označeni visačkou s identifikačními údaji.

Bude proveden sběr rostlinného materiálu pro izolaci DNA (pupeny, listy) a DNA izolována.

Generovaná data (alely S-lokusu a minimálně 10 mikrosatelitových lokusů) budou vyhodnocena a interpretována ve vztahu k prostorové struktuře semenného sadu a fenologickým pozorováním. Analýza dat bude provedena s využitím vhodných softwarových nástrojů (např. GenAlEx, FSTAT, Poptree2) a výsledky budou interpretovány s důrazem na praktickou uplatnitelnost zjištěných závěrů.

Doporučený rozsah práce

cca 50 stran

Klíčová slova

semenný sad, třešeň ptačí, genetická struktura, autoinkompatibilita

Doporučené zdroje informací

- Cachi, A. M., and A. Wuensch, 2014, Characterization of self-compatibility in sweet cherry varieties by crossing experiments and molecular genetic analysis: *Tree Genetics & Genomes*, v. 10, p. 1205-1212.
- Mariette, S., E. Balsemin, S. Stoeckel, M. Tavaud, H. Le Bouler, F. Santi, and M. Verger, 2007, Parental participation in progeny and effective population sizes in experimental seed orchards of wild cherry *Prunus avium* L. (Batsch): *Annals of Forest Science*, v. 64, p. 533-539.
- Peakall, R., and P. E. Smouse, 2012, GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update: *Bioinformatics*, v. 28, p. 2537-2539.
- Schueler, S., A. Tusch, and F. Scholz, 2006, Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites: *Molecular Ecology*, v. 15, p. 3231-3243.
- White, T. L., W. T. Adams, and D. B. Neale, 2007, *Forest genetics*: Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA, CABI Publishers, 682 p.

Předběžný termín obhajoby

2015/16 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 10. 11. 2015

prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 19. 12. 2015

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Děkan

V Praze dne 16. 04. 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Analýza populační struktury semenného sadu třešně ptačí *Prunus avium* L. vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jiřího Koreckého, Ph.D. a použila jsem jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. O vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 20.4.2016

Podpis:

Anna Krejzková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Jiřímu Koreckému, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad, věcných připomínek a vstřícnost při konzultacích. Dále Ing. Oldřichu Hrdličkovi a Ing. Hubertu Královi za poskytnuté informace o semenném sadu Čejkovka. Mgr. Janu Bílému za významnou pomoc při generování mikrosatelitových dat a Ing. Petru Sedlákovu, Ph.D. za možnost využít data generovaná jeho týmem (genotyp S – lokusů) pro účely zpracování této diplomové práce.

Abstrakt

Semenný sad třešně ptačí (*Prunus avium* L.) Čejkovka, LS LČR Lužná, vznikl v roce 2002. Sad se vyznačuje podprůměrnou produkcí osiva. První sběr proběhl v roce 2015, sebráno bylo 35 kg osiva. Na základě genetických analýz byly detekovány alely S – lokusu a mikrosatelitová data. Také byla pozorována fenologie kvetení a plodnosti jednotlivých ramet. Bylo zjištěno, že z evidovaných 59 klonů je 46 klonů různých genotypů a 29 klonů se neshoduje v S – lokusu. Zhruba 37 % ramet v sadu je geneticky identických. V roce 2015 plodilo celkem 45 % ramet. Efektivní počet klonů v sadu na základě evidence je 31, na základě SSRs 12 a podle S – lokusů 10. Efektivní počet klonů, které plodily v roce 2015 dle evidence je 20, dle SSRs 8 a na základě S – lokusů pouze 5. Pro zvýšení produkce osiva by bylo vhodné geneticky identické klony z části nahradit klony s jiným genotypem. Další možností je využít stávající sad k odebrání roubů a založit nový sad, podle vhodného designu.

Klíčová slova: semenný sad, třešeň ptačí, genetická struktura, autoinkompatibilita

Abstract

The seed orchard of *Prunus avium* L., Čejkovka, LS LČR Lužná, was established in 2002. Low seed production is characteristic for the orchard. First seed collection took place in 2015, summing up to 35 kilograms. Based on genetic analysis, S - locus alleles and microsatellite data were detected. Furthermore, phenology of blooming and fertility of individual ramets was observed. It was detected that from the registered 59 clones, 46 clones were of different genotypes and 29 clones are different in S - locus. Approximately 37% ramets in the orchard are genetically identical. In 2015, a total of 45% ramets produced seeds. Based on evidence, the effective number of clones in the orchard is 31, 12 based on SSRs and 10 based on S - locus. The number of seed producing clones in 2015 was 20 based on evidence, 8 based on SSRs and only 5 based on S - locuses. In order to achieve higher seed production it would be appropriate to partially supplement genetically identical clones with those of different genotypes. An additional option would be utilizing the existing orchard to collect grafts to establish a new, appropriately designed, orchard.

Keywords: seed orchard, wild cherry, genetic structure, self-incompatibility

Obsah

1. 1. Úvod.....	9
1. 2. Cíl práce	10
2. Literární rešerše.....	11
2. 1. Třešeň ptačí (<i>Prunus avium</i> L.)	11
2. 2. Šlechtění dřevin.....	12
2. 2. 1. Šlechtitelský cyklus.....	14
2. 2. 2. Popis populací	15
2. 2. 3. Rekonstrukce rodokmenu.....	16
2. 3. Semenné sady	17
2. 3. 1. Typy semenných sadů	19
2. 3. 2. Umístění a velikost semenného sadu	21
2. 3. 3. Designy semenných sadů	21
2. 3. 4. Genetická kvalita.....	23
2. 3. 5. Genetický zisk	23
2. 3. 6. Genetická efektivita.....	24
2. 3. 7. Genetická diverzita.....	24
2. 3. 8. Efektivní velikost populace	25
2. 3. 9. Semenné sady – legislativa	26
2. 3. 10. Národní program	27
2. 3. 11. ERMA2	27
2. 5. Molekulárně genetické metody	28
2. 5. 1. Izolace DNA.....	28
2. 5. 2. Polymerázová řetězová reakce - PCR	30
2. 5. 3. Multiplex PCR.....	30
2. 5. 4. Genetické markery	31
2. 5. 5. Autoinkompatibilita	34
2.6. Programy pro analýzu dat	35
2. 6. 1. GeneMarker®.....	35
2. 6. 2. GenAIEx 6.5 (Genetic Analysis in Excel)	36
2. 6. 3. Cervus.....	37
3. Metodika.....	38
3. 1. Semenný sad – Čejkovka	38
3. 2. Fenologie kvetení	39
3. 3. Sběr a uchovávání vzorků	41
3. 4. Izolace DNA.....	41
3. 5. Analýza mikrosatelitových lokusů	42
3. 6. Efektivní počet klonů v semenném sadu.....	45
4. Výsledky.....	47
4. 1. Genetická struktura sadu Čejkovka.....	47
4. 1. 1. Výběrové stromy	47
4. 1. 2. Genetická struktura	50
4. 1. 3. Efektivní počet klonů v semenném sadu.....	54
4. 2. Fenologie.....	55
4. 3. Plody.....	55
5. Diskuze.....	58
6. Závěr.....	61
7. Seznam literatury a použitých zdrojů.....	63
7. 1. Internetové zdroje.....	72

8. Seznam příloh.....	73
9. Přílohy	74

Seznam tabulek, obrázků a grafů

Tabulka 1: Multiplex A	43
Tabulka 2: Multiplex B	44
Tabulka 3: Multiplex C	44
Tabulka 4: Multiplex D	44
Tabulka 5: Výběrové stromy	48
Tabulka 6: Analýza frekvence alel.....	51
Tabulka 7: S alely klonů (alely jsou označeny číslem)	53
Tabulka 8: Efektivní počet dle evidence	54
Tabulka 9: Efektivní počet dle SSRs.....	54
Tabulka 10: Efektivní počet dle S – lokusů	54
Tabulka 11: Efektivní počet dle evidence	54
Tabulka 12: Efektivní počet dle SSRs.....	54
Tabulka 13: Efektivní počet dle S - lokusů	54
Tabulka 14: Nekvetoucí ramety	55
Tabulka 15: Neplodící klony	55
Tabulka 16: Plodnost klonů č. 392 - 398	56
Tabulka 17: Plodnost klonů.....	56

Obrázek 1: Šlechtitelský cyklus.	14
Obrázek 2: Schéma fungování gametofytické autoinkompatibility.....	35
Obrázek 3: Typická pattern. Šipky označují skutečnou délku alel.	36
Obrázek 4: Pattern s „A“ produktem.	36
Obrázek 5: Semenný sad Čejkovka - pohled od silnice.....	39
Obrázek 6: Rameta hodnocena 0.....	40
Obrázek 7: Rameta hodnocena 1	40
Obrázek 8: Rameta hodnocena 2.....	40
Obrázek 9: Rameta hodnocena 3.....	40

Graf 1: Genetická vzdálenost výběrových stromů	49
Graf 2: Prostorová korelace.....	49
Graf 3: Procentické zastoupení alel S – lokusu v semenném sadu Čejkovka	52
Graf 4: Plodnost ramet	57
Graf 5: Plodnost ramet	57

1. 1. Úvod

Semenné sady jsou účelové výsadby pro šlechtění a produkci vysokohodnotného osiva (Paule, 1992). Předpokladem pro správné plnění funkcí sadu je ověření jednotlivých klonů, zda jejich potomstva odpovídají kritériím výběru. Nejstarší semenné sady v České republice pocházejí ze 70. let 20. století (Kaňák et al., 2009).

Tato diplomová práce se zabývá semenným sadem třešně ptačí (*Prunus avium L.*) Čejkovka, LS LČR Lužná. Sad byl založen v roce 2002, avšak vzhledem k velmi nízké plodnosti sadu, první sběr proběhl až v roce 2015, kdy bylo sebráno 35 kg. Pro zjištění příčin nízké plodnosti sadu byla využita molekulární data (mikrosatelitové markery) a detekce alel S – lokusu. Také byla v roce 2015 pozorována fenologie kvetení a plodnosti sadu. Fenologické šetření bylo srovnáno s pozorováním Kozlíkové (2008) a s pozorováními Ing. Hrdličky od založení sadu. Ze sadu byly odebrány vzorky listů, u kterých byla následně provedena analýza molekulárních dat (mikrosatelitových dat, alel S – lokusu). Mikrosatelitové markery jsou vysoce polymorfní a nereagují na změny prostředí a díky těmto markerům je možné určit variabilitu v populaci. Celkem bylo analyzováno 24 mikrosatelitových lokusů. Detekované alely S – lokusu nás informují o autoinkompatibilitě jednotlivých klonů. Gametofytická autoinkompatibilita je mechanismus u některých krytosemenných rostlin, jenž zabraňuje v samoopylení. Autoinkompatibilita zabraňuje opylení rostliny se stejným genem (Öpik a Rolfe, 2005). Při fenologickém šetření v dubnu a květnu 2015 byla pozorována fenologie kvetení u každé ramety. Také bylo zjištěno kolik ramet plodilo. Na základě výsledků mikrosatelitových dat, byly odebrány vzorky z některých výběrových stromů a byla u nich taktéž provedena genetická analýza. Výsledky analýzy potvrdily, že některé výběrové stromy jsou geneticky identické. Ze získaných dat o jednotlivých klonech byl vypočítán efektivní počet klonů a efektivní počet plodících klonů v roce 2015. V závěru této práce jsou navrženy postupy, které by mohly vést ke zvýšení produkce osiva v daném semenném sadu.

Literární rešerše se zabývá šlechtěním lesních dřevin, semennými sady, autoinkompatibilitou, efektivní velikostí populace, popisem genetických markerů, popisem izolace DNA a gelové elektroforézy a samozřejmě popisem třešně ptačí.

1. 2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je popsat populační strukturu semenného sadu třešně ptačí LS LČR Lužná, v lokalitě Čejkovka. K dosažení cíle budou využita molekulární data (mikrosatelitová data a detekované alely S – lokusu) a údaje o fenologii kvetení a plodnosti sadu. Mikrosatelitová data pomohou odhalit genetickou příbuznost klonů v sadu a výběrových stromů a detekované alely S – lokusu nás informují o gametofytické autoinkompatibilitě jednotlivých klonů. Získaná data budou analyzována, interpretována a diskutována za účelem posouzení příčin nízké plodnosti semenného sadu. Následně budou navrženy postupy, které by mohly zvýšit produkci osiva ze zastoupených klonů.

2. Literární rešerše

2. 1. Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.)

Třešeň ptačí patří do čeledi Rosaceae. Je to opadavý, zhruba 30 m vysoký strom s rovným silným kmenem a nepravidelnou, vysoko posazenou, volně olistěnou korunou. Mezera (1989) uvádí u třešně ptačí, že tloušťka kmene bývá až 70 cm. Naopak štíhlý až tenký kmen je uveden u Heiekeho (1978).

Nachází se v celé Evropě kromě severských zemí (Mezera, 1989), dále se vyskytuje ve střední Asii, na západní Sibiři, Kavkaze a na severozápadě Afriky. V ČR je třešeň ptačí rozšířená nejvíce ve středních Čechách, Českém středohoří a také na jižní Moravě (Hejný et al., 1992). V Evropě ji najdeme především v křovinách a smíšených lesích (Musil, 2005).

Třešeň vyžaduje úživnou, mírně vlhkou, vápenitou půdu a výslunné polohy. Roste v lesích a na jejich okrajích, v houštinách a na březích potoků, v Alpách až do nadmořských výšek 1500 m, ovšem v Karpatech roste jen do 800 m nadmořské výšky (Mikula, 1979). Spiecker (1988) uvádí, že třešeň ptačí je méně náročná na úrodnost půdy, ovšem na obohacených stanovištích ekologické řady D (od dubového stupně až po bukový) mívá největší přírůsty. Pro pěstování třešně jsou důležitými faktory nároky na světlo, brzká kulminace přírůstu, slabší odolnost proti větru i napadení hnilobou (Prudič, 1996).

Borka se uvolňuje v příčných pruzích, s nápadnými, vodorovnými lenticelami, je červenavě hnědošedá, slabě lesklá. Pupeny jsou vejcovité, špičaté, leskle červenohnědé, přitisklé (Kremer a Poláček, 1995).

Listy jsou střídavé, podlouhle vejčité, zašpičatělé, báze klínovité nebo zaokrouhlené, hrubě pilovité, většinou s celokrajnou špičkou, poměrně tenké a chabé, na líci lysé, zpravidla poněkud svraskalé, tmavozelené, na jemně chlupatém, světlezeleném rubu vystupuje zřetelně hlavní žilka, na řápíku má 2 velké, červené žlázy. Na podzim listy žloutnou a červenají a v říjnu opadávají (Mikula, 1979). Květy rozkvétají před úplným vývinem listů, kvetou bíle, jsou dlouze stopkaté v okolíčnatých svazečcích (Fér a Pokorný, 1964). Plodem je kulovitá peckovice, zpočátku je zelená, později červená a někdy až téměř černá (Mikula, 1979). Dužina je nasládlá či nahořklá (ptáčnice, var. *sylvestris*) a uzavírá hladkou kulatou pecku s jedním bezbílečným semenem, které špatně uchovává klíčivost (Fér a Pokorný, 1964).

Kořenový systém je dlouhý a bohatě větvený s hojným kořenovým vlášením (Hieke, 1978). Na podmáčených, kamenitých a mělkých půdách třešně vytváří plochý

kořenový systém. Prudič (1996) poukazuje na vyvrácení až třicetiletých stromů při vichřici v roce 1990, ale Musil (2005) uvádí, že k vývrátům nedochází.

Dřevo s červenavě hnědým jádrem a červenavě bílou bělí je lesklé, velmi tvrdé, pevné, pružné a výborně se leští (Mezera, 1989). V posledních letech je velmi ceněno jako náhrada za tropické druhy, protože namořené je podobné červenohnědému mahagonu (Musil, 2005). Je využíváno v nábytkářství, řezbářství i nástrojářství (Fér a Pokorný, 1964).

Somatické buňky třešně jsou diploidní ($2n=2x=16$) (Vaughan a Russel, 2004). Počet chromozomů se liší pravděpodobně v závislosti na odrůdě a ne vždy se jedná o diploidní stromy. Také byl zaznamenán počet chromozomů $2n$ 17, 18, 24 a 32 (Vachůn a Řezníček, 1989).

Mezi reprodukční strategie třešně patří pohlavní rozmnožování pomocí opylování hmyzem a následného šíření semen gravitací, ptáky a savci a nepohlavní rozmnožování kořenovou výmladností (Vaughan et al., 2007).

Alogamie třešně je řízena S – lokusem, který kontroluje autoinkompatibilitu a kompatibilitu mezi jedinci (Crane a Lawrence, 1928). Třešně se též řadí mezi entomofily a jsou opylovány zejména čmeláky (*Bombus spp.*) (Heinrich, 1976).

2. 2. Šlechtění dřevin

Šlechtění lesních dřevin je nedílnou součástí moderního lesnictví (Ruotsalainen, 2014). Společně s hospodaření v lesích a užitím genetických zásad rozvíjí výnosné, zdravé a udržitelné pěstování lesů (White, 2007). Modifikuje genetické složení stromových populací k lepšímu plnění lidských potřeb. Biotické a abiotické složky prostředí se stále mění, a tudíž historické adaptace mohou být dnes již zastaralé. Změna klimatu může zvýšit potřebu umělé obnovy lesa a šlechtění lesních dřevin. Šlechtění lesních dřevin urychluje adaptaci stromů ke změnám prostředí (Ruotsalainen, 2014).

Funda a El-Kassaby (2012) definuje šlechtění lesních dřevin jako kombinaci pěstebních a lesnických činností, které jsou obvykle opakovaně aplikovány pro plné využití existující přirozené genetické variace v populacích a ke zvýšení ekonomické hodnoty uměle obnovovaných lesů.

Šlechtění dřevin, tak jak ho známe dnes, započalo v 50. letech 19. století. Toto významné zpoždění mělo za následek zanechání populací lesních dřevin převážně nedotčených genetickou manipulací a využití znalostí a zkušeností šlechtitelů získaných v průběhu staletí v jiných oborech (van Buijtenen, 1984).

Šlechtění lesních dřevin je intenzivní především v oblastech, kde je praktikováno hospodářství s krátkou obnovní dobou (např. borovice montereyská *Pinus radiata* na Novém Zélandu, eukalypty v Jižní Americe). Ale má také klíčovou roli v oblastech, kde má velký ekonomický dopad lesnictví s umělou obnovou (např. Skandinávie a Kanada) (Ruotsalainen, 2014).

Metody šlechtění můžeme rozdělit na šlechtění výběrem a novošlechtění. Šlechtění výběrem může být prováděno jako individuální výběr nebo hromadný. Populace je množena vegetativně či generativně, tím zůstává stejně genetická variabilita. Novošlechtěním je myšlena hybridizace, mutační šlechtění či genetické manipulace. Díky novošlechtění můžeme získat nové kombinace dědičných vloh (Paule, 1992).

V 60. letech 20. století se dřeviny začaly množit biotechnologickými postupy *in vitro*. Postupy *in vitro* spočívají v indukci organogeneze nebo somatické embryogeneze následované dopěstováním celistvých rostlin. Tento postup vede k rychlému množení dřevin, které mají vynikající genetické vlastnosti (např. selektované stromy, hybridy z kontrolovaného křížení). V 80. letech bylo jako u první dřeviny *Prunus avium* dokázáno, že lze množit velké množství výběrových stromů této dřeviny za pomoci orgánových kultur (Vítámvás et al., 2006).

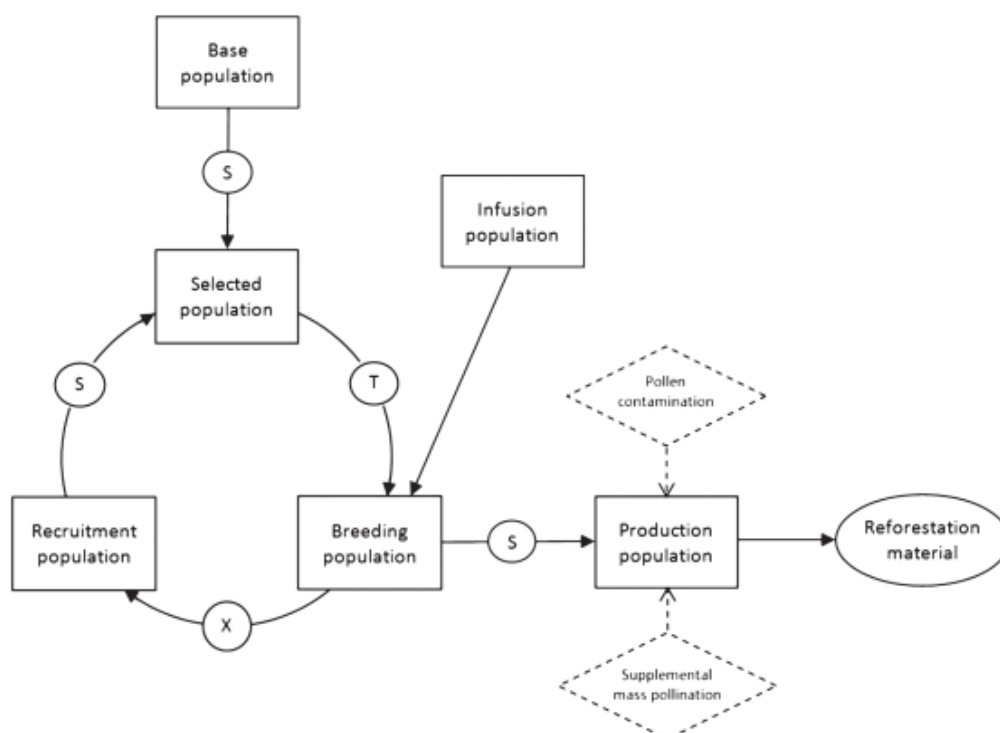
Při svém vzniku, byly činnosti spojené se šlechtěním dřevin většinou zahájeny s cílem okamžitě splnit poptávku po vysoce kvalitních dřevařských výrobcích, bez jakéhokoliv plánování pro budoucí generace. Dosažení přiměřených zisků rychle a efektivně bylo možné, pokud byla aplikovaná velmi intenzivní selekce (tj. selekce jen malé části z nejlepších jedinců). Avšak od tohoto krátkodobého myšlení bylo upuštěno, protože by zanechalo příliš mělký genetický základ pro budoucí programy šlechtění, zejména když by byly krátkodobé programy převáděny do dlouhodobého úsilí (Funda a El-Kassaby, 2012). Současné dlouhodobé šlechtění kombinuje zachování dostatečné genetické variace, nezbytné pro dlouhodobý genetický zisk a vysoký okamžitý zisk z krátkodobých akcí, které šlechtitelské práce odůvodňují ekonomicky (Ruotsalainen, 2014).

Většina dlouhodobých programů může být popsána pomocí rámce opakované selekce šlechtitelského cyklu, který se skládá ze dvou nezávislých, ale vzájemně se nevylučujících, fází - šlechtění a produkce. Tyto fáze jsou úzce spojeny a jejich hlavním cílem je dosáhnout a udržet si široký genetický základ, přičemž kombinují požadované vlastnosti vhodných, vysoce kvalitních, dobře přizpůsobivých stromů, které by byly hodnotné pro další generace.

2. 2. 1. Šlechtitelský cyklus

První fáze (fáze šlechtění) je složena ze selekce jedinců v porostech, plantážích nebo vyšlechtěných pokročilých generací podle specifických kritérií, která by zajistila splnění definovaných cílů. Těmito kritérii je šlechtění, které zahrnuje kontrolované křížení mezi vybranými jedinci, aby umožnili získávání genetických parametrů potřebných k provedení druhého kola šlechtění a testování, k vyhodnocení genetické kvality těchto selektovaných stromů, testováním jejich potomstva a potomstva samotného (tzv. backward a forward selekce) (El – Kassaby a Lstibůrek, 2009). Selektce a testování může být změněno a některé části fáze mohou být dokonce vynechány úplně, což vede k zjednodušenému šlechticímu cyklu. V generačním obratu může být křížení nahrazeno volným opylením, jestliže křížení není realizovatelnou metodou, kvůli potížím s produkcí semen (např. douglaska tisolistá *Pseudotsuga menziesii* na Novém Zélandu) (Ruotsalainen, 2014).

Další fáze se zaměřuje na zakládání lesních porostů či plantáží z vylepšeného semenného materiálu. Programy na šlechtění dřevin jsou extrémně závislé na zdrojích a dlouhodobých snahách, a proto je nezbytné zkoumat méně náročné alternativní přístupy, které jsou schopné dodávat přijatelné a uspokojivé zisky (Funda a El-Kassaby, 2012).



Obrázek 1: Šlechtitelský cyklus.

Base population = základní populace, **selected population** = selektovaná populace, **breeding population** = šlechtitelská populace, **recruitment population** = náborová populace, **infusion population** = infuzní populace, **production population** = produkční populace, **reforestation material** = zalesňovací materiál, **pollen contamination** = kontaminace pylem, **supplemental mass pollination** = doplňkové opylení. Označení s je selekce, t značí testování potomstev a x je křížení mezi jedinci. Zdroj: Funda a El-Kassaby, 2012.

2. 2. 2. Popis populací

Programy šlechtění dřevin se skládají z odlišných populací. Tyto populace jsou definovány svými funkcemi, nikoliv jejich fyzickým vzhledem, genetickou konstitucí nebo jejich stanovištěm (ve skutečnosti, některé funkčně odlišné populace se mohou fyzicky překrývat). Jednou z nejvýznamnějších vlastností konceptu je, že populace použité ve šlechtitelském cyklu jsou separované od populací užitých k produkci geneticky zlepšeného materiálu, určeného pro plantáže. Populace, ze které jsou vybráni jednotlivci do šlechtitelského programu, se nazývá základní či zdrojová populace (Funda a El-Kassaby, 2012). Zdrojové populace tedy reprezentují například uznané porosty, rezervace (Paule, 1992).

V každé generaci je z fenotypicky nadstandardních jedinců ze zdrojové populace, vytvořena kandidátská či selektovaná populace. Tato populace je obvykle méně početná než zdrojová populace, ale očekává se, že její genetické složení bude mít dostatečný potenciál k vytvoření zisků žádoucích znaků v dalších generacích. Vlastní genetická nadstandardnost těchto vybraných stromů je hodnocena na základě výsledků testů potomstva, které reprezentují nezbytnou součást všech programů a slouží, mimo jiných účelů, k vyloučení hůře hodnocených rodičů z populací - šlechtitelské a produkční.

Šlechtitelská populace je podskupinou vybraných jedinců, kteří prokázali žádoucí genetické kvality prostřednictvím testování potomstva a budou sloužit jako rodiče následujících generací (Zobel a Albert, 1984; Paule, 1992).

Při zakládání se klade důraz na zachování a získání dostatečně vysokých genetických zisků a úroveň genetické variability, udržením dostatku jedinců ve šlechtitelské populaci tak, že je zajištěn budoucí vývoj. V jakékoliv fázi šlechtění může být šlechtitelská populace doplněna materiálem z externích zdrojů, jako např. populace genetických zdrojů nebo jiného probíhajícího šlechtitelského programu. Doplnkový materiál se nazývá infuzní populace a selektovaný materiál dobře zapadá do daných cílů programu (Funda a El-Kassaby, 2012).

Nezávislá na všech populacích a zejména na šlechtitelském cyklu je produkční populace, někdy také nazývaná nasazovací populace. Jedná se o vysoce selektovanou podmnožinu šlechtitelské populace, bez ohledu na stupeň postupu (tj. první nebo pokročilé šlechtitelské cykly), která obvykle zahrnuje třeba jen několik desítek těch nejlepších jedinců (Allard, 1960). Produkční sady se zaměřují na produkci vyšlechtěného materiálu, například semenné sady při generativním množení a matečnice při vegetativním množení. Vyšlechtěný materiál musí splňovat dvě kritéria. Prvním kritériem je, že musí zaručit

rozmnožování bez ztráty genetické hodnoty a druhým kritériem je rychlost rozmnožování (tj. v krátkém čase získat z každého vyšlechtěného jedince dostatečné velké množství geneticky identického materiálu (Paule, 1992).

Faktory jako je sklizeň osiva, manipulace, skladovací praktiky, rozdílnost klíčivosti semen a prořezávky, v lesnických školkách významně ovlivňují genetický zisk i diverzitu obnovního materiálu (Funda a El-Kassaby, 2012). Snížení velikosti populace nevyhnutelně znamená ztrátu některých vzácných alel, díky efektu odběru vzorků, to ale neškodí dlouhodobému genetickému zisku, protože genetická variace je způsobena běžnými alelami. Podle simulačních studií, velikosti šlechtitelské populace 40-50 stromů jsou dostatečně velké k záruce trvalého gen. zisku a také předcházení inbreedingu. Předcházení inbreedingu v semenných sadech potomstva může být vyřešeno tak, že je populace rozdělena do subpopulací, které se nikdy vzájemně nekříží ve šlechtitelském cyklu. Tak mohou být získány nepříbuzné genotypy pro semenné sady zahrnutím jen 1 stromu z každé sublinie (Ruotsalainen, 2014).

Alternativou ke klasickému šlechtění lesních dřevin je tzv. breeding without breeding, kdy je testování potomstev zjednodušeno využitím polosesterských potomstev z volného opylení. Nebo je rodokmen jedinců zjištěn za pomoci otisku DNA a otcovského příspěvku či úplnou rekonstrukcí rodokmenu (Lstibůrek et al, 2012). S breeding without breeding je spojen pravděpodobnostní model, který minimalizuje úsilí vynaložené při genotypizaci. Tento model se zaměřuje na dosažení deklarované velikosti cílové populace za pomoci rekonstrukce rodokmenu a následné selekce. Důležité je, že genetický zisk je ovlivněn při minimálním úsilí při genotypizaci (Lstibůrek et al, 2011).

2. 2. 3. Rekonstrukce rodokmenu

Rekonstrukce rodokmenu poskytuje informace o matkách, otcích, reprodukčním úspěchu, míře kontaminace pylem a genetické rozmanitosti (Lai et al., 2010). Metody rekonstrukce rodokmenu, které vycházejí z genetických markerů jsou důležité pro vytvoření matice příbuznosti klonů v již probíhajících experimentech (Blouin, 2003; Jones a Ardren, 2003). Znalost kompletního rodokmenu je předpokladem moderního šlechtění (El – Kassaby et al., 2011). Pro selekci sadů pokročilé generace je kompletní znalost rodokmene nezbytná, díky ní je možné sady založit ze stávajících testů potomstev (Kobliha et al, 2012).

2. 2. 3. 1. Ředění pylu a zóny obohacení

Kontaminace pylem, definovaná jako příval pylu z vnějšku sadu, redukuje očekávaný genetický zisk sbíraného osiva ze sadu, protože sebraný materiál v sadu je opylován neznámými rodiči nižší genetické kvality než vybrané klony v sadu. Používají se různé postupy k odhadu kontaminace pylem, ale jsou preferovány využívající genetické markery. Nejčastěji používaná metoda je vyloučení otcovství, porovnáním genotypů vyprodukovaného osiva v sadu a určení frakcí, které by nemusely být oplodněny stromy ze sadu. Kontaminace pylem je důležitou otázkou v jehličnatých semenných sadech a pravděpodobně v mnoha semenných sadech krytosemenných druhů. V minulosti se běžně doporučovalo, aby byla vytvořena zóna ředění pylu byla cca 150m kolem semenného sadu. Záměrem bylo snížit množství kontaminace pylem částečnou izolací sadu od přilehlých stanovišť stejných druhů. Avšak přidáním zóny ředění pylu se zvyšuje velikost fyzického místa potřebného pro sad a tím i náklady (White, 2007). Adams a Burczyk (2000) uvádí, že zóny ředění pylu 150 m nejsou účinné. U jehličnatých semenných sadů je nutná izolace alespoň 500 m až 1000 m. Pro druhy opylované hmyzem či zvířaty potenciální účinnost zón ředění pylu závisí na vzdálenosti pohybu pylových vektorů.

Geneticky vhodný materiál stejného druhu vysázen kolem semenného sadu a tvoří tzv. zónu obohacení. Účinnost těchto zón není prokázána, ale předpokládá se, že je pravděpodobná částečná kontaminace tímto pylem.

Dalšími možnostmi jak předejít kontaminaci pylem je zvýšení produkce pylu v sadu tak, aby se snížil význam kontaminujícího pylu. To by mohlo být dosaženo založením většího sadu, protože větší sady produkují více pylu. Další možností je použití různých umělých pylových technik (např. oplodnění, hormonální léčba, prořezávání kořenů) a změna fenologie kvetení stromů tak, že budou kvést dříve či později než v porostech ve stejné oblasti (Bonnet-Masimbert and Webber, 1995). Jako metoda řešení problému s kontaminací pylem jsou studovány také kryté semenné sady (Ruotsalainen, 2014).

2. 3. Semenné sady

White et al. (2007) definuje semenný sad jako soubor vybraných klonů nebo rodin na jedné lokalitě. Semenné sady se skládají z vybraných, geneticky nadřazených, kandidátských rodičů nebo jejich potomstva (Funda a El-Kassaby, 2012). Semenné sady mohou přispět ke zvýšení produkce dřevní hmoty a produkovat dostatečné množství

kvalitního osiva (Lindgren, 2007). Pro zvýšení lesní produkce je investice do založení semenného sadu ekonomicky nejvýhodnějším řešením (Bilir et al, 2008).

Semenné sady jsou zakládány s předpokladem, že se jedná o uzavřené, perfektní a panmiktické populace, jinými slovy, že nemají genetické ani behaviorální omezení náhodného křížení, to znamená, že všechny ramety mají stejnou šanci se vzájemně křížit, včetně samooplození. Je-li tento předpoklad pravdivý, potom alelové a genotypové frekvence v populaci potomků by měly odpovídat frekvencím populace rodičů, s absencí rušivých jevů jako je migrace, selekce, mutace a náhodného genetického driftu (Funda a El-Kassaby, 2012). Ve většině případů je opylení stromů v sadech nekontrolované (tj. opylení cizosprašných stromů způsobené větrem, hmyzem nebo zvířaty) (White, 2007).

Semenné sady by měly být zakládány na úrodných, dobře odvodněných půdách s teplým místním klimatem (Ruotsalainen, 2014). Velmi důležitým aspektem hospodaření v semenných sadech je udržování dobré evidence. Stromy musí být jednoznačně označeny a zmapovány (White, 2007).

Cílem semenných sadů je produkce geneticky vysoce kvalitního osiva, které bude používáno pro obnovu lesa (Moriguchi et al, 2008). Dalším cílem je záchrana a reprodukce genofondu (Kaňák et al, 2008). S geneticky zlepšeným osivem se poté hospodaří v sadech a v lesích. Umístěním vylepšeného materiálu ve stejném místě se teoretické genetické zisky zdvojnásobují ve srovnání s řízeným sběrem osiva. Semenné sady jsou nejčastějším typem množení populace lesních dřevin (White, 2007).

První semenné sady byly založeny již v roce 1880 holandskými kolonisty na Jávě k množení domácí rostliny *Cinchona ledgeriana*. Nicméně, použití tohoto konceptu se rozšířilo asi až o sedm desetiletí později, kdy byly zřejmé důkazy o podstatném zlepšení prostřednictvím volby a šlechtění (Funda a El-Kassaby, 2012). První koncept klonových semenných sadů aplikoval v Dánsku prof. Syrach - Larsen ve 30. letech (Ruotsalainen, 2014).

Semenné sady jsou ve 24 z 28 států EU, které pokrývají 40 druhů. Finsko, Polsko a Švédsko jsou země s největšími oblastmi semenných sadů. Celkem země EU mají kolem 10 000 ha semenných sadů, půlka z nich jsou sady borovice lesní (*Pinus sylvestris*), dalšími druhy se značnými plochami jsou smrk ztepilý (*Picea abies*) a modřín opadavý (*Larix decidua*).

Semenný sad je dlouhodobá investice, která obsahuje mnoho biologických a ekonomických rizik. Tudíž jsou semenné sady v mnoha zemích vlastněny státem

(např. Polsko, Norsko) nebo je jejich zřízení dotováno státem (př. Finsko). Ve Švédsku sady zřizují soukromé lesní firmy na kooperativním základě podle národního (Ruotsalainen, 2014).

2. 3. 1. Typy semenných sadů

Semenné sady lze rozdělit podle vyšlechtěných generací nebo podle použitého druhu rostlinného materiálu - sazenic nebo klonů (Funda a El-Kassaby, 2012; White, 2007; Kaňák et al., 2008).

Sady I. generace

Sady I. generace jsou zakládány s rodiči vybranými podle jejich fenotypového projevu z porostů nebo nekultivovaných plantáží (tj. ze zakládající populace) a jejich genetická hodnota je do značné míry neznámá. Na základě výsledků získaných z testování potomstva (tj. backward selekce), mohou být sady I. generace vylepšeny roubováním méně kvalitních rodičů - poté se označují jako sady 1,5. generace, (Ivanek et al., 2010; Funda a El-Kassaby, 2012).

Sady pokročilých generací

Sady založené z klonů z kontrolovaného křížení elitních genotypů (nebo z jejich samosprašného potomstva a pozdější rekonstrukcí původu otců s cílem zvýšit genetický zisk) (tj. forward selekce) jsou sady pokročilých generací. V zemích s vyspělým šlechtěním lesních dřevin se můžeme setkat se semennými sady 6. generace (Ivanek et al., 2010). White et al. (1993). také uvádí sady 2,5 generace, které vznikají po otestování selekce ze sadů II. generace před založením klonových semenných sadů.

White et al. (2007) rozděluje semenné sady na klonové semenné sady a jádrové semenné sady. Oba dva typy jsou užitečné v odlišných situacích. Ale ve šlechtitelském programu jednotlivých druhů dřevin jedné organizace, mohou být použity oba typy.

Klonové semenné sady

Klonové semenné sady jsou nejběžnější metodou pro produkci geneticky zlepšeného osiva v lesnictví. Tento druh sadů je populární jak pro nahosemenné, tak pro krytosemenné druhy ve všech částech světa (White et al., 2007). V České republice jsou pouze sady klonové (Kaňák et al., 2008).

Klonový semenný sad je založen z klonů výběrových stromů, pomocí vegetativního množení (tj. roubování, zakořeňování či tkáňové kultury) (Paule, 1992). Obvykle je sad založen z 20 až 60 nejlepších klonů z ortetu. Počet ramet klonu je určen celkovým počtem stromů nezbytných k pokrytí poptávky. Často je zasazeno 50 až 100 ramet klonu v sadu. Fenotypový vzhled stromů v sadu není důležitý, neboť genetické hodnoty jsou determinované genetickými testy. Téměř vždy jsou v sadu tzv. wolf-tree, stromy silně rozvětvené díky širokému rozestupu. Mnohdy se stane, že se stromy zkroutí a vznikne malformace z opakované sklizně osiva. Cílem klonových semenných sadů je produkce vylepšeného osiva a všechny pěstební postupy jsou zaměřeny na maximalizaci genetické kvality produkce osiva při minimálních nákladech (White, 2007).

Jádrové semenné sady

Jádrové semenné sady obvykle zahrnují širší genetický základ, díky většímu počtu jedinců zahrnutých v křížení (otec je při samosprašení často neznámý). Očekává se, že genetický zisk bude nižší, protože jejich rodokmeny nejsou zcela známy (Funda a El-Kassaby, 2012). Jádrové semenné sady vznikají jako generativní potomstvo výběrových stromů (Paule, 1992). White et al. (2007) uvádí, že jádrové semenné sady jsou zakládány ze samosprašných sazenic nebo plnosesterských křížení mezi vybranými stromy a tyto rodiny zasázené v sadu jsou potomky výběrových stromů.

Důležitým rozdílem mezi klonovými semennými sady a jadernými semennými sady je, že mnoho jádrových semenných sadů je zakládáno jako víceúčelových. Klonové semenné sady jsou zakládány téměř výhradně jen pro produkci osiva. Speciální jádrový semenný sad může po několik let sloužit pro genetické testování, poté může být převeden na produkční semenný sad a nakonec může být využit jako zakládající populace při provádění výběru pro následující generace (Barnes, 1995).

Alternativou k jaderným semenným sadům jsou tzv. polycross semenné sady. Jsou založeny z potomstev výběrových stromů, které byly sprášeny pylem vybraných otcovských jedinců (Plomion et al, 2001). Výběrové stromy byly geneticky testovány, ale nebyly množeny vegetativně (Funda a El-Kassaby, 2012).

Češka (2014) uvádí rozdělení semenných sadů dle způsobu využití - produkční, udržovací a hybridizační.

Produkční semenné sady zajišťují geneticky kvalitní osivo lesních dřevin, ze kterého je vypěstován sadební materiál, jež je využit k obnově lesa.

Hybridizační semenné sady jsou výzkumné výsadby, sloužící k produkci hybridů 2. filiální generace.

Udržovací semenné sady se zaměřují na záchranu a reprodukci genových zdrojů lesních dřevin, zamezení ztráty a degradaci jednotlivých druhů a také na zvýšení genetické diverzity a adaptability reprodukčního materiálu.

Kobliha (2002) zmiňuje klonové archivy, jejichž cílem je konzervovat genofond vybraných genotypů výběrových stromů.

2. 3. 2. Umístění a velikost semenného sadu

Zvolená plocha by se měla vyznačovat výbornou produkcí osiva; blízkostí provozních zařízení, aby byly zajištěny dostatečné zásoby vody a požární ochrana; nepřístupností či dostatečnou vzdáleností zdrojů kontaminujícího pylu, které by mohly značně snížit genetický zisk a adaptabilitu osiva; rovným nebo mírně svažitém terénem s půdami, které usnadňují vstup pro hospodaření a sklizení osiva; stabilním vlastnictvím, zajišťujícím využití lokality po životnost sadu; vzdáleností od populačních center a oblastí, kde mohou být používány insekticidy; dobrým prouděním vzduchu, pokud jsou problémem mrazy během období květu (květy jsou náchylnější k poškození mrazem než vegetativní tkáně) (White, 2007; Kaňák et al., 2008).

Sad musí být dostatečně velký, aby bylo zajištěno dostatečné zásobování pylu. Velikost se stanoví na základě odhadu počtu zasazení schopných sazenic produkovaných ročně na 1 ha semenného sadu, rozdělením celkové roční poptávky po sazenicích dle počtu získaného v prvním kroku a úpravou tohoto čísla, např. prodej osiva jiným organizacím, potřeba splnit roční poptávky po sazenicích před kompletní reprodukční zralostí sadu (White, 2007).

2. 3. 3. Designy semenných sadů

Designy semenných sadů jsou vytvořeny s cílem optimalizovat prostorové rozmístění rodičovských stromů v sadu (El-Kassaby, 2014). Mnoho designů semenných sadů, které byly vyvinuty a realizovány mají společný cíl – minimalizovat samooplození a podporovat panmixii (Funda a El-Kassaby, 2012).

Navrhování semenných sadů zahrnuje 2 aspekty, genetický návrh zahrnující počet a typy klonů, jež mají být zavedeny a polní návrh specifikující fyzické rozmístění ramet všech klonů po ploše.

Prvním krokem je určení dostatečného počtu klonů. Příliš málo klonů může znamenat úzkou genetickou základnu, zvýšenou kontaminaci pylem (pokud je sad malý) nebo zvýšené samosprášení, díky těsné blízkosti ramet stejného klonu. Příliš mnoho klonů způsobuje složitější hospodaření a redukuje očekávaný genetický zisk (protože větší počet klonů znamená, že některé jsou méně kvalitní a to redukuje intenzitu výběru). Relativně velký počet klonů (např. 60) je třeba pro sady I. generace založených s klony netestovaných výběrových stromů. Testováním potomstva se identifikují klony nižší genetické kvality, které se odstraní společně s klony nevhodnými z jiných důvodů jako např. inkompatibilita roubu, fenologickým rozdílem v době kvetení. Odstraněním všech ramet z poloviny či 2/3 původních klonů na základě testů potomstev se může podstatně zvýšit genetický zisk. Jestliže již byly klony testovány, potom může být minimální počet pro založení sadu 20 klonů. V tomto případě se předpokládá, že všechny či většina klonů zůstanou v sadu. Rozestupy mezi rametami při sázení závisí na biologii druhu a předpokládané prořezávce v sadu (White, 2007).

Inbreeding (samosprášení nebo jiné typy opylení mezi blízkými příbuznými) je v semenných sádkách vysoce nežádoucí, protože inbrední osivo téměř vždy přináší sazenice, které trpí inbrední depresí. Toto redukuje očekávaný zisk sadu. Z tohoto důvodu je důležité maximalizovat vzdálenost mezi příbuznými (Young et al., 2000). Minimalizace inbreedingu s různým stupněm příbuznosti (jako je samooplození, opylení ramet stejného klonu, opylení jedinců, kteří mají stejného předka) představuje významný problém, neboť příbuznost se s každým dokončeným šlechtícím cyklem zvyšuje (Lstibůrek a El-Kassaby, 2010).

Již při výběru rodičovských stromů můžeme minimalizovat riziko inbreedingu a to tím, že vybíráme jedince od sebe vzdálené, ale jejich nepříbuznost lze ověřit pouze rekonstrukcí rodokmene a na základě molekulárních markerů (Kaňák et al., 2008; Lstibůrek a El-Kassaby, 2010).

Genetické a terénní designy klonových semenných sadů dvoudomých druhů

U volně opylovatelných klonových semenných sadů dvoudomých druhů, samčí stromy slouží jako opylovatelé a osivo je sbíráno ze samičích stromů. Samosprášení není možné a inbreeding není problém, pokud jsou příbuzné klony stejného pohlaví. V jednom extrému genetické diverzity je možné maximalizovat genetické zisky pomocí založení dvou-klonového

sadu s nejlepším klonem každého pohlaví. Ke zvýšení genetické diverzity jeden nebo oba klony mohou být periodicky měněny v různých blocích v sadu.

Terénní designy také závisí na biologii opylování, ale obvykle samčí stromy (opylovatelé) jsou systematicky rozmístěny po celém sadu. Jedním z příkladů je 1 opylovatel ve středu každé skupiny 9 stromů (3 řádky x 3 sloupce), což znamená, že je tam 8 samičích stromů obklopující každý samčí strom. Skupiny 9 stromů mohou být prostorově opakovány za vzniku celého sadu a oba samčí klony ve středu nebo některé z 8 samičích obklopujících stromů mohou být vyměněny v některých skupinách (White, 2007).

2. 3. 4. Genetická kvalita

Genetická kvalita je poměrně obecný výraz s nejednoznačným použitím. Genetická kvalita v programech šlechtění dřevin a ve šlechtění obecně je chápána z pohledu šlechtitelů tak, aby odrážela hodnoty, které lze snadno vyčíslit a porovnat s přírodními populacemi, zakládajícími populacemi. V této souvislosti termín hodnota obsahuje dva komponenty- genetický zisk a genetickou diverzitu, které působí v opačných směrech, což znamená, že jeden může být zvýšen jen na úkor druhého (Funda a El-Kassaby, 2012).

2. 3. 5. Genetický zisk

Všeobecný vzorec pro výpočet genetického zisku je $G = S \cdot h^2$, kde S představuje selekční rozdíl a h^2 dědivost (Paule, 1992). Selekční rozdíl S je rozdíl mezi průměrem populace a vyselektované části stejné generace. Měření selekčního rozdílu je snadné a často je vyjadřováno směrodatnou odchylkou. Jestliže chce šlechtitel dosáhnout zvýšení genetického zisku, musí manipulovat s jednou nebo oběmi složkami uvedeného vzorce.

Funda a El-Kassaby (2012) definují podstatu genetického zisku u kvantitativních znaků jako odezvu na selekci (R), která je posun mezi průměrnou fenotypovou hodnotou potomstva vybraných rodičů a rodičovské generace v důsledku selekce. To může být vyjádřeno jako $R = b_{op} S$, kde b_{op} je regrese potomstva a S je diferenciál selekce, tj. průměr nadstandardních vybraných rodičů. Pokud není žádná genetická příčina podobnosti rodič - potomek a žádná přirozená selekce, regrese může být nahrazena heritabilitou v úzkém smyslu (h^2), což je poměr aditivního genetického rozptylu k celkovému fenotypovému rozptylu, $R=S \cdot h^2$.

K tomu aby šlechtitelé kvantifikovali úspěch šlechtitelských programů, nadstandardnost vybraných rodičů musí být hodnocena vzhledem k původní populaci s využitím konceptu šlechtitelských hodnot. Šlechtitelská hodnota je součet průměrných účinků všech kvantitativních znaků lokusů, které nese jednotlivec, nebo-li hodnota jednotlivce založená na výkonu jeho potomstva. Šlechtitelské hodnoty můžou být vyjádřeny ve stejných absolutních jednotkách jako znak nebo jako odchylka od střední hodnoty populace. Genetický zisk se pak rovná šlechtitelské hodnotě všech jedinců v populaci, která se za předpokladu náhodného páření přenáší do další generace. V semenných sadech se potenciální nebo očekávaný genetický zisk vypočítá podobným způsobem, ale šlechtitelské hodnoty jsou převáženy rodičovským zastoupením (tj. počtem ramet reprezentujících konkrétního rodiče). Nicméně skutečný genetický zisk realizovaný osivem není znám a může se podstatně lišit od očekávané hodnoty, závisí na variabilitě v reprodukčním úspěchu rodiče a kontaminaci pylu (Stoehr et al., 2004).

2. 3. 6. Genetická efektivita

Genetická efektivita semenných sadů má zásadní význam, protože určuje rozsah genetického zisku a diverzity budoucích porostů lesních dřevin. Prakticky všechny aspekty genetické efektivy semenného sadu byly důkladně prošetřeny, včetně jejich biologického modelu, základních předpokladů a hospodářských postupů, vytvořeny a zavedeny ke zlepšení genetické kvality plodin (Funda a El-Kassaby, 2012).

2. 3. 7. Genetická diverzita

Plesník (2005) uvádí, že genetická diverzita je vyjádření rozmanitosti genů v rámci populací a druhů, zahrnuje různé populace v rámci jednoho druhu a rozdílné jedince v rámci určité populace. Funda a El-Kassaby (2012) definují diverzitu jako celkovou genetickou variabilitu, nesenou jednotlivci uvnitř nebo mezi genetickými jednotkami v důsledku jejich evolučních drah a tvořící základ pro jejich reakci vůči biotickým a abiotickým vlivům. Genetická diverzita je tedy považována za předpoklad pro adaptabilitu a další vývoj. Většinou je vyjadřována jako heterozygotnost, průměrný počet alel na lokusu nebo průměrný podíl polymorfních lokusů a lze jí odhadnout několika různými typy genetických markerů. Další možnost je vztáhnout genetickou diverzitu ke konceptu společného původu, který je definován jako pravděpodobnost, že dvě náhodně vzorkované alely (jedna od každého

rodiče) v daném lokusu jsou identické podle původu (Funda a El-Kassaby, 2012). Umělým výběrem, lze velmi rozšířit genetickou variabilitu selektovaného znaku (Relichová, 2009).

2. 3. 8. Efektivní velikost populace

Nejčastěji je genetická diverzita znázorňována efektivní velikostí populace (Funda a El-Kassaby, 2012). Efektivní velikost populace je jedním z důležitých parametrů, které determinují dynamiku genů v populaci. Tento koncept je stěžejní při posouzení míry ztráty genetické variace zapříčiněné náhodným genetickým driftem v konečné populaci. V reálných populacích dochází k proměnlivé početnosti populace, nestejnému poměru pohlaví a uniformní disperzi populace (Relichová, 2009). Genetický drift má tendenci snižovat genetickou rozmanitost a případně produkuje fixaci jedné alely na každém lokusu (Soulé, 1987). Změny v genetické skladbě velkých populací jsou relativně malé, ale v malých populacích mohou být zásadní (Panczak a Otová, 2013). Nepředvídatelné náhodné změny v alelových frekvencích mají za následek hromadění příbuzenských plemenitb v průběhu generací, což vede k poklesu fitness postižených jedinců a tento jev se nazývá inbrední deprese. Dopad inbrední deprese se liší mezidruhově a dokonce i v rámci populace jednoho druhu (Kärkkäinen et al., 1996).

Efektivní velikost populace je abstraktní pojem, který představuje velikost ideální populace, jenž produkuje stejnou úroveň genetického driftu jako uvažovaná populace (Funda a El-Kassaby, 2012). Ideální populaci představuje tzv. panmiktická populace, která je izolovaná, náhodně se párující populace s oddělenými generacemi, neprobíhá v ní žádný výběr a nedochází k mutacím genů. Pro výpočet nárůstu inbreedingu či variací genových frekvencí by velikost populace (N) měla být nahrazena efektivní velikostí (N_e) (Gömöry a Longauer, 2014). Variabilita počtu ramet v sadu a v plodnosti zapříčiňuje nerovnoměrné gametické příspěvky klonů. Efektivní počet klonů je založen na variabilitě počtu ramet mezi klony a popisuje genofond semenného sadu. Je odhadován vzorcem:

$$N_e = \frac{n_{total}^2}{\sum_{i=1}^N n_i^2}$$

Kde n_{total} představuje celkový počet ramet, n_i počet ramet genotypu i a N je celkový počet klonů v sadu (Kang et al., 2001).

Kang a Lindgren (1998) uvádějí rovnocenný způsob zjištění N_c s využitím variačního koeficientu (C.V.%) ramet všech klonů v sadu.

$$N_c = \frac{N}{\left(\frac{C.V.\%}{100}\right)^2 + 1}$$

N_c se snižuje, pokud se variace počtu ramet zvyšuje. Jestliže mají klony v sadu stejný podíl ramet, potom nemá celkový počet ramet vliv.

2. 3. 9. Semenné sady – legislativa

Semennými sady se zabývá zákon č. 149/2003 Sb., o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných druhů a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin). Tento zákon zpracovává Směrnice Rady 199/105/ES, ze dne 22. prosince 1999, o uvádění reprodukčního materiálu lesních dřevin na trh a stanovuje zásady ochrany a reprodukce genofundu lesních dřevin a podmínky, kdy lze uvádět do oběhu reprodukční materiál lesních dřevin a umělých kříženců, určených k obnově lesa, k zalesňování a pro udržování a zvyšování biologické různorodosti lesa, genetické různorodosti stromů a pro trvale udržitelné hospodaření v lesích.

Dle zákona č.149/2003 Sb. je možné sbírat reprodukční materiál pouze z uznaných zdrojů. Uzané zdroje reprodukčního materiálu lesních dřevin jsou identifikované, kvalifikované, selektované a testované. Semenné sady I. generace jsou řazeny mezi kvalifikované zdroje reprodukčního materiálu, sady pokročilých generací patří mezi zdroje testované.

Zákon také udává podmínky pro zařazení genetických zdrojů lesních dřevin do Národního programu a finanční prostředky pro jejich shromažďování, hodnocení, dokumentaci, ochranu, reprodukci a k provozování banky osiva a explantátů.

Zákon č. 149/2003 Sb. ukládá podmínky pro uznávání zdrojů reprodukčního materiálu, jeho uchovávání, podmínky pro sběr, požadavky na kvalitu, evidenci, obchodování s reprodukčním materiálem, povinnosti při obchodování mezi státy Evropské unie, podmínky pro udělení licence, ukládá sankce za přestupky fyzických osob a za správní delikty právnických a podnikajících osob (Zákon č. 149/2003 Sb.).

2. 3. 10. Národní program

Pro období 2014 až 2018 byl Ministerstvem zemědělství České republiky vyhlášen Národní program ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin podle § 2a zákona č. 149/2003 Sb., o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných druhů a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin), ve znění pozdějších předpisů.

Národní program zajišťuje dosud nedostatečně upravenou oblast ochrany a reprodukce genetických zdrojů lesních dřevin a uvádí do souladu s platnými právními předpisy a mezinárodními úmluvami a dohodami.

V Národním programu jsou zabezpečeny všechny nezbytné aktivity, jako shromažďování, evidence, dokumentace, popis, hodnocení, obnova a dlouhodobé uchování genetických zdrojů lesních dřevin. Dalším účelem je umožnit využívání genetických zdrojů lesních dřevin v České republice i v zahraničí k reprodukci a poskytování vzorků dostupných genetických zdrojů a relevantních informací za podmínek stanovených platnými mezinárodními dohodami a normami.

Mezi cíle Národního programu patří vytvoření předpokladů pro trvalé využívání genetických zdrojů lesních dřevin v souladu s potřebami lesního hospodářství a zásadami trvale udržitelného hospodaření v nich; monitoring genetických zdrojů lesních dřevin; zabezpečení evidence genetických zdrojů; vytvoření informační databáze; zajištění dostupnosti genetických zdrojů lesních dřevin pro zahraniční uživatele a zajištění přístupu pro domácí subjekty ke genetickým zdrojům ze zahraničí; přispění k uchování a využívání genofondu a biodiverzity v globálním měřítku (Zákon č. 149/2003 Sb.).

2. 3. 11. ERMA2

Evidence reprodukčního materiálu, nebo-li ERMA2, je internetová aplikace, která je provozována Ústavem pro hospodářskou úpravu lesa. ERMA2 má dvě části, část veřejnou a část neveřejnou.

Ve veřejné části je přístupný Rejstřík držitelů licencí pro nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin, Rejstřík uznaných zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin a vyhlášených genových základů České republiky, po vyhlášení Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin 2014 - 2018 je zde také seznam účastníků

Národního programu, seznam uznaných jednotek a genových základů zařazených v Národním programu. Lze zde najít také žádosti a formuláře.

Neveřejná část je přístupná pouze pověřeným osobám a obsahuje údaje potřebné pro tvorbu analýz a k výkonu ustanovení zákona č. 149/2003 Sb. v platném znění (Anonymus, 2016a).

2. 5. Molekulárně genetické metody

2. 5. 1. Izolace DNA

Pro izolaci rostlinné DNA se v praxi používá mnoho protokolů. Rozhodujícími kritérii pro zvolení protokolu je rychlost, jednoduchost, cenová dostupnost. Biochemické složení rostlinné tkáně jednotlivých druhů rostlin může zapříčinit nedostatečné výtěžky DNA při použití jednoho izolačního postupu. Izolační postupy musí být speciálně upraveny pro každý rostlinný druh i pro každou rostlinnou tkáň. Stejný protokol u blízce příbuzných druhů může vést k neúspěšné izolaci (Trojánek, 2013).

Izolace nukleových kyselin je nezbytnou podmínkou pro většinu charakterizací genomu a mapovacích postupů za použití genetických markerů a pro identifikaci a izolaci rostlinných genů v genetickém inženýrství. Stupeň požadované čistoty a kvality izolovaného DNA se liší dle jeho využití. Vysoká molekulární koncentrace, vysoká čistota DNA je vyžadována při tvorbě genomových DNA archivů, které jsou testovány rostlinnými genovými sekvencemi a jinými genetickými markery jako je RFLP. U genetických analýz může být stupeň čistoty nižší, pokud jiné faktory jako koncentrace DNA jsou významnější.

Izolace rostlinné DNA je obtížné kvůli tvorbě komplexů nukleových kyselin se sekundárními látkami, jako jsou polysacharidy nebo polyfenoly, uvolněných díky rozrušení buněk (Guillemaut a Maréchal-Drouard, 1992). Polysacharidy inhibují enzymovou aktivitu Taq DNA polymerasy a jejich přítomnost ve vzorku je charakteristická u velmi viskózních roztoků, které se špatně pipetují. Polyfenoly snižují výtěžek a kvalitu izolované DNA a způsobují její hnědé zbarvení (Trojánek, 2013).

Izolace DNA by měla splňovat tato hlavní kritéria:

1) Koncentrace DNA by měla být dostatečně čistá vzhledem k následné manipulaci. Např. pro analýzy zahrnující použití PCR nesmí být extrahovaná DNA kontaminovaná látkami, které narušují požadavky PCR.

- 2) DNA by mělo být dostatečně neporušené, aby migrační vzorce při následné gelové elektroforéze byly přesné a reprodukovatelné.
- 3) Koncentrace DNA musí být adekvátní vzhledem k jeho použití.
- 4) Tato procedura by měla být rychlá, jednoduchá a levná. Pokud je to možné, tak by se mělo zamezit užití nebezpečných chemikálií.

Základní postupy extrakce

Nejprve musí být rozrušeny buněčné stěny za účelem uvolnění buněčných složek. Mnoho technik k rozrušování buněk, ale často krátí DNA, a proto každá metoda musí být kompromisem mezi délkou DNA a koncentrací. Pro izolaci celého genotypového DNA postup zahrnuje dehydrataci rostlinných tkání a drcení na jemný prášek. Alternativou je, že se čerstvé rostlinné tkáně rychle zmrazí suchým ledem či kapalným dusíkem a dokud jsou stále zmražené, nadrtí se na jemný prášek pomocí drtící paličky a hmoždíře. K izolaci jaderné či mimochromosomální DNA musí být postupy jemnější a také se musí vyhnout předčasnému poškození vnitřních membrán. V tomto případě pobíhá homogenizace při 4°C a užitý buffer obvykle obsahuje osmotikum.

Dále musí být porušeny buněčné membrány tak, že DNA se uvolní do extrakčního bufferu. To je zakončeno použitím detergentu, např. dodecylsírany sodného (SDS) nebo cetrimoniumbromidu (CTAB). Detergent chrání DNA před endogenními nukleázami. Extrakční buffer často obsahuje EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) k chelaci hořečnatých iontů – nezbytní spoličinitelé ve většině nukleázách.

Vysoká molekulární hmotnost DNA v roztoku může být poničena vystavením turbulencím (např. vortexování). Molekulární hmotnost DNA se většinou pohybuje mezi 50 – 100 kb.

Počáteční DNA je často kontaminovaná velkým množstvím RNA, proteiny, polysacharidy, tříslovinami a pigmenty, které je v některých případech obtížné oddělit od DNA. Proteiny mohou být odstraněny denurací a precipitací za použití chloroformu nebo fenolu. Přidáním do roztoku předeřáté RNázy se odstraní většina RNA. Polysacharidy jdou často jen obtížně odstranit a mohou narušit např. spektrometrické metody.

K extrakci rostlinného DNA se používá CTAB metoda a Dellaportova metoda (Clark, 2013). Další používanou metodou je metoda vysrážení DNA na mikrokolonách. Při této metodě je používán Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK). Tato metoda využívá unikátní patentované technologie Invisorb®. Principem je interakce mezi negativně nabitými fosfátovými skupinami DNA a pozitivně nabitými skupinami na povrchu membrány

v kolonce, kde je vázáno DNA a uvolní se po přečištění vhodnými elučními buffrem. Uvolnění DNA nebo vazba na kolonce je závislá na koncentraci solí a pH použitých buffrů (Anonymus, 2016g). Konkrétní fáze této metody jsou popsány v metodice.

2. 5. 2. Polymerázová řetězová reakce - PCR

PCR je zkratka z anglického Polymerase Chain Reaction, je molekulárněbiologická metoda rychlého zmnožení specifických úseků DNA (Simons a Snustand, 2009). Technologie PCR je jednoduchý a spolehlivý diagnostický test na přítomnost či absenci určité nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) ve vzorku (Luo et al., 1992). PCR má tři po sobě jdoucí reakční fáze. Každá fáze probíhá za předem daných teplot a po různě dlouhou dobu. Aby byla denaturace úspěšná, je třeba roztok zahřát téměř na 100 °C, což vede k degradaci většiny proteinů včetně DNA - polymerázy. Tento problém byl vyřešen díky bakterii *Thermophilus aquaticus*, která žije ve vývěrech horkých minerálních pramenů. Z jejích buněk byla izolována termostabilní polymeráza, Taq polymeráza (Simons a Snustand, 2009). Tyto fáze se cyklicky opakují (20 - 40 cyklů). PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler.

2. 5. 3. Multiplex PCR

Multiplex PCR je rozšířená molekulární technika (Anonymus, 2016b), při které je 2 nebo více lokusů amplifikováno ve stejné reakci (Markoulatos et al., 2002). Tato metoda značně šetří čas a úsilí v laboratoři (Anonymus, 2016b). Při multiplex PCR vzniká více různých produktů, které se následně analyzují (Anonymus, 2016c). Prvně byla popsána v roce 1988 a od té doby úspěšně využita v mnoha oblastech DNA testování, včetně analýz delecí, mutací a polymorfismů či kvantitativních testů a reverzní transkripce PCR (Markoulatos et al., 2002). Markoulatos et al. (2002) také uvádí, že v několika studiích byly prezentovány rozsáhlé diskuze o faktorech (např. koncentrace primeru, cyklíci profil), které mohou mít vliv na výsledky multiplex analýz.

Typy multiplex PCR:

- Jedno-templátová PCR reakce

Tato technika používá jeden teplát, kterým může být genomová DNA, spolu s několika páry forward a reverse primerů k amplifikaci specifických oblastí v templátu.

- Multiple (vícenásobná) templátová PCR reakce

Reakce probíhá za použití více temlátů a několika sad primerů ve stejné reakční zkumavce. Přítomnost více primerů může vést ke vzájemné zkřížené hybridizaci (cross hybridization) a možnosti nesprávného nasedání ostatních temlátů (Anonymus, 2016b).

2. 5. 4. Genetické markery

Rosypal (2001) uvádí, že genetický marker je gen nebo jeho úsek na chromozomu, jehož umístění na chromozomu je známé a používá se jako orientační bod v mapování nových mutací.

Genetický marker je jakýkoli viditelný znak nebo jiným způsobem zjistitelný fenotypový znak, který se dědí dle Mendlova zákona (např. viditelné znaky u hrachu a *Drosophila*). Genetické markery mohou být použity ke studiu genetiky organismů, včetně stromů, na úrovni jednotlivých genů. Stromy bohužel nemají mnoho viditelných mendelovských znaků a to omezovalo po mnoho let genetický výzkum (White, 2007).

Genetické markery jsou používány ke studiu genetiky přírodních a domestikovaných populací stromů a sil, které způsobují změny v těchto populacích. Mezi nejdůležitější aplikace genetických markerů patří: popis křížení, úrovně inbreedingu a časové i prostorové vzory genetické variability v rámci porostů; popis geografických vzorů genetické variability; odvozování taxonomických a fylogenetických vztahů mezi druhy; hodnocení dopadů domestikace, včetně lesního hospodářství a šlechtění dřevin, na genetickou diverzitu; identifikace osiva či sazenic při šlechtění populací; konstrukce genetických map; šlechtění pomocí markerů.

Žádoucími znaky daného genetického markeru jsou – cenově dostupný vývoj a aplikace; nepodléhá vlivu životního prostředí; velmi silný a opakovatelný z různých typů tkání a v různých laboratořích; polymorfní; kodominance (Adams et al., 1992).

Morfologické markery

Morfologické markery jsou viditelné znaky, jako je barva či tvar. Expresí morfologického markeru může být ovlivněna prostředím (Teturová, 2011).

Mnoho z identifikovaných morfologických markerů jsou mutace. Mutace se vyskytují zřídka a často jsou škodlivé, proto morfologické markery mají omezené využití .

Biochemické markery

Biochemické markery (alozymové, isoenzymové a proteinové) jsou velmi používané při populačně genetických studiích (Hillis a Moritz, 1990). Různé formy téhož enzymu jsou alozymy, které mají stejnou funkci, ale liší se chemickými vlastnostmi. Na základě elektroforetické migrace molekul jsou alozymy separovány, rychlost separace je dána rozdílnou primární strukturou (Markert and Moller, 1959).

V roce 1970 byly pro stromy vyvinuty biochemické genetické markery – terpeny a alozymy (White, 2007). Biochemické markery jsou založeny na analýze metabolických produktů (enzymů), neboť druh produkovaného enzymu je v úzké korelaci s variabilitou struktury DNA. Jejich nevýhodou je nižší míra polymorfismu - detekovatelná variabilita. Toto je důsledkem toho, že ne všechny změny struktury DNA mají za následek změnu produkovaného enzymu (Klápště et al., 2012).

Nevýhoda biochemických markerů je, že existuje málo rozdílných markerových lokusů. Tento problém byl vyřešen v roce 1980, kdy byly vyvinuty molekulární markery. Molekulární markery mají širokou škálu využití ve šlechtění dřevin (White, 2007).

Molekulární markery

Objev molekulárních markerů významně přispěl v populační genetice při studiu genetické diverzity, reprodukčního systému a genomového mapování (Jarne a Lagoda, 1996). Výhoda molekulárních markerů je jejich velké množství v genomu, jsou nezávislé na vlivu prostředí, pro detekci není nutná jejich exprese a jsou spolehlivé (Semagn et al., 2006). Molekulární markery se používají pro odhad příbuznosti mezi jednotlivci a zjištění jejich původu (Garant, Kruuk, 2005). Od poloviny 90. let jsou molekulární markery (např. mikrosatelity) používány v genetických studiích lesních dřevin (Dzialuk et al., 2005).

Nejprve byly využívány metody založené na hybridizaci k detekci polymorfizmů mezi jedinci. K mapování a konstrukci genetických map rostlin byly jako první použity RFLP markery (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein et al., 1980). Metoda RFLP se zakládá na použití restričních enzymů. U každého jedince se při štěpení genomové DNA restričními endonukleázami vytvoří různý počet nestejně dlouhých restričních fragmentů. Díky tomu je možné rozlišit jedince stejného druhu (Klumpler, 2006).

Vývoj PCR přinesl velký pokrok v molekulární biologii. Začaly se používat markery na základě amplifikace DNA (Saiki et al., 1985). AFLP metoda (Amplified Fragment Length Polymorphism) kombinuje RFLP a PCR. Nejprve je DNA rozštěpeno restričními enzymy a následují dvě PCR amplifikace se selektivními markery. Touto metodou je možné

analyzovat velké množství lokusů najednou bez předchozí znalosti sekvence. AFLP metoda je spolehlivá a dobře reprodukovatelná (Schwarz et al., 1999).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) je metoda založená na náhodné amplifikaci polymorfni. (Williams et al., 1990). RAPD markery jsou generovány PCR na vzorku genomové DNA za použití náhodně konstruovaných oligonukleotidů jako primerů. Tato technika je poměrně snadno aplikovatelná na celou řadu rostlinných a živočišných taxonů a počet lokusů, které mohou být testovány je v podstatě neomezený (Lunch a Milligan, 1994).

SSRs (Simple Sequence Repeat), STRs (Short Tandem Repeats), SSLPs (Simple Sequence Length Polymorphisms (Robinson a Harris 1999), tzv. mikrosatelity, jsou jednoduché repetitivní sekvence (Tautz et al., 1984; Litt and Luty, 1989). Sekvence jsou nejčastěji tvořeny opakováním mono-, di-, tri- či tetranukleotidů (např. (A)_n; (AT)_n, (ATA)_n). Počet repetice definuje alelu (Weber a May, 1989). Mikrosatelity jsou krátké 2 - 6 nukleotidů dlouhé motivy, které se opakují tandemově v počtu 15 - 60 repetice. Oproti jiným oblastem v genomu mutují až 10 000x rychleji (Mitas et al., 1995). Jsou to vysoce informativní markery vhodné pro analýzu genomu (Schmidt et al., 2000). SSRs markery se ukázaly jako velmi užitečné při odhalování genetické rozmanitosti lesních dřevin (Liewlaksaneeyanawin et al., 2004). Jsou to kodominantní markery, které mohou být amplifikovány PCR z malého množství DNA (Echt a Marie Marquardt 1997).

Před výrobou primerů pro SSRs je třeba zkonstruovat genomovou knihovnu pro daný druh (Becker and Heun, 1995). Aranzana (2002) uvádí, že je navrženo 24 mikrosatelitů pro rod *Prunus*. Ve studii Vaughan, Russell (2004) zmiňují, že bylo vyvinuto 14 mikrosatelitů z genomové knihovny DNA třešně ptačí *Prunus avium* a v rámci jejich studie bylo identifikováno 7 polymorfni lokusů a 4 již dříve indentifikované byly odpojeny. Také byly optimalizovány dvě multiplex PCR, aby umožnila charakterizaci všech polymorfni SSRs lokusů.

Jiang (2013) popisuje cytologické markery. Strukturální znaky chromozomů, mohou být zobrazeny pomocí karyotypu a pruhování chromozomů. Každý pruh se liší barvou (tmavé a světlé pruhy), šířkou a polohou, to nám ukazuje rozdíl v rozložení euchromatinu a heterochromatinu. Metody pruhování se používají pro charakterizaci chromozomů, k detekci mutací chromozomů, k fyzickému mapování a k identifikaci vazebné skupiny. Přímé využití cytologických markerů je velmi omezené v genetickém mapování a pěstování rostlin.

2. 5. 5. Autoinkompatibilita

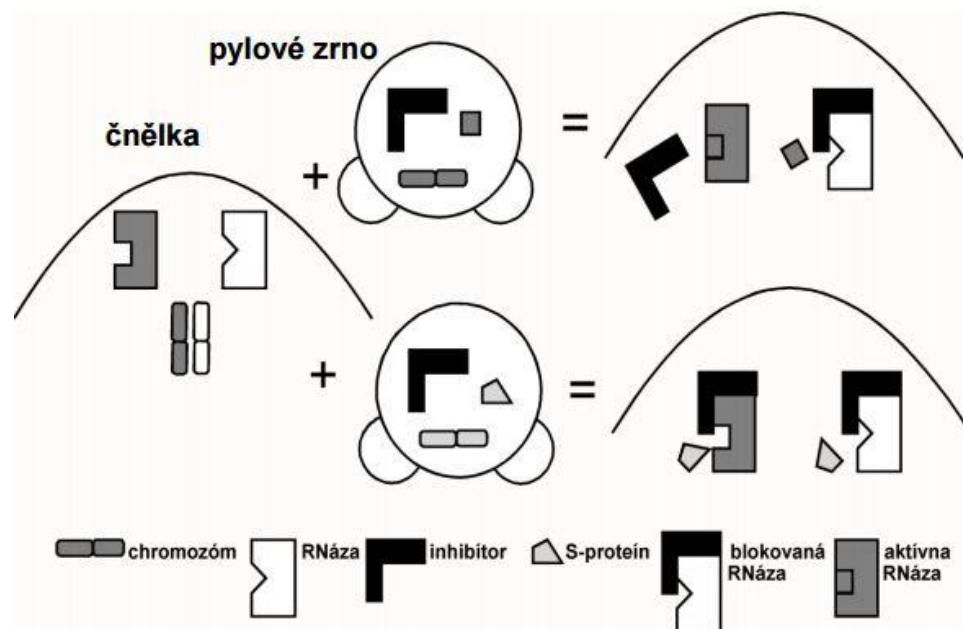
Autoinkompatibilita je mechanismus zabraňující samooplození (Vaughan et al., 2008). Gömöry et al. (2000) definuje autoinkompatibilitu jako životaschopnost inbredních (zejména samooplozených) embryí. Nejznámější forma inkompatibility je mezidruhové křížení (Gömöry et al., 2000). Rozlišuje se autoinkompatibilita gametofytická (např. u čeledi *Rosaceae*, rodu *Corylus*) a sporofytická (u čeledí *Betulaceae*, *Tiliaceae*, *Ulmaceae*) (Gömöry a Longauer, 2014). Cizosprašnost je zprostředkována gametofytickou autoinkompatibilitou, která je řízena alelickou sérií S – alel (Clarke a Newbegin 1993). Dva spojené geny (SRNáza a SFB) na S – lokusu kódují proteiny, jež řídí interakce mezi pylem a čnělkou (Cachi a Wunch, 2014; Clarke a Newbegin, 1993). SRNáza je glykoprotein nezbytný pro odmítnutí pylu. Pro plný projev autoinkompatibility jsou nutné další geny, které nesouvisí s S – lokusem. Během růstu pylové láčky, může pyl jen s různými S – haplotypy diploidní tkáně pestíků růst na vaječniku (Cachi a Wunch 2014). S – lokus produkuje tři proteiny. Ve čnělce mateřské rostliny je RNáza, v pylovém zrnu je inhibitor RNázy a S – protein. Jestliže haploidní pylové zrno nese stejnou alelu na S – lokusu jako diploidní alela mateřské rostliny, potom je kompatibilní S – protein s RNázou, váže se na ni a zabraňuje zablokování inhibitory. V rostoucím pylovém váčku zůstává RNáza aktivní a odbourává molekuly RNA, a tím brání expresi genů pylu a syntéze bílkovin, které jsou nutné pro růst a fungování pylového váčku. Tímto je zablokován růst pylového váčku a není možné oplodnění. Křížení jedinců, kteří nesdílejí žádnou alelu v S - lokusu je vždy úspěšné, křížení jedinců s jednou stejnou alelou je úspěšné v polovině případů a křížení jedinců sdílející obě stejné alely je vždy neúspěšné (Gömöry a Longauer, 2014).

Detekce S – alel probíhá za použití PCR metod. Pro S3, S4 a S9 byly navrženy nové primery, protože předešlé vykazovaly slabou amplifikaci (Sharma et al., 2015).

Autoinkompatibilita bude stále důležitější, neboť reprodukce a opylovací procesy mohou být ovlivněny současným oteplováním (Cachi a Wunch, 2014). V přírodních populacích třešně ptačí je distribuce a frekvence S – alel ekologicky významná a ovlivňuje rozptýlení genů, prostorovou genetickou strukturu a genetickou diverzitu (Schueler et al., 2006).

Cachi a Wunch (2014) šetřili dědičnost S – lokusu a mikrosatelitu EMPaS02 u potomků ze samosprašení. Výsledky ukázaly, že kompatibilita je stejná u vzorků odebraných ve dvou oblastech (ze 4) a nejspíše je způsobena stejnou mutací.

U třešně ptačí byla do značné míry stanovena inkompatibilita genotypů. Data o kompatibilitě jsou důležitá pro karpology, kteří na základě těchto dat, doporučují vhodné opylovatele šlechtitelům (De Cuyper et al., 2005).



Obrázek 2: Schéma fungování gametofytické autoinkompatibility. Stejně odstíny značí stejnou alelu S-locusu. Aktivní RNáza odbourává RNA pylového vaku a brání jeho prorůstání k vajíčku. Zdroj: Gömöry a Longauer, 2014.

2.6. Programy pro analýzu dat

2. 6. 1. GeneMarker®

GeneMarker® je genotypizační program, který je navržen tak, aby jeho užívání bylo snadné a intuitivní, ale byl přesný, rychlý a jeho aplikace byly výkonným výzkumným nástrojem.

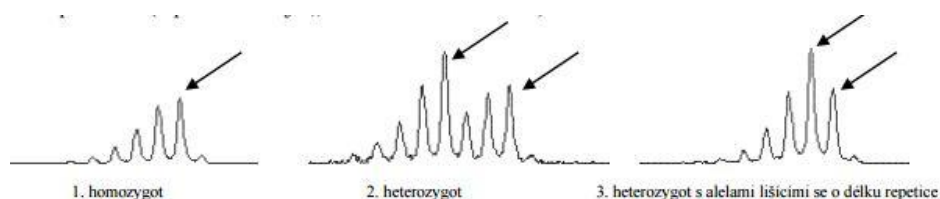
Analyzuje a vizualizuje data ze sekvenátoru. Při analýze dat můžeme nastavit nejrůznější parametry automatické analýzy. Můžeme si zkontrolovat, zda se u vzorků po analýze objevilo Completed či Failed, pokud se objeví Failed, vzorek se zřejmě nebude možné použít. Vzorky, které jsou označeny zeleně jsou kompletně analyzovány, žlutě označené jsou problémové a vzorky červené jsou neanalyzované. Pro vyhodnocení mikrosatelitových dat si zobrazíme vzorky v příslušných lokusech pod sebe a odečteme jednotlivé alely. Takto můžeme odečíst alelickou kompozici pro daný lokus u jednotlivých vzorků a přenést ji do excelové tabulky (Anonymus, 2016d).

Vyhodnocování mikrosatelitových pattern

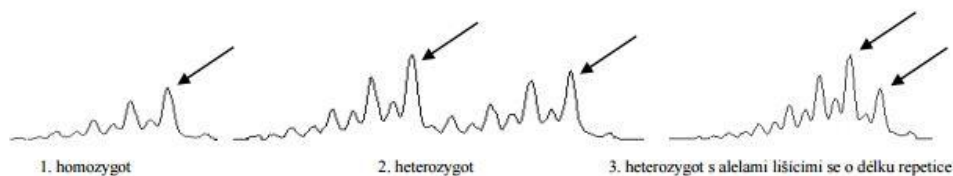
Diploidi mají v jednom lokusu max. 2 alely, při skorování jen jedné, se jedná o homozygota. Tetraploidi mají až 4 alely v jednom lokusu a jestliže skorujeme čtyři nebo jednu alelu, můžeme určit genotyp. Při skorování tří alel, je jedna přítomna dvakrát a nelze říci, která to je. Proto již nemůžeme určit genotyp.

U některých lokusů se vyskytují tzv. stutter bands, což jsou peaky, které jsou o dvou-, tří- atd. násobek repetice kratší než je skutečná délka alely.

U homozygotů skorujeme peak nejvíce vpravo – nejvyšší. U heterozygotů se skorují dva nejvyšší peaky, za nimiž následuje o hodně nižší peak (Fér, 2014).



Obrázek 3: Typická pattern. Šipky označují skutečnou délku alel. Zdroj: Fér, 2014



Obrázek 4: Pattern s „A“ produktem. Šipky označují skutečnou délku alel. Zdroj: Fér, 2014.

2. 6. 2. GenAlEx 6.5 (Genetic Analysis in Excel)

GenAlEx je platforma pro široké spektrum analýz populační genetiky v Microsoft Excelu. Data lze exportovat do více než 30 jiných formátů. Software je napsán v jazyce VBA a je kompatibilní s Excel 2003, 2007, 2010 na PC a Excel 2004 a 2011 na Macintosh. Použití grafických možností, dostupných v Excelu, usnadňuje interpretaci výsledků analýz. GenAlEx 6 byl původně vyvinut jako učební pomůcka pro bakalářské a magisterské obory.

GenAlEx poskytuje genetické analýzy populací diploidních kodominantních, haploidních, haplotypových a binárních genetických dat zvířat, rostlin a mikroorganismů. Genetické analýzy mohou být prováděny za pomoci SSRs, SNP, AFLP a DNA sekvencí. Analýzy alelových frekvencí zahrnují odhady heterozygotnosti a genetické rozmanitosti, F- statistiky, Neiovi genetické vzdálenosti, příbuznosti populace, analýzu molekulárního rozptylu (AMOVA), analýzu hlavních koordinát - Principal Coordinates Analysis (PCoA),

Mantel testy, TWOGETHER, vícerozměrné a 2D prostorové autokorelace. Více než 30 různých grafů v Excelu zobrazuje výsledky genetických analýz.

PCoA je představuje postup, který ukáže základní vzory beze změny samotných dat. Při tomto procesu jsou hlavní osy variace umístěny ve vícerozměrných datových sadách (Peakall a Smouse, 2012).

2. 6. 3. Cervus

Cervus je počítačový program, který se používá při rekonstrukci rodokmenů, přiřazuje rodiče k jejich potomkům s využitím genetických markerů a to i v případě, že některé genotypy jsou neúplné, nesprávné či chybí úplně. Při analýze se využívají kodominantní genetické markery, jako jsou SSRs a SNP. Předpokládá se, že markery se dědí nezávisle na sobě. Cervus provádí následující analýzy: frekvence alel, analýza rodičovství, analýza identity, simulace rodičovství – 4 různé analýzy mohou být simulovány (analýza mateřství, otcovství, analýza rodičovských párů – kde známe pohlaví rodičů a kde je pohlaví neznámé) (Anonymus, 2016e). Pro naše potřeby byl program Cervus použit k detekci alel, jejich frekvenci, očekávané a pozorované heterozygotnosti, avšak nebyl využit k rekonstrukci rodokmene.

3. Metodika

3. 1. Semenný sad – Čejkovka

Semenný sad Čejkovka vznikl na místě bývalé lesní školky LS LČR Lužná v roce 2002, nedaleko obce Lužná u Rakovníka. Vzhledem k tomu, že se jedná o území bývalé lesní školky, je možné, že půda byla kontaminována chemikáliemi. Rozloha sadu je 1,13 ha, v nadmořské výšce 390 m n.m. Sad leží u silnice III/2371. Průměrný roční srážkový úhrn se pohybuje kolem 525 mm, průměrná roční teplota vzduchu je 7,7°C. Dle Quitta patří oblast do mírně teplého regionu MT 11.

Od roku 2007 je semenný sad Čejkovka uznán jako kvalifikovaný zdroj reprodukčního materiálu do roku 2007. Číslo uznané jednotky je CZ - 3 - 3 - TR - 00170 - 8 - 2 - S; číslo uznané jednotky evropské CZ - 3 - 3 - pav - 170 - 8 - 2 - S.

Rouby byly odebrány z LS LČR Křivoklát (42 stromů) a LS LČR Nižbor (21 stromů) za dozoru Ing. Oldřicha Hrdličky. Výběrové stromy se nacházely v lokalitách Pustá Seč (porosty 402E, 407H4, 47G5), Kouřimec (429D4), Kolna (704B6, 709C2, 644C2), Bušohrad (626E2), Skryje (619E3, 328A13, 327D8), Alžběta (117F5), Buková (226C3, 226D4, 238A4, 226E5), Mrákavy (909C7, 906A9), Velká Dobrá (814A14, 814B11, 814C12, 812D9, 812D8) a Karlštejn (105C6). Celkem zde bylo schváleno 63 výběrových stromů - ortetů třešně ptačí. První rouby se sbíraly v únoru 1999. Roubování se provádělo ve Šlechtitelské stanici Truba. Jelikož odběr roubů byl proveden pozdě, došlo k velkému úhynu roubovanců. Proto tedy byl od 21 klonů proveden další odběr roubů v prosinci, který byl již úspěšný. Výsadba roubovanců proběhla v březnu 2002. S výsadbou sazenic se začalo od cesty směrem dolů, sazenice u cesty jsou kvalitnější.

Celkem bylo vysázeno 343 roubovanců od 61 klonů. Roubovanci se sázely ve sponu 6 x 6 m. Semenný sad Čejkovka je velmi dobře udržován, je oplocen, v době kvetení sečen a také jsou zde 4 včelstva. Byl zde proveden pokus o vysazení čmeláků, avšak byl neúspěšný. V roce 2015 proběhl první sběr, bylo sebráno 35 kg. V jeho blízkosti se nachází pouze 1 třešň ptačí, u které byla provedena genetická analýza.



Obrázek 5: Semenný sad Čejkovka - pohled od silnice. Zdroj: Anna Krejzková

3. 2. Fenologie kvetení

Pro stanovení fenologie kvetení jsem stanovila stupnici od 0 do 3. Dne 14.6. jsem zaznamenala plodnost jednotlivých ramet a vizuálně odhadla jejich výšku ramet. Fenologie kvetení byla vizuálně pozorována ve dnech 24.4., 27.4., 29.4., 1.5., 3.5. a 5.5.2015.

Stupnice:

0 – rameta nekvete, žádný květ není rozkvetlý

1- minimálně 1 plně rozkvetlý květ, zhruba do 20% rozkvetlý jedinec

2- rameta je do 50% rozkvetlá

3 – nad 50% rozkvetlá rameta

o – odkvět

p – na jedinci jsou minimálně 3 plody



Obrázek 6: Rameta hodnocena 0.
Zdroj: Anna Krejzková



Obrázek 7: Rameta hodnocena 1.
Zdroj: Anna Krejzková



Obrázek 8: Rameta hodnocena 2.
Zdroj: Anna Krejzková



Obrázek 9: Rameta hodnocena 3.
Zdroj: Anna Krejzková

3. 3. Sběr a uchovávání vzorků

Sběr listů probíhal v květnu a listy byly při sběru vloženy do uzavíratelných sáčků, které se řádně označily. Sáčky s listy byly uchovávány v mrazáku, dokud nedošlo k přípravě vzorků, tzn. odebráním potřebné části listu do eppendorf zkumavky. Listy a vzorky byly dlouhodobě skladovány za nízkých teplot (- 80 °C) v mrazáku.

3. 4. Izolace DNA

DNA bylo extrahováno z odebraných listů. Části listů (přiměřené množství) byly umístěny do eppendorf zkumavek (2 ml) a byly k nim přidány drtící kuličky. Pro každý klon byly připraveny 2 vzorky (1 jako záloha). Všechny zkumavky se vzorky byly náležitě označeny číslem klonu. Následně bylo nutné vzorky zmrazit pomocí kapalného dusíku N₂ a po dobu 5 minut byly drceny v oscilačním mlýnu.

Pro izolaci DNA byl použit Invisorb® Spin Plant Mini Kit. Invisorb® Spin Plant Mini Kit byl navržen k izolaci a purifikaci (přečištění) DNA mnoha druhů rostlin (čerstvý, mražený či sušený rostlinný materiál, např. listy, kořeny, plody, semena) a vzorků potravin rostlinného původu. Další postup byl prováděn dle manuálu. Podstatou je interakce mezi negativně nabitými fosfátovými skupinami DNA a pozitivně nabitými skupinami na povrchu membrány v kolonce, kde se váže DNA a po přečištění se uvolní elučním bufferem. Vazba či uvolnění DNA z kolonky je závislé na koncentraci solí a pH bufferů. Invisorb® Spin Plant Mini Kit se používá například pro PCR, RFLP analýzy, sekvenování, klonování.

Postup:

- **Homogenizace materiálu:** Jeden vzorek obsahoval cca 60 mg listu, za pomoci tekutého dusíku byly vzorky zmrazeny a v oscilačním mlýně nadrceny.
- **Lyze materiálu:** Do nadrceného vzorku byl přidán Lysis Buffer P (400μl), zvortexován a na 20 min dán do termomixéru. Během inkubace jsme si připravili kolonky (Prefiltr) do 2,0 ml sběrných zkumavek (Receiver Tube).
- **Filtrace:** Lyzační směs se přenese na kolonky a centrifugujeme po dobu 4 min při otáčkách 11 000 rpm. Centrifugace se opakovala u vzorků, kde na kolonce zůstávala kapalina. Kolonky ze zkumavek se odstranily a do filtrátu se přidala RNáza A (ribonukleáza) (4,5 μl), z důvodu odstranění RNA. Vzorky se zvortexovaly a přidal se Lysis Buffer A (200 μl) a opět proběhlo vortexování.

- Navázání DNA: Umístili jsme nové kolonky (Spin Filter) do sběrných zkumavek a směs jsme do nich přemístili. Vzorky byly opět centrifugovány (2 min, 11 000 rpm).
- Promytí I: Filtrát byl odstraněn a kolonka vrácena do sběrné zkumavky. Přidali jsme Wash Buffer I (550 µl) a za stejných podmínek jako předtím proběhla centrifugace, po které se opět filtrát odstranil.
- Promytí II: Stejný postup se opakoval po přidání Wash Bufferu II (550 µl), který byl přidáván dvakrát. Tento proces zajistil zachycení DNA na kolonce (Spin Filtr). Abychom odstranili zbytky ethanolu z Wash Bufferů centrifugovali jsme 2 min při 11 000 rpm.
- Eluce: Kolonky se poté umístily do eppendorf zkumavek (1,5 ml) a přidali jsme 100 µl vody, ohřáté na 66°C. Vzorky jsme inkubovali po dobu 15 min a nakonec proběhla centrifugace (1,5 min, 11 000 rpm).

3. 5. Analýza mikrosatelitových lokusů (testování a výběr primerů, charakterizace multiplexů, podmínky PCR reakcí)

Pro třešň patčí bylo vybráno 26 potenciálně vhodných mikrosatelitových markerů, dle vědecké literatury. Několik druhů vybraných a testovaných primerů bylo vyvinuto pro jiný druh rodu *Prunus*, ale úspěšně amplifikují repetitivní úseky i u třešně ptačí, jedná se o tzv. cross-amplification, tedy mezidruhovou amplifikaci. Z ekonomických důvodů byla testovací skupina 26 primerů objednána jako neznačená. Elektroforetickou separací předpokládaných PCR produktů na agarózových gelech byla ověřena amplifikace předvybraných primerů.

V souladu s autory článků, v nichž byly publikovány primerové sekvence, byly zvoleny podmínky PCR reakcí pro příslušný typ primeru. Podle tohoto posouzení bylo vybráno 24 primerů, které vykazovaly dostatečnou amplifikaci. V sérii 10 testovacích vzorků se tyto primery nejevily jako monomorfní (tj. nevykazovaly jednotný genotyp). Následně byly objednány jako fluorescenčně značené (barvy: modrá FAM, zelená VIC, žlutá NED, červená PET), aby mohly být amplifikace jednotlivých primerů sdružovány do tzv. multiplexových reakcí.

Pro sestavení kompatibilního souboru primerů v příslušné multiplexové reakci je důležitým parametrem porovnání délky amplifikovaných fragmentů a návrh jejich

fluorescenčního obarvení tak, aby nedocházelo k překryvu stejnobarevných fragmentů různých primerů při fragmentační analýze na sekvenátoru.

Fluorescenčně značené primery byly rozděleny do 4 multiplexových reakcí, a to následovně:

- Multiplex A obsahoval 8 primerů (EMPaS02_{VIC}, EMPaS10_{6-FAM}, EMPaS11_{VIC}, UCD-CH18_{VIC}, UCD-CH11_{PET}, UCD-CH31_{NED}, PS12A02_{NED}, UDP98-412_{6-FAM}).
- Multiplex B, sestával ze 7 primerů (UCD-CH17_{VIC}, UCD-CH21_{6-FAM}, EMPaS05_{6-FAM}, EMPaS06_{NED}, EMPaS12_{VIC}, BPPCT 034_{PET}, UDP98-21_{NED}).
- Třetí multiplex C zahrnoval 5 mikrosatelitových primerů (BPPCT 040_{VIC}, UDP97-403_{6-FAM}, PceGA34_{NED}, UDP98-411_{PET}, UCD-CH12_{PET}).
- Čtvrtý multiplex obsahoval 4 primery (UCD_CH15_{VIC}, EMPaS14_{VIC}, UCD_CH14_{VIC}, EMPaS01_{6-FAM}).

Tabulka 1: Multiplex A

multiplex A				
Primer	nukleotidová sekvence primeru	rozsah amplifikace (bp)	barva	citace
UCD_CH31	Forward p. TCCGCTTCTCTGTGAGTGTG	111 - 148	NED	Struss et al. 2003
	Reverse p. CGATAGTTTCCTTCCCAGACC			
PS12A02	Forward p. GCCACCAATGGTTCTTCC	150 - 178	NED	Downey and Iezzoni 2000
	Reverse p. AGCACCAGATGCACCTGA			
UDP98_412	Forward p. AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC	129	FAM6	Testolin et al. 2000
	Reverse p. GCTGAAGACGACGATGATGA			
EMPaS10	Forward p. GCTAATATCAAATCCCAGCTCTC	151 - 183	FAM6	Vaughan and Russel 2004
	Reverse p. TGAAGAAGTATGGCTTCTGTGG			
EMPaS11	Forward p. ACCACTTTGAGGAACTTGGG	73 - 106	VIC	Vaughan and Russel 2004
	Reverse p. CTGCCTGGAAGAGCAATAAC			
EMPaS02	Forward p. CTACTTCCATGATTGCCTCAC	133 - 145	VIC	Vaughan and Russel 2004
	Reverse p. AACATCCAGAACATCAACACAC			
UCD_CH18	Forward p. GATGGAAGGCCAAGGCAAC	179 - 189	VIC	Struss et al. 2003
	Reverse p. AATGTTCCCGGTTATATGC			
UCD_CH11	Forward p. TGCTATTAGCTTAATGCCTCCC	144 - 167	PET	Struss et al. 2003
	Reverse p. ATGCTGATGTCATAAGGTGTGC			

Tabulka 2: Multiplex B

multiplex B				
Primer	nukleotidová sekvence primeru	rozsah amplifikace (bp)	barva	citace
UDP98_021	Forward p. AAGCAGCAATTGGCAGAATC	145	NED	Testolin et al. 2000
	Reverse p. GAATATGAGACGGTCCAGAAGC			
EMPaS06	Forward p. AAGCGGAAAGCACAGGTAG	200 - 2018	NED	Vaughan and Russel 2004
	Reverse p. TTGCTAGCATAGAAAAGATTGTAG			
UCD_CH21	Forward p. TTGTTGACCATCGAATATGAAG	106 - 118	FAM6	Struss et al. 2003
	Reverse p. GAAGGTACATGGCGTGCC			
EMPaS05	Forward p. CATGTGCTTTCTCTGCCC	161 - 171	FAM6	Vaughan and Russel 2004
	Reverse p. TCTTCTCAAGCAATCCCC			
EMPaS12	Forward p. TGTGCTAATGCCAAAAATACC	122 - 148	VIC	Vaughan and Russel 2004
	Reverse p. ACATGCATTTCAACCCACTC			
UCD_CH17	Forward p. TGGACTTCACTCATTTCAGAGA	186 - 208	VIC	Struss et al. 2003
	Reverse p. ACTGCAGAGAATTTCCACAACCA			
BPPCT_034	Forward p. CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT	228	PET	Dirlewanger et al. 2002
	Reverse p. CAATGGAGAATGGGGTGC			

Tabulka 3: Multiplex C

multiplex C				
primer	nukleotidová sekvence primeru	rozsah amplifikace (bp)	barva	citace
BPPCT_040	Forward p. ATGAGGACGTGTCTGAATGG	135	VIC	Dirlewanger et al. 2002
	Reverse p. AGCCAAACCCCTCTTATACG			
UDP97_403	Forward p. CTGGCTTACAACCTCGCAAGC	150	FAM6	Testolin et al. 2000
	Reverse p. CGTCGACCAACTGAGACTCA			
PceGA34	Forward p. GAACATGTGGTGTGCTGGTT	140 - 174	NED	Downey and Iezzoni 2000
	Reverse p. TCCACTAGGAGGTGCAAATG			
UDP98_411	Forward p. AAGCCATCCACTCAGCACTC	150	PET	Testolin et al. 2000
	Reverse p. CAAAAACCAAACCAAAGG			
UCD_CH12	Forward p. AGACAAAGGGATTCTGGGC	178 - 200	PET	Struss et al. 2003
	Reverse p. TTCTGCCACAAACCTAATGG			

Tabulka 4: Multiplex D

multiplex D				
Primer	nukleotidová sekvence primeru	rozsah amplifikace (bp)	barva	citace
UCD_CH15	Forward p. TCACTTTCGTCCATTTTCCC	93 - 97	VIC	Struss et al. 2003
	Reverse p. TCATTTTGGTCTTTGAGCTCG			
EMPaS14	Forward p. TCCGCCATATCACAATCAAC	196 - 210	VIC	Vaughan and Russel 2004
	Reverse p. TTCCACACAAAAACCAATCC			
UCD_CH14	Forward p. GTACACGGACCCAATCCTG	144 - 150	VIC	Struss et al. 2003
	Reverse p. TCTAACATCATGTAAACATCG			
EMPaS01	Forward p. CAAAATCAACAAAATCTAAACC	222 - 238	FAM6	Vaughan and Russel 2004
	Reverse p. CAAGAATCTTCTAGCTCAAACC			

Jako templátová DNA byla použita DNA izolovaná ze zájmových vzorků. Izolovaná DNA byla naředěna na standardizovanou koncentraci 10 ng/ul. Za příslušných podmínek byly prováděny PCR reakce v termocykleru Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems). Z důvodu zefektivnění práce nebyly neproměnlivé složky PCR směsi (tj. Taq polymeráza, dNTPs, hořečnaté ionty) pipetovány odděleně, ale byl využit předpřipravený roztok reakčních produktů Qiagen Multiplex PCR kit. Jednotlivě byly přidávány pouze primery a templátová DNA. Celkový objem reakční směsi činil 15 ml a obsahoval 10 ng genomové DNA a 200 nM každého značeného primeru.

Polymerázová řetězová reakce byla prováděna 35 cyklů s počáteční 15 minutovou inkubací při teplotě 95°C, aby došlo k aktivaci hotstar Taq DNA polymerázy. Hotstar Taq DNA polymeráza zajišťuje správné nasedání primerů, aby nedocházelo k vzniku nespecifických PCR produktů. Tento enzym je za nízkých teplot zcela neaktivní a aktivuje až v tepelném kroku PCR (Anonymus, 2016c; Anonymus, 2016f)

Denaturace při každém cyklu probíhala po dobu 30s při teplotě 95°C, fáze annealingu trvala 45s a teplotně se u jednotlivých multiplexů odlišovala. Pro multiplex A byly reakční podmínky od 67°C postupně klesající na 58°C a u multiplexů B a C začínala fáze annealingu na teplotě 64°C a postupně byla snížena na 55°C. Pokles teploty mezi jednotlivými cykly annealingu činil 1°C.

Následně byl vždy 1 ml vzniklého PCR produktu smíchán se 13 ml roztoku formamidu obsahujícím DNA velikostní standard GeneScan 500 LIZ (značeno fluorescenční oranžovou barvou LIZ). Směs byla denaturována při teplotě 95°C po dobu 5 minut a rychle zchlazena na ledu. Fragmenty byly separovány s využitím 8 kapilárního sekvenátoru Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems) a vyhodnocena v softwaru in GeneMarker®.

3. 6. Efektivní počet klonů v semenném sadu

Při výpočtu efektivního počtu klonů v populaci bylo nutné zjistit směrodatnou odchylku (s). Dále byl zjištěn aritmetický průměr (\bar{x}) počtu ramet a variační koeficient (k).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}} \quad \bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad k = \frac{s}{\bar{x}}$$

Pro výpočet efektivního počtu klonů v semenném sadu byl použit výpočet dle Kang et al. (2001).

$$N_e = \frac{N}{\left(\frac{C.V.\%}{100}\right)^2 + 1}$$

Kde N je celkový počet klonů v sadu a C. V.% představuje variační koeficient všech klonů v sadu. Tento vzorec pro výpočet efektivního počtu byl použit s údaji z evidence, na základě SSRs a S – lokusu.

4. Výsledky

V semenném sadu je evidováno 59 klonů. Na základě posouzení 24 mikrosatelitových markerů u těchto klonů bylo zjištěno, že je zde zastoupeno jen 46 odlišných genotypů (tab. 7 - 10). To nám poukazuje na to, že některé výběrové stromy jsou geneticky identické (tab. 5). Nejpočetněji zastoupené klony pochází právě z výběrových stromů se stejným genotypem.

Analýzou S – lokusů bylo zjištěno, že klonů s rozdílným S – lokusem je v sadu pouze 29. Celkem bylo detekováno v sadu 15 alel S – lokusu. Jedinci se stejným genotypem S – lokusu jsou vzájemně inkompatibilní. Jedinci mající stejnou jednu alelu na S – lokusu, mají 50% úspěšnost opylení.

4. 1. Genetická struktura sadu Čejkovka

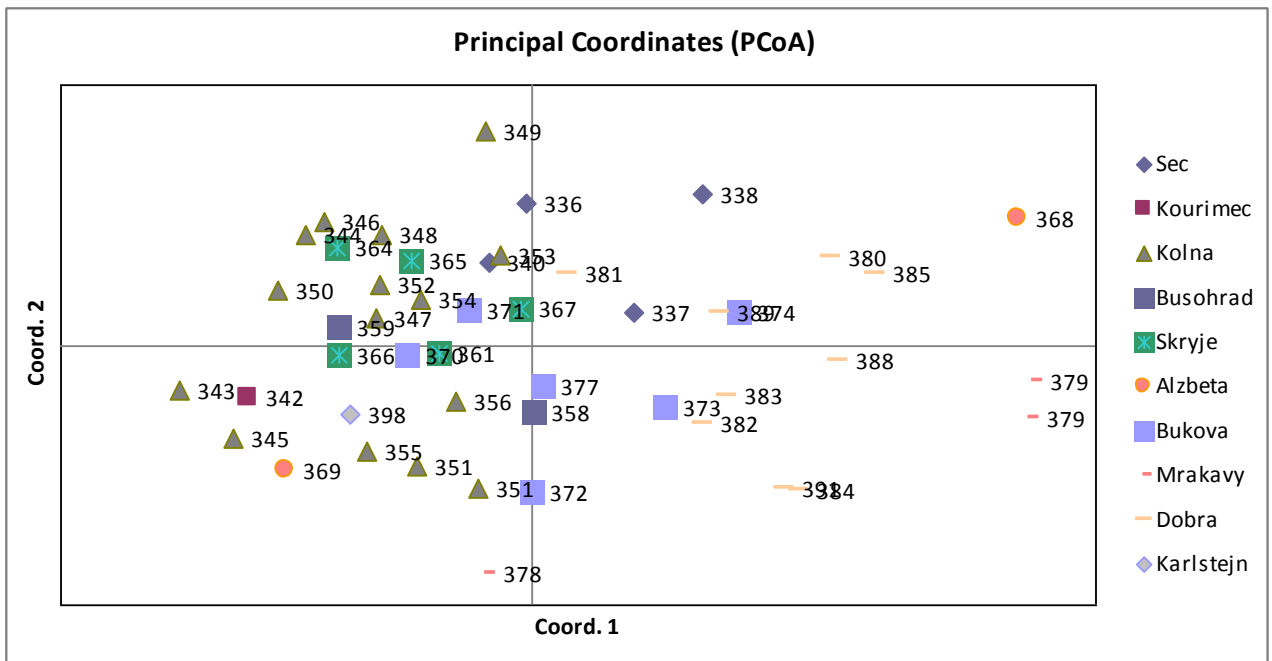
4. 1. 1. Výběrové stromy

V tabulce č. 5 jsou klony rozděleny dle původu výběrových stromů. U některých výběrových stromů byla provedena genetická analýza, díky které se zjistilo, že klony č. 339 a 340; 341 a 342; 363 a 364; 375, 376 a 377; 386, 387 a 390; 392 – 398 mají stejný genotyp, tedy jsou geneticky identické. Jelikož klony se stejným genotypem pocházejí z výběrových stromů ze stejného porostu, předpokládá se, že je to zapříčiněné tzv. kořenovou výmladností. Tyto klony jsou v tabulce vyznačeny barevně.

Tabulka 5: Výběrové stromy

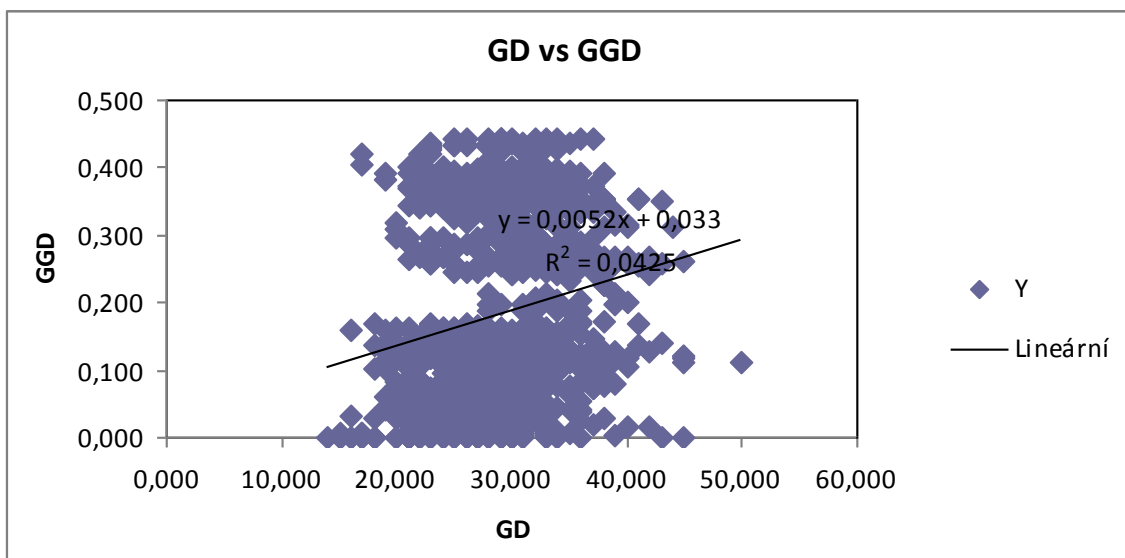
Lokalita	porost	klon	lokalita	porost	klon	lokalita	porost	klon
Pustá Seč	402E2	336	Bušohrad	626E2	358	Velká Dobrá	814A14	380
	407H4	337			359		814B11	381
		338	Skryje	619E3	361			382
	407G5	339		328A13	363			383
		340			364		814C12	384
Kouřimec	429D4	341			365		812D9	385
		342			366		812D12	386
Kolna	704B6	343			367			387
		344	Alžběta	117F5	368			388
		345			369			389
		346	Buková	226C3	370		390	
		347			371	812D8	391	
		348			372	Karlštejn	105C6	392
		349		226D4	373			393
	709C2	350		238A4	374			394
		351		226E5	375			395
		351		376			396	
		352		377			397	
		353	Mrákavy	909C7	378		398	
	644C2	354		906A9	379			
		355			379			
		356						

Přiložený graf č. 1, vygenerovaný programem GenAlEx, zobrazuje genetickou vzdálenost mezi výběrovými stromy. Z grafu je patrné, že výběrové stromy z lokality Kolna si jsou genotypově podobné se stromy z lokalit Skryje a Buková, také se genotypově blíží ke stromům z lokality Kouřimec. Výběrové stromy z lokality Dobrá mají nejbližší ke stromům z Bukové. Stromy z lokality Alžběta se geneticky podobají stromům z lokality Kolna. Lokalita Mrákavy je genotypově nejméně podobná ostatním lokalitám.



Graf 1: Genetická vzdálenost výběrových stromů

Prostorová korelace prostorového rozmístění výběrových stromů versus genetická data je nesignifikantní (graf č. 2). Avšak pro tuto analýzu bylo analyzováno poměrně málo jedinců. Zvláště když byl jejich počet snížen klonovou identitou. Lze předpokládat ovlivnění porostů lidskou činností.



Graf 2: Prostorová korelace

4. 1. 2. Genetická struktura

V semenném sadu Čejkovka byla provedena genetická analýza 24 lokusů. Tabulka č. 6, vygenerována programem Cervus, zobrazuje názvy testovaných pokusů, počet alel na daném lokusu (k) a celkový počet (N). Dále je zde očekávaná heterozygotnost (HExp) a pozorovaná heterozygotnost (HObs), polymorfní informační obsah (PIC - polymorphic information content) a nulová alela (F (Null)).

Údaje o heterozygotnosti a polymorfismu nás informují o variabilitě v dané populaci. Očekávaná heterozygotnost je stanovena za předpokladu náhodného páření. Nulová alela je alela, která se při PCR neamplifikuje a poté se jedinec jeví jako homozygot, přestože se jedná o heterozygota.

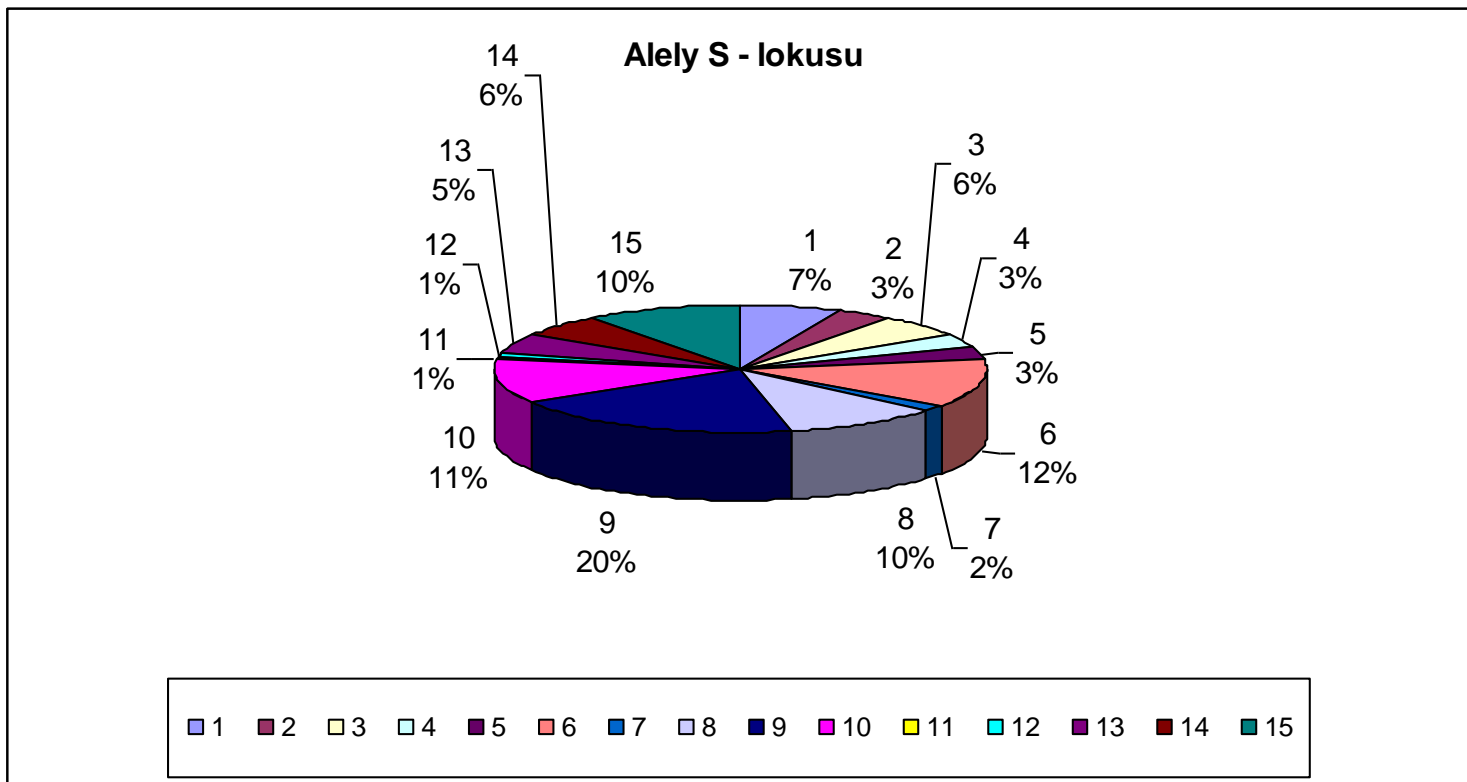
Z tabulky č. 6 vyplývá, že nejméně alel je na lokusu UCD_CH14 (2 alely), naopak nejvíce je na lokusu PceGA34 (15 alel). Můžeme tedy říci, že tento lokus je nejvíce polymorfní. Nejvyšší pozorovaná heterozygotnost byla zaznamenána na lokusech EMPaS12 a BPPCT_034 (0,816), nejnižší 0,147 na lokusu UCD_CH14. Nejvyšší rozdíl mezi očekávanou a pozorovanou heterozygotností je na lokusu EMPaS02. Marker UCD_CH14 nelze považovat za informativní, neboť dle Sharma et al. (2010) jsou markery klasifikovány jako informativní od hodnoty $PIC \leq 0,5$ a UCD_CH14 dosahuje hodnoty 0,359. Těsně pod touto hranicí se pohybují i markery UCD_CH18 (0,430), UCD_CH15 (0,489) a EMPaS14 (0,483). Jako nejvíce polymorfní se ukázal lokus BPPCT_034 a za nejméně polymorfní lokus můžeme označit UCD_CH14.

Tabulka 6: Analýza frekvence alel

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	F(Null)
UCD_CH31	7	49	0.592	0.660	0.602	+0.0600
PS12A02	10	49	0.776	0.795	0.762	+0.0164
UDP98_412	6	49	0.714	0.765	0.718	+0.0284
EMPaS10	7	49	0.653	0.712	0.656	+0.0392
EMPaS11	4	49	0.592	0.643	0.586	+0.0309
EMPaS02	7	49	0.612	0.712	0.676	+0.0680
UCD_CH18	4	49	0.429	0.465	0.430	+0.0439
UCD_CH11	8	49	0.633	0.618	0.584	-0.0152
UDP98_021	4	49	0.735	0.668	0.609	-0.0480
EMPaS06	6	49	0.694	0.712	0.665	+0.0158
UCD_CH21	6	49	0.633	0.647	0.610	-0.0011
EMPaS05	4	49	0.714	0.733	0.676	+0.0079
EMPaS12	6	49	0.816	0.706	0.663	-0.0872
UCD_CH17	9	49	0.612	0.580	0.543	-0.0359
BPPCT_034	8	49	0.776	0.833	0.802	+0.0314
BPPCT_040	8	49	0.816	0.760	0.713	-0.0426
UDP97_403	9	49	0.714	0.800	0.766	+0.0467
PceGA34	15	48	0.771	0.808	0.784	+0.0184
UDP98_411	5	49	0.776	0.705	0.641	-0.0583
UCD_CH12	9	48	0.771	0.758	0.721	-0.0097
UCD_CH15	3	48	0.458	0.587	0.489	+0.1199
EMPaS14	3	48	0.583	0.555	0.483	-0.0436
UCD_CH14	2	48	0.417	0.474	0.359	+0.0588
EMPaS01	6	45	0.533	0.682	0.618	+0.1174

V přílohách č. 5 – 8 jsou uvedeny pozorované variace alel pro jednotlivé lokusy v příslušném multiplexu PCR jednotlivých klonů. Každá alela je charakterizována délkou amplifikovaného fragmentu PCR. Hodnoty jsou vyhodnoceny v programu GeneMarker. Klony se stejným genotypem (č. 339 a 340; 341 a 342; 363 a 364; 375 – 377; 386, 387 a 390; 392 – 398) se v délkách amplifikovaných fragmentů liší velmi málo. Rozdíly mohou být způsobeny tzv. stutter bands, tedy sklouznutím DNA polymerázy při replikaci. Hodnoty označené červěně, značí homozygotnost daného lokusu.

Bylo zjištěno, že 29 klonů má schodné S – alely. To znamená, že u těchto jedinců dochází ke gametofytické inkompatibilitě. Celkem je v sadu zastoupeno 15 alel na S - lokusu.



Graf 3: Procentické zastoupení alel S - lokusu v semenném sadu Čejkovka

Tabulka 7: S alely klonů (alely jsou označeny číslem)

počet ramet	klon	alela	alela
4	391	3	7
5	336	5	6
3	380	6	7
7	374	1	8
2	384	1	8
1	338	1	9
2	375	1	15
1	376	1	15
2	377	1	15
2	343	1	3
1	371	1	3
8	345	8	9
2	351	8	9
13	353	8	9
9	367	8	9
2	369	8	9
1	347	8	13
1	381	8	13
2	348	9	10
2	356	9	10
10	358	9	10
5	392	9	14
14	393	9	14
12	394	9	14
12	395	9	14
10	396	9	14
12	397	9	14
8	398	9	14

počet ramet	klon	alela	alela
2	346	9	15
2	349	9	15
4	363	9	15
1	364	9	15
6	359	10	12
1	382	10	13
2	350	10	15
3	370	10	15
10	344	13	15
17	373	13	15
2	337	2	9
4	352	2	9
3	341	2	6
3	342	2	6
4	361	3	9
6	388	3	10
17	389	3	10
1	368	3	4
15	372	4	11
2	379	4	6
1	385	4	6
18	339	5	8
3	340	5	8
3	355	5	13
5	366	6	15
4	354	6	8
2	383	6	9
4	365	6	10
2	378	6	10
1	386	6	10
1	387	6	10
2	390	6	10

V blízkosti sadu byla nalezena třešeň (cca 20 m od plotu sadu), u které byl sebrán vzorek a provedena genetická analýza. Analýzou bylo potvrzeno, že tato třešeň se liší genotypem vzhledem k třešním v sadu. Tento údaj je v budoucnosti možné využít pro potřeby rekonstrukce rodokmenu. Lze díky němu odhalit pylovou kontaminaci v sadu.

4. 1. 3. Efektivní počet klonů v semenném sadu

Do vzorců uvedených v kapitole 3. 6. Efektivní počet klonů byly dosazeny hodnoty dle evidence, mikrosatelitových markerů a S – lokusů. V semenném sadu Čejkovka je zaevidováno 59 klonů. Výpočtem dle Kang et al. (2001) se vypočetl efektivní počet klonů v sadu – 32. Na základě SSRs markerů bylo do vzorce dosazeno 46 klonů, neboť 46 klonů je geneticky odlišných (viz příloha 5 – 8) a efektivní počet klonů vyšel 12. Pro S-lokusy bylo dosazeno 29 klonů (viz tab. 11) a efektivní velikost byla stanovena na 10 klonů.

Tabulka 8: Efektivní počet dle evidence

sm.odchylka	4,6793
průměr	5,0667
var.koeficient	0,9235
ef.počet	31,8415

Tabulka 9: Efektivní počet dle SSRs

sm.odchylka	10,9911
průměr	6,6087
var.koeficient	1,6631
ef.počet	12,2146

Tabulka 10: Efektivní počet dle S – lokusů

sm.odchylka	14,395
průměr	10,5172
var.koeficient	1,3687
ef.počet	10,0928

Efektivní počet klonů v semenném sadu – plody 2015

Efektivní počet pro plodící klony v roce 2015 byl počítán pro všechny klony, u kterých plodila minimálně polovina jejich ramet. Byly zde započítány klony, které jsou v sadu zastoupeny alespoň jednou rametou, pokud plodila. Na základě evidence bylo do vzorce dosazeno 37 klonů, které plodily a výsledkem je efektivní počet 20 klonů. Dle SSRs markerů v semenném sadu Čejkovka plodilo v daném roce 31 klonů a výsledným efektivním počtem klonů je 8. Efektivní počet klonů vzhledem k S – lokusům je 5, neboť pouze 14 klonů odlišných genotypů S – lokusu plodilo v roce 2015, viz příloha 9.

Tabulka 11: Efektivní počet dle evidence

sm.odchylka	4,6793
průměr	5,0667
var.koeficient	0,9235
ef.počet	19,9684

Tabulka 12: Efektivní počet dle SSRs

sm.odchylka	10,9911
průměr	6,6087
var.koeficient	1,6631
ef.počet	8,2316

Tabulka 13: Efektivní počet dle S - lokusů

sm.odchylka	14,3950
průměr	10,5172
var.koeficient	1,3687
ef.počet	4,8724

4. 2. Fenologie

Z 304 ramet bylo 13 ohodnoceno 0, což znamená, že neměly žádný květ rozkvetlý. Jednalo se o ramety klonů č. 361, 392, 393, 395, 396, 397, 398. Genetická analýza ukázala, že klony č. 392 až 398 jsou geneticky identické.

Tabulka 14: Nekvetoucí ramety

lokalizace ramety	klon	24.4.2015	27.4.2015	29.4.2015	1.5.2015	3.5.2015	5.5.2015	plody
N	9	361	0	0	0	0	0	-
D	12	392	0	0	0	0	0	-
I	8	392	0	0	0	0	0	-
D	15	393	0	0	0	0	0	-
E	10	393	0	0	0	0	0	-
N	13	393	0	0	0	0	0	-
O	11	393	0	0	0	0	0	-
K	7	395	0	0	0	0	0	-
K	15	395	0	0	0	0	0	-
O	15	396	0	0	0	0	0	-
P	12	396	0	0	0	0	0	-
P	21	397	0	0	0	0	0	-
I	6	398	0	0	0	0	0	-

4. 3. Plody

14. července 2015 bylo posouzeno, zda ramety plodí či nikoli. V následující tabulce č. 15 můžeme vidět, že nebyly zaznamenány žádné plody u klonů č. 341, 342, 352, 354, 365, 367, 382, 385, 386, 391, 392, 394 a 396 (neplodila žádná jejich rameta). Klony 341, 342 a 352 mají stejný genotyp.

Tabulka 15: Neplodící klony

klon	počet ramet	plodící ramety
341	3	0
342	3	0
352	4	0
354	4	0
365	4	0
367	9	0
382	1	0
385	1	0
386	1	0
391	4	0
392	5	0
394	12	0
396	10	0

Klony č. 392 až 398, které jsou geneticky identické, jsou v sadu zastoupeny 73 rametami (cca 24 %), avšak plodilo pouze 5 ramet.

Tabulka 16: Plodnost klonů č. 392 - 398

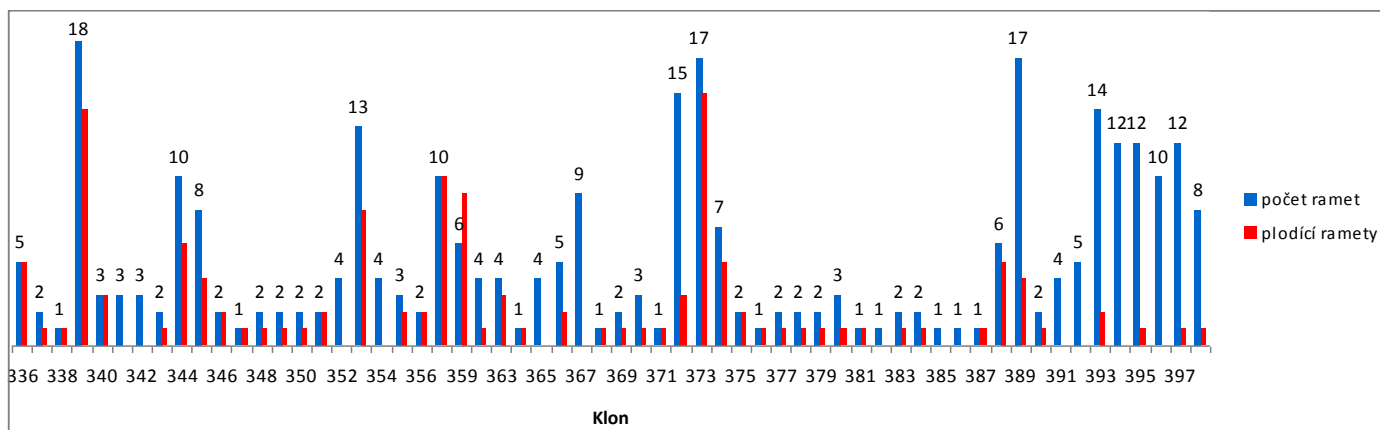
klon	počet ramet	plodící ramety
392	5	0
393	14	2
394	12	0
395	12	1
396	10	0
397	12	1
398	8	1
		5

Tabulka č. 17 ukazuje klony, jejichž ramety plodily všechny. Nejvyšší zastoupení ramet má klon č. 336 (5 ramet). Ostatní klony mají pouze 1 či 2 ramety, klon č. 340 má 3 ramety.

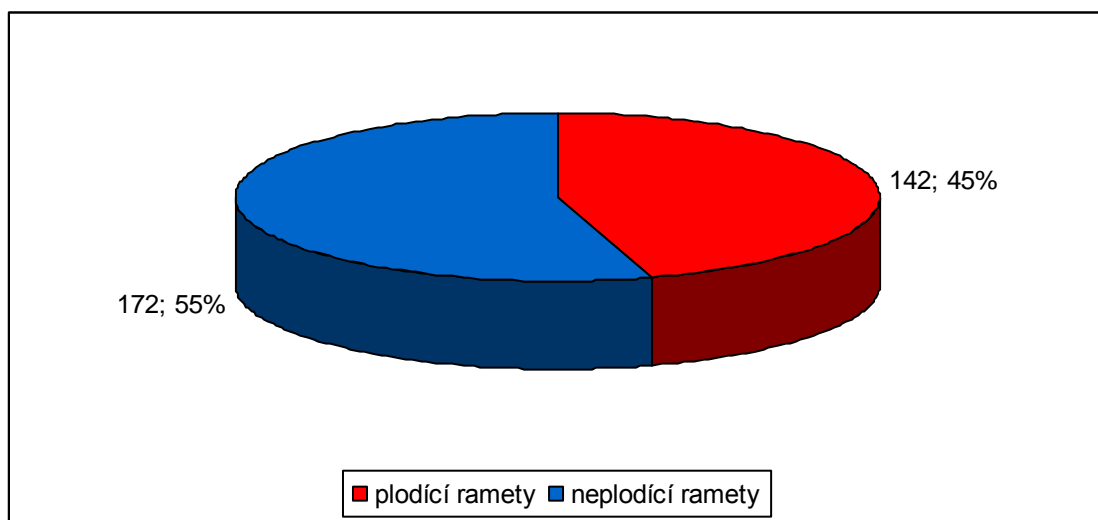
Tabulka 17: Plodnost klonů

klon	počet ramet	plodící ramety
336	5	5
338	1	1
340	3	3
346	2	2
347	1	1
351	2	2
356	2	2
364	1	1
368	1	1
371	1	1
375	2	2
376	1	1
381	1	1
387	1	1

Následující dva grafy č. 4 a č. 5 zobrazují počet ramet, které plodily či nikoli.



Graf 4: Plodnost ramet



Graf 5: Plodnost ramet

5. Diskuze

Kozlíková (2008) uvádí, že v roce 2007 nekvetla žádná rameta od klonů č. 357, 365, 382, 384, 386, 395, 398 a převážná většina ramet klonů č. 347, 350, 351, 369, 370, 377, 380, 383, 389, 393, 394, 396, a 397 byla zařazena do stejné kategorie. V roce 2015 nekvetly 4 ramety klonu č. 393, 2 ramety klonu č. 395, 2 ramety klonu č. 396 a 1 rameta klonu č. 397, dále nekvetla 1 rameta klonu č. 361, 2 ramety klonu č. 392 a 1 rameta klonu č. 398, viz tab. 14. V roce 2015 byla fenologie pozorována 6 dní (24.4., 27.4., 29.4., 1.5., 3.5., 5.5.) (viz příloha 4), v roce 2007 pouze 1 den, 19.4. Fenologie kvetení z roku 2007 může být tedy zavádějící, neboť některé ramety začínaly kvést déle, např. 29.4.2015 začala kvést 1 rameta klonu č. 339, 377, 397 a 398. Tyto 4 jedinci byli ohodnoceni 1, tedy jedinec kvetl do 20 %.

V roce 2007 bylo pozorováno silné kvetení u všech ramet klonů č. 338, 340 a 349. Tyto klony v roce 2015 byly hodnoceny minimálně ve dvou dnech 3 (tj. rameta je rozkvetlá z více než 50 %), můžeme tedy říci, že opět kvetly silně. Ovšem všechny tyto klony jsou v sadu zastoupeny velmi malým počtem ramet. Klon č. 338 je zastoupen v sadu pouze 1 rametou, klon č. 340 třemi rametami a klon č. 349 je zastoupen 2 rametami.

U klonů č. 392, 393, 395, 396, 397, 398 byl prokázán stejný genotyp. Ramety těchto klonů ve všech pozorovaných dnech kvetly podprůměrně (0, 1 výjimečně 2), pouze u 2 ramet (evidenčně vedených u klonů č. 393 a 394) bylo kvetení hodnoceno 3 (alespoň 1 den). Tyto klony pocházejí ze stejného porostu, Karlštejn 105C6. V sadu jsou zastoupeny zhruba z 24 % (tj. 73 ramet), ale z toho množství plodilo pouze 5 ramet (tab. 16).

Kromě klonů č. 392 – 398, jsou též geneticky identické klony č. 339 a 340 (celkem 21 ramet), 341 a 342 (celkem 6 ramet), 363 a 364 (celkem 5 ramet), 375 – 377 (celkem 5 ramet) a 386, 387, 390 (celkem 4 ramety) (příloha 5 – 8). Výběrové stromy klonů č. 339 a 340 pocházejí z porostu 407G5, Pustá Seč; klonů č. 341 a 342 z porostu 429D4, Kouřimec; klonů č. 363 a 364 z porostu 328A13, Skryje; klonů č. 375 – 377 z porostu 226E5, Buková a výběrové stromy klonů č. 386, 367 a 390 pocházejí z porostu 812D12, Velká Dobrá (tab. 5). Celkem se jedná o 114 jedinců (cca 38 %), jejichž identita se liší od evidence. Tím je snížena genetická variabilita sadu. To, že jsou klony geneticky identické můžeme vysvětlit kořenovou výmladností třešně. Přestože jsou výběrové stromy těchto klonů od sebe vzdáleny i desítky metrů. Adams (1992) ve studiích přirozených lesů zmiňuje, že vzdálenost mezi rodiči je důležitý faktor, který ovlivňuje pravděpodobnost křížení jedinců mezi sebou. Vaughan et al. (2007) uvádí, že nepohlavně se rozmnožovalo 48 % a 65 % jedinců z pozorovaných oblastí, kdy jedna oblast byla obhospodařována, druhá oblast byla po několik desítek let

neobhospodařována. Nicméně také zjistili, že obě oblasti udržují relativně vysokou hladinu genetické diverzity bez ohledu na hospodaření.

Vliv na nízkou plodnost sadu má dle mého názoru také velký podíl málo plodících ramet klonů č. 392 – 398 a jejich rozmístění v sadu. Velmi významným faktorem je shodnost alel na S – lokusu. Gömöry a Longauer (2014) tvrdí, že křížení jedinců se stejnými alelami na S - lokusu je vždy neúspěšné a křížení jedinců s jednou stejnou alelou je úspěšné z 50 %. Podle tohoto tvrzení se šance na úspěšné křížení jedinců v semenném sadu Čejkovka velmi snižuje, neboť pouze 29 klonů se liší S – lokusem. Ale někteří z těchto jedinců se shodují v jedné alele, což znamená, že šance na úspěšné křížení mezi nimi se snižuje o 50 %.

Podle De Cuyper et al. (2005) by měly být sousední stromy v semenném sadu vzájemně kompatibilní, aby se maximalizovala produkce osiva. Tento předpoklad v semenném sadu Čejkovka splněn není, z důvodu stejných genotypů evidenčně různých klonů (příloha 1) a odlišných klonů, jež se shodují S - lokusem. Gömöry et al. (2000) kromě genetické inkompatibility zmiňuje jako faktory ovlivňující křížení jedinců mezi sebou v semenném sadu také směr větru, opakování klonů v několika rametách, rozdíly ve fenologii kvetení.

Schueler et al. (2006) srovnával frekvenci distribuce S – alel. Zjistil 15 S – alel ve studované populaci 164 stromů. Pozorovaná heterozygotnost se pohybovala od 0,360 do 0,823. De Cuyper et al. (2005) z populací 39 a 36 stromů zjistil 13 a 14 S – alel, které byly již dříve popsány a identifikoval 6 neznámých S – alel. V semenném sadu Čejkovka bylo zjištěno 15 S – alel a pozorovaná heterozygotnost byla v rozmezí od 0,417 do 0,816.

Diverzita sadu je nejlépe vyjádřena efektivním počtem klonů. Efektivní počet klonů by se měl zachovat vyšší, zatímco klony by neměly být v sadu zastoupeny ve stejném poměru (Kang et al., 2001). Ve studii jehličnatých klonových sadů, Kang et al. (2001) odvodil průměrný efektivní počet klonů v semenném sadu 66, u 1/5 sadů byl efektivní počet klonů mezi 10 a 40. V semenném sadu Čejkovka je efektivní počet klonů 32, ale pokud se zaměříme na mikrosatelitové markery či S – lokus, potom se efektivní počet snižuje na 12 a 10. Efektivní počet klonů, u kterých plodila více než polovina ramet v roce 2015, je dle evidence zastoupených klonů 20, dle SSRs 8 a dle S – lokusů 5. Klony zastoupeny v sadu pouze s jednou rametou byly do efektivního počtu zařazeny také, pokud plodila. Skutečnost, že v semenném sadu Čejkovka je efektivní počet klonů dle S – lokusů pouze 5 je zásadní, neboť vzhledem k evidenci, kde efektivní počet klonů je 32, se počet klonů velmi zredukoval a díky tomu se snížila i genetická diverzita sadu. Na základě tohoto faktu, můžeme konstatovat příčinu nízké plodnosti sadu. A to tak, že v semenném sadu se nachází mnoho

klonů, které jsou geneticky identické, z důvodu kořenové výmladnosti výběrových stromů, ale podle evidence se jeví jako různé klony. Nejenže jejich ramety, které jsou v sadu zastoupeny nejpočetněji – 37 %, nevykazují očekávanou plodnost, ba dokonce můžeme říct, že neplodí. Tyto nekvalitní klony snižují plodnost sadu. Lingren a Mullin (1993) uvádí, že počet použitých klonů v semenném sadu by měl udržet vysoký efektivní počet a nízký inbreeding, díky optimalizaci využití klonů s nejlepšími šlechtíci hodnotami.

Mariette et al. (2006) se zabývala efektivní velikostí na základě fenologie, plodnosti a analýzy paternity. Výsledky neukázaly žádný rozdíl genetické diverzity mezi rodiči a potomky. Ukázalo se, že významný vliv na efektivní opylování má vzdálenost kvetoucích klonů. Sousední klon může dominovat v sadu jako otcovský či mateřský strom a tím snižovat efektivní počet otců. Tato studie také ukázala poměrně vysoké efektivní velikosti matek, otců a rodičů na úrovni sadu. Efektivní velikost sadu se pohybovala od 7,6 do 12,1.

6. Závěr

Výzkumem bylo zjištěno, že v semenném sadu Čejkovka je vysoké zastoupení gametofyticky autoinkompatibilních jedinců. Kromě autoinkompatibilních jedinců, bylo díky analýze mikrosatelitových dat prokázáno, že některé klony mají také stejný genotyp, přestože pocházejí z rozdílných výběrových stromů. Tato skutečnost je způsobená kořenovou výmladností, ačkoliv se v lesnické praxi na tuto reprodukční strategii třešně příliš nehledí. Kořenovou výmladností třešně se ve svých studiích zabývalo již mnoho autorů např. Vaughan et al. (2007), Schueler et al. (2003), Schueler et al. (2006), Ducci a Santi (1997). Kořenová výmladnost se dostavuje po poranění kořenu či celého stromu. Výběrové stromy pochází z Křivoklátska, které leží nedaleko Prahy a tato oblast je dlouhodobě osídlena. Již několik desítek let se v lesích hospodaří a důsledkem toho je kořenová výmladnost. Na základě testů klonů v semenném sadu se posléze provedla analýza mikrosatelitových markerů některých výběrových stromů. Bylo zjištěno, že výběrové stromy klonů č. 339 – 340; 341 – 342; 363 - 364; 375 – 377; 386, 387 a 390; 392 - 398 jsou geneticky identické. Výsledky analýzy mikrosatelitů tedy nepotvrdily jednu z možných příčin klonové identity jako např. záměnu roubů či nesprávnou evidenci. Geneticky identické klony jsou v sadu zastoupeny nejvyšším počtem ramet (celkem se jedná zhruba o 37 % ramet). Z tohoto důvodu je v sadu zastoupeno poměrně velké množství gametofyticky autoinkompatibilních jedinců, neboť tito jedinci mají stejné S – lokusy. Počet inkompatibilních jedinců ještě vzroste při započtení jedinců odlišných dle mikrosatelitových markerů, ale se shodující se S - alelou. To znamená, že mezi autoinkompatibilními jedinci nemůže dojít k opylení a o 50 % se snižuje šance na úspěšné opylení v případě, že ramety mají jednu alelu na S – lokusu shodnou.

Pro vyšší produkci osiva ze zastoupených klonů by bylo vhodné část geneticky identických ramet nahradit rametami jiných klonů, nejlépe upřednostňovat ty klony, které plodily a případně provést tzv. inkluzi nových šlechtících jedinců (zavedení zcela nových klonů). Navrhovala bych zvýšit zastoupení ramet klonů č. 336, 346, 347, 351, 356, 358, 359, 373, 374, 388. Ramety zmíněných klonů v roce 2015 plodily všechny či z převážné většiny. Rozmístění nových ramet v sadu by mělo být takové, aby inkompatibilní ramety nebyly v přílišné blízkosti. Taktéž by spolu neměli sousedit geneticky identičtí jedinci. Ke splnění tohoto předpokladu by bylo vhodné použít optimalizační algoritmus, který vzniká na katedře genetiky a fyziologie dřevin. Tento algoritmus maximalizuje náhodné křížení mezi všemi přítomnými klony. Lze jím také doplňovat volná místa v již stávajícím sadu, neboť bere v potaz již předdefinované pozice a doplní je. Tudiž by bylo vhodné ho použít v sadu

i při inkluzi nových klonů. Při použití tohoto optimalizačního algoritmu lze řešit jakoukoliv velikost a tvar sadu (Chaloupková, 2016).

Další alternativou je využití semenného sadu Čejkovka k odběru roubů pro založení nového sadu. Nový sad by byl již založen na základě poznatků o jednotlivých genotypch klonů a gametofytické autoinkompatibilitě a za použití zmíněného optimalizačního algoritmu. Tyto poznatky by mohly výrazně ovlivnit produkci osiva v novém sadu.

7. Seznam literatury a použitých zdrojů

ADAMS, W.T.; BURCZYK J. Magnitude and implications of gene flow in gene conservation reserves. In: Young, A., Boshier, D. and T.Boyle (eds.) Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) Publishing, Collingwood, Victoria, Australia, 2000. s. 215-244.

ADAMS, W. T.; STRAUSS, S. H.; COPES, D. L.; GRIFFIN, A. R. Population Genetics of Forest Trees. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1992. 420 s. ISBN 0-7923-1857-9.

ALLARD, R. W. Principles of Plant Breeding. New York: John Wiley and Sons, 1960.

ARANZANA, M. J.; GARCIA - MAS. J.; CARBO, J.; ARÚS, P. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. Plant Breeding. 2002, vol. 121, no. 1, s. 87-92.

BARNES, R. D.; The breeding seedling orchard in the multiple population breeding strategy. Silvae Genetica. 1995, vol. 44, s. 81-88.

BARNES, R. D.; WHITE, T. L.; NYOKA, B. I.; JOHN, S.; PSWARAYI, I. Z. The composite breeding seedling orchard. In: Potts, B.M. Borralho, N.M.G. Reid, J.B., Cromer, R.N., Tibbits, W.N. and Raymond, C.A. (eds.) Proceeding of the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO), Conference on Eucalypt Plantations: Improving Fibre Yield and Quality. Hobart,Australia, 1995. s. 285-288.

BILIR, N.; PRESCHER, F.; LINDGREN, D.; KROON, J. Variation in cone and seed characters in clonal seed orchards of Pinus sylvestris. New Forests. 2008. vol. 36, no. 2, s. 187- 199. ISSN 0169-4286.

BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatellites: allele variation and mapping. Plant Molecular Biology. 1995, vol. 27, no. 4, s. 835–845. ISSN 0167-4412.

BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. Trends in Ecology and Evolution. 2003, vol. 18, no. 10, s. 503-511. ISSN 0169-5347.

BONNET -MASIMBERT, M.; WEBBER, J. E. From flower induction to seed production in forest tree seed orchards. Tree Physiology. 1995, vol. 15, no. 7, 8 s. 419-426. ISSN 0829-318X.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 1980, vol. 32, no. 3, s. 314–331.

CACHI, A. M.; WÜNSCH A.. Characterization of self-compatibility in sweet cherry varieties by crossing experiments and molecular genetic analysis. Tree Genetics & Genomes. 2014, vol. 10, no. 5, s. 1205 – 1212. ISSN 1614-2942.

CLARK, M. S. (Ed.). Plant molecular biology - laboratory manual. Springer Science & Business Media, 2013. 529 s. ISBN 3642878733.

CLARKE, A.; NEWBEGIN, E. D. (1993): Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. *Annual Review of Genetics*. 1993, vol. 27, s. 257–279. ISSN 0066-4197.

CRANE, M. B.; LAWRENCE, W. J. C. Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *Journal of Pomology and Horticultural Science*. 1928, vol. 7, no. 3. s. 276–301.

CUYPER, B.; SONNEVELD, T.; TOBUTT, K. R. Determining self - incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Molecular Ecology*. 2005, vol. 14 no. 4, s. 945-955. ISSN 0962-1083.

Česko. Ministerstvo zemědělství. Zákon č. 149/2003 Sb., o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných druhů a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin). In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2003, částka 57, s. 3279. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-2003-149-viceoblasti.html

ČEŠKA, Pavel. Zakládání a rozvoj semenných sadů lesních dřevin u VLS ČR, S.P. Disertační práce. Praha: ČZU, 2014. 154 s.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZANA, M.; POIZAT, C.; ZANETTO, A.; LAIGRET, F. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2002, vol. 105, no. 1, s. 127-138. ISSN 0040-5752.

DOWNEY, S. L.; IEZZONI, A.F. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2000, vol. 125, no. 1, s. 76-80. ISSN 0003-1062.

DUCCI, F.; SANTI, F. The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium*). *Canadian Journal of Forest Research*, 1997, vol. 27, no. 12, s. 1998-2004.

DZIALUK, A.; CHYBICKI, I; BURCZYK, J. PCR multiplexing of nuclear microsatellite loci in *Quercus* species. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2005, vol. 23, no. 2, s. 121-128. ISSN 0735-9640.

ECHT, C. S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. *Genome*. 1997, vol. 40, no. 1, s. 9-17. ISSN 0831-2796.

EL - KASSABY, Y. A.; CAPPA, E. P; LIEWLAKSANEEYANAWIN, C.; KLÁPŠTĚ, J.; LSTIBŮREK, M. Breeding without breeding: is a complete pedigree necessary for efficient breeding?. *PLoS One*. 2011, vol. 6, no. 10, e25737.

EL – KASSABY, Y. A.; FAYED, M.; KLÁPŠTĚ J.; LSTIBŮREK; RANDOMIZED, M. replicated, staggered clonal-row (R2SCR) seed orchard design. *Tree Genetics and Genomes*. 2014, vol. 10, no. 3, s. 555-563. ISSN 1614-2942.

EL – KASSABY, Y. A.; LSTIBŮREK M. Breeding without breeding. *Genet Research*. 2009, vol. 9, no. 2, s. 111–120.

FÉR, T. Molekulární markery v systematice a populační biologii rostlin. Praha: DNA laboratoř Katedry botaniky PřF UK, Benátská 2, Praha, 2014. Dostupné z: <http://botany.natur.cuni.cz/dna/images/stories/pdf/protokoly-praktika/protokoly2.pdf>

FÉR, T.; POKORNÝ, J.: Listnáče lesů a parků. Praha: SZN, 1964. 365 s.

FUNDA, T.; EL-KASSABY, Y. A. Seed orchard genetics. *Plant Sci Rev*, 2013, 2012: 21-43.

GARANT, D.; KRUUK, L. E. B. How to use molecular marker data to measure evolutionary parameters in wild populations. *Molecular Ecology*. 2005, vol. 14, no. 7, s. 1843-1859.

GÖMÖRY, D., BRUCHANIK, R., PAULE, L. Effective population number estimation of three Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed orchards based on an integrated assessment of flowering, floral phenology, and seed orchard design. *For. Genet*, 2000, 7: 65-75.

GÖMÖRY, D., LONGAUER R., Lesnická genetika. Brno. 2014. s. 137.

GUILLEMAUT, P.; MARÉCHAL-DROUARD, L. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1992, vol. 10, no. 1, s. 60-65. ISSN 0735-9640.

HEINRICH, B. The foraging specializations of individual bumblebees. *Ecological Monographs*. 1976, vol. 46, no. 2, s. 105–128. ISSN 0012-9615.

HEJNÝ, S.; SLAVÍK, B.; kol. Květena České republiky – 3. díl. ČSAV, Academia : Praha, 1992. 442–444 s.

HIEKE, K. Praktická dendrologie II. 1. vyd. Praha: SZN, 1978. 2 sv. Rostlinná výroba.

HILLIS, D. M; MORITZ, C., *Molecular Systematics*. Sinauer Ass., Inc., Sunderland: Massachussets, 1990.

CHALOUPKOVÁ K.; Ústní sdělení. Student ČZU. Praha. 16.4.2016

IVANEK, O.; NOVOTNÝ, C. I. P.; FRÝDL, J. Metodika zakládání semenných sadů 1, 5. generace. Certifikovaná metodika. Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. 2010.

JARNE, P.; LAGODA P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*. 1996, vol. 11, no. 10, s. 424 - 429.

JIANG, G. L. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. 2013, s. 45-83.

JONES, A.; G., ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*. 2003, vol. 12, s. 2511-2523.

KANG, K. S.; HARJU, A. M.; LINDGREN, D.; NIKKANEN, T.; ALMQVIST, C.; SUH, G. U. Variation in effective number of clones in seed orchards. *New Forests*. 2001, vol. 21, no. 1, s. 17-33. ISSN 0169-4286.

KANG, K. S.; LINDGREN, D. Fertility variation and its effect on the relatedness of seeds in *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii* and *Pinus koraiensis* clonal seed orchards. *Silvae Genetica*. 1998, vol. 47, no. 4, s. 196-201. ISSN 0037-5349.

KAŇÁK, J.; FRÝD, J.; NOVOTNÝ, P.; ČÁP J. Metodika zakládání semenných sadů: recenzovaná metodika. Strnady Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. Lesnický průvodce, 2008. 24 s. ISBN 978-80-7417-007-2.

KAŇÁK, J.; KLÁPŠTĚ, J.; LSTIBŮREK, M. Úvodní genetické hodnocení semenných sadů borovice lesní v západních Čechách. *Zprávy lesnického výzkumu*. 2009, roč. 54, č. 3, s. 112 - 127. ISSN: 0322-9688.

KARKKAINEN, K.; KOSKI, V.; SAVOLAINEN, O. Geographical variation in the inbreeding depression of Scots pine. *Evolution*. 1996, vol. 50, s. 111–9.

KLÁPŠTĚ, J.; KORECKÝ, J.; LSTIBŮREK, M.; KOBLIHA, J. Moderní šlechtitelské metody v lesnictví. *Lesnická práce*, 2012. Dostupné z <http://www.lesprace.cz/casopis-lesnicka-prace-archiv/rocnik-91-2012/lesnicka-prace-c-10-12/moderni-slechtitelske-metody-v-lesnictvi>

KLUMPLER, T. Studium polymorfizmu DNA markerů ječmene u nových zdrojů rezistence k padlí [online]. Brno, 2006 [cit. 2016-04-08]. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Pavel Lízal Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/55204/prif_m/>.

KOBLIHA, J. Wild cherry (*Prunus avium* ild cherry (L.) breeding program aimed at the use of this tree in the Czech forestry. *J. For. Sci*, 2002, 48.5: 202-218.

KOBLIHA, J.; LSTIBŮREK, M.; HYNEK, V.; KLÁPŠTĚ, J.; STEJSKAL, J. Metodika testů potomstev lesních dřevin pro zakládání semenných sadů 2. generace, certifikovaná metodika. 2012. 218370/2012-MZE-16222/M57.

KOZLÍKOVÁ, K. Hodnocení semenného sadu třešně ptačí (*Prunus avium* L.) na LS LČR Lužná. Diplomová práce. ČZU Praha, 2008.

KREMER, B. P.; POLÁČEK, J. (1995). *Stromy. V Evropě zdomácnělé a zavedené druhy*. Praha: Knižní klub, 1995.

LAI, B. S.; FUNDA, T; LIEKWLAKSANEEYANAWIN, C.; KLÁPŠTĚ, J.; VAN NIEJENHUIS, A.; COOK, C.; EL-KASSABY, Y. A. (2010). Pollination dynamics in a Douglas-fir seed orchard as revealed by pedigree reconstruction. *Annals of forest science*. 2010, vol. 67, no. 8, s. 808. ISSN 1286-4560.

LIEWLAKSANEEYANAWIN, C.; RITLAND, C. E.; EL-KASSABY, Y. A.; RITLAND, K. 2004. Singlecopy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004, vol. 109, no. 2, s. 361-369. ISSN 0040-5752.

LINDGREN, D.; MULLIN, T. J. Relatedness and of expected group coancestry. status number in seed orchard crops. *Canadian Journal of Forest Research*. 1998, vol. 28, no. 2, s. 276–283. ISSN 0045-5067.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 1989, 44.3: 397.

LSTIBŮREK, M.; EL-KASSABY, Y. A. Minimum-Inbreeding Seed Orchard Design. *Forest Science*. 2010, vol. 56, no. 6, s. 603-608. ISSN: 0015-749X.

LSTIBŮREK, M., IVANKOVÁ, K., KADLEC, J., KOBLIHA, J., KLÁPŠTĚ, J., EL-KASSABY, Y. A. Breeding without breeding: minimum fingerprinting effort with respect to the effective population size. *Tree genetics & genomes*, 2011, 7.5: 1069-1078.

LSTIBŮREK, M., KOBLIHA, J., KLÁPŠTĚ, J., EL-KASSABY, Y. A. Breeding without Breeding. *Tree genetics & genomes*, 2012, 8.4: 873-877.

LUO, G.; HEPBURN, A. G.; WIDLHOLM, J. M. (1992). Preparation of plant DNA for PCR analysis: a fast, general and reliable procedure. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1992, vol. 10, no. 4, s. 319-323. ISSN 0735-9640.

LYNCH, M.; MILLIGAN, Brook G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular ecology*. 1994, vol. 3, no. 2, s. 91-99.

MARIETTE, S.; BALSEMIN, E.; STOECKEL, S.; TAVAUD, M.; LE BOULER, H.; SANTI, F.; VERGER, M. Parental participation in progeny and effective population sizes in experimental seed orchards of wild cherry *Prunus avium* L. (Batsch). *Annals of forest science*. 2007, vol. 64, no. 5, s. 533-539. ISSN 1286-4560.

MARKERT, C. L.; MOLLER F. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1959, vol. 45, no. 5, s. 753–763.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2002, vol. 16, no. 1, s. 47-51.

MEZERA, A. *Naše stromy a keře*. Praha: Albatros, 1989. 426 s.

MIKULA, A. *Plody planých a parkových rostlin*. Praha : SPN, 1979. 308 s.

MITAS, M.; YU, A.; DILL, J.; KAMP, T. I.; CHAMBERO, E. J.; HAWORTH, I. S. Hairpin properties of single-stranded DNA containing a GC-rich triplet repeat: (CTG)₁₅. *Nucleic Acids Research*. 1995, vol. 23, no. 6, s. 1050-1059. ISSN 0305-1048.

MORIGUCHI, Y.; PRESCHER, F.; LINDGREN, D. Optimum lifetime for Swedish Picea abies seed orchards. *New Forest*. 2008, vol. 35, no. 2, s. 147-157.
ISSN 0169-4286

MUSIL, I. Listnaté dřeviny. Skriptum. Praha: ČZU-FLE, 2005. 215 s.

ÖPIK, H.; ROLFE, S. A.; WILLIS, A. J. The physiology of flowering plants. Cambridge University Press, 2005. ISBN 0-521-66485-3.

PANCZAK, A.; OTOVÁ, B.(ed.). Lékařská biologie a genetika [online]. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2013 [cit. 2016-04-04]. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-2415-0.

PAULE, L. Genetika a šľachtenie lesných drevín. Bratislava: Príroda a.s., 1992. 304 s.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 19, s. 2537-2539.

PLESNÍK, J. Ukazatele změn biodiverzity (editor David Vačkář). Praha: Academia, 2005. 298 s. ISBN 80-200-1386-5.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; POT, D.; VENDRAMIN, G.; GERBER, S.; DECROCQ, S.; BRACH, J.; RAFFIN, A.; PASTUSZKA P. Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. *Canadian Journal of Forest Research*. 2001, vol. 31, no. 10, s. 1816-1825. ISSN 0045-5067.

PRUDIČ, Z. Nové poznatky o pěstování třešně ptačí. *Lesnická práce*. 1996, vol. 75, no. 5, s. 158–159.

RELICHOVÁ, J. Genetika populací. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4795-2.

ROBINSON J. P.; HARRIS S. A. Microsatellite markers as a tool for the detection of intra- and interpopulational genetic structure. in *Which DNA Marker for Which Purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union, Research Programme Molecular Tools for Biodiversity*. 1999.

ROSYPAL, S.; DOŠKAŘ, J.; PANTŮČEK, R. a kol. Terminologie molekulární biologie. Brno: Grafex, 2001. 281 s. ISBN 80-902562-3-6.

RUOTSALAINEN, Seppo. Increased forest production through forest tree breeding. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2014, vol. 29, no. 4 s. 333-344.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985, vol. 230, no. 4732, s. 1350–4

SEMAGN, K.; BJORNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 5, no. 25, s. 2540–2568

SHARMA, M. V.; KANTARTZI, S. K.; STEWART, J. M. Molecular diversity and polymorphism information content of selected *Gossypium hirsutum* accessions. In: Oosterhuis D. M., 2010.

SHARMA, K.; SEDLÁK, P.; ZEKA, D.; VEJL, P.; SOUKUP, J. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility alleles S3, S4 and S9 using consensus and allele-specific primers in the Czech Republic. *Horticultural Science*. 2014, vol 41, no. 4, s. 153-159. ISSN 0862-867X.

SCHMIDT, A.; DOUDRICK, R. L.; HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHMIDT, T. 2000. The contribution of short repeats of low sequence complexity to large conifer genomes. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000, vol. 101, no. 1-2, s. 7-14. ISSN 0040-5752.

SCHUELER, S.; TUSCH, A.; SCHOLZ, F. Comparative analysis of the within - population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self - incompatibility locus and nuclear microsatellites. *Molecular ecology*, 2006, 15.11: 3231-3243.

SCHUELER, S.; TUSCH, A.; SCHUSTER, M.; ZIEGENHAGEN, B. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*. 2003, vol. 46, no. 1, s. 95-102.

SCHWARZ, G.; MICHALEK, W.; MOHLER, V.; WENZEL, G.; JAHOOOR, A. Chromosome landing at the *Mla* locus in barley (*Hordeum vulgare* L.) by means of high-resolution mapping with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999, vol. 98, no. 3–4, s. 521–530. ISSN 0040-5752.

SIMMONS, M.S.; SNUSTAD, P.D. *Genetika*. Brno: Muni press, 2009. 894 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

SOULÉ, M. E. *Viable populations for conservation*. Cambridge university press, 1987. 189 s. ISBN 052133903.

SPIECKER, H. Erziehung von Kirschenwertholz. *Allgemeine Forstzeitung*. 1988, vol. 20, s. 562-566.

STOEHR, M.; WEBBER, J.; WOODS, J. Protocol for rating seed orchard seedlots in British Columbia: quantifying genetic gain and diversity. *Forestry*. 2004, vol. 77, no. 4, s. 297–303.

STRUSS, D.; AHMAD, R.; SOUTHWICK, S. M.; BORITZKI, M. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. 2003, vol. 128, no. 6, s. 904–909. ISSN 0003-1062.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 1984, vol. 12, no. 10, s. 4127–4138.

TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M. T.; SANSAVINI, S. (2000). Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its

use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*. 2000, vol. 43, no. 3, s. 512-520.

TETUROVÁ, K. Identifikace genů rezistence k padlí (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) u *Hordeum vulgare* prostřednictvím DNA markerů [online]. Brno, 2011 [cit. 2016-04-20]. Disertační práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jana Řepková Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/151559/prif_d/>.

TROJÁNEK, Z. Izolace DNA z rostlinných tkání pro použití v polymerázové řetězové reakci. Brno University of technology, 2013.

VACHŮN, F.; ŘEZNÍČEK, V. Ovocnictví. Praktická cvičení II. Brno: Skriptum VŠZ, 1989.

VAN BUIJTENEN, J. P. Strategies for maintaining the genetic base. How will advanced generation tests differ from first? Progeny testing, proceedings of Servicewide Genetics Workshop; Charleston, South Carolina, Dec 5–9, 1983. USDA Forest Service, Washington, D.C., USA, 1984. s. 566–72.

VARGHESE, M.; LINDGREN, D.; NICODEMUS, A. Fertility and Effective Population Size in Seedling Seed Orchards of *Casuarina equisetifolia* and *C. junghuhniana*. *Silvae Genetica*, 2004, vol. 53, no. 4, s. 164-168. ISSN 0037-5349.

VAUGHAN, S. P.; BOŠKOVIČ, R. I.; GISBERT-CLIMENT, A.; RUSSELL, K.; TOBBUT, K. R. Characterisation of novel S-alleles from cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Genetics & Genome*. 2008, vol. 4, no. 3, s. 531-541. ISSN 1614-2942.

VAUGHAN, S. P.; COTTRELL, J. E.; MOODLEY, D. J.; CONNOLLY, T.; RUSSELL, K.. Clonal structure and recruitment in British wild cherry (*Prunus avium* L.). *Forest ecology and management*. 2007, vol. 242, no. 2, s. 419-430.

VAUGHAN, S. P.; RUSSELL, K. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large - scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Molecular Ecology Notes*. 2004, vol. 4, no. 3, s. 429-431.

VÍTÁMVÁS, J.; MAULEOVÁ, M.; KOBLIHA, J. Možnosti využití kultur in vitro při zakládání semenných sadů lesních dřevin. In: Sborník z konference "Semenné sady jako zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu – minulost, současnost a budoucnost", 20. – 21. 6., Bzenec 2006, s. 82-85.

WEBER, J. L.; MAY, P.. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*. 1989, vol. 44, no. 3, s. 388-396. ISSN 0002-9297.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990, vol. 18, no. 22, s. 6531–6535.

WHITE, T. L.; ADAMS, W.; NEALE, David B. *Forest genetics*. Cambridge, MA: CABI Pub., 2007, 682 p. ISBN 08-519-9083-5

WHITE, T. L.; HODGE, G. R.; POWELL, G. L. An advanced-generation tree improvement plan for slash pine in the southeastern United States. *Silvae Genetica*. 1993, vol. 42, no. 6, s. 359-371. ISSN 0037-5349.

YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. Australia, Collingwood, Victoria : Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) Publishing, 2000.

ZOBEL, B. J., TALBERT, J. T. *Applied Forest Tree Improvement*. New York: John Wiley and Sons, 1984.

7. 1. Internetové zdroje

ANONYMUS., 2016a: [online]. [cit. 2016-4-3]. Dostupné z:

<http://www.uhul.cz/nase-cinnost/reprodukcnim-materialem-lesnich-drevin/erma>

ANONYMUS., 2016b: Premierbiosoft. [online]. [cit. 2016-14-3]. Dostupné z:

http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html

ANONYMUS., 2016c: Labguide. [online]. [cit. 2016-20-2]. Dostupné z:

<http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Ke-sta%C5%BEn%C3%AD-PCR1.pdf>

ANONYMUS., 2016d: Softgenetic [online]. [cit. 2016-22-2]. Dostupné z:

<http://www.softgenetics.com/>

ANONYMUS., 2016e: Fieldgenetics [online]. [cit. 2016-22-2]. Dostupné z:

<http://www.fieldgenetics.com/pages/>

ANONYMUS., 2016f: Quiagen [online]. [cit. 2016-22-2]. Dostupné z:

<https://www.qiagen.com/cz/shop/pcr/end-point-pcr-enzymes-and-kits/regular-pcr/hotstartaq-dna-polymerase/#orderinginformation>

ANONYMUS., 2016g: Laboratoř molekulární biologie rostlin Přf JU [online]. [cit. 2016-21-1]. Dostupné z:

<http://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/izolace.html#A>

8. Seznam příloh

Příloha 1: Schéma sadu	74
Příloha 2: Počet ramet	75
Příloha 3: Fenologie kvetení v letech 2003, 2004, 2005, 2006, 2009, 2010, 2013, 2015.....	76
Příloha 4: Fenologie v roce 2015	77
Příloha 5: Multiplex A - genotyp	84
Příloha 6: Multiplex B - genotyp.....	85
Příloha 7: Multiplex C - genotyp.....	86
Příloha 8: Multiplex D - genotyp	88
Příloha 9: Efektivní počet klonů – plody	89

9. Přílohy

Příloha 1: Schéma sadu

↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
A	392	393	391	366	358	388	395	345	374	398	373	354	396	341	367	389	379	339	397	372	339	
B	380	365	340	355	336	361	353	347	363	352	339	364	397	359	369	383	346	344	396	373	367	
C		372	349	338	390	384	337	387	377	371	370	353	344	358	348	378	356	353	394	389	395	339
D	342	350		382	376	368	374	381	397	344	372	392	375	339	393	389	395	358	393	358	372	389
E	388	373	396	398	345	366	353	358	339	393		391	396	352	374	355	385	367	359	353	373	393
F	365	354	336	361	395	398	343	344	378	341	372	397	359	340	339	366	363	372		339	394	373
G	367	359	344	367	389	345	PO1	394	373			394	353	372	393	PO2	394	373	344	397	358	393
H	397	395	339	379	373	391	342	PO3		344	389	370	389	388	380	353	396	374	358	395	389	
I	366	372	374	355	358	398	352	392	397	337		354		373	367	345	343	389	393	394	339	
J	391	350	336		346	356	393	369	365	347	384	351	348	383	363	359	349	397	372	353	373	
K	392	375		353	336	377	395	372		388	339		361		395	344		339	394	395		
L	398		345	394	341	397		PO4	370		390		389	340	380	392	342		373	339	393	
M	388	339	396	353	374	373	367	393	395	394	345	373	372	398		389	366	372	374	372	389	
N	359	354	397	344	363	336	389	365	361	389		358	393	339	345	388	352	396	367	394	339	
O	396			367	353	344	358	386	373	339	393	395	394	373	396		398	395	353		373	
P	394	389	393		372		345	398	353	373	397	396	389				373	339		389	397	

Příloha 2: Počet ramet

klon	počet ramet	klon	počet ramet
336	5	369	2
337	2	370	3
338	1	371	1
339	18	372	15
340	3	373	17
341	3	374	7
342	3	375	2
343	2	376	1
344	10	377	2
345	8	378	2
346	2	379	2
347	1	380	3
348	2	381	1
349	2	382	1
350	2	383	2
351	2	384	2
352	4	385	1
353	13	386	1
354	4	387	1
355	3	388	6
356	2	389	17
358	10	390	2
359	6	391	4
361	4	392	5
363	4	393	14
364	1	394	12
365	4	395	12
366	5	396	10
367	9	397	12
368	1	398	8
			304

Příloha 3: Fenologie kvetení v letech 2003, 2004, 2005, 2006, 2009, 2010, 2013, 2015.

Údaje z let 2003, 2004, 2005, 2006, 2009, 2010, 2013 jsou zveřejněné se souhlasem Ing. Hrdličky.

klon	2003		2004		2005		2006		2009		2010		2013		2015		úhyn
	počet	květ	počet	květ	počet	květ	počet	květ	počet	květ	počet	květ	počet	květ	počet	květ	
380	3	3	3	0	3	1	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	
350	2	1	2	1	2	0	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	
340	3	1	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
390	2	0	2	0	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
370	3	0	3	0	3	1	3	1	3	3	3	3	3	2	3	3	
391	0	1	5	1	5	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1
361	5	3	5	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	2	4	3	1
341	3	0	3	0	3	1	3	2	3	3	3	3	3	1	3	3	
351	2	0	2	0	2	0	2	0	2	2	2	2	2	1	2	2	
381	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
371	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
392	6	0	6	0	6	0	6	1	6	4	5	1	5	2	5	3	1
342	3	2	3	0	3	1	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	
372	15	6	15	10	15	10	15	12	15	15	15	13	15	15	15	15	
382	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
352	4	1	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
373	19	2	19	3	19	12	18	13	18	18	17	17	17	17	17	17	2
393	18	0	16	0	16	0	15	1	15	12	15	7	15	4	14	10	4
353	14	4	14	3	14	12	14	12	13	13	13	12	13	13	13	13	1
363	4	1	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1	4	4	
343	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	
383	2	0	2	0	2	0	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	
394	15	0	15	0	15	0	12	2	12	10	12	3	12	2	12	12	3
354	4	2	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
344	10	3	10	3	10	4	10	8	10	10	10	10	10	10	10	10	
374	9	5	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7	7	2
364	2	1	2	2	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2
384	2	0	2	0	2	1	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	
365	4	0	4	0	4	2	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	
375	2	1	2	0	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
395	14	0	13	0	13	1	13	2	12	2	12	5	12	4	12	10	2
345	9	2	9	2	9		8	5	8	8	8	8	8	8	8	8	1
355	4	0	4	0	3	0	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	
385	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
366	6	2	6	3	6	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1
396	11	0	10	0	10	0	10	2	9	7	9	4	11	5	10	8	3
336	5	0	5	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
376	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
346	2	0	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
356	2	1	2	0	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	
386	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
357	2	1	2	1	2	0	2	2	1	1	0	0	1	1	0	0	3
367	11	1	11	1	10	4	10	5	8	8	10	6	9	5	9	9	4
397	13	0	12	0	12	0	12	1	12	9	12	5	12	5	12	11	1
377	2	0	2	0	2	0	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	

337	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
387	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
347	2	0	2	0	2	0	2	0	2	2	2	2	2	1	2	2	
388	6	1	6	2	6	5	6	5	6	6	7	7	6	6	6	6	
398	9	0	8	0	8	0	8	1	8	6	8	2	8	3	8	7	1
368	2	0	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
338	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
358	14	3	13	0	13	7	12	9	10	10	10	10	10	10	10	10	4
378	3	0	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	1
348	2	0	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	
389	17	1	17	0	17	3	17	9	17	17	17	16	17	12	17	17	
359	8	0	6	0	6	5	6	5	6	5	6	6	7	6	6	6	1
339	19	3	19	7	19	13	19	17	18	18	18	18	18	16	18	18	1
349	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
379	3	0	3	0	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
369	2	1	2	0	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	

Příloha 4: Fenologie v roce 2015

	24.4.2015	27.4.2015	29.4.2015	1.5.2015	3.5.2015	5.5.2015	14.6.2015
336	1	2	3	3po	3o	3o	p
336	1	2	3	3o	2o	1o	p
336	0	1	3	2o	2	1o	p
336	1	2	2	2	2po	2o	p
336	0	2	2	2o	2po	2o	p
337	1	2	2	2	2o	1o	-
337	1	3	3	3	3	2o	p
338	2	3	3	3o	3o	2o	p
339	0	2	3	3	3po	2o	-
339	0	2	3	3	3po	2o	p
339	0	1	2	3	3p	2o	p
339	1	2	2	3	3p	2o	p
339	0	2	3	3	3p	2o	p
339	0	1	2	2	3po	2o	-
339	0	3	3	3	3po	2o	p
339	0	1	2	3	3p	3o	p
339	0	2	3	3p	3	2o	p
339	0	2	3	3	3po	2o	p
339	1	2	3	3	3po	2o	p
339	0	3	3	3	3	3o	p
339	0	2	3	3	3p	3o	p
339	1	2	3	3	3	3o	p
339	0	0	1	1	1	1o	-
339	0	2	3	3	3p	3o	p
339	0	1	2	3	2po	2o	-
339	0	2	3	3	3po	3o	p
340	0	2	3	3	3	2o	p
340	0	2	3	3	3po	2o	p
340	0	1	2	3	3po	2o	p
341	1	1	2	2o	2o	1o	-

341	1	2	2	2	2o	1o	-
341	1	1	2	2	2o	1o	-
342	1	2	2	2	3	3o	-
342	0	1	3	2o	2o	1o	-
342	1	2	3	3	2o	1o	-
343	1	3	3	3o	3o	1o	-
343	0	2	2	3o	3o	2o	p
344	0	2	3	3o	3p	3o	p
344	0	3	3	3	3o	1o	p
344	0	3	3	3	3	2o	p
344	0	2	3	3	3p	2o	p
344	0	2	3	3	3o	2o	p
344	0	2	3	3	2o	2o	p
344	1	3	3	2o	2o	1o	-
344	0	1	3	2o	2o	1o	-
344	1	2	3	2o	2o	1o	-
344	0	2	3	3	2o	1o	-
345	0	2	3	3	3	2o	-
345	0	2	2	2	2	1o	-
345	1	2	3	3	3	2o	p
345	0	2	3	3o	3po	1o	p
345	0	2	2	2	2	1o	p
345	0	3	3	3	3	2o	p
345	0	2	3	3	2o	1o	-
345	0	0	1	1	1	1o	-
346	0	2	3	3o	3po	2o	p
346	0	1	3	3po	3po	2o	p
347	0	2	2	3	2o	2o	p
347	0	2	2	3	3po	2o	p
348	0	1	2	2	2	2o	p
348	0	0	1	1o	2po	1o	-
349	0	3	3	3	3	2o	p
349	0	2	2	3	3po	2o	-
350	0	0	1	1	2o	1o	p
350	1	1	2	2	2o	1o	-
351	0	2	3	2o	2o	1o	p
352	0	2	2	1o	1o	1o	-
352	1	2	2	2o	2o	1o	-
352	0	1	1	1	1o	0	-
352	1	2	3	3o	2o	1o	-
353	0	3	3	3	2p	2o	-
353	1	2	3	3o	3o	1o	-
353	1	1	3	3	3o	2o	p
353	0	3	3	3	3o	2o	-
353	1	3	3	3o	3o	2o	p
353	1	3	3	3	3o	1o	p
353	0	2	3	3o	3o	2o	p
353	0	3	3	2o	2o	2o	p
353	1	1	2	1o	1o	0	-
353	0	3	3	3	3	2o	-
353	1	3	3	3	3	1o	p

353	0	2	3	3	3o	2o	p
353	0	3	3	3	3	2o	p
354	0	1	2	2	2p	2o	-
354	0	1	2	1o	1	1o	-
354	0	1	2	1o	1	1o	-
354	0	1	1	1po	1o	1o	-
355	2	3	3	3o	3	2o	p
355	0	1	2	2o	2po	1o	-
355	2	3	3	3po	3po	2o	p
356	1	2	3	3o	3o	1o	p
356	1	2	2	2po	2po	1o	p
358	1	3	3	3	3o	2o	p
358	1	2	3	3	3o	2o	p
358	0	1	3	3o	3o	2o	p
358	1	3	3	3	3p	2o	p
358	1	2	3	3o	3o	2o	-
358	1	3	3	3o	3o	2o	p
358	1	3	3	3o	3po	1o	p
358	1	3	3	3	3o	2o	p
358	x	x	x	x	x	x	x
358	1	3	3	3o	3o	2o	p
358	1	3	3	3	3	2o	p
359	1	3	3	3o	3po	2o	p
359	2	2	3	3o	3o	2o	p
359	1	3	3	3	3o	1o	p
359	2	3	3	3o	3o	2o	p
359	1	2	2	3	3po	2o	-
359	2	3	3	3o	3o	2o	p
361	0	1	2	2	2p	2o	-
361	0	1	3	3o	2o	1o	p
361	0	1	1	1	1op	1o	-
361	0	0	0	0	0	0	-
363	0	1	2	2o	2o	1o	-
363	1	2	3	3o	2po	1o	p
363	1	2	3	3o	2po	1o	p
363	2	2	3	2o	2o	1o	p
364	2	3	3	3o	3o	1o	p
365	0	1	1	1	1o	1o	-
365	0	1	2	2po	2o	1o	-
365	0	1	1	1o	1	1o	-
365	0	1	1	1o	1o	1o	-
366	2	2	3	3	3	2o	-
366	0	2	2	2	2	1o	-
366	1	2	3	3	2o	2o	p
366	1	2	3	2o	2o	1o	p
366	0	2	2	2	2po	2o	-
367	0	1	1	2	2p	2o	-
367	0	0	0	1	1	0	-
367	0	0	0	1	1po	1o	-
367	0	0	1	1	2po	2o	-
367	0	0	1	1	2	2o	-

367	0	0	1	1	2	2o	-
367	0	0	0	0	1	0	-
367	0	0	1	1	2p	1o	-
367	0	0	2	2	2po	1o	-
368	1	3	3	3o	3o	2o	p
369	0	2	3	3o	3po	2o	p
369	0	1	2	2o	2o	1o	-
370	0	0	1	2	2p	2o	-
370	0	1	2	2	3p	3o	p
370	0	0	1	1	1po	1o	-
371	0	1	2	2o	2o	1o	p
372	2	2	2	2o	2o	1o	-
372	3	2	2	3o	2o	1o	p
372	2	2	2	2o	2o	1o	-
372	2	2	2	3o	2o	1o	p
372	2	2	2	2o	2o	1o	-
372	2	2	2	2o	2o	0	-
372	2	2	2	1o	1o	0	-
372	3	3	3	2o	2o	0	p
372	2	2	2	3o	1o	0	-
372	1	1	1	1o	1o	0	-
372	2	2	2	2o	2o	1o	-
372	1	2	2	2o	1o	1o	-
372	2	2	2	2o	2o	1o	-
372	2	2	2	2o	2o	1o	-
372	1	1	2	1o	1o	0	-
373	2	3	3	3	3o	2o	-
373	2	3	3	3	3o	2o	p
373	2	3	3	3p	3	1o	p
373	1	3	3	3o	3o	2o	p
373	2	3	3	3o	3o	2o	p
373	2	3	3	3	3o	2o	p
373	1	3	3	3o	3o	2o	p
373	1	3	3	3o	3o	2o	p
373	1	3	3	3o	3o	2o	p
373	1	3	3	3o	3o	2o	p
373	1	3	3	3o	3o	2o	p
373	2	3	3	3o	3o	2o	p
373	0	3	3	3	3	2o	-
373	1	3	3	3o	3o	2o	p
373	0	3	3	3	3	2o	p
373	1	3	3	3o	3o	2o	p
374	1	2	3	3o	3po	2o	p
374	1	2	3	3	3o	2o	-
374	0	1	3	3	2po	1o	p
374	1	2	3	3	2po	1o	p
374	1	3	3	3po	3po	2o	p
374	1	2	2	2	2po	1o	p
374	0	1	2	2	2po	2o	-
375	1	2	3	3o	3o	1o	p

375	0	2	3	3	3	2o	p
376	0	2	3	3po	3po	2o	p
377	0	0	1	1o	1o	1o	-
377	0	1	2	3po	3po	2o	p
378	0	1	2	3	3p	2o	-
378	1	2	3	3	3po	2o	p
379	1	1	2	2	2po	1o	p
379	1	2	2	2o	2o	1o	-
380	0	1	1	1po	1o	1o	-
380	0	1	2	3o	2o	1o	-
380	0	0	1	2	1po	1o	p
381	0	2	3	3o	3o	2o	p
382	1	1	2	2	1o	1o	-
383	3	3	3	3o	3o	1o	p
383	2	3	3	3o	3o	1o	-
384	0	2	3	3o	3o	2o	-
384	0	2	3	2o	2o	1o	p
385	1	3	3	3o	3o	1o	-
386	0	2	2	2o	2o	1o	-
387	1	2	3	3o	3o	1o	p
388	3	3	3	3o	3o	1o	-
388	2	3	3	3	3o	1o	p
388	3	3	3	3o	3o	1o	p
388	2	3	3	3	3o	1o	p
388	2	3	3	3o	3o	1o	p
388	2	2	3	3o	2o	1o	p
389	1	2	2	3o	2o	1o	-
389	1	2	2	3o	2o	1o	-
389	0	2	1	2o	2o	1o	-
389	0	2	2	3o	2o	1o	-
389	1	1	2	2	1po	1o	-
389	0	2	2	2o	2o	1o	-
389	1	2	2	2o	2o	1o	p
389	1	2	2	3o	2o	1o	-
389	0	1	2	2o	2o	1o	-
389	1	2	3	3o	2o	1o	p
389	0	1	1	2o	2o	1o	p
389	0	1	1	3	2o	1o	-
389	1	2	2	2o	2o	1o	p
389	0	2	2	2o	2o	1o	-
389	0	1	2	1o	1o	0	-
389	0	2	2	2o	2o	1o	-
389	0	1	2	2	2o	1o	-
390	1	2	3	3o	2o	1o	-
390	1	3	3	3o	3o	1o	p
391	0	1	3	2o	2o	0	-
391	0	1	1	1o	2o	1o	-
391	0	0	1	2o	1po	1o	-
391	0	1	3	3o	3o	2o	-
392	1	1	1	1o	1o	0	-
392	0	0	0	0	0	0	-

392	0	0	0	0	0	0	-
392	1	1	1	1	1o	0	-
392	0	1	1	1o	1o	0	-
393	0	1	1	1o	1o	0	-
393	0	0	0	0	0	0	-
393	1	1	1	1o	1o	0	-
393	0	0	0	0	0	0	-
393	0	1	1	1o	1o	0	-
393	0	1	1	1o	1o	0	-
393	1	1	1	1o	1o	0	p
393	0	2	3	3	3o	2o	p
393	0	1	1	1o	1o	0	-
393	0	1	1	1	1	0	-
393	1	1	1	1o	1o	0	-
393	0	0	0	0	0	0	-
393	0	0	0	0	0	0	-
393	0	1	1	1o	1o	0	-
394	1	1	1	1o	1o	0	-
394	0	1	1	1	1o	0	-
394	1	1	3	1o	1o	0	-
394	1	1	1	1o	1o	0	-
394	1	1	1	1o	1o	0	-
394	1	1	1	1o	1o	0	-
394	0	1	0	1	1o	0	-
394	1	1	1	1o	1o	0	-
394	1	1	1	1o	1o	0	-
394	0	1	1	1o	1o	0	-
394	0	1	2	1o	1o	0	-
394	0	1	2	1o	1o	0	-
395	1	1	1	1o	0	0	-
395	1	1	1	1o	1o	0	-
395	0	1	1	1o	1o	0	-
395	0	1	1	1o	1o	0	-
395	2	2	2	2o	2o	1o	p
395	2	2	2	1o	1o	0	-
395	0	0	0	0	0	0	-
395	0	0	0	0	0	0	-
395	0	1	1	1o	1o	0	-
395	1	1	1	1o	1o	0	-
395	1	1	1	1o	1o	0	-
395	0	1	1	1o	1o	0	-
396	0	1	0o	0	0	0	-
396	1	1	1	1	1o	0	-
396	0	1	1	1o	1o	0	-
396	1	1	1	1o	0o	0	-
396	0	1	1	1o	1o	0	-
396	1	1	2	1o	1o	0	-
396	0	1	1	1o	1o	0	-
396	1	1	2	1o	1o	0	-
396	0	0	0	0	0	0	-
396	0	0	0	0	0	0	-
397	1	1	1	1o	1o	0	-

397	0	1	1	1o	1o	0	-
397	1	1	2	1o	1o	0	-
397	1	1	1	1o	1o	0	-
397	1	1	1	2o	1o	1o	-
397	1	1	2	1o	1o	0	-
397	1	1	1	1o	1o	0	p
397	0	1	2	1o	1o	0	-
397	0	1	1	1o	1o	0	-
397	0	0	1	0o	0	0	-
397	0	1	1	1	1o	0	-
397	0	0	0	0	0	0	-
398	1	1	1	1o	1o	0	p
398	0	0	1	0o	0	0	-
398	1	1	1	1o	0	0	-
398	0	0	0	0	0	0	-
398	1	1	1	1o	1o	0	-
398	1	1	1	1o	1o	0	-
398	1	1	1	1o	1o	0	-
398	0	1	1	1o	0	0	-
PO1	2	3	3	3o	3o	1o	p
PO2	2	3	3	3o	3o	1o	p
PO3	1	2	3	2o	2o	1o	-
PO4	0	0	2	2o	2o	1o	-

Příloha 5: Multiplex A - genotyp

multiplex A																
klon	UCD_CH31		PS12A02		UDP98_412		EMPaS10		EMPaS11		EMPaS02		UCD_CH18		UCD_CH11	
336	126	126	157	165	121	125	168	168	76	76	144	146	189	189	144	157
337	126	126	161	165	113	127	160	160	76	86	140	142	189	189	153	157
338	126	126	157	163	125	133	154	154	76	76	144	146	189	189	144	157
339	132	132	161	161	113	125	154	168	76	76	142	146	189	189	144	157
340	132	132	161	161	113	125	154	168	76	76	142	146	189	189	144	157
341	132	144	159	163	119	125	168	168	76	104	146	146	189	189	153	157
342	132	144	159	163	119	125	168	168	76	104	146	146	189	189	153	157
343	132	144	161	167	125	125	168	186	76	104	146	146	179	189	144	157
344	132	144	157	161	121	125	186	184	104	104	136	146	189	189	157	157
345	132	132	161	177	125	125	168	168	76	76	146	146	189	189	157	157
346	126	132	157	157	119	125	168	186	104	104	134	146	189	189	157	157
347	126	132	161	163	125	125	168	186	66	76	136	146	189	189	157	167
348	126	126	157	167	119	125	168	186	66	104	134	146	187	189	157	157
349	126	144	157	167	119	133	168	186	104	104	134	144	187	189	157	157
350	126	132	157	167	119	133	168	186	104	104	146	146	189	189	157	157
351	126	132	161	161	119	125	154	154	104	104	136	146	179	189	153	157
351	126	132	161	177	119	119	168	186	66	86	146	146	179	189	144	157
352	132	134	161	167	125	125	160	168	66	76	136	136	189	189	153	157
353	134	144	157	167	125	125	160	168	66	76	140	144	189	189	155	157
354	126	126	163	177	119	125	154	168	76	76	146	146	189	189	157	157
355	132	142	161	163	119	119	160	168	66	76	144	146	189	189	157	167
356	126	126	157	159	119	125	160	168	86	104	144	146	179	179	157	157
358	132	132	161	167	119	119	154	170	66	76	136	136	179	189	157	157
359	136	144	157	161	113	119	154	168	66	76	146	146	189	189	157	157
361	126	144	161	161	119	125	168	168	76	86	146	146	179	189	144	153
363	126	144	157	171	119	125	168	184	76	76	146	146	189	189	144	153
364	126	144	157	171	119	125	168	184	76	76	146	146	189	189	144	153
365	136	144	159	163	113	133	160	168	76	76	136	146	189	189	157	157
366	126	132	157	167	119	125	168	186	76	104	142	146	189	189	155	157
367	126	126	157	157	113	119	154	168	76	76	144	146	189	189	157	157
368	126	126	157	165	121	121	154	154	76	86	136	146	187	189	151	151
369	132	144	161	161	119	125	168	168	66	76	146	146	179	189	153	167
370	126	132	161	161	119	121	168	168	66	76	146	146	189	189	153	157
371	126	126	161	161	121	121	168	168	76	104	136	142	189	189	144	157
372	132	132	161	161	119	121	160	168	66	104	142	146	183	189	155	157
373	126	126	163	167	113	121	160	168	76	86	144	146	179	179	157	161
374	132	134	161	161	113	133	154	186	76	76	136	136	183	189	157	157
375	126	126	175	177	121	125	154	168	66	66	144	146	189	189	153	157
376	126	126	175	177	121	125	154	168	66	66	144	146	189	189	153	157
377	126	126	175	177	121	125	154	168	66	66	144	146	189	189	153	157
378	136	136	161	179	119	119	154	156	76	104	146	146	179	189	153	167
379	126	132	161	165	113	121	154	154	66	76	140	140	183	187	157	157
379	126	132	161	165	113	121	154	154	66	76	140	140	183	187	157	157
380	126	126	161	165	121	125	154	168	76	76	136	136	189	189	151	155
381	126	136	157	161	113	113	154	168	76	104	144	146	189	189	157	157
382	126	132	161	161	119	121	154	168	76	86	142	144	179	189	157	157
383	126	136	157	165	113	113	154	160	66	76	142	146	187	189	153	157

384	124	126	161	175	119	125	154	154	66	76	140	148	179	183	153	157
385	126	126	157	177	113	121	154	160	76	76	140	148	187	189	148	155
386	126	132	157	177	113	119	154	160	76	76	140	146	189	189	155	157
387	126	132	157	177	113	119	154	160	76	76	140	146	189	189	155	157
388	126	132	157	159	119	121	154	154	76	76	146	146	183	189	155	157
389	126	126	157	177	119	121	154	160	76	76	140	146	183	189	153	157
390	126	132	157	177	113	119	154	160	76	76	140	146	189	189	155	157
391	126	132	161	165	119	121	154	154	66	86	140	142	183	189	148	153
392	126	126	161	179	119	119	168	168	76	104	142	146	189	189	153	157
393	126	126	161	179	119	119	168	168	76	104	142	146	189	189	153	157
394	126	126	161	179	119	119	168	168	76	104	142	146	189	189	153	157
395	126	126	161	179	119	119	168	168	76	104	142	146	189	189	153	157
396	126	126	161	179	119	119	168	168	76	104	142	146	189	189	153	157
397	126	126	161	179	119	119	168	168	76	104	142	146	189	189	153	157
398	126	126	161	179	119	119	168	168	76	104	142	146	189	189	153	157

Příloha 6: Multiplex B - genotyp

multiplex B														
klon	UDP98_021	EMPaS06	UCD_CH21	EMPaS05	EMPaS12	UCD_CH17	BPPCT_034							
336	99	114	206	222	108	108	164	172	124	140	186	208	223	225
337	101	110	206	222	106	108	164	172	138	140	186	188	233	257
338	99	99	222	222	106	112	164	172	138	148	188	203	235	257
339	99	114	222	206	108	116	164	170	146	148	186	188	225	257
340	99	114	222	222	108	116	164	170	146	148	186	188	225	257
341	99	114	206	206	112	118	164	170	138	140	188	188	225	243
342	99	114	206	206	112	118	164	170	138	140	188	188	225	243
343	99	114	206	206	108	108	162	164	140	140	188	188	235	257
344	99	114	206	222	108	116	162	170	140	146	186	186	243	257
345	99	99	206	206	108	108	164	164	138	140	188	188	243	243
346	110	114	206	222	106	108	164	172	140	140	186	188	243	257
347	99	101	206	222	108	108	164	164	138	146	186	188	235	243
348	110	114	206	220	106	116	170	172	140	146	188	188	235	257
349	99	114	220	222	106	108	170	170	140	146	186	188	235	235
350	99	114	206	222	108	108	172	172	140	140	188	205	257	257
351	101	114	204	206	108	112	162	170	138	148	188	188	243	243
351	99	110	204	206	108	108	164	170	140	148	188	188	223	233
352	110	114	206	222	108	112	162	172	138	146	188	188	225	257
353	99	99	206	222	108	112	164	172	146	150	188	205	221	223
354	99	110	206	206	108	116	170	170	140	148	188	188	233	257
355	99	99	206	206	112	112	162	172	140	146	188	188	235	243
356	110	114	204	206	108	118	162	164	138	138	188	202	225	229
358	99	99	204	206	108	108	162	172	124	140	188	194	243	257
359	114	114	206	206	106	108	164	170	146	148	188	188	235	243
361	99	114	204	222	108	116	170	170	138	140	186	205	223	257
363	110	114	206	206	106	106	162	170	124	140	188	205	243	257
364	110	114	206	206	106	106	162	170	124	140	188	205	243	257
365	114	114	206	222	108	108	164	172	124	140	188	193	225	257
366	101	110	206	206	108	108	162	164	138	140	188	205	235	243
367	99	110	206	206	108	112	164	172	140	140	188	188	225	243
368	99	110	220	222	110	110	170	170	138	146	188	208	225	233

369	99	114	206	206	108	108	164	164	138	140	188	205	221	235
370	99	114	222	222	108	112	162	172	124	140	188	205	257	257
371	110	114	206	222	106	108	162	170	140	148	188	188	223	243
372	99	110	206	208	108	118	162	172	138	140	188	208	223	243
373	99	114	204	204	108	108	164	170	138	140	188	205	223	243
374	99	99	208	222	106	108	170	172	140	140	188	205	223	225
375	99	110	206	206	108	108	162	170	124	140	188	188	233	233
376	99	110	206	206	108	108	162	170	124	140	188	188	233	233
377	99	110	206	206	108	108	162	170	124	140	188	188	233	233
378	110	114	204	208	108	112	164	164	124	140	188	205	243	243
379	99	99	208	220	108	110	164	172	138	140	188	188	233	233
379	99	99	208	220	108	110	164	172	138	140	188	188	233	233
380	99	99	206	222	108	110	172	172	124	140	186	188	223	225
381	99	99	206	222	108	108	172	172	138	148	188	188	223	229
382	99	110	204	222	108	110	164	172	140	148	188	205	223	243
383	99	101	206	220	108	112	164	172	140	140	188	188	235	243
384	99	101	204	208	108	118	164	172	124	140	205	208	243	243
385	99	101	220	224	112	118	164	164	140	146	186	191	233	257
386	99	101	222	224	110	112	164	164	140	140	186	188	233	235
387	99	101	222	224	110	112	164	164	140	140	186	188	233	235
388	99	99	208	224	108	110	164	170	140	148	186	208	233	243
389	99	114	208	222	106	112	164	170	140	148	186	188	235	243
390	99	101	222	224	110	112	164	164	140	140	186	188	233	235
391	99	110	206	208	108	108	172	172	140	140	188	202	243	257
392	99	101	206	206	108	108	162	164	138	140	188	188	257	257
393	99	101	206	206	108	108	162	164	138	140	188	188	257	257
394	99	101	206	206	108	108	162	164	138	140	188	188	257	257
395	99	101	206	206	108	108	162	164	138	140	188	188	257	257
396	99	101	206	206	108	108	162	164	138	140	188	188	257	257
397	99	101	206	206	108	108	162	164	138	140	188	188	257	257
398	99	101	206	206	108	108	162	164	138	140	188	188	257	257

Příloha 7: Multiplex C - genotyp

multiplex C											
klon	BPPCT_040	UDP97_403	PceGA34	UDP98_411	UCD_CH12						
336	135	135	124	146	143	165	163	167	178	178	
337	121	131	122	122	143	165	167	169	184	200	
338	131	135	130	130	137	143	155	167	178	178	
339	121	135	124	144	135	161	155	167	182	182	
340	121	135	124	144	135	161	155	167	182	182	
341	131	135	124	126	131	137	167	169	194	196	
342	131	135	124	126	131	137	167	169	194	196	
343	135	135	122	122	143	161	167	169	178	198	
344	121	135	122	146	135	143	169	169	184	198	
345	135	135	130	130	159	161	167	169	184	198	
346	121	135	122	146	143	143	155	167	178	200	
347	121	135	130	130	143	161	167	167	198	200	
348	121	135	122	124	135	143	167	169	184	200	
349	121	121	126	146	143	143	155	169	178	200	

350	135	135	122	122	143	167	169	169	178	178
351	135	145	122	124	137	155	155	169	178	178
351	131	135	122	122	143	153	167	169	178	178
352	131	135	126	146	135	143	167	169	178	200
353	131	131	124	146	143	143	167	169	198	200
354	131	135	122	126	135	143	167	169	178	198
355	135	143	122	122	137	137	169	169	178	184
356	131	131	122	124	143	155	167	169	178	196
358	131	135	146	146	143	143	167	169	178	200
359	121	131	122	146	143	161	155	167	184	200
361	121	137	122	124	135	153	155	167	182	200
363	121	131	124	146	143	143	155	167	178	182
364	121	131	124	146	143	143	155	167	178	182
365	121	131	124	144	151	161	155	169	190	200
366	121	131	120	124	143	153	155	167	178	196
367	131	135	124	146	137	161	155	169	200	200
368	129	147	126	142	143	145	155	163	178	192
369	121	131	124	148	143	167	155	167	184	198
370	131	135	122	146	137	157	167	169	178	178
371	131	135	122	124	143	153	155	167	178	184
372	131	137	122	124	143	155	167	167	178	200
373	131	145	124	126	129	163	155	155	178	200
374	131	137	122	126	143	143	167	167	178	200
375	131	131	122	142	143	153	155	169	184	196
376	131	131	122	142	143	153	155	169	184	196
377	131	131	122	142	143	153	155	169	184	196
378	131	137	122	122	137	159	155	167	184	198
379	129	137	142	146	143	143	167	167	178	200
379	121	131	124	124	0	0	155	165	0	0
380	129	131	142	142	145	161	155	167	178	178
381	121	135	122	124	143	143	163	167	178	196
382	135	137	122	126	145	161	155	155	178	200
383	129	131	122	126	137	145	155	165	196	200
384	129	135	124	142	143	155	169	169	178	184
385	121	131	122	146	137	153	163	167	178	182
386	131	135	122	142	137	145	155	167	178	178
387	131	135	122	142	137	145	155	167	178	178
388	129	131	122	142	143	145	167	169	178	178
389	129	135	122	122	137	143	155	169	178	184
390	131	135	122	142	137	145	155	167	178	178
391	135	137	122	142	165	165	163	167	196	200
392	131	131	126	126	153	153	167	167	178	196
393	131	131	126	126	153	153	167	169	178	196
394	131	131	126	126	153	153	167	169	178	196
395	131	131	126	126	153	153	167	167	178	196
396	131	131	126	126	153	153	167	167	178	196
397	131	131	126	126	153	153	167	167	178	196
398	131	131	126	126	153	153	167	167	178	196

Příloha 8: Multiplex D - genotyp

multiplex D								
Klon	UCD_CH15		EMPaS14		UCD_CH14		EMPaS01	
336	93	95	197	199	144	150	231	233
337	93	95	197	211	144	144	229	233
338	95	95	197	197	150	150	229	233
339	95	95	197	211	150	150	0	0
340	95	95	197	211	150	150	0	0
341	93	93	197	199	150	150	0	0
342	93	93	197	199	150	150	0	0
343	93	97	197	197	150	150	231	233
344	93	95	197	211	144	150	231	231
345	93	93	197	197	144	150	233	239
346	93	95	197	211	144	150	231	231
347	93	95	197	197	144	144	233	233
348	93	95	197	197	144	144	231	231
349	95	95	197	197	144	150	229	231
350	93	95	197	211	144	150	229	231
351	93	95	197	211	144	150	229	239
351	93	97	197	199	144	150	229	229
352	93	95	197	211	144	150	229	229
353	93	93	197	211	144	144	229	229
354	93	93	211	211	144	150	223	233
355	93	93	197	197	150	150	229	229
356	95	97	199	199	144	150	233	233
358	93	97	197	199	150	150	229	229
359	93	93	197	211	144	150	223	229
361	95	97	197	199	144	144	231	235
363	93	93	197	211	150	150	229	233
364	93	93	197	211	150	150	229	233
365	93	95	197	211	150	150	229	233
366	93	93	197	197	150	150	233	233
367	93	93	197	197	144	150	233	233
368	95	95	197	197	144	150	229	233
369	93	93	197	211	150	150	229	233
370	95	95	197	211	150	150	233	233
371	93	95	199	199	144	150	229	233
372	93	95	197	197	150	150	223	229
373	97	97	197	199	150	150	223	233
374	95	95	197	197	150	150	233	233
375	93	93	197	197	150	150	229	233
376	93	93	197	197	150	150	229	233
377	93	93	197	197	150	150	229	233
378	93	97	197	197	150	150	233	233
379	95	95	197	211	144	144	233	233
379	95	95	197	211	144	144	233	233
380	93	95	197	197	150	150	0	0
381	93	95	199	211	150	150	229	229
382	95	97	197	197	144	144	229	233
383	93	95	197	199	150	150	223	233
384	95	95	199	211	144	150	229	233

385	95	95	197	211	144	150	233	233
386	95	95	211	211	150	150	231	233
387	95	95	211	211	150	150	231	233
388	95	95	197	211	144	150	233	233
389	95	95	197	211	144	150	231	233
390	95	95	211	211	150	150	231	233
391	0	0	0	0	0	0	0	0
392	93	93	197	211	144	150	229	229
393	93	93	197	211	144	150	229	229
394	93	93	197	211	144	150	229	229
395	93	93	197	211	144	150	229	229
396	93	93	197	211	144	150	229	229
397	93	93	197	211	144	150	229	229
398	93	93	197	211	144	150	229	229

Příloha 9: Efektivní počet klonů – plody
1 – klony, jejichž nadpoloviční většina ramet plodila

klon	počet ramet	plodící ramety	evidence	SSRs	S-lokus
336	5	5	1	1	1
337	2	1	1	1	
338	1	1	1		1
339	18	14	1	1	1
340	3	3	1		
341	3	0			
342	3	0			
343	2	1	1	1	1
344	10	6	1	1	1
345	8	4	1	1	
346	2	2	1	1	1
347	1	1	1	1	1
348	2	1	1	1	1
349	2	1	1	1	
350	2	1	1	1	
351	2	2	1	1	
352	4	0			
353	13	8	1	1	
354	4	0			
355	3	2	1	1	1
356	2	2	1	1	
358	10	9	1	1	
359	6	5	1	1	1
361	4	1			
363	4	3	1	1	
364	1	1	1		

365	4	0			
366	5	2			
367	9	0			
368	1	1	1	1	1
369	2	1	1	1	
370	3	1			
371	1	1	1	1	
372	14	3			
373	18	15	1	1	
374	7	5	1	1	1
375	2	2	1	1	1
376	1	1	1		
377	2	1	1		
378	2	1	1	1	
379	2	1	1	1	
380	3	1			
381	1	1	1	1	
382	1	0			
383	2	1	1	1	1
384	2	1	1	1	
385	1	0			
386	1	0		1	
387	1	1	1		
388	6	5	1	1	
389	17	4			
390	2	1	1		
391	4	0			
392	5	0			
393	14	2			
394	12	0			
395	12	1			
396	10	0			
397	12	1			
398	8	1			
			37	31	14