

**Česká zemědělská univerzita v Praze**



**Fakulta lesnická a dřevařská**

**Katedra genetiky a fyziologie šlechtění dřevin**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Využití molekulárních markerů k rekonstrukci rodokmene  
polosesterských potomstev třešně ptačí**

Bc. Michaela Jirková

Obor: Lesní inženýrství

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

Praha 2017

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Michaela Jirková

Lesní inženýrství

### Název práce

Využití molekulárních markerů k rekonstrukci rodokmene polosesterských potomstev třešně ptačí

### Název anglicky

Use of molecular markers for pedigree reconstruction of wild cherry half-sib progenies

---

### Cíle práce

Cílem práce je s využitím mikrosatelitových markerů provést rekonstrukci rodokmene jedinců třešně ptačí (*Prunus avium* L.) pěstovaných pro potřeby založení výsadby polosesterských potomstev, tj. ověřit evidenční příslušnost matky a dohledat otce mezi klony zastoupenými v semenném sadu, případně odhalit paternální gametickou kontaminaci.

Technicky tedy dojde k převodu jedinců polosesterského potomstva na potomstvo plnosesterské. Znalost rodokmene bude v budoucnu dále využívána při genetické evaluaci jedinců založeného potomstva a umožní významné urychlení celého šlechtitelského cyklu.

### Metodika

Bude proveden literární rozbor zaměřený na problematiku rekonstrukce rodokmene pomocí molekulárních markerů a rozebrána teorie šlechtitelského cyklu se zaměřením na testy potomstev.

Studie bude provedena na materiálu ze semenného sadu třešně ptačí Obrovice, vlastník VLS s.p. (rodičovská populace) a sazenic vypěstovaných z těchto jedinců pro potřeby založení polosesterského testu potomstev v lesní školce Lhota.

V rámci vlastní výzkumné části bude proveden sběr vzorků, a to všech klonů rodičovské populace a cca 200 jedinců z potomstva evidenčně rovnoměrně příslušných mateřským klonům. Následně bude izolována DNA, provedena mikrosatelitová analýza na min. 10 polymorfních lokusech a realizována rekonstrukce rodokmene (software Cervus). Zjištění budou vhodně interpretována a struktura potomstva bude podrobně popsána.

Doporučený rozsah práce  
cca 70 str. včetně tabulek a grafů

Klíčová slova

DNA markery, rekonstrukce rodokmene, kontaminace, třešeň ptačí

---

Doporučené zdroje informací

- Blouin MS. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 503-511.
- Jarne P, Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 424-429.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Kato S, Matsumoto A, Yoshimura K, et al. 2012. Clone identification in Japanese flowering cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) cultivars using nuclear SSR markers. *Breeding Science*. 2012;62(3):248-255.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655
- Metzenberg S. 2007. Working with DNA. Taylor and Francis Group, Abingdon, UK.
- White TL, Adams WT, Neale DB. 2007. Forest genetics. CABI Publishers, Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA.

---

Předběžný termín obhajoby  
2016/17 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, Ph.D.  
Děkan

V Praze dne 10. 04. 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma: „Využití molekulárních markerů k rekonstrukci rodokmene polosesterských potomstev třešně ptačí“, jsem vypracovala samostatně. Veškeré použité zdroje jsou uvedeny v seznamu citovaných zdrojů.

V Praze 20. dubna 2017

### **Poděkování**

Nejprve bych chtěla poděkovat mému vedoucímu práce panu Ing. Jiřímu Koreckému Ph.D. za odborné vedení a pomoc při zpracování této diplomové práce. Dále také Mgr. Janu Bílému Ph.D, za ochotu a cenné rady při zpracování dat k této práci.

## Obsah

1	Úvod.....	11
2	Cíl.....	12
3	Literární rešerše.....	13
3.1	Třešeň ptačí ( <i>Prunus avium L.</i> ).....	13
3.1.1	Morfologie.....	13
3.1.2	Ekologie.....	14
3.1.3	Třešeň v České republice.....	14
3.1.4	Rozšíření.....	14
3.1.5	Využití.....	15
3.2	Šlechtění lesních dřevin.....	16
3.2.1	Šlechtitelský cyklus.....	16
3.2.2	Šlechtitelské metody.....	17
3.2.3	Šlechtění třešně ptačí.....	17
3.3	Semenné sady.....	18
3.3.1	Breeding without Breeding.....	19
3.4	Genetické markery.....	20
3.4.1	Morfologické markery.....	21
3.4.2	Biochemické markery.....	21
3.4.3	Molekulární markery.....	22
3.4.4	Porovnání markerů.....	23
3.5	Rekonstrukce rodokmene.....	25
3.5.1	Kategorie vztahu a IBD koeficienty.....	26
3.6	PCR.....	27
3.6.1	Multiplexová reakce PCR.....	27
3.7	Softwary pro analýzu dat.....	27
3.7.1	GeneMarker.....	27
3.7.2	Cervus.....	28
3.7.3	Alelové frekvenční analýzy, analýza rodičovství, předků a identity 31	
4	Metodika.....	33
4.1	Rostlinný materiál – divize Velichov.....	33
4.2	Semenný sad Obrovice.....	33
4.3	Pomůcky.....	34
4.4	Extrakce DNA.....	34

4.5	Průběh PCR .....	35
4.5.1	Analýza mikrosatelitových lokusů .....	35
5	Výsledky .....	36
5.1	Generování molekulárních dat .....	36
5.2	GeneMarker .....	41
5.3	Rekonstrukce rodokmene .....	42
5.4	Rekonstrukce rodokmene plnosesterských potomstev .....	46
5.5	Míra gametického příspěvku otců .....	50
5.5.1	Proporcionální porovnání ramet v semenném sadu .....	52
6	Diskuse .....	53
7	Závěr .....	56
8	Zdroje .....	57
9	Přílohy .....	64

## Seznam obrázků, grafů, tabulek a příloh

Obrázek 1- šlechtitelský cyklus .....	16
Obrázek 2 - GeneMarker .....	41
Graf 1 - míra gametických příspěvků otců.....	50
Graf 2- míra gametických příspěvků obou rodičů .....	51
Graf 3- korelace počtu ramet s množstvím gametických příspěvků otců .....	52
Tabulka 1- porovnání výhod mikrosatelitů .....	23
Tabulka 2- fluorescenčně značené primery byly rozděleny do multiplexových reakcí .....	37
Tabulka 3- alelová frekvenční analýza .....	43
Tabulka 4- procentické nalezení jedince dle genotypu .....	44
Tabulka 5 - výsledná tabulka rodokmene .....	47
Příloha 1-zastoupení genotypových délek amplifikací v jednotlivých lokusech .....	64
Příloha 2- fotografie z laboratoře, autor: Jirková Michaela .....	71
Příloha 3 - rozmístění ramet klonů v sadu Obrovice.....	73
Příloha 4- fotografie porostů Velichov .....	74
Příloha 5- ukázky genotypů potomků a rodičů pozn.: (každý klon testován na 16 lokusech, rozděleno do 2 tabulek po 8 lokusech).....	75
Příloha 6- mapa geologického umístění lesní školky Lhota .....	78
Příloha 7- ukázka průměrné koncentrace klonů.....	79



## Abstrakt

Cílem práce bylo s využitím mikrosatelitových markerů provést rekonstrukci rodokmene jedinců třešně ptačí (*Prunus avium* L.) pěstovaných pro potřeby založení výsadby polosesterských potomstev, tj. ověřit evidenční příslušnost matky a dohledat otce mezi klony zastoupenými v semenném sadu, případně odhalit paternální gametickou kontaminaci. Technicky došlo k převodu jedinců polosesterského potomstva na potomstvo plnosesterské.

V rešeršní části byl proveden literární rozbor zaměřený na problematiku rekonstrukce rodokmene pomocí molekulárních markerů a rozebrána teorie šlechtitelského cyklu se zaměřením na testy potomstev, společně s popisem třešně ptačí jako druhu např. její morfologií, rozšíření či ekologií. Studie byla provedena na materiálu ze semenného sadu Obrovice, vlastník VLS s. p. (rodičovská populace) a sazenic vypěstovaných z těchto jedinců pro potřeby založení polosesterského testu potomstev v lesní školce Lhota. V rámci vlastní výzkumné části byl proveden sběr vzorků, a to všech klonů rodičovské populace a 268 jedinců z potomstva evidenčně rovnoměrně příslušných mateřským klonům. Následně byla izolována DNA, provedena mikrosatelitová analýza na 16 polymorfních lokusech a realizována genotypizace pomocí softwaru GeneMarker a následná rekonstrukce rodokmene v softwaru Cervus. Rekonstrukce rodokmene byla úspěšně realizována a získaná informace o otcovském gametickém příspěvku umožnila faktické převedení sazenic rozpěstovaných ve formě polosesterského potomstva tj. s evidencí mateřského jedince do plnosesterského potomstva, což je interpretováno v závěru. Znalost rodokmene bude v budoucnu dále využívána při genetické evaluaci jedinců založeného potomstva a umožní významné urychlení celého šlechtitelského cyklu, protože zde byla využita metoda Breeding with Breeding.

## Abstract

The aim of my master thesis was to reconstruct the pedigree of wild cherry (*Prunus avium L.*) half sib progeny using microsatellite markers. The cherries (*Prunus avium L.*) are grown for the purpose of establishing plantations half-sib progeny, to verify the registration of mother and traced his father between the clones represented in the seed orchards, or reveal paternal gamete contamination. Technically there is a transfer of individuals half-sib offspring to full-sib offspring.

Literary analysis was performed focusing on the issue of pedigree reconstruction using molecular markers and the theory of the breeding cycle focusing on offspring testing was incorporated. The study was conducted on material from the seed orchard Obrovce, owner VLS s. p. (Parental population) and seedlings grown from these individuals for the purpose of establishing half-sib offspring testing in the forest nursery Lhota. As part of their research were collected samples, all clones of parental populations and 268 individuals from the offspring recording evenly respective parent clones. Subsequently DNA was isolated. Microsatellite analysis was performed on 16 polymorphic loci and realized the pedigree reconstruction using software GeneMarker and software Cervus. Results are recorded at the end and progeny structure was described in detail. Pedigree knowledge will continue to be used in the future in genetic evaluation of individuals based offspring and enables significant acceleration of the whole of the breeding cycle.

# 1 Úvod

Třešeň ptačí (*Prunus avium L.*) je cenná listnatá dřevina, o kterou v posledních letech výrazně stoupá zájem. Kromě produkční funkce, půdotvorné funkce, estetické funkce a ekologické funkce, má třešeň ještě výraznou mimoprodukční funkci. Z kladných vlastností třeba poukázat na výborné mechanické vlastnosti dřeva, schopnost zvyšovat biodiverzitu a v neposlední řadě uplatnění pro potravinářský průmysl.

V mezinárodním evropském měřítku se šlechtěním třešně ptačí zabývají genetické výzkumné programy jako je například (Euforgen), jelikož v současné době je nedostatek kvalitního sadebního materiálu. Hlavním cílem těchto projektů je zachování genofondu, šlechtění třešně ptačí na vyšší produkci a kvalitu dřeva a na odolnost vůči biotickým škůdcům a abiotickým poškozením.

## 2 Cíl

Cílem diplomové práce je poskytnout v literární rešerši základní informace o třešni ptačí a jejím šlechtění nejen v České republice. Tato studie řeší převod jedinců polosesterského potomstva na plnosesterské potomstvo pomocí rekonstrukce rodokmene semenného sadu třešně ptačí Obrovice.

Za pomoci mikrosatelitových markerů provést rekonstrukci rodokmene jedinců třešně ptačí (*Prunus avium L.*) pěstovaných pro potřeby založení výsadby polosesterských potomstev, tj. ověřit evidenční příslušnost matky a dohledat otce mezi klony zastoupenými v semenném sadu, případně odhalit paternální gametickou kontaminaci. Znalost rodokmene bude v budoucnu dále využívána při genetické evaluaci jedinců založeného potomstva a umožní významné urychlení celého šlechtitelského cyklu.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.)

#### 3.1.1 Morfologie

Třešeň ptačí dorůstá až 35 metrů do výšky a tloušťky až 1 m. Dožívá se 150-200 let. Kmen v porostech bývá plnodřevný, dosti rovný s vysoko nasazenou korunou. Borka se odlupuje prstencovitě. Má příčné lenticely: ve stáří se podélně rozpukává. Kořenový systém je kúlový, později jde i do šířky, avšak k vývratům nedochází. Mladé větévky jsou silné, lesklé, červenohnědé, často i popelavé. Květy mají barvu bílou v období od dubna do května. Olistění hlavně na obvodu koruny a na podzim žloutnou, až červenají. Kořenová výmladnost kmenová je výraznější. Pupy jsou červenohnědé a často jich bývá více pohromadě, listové jsou zašpičatělé a jejich délka je 6-8 mm. Puppenové šupiny jsou zaokrouhlené a lepkavé (Musil, 2005). Podle (Stojecová & Kupka, 2009) je růst velmi rychlý až do 40 let, a začíná stárnout okolo 80 až 90 roku. Naproti tomu (Remeš, 2006) tvrdí, že je mylně zralá v 70-80 letech a její výškový přírůst kulminuje ve věku 7-12 let, kdy dosahuje 60-120 cm ročně.

Klíčivost semene (pecek) je vysoká, rychle však klesá. Semenáček má masité dělohy a první listy jsou podobné listům dospělé dřeviny. Třešeň se často obstojně roubuje. Třešeň podle (Stojecová & Kupka, 2009) začíná plodit ve věku 20 let. Oproti tomu podle Musila (2005) plodí už od 15 roku života každoročně, pokud není v zástínu. Přesná identifikace stávajících kultivarů třešní je nezbytná pro výběr genotypů ve šlechtitelských programech. Kromě toho je zapotřebí zjišťování a zachování efektivních metod pro charakterizaci drahocenných genofondů, které jsou stále přítomny ve východní Evropě a studovat variabilitu porostů roztroušených v Eurasii (Wünsch, 2002).

### 3.1.2 Ekologie

Třešni nevdí znečištěné městské prostředí. Není příliš odolná vůči větru, nepůsobí příznivě na zpevnění porostů a není vhodná do exponovaných poloh (Kobliha, Podrázský, 2001). Třešeň ptačí je světlomilná dřevina a zástin snáší jen slabší. Ve stínu nekvete a chřadne, a proto je nutné ji držet alespoň v hlavní úrovni. Je náročná na půdní vláhu. Nesnáší však záplavy, zabahněné půdy, ani půdy v létě vysychající. Spíše vyžaduje hlubší, živnější podklady, byť kamenité. Těžko snáší kyselé půdy, naopak velice dobře vápencové. Snáší kontinentální klima, ale květy bývají poškozovány pozdními mrazy. I ve znečištěném městském prostředí roste dobře (Musil, 2005).

Obecně se u třešni kořenový systém vyvíjí ve tvaru srdce a dalekosáhlé boční kořeny v nejvyšších půdních horizontech. V lehkých půdách kořenový systém dosahuje až do hloubky cca 3 m. Většina autorů doporučuje pěstovat třešeň ve směsi s jinými druhy. Několik autorů zveřejnilo své vynikající výsledky růstu třešně s *Fagus sylvatica*, *Sorbus torminalis* nebo jiných listnáčů, jako je *Quercus robur*, *dub zimní*, *Tilia* sp. (Stojecová & Kupka, 2009).

### 3.1.3 Třešeň v České republice

Třešeň je přirozeně rozšířená dosti hojně typu půdy T (glejové a chudé) a M (kyselá chudá). V oblasti suprakolinní (kopcovité) ve 200-550 m. n. m. až submontánní (vrchovinné) ve 450-800 m. n. m (Musil, 2003). Ekologická řada glejová je vymezena režimem půdní vody, pro který je charakteristické trvalé zamokření alespoň části půdního profilu podzemní vodou. Zaujímá většinou terénní poklesliny na plošinách a v pánvích a plochá dna údolí. Ekologická řada kyselá sdružuje stanoviště kyselých, živinami chudě až sotva průměrně zásobených půd. Půdy jsou většinou geneticky dobře vyvinuté, dobře provzdušněné (Vyslyšel, 2007).

### 3.1.4 Rozšíření

Rozšířena v Evropě, Malé Asii, na Kavkazu a ve Střední Asii. Hojně i mimo původní areál (Musil, 2005). Názory na původní areál výskytu třešně

ptačí se dělí na dva tábory. Jedni tvrdí, že je původu čistě evropského, druzí, že asijského. O naší třešni ptačí píše, že její původní areál se mohl rozkládat na jižní Moravě a do Čech se rozšířila až druhotně. Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) se pěstuje v mírných oblastech světa pro své jedlé plody. Třešně vznikli kolem Kaspického a Černého moře a v současné době se nalézají v celé kontinentální Evropě a v západních oblastech Asie. Myšlenka pěstování třešni se objevila v dobách Římské říše, i když nebyly vysazovány ve velké míře až do 16. století. Dobré šíření třešni a pěstování v celé západní Evropě, bylo pravděpodobně založeno na domestikaci divokých jedinců, které byly vhodně přizpůsobeny všem oblastem. Třešně začaly být komerčně využívány teprve před sto lety (Wünsch, 2002).

### 3.1.5 Využití

Dřevo je tvrdé, pevné a pružné. Výborně se leští. Má černobílou bělouš a červenavě hnědé jádro, jež je lesklé, pevné a má pěkný fládr (Mezera, 1989). Výborně využitelné jako náhrada za tropické dřeviny, jelikož s mořidlem napodobuje červenohnědý mahagon. Používá se na výrobu dřív pro nábytkářství, stolařství a řezbářství – i při výrobě drobných předmětů. Záliba v třešňovém nábytku však již v období biedermeieru v 1. pol. 19. století zřejmě spolupůsobila při redukci zastoupení třešně ptačí v porostech. V Evropě jsou v současné době zakládány třešňové plantáže (s ptáčnicí, var. *avium*) s předpokládaným pozdějším dřevařským využitím. V sadovnictví se používají okrasné kultivary. Hlavní význam třešně ptačí spočívá v ovocnářství, kde je známa celá řada kultivarů, odvozená ze tří výrazných skupin (Musil, 2005). Třešeň ptačí má také včelařská význam, je to medonosná dřevina. Její odrůdy jsou dobrými zdroji pylu a nektaru (Haragsim, 2004).

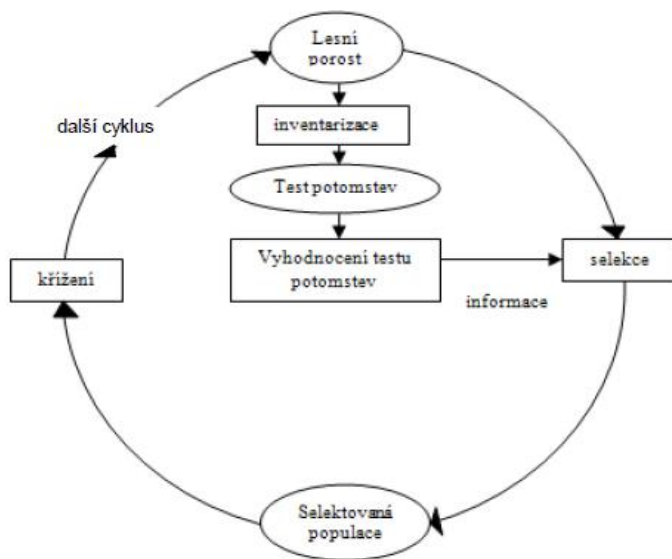
## 3.2 Šlechtění lesních dřevin

K cílům šlechtění patří zvýšení kvality (př. semena) a kvantity produkce (př. dřevní hmota). Dále pak také zvyšování odolnosti dřevin vůči biotickým (př. vítr) a abiotickým (př. hmyz) činitelům. Cílem, je genetický zisk, který je ovlivněn třemi základními faktory: intenzitou selekce, proměnlivostí znaku a iritabilitou (Lstibůrek, 2010). Šlechtění lesních dřevin 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). V 60. letech 20. století se začaly množit biotechnologické postupy tzv. neošlechtění – in vitro. 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).

### 3.2.1 Šlechtitelský cyklus

Šlechtitelské programy jsou navrhovány, aby rozvíjely a zdokonalovaly šlechtitelské cykly, využívané pro obnovu lesa za účelem zvýšení ekonomické a společenské hodnoty pěstovaných lesních porostů (White, 2007).

**Obrázek 1- šlechtitelský cyklus**



Zdroj: Namkoong, 1988



Lesním porostem dle výše uvedeného schématu se rozumí základní populace. Základní populace se v rámci šlechtitelského programu skládá ze všech dostupných jedinců (stromů), které mohou být selektovány (Zobel a Talbert, 1984). Selektovanou populací je v našem případě několik souborů rodičovských stromů dle jednotlivých dřevin vybraných na základě posouzení fenotypu. Dříve probíhal šlechtitelský cyklus na základě testu polosesterských potomstev díky tzv. volnému opylení, což bylo mnohonásobně levnější. Dnes již šlechtitelský cyklus lze urychlit a to přechodem ze semenných sadů první generace (kvalifikovaný zdroj) na semenné sady pokročilých generací (testovaný zdroj), (Lstibůrek, 2011).

### 3.2.2 Šlechtitelské metody

Metody lze rozdělit do dvou základních skupin:

- 1) šlechtění výběrem – selekce stromů individuální či hromadná
- 2) novošlechtění – hybridizace, mutační šlechtění či genetická manipulace.

V případě šlechtění výběrem, populaci dále generativně či vegetativně rozmnožíme. U neošlechtění již dochází ke zlepšení genetické variability. Dokonce k zisku nových dědičných vloh. Individuální výběr je takový, kdy se v populaci vyberou stromy na základě výjimečných fenotypových vlastností na splnění šlechtitelských cílů. Selektace výběrových stromů se uplatňuje v rámci zakládání semenných sadů a testů potomstev (Paule, 1992).

Hybridizace je generativní spojení dvou genotypově různých gamet při oplodnění (např. příbuzenské křížení). Náplní mutačního šlechtění je indukce mutačního procesu, tj. vznik dědičně podmíněných změn vlivem speciálního působení faktorů vnějšího i vnitřního prostředí (např. polyploidie). Genetická manipulace se dělí na tzv. přenos genetické informace prostřednictvím buněk a na vlastní genové inženýrství, kdy dochází k přenosu samotných genů (Paule, 1992).

### 3.2.3 Šlechtění třešně ptačí

Šlechtěním třešně ptačí od roku 1996, se zabývá Lesnická fakulta ČZU ve spolupráci s VÚLHM Jíloviště – Strnady, MZLU v Brně, Přírodovědeckou

fakultou UK v Praze a Ústavem experimentální botaniky AV ČR v Praze projektem na zdokonalení metod rozmnožování lesních dřevin v podobě in vitro (Chalupa, 2000). Autovegetativním způsobem rozmnožování (řízkováním) Ing. Čížková, PhD, Ing. Benedíková, Ing. Hynek, CSc. a RNDr. Buriánek (v rámci VÚLHM), prof. Ing. Kobliha, CSc. a Ing. Hajnala, PhD. (v rámci FLD ČZU). Jedním z největších objemů práce pro šlechtění této dřeviny byl dosud vykonán v rámci řešení šlechtitelské části projektu NAZV EP 7138 „Šlechtění a pěstování třešně ptačí (*Prunus avium* L.) v České republice. V tomto projektu bylo cílem šlechtění třešně na vysokou produkci a jakost dřeva pro obnovu lesa a zalesňování nelesních půd. Pomocí založení šlechtitelského programu (Kobliha, Podrázský, 2001), spočívajícím ve vytvoření výsadeb a ověřovacích testů. Cílem bylo získání poznatků o šlechtění, množení a pěstování třešně ptačí (Kobliha, Janeček 2001).

### 3.3 Semenné sady

Za doposud nejrozšířenější způsob šlechtění třešně ptačí je považováno zakládání semenných sadů. 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). Pro období 2014 – 2018 byl Ministrem zemědělství České republiky vyhlášen Národní program ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin podle paragrafu 2a zákona č. 149/2003 Sb., ve znění pozdějších předpisů, za účelem umožnit využívání genetických zdrojů lesních dřevin v souladu s potřebami lesního hospodáře a zásadami trvale udržitelného hospodaření v nich, monitoring genetických zdrojů lesních dřevin, zabezpečení evidence, vytvoření informační databáze, přispění k uchování a využívání genofondu a biodiverzity v globálním měřítku. Semenné sady mohou přispívat ke zvýšení produkce dřevní hmoty a produkovat dostatečné množství kvalitního osiva (Lindgren, 1998). Pro zvýšení lesní produkce je investice do založení semenného sadu ekonomicky nejvýhodnějším (Bilir et. al., 2008).

Semenné sady se také používají pro produkci osiva, které je vhodné pro konkrétní prostředí (PLO). Semenné sady jsou zakládány s předpokladem, že se jedná o uzavřené, panmiktické populace, a že nemají genetické ani jiné behaviorální omezení náhodného křížení, 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 & El-Kassaby, 2012).

Semenné sady lze rozdělit dle vyšlechtěných generací (první generace, pokročilých generací) nebo podle použitého druhu rostlinného materiálu (sazenice, klony), (Funda & El-Kassaby, 2012; White, 2007). LČR s. p. v současné době provozují 5 semenných sadů třešně ptačí (Troubky, Vlčí luka, Čejkovka, Vršavá a Motykov) a jeden semenný sad chtějí ještě založit. Vojenské lesy a statky s. p. provozují semenný sad Obrovice na LS Klášterec. Ostatní semenné sady třešně ptačí jsou soukromé (Bergmann, 2015).

### 3.3.1 Breeding without Breeding

Nová metoda testování plnosesterských potomstev, která využívá analýzu mikrosatelitů DNA ke kompletní rekonstrukci rodokmene pomocí zakládání semenných sadů pokročilých generací (Funda & El-Kassaby, 2012). Kombinací biometrie a molekulárně genetických metod vzniká nástroj pro metodiku, která je dnes ve světě označována jako BWB (Breeding without Breeding, Lstibůrek a El-Kassaby), navržená katedrou dendrologie a šlechtění lesních dřevin České zemědělské univerzity ve spolupráci s UBC (University of British Columbia) v Kanadě. Díky využití genových markerů dochází k urychlení celého procesu testování potomstev rodičovských stromů lesních dřevin a v návaznosti na to procesu zakládání semenných sadů vyšších generací a konkrétně také sadů 2. generace. Vzhledem ke zkrácení celého procesu řádově z 25 let na 5 let dojde k zásadním úsporám nákladů. Týká se to také skutečnosti, že nemusí být přistoupeno ke kontrolovanému opylování a nákladnému zakládání testů plnosesterských potomstev (Korecký, 2012).

Výběr elitních genotypů a následné zřízení semenných sadů usnadňuje genetické testování při šlechtění dřevin. Pro vytvoření strukturovaných rodokmenů je nezbytné vytvořit model postupného oplození dřevin (Ivanek, Novotný, & Josef, 2010). Zakládání semenných sadů 2. generace přinese ještě větší ekonomický efekt. V roce 2011 byla přijata certifikovaná metodika pro výpočet ekonomické efektivnosti semenných sadů (Kobliha, 2002). Příjmy přináší vlastní šlechtitelský proces, ale aplikace metodiky může významně zvýšit efektivnost šlechtění a tedy i finanční příjmy. Vyčíslení ve finančních jednotkách pochopitelně závisí na rozsahu šlechtitelského programu a řadě dalších vyjmenovaných parametrů programu (Češka, 2015). Pro šlechtitelský cyklus jsou stěžejní markery, které nesou určitý fenotypový znak a umožňují urychlení cyklu při správné selekci jedinců.

### 3.4 Genetické markery

Genetický marker je jakýkoli viditelný znak nebo fenotypově se jasně projevující znak, kterým lze alely na lokusu náhodně segregovat Mendelovským způsobem. Genetické markery popisují křížení jedinců, úroveň příbuzenského křížení a časovou a prostorovou variabilitu v rámci porostů. Popisují geografické vzory genetické variability, dokládají taxonomické a fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy. Hodnotí dopady domestikace včetně lesního hospodářství a genetické rozmanitosti. Díky markerům lze identifikovat populace a konstruovat genetické mapy. Mezi žádoucí vlastnosti markerů patří nízká cena pro vytvoření a jejich následné uplatnění. Dále pak vysoký stupeň polymorfismu, kodominance a schopnost testování napříč typy tkání v různých laboratořích (White, 2007).

Genetické markery jsou použity při základních výzkumech rostlin pro charakterizování rostlinné zárodečné plazmy, dále izolaci genu pro přenos genetické informace z jednoho druhu na další a pro ochranu odrůd (Andersen et. al. 2003). Genotyp rostlin může být studován pomocí genetických markerů, potažmo lze vytvořit rekonstrukci vztahů mezi rodiči a jejich potomky (tj. analýzou rodičovství). Gerber (2000) tvrdí, že otcovství nebo přiřazení původu může být dosaženo jakýmkoliv typem genetického markeru za předpokladu,

že je dostatečně polymorfní. Existuje více druhů markerů. Morfologické, biochemické a molekulární markery (White, 2007).

#### 3.4.1 Morfologické markery

Znaky morfologických markerů mají několik nevýhod, pokud jsou používány v rostlinné genetice. Recessivní alely mohou být ve svém projevu maskovány přítomností aktivní či dominantní alely. Nalezení morfologického markeru je velmi náročná a zdouhavá práce. Zásadní vliv na výsledek má správný výběr rodičů. I v případech, kdy je sledováno velké množství znaků a počet sledovaných hybridů je dostatečně vysoký, je nutná i velká dávka štěstí, aby se podařilo nalézt v praxi použitelný morfologický marker, který by byl v dostatečně úzké vazbě s požadovanou vlastností (OPVK, 2017). Mnohé z identifikovaných morfologických markerů jsou například mutace, které můžeme pozorovat u semenáčků (White, 2007). Vzhledem k těmto počátečním studiím genetických markerů, došlo k postupnému objevení od morfologických markerů přes izoenzymy až k nalezení DNA markerům (Andersen et. al. 2003).

#### 3.4.2 Biochemické markery

Biochemické markery využívaly látky zvané monoterpeny a isoenzymy. Monoterpeny jsou obsaženy v pryskyřici a silicích rostlin. Pravděpodobně hrají důležitou roli při odolnosti vůči napadení chorobami a hmyzem. Koncentrace různých monoterpenů, jako je například myrcen nebo limonen, se stanovují pomocí plynové chromatografie. Isoenzymy jsou levnější oproti monoterpenům a s vysokým stupněm kodominance. Isoenzymy jsou alelické formy enzymů (proteinů, bílkovin), které lze rozlišit pomocí elektroforézy (White, 2007). Nicméně trpí nedostatky. Pro kompletní genomové testy jsou isoenzymy nedostačující, např. v analýze kvantitativních znaků je užitečnost znaků omezená a dále některé markery se mohou ovlivňovat, jelikož je zde patrný pleiotropismus. Podobné omezení platí pro aplikaci morfologických markerů (Andersen, 2003).

### 3.4.3 Molekulární markery

Nicméně v roce 1980 bylo objeveno obrovské množství molekulárních markerů (markerů DNA), (White, 2007). Molekulární markery byly využívány v populačních studiích pro stanovení genetické struktury populací (Gömöry a Paule 2001, Mariette et al., 1997). Molekulární markery mají širokou škálu aplikací v obou základních výzkumných a aplikovaných zlepšeních lesnických programů. Genové inženýrství umožňuje využívat pro charakterizaci genomů jednotlivých odrůd kulturních rostlin, hospodářských zvířat i pro získání individuálního profilu jednotlivých osob molekulární znaky DNA (Ondřej, Drobník, 2002). V současné době se využívá nejčastěji molekulárních markerů, které jsou oproti izoenzymům více variabilní a mohou charakterizovat celý genom. Pomocí DNA markerů lze jednoduše detekovat rozdíly v genetické informaci, kterou sledovaní jedinci nesou (Řepková, Relichová, 2001). Wunsch (2002) dokonce pokládá identifikaci genotypů rostlin pomocí molekulárních markerů za nejpřesnější.

Existují dva základní typy DNA markerů: 1) založené na DNA-DNA hybridizaci př. RFLP a (2) ty, založené na amplifikaci DNA sekvenci za použití polymerázové řetězové reakce PCR (RAPD, AFLP, SSR) (White, 2007).

V genetice a šlechtění rostlin jsou nejčastěji využívány následující markerovací systémy založené na polymorfismu DNA (Knoll, Vykoukalová, 2002):

- a) Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)
- b) Polymorfismus v délce sekvence (SSLP, mikrosatelity STR)
- c) Polymorfismus jednotlivých nukleotidů (SNP)

#### 3.4.3.1 *Mikrosatelity*

Mikrosatelity (jednoduché opakující se sekvence) jsou široce využitelné v populační genetice a šlechtění rostlin (Schueler, Tusch, Schuster, & Ziegenhagen, 2003). Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA (v rozmezí délek 2-5 bází), které se často opakují a nacházejí se ve většině genomech. Zmiňované úseky jsou u lidí vysoce polymorfní i u mnoha dalších druhů. Tato variabilita

učinila mikrosatelity populárními genetickými markery pro využívání ke studiím lékařské genetiky, genetického mapování a mapování lidské a rostlinné populace (Riley, 2014). Riley tvrdí, že mikrosatelity byly původně použity pro genetické mapování, ale nyní jsou široce používány v onkologickém výzkumu. Mikrosatelity jsou analyzovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a přesně dimenzovány pomocí elektroforézy. Mikrosatelity jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu (Weising et al., 1995). Je prokázáno, že v průběhu evoluce dochází k prodlužování mikrosatelitových sekvencí, což lze pozorovat už v průběhu několika stovek generací. Další mikrosatelity se v budoucnu mohou snadno vyštěpit rekombinací. Zdá se ale, že některé mikrosatelitové sekvence získaly časem určitou funkci, která přispívá k jejich udržení v genomu a nehrozí tak jejich zánik (Weising et al., 1995).

Podle složení lze mikrosatelity rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalý mikrosatelit je tvořen souvislým motivem, např.  $(AG)_{24}$ , u nedokonalých je tvořen několika různými motivy, např.  $(AG)_{14}(AT)_{35}$  (Zobel, 1984), (Weber, 1990).

#### 3.4.4 Porovnání markerů

<b>Porovnání mikrosatelitů</b>			
<b>Charakteristika</b>	<b>Allozymy</b>	<b>RAPD</b>	<b>Mikrosatelity</b>
Kodominance	Ano	Ne	Ano
Neutralita	nejistý	Ano	Ano
lze získat informaci z dospělce /embrya	ano/zřídka	ano/ano	ano/ano
variabilita lokusu	10 až 50	10 až 100	5 až 20
stupeň polymorfismu	1 až 5	2	1 až 50
schopnost nést informaci o mutaci	zřídka	Zřídka	Dosažitelná
Náklady	1	1	3 až 4 násobek

**Tabulka 1- porovnání výhod mikrosatelitů**

Tabulka 1, jejíž autory jsou (Jarne & Lagoda, 1996) popisuje výhody mikrosatelitů a porovnává je s jinými markery. Tabulka obsahuje informace ohledně kodominance (schopnost vzájemného neovlivnění párových alel) přičemž tuto schopnost splňují allozymy a mikrosatelity. Kodominantní charakter markerů umožňuje rozlišit heterozygoty a homozygoty. Dále schopnost neutrality (neovlivněný prostředím, bez vlivu na fitness jedince), kterou splňují RAPD a mikrosatelity. V případě allozymů, může dojít k ovlivnění prostředím. U molekulárních markerů se informace zkoumá z nekódujících úseků DNA, a tedy se předpokládá neutrální charakter. Dále získávání informací z různých typů tkání či embrya lze v případě mikrosatelitů a RAPD. Získání informace z embrya lze jen velmi obtížně. Informace z tkání jsou však přesnější. Mikrosatelitové lokusy patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu, kdy je polymorfismus dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu nukleotidů (Cvrčková, Poláková, & Trčková, 2016). V případě mikrosatelitů byl detekován až padesáti násobek polymorfního charakteru oproti ostatním markerům. Mikrosatelity se skládají z jednoho až šesti opakujeících se nukleotidů, které se charakterizují mutačním chováním. Důsledek jejich zvýšené míry mutace je v případě mikrosatelitů vysoký stupeň polymorfismu. Jedinci vykazují variační projevy jako opakovaný nesoulad počtu (Guichoux et al., 2011). Zachycení mutace je dosažitelné u mikrosatelitů.

Po shrnutí z tabulky vyplývá, že mikrosatelity nejlépe splňují kritéria, která určují kvalitu vlastností markerů a zároveň pozdější míru úspěšnosti při testování DNA. Mikrosatelity oproti ostatním markerům splňují vysoký stupeň polymorfismu (vysoká míra odlišitelnosti) a schopnost nést informace. Nevýhodou jsou však vyšší náklady.



### 3.5 Rekonstrukce rodokmene

Rekonstrukce rodokmene třešně ptačí se vytváří s cílem dosáhnout a udržet širokou genetickou základnu, přičemž lze těžit určitých vlastností, jako je například vysoká kvalita vybraných stromů, která bude přínosem pro budoucí generace. Dále se vytváří pro zachování jedinců, kteří mají přínosné meliorační vlastnosti. A v neposlední řadě i pro možné budoucí zvýšení zisků z pěstování třešně ptačí (Funda & El-Kassaby, 2012). Rekonstrukce rodokmene poskytuje informace o rodičích, míře úspěchu nalezení matek a otců, míře kontaminace a genetické rozmanitosti (Lai et. al., 2010). Znalost kompletního rodokmene je předpokladem moderního šlechtění (El – Kassaby et. al., 2011). Ke kompletní znalosti rodokmene se dnes hojně využívají mikrosatelity. Mikrosatelity byly detekovány v genomech eukaryot před více než 15 ti lety, ačkoli nebyly považovány za nic zvláštního (Jarne & Lagoda, 1996).

Nicméně nyní díky nim lze dnes odvodit podrobné genealogické informace o jednotlivcích v přirozených populacích. Dále v oblasti výzkumu bylo dosaženo schopnosti zjišťování vzájemných vztahů jednotlivců v populaci (Blouin, 2003). A v neposlední řadě kompletní znalost rodokmene je nezbytná pro selekci stromů sadu pokročilé generace. Sady lze následně zakládat z testů potomstev (Kobliha et. al., 2012). Mikrosatelity jsou ideální markery pro odhalování genetických vztahů mezi jednotlivci, díky jejich kodominantní dědičnosti (Sefc, Steinkellner, Glössl, Kampfer, & Regner, 1998). Analýza rodičovství by mohla být definována jako nástroj pro vyhledávání příbuznosti mezi kandidátskými rodiči a cílovými potomky (Blouin 2003).

Výhody rekonstrukce rodokmene s pomocí mikrosatelitních markerů:

- Lze odhadnout heritabilitu ve volné přírodě, čímž následně dochází k minimalizaci příbuzenského křížení
- Lze odhadnout rychlost toku genů do populace
- Lze nalézt přítomnost četností příbuzenských alel v populaci

- Dále také rozptýl úspěšnosti reprodukce mezi jednotlivci, který může být použit ke studiu efektivní velikosti populace (Blouin, 2003).

Nicméně někdy dochází ke zjištění, že při testu potomstev se nepotvrdí žádný rodič ze založeného sadu. Dochází zde k tzv. kontaminaci pylem a nelze tak vytvořit rekonstrukci rodokmene. Kontaminace mohla být způsobena okolními stromy v blízkosti sadu, přičemž hlavním původcem je vítr. Proto, se také i v minulosti doporučovala okolo sadů tzv. zóna ředění. Záměrem bylo snížit množství kontaminace pylem částečnou izolací sadu od přilehlých stanovišť stejných druhů. Nebo naopak docházelo k vytváření tzv. zón obohacení, kdy byl geneticky vhodný materiál vysázen kolem semenného sadu (White, 2007). Způsoby jak zabránit kontaminaci je hned několik. Například velikostí sadu. Čím větší je sad, tím je vyšší pravděpodobnost opylování uvnitř sadu. Dále je možné využívat různých umělých pylových technik (např. oplodnění) či změnou fenologie kvetení stromů tím, že budou kvést dříve či později než v porostech ve stejné oblasti (Bonnet-Masimbert et. al., 1995).

### 3.5.1 Kategorie vztahu a IBD koeficienty

Kategorie vztahu se týkají konkrétních kategorií rodokmene, jako jsou plnosesterské nebo polosesterské vztahy. Při rekonstrukci rodokmene je zapotřebí určit při testování určitý poměr příbuznosti či ji vyloučit. K tomu právě slouží tzv. IBD alela, která je společná původem neboli zděděná od společného předka (Blouin, 2003). Nejvyšší kategorií jsou monozygoti (dvojčata) a klony  $r=1$  (100%), kdy  $r$  je hodnota příbuznosti alel. Kategorie rodič-potomstvo a sourozenci (full SIB) jsou souhrnně označovány jako první stupeň příbuznosti (50% alel sdílí shodné podle původu, v průměru)  $r=0,5$ . Kategorie prarodič-prapotomstvo, nevlastní sourozenec jsou jako druhý stupeň (v průměru 25% sdílený), kategorie bratraci jako třetí stupeň (12,5%), sdílené. Pravděpodobnosti konkrétních vztahových podílů 0, 1 nebo 2 alely, které jsou identické podle původu na jakémkoli lokusu jsou shrnuty pomocí tří souborů parametrů IBD koeficientů ( $k_0, k_1, k_2$ ), někdy nazývané  $k$ - koeficienty.

## 3.6 PCR

PCR je zkratka z anglického Polymerase Chain Reaction, molekulárně biologická metoda rychlého zmnožení specifických úseků DNA (Snustad et. al. 2009). Úseky po namnožení jsou na začátku a na konci ohraničeny tzv. primery. PCR má tři po sobě jdoucí reakční fáze. Každá fáze probíhá za předem stanovených teplot a po různě dlouhou dobu. První je denaturace, druhá je nasedání primerů a třetí je syntéza DNA. PCR probíhá v termocykléru (Newton, 1997).

### 3.6.1 Multiplexová reakce PCR

Multiplexová PCR reakce se skládá z několika sad primerů v jedné PCR směsi. Tyto sady obsahují jednotlivé amplicony různých velikostí, jež jsou specifické pro různé sekvence DNA. Testováním více sekvencí DNA najednou dochází k celkovému získání většího množství informací za kratší dobu (Rappaport, 1993). Studie parametrů ovlivňujících zesílení primerů říká, že nejdůležitější pro vysokou amplifikaci multiplexové reakce je teplota nasedání a koncentrace KCl. Dále pak je důležitá úměrná koncentrace chloridu hořečnatého k množství dNTP (Henegariu, Dlouhy, Vance, & Vogt, 1997). Primerovými sekvencemi se zabývali například (Dirlewanger et al., 2002; Downey & Iezzoni, 2000; Struss, Ahmad, Southwick, & Boritzki, 2003; Testolin et al., 2000; Vaughan & Russell, 2004), dále také (Schueller et al. 2006).

## 3.7 Softwary pro analýzu dat

Nejlepší volba konkrétního programu závisí na struktuře vstupních údajů, druhu požadované analýzy a vlastností populace (Jones, 2003).

### 3.7.1 GeneMarker

Po PCR reakci se přechází ke zpracování dat v sekvenátoru. Výsledky fragmentační analýzy na sekvenátoru jsou zapsány do počítačového souboru (Microsoft Excel), který lze analyzovat pomocí softwaru GeneMarker. GeneMarker je druh softwaru pro analýzu, který integruje nové technologie zvyšující rychlost a přesnost analýzy. Umí například vytvářet rekonstrukce

rodokmenů, populační struktury, fylogenezi (Softgenetics, 2016). GeneMarker může provádět analýzu fragmentů o čtyřech nebo pěti barevných sadách dat z jakékoliv gelové desky nebo kapilární elektroforézy. Navíc tento software automaticky koriguje většinu chyb přístrojů, šetří značné množství času pro analýzu a také náklady. GeneMarker urychluje analýzu díky automatizované korekci běžných problémů s genotypy. Průvodce GeneMarkeru je navržen tak, aby analýza byla rychlá, snadná a přesná. Při vytváření analýzy dat dochází k nasycení vrcholů ve tvaru peaku. (Riley, 2014). Tyto vrcholy jsou v podstatě zaznamenané alely (peaky zaznamenané křivkou), které nám určují případný genotyp. V některých případech jsou alely určené nesprávně i přes veškeré opatření vytvořená softwarem GeneMarker a proto je potřeba tyto chyby vždy přezkontrolovat a upravit. Důvodem může být chyba přístroje nebo identifikace otcovství. Uživatel může přidávat, mazat nebo měnit alely v elektroforeogramu. GeneMarker rodokmen je užitečným nástrojem pro identifikaci a sledování genetických alel.

Existují i další druhy softwarů jako například Genotyper® a GeneScan® nebo softwar GeneMapper®; Licor sága, MegaBACE® Genetic Profiler a Fragment Profiler, SeqencePilot® nebo Coffalyser.Net software MRC Holland (Softgenetics, 2016).

### 3.7.2 Cervus

Cervus je software, který analyzuje genetické údaje z kodominantních genetických markerů, jako jsou mikrosatelity (STR) a SNP. Předpoklad je, že druh je diploidní a že markery jsou autozomální (podmíněné geny uložené na nepohlavních chromosomech). Předpokládá také, že znaky markerů se dědí nezávisle na sobě, jinými slovy, že jsou ve vazebné rovnováze. Druhy analýz, které lze provádět softwarem Cervus, jsou analýza alelová frekvenční, analýza rodičovství, analýza identity (Kalinowski, Taper, & Marshall, 2007). Cervus (Marshall TC, Slate, J., Slate, J, Kruuk, 1997) je simulační program, který generuje kritické logaritmické pravděpodobnosti a přiřazuje otcovství na dané úrovni statistické spolehlivosti. Simulace obsahuje vstupní parametry definované uživatelem, jako je například celkový počet kandidátů, jejich podíl, vzorky, které byly odebrány a množství chyb v genetických datech

(Worthington et. al., 1999). Využití genetických markerů pro identifikaci vztahu potomků a rodičů, se stává důležitým nástrojem v molekulární ekologii. V ostatních případech je analýza otcovství používána při odhadu nebo detekci toku genů mezi populacemi anebo pro zjištění reprodukčního úspěchu u behaviorálních skupin (Nielsen, 2001). Software CERVUS umožňuje simulaci očekávaných statistických parametrů (delta). Delta je rozdíl mezi hodnotami obou nejpravděpodobnějších otců. Cervus je schopen určit kritickou hodnotu, která je mezníkem, kdy rodič může být považován za kandidáta na pravého rodiče. Cervus analyzuje výpočet frekvence jednotlivých alel u každého lokusu v populaci a bere v úvahu Hardy - Weinbergovu rovnováhu stejně jako přítomnost nulových alel.

Pravděpodobně nejdůležitější rozdíl mezi softwary je úroveň, na které se může pracovat s nulovými alelami, mutací a chybami. Přítomnost nulových alel může způsobit falešné vyloučení pravého rodiče, pokud je heterozygot nesprávně zaznamenán jako homozygot. Nulová alela (neamplifikuje se) může být uznána díky výrazné odchylce od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Pokud známe jednoho z rodičů, je snazší odhalit nulové alely. Nekompatibilita může nastat mezi známým rodičem a jeho potomkem v případě, že heterozygot s nulovou alelou je nesprávně hodnocen jako homozygot. V ideálním případě dojde ke spárování většiny rodičů a potomků, kteří jsou k dispozici a v tom případě, dojde jen k ověření relační vazby. Čím méně informací máme, tím lze obtížněji určit původ. V některých případech nelze určit rodiče všech potomků. Někteří rodiče mohou být přiřazeni dokonce nesprávně. Chakraborty (1988) tvrdí, že obecně platí, že čím méně údajů vstupuje do analýzy původu, tím důležitější jsou kvalitativní vlastnosti molekulárních markerů. Informace o celkovém počtu kandidátů v rodičovské populaci hraje důležitou roli při určování spolehlivosti analýzy rodičovství (Marshall TC, Slate, J., Slate, J, Kruuk, 1997). Podle (Jones, 2003) který přezkoumal různé způsoby analýzy rodičovství, je software Cervus na tento parametr poměrně citlivý.

Cervus a další programy považují nulovou alelu jako druh mutace nebo možnou chybu při určování. Studie předpokládají, že alely se dědí nezávisle na sobě. Další komplikací při vytváření rodokmene může být mutace a

genotypizace. Většina softwarových programů bere v úvahu tyto faktory. Díky těmto omezením, nemohou být někteří potomci přiřazeni k jejich biologickým rodičům. Množství mikrosatelitů se liší u různých druhů programů a může být další nevýhodou k určení genotypu. Odhalující nesrovnalosti v genotypizaci by mohly být dosaženy porovnáním genotypů potomstev s genotypem známého rodiče. Speciální algoritmus, který toto dokáže, byl vyvinut (Marshall TC, Slate, J., Slate, J, Kruuk, 1997). Například software Cervus (Kalinowski et al., 2007) nahradí nesprávně určený lokus alternativním lokusem genotypu podle očekávané frekvence v populaci.

Tyto analýzy pomáhají určit vhodnost lokusů pro následné analýzy. Patří mezi ně: očekávané heterozygoty, polymorfní informační obsah, pravděpodobnost, Hardy-Weinbergův chi-kvadrát statistiky a odhad nulové alelové frekvence. Obsah polymorfní informace (PIC) je měřítkem informativnosti vztahující se k očekávané heterozygotitě a podobně je počítána z alelové frekvence (Korecký, 2012). PIC odhaduje sílu markeru pro detekci polymorfismu (Guo a Elston, 1999). Jeho hodnota je závislá na počtu významných alel na lokusu a na jejich frekvenci v populaci. Srovnání mezi očekávanou a pozorovanou heterozygotitou umožňuje odhad z nulové alely frekvence (Kalinowski et al., 2007). Poměr vysoké pravděpodobnosti znamená, že jedinec je pravděpodobný rodič zkoumaného potomstva. Může však dojít k chybám v případě potomků, mateřských a otcovských genotypů nebo v různých kombinacích všech třech. Z tohoto důvodu Cervus používá pravděpodobnostních rovnic pro data zpracování, které lze brát v úvahu. Výhodou tohoto přístupu je, že jedinec, který se neshoduje na více lokusech, není z množiny potenciálních rodičů vyloučen, ale pravděpodobnost, že se jedná o pravého rodiče, bude klesat. Frekvence mutací a nulových alel může být nastavena uživatelem. Celkový poměr pravděpodobnosti každého jedince se vypočítá vynásobením poměrů zejména lokusů. Tento přístup předpokládá, že studované lokusy jsou děděny nezávisle (Korecký, 2012).

LOD skóre (dosažená hodnota poměru pravděpodobnosti, pravděpodobnost otcovství konkrétního samce vzhledem k pravděpodobnosti otcovství libovolného samce). Pokud dva nebo více samců dosáhlo stejné

pravděpodobnosti (obvykle proto, že jejich genotypy byly identické), otcovství zůstávají neobsazená (Marshall TC, Slate, J., Slate, J, Kruuk, 1997). Kritická hodnota LOD skóre a delta nelze hodnotit pomocí normálního rozdělení, proto je nutné, aby použitá simulační analýza rodičovství pro určení úrovně důvěry determinovala limity těchto parametrů, ve kterých by domnělý rodič mohl být ještě odhadnut jako pravý rodič. Pro účely simulace musí být zadány do softwaru u genotypů, stejně jako počet mateřských kandidátů či počet potenciálních analyzovaných rodičů, také podíl analyzovaných lokusů a četnost chyb. Pokud Delta a LOD skóre překročí kritickou hodnotu, při plnění kritérií specifikovaných v analýze je správný rodič s přísnou (95%) pravděpodobností nebo uvolněnou (80%) pravděpodobností. Cervus pracuje s parametry celé populace a zároveň simuluje příbuzenský vztah rodič – potomstvo (Korecký, 2012).

### 3.7.3 Alelové frekvenční analýzy, analýza rodičovství, předků a identity

Testování rodičovství pomocí pravděpodobnosti vyžaduje alelovou frekvenci. Tato analýza počítá frekvenci každé alely pro každý lokus v populaci, spolu s řadou souhrnných statistických údajů včetně testů Hardy Weinbergovy rovnováhy a přítomnost nulových alel. Tyto statistiky pomohou určit vhodnost lokusu pro následnou analýzu. Simulace analýzy rodičovství je užitečná ze dvou důvodů. Za prvé, simulace může být použita k prověření proveditelnosti analýzy rodičovství pro daný lokus. Za druhé, simulace může být použita pro výpočet kritické hodnoty koeficientů pravděpodobnosti. Můžeme simulovat až čtyři různé typy rodičovství: mateřská analýza, otcovská analýza, analýza rodičů (kde jsou známá pohlaví kandidátských rodičů) nebo analýza dvojic rodičů, kde pohlaví kandidátských rodičů jsou neznámá. Simulace je založena na frekvencích alel a počtu kandidátních rodičů. Analýza předků, je navržena tak, aby se časově náročný úkol testování mnoho kandidátských rodičů proti mnoha potomkům podstatně zjednodušil a jasně interpretoval výsledky. U každého testovaného potomstva se získají buď pravděpodobní kandidáti rodičů s určitou spolehlivostí anebo se žádní nepřihadí. V takovémto případě dojde k rekonstrukci seznamu kandidátských rodičů a určení v podstatě nižší spolehlivosti (odhadu). Analýza identity se používá k identifikaci jedinců, kteří byli převzorkováni, a to i v případě, že oba

genotypy neodpovídají přesně. Analýza identity je zvláště užitečná pro studii neinvazivního odběr vzorků tkáně nebo tam, kde jsou vzorky získané z neoznačených jedinců (Kalinowski, Taper, and Marshall, 2007).



## 4 Metodika

### 4.1 Rostlinný materiál – divize Velichov

Na základě odborného posudku VÚLHM stanice Uherského Hradiště a uznání výběrových stromů pro sběr roubov na LHC Klášterce nad Ohří byl založen semenný sad Obrovice, ze kterého byly testovány sazenice třešně ptačí. Uznané výběrové stromy třešně ptačí se nachází v porostu 121 H000, 107 D000, 120 C010 na LHC Klášterec nad Ohří s. p. VLS ČR, divize Velichov. Věk v době sběru 116 let, 3 LVS ve většině případů. Nadmořská výška 420 m. n. m. Průměrná výška stromů byla 20 m, výčetní průměr stromů byl 30cm. Evidenční čísla viz níže (Bergmann, 2015). Evidenční čísla VS-TR-740399 -4-3-VLÚ až VS-TR-740428-4-3-VLÚ.

Sazenice ze sadu Obrovice byly zpracovávány v lesní školce Lhota. Viz příloha č. 6. Ze sadu Obrovice jsme získali 27 klonů třešně ptačí v červenci 2015. Z každého klonu bylo v sadu vypěstováno (16 – 20) sazenic. V našem případě došlo k testování počtu od každého klonu 10 sazenic. Sbírali se vždy alespoň tři listy od každé sazenice a uchovávaly se v igelitových neprodyšných pytlících s příslušným číslem v mrazicím boxu (-82°C). Počty odebraných vzorků u jednotlivých klonů byl následující. U klonů 1,4,5,7,9,10,11,12,13,14,15,17,18,19,21,22,23,24,25,26,27,28 bylo odebráno 20 vzorků od každého. U klonu 2 bylo odebráno 17 vzorků. U klonu 20 bylo odebráno 16 vzorků. U klonu 8 jen 13 vzorků a klonu 3 jen 12 vzorků. U klonů 6,16 a 29 nebyly údajně odebrány žádné vzorky.

### 4.2 Semenný sad Obrovice

Semenný sad třešně ptačí (Obrovice) byl založen v roce 2002. Evidenční číslo je CZ-3-3-TR-00171-4-3-V. Sad je umístěn na pozemku p. č. 327 v k. ú. Radonice u Hradiště, obec Vojenský újezd Hradiště, kraj Karlovarský a nachází se na Lesním hospodářském celku (LHC 483143) Valeč. Porosty se uznávají na dobu 10 let. Harmonogram činností zde prakticky kopíroval předchozí semenný sad „Čejkovka“ na LS LČR Lužná. Plocha byla vybrána v návaznosti na lesní školku, výměra činí 1,25 ha. Na přelomu prosince 1999

a ledna 2000 byl z 30 výběrových stromů proveden sběr rouků v Klášteřci nad Ohří s. p. VLS ČR, divize Velichov. S tímto materiálem bylo naloženo jako v předchozím případě. Klonový sortiment pochází z místních populací přírodní lesní oblasti (PLO) 4-Doupovské hory. Výsadba proběhla na jaře 2002. Vysazeno bylo celkem 240 roubovanců od 28 klonů. Spon výsadby je 7 x 6m, 3 LVS (lesní vegetační stupeň) a nadmořská výška 390 m. n. m. Sběr z roku 2014 přinesl 364 kg bez rozlišení klonů (Bergmann, 2015).

### 4.3 Pomůcky

K extrakci DNA jsou zapotřebí kity ( Invisorb - Spin plant mini kit) v našem případě použitý, zkumavky a filtry, pipety, pinzety, kádinky, stojany na zkumavky, termomixer, termocyklér, centrifuga, oscilační mlýn, tekutý dusík, spektrometr.

### 4.4 Extrakce DNA

Extrakce DNA se rozumí proces získání DNA z rostlinného materiálu. K extrakci DNA je nezbytné zázemí molekulárně-genetické laboratoře. Izolace byla provedena s využitím komerčně dostupného extrakčního kitu Invisorb – Spin Plant Mini Kit®. Viz příloha č. 2. DNA byla extrahována z 50 až 100 mg listového materiálu. K eluci DNA z mikrofiltrů došlo přidáním zahřáté destilované vody do zkumavky s uchycenou DNA, inkubace a konečné centrifugace. Inkubace v tomto případě trvala až dvakrát déle než podle standardního manuálu extrakce DNA pro získání lepších výsledků testování. Parametry izolované DNA (koncentrace a čistota) byly zjištěny spektrometrickým měřením. Průměrná koncentrace izolované DNA činila 202 ng/μl +-133,81. Ukázka koncentrace a parametry čistoty pro jednotlivé potomky jsou v příloze č. 7. Veškerá izolovaná DNA byla pro navazující kroky analýzy naředěna na pracovní koncentraci 20 ng/μl.

**Klon 16** nebyl zastoupen mezi vzorky (nicméně dle evidence sadu měl chybět klon 10, ten ale fyzicky zastoupen je). **Možná záměna klonu 16 a 10.** **Klon 29** není fyzicky zastoupen mezi vzorky i dle evidence sadu. **Klon 6** není fyzicky zastoupen mezi vzorky, v sadu se ale nachází. Získanou vyextrahovanou DNA z 27 klonů (268 sazenic) jsme následně měřili na spektrometru.

#### 4.5 Průběh PCR

Polymerázová řetězová reakce se vytvoří za pomoci templátové DNA, kterou jsme si naředili do požadovaného množství, primerů (forward a reverse), volných iontů či  $Mg^{2+}$  a deoxyribonukleosidtrifosfátu (dNTPs). PCR se skládalo ze tří částí: denaturace dvoušroubovicové DNA, nasednutí primerů k oblastem, které mají být zesíleny a syntézy DNA. Tyto tři kroky se neustále opakovaly (30-40 krát). K tomuto účelu sloužil termocyklér. Primery byly použity pro amplifikaci genomové DNA. Výsledné PCR produkty byly analyzovány na přítomnost mikrosatelitních markerů.

##### 4.5.1 Analýza mikrosatelitových lokusů

Na základě rozboru vědecké literatury bylo vybráno 16 potenciálně vhodných mikrosatelitových markerů pro třešeň ptačí. U několika vybraných a testovaných primerů byla předpokládána úspěšná mezidruhová amplifikace (tzv. cross-amplification). To znamená, že tyto mikrosatelitové páry byly primárně vyvinuty pro jiný druh rodu *Prunus*, ale úspěšně amplifikují repetitivní úseky také u zájmového druhu. PCR amplifikace byla prováděna v celkovém objemu 50  $\mu$ l, obsahující 20 ng templátové DNA.

Testovací skupina 16 primerových párů byla z ekonomických důvodů objednána jako neznačená. Amplifikace předvybraných primerů byla ověřena elektroforetickou separací předpokládaných PCR produktů na agarózových gelech. DNA je kyselina, obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se pohybují fragmenty DNA od záporně nabitě elektrody směrem ke kladně nabitě. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji horizontálně uložený agarózový gel, již zmíněný. Fragmenty o stejné velikosti a molekulové váze - postupují stejně rychle a vytvoří shluk, po obarvení

proužek. DNA je na gelu vizualizována pomocí barvení ethidiumbromidem (EtBr). Váže se mezi báze nukleových kyselin a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje. Vzhledem k tomu, že ethidium bromid je karcinogen, gely jsou po vyfotografování skladovány ve zvláštní odpadní nádobě. Podmínky PCR reakcí pro příslušný typ primeru byly zvoleny dle autorů článků, ve kterých byly primerové sekvence publikovány.

## 5 Výsledky

### 5.1 Generování molekulárních dat

Na základě tohoto posouzení bylo vybráno 16 primerů, které vykazovaly dostatečnou amplifikaci a v sérii 10 testovacích vzorků se nejevily jako monomorfní (tj. nevykazovaly jednotný genotyp). Tyto primery byly následně objednány jako fluorescenčně značené (barvy modrá, zelená, žlutá, červená), tak aby mohly být amplifikace jednotlivých primerů sdružovány do tzv. multiplexových reakcí. Důležitým parametrem pro sestavení kompatibilního souboru primerů v příslušné multiplexové reakci je porovnání délky amplifikovaných fragmentů a návrh jejich fluorescenčního obarvení tak, aby nedocházelo k překryvu stejnobarevných fragmentů různých primerů při fragmentační analýze na sekvenátoru.

**Tabulka 2- fluorescenčně značené primery byly rozděleny do multiplexových reakcí**

<b>multiplex A</b>			oblast amplifikace	fluorescenční barva	citace
název primeru		nukleotidová sekvence primeru			
EMPaS02	Forward primer	CTACTTCCATGATTGCCTCAC	135-145	FAM6	Vaughan and Russel 2004
	Reverse primer	AACATCCAGAACATCAACACAC			
EMPaS10	Forward primer	GCTAATATCAAATCCCAGCTCTC	151-183	VIC	Vaughan and Russel 2004
	Reverse primer	TGAAGAAGTATGGCTTCTGTGG			
EMPaS11	Forward primer	ACCACTTTGAGGAACTTGGG	73-106	FAM6	Vaughan and Russel 2004
	Reverse primer	CTGCCTGGAAGAGCAATAAC			
UCD-CH11	Forward primer	TGCTATTAGCTTAATGCCTCCC	134-151	PET	Struss et al. 2003
	Reverse primer	ATGCTGATGTCATAAGGTGTGC			
UCD-CH31	Forward primer	TCCGCTTCTCTGTGAGTGTG	111-148	NED	Struss et al. 2003
	Reverse primer	CGATAGTTTCCTTCCCAGACC			
PS12A02	Forward primer	GCCACCAATGGTCTCTCC	150-178	NED	Downey and Iezzoni 2000
	Reverse primer	AGCACCAGATGCACCTGA			
UDP98-412	Forward primer	AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC	124-132	VIC	Testolin et al. 2000 (Schueller et al. 2006)
	Reverse primer	GCTGAAGACGACGATGATGA			

<b>multiplex B</b>								
EMPaS05	Forward primer	CATGTGCTTTCTCTGCCC				161-171	NED	Vaughan and Russel 2004
	Reverse primer	TCTTCTAAGCAATTCCCC						
EMPaS06	Forward primer	AAGCGGAAAGCACAGGTAG				200-218	VIC	Vaughan and Russel 2004
	Reverse primer	TTGCTAGCATAGAAAAGAATTGTAG						
EMPaS12	Forward primer	TGTGCTAATGCCAAAAATACC				122-148	FAM6	Vaughan and Russel 2004
	Reverse primer	CTGCCTGGAAGAGCAATAAC						
BPPCT 034	Forward primer	CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT				228	PET	Dirlewanger et al. 2002
	Reverse primer	CAATGGAGAATGGGGTGC						

<b>multiplex C</b>								
BPPCT 040	Forward primer	ATGAGGACGTGTCTGAATGG				135	FAM6	Dirlewanger et al. 2002
	Reverse primer	AGCCAAACCCCTCTTATACG						
UDP97-403	Forward primer	CTGGCTTACAACCTCGCAAGC				150	VIC	Testolin et al. 2000 (Schueller et al. 2006)
	Reverse primer	CGTCGACCAACTGAGACTCA						
PceGA34	Forward primer	GAACATGTGGTGTGCTGGTT				140-174	NED	Downey and Iezzoni 2000
	Reverse primer	TCCACTAGGAGGTGCAAATG						
UDP98-411	Forward primer	AAGCCATCCACTCAGCACTC				150	PET	Testolin et al. 2000 (Schueller et al. 2006)
	Reverse primer	CCAAAAACCAAACCAAAGG						
UCD-CH12	Forward primer	AGACAAAGGGATTGTGGGC				173-200	PET	Struss et al. 2003
	Reverse primer	TTTCTGCCACAAACCTAATGG						

Multiplex A obsahoval primery EMPaS02, EMPaS10, EMPaS11, UCD-CH11, UCD-CH31, PS12A02, UDP98-412. Rozsahy délek amplifikací primerů byly od 73 do 183bp. Multiplex B obsahoval primery EMPaS05, EMPaS06, EMPaS12, BPPCT 034. Délka amplifikace byla od 122 do 228bp. Multiplex C obsahoval primery BPPCT 040, UDP97-403, PceGA34, UDP98-411, UCD-CH12 a rozsah délek amplifikace byl od 135-200bp. Délky amplifikace jsou pro každý primer odlišné, jak je vidět v tabulkách. Každý primer je označen jinou fluorescenční barvou pro lepší rozlišení. Primery jsou děleny na forward a reverse (přední a zadní) a ohraničují nukleotidovou sekvenci. Na pravé straně tabulky jsou značení autoři primerů, podle kterých bylo testování nukleotidových sekvencí řízeno.

V příloze č. 1 jednotlivé primery vykazují informace o zastoupení bp (amplifikovaných délek). EMPaS02 měl největší zastoupení 146 bp a to z 70%. EMPaS10 měl největší zastoupení 293 bp a to z 32% a 287 bp a to z 28%. EMPaS11 měl největší zastoupení 76 bp a to z 72%. UCD-CH11 měl největší zastoupení 157 bp a to z 47% a 155 bp a to z 33%. UCD-CH31 měl největší zastoupení 126 bp a to z 69%. PS12A02 měl největší zastoupení 169 bp a to z 35%. UDP98-412 měl největší zastoupení 120 bp a to z 64%. EMPaS06 měl největší zastoupení 205 bp a to z 40%. EMPaS12 měl největší zastoupení 224 bp a to z 31% a 238 bp z 23 %. BPPCT 034 měl největší zastoupení 336 bp a to z 39% a 332 z 32 %. BPPCT 040 měl největší zastoupení 157 bp a to z 44% a 161 bp z 35 %. PceGA34 měl největší zastoupení 251 bp a to z 31%. UDP98-411 měl největší zastoupení 262 bp a to z 39% a z 274 bp z 36 %. EMPaS05 měl víceméně rovnoměrné zastoupení 165 bp 31 %, 167 bp 24 %, 173 bp 24 % a 175 bp 20 %. Primery UCD-CH12 a UDP97-403 nejsou vneseny do grafu, jelikož se s nimi při rekonstrukci rodokmene nepracuje.

Jako templátová DNA byla použita DNA izolovaná z listů třešně ptačí. Izolovaná DNA (viz výše) byla naředěna na standardizovanou koncentraci 10 ng/ul. PCR reakce byly za příslušných podmínek prováděny v termocykleru Veriti 96 - well thermal cycler (Applied Biosystems). Z důvodu zefektivnění práce nebyly neproměnlivé složky. PCR směs se skládá z (tj. Taq polymerázy,

dNTPs, hořčnatých iontů pipetovaných odděleně, ale byl využit předpřipravený roztok reakčních produktů Qiagen Multiplex PCR kit. Jednotlivě tedy byly přidávány pouze primery a templátová DNA. Celkový objem reakční směsi činil 15  $\mu$ l a obsahoval 10 ng genomové DNA a 200nM každého značeného primeru. Polymerázová řetězová reakce byla prováděna v 35 cyklech s počáteční 15 minutovou inkubací při teplotě 95°C, aby došlo k aktivaci hotstar Taq DNA polymerázy (Čurn, 2011).

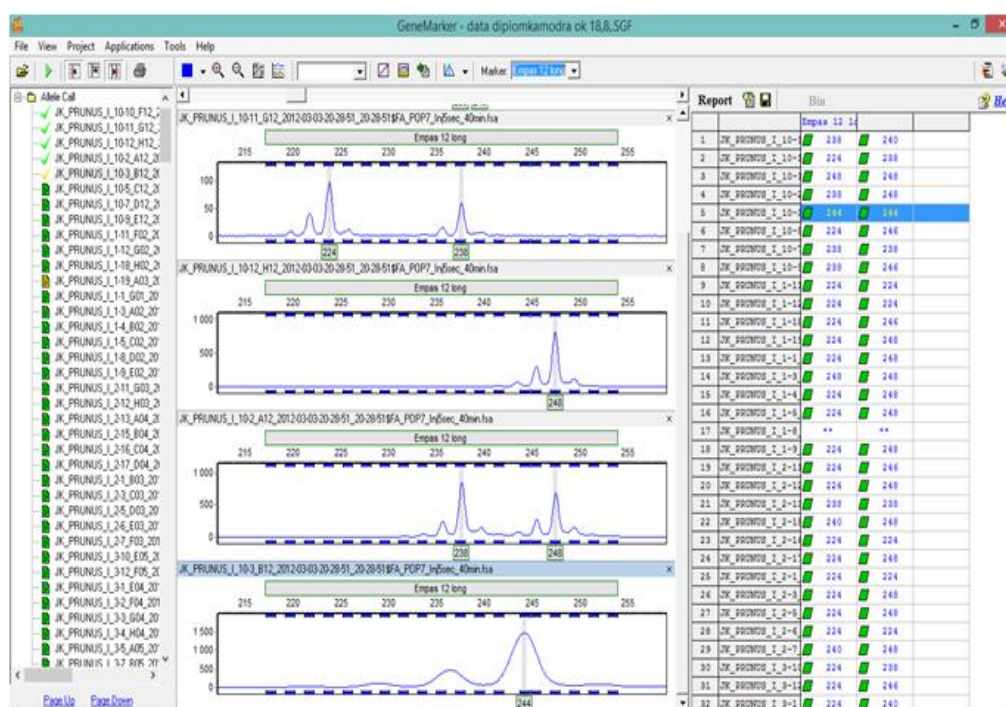
*(HotStar Taq DNA PCR směs, která obsahuje HotStar Taq DNA polymerázu. Tato polymeráza je modifikovanou formou Taq DNA polymerázy. V PCR směsi je v inaktivovaném stavu, takže nemá žádnou polymerázovou aktivitu. Absence polymerasové aktivity brání extenzi nespecificky připojených primerů a vzniku primerových dimerů, které se jinak tvoří při nízkých teplotách na počátku PCR a během prvního PCR cyklu. HotStar Taq DNA polymeráza je aktivována až po 10 minutové inkubaci při 94 °C (Burdychová, 2004)).*

Denaturace při každém cyklu probíhala po dobu 30s pře teplotě 95°C, fáze annealingu (nasedání) trvala 45s a teplotně se u jednotlivých multiplexů odlišovala. Pro multiplexy byly reakční podmínky od 67°C postupně klesající na 55°C. Následně byl vždy 1  $\mu$ l vzniklého PCR produktu smíchán se 13  $\mu$ l 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 osmi kapilárního sekvenátoru Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems) a vyhodnoceny v softwaru GeneMarker®.



## 5.2 GeneMarker

Software, který pomohl zpracovat výsledky z PCR (hodnoty bp neboli kódy alel). Tento software vytvořil díky zadaným parametrům křivky, díky kterým jsme schopni rozeznat homozygoty a heterozygoty pod jednotlivými multiplexy se zadanými primery (příklad EMPAs05) a také hodnotu peaků, které jsou zcela zásadní pro software Cervus. Díky nim vyhodnotí a spáruje jednotlivé vzorky rodičů a potomků. Počet těchto vyhodnocených dat byl přibližně 6000.



Obrázek 2 - GeneMarker

V levé části obrázku se nachází názvy alel, uprostřed jsou zaznamenány primery s peaky a vpravo vyhodnocené genotypy. Po přenesení vyhodnocených dat z GeneMarkeru do excelu, lze data upravovat graficky a zároveň s nimi pracovat dále i pro software Cervus. Viz příloha 5. Po vyhodnocení dat v GeneMarkeru je zapotřebí převést data do textového souboru. V příloze č. 5 lze vyčíst jednotlivé genotypy všech lokusů a příslušných jedinců za pomoci analýzy DNA mikrosatelitními markery. Velikosti fragmentů byly v rozmezí 65 bp (EMPaS 11) a 357 bp (BPPCT034).

Ve srovnání s výsledky z příslušné literatury se velikosti rozsahu bp uváděné v této diplomové práci částečně překrývaly. Ukázka viz.(tabulka č. 2).

14 lokusů z 16 (87,5 procent) mikrosatelitních primerů bylo použitých k produkci stabilního a polymorfního zesílení fragmentů 32 genotypů. Dva primery (UDP97-403 a UCD-CH12) byly vyloučeny z vyhodnocování vzhledem k přítomnosti nulových alel. Marker je vysoce informativní, pokud je jeho PIC větší než 0.500. Střední hodnota je 0,6005, představující minimální hodnotu 0,37 a maximálně 0,831 (Avramidou, Ganopoulos, & Aravanopoulos, 2010). Nejvíce informativní jsou markery PceGA34 a EMPaS12 a nejméně EMPaS11 a EMPaS02. Pozorovaná heterozygotnost 0,365 do 0,739 a v průměru 0,552, zatímco očekává heterozygotita v této studii v rozmezí od 0,432 do 0,799 s průměrem 0,616. Index fixace (F) byl v rozmezí 0,0038 a 0,2204 a měl průměr přes všechny lokusy 0,1121 (tabulka č. 3).

### 5.3 Rekonstrukce rodokmene

Rekonstrukce rodokmene byla provedena za pomoci softwaru Cervus. Pro studium genetických vztahů bylo vytvořeno několik počítačových programů. Po vložení genotypů získaných z genemarkeru do softwaru jsme získali alelovou frekvenční analýzu. Viz tabulka č. 3 níže:

Lokus	k	N	HObs	HExp	PIC	F(Null)
EMPaS11	7	288	0.365	0.432	0.370	0.0802
EMPaS02	7	283	0.417	0.470	0.426	0.0346
BPPCT 040	10	289	0.640	0.670	0.611	0.0161
EMPaS12	10	288	0.736	0.788	0.754	0.0286
UDP98-412	5	282	0.468	0.527	0.473	0.0541
EMPaS05	5	280	0.739	0.747	0.699	0.0038
EMPaS10	12	282	0.727	0.753	0.709	0.0125
UCD-CH 31	7	286	0.472	0.482	0.438	0.0102
PS12A0	10	286	0.661	0.764	0.727	0.0742
EMPaS06	7	255	0.690	0.724	0.676	0.0233
PceGA34	14	280	0.582	0.799	0.770	0.1526
UCD-CH11	6	284	0.412	0.639	0.570	0.2204
UDP98-411	6	286	0.647	0.687	0.627	0.0251
BPPCT 034	17	255	0.647	0.721	0.675	0.0506

**Tabulka 3- alelová frekvenční analýza**

Alelová frekvenční analýza:

k – počet alel v lokusu

N – počet jedinců

Hobs – pozorovaná heterozygotnost

HExp – očekávaná heterozygotnost

PIC – informovanost lokusu, čím vyšší, tím lepší

F (Null) – odhadovaná nulová frekvence alely

Celkový počet otestovaných jedinců byl 292 včetně rodičů. Počet testovaných potomků byl 260 a počet testovaných rodičů byl 32. Na šestnácti lokusech byli jedinci testováni. Od každého rodiče byly odebrány dva vzorky pro přesnější analýzu a upřednostnění kvalitnějšího vzorku, nicméně

v některých případech došlo k neshodě (nekompatibilitě) 2 vzorků od stejného jedince (rodiče). Dále bylo zapotřebí vytvořit simulaci rodičovské analýzy, díky které bylo možné získat přehled o počtu spárování genotypů, procentické nalezení rodiče či rodičovského páru. Viz tabulka č. 4.

jednotlivec	jistota (%)	Přiřazení	míra přiřazení
úroveň		pozorovaná (očekávaná)	pozorovaná (očekávaná)
jistý	95.00	516 (489)	100% (95%)
volný	80.00	516 (489)	100% (95%)
nepřiřazen		0 (27)	0% (5%)
celkem		516 (516)	100% (100%)

**Tabulka 4- procentické nalezení jedince dle genotypu**

Pozorované procentické přiřazení, jak jednoho rodiče, tak rodičovského páru, bylo nakonec stoprocentní, i když zadaný parametr byl minimálně 95%. Celkový počet testovaných potomků bylo 260, jak již bylo výše zmíněno. 258 potomků bylo testováno na minimálně 8 lokusech a také všech 32 kandidátských rodičů. Číslo 516 - potencionální nalezení kandidátští rodiče potomků číslo 489 je míra očekávaného přiřazení rodičů. Míra přiřazení je v tabulce na pravé straně vyobrazena jako absolutní (počet) nebo relativní (%). Všichni jedinci byli přiřazení. Pomocí analýzy genetické identity byla u konkrétních analyzovaných ramet odhalena identičnost následujících klonů:

- a) **20A,21B,2A (94%)** z 16 lokusů vykazovalo identické genotypy 15 lokusů kromě (UCD-CH 12)
- b) **20B a 21A (100%)** identičnost u všech 16 lokusů
- c) **9AB a 3B (94%)** z 16 lokusů vykazovalo identické genotypy 15 lokusů kromě (UCD-CH 12)
- d) **4AB a 5AB (100%)** identičnost u všech 16 lokusů
- e) **17A a 18AB (94%)** identičnost u 15 lokusů kromě (UDP97-403)

V případě lokusů UCDCH12 a UDP97-403 docházelo již při zjišťování genotypů k náročnější analýze, jelikož peaky v Genemarkeru nebylo snadné rozeznat. A právě proto, byly následně pro rekonstrukci rodokmene tyto lokusy vyřazeny.

Nakonec byla provedena přímá rodičovská analýza, jež nám ukázala, procentuální úspěšnost párování a nalezení rodičů potomků. Analýza byla provedena:

- 1, žádný rodič nepřizán, náhodné párování.
- 2, matka přizána tzv. „natvrdo“.

Nejprve byla provedena rekonstrukce, kdy nebyla přizána informace o evidenční matce. Výstupem byla informace o genotypu dvou rodičů, avšak bez rozlišení mateřského a otcovského jedince. Ve skupině potomků evidenčně příslušných do jednoho mateřského polosesterského potomstva pak bylo ověřeno, zda je konzistentně přizován jako jeden z rodičů stále stejný jedinec a pokud ano, zda genotyp tohoto jedince koresponduje s genotypem evidenční matky. V případě skupin jedinců, u kterých se tento případ ověřil, následně došlo k rekonstrukci rodokmene, již s přizanou ověřenou evidenční matkou. Přizaná matka tzv. „natvrdo“ se přizala jako jeden z rodičů přímo v programu, přičemž druhý z rodičů byl analýzou dohledáván a přizán. Po přenesení dat jsme dostali následující kompletně rekonstruovaný rodokmen, který je níže v tabulce č. 7.

#### 5.4 Rekonstrukce rodokmene plnosesterských potomstev

Analýza rodičovství softwaru Cervus, potvrdila správnost evidence mateřských stromů v semenném sadu Obrovice s výjimkou klonu č. 8 v procesu postupného přiřazování rodičů k jedinci při opakovaně se shodujících genotypech evidenční matky. Druhý z rodičů byl analýzou dohledáván a přiřazen. Po přenesení dat byl vytvořen kompletně rekonstruovaný rodokmen. U klonu č. 8 se nepodařilo s jistotou prokázat, že evidenční matka je s jistotou ta správná. Mohlo to být způsobeno pravděpodobnou kontaminací při testování či záměnou informací při evidenci. U klonu č. 10 byla evidenční matka určena nejpravděpodobnější matka 6AB a u klonu č. 2 matku 4\_5AB. K duplicitě genotypů došlo u rodičů 17A\_18AB, 20A\_21B\_2A, 20B\_21A, 4\_5AB a 9Ab\_3B, přičemž genotypy mezi těmito rodiči jsou prakticky identické. Důvodem může být vegetativní množení mateřských stromů v oblastech sběru materiálu, jelikož vzdálenost mezi sběrnými místy činila 1-1,5 km viz příloha č. 4. U klonu č. 3 byla potvrzena evidenční matka 9Ab\_3B. V případě klonu č. 4 a 5 byla potvrzena evidenční matka 4\_5AB. U klonu č. 17 byla potvrzena evidenční matka 17A\_18AB. U klonu č. 18 byla potvrzena evidenční matka 17A\_18AB. U klonu č. 20 a 21 byla potvrzena evidenční matka 20A\_21B\_2A. V ostatních případech korespondovalo číselné označení klonu potomka s číselným označením rodiče. Pokud při rekonstrukci nebyl s dostatečnou mírou statistické pravděpodobnosti přiřazen otcovský strom, pochází gametický příspěvek z jedince mimo semenný sad, zde je použita hodnota x. Pravděpodobně vlivem nějaké kontaminace vzorků při přípravě v laboratoři či samovolným opylením stromu mimo sad. V tabulce č. jsou zaznamenáni potomci s evidenčními čísly, dále matka, která je zde určena tzv. natvrdo. Otec byl přiřazen jako nejpravděpodobnější při stanovení míry úspěšnosti jako rodiče s 95% pravděpodobností. Viz tabulka č. 5 níže:

**Tabulka 5 - výsledná tabulka rodokmene**

potomek	matka	Otec	Úspěšnost 95%*,95%+
10x11	x	X	
10x12	6Ab	20B_21A	+
10x18	6Ab	30AB	*
10x19	6Ab	7Ab	*
10x2	6Ab	22Ab	*
10x20	6Ab	24AB	*
10x5	6Ab	24AB	+
10x7	6Ab	16Ab	*
10x9	11Ab	19Ab	+
11x1	11Ab	3A	*
11x13	11Ab	30AB	*
11x15	11Ab	30AB	*
11x16	11Ab	8Ab	*
11x2	11Ab	30AB	*
11x20	11Ab	8Ab	*
11x5	11Ab	25A	*
11x7	11Ab	3A	*
11x8	11Ab	24AB	*
12x10	12Ab	15Ab	*
12x12	12Ab	19Ab	*
12x13	12Ab	15Ab	*
12x17	12Ab	6Ab	*
12x18	12Ab	6Ab	*
12x19	12Ab	2B	*
12x2	12Ab	4_5AB	*
12x20	12Ab	15Ab	*
12x3	12Ab	17A_18Ab	*
12x9	12Ab	1Ab	*
13x1	13Ab	28Ab	+
13x10	13Ab	8Ab	*
13x14	13Ab	8Ab	*
13x15	13Ab	8Ab	*
13x3	13Ab	4_5AB	+
13x4	13Ab	4_5AB	*
13x5	13Ab	28Ab	*
13x6	13Ab	8Ab	*
13x7	13Ab	28Ab	*
13x8	13Ab	28Ab	*
14x10	14B	2B	+
14x13	14B	4_5AB	*
14x14	14B	4_5AB	+
14x2	14B	1Ab	+

14x20	14B	1Ab	*
14x3	14B	8Ab	*
14x6	14B	22Ab	*
14x7	14B	17A_18Ab	*
14x8	14B	8Ab	*
14x9	14B	12Ab	*
15x1	15Ab	8Ab	*
15x12	15Ab	9Ab_3B	*
15x14	X	X	
15x17	15Ab	30AB	*
15x18	15Ab	19Ab	*
15x19	15Ab	1Ab	*
15x20	15Ab	4_5AB	*
15x4	15Ab	19Ab	*
15x8	15Ab	20A_21B_2A	*
17x12	6Ab	8Ab	+
17x13	17A_18Ab	1Ab	*
17x15	17A_18Ab	19Ab	*
17x18	17A_18Ab	6Ab	*
17x4	17A_18Ab	6Ab	*
17x5	17A_18Ab	4_5AB	*
17x7	17A_18Ab	22Ab	*
17x8	17A_18Ab	27Ab	+
17x9	17A_18Ab	8Ab	*
18x11	17A_18Ab	20A_21B_2A	+
18x12	17A_18Ab	9Ab_3B	*
18x14	17A_18Ab	11Ab	*
18x15	17A_18Ab	11Ab	*
18x16	17A_18Ab	11Ab	*
18x18	17A_18Ab	11Ab	*
18x19	17A_18Ab	11Ab	+
18x20	17A_18Ab	9Ab_3B	*
18x5	17A_18Ab	30AB	*
18x9	17A_18Ab	24AB	*
19x1	19Ab	25A	*
19x10	19Ab	8Ab	*
19x12	19Ab	17B	*
19x13	19Ab	20A_21B_2A	*
19x16	19Ab	var1	+
19x17	19Ab	4_5AB	*
19x20	19Ab	2B	+
19x6	19Ab	8Ab	*
19x7	19Ab	8Ab	*

19x8	19Ab	8Ab	*
19x9	19Ab	12Ab	*
1x1	1Ab	28Ab	*
1x11	1Ab	8Ab	*
1x12	1Ab	28Ab	*
1x18	1Ab	7Ab	*
1x19	1Ab	X	
1x3	1Ab	13Ab	+
1x4	1Ab	25A	+
1x5	1Ab	12Ab	*
1x8	1Ab	X	
1x9	1Ab	6Ab	*
20x1	20A_21B_2A	28Ab	*
20x10	20A_21B_2A	8Ab	+
20x11	20A_21B_2A	28Ab	+
20x12	20A_21B_2A	6Ab	+
20x15	20A_21B_2A	13Ab	+
20x16	20A_21B_2A	17B	*
20x4	20A_21B_2A	22Ab	*
20x5	20A_21B_2A	15Ab	*
20x6	20A_21B_2A	8Ab	*
20x9	20A_21B_2A	7Ab	*
21x1	20A_21B_2A	4_5AB	*
21x10	20A_21B_2A	30AB	*
21x13	20A_21B_2A	15Ab	*
21x16	20A_21B_2A	30AB	*
21x20	20A_21B_2A	19Ab	*
21x4	20A_21B_2A	8Ab	+
21x5	20A_21B_2A	15Ab	*
21x6	20A_21B_2A	15Ab	*
21x8	20A_21B_2A	23B	*
21x9	20A_21B_2A	9Ab_3B	*
22x1	22Ab	25A	*
22x11	22Ab	17A_18Ab	*
22x12	22Ab	17A_18Ab	*
22x13	22Ab	17A_18Ab	*
22x14	22Ab	17A_18Ab	*
22x18	22Ab	4_5AB	*
22x2	22Ab	8Ab	*
22x4	22Ab	16Ab	*
22x8	22Ab	26Ab	+
22x9	22Ab	17A_18Ab	*
23x13	23B	30AB	*
23x14	23B	20A_21B_2A	*
23x18	23B	4_5AB	*
23x2	23B	20A_21B_2A	*

23x20	23B	30AB	*
23x3	23B	15Ab	*
23x4	23B	4_5AB	*
23x5	23B	30AB	*
23x6	23B	30AB	*
23x7	23B	20A_21B_2A	*
24x11	24AB	28Ab	*
24x12	24AB	6Ab	*
24x13	24AB	11Ab	+
24x14	24AB	15Ab	+
24x17	24AB	30AB	+
24x18	24AB	11Ab	*
24x2	24AB	30AB	*
24x3	24AB	30AB	*
24x5	24AB	23A	*
24x6	24AB	11Ab	*
24x8	24AB	30AB	*
24x9	24AB	7Ab	*
25x1	25A	X	
25x12	25A	13Ab	+
25x13	25A	30AB	*
25x16	25A	8Ab	*
25x18	25A	4_5AB	+
25x19	25A	2B	*
25x20	25A	13Ab	*
25x4	25A	11Ab	*
25x7	25A	6Ab	*
26x10	26Ab	11Ab	*
26x11	26Ab	3A	*
26x14	26Ab	19Ab	*
26x16	26Ab	19Ab	*
26x17	26Ab	19Ab	*
26x20	26Ab	8Ab	*
26x6	26Ab	19Ab	*
26x7	26Ab	3A	*
26x8	26Ab	17B	*
26x9	26Ab	11Ab	*
27x12	27Ab	4_5AB	*
27x13	27Ab	28Ab	*
27x14	27Ab	28Ab	*
27x15	27Ab	7Ab	*
27x17	27Ab	22Ab	*
27x2	27Ab	4_5AB	*
27x20	27Ab	4_5AB	*
27x3	27Ab	4_5AB	*

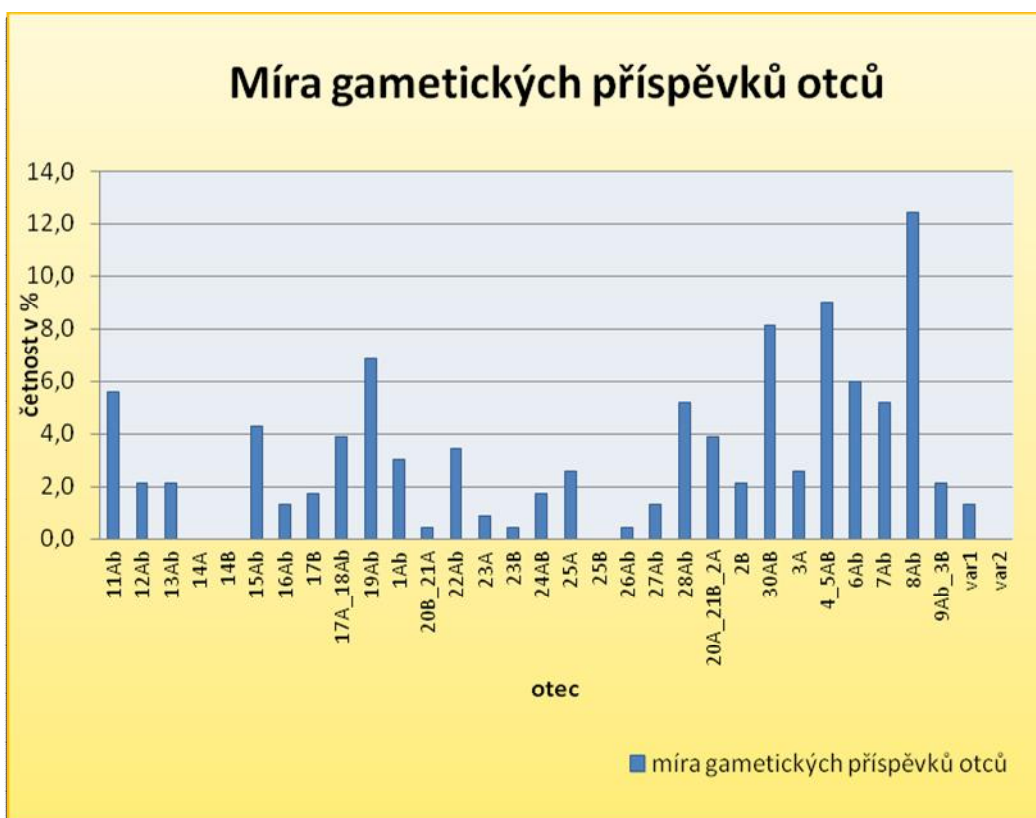


27x9	27Ab	22Ab	*
28x1	28Ab	7Ab	+
28x12	28Ab	8Ab	+
28x14	28Ab	4_5AB	*
28x15	28Ab	7Ab	*
28x16	28Ab	20A_21B_2A	*
28x2	28Ab	8Ab	*
28x3	28Ab	1Ab	*
28x4	28Ab	6Ab	*
28x8	28Ab	6Ab	*
2x1	4_5AB	12Ab	+
2x11	4_5AB	19Ab	*
2x12	4_5AB	X	
2x13	4_5AB	X	
2x15	4_5AB	X	
2x16	4_5AB	7Ab	*
2x17	4_5AB	X	
2x3	4_5AB	7Ab	*
2x5	4_5AB	X	
2x6	4_5AB	27Ab	*
2x7	4_5AB	8Ab	*
3x1	3A	13Ab	+
3x10	3A	11Ab	*
3x12	3A	19Ab	*
3x2	3A	23A	*
3x3	3A	15Ab	*
3x4	3A	19Ab	*
3x5	3A	25A	+
3x7	3A	1Ab	+
3x8	3A	8Ab	*
3x9	3A	19Ab	*
4x1	4_5AB	X	
4x10	4_5AB	6Ab	*
4x11	4_5AB	3A	+
4x12	4_5AB	30AB	*
4x13	4_5AB	12Ab	*
4x14	4_5AB	2B	*
4x15	4_5AB	19Ab	*
4x18	4_5AB	6Ab	*
4x20	4_5AB	19Ab	*
4x3	4_5AB	7Ab	*
5x1	4_5AB	3A	*
5x11	4_5AB	X	
5x12	4_5AB	8Ab	*
5x14	4_5AB	22Ab	*
5x16	4_5AB	8Ab	*

5x17	4_5AB	7Ab	*
5x20	4_5AB	30AB	*
5x5	4_5AB	6Ab	*
5x6	4_5AB	var1	+
5x8	4_5AB	X	
5x9	4_5AB	7Ab	*
7x10	7Ab	X	
7x11	7Ab	27Ab	*
7x12	7Ab	8Ab	*
7x13	7Ab	4_5AB	+
7x14	7Ab	6Ab	*
7x15	7Ab	9Ab_3B	*
7x18	7Ab	28Ab	+
7x2	7Ab	X	
7x3	7Ab	var1	+
7x4	7Ab	17B	*
8x1	X	X	
8x10	X	X	
8x11	X	X	
8x12	X	X	
8x4	8Ab	22Ab	*
8x5	8Ab	17A_18Ab	*
8x7	X	X	
8x8	X	X	
8x9	X	X	
9x1	9Ab_3B	11Ab	+
9x10	9Ab_3B	20A_21B_2A	+
9x11	9Ab_3B	X	
9x12	9Ab_3B	16Ab	+
9x2	9Ab_3B	20A_21B_2A	*
9x20	9Ab_3B	25A	*
9x5	9Ab_3B	4_5AB	*
9x6	9Ab_3B	17A_18Ab	+
9x9	9Ab_3B	4_5AB	+

## 5.5 Míra gametického příspěvku otců

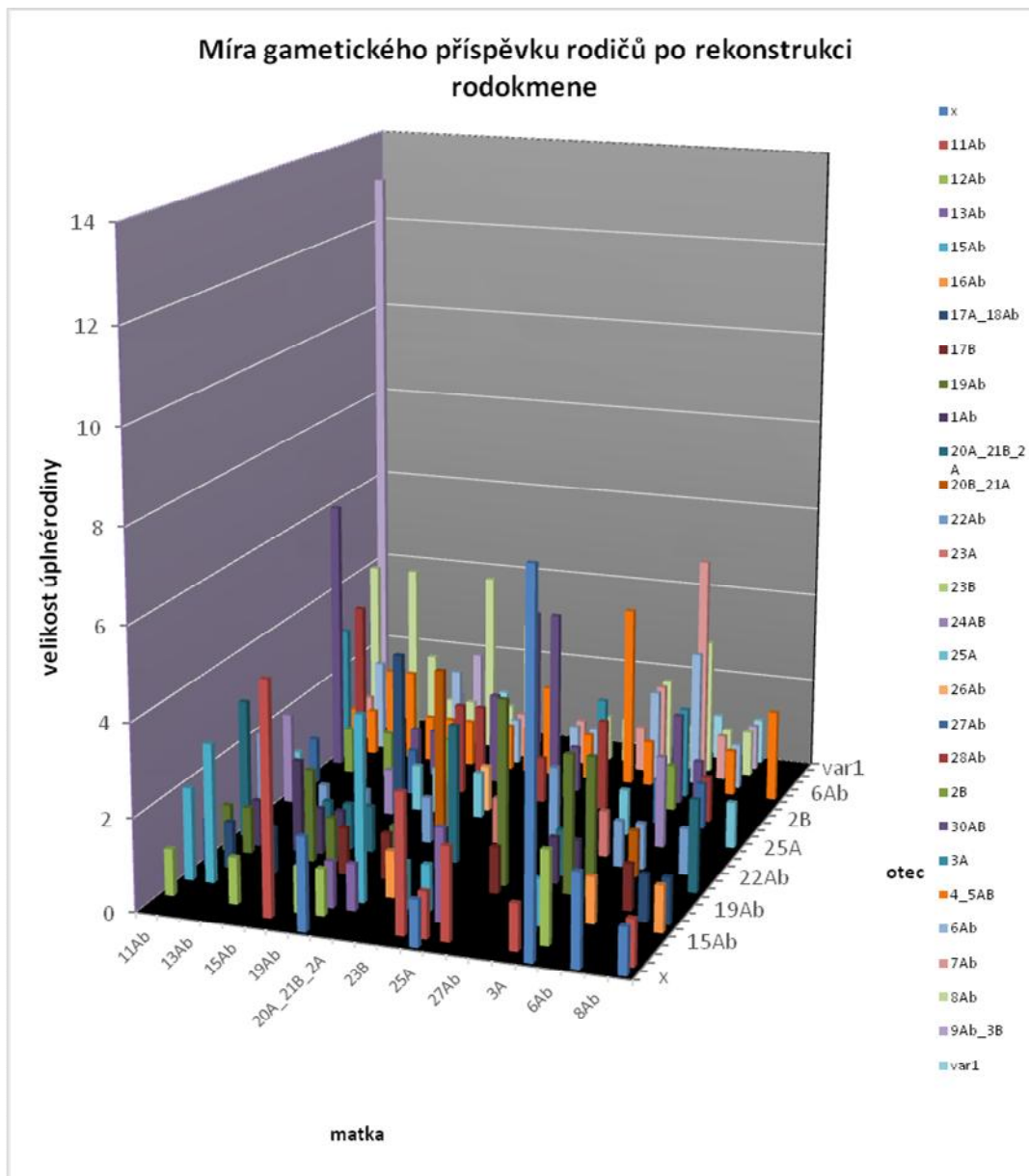
Míra gametického příspěvku otců je vyobrazena v grafu č. 1. Je vyjádřen pomocí procentuální četnosti otců k jednotlivým potomkům podle výsledků. Nejvyšší zastoupení tvořil otec 8Ab téměř třinácti procentní gametický příspěvek celého potomstva. Devíti procentní gametický příspěvek tvořil otec 4\_5AB (otec 4 a 5 se stejnými genotypy) a osmi procentní gametický příspěvek otec 30AB. Žádné zastoupení v podobě gametického příspěvku jsme nezaznamenali v případě otců 14A, 14B, 25B a var 2.



**Graf 1 - míra gametických příspěvků otců**

Při porovnání míry zastoupení gametických příspěvků otců s počty ramet v sadu, lze konstatovat, že v případě 4\_5AB, 8Ab a 30AB odpovídá vyšší počet ramet i vyššímu procentuálnímu zastoupení otců. V případě otců 6Ab, 11Ab a 19 Ab došlo k nadprůměrnému procentuálnímu zastoupení při nižšímu počtu ramet v sadu a naopak k podprůměrnému procentuálnímu zastoupení při vyšším počtu ramet v sadu u jedinců 9Ab\_3B, 13Ab, 16Ab.

Viz porovnání grafu č. 1 a přílohy č. 3.

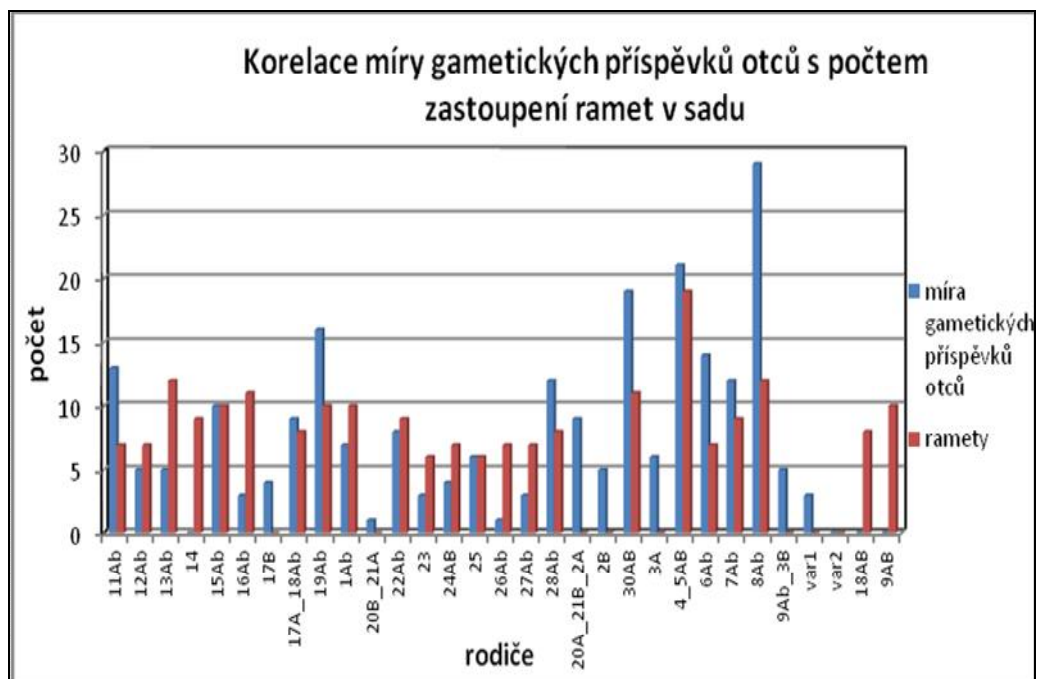


**Graf 2- míra gametických příspěvků obou rodičů**

Analýza skutečně zastoupené matky u jednotlivých potomků nám ukázala, že evidenční matka je shodná se skutečně zastoupenou matkou. V případě klonů 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 se zastoupení evidenční potvrdilo téměř 100%. V případě klonů 10 a 17 došlo k téměř 90 % úspěšnosti potvrzení správnosti evidenční matky. Klon 10 tvořil okolo 10 % zastoupení matky 11AB. Klon 17 tvořil okolo 10% zastoupení matky 6Ab. Tato chyba mohla vzniknout chybnou manipulací se vzorky nebo evidenční chybou. V grafu č. 2 je znázorněna míra gametických příspěvků otců. Celkem 95% všech otcovských stromů se podílelo na vytvoření alespoň jednoho potomka.

### 5.5.1 Proporcionální porovnání ramet v semenném sadu

Podle počtu ramet (příloha č. 3) od každého rodičovského klonu, byl zjištěn proporcionální vliv míry gametického příspěvku otců v semenném sadu viz graf č. 3.



**Graf 3-** korelace počtu ramet s množstvím gametických příspěvků otců

V tomto grafu jsou přiřazené počty ramet jednotlivých klonů. Červeně jsou označeny počty ramet u jednotlivých klonů v sadu a modře zase počty zastoupení gametických příspěvků otců. V případě klonu 14A a 14B, 23A a 23B, 25A a 25B došlo ke sloučení pro lepší vyobrazení v grafu. V případě identických genotypů, které byly sloučeny (klony 17A\_18Ab, 20B\_21A, 20A\_21B\_2A, 9Ab\_3B) nebylo možné přiřadit správný počet ramet, kvůli duplicitě genotypů. U klonů č. 17B, 2B, 3A, var 1 také nebylo možné přiřadit počty ramet, protože duplicita již narušila strukturu označení klonů. U klonů č. 18Ab a 9Ab naopak není známa míra gametických příspěvků, protože tyto klony jsou duplicitní a jsou tedy sloučeny pod názvem jiných genotypů, přesto počet ramet byl zjištěn. Předpokládaná korelace počtu ramet v sadu s mírou gametických příspěvků (čím více ramet tím vyšší míra gametického příspěvku) nebyla potvrzena, což vyplývá i z grafu.

## 6 Diskuse

Podle Bergmanna (2015) je analyzovaný sad Obrovice vysoce plodný s průměrnou roční produkcí 350 kg třešní. Svůj podíl na tom má jistě uspořádání jednotlivých klonů (ramet) v sadu. Adams (1992) ve svých studiích zmiňuje, že vzdálenost mezi rodiči je důležitý faktor, který ovlivňuje pravděpodobnost křížení. De Cuyper et. al. (2005) tvrdí, že sousední stromy v semenném sadu by měly být vzájemně kompatibilní, aby se maximalizovala produkce. Pojem „vzájemně nekompatibilní“ znamená vzájemnou neslučitelnost (nekompatibilitu) alel S-locusu mezi jedinci. Gömory a Longauer (2014) tvrdí, že křížení jedinců se stejnými alelami na S-locusu je vždy neúspěšné a křížení jedinců s jednou stejnou alelou je úspěšné z 50 %. V sadu Obrovice je tento předpoklad pravděpodobně splněn, jelikož zde jedinci se stejnými alelami na S-locusu zjištěni nebyli.

V návaznosti na kompatibilitu má dále svůj podíl na produkci efektivní počet klonů v sadu a rozmístění v něm. Vzhledem k produkci jakou sad vykazoval v posledních letech a k množství různých rodičovských genotypů v sadu lze určit, že předpoklady pro správnou funkčnost a vysokou diverzitu sadu má velmi dobré. Ani tzv. duplicit genotypů, jako tomu bylo například u klonů 4\_5Ab, 20A\_21B\_2A, 20B\_21A, 9AB\_3B, 17A\_18AB zde nebyla překážkou. V této práci bylo analyzováno 32 genotypů rodičovských klonů. Kang (2001) ve své studii odvodil efektivní počet klonů u 1/5 jehličnatých sadů mezi 10 a 40 genotypy, čímž sad Obrovice tento předpoklad splňuje. Tzv. duplicita genotypů mohla být způsobena mechanickým zaměněním organického materiálu při práci se vzorky nebo chybným označením při samotném sběru či zde mohla existovat vzájemná genetická příslušnost vlivem vegetativního množení mateřských stromů již na divizi Velichov.

Semenné sady jsou zdaleka nejčastěji používaným nástrojem k reprodukci lesnické produkce populace na světě. Skládají se z vybraných, geneticky vynikajících kandidátských rodičů nebo jejich potomstva s hlavním cílem, produkovat konzistentní a bohaté výnosy geneticky vylepšených semen

(Funda & El-Kassaby, 2012). Semenné sady jsou zakládány s předpokladem, že se jedná o uzavřené, panmiktické populace, že nemají genetické ani jiné behaviorální omezení náhodného křížení, 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 & El-Kassaby, 2012). Docílit tohoto stavu v semenném sadu je velice obtížné, avšak výsledky z tohoto testování vykazují, že výše uvedené předpoklady pro vytvoření a následný rozvoj semenného sadu jako panmiktické populace jsou zde z velké části splněny. V sadu dochází k náhodnému křížení, což je způsobeno také kvalitním rozestoupením ramet rovnoměrně v sadu, čímž se zde dotýkáme již výše zmíněné problematiky rozmístění klonů v sadu. Dále genotypové frekvence populace rodičů odpovídají ve většině případů frekvencím populace potomků. Rušivé jevy, jako jsou migrace, selekce, mutace a náhodný genetický drift jsou zde potlačeny. Na základě toho došlo při testování k nalezení 100% rodičovských párů. Evidenční matky potomků jednotlivých klonů byly potvrzeny jako správné až na výjimku klonu č. 8.

Jediným rušivým jevem mohla být kontaminace pylem z okolí sadu, která se objevila ve výsledcích v podobě hodnoty x, jako nenalezený genotyp z nabízených rodičovských genotypů. White (2007) tvrdí, že kontaminace pylem může zvýšit genetickou rozmanitost semenných sadů, ale je obvykle nežádoucí, protože snižuje genetický zisk. Míra kontaminace pylem je značná v případě použitých osiv z nezralých sadů. Zároveň dochází ke snížení genetické diverzity. Lai et. al. (2010) tvrdí, že konstrukce rodokmene poskytuje informace o rodičích, míře úspěchu nalezení matek a otců, míře kontaminace a genetické rozmanitosti. 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. Analýza otcovství také ukázala, že vzdálenost a doba kvetení silně ovlivňuje vzor účinného opylení (Mariette et. al., 2007). Směr větru je faktor, který nelze regulovat, alespoň prozatím. Pokud jde o opakování klonů v několika rametách, lze konstatovat, že v analyzovaném sadu nedocházelo

k žádnému skupinovitému nahromadění ramet stejných klonů. Naopak rozmístění ramet bylo náhodné a rovnoměrné. Fenologii kvetení nebyla věnována zásadní pozornost, jelikož informace o plodnosti a produkci stromů byly uspokojivé. Podpoření elitních genotypů vede k získání zvýšené genetické odolnosti a následně možné rekonstrukci úplného rodičovství. Sazenice semenných sadů mají obvykle širší genetický základ z důvodu většího počtu jedinců zapojených do opylování. (Funda & El-Kassaby, 2012).

Nicméně vytvoření stoprocentní panmiktické populace je v současné době nereálné, jelikož skutečná genetická kvalita semen či plodin je nepředvídatelná. Přesto sad Obrovice se těší produkčnímu úspěchu, ať už je to z důvodu správného rovnoměrného rozmístění ramet v sadu, kvalitou semenného materiálu, který byl odebrán z oblasti divize Velichov či profesionálnímu pěstebnímu přístupu zakladatelů sadu.

Výsledky gametických příspěvků odpovídaly téměř 94 % z rodičovské populace v sadu. Množství kontaminace pylem bylo zbylých 6 %, u kterých rekonstrukce nepřiradila žádného z nabízených rodičů. Analýza prokázala také, 0% samoopylení v sadu. Množství vzorků (260 potomků a 32 rodičů), se kterým zde bylo pracováno, bylo považováno za dostatečné k nalezení přiměřeného reprodukčního zastoupení matek a otců, a umožní tak objasnit samčí a samičí biologické reprodukční atributy jako je rodičovský gametický příspěvek (reprodukční úspěšnost), kontaminaci (znečištění) a míru samoopylení (Lai et al. 2010). Při porovnání sadu Douglasky ve studii (Korecký & El-kassaby, 2016), která byla testována rovněž pomocí mikrosatelitů, se sadem třešňí Obrovice, je evidentní rozdíl v míře gametických příspěvků, kdy u douglasky je tato míra konzistentně 80 % v průběhu několika let a s mírou kontaminace pylem mezi 10-18 %.

## 7 Závěr

Úspěšně realizovaná rekonstrukce rodokmene a získaná informace o otcovském gametickém příspěvku umožnila faktické převedení sazenic rozpěstovaných ve formě polosesterského potomstva tj. s evidencí mateřského jedince do plnosesterského potomstva. Tento postup zkrátil šlechtitelský cyklus hlavně s využitím metody BwB (Breeding without breeding).

Dle výsledků byla prokázána shoda evidenčních matek s matkami skutečnými ve všech případech kromě klonu 8. Při určování rodokmene jsme našli téměř všechny rodičovské páry. Při zjišťování gametického příspěvku otců, jsme určili míru účasti jednotlivých jedinců (viz graf č. 1) a také zda počet ramet v sadu Obrovice byl v korelaci s mírou zastoupení gametických příspěvků otců či měl nějaký vliv na množství potomků.

Cílem bylo porovnat evidenci rodičů v sadu Obrovice s lesní školkou Lhota a vytvořit plnosesterské potomstvo za pomoci mikrosatelitních markerů. Závěrem lze říci, že pomocí 14 mikrosatelitních markerů byla úspěšně použita molekulární identifikace a charakterizace DNA *Prunus avium L.* Bylo možné jednoznačně identifikovat unikátní data DNA všech genotypů. Tyto data budou hrát významnou roli při budoucích pěstebních a operačních přístupech (například zhodnocení řízeného kříže, zřízení a posouzení sadu osiva, klonální množení a šíření), jelikož bude znám genofond.



## 8 Zdroje

- Adams, W. T., Strauss, S. H., Copes, D. L., & Griffin, A. R. (Eds.). (1992). Population Genetics of Forest Trees: Proceedings of the International Symposium on Population Genetics of Forest Trees Corvallis, Oregon, USA, July 31-August 2, 1990 (Vol. 42). *Springer Science & Business Media*.
- Andersen, J. S., Wilkinson, C. J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E. A., & Mann, M., (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 426(6966): 570-574.
- Avramidou, E., Ganopoulos, I. V., & Aravanopoulos, F. A. (2010). DNA fingerprinting of elite Greek wild cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using microsatellite markers. *Forestry*, 83(5), 527–533. <http://doi.org/10.1093/forestry/cpq035>
- Bilir, N., Prescher, F., Lindgren, D., & Kroon, J. (2008). Variation in cone and seed characters in clonal seed orchards of *Pinus sylvestris*. *New Forests*, 36(2), pp.187-199.
- Blouin, M. S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations, 18(10), 503–511. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00225-8](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00225-8)
- Bonnet-Masimbert, M., & Webber, J. E. (1995). From flower induction to seed production in forest tree orchards. *Tree Physiology*, 15(7-8), pp. 419-426.
- Burdychová R., (2004). Využití mikrobiálních expresních systémů k produkci rekombinantních proteinů. Disertační práce. *Brno : VUT FCH*, 148 l.
- Cvrčková, H., Poláková, L., & Trčková, O. (2016). Genetická variabilita vybraných populací borovice lesní. *Genetická Variabilita Vybraných Populací Borovice Lesní*, 2016(3), 223–229.
- České Ministerstvo zemědělství. Zákon č. 149/2003 Sb. o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnicky 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: Sbíрка zákonů České republiky. 2003, část

57, pp.2379.

- De Cuyper, B., Sonneveld, T., & Tobutt, K. R. (2005). Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Molecular Ecology*, *14*(4), pp 945-955.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M. J., Poizat, C., Zanetto, A., ... Laigret, F. (2002). 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*, *105*(1), 127–138. <http://doi.org/10.1007/s00122-002-0867-7>
- Downey, S. L., & Iezzoni, A. F. (2000). 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*, *125*(1), 76–80. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/125/1/76.short>
- El-Kassaby, Y. A., Cappa, E. P., Liewlaksaneeyanawin, C., Klápště, J., & Lstibůrek, M. (2011). Breeding without breeding: is a complete pedigree necessary for efficient breeding?. *PLoS One*, *6*(10), e25737.
- Funda, T., & El-Kassaby, Y. A. (2012). Seed orchard genetics. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, *7*(JUNE 2012), 1–23. <http://doi.org/10.1079/PAVSNNR20127013>
- Gerber, H. P., & Ferrara, N. (2000). Angiogenesis and bone growth. *Trends in cardiovascular medicine*, *10*(5), 223-228.
- Gömöry, D., Paule, L., (2001): Spatial structure and mating system in wild cherry (*Prunus avium*) population. *Biologia* *56*: 117-123
- Gömöry, D., Longauer R., (2014). Lesnická genetika. *Brno*. s. 137.
- Granger, A., R., Clarke, G., R., Jackson, J., F., (1993): Sweet cherry cultivar identification by Lea isozyme polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* *86*: 458-464
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., L??ger, P., Lepais, O., ... Petit, R. J. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, *11*(4), 591–611. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>

- Guo XQ, Elston RC. (1999). Linkage information content of polymorphic genetic markers. *Human Heredity* 49: 112-118.
- Henegariu, O., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR : Critical Parameters and. *BioTechniques*, 511(September), 504–511.
- Chakraborty, R., & Weiss, K. M. 1988. Admixture as a tool for finding linked genes and detecting that difference from allelic association between loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23): 9119-9123.
- Ivánek, O., Novotný, P., & Josef, F. (2010). *Metodika zakládání semenných sadů 1,5 generace*.
- Jarne, P., & Lagoda, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11(10), 424–429. [http://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](http://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)
- Jones, A. G., & Ardren, W. R. (2003). Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular ecology*, 12(10):. 2511-2523.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5), 1099–1106. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- Kang, K. S., Harju, A. M., Lindgren, D., Nikkanen, T., Almqist, C., Suh, G. U. (2001). Variation in effective number of clones in seed orchards. *New Forests.*, 21(1), pp. 17-33.
- Knoll, A.; Vykoukalová, Z.,. (2002). Molekulární genetika zvířat. Metody detekce polymorfizmu DNA genu. *Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně*.
- Kobliha, J., Podrázský, V. (200)1. Šlechtění a pěstování třešně ptačí. *Prunus avium*.
- Kobliha, J., Janeček, V. (2001). Selekcce stromů třešně ptačí. In *Sbor. z celost. konf. Krajina, les a lesní hospodářství. Praha, ČZU, Kostelec n. Č. 1* (Vol. 22, No. 23, p. 1).
- Kobliha, J. (2002). Wild cherry (*Prunus avium* L.) breeding program aimed at the use of this tree in the Czech forestry. *Journal of Forest Science*, 48(5), 202–218.

- Korecký, J. (2012). Establishment of the second-generation seed orchards of Scots pine. Unpublished doctoral dissertation, Molecular – genetics part, University of Czech republic, Praha, 139.
- Korecký, J., & El-Kassaby, Y. A. (2016). Pollination dynamics variation in a Douglas-fir seed orchard as revealed by microsatellite analysis. *SILVA FENNICA*, 50(4).
- Lindgren, D., Mullin, T. J. (1998). Relatedness and status number in seed orchard crops. *Canadian Journal of Forest Research*, 28(2), 276-283.
- Lstibůrek, M., & El-Kassaby, Y. A. (2010). Minimum-inbreeding seed orchard design. *Forest science*, 56(6), 603-608.
- Mariette, S., Lefranc, M., Legrand, P., Frascaria, L., N., Machon, N., (199)7: Genetic variability in wild cherry population in France. Effects of colonizing processes. *Theoretical and Applied Genetics* 94, 6 – 7: 904–908.
- Mariette, S., Balsemin, E., Stoeckel, S., Tavaud, M., Le Bouler, H., Santi, F., & Verger, M. (2007). Parental participation in progeny and effective population sizes in experimental seed orchards of wild cherry *Prunus avium* L.(Batsch). *Annals of forest science*, 64(5): 533-539.
- Marshall TC , Slate, J., Slate, J, Kruuk, L. E. B. and P. J. (1997). Statistical confidence for likelihood-based paternity. *Mol. Ecol*, (1998), 639–655.
- Musil, I., 2003: Jehličnaté dřeviny. *Lesnická dendrologie 1 ČZU-FLE, Praha: 177.*
- Musil, I., et. al., (2005): Listnaté dřeviny 2. *Lesnická dendrologie 2/2 ČZU-FLE, Praha: 77-155.*
- Nielsen, R., & Wakeley, J. (2001). Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, 158(2):. 885-896.
- Paule, L., (1992). Genetika a šľachtenie lesných drevin. *Bratislava, Príroda a. s: 304.*
- Rappaport, J. (199)3. Narrative studies, personal stories, and identity transformation in the mutual help context. *The Journal of Applied Behavioral Science*, 29(2),: 239-256.
- Řepková, J.; Relichová, E., (2001). Molekulární markey, Brno. *Atlantis: 64-69.*
- Sefc, K. M., Steinkellner, H., Glössl, J., Kampfer, S., & Regner, F. (1998).

- Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1–2), 227–231. <http://doi.org/10.1007/s001220050889>
- Schueler, S., Tusch, A., Schuster, M., & Ziegenhagen, B. (2003). Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.)--markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46, 95–102. <http://doi.org/10.1139/g02-107>
- Snustad, D., Simmons, M. 2005. Principles of genetics.
- Stojecová, R., & Kupka, I. (2009). Growth of wild cherry (*Prunus avium* L.) in a mixture with other species in a demonstration forest. *Journal of Forest Science*, 55(6), 264–269.
- Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S. M., & Boritzki, M. (2003). Analysis of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars Using SSR and AFLP Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(6), 904–909. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0242340362&partnerID=40&md5=e941eef41088aab830be054a1975b371>
- 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*, 43(3), 512–520. <http://doi.org/10.1139/gen-43-3-512>
- Van Buijtenen, J., P.. 1984. Strategies for maintaining the genetic base. How will advanced generation tests differ from first? Progeny testing, proceedings of Servicewide Genetics Workshop, Charlstone, South Carolina, Dec 5-9, 1983. USDA Forest Service, Washington D. C., USA, 1984: 566-572.
- Vaughan, S. P., & Russell, K. (2004). Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 429–431. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00673.x>.
- Vítámvás, J., Mauleová, M., Koblíha, J., (2006). 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“, *Bzenec*: 82-85.
- Vyslyšel, K., et. al., (2007). Pracovní metodika pro privátní poradce v lesnictví, *Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem*: 35.
- Weber, J., L., (1990). Informativeness of human (dC-dA) n·(dG-dT) n polymorphisms. *Genomics*, 7.4, 524-530.
- Weising, K., Atkinson, R. G., Gardner, R. C., (1995). Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *Genome Research*, 4.5, 249-255.
- White, T. (2007). *Forest genetics. Nature* (Vol. 167). <http://doi.org/10.1038/167764a0>
- Worthington W. J., et al. (1999). Where have all the fathers gone? An extensive microsatellite analysis of paternity in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *Molecular Ecology*, 8.9, 1417-1429.
- Wünsch, A., Hormaza, J. I., (2002). Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity*, 89.1, 56-63.
- Zobel, B. J., Talbert, J., (1984). Applied forest tree improvement. John Wiley and Sons, *New York*: 505.

### **Ostatní zdroje:**

- Burdychová, R., (2004). Využití mikrobiálních expresních systémů k produkci rekombinantních proteinů. *Disertační práce. Brno, VUT FCH*: 148 l.
- Bergmann, J., (2015). Vojenské lesy a statky ČR, s. p, středisko Bukovina.
- Remeš J., (2006). Pěstování lesů II. Podklady pro studium – vybrané pasáže z přednášek zpracované na základě různých literárních pramenů. *ČZU FLE Katedra pěstování lesů, Praha*.

### **Internetové zdroje:**

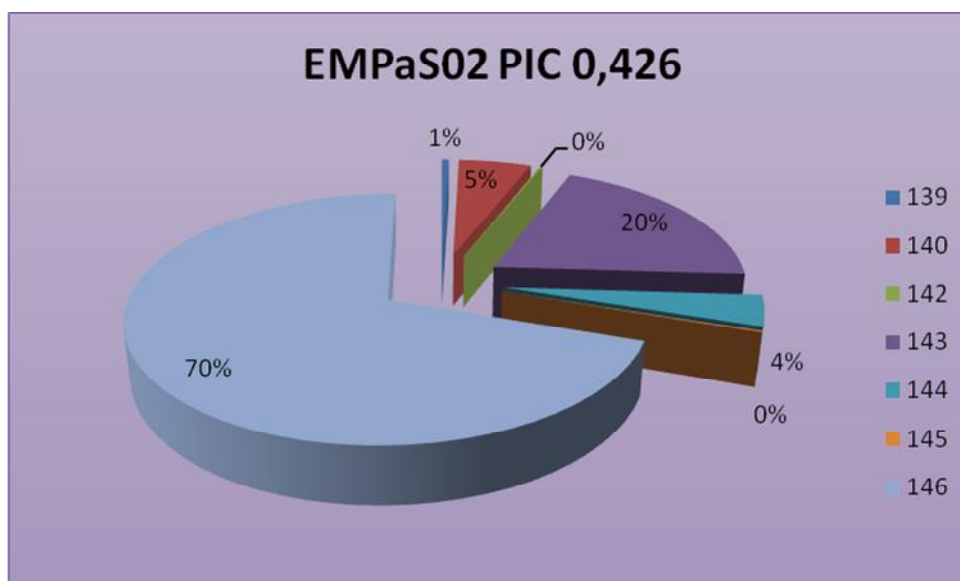
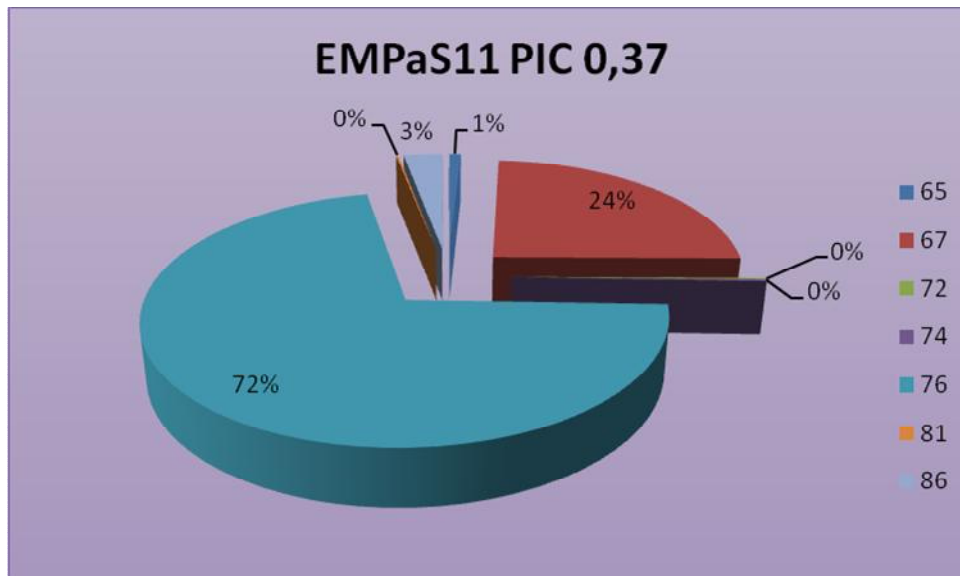
- Anonymous OPVK, M. listy. (2017). Molekulární metody hodnocení genotypů – Marker Assisted Breeding. *Výzkumný a Šlechtitelský Ústav Ovocnářský Holovousy S. R. O.*

- ČEŠKA P., (2015). Péče o les, *Vojenské lesy a statky ČR*, s. p. [online]. [cit. 2015-02-03]. Dostupné z: [http://www.lesycr.cz/pece\\_oles/pestovanilesu/Documents/seminar-genetika-prispevek-vls-cr.pdf](http://www.lesycr.cz/pece_oles/pestovanilesu/Documents/seminar-genetika-prispevek-vls-cr.pdf)
- Čurn V., Nováková A., Šimáčková K., (2011). Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.). *Biocentrum*. [online]. [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: <http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/publikace/Metodika-i-cccd1ea729.pdf>
- Drobník, J., Petr, J., Ondřej, M., (2002). *Geneticky modifikované organismy v zemědělství. Ústav zemědělských a potravinářských informací*. [cit. 2016-02-01].
- Riley, M., ChangSheng, Jonathan L., (2014): Microsatellite Analysis with Linked Pedigree Tool, *Softgenetics*. [online]. [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: [http://www.softgenetics.com/GeneMarker\\_19.php](http://www.softgenetics.com/GeneMarker_19.php)
- Softgenetics. Genemarker, The biologist friendly software [online]. Softgenetics, [2016] [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: <http://www.softgenetics.com/GeneMarker.html>
- Stratec, (2011): Biomedical. Instruction for the InvisorbR Spin Plant Mini Kit., [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: [http://www.stratec.com/en/molecular/Products\\_Molecular/Genomic\\_DNA/invimag\\_spin\\_plant\\_mini\\_kit/invimag\\_spin\\_plant\\_mini\\_kit.php](http://www.stratec.com/en/molecular/Products_Molecular/Genomic_DNA/invimag_spin_plant_mini_kit/invimag_spin_plant_mini_kit.php)
- Vojenské lesy a statky ČR, s. p. (2017): *Divize školkařství*. [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: <https://www.vls.cz/cs/divize/skolkarstvi>

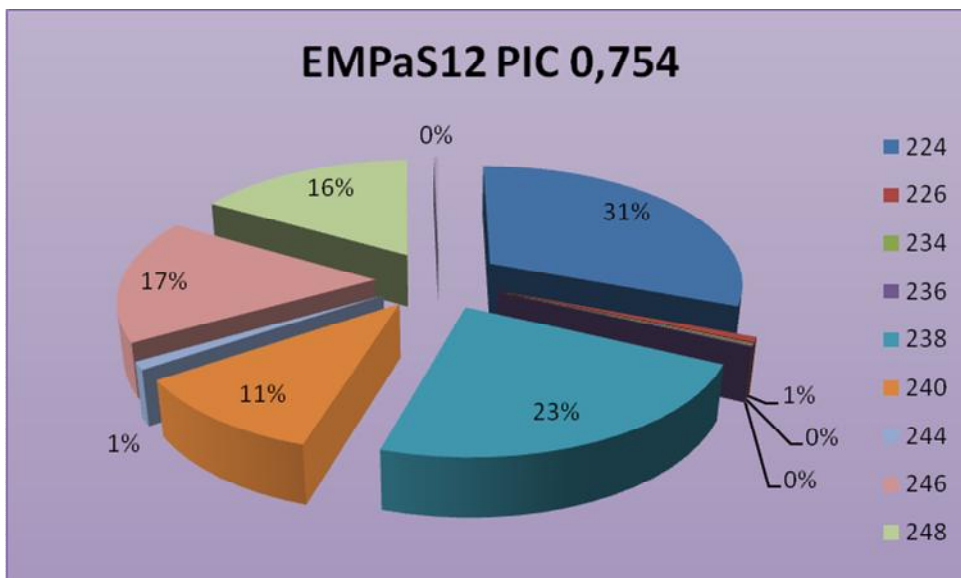
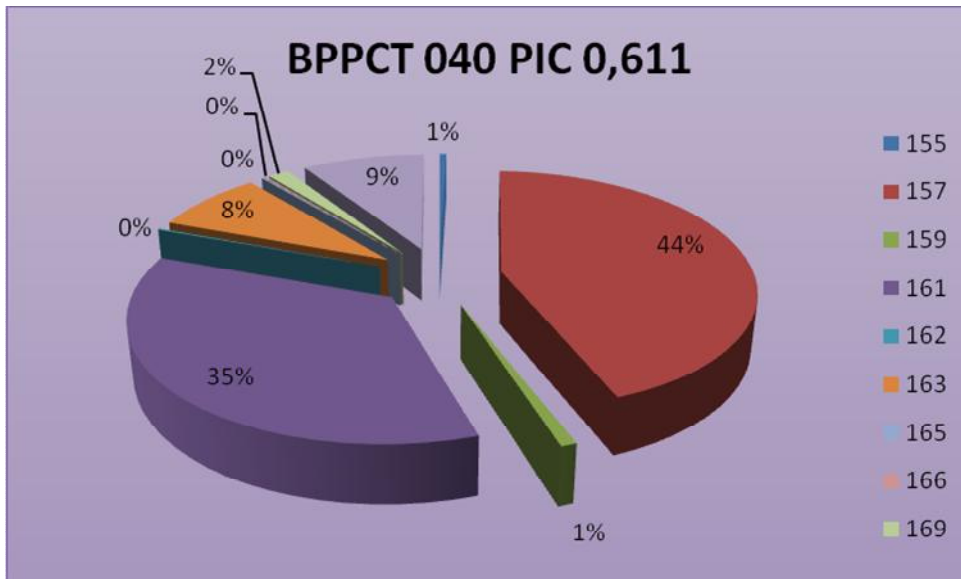
## 9 Přílohy

### Příloha 1-zastoupení genotypových délek amplifikací v jednotlivých lokusech

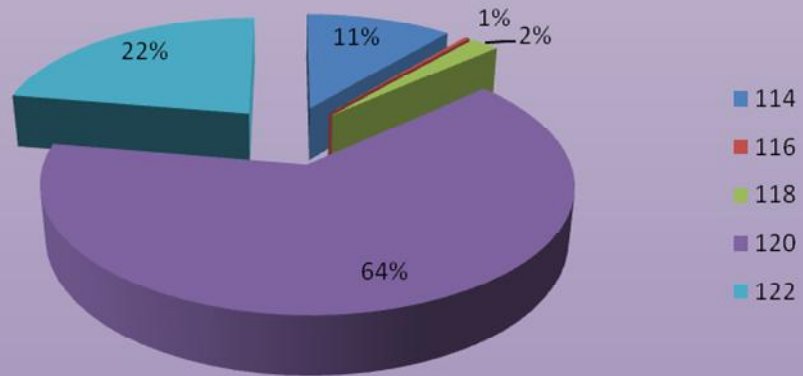
Hodnoty x tzv. nezjištěné byly pro názornější interpretaci vyloučeny z grafů.



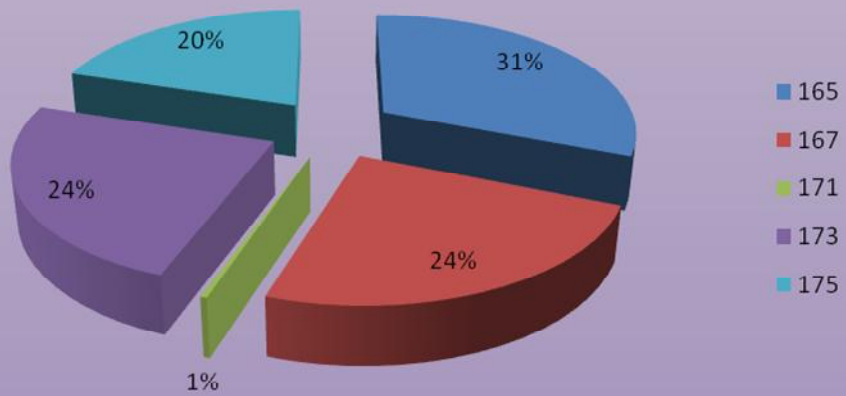


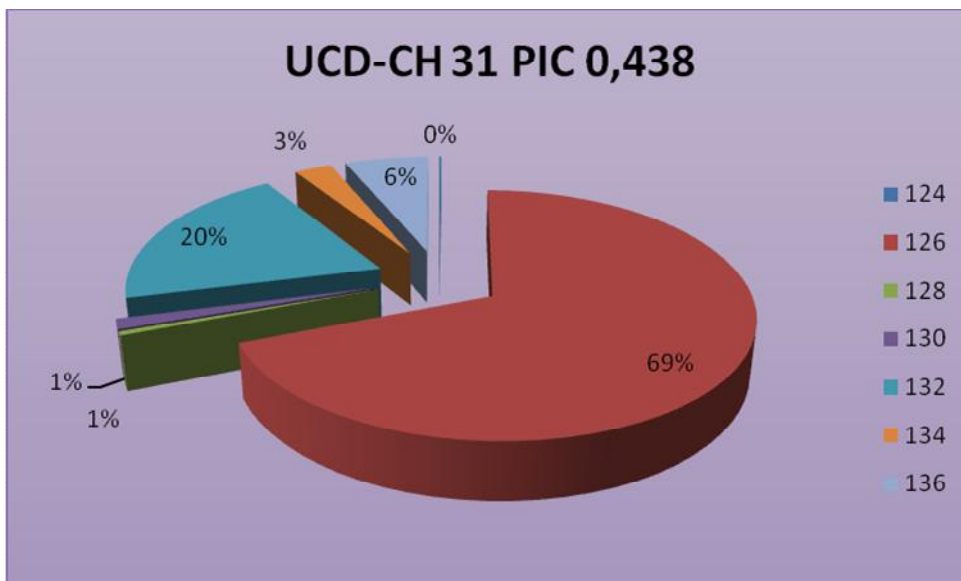
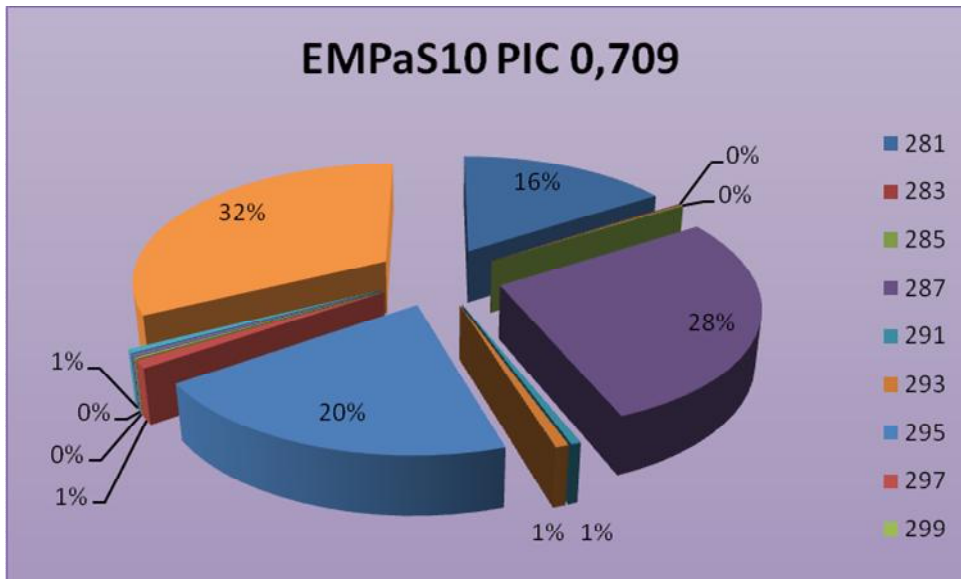


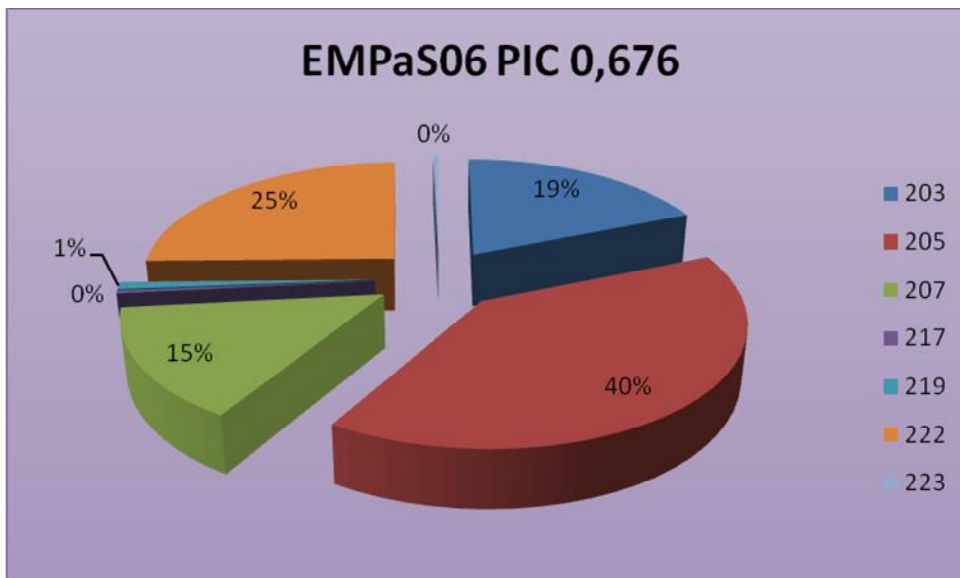
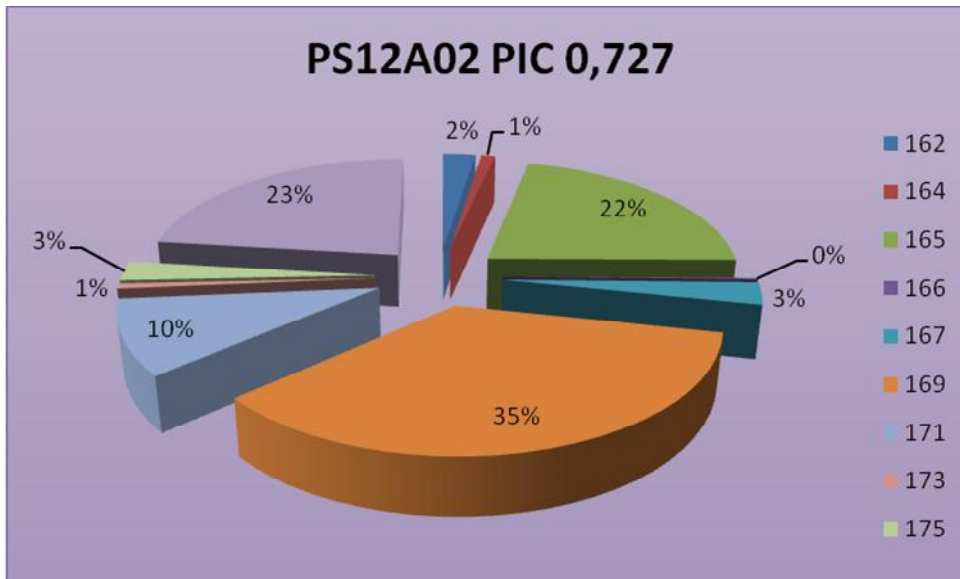
### UDP98-412 PIC 0,473

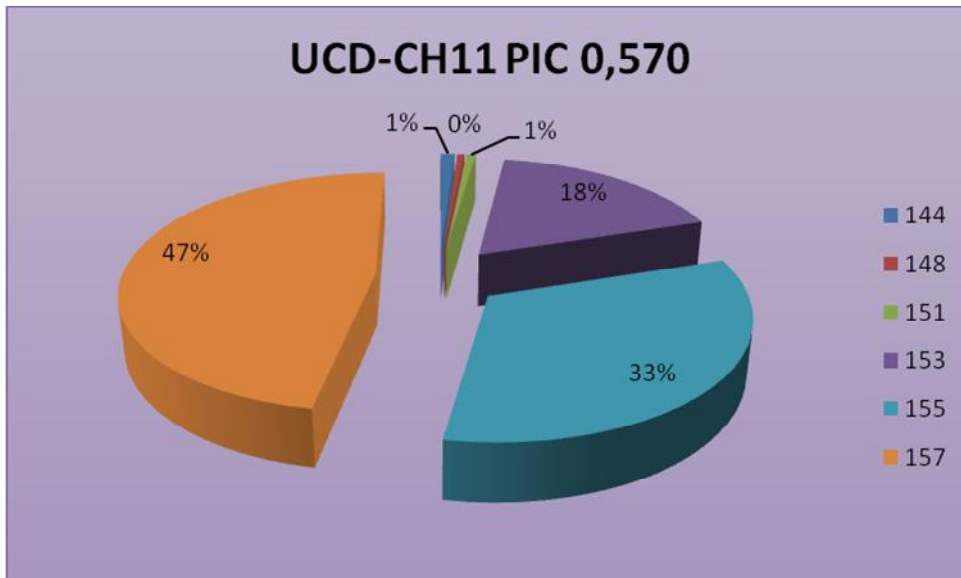
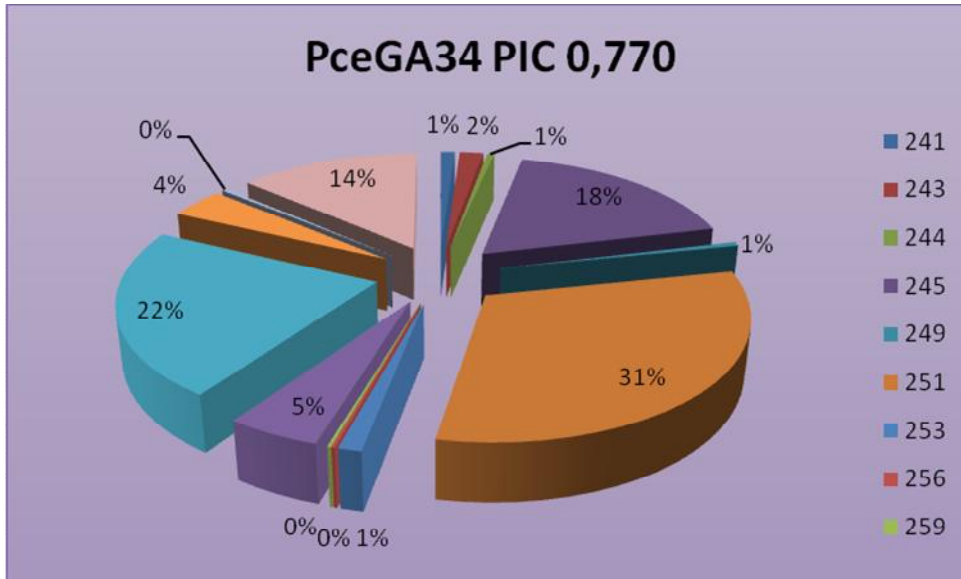


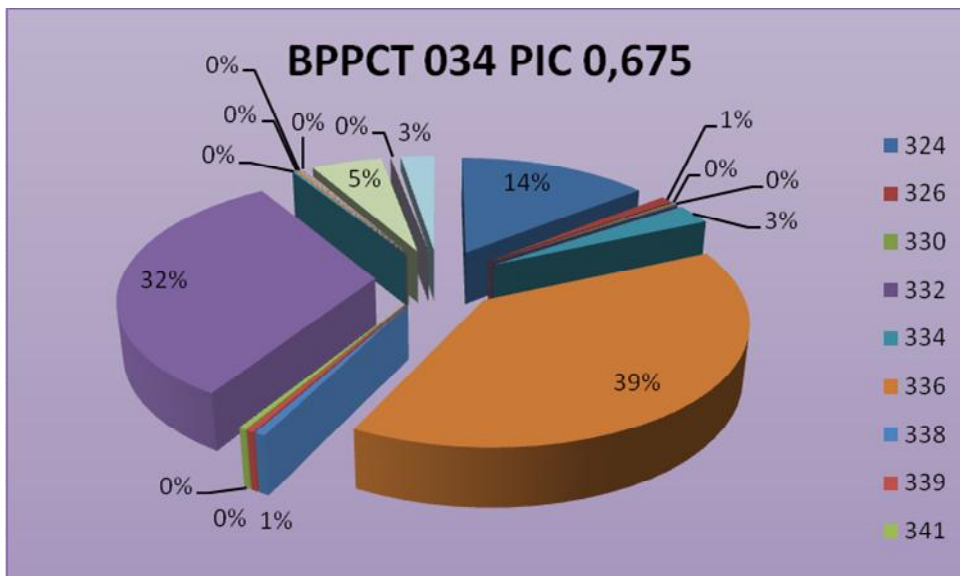
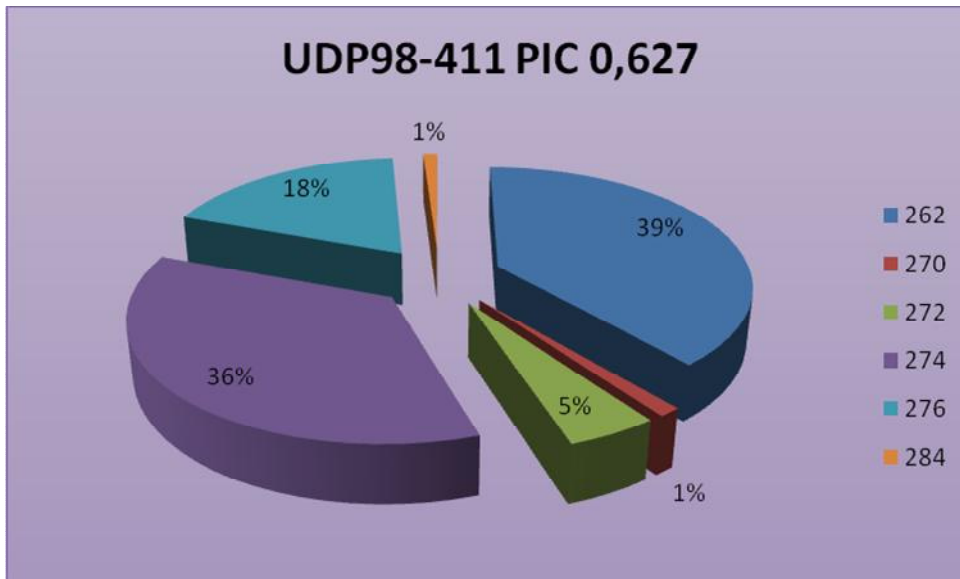
### EMPaS05 PIC 0,699





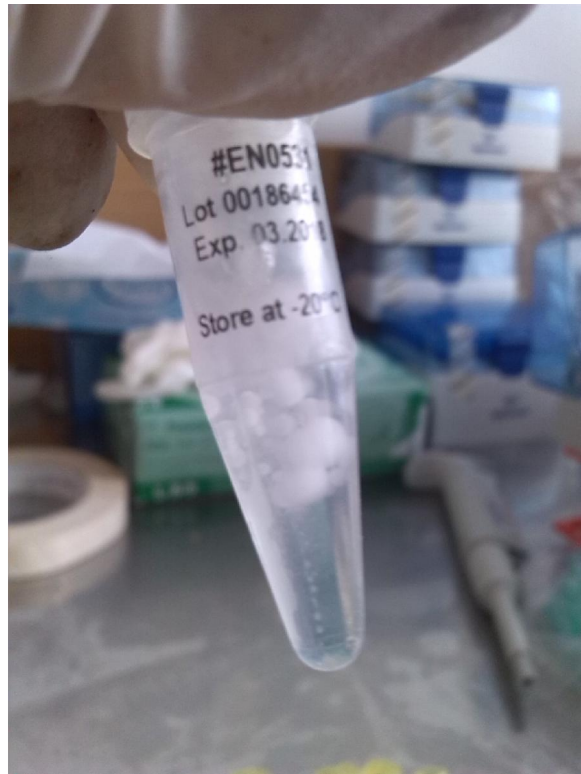






Příloha 2- fotografie z laboratoře, autor: Jirková Michaela







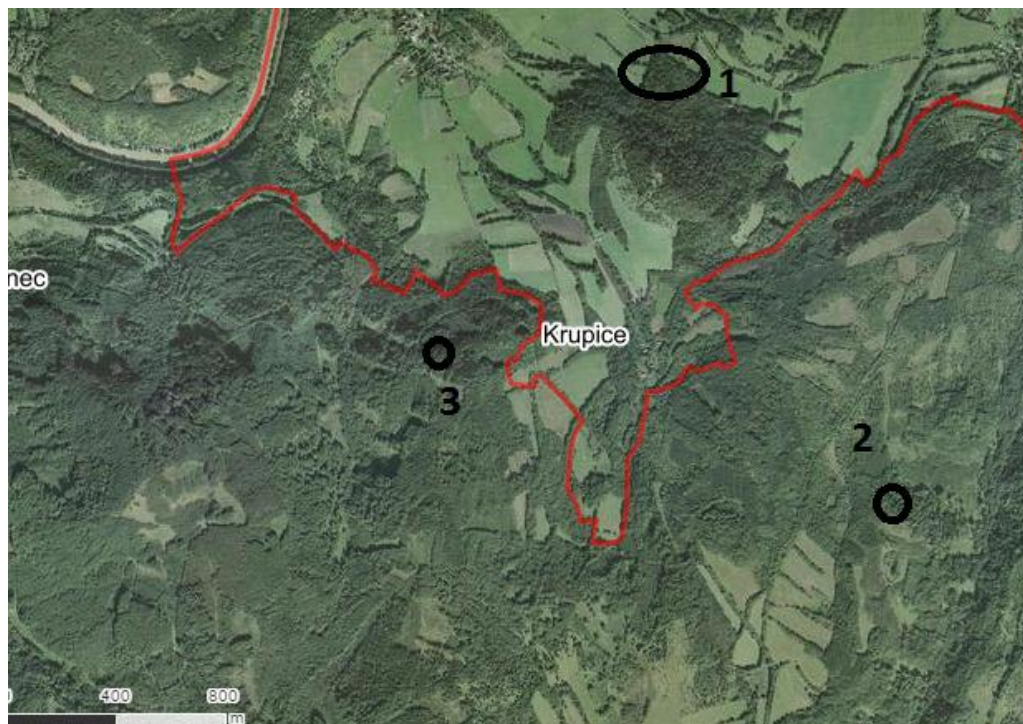
### Příloha 3 - rozmístění ramet klonů v sadu Obrovce

Semenný sad Obrovce- třešeň ptačí							
	6	5	4	3	2	1	
1			22	bez čísla	bez čísla		1
2	30	16	1	30	21	16	2
3	13	4	19	5	17	27	3
4	20	8	2	19	11	20	4
5	9	19	7	21	6	14	5
6	16	6	23	14	26	21	6
7	27	22	15	2	20	19	7
8	19	20	19	1	15	9	8
9	15	8	28	16	9	2	9
10	4	26	21	4	12	18	10
11	3	13	16	9	14	8	11
12	20	1	6	8	21	28	12
13	13	16	24	15	27	13	13
14	1	3	11	1		1	14
15	30	16	18	24	13	22	15
16	8	2	3	13	14	7	16
17	28	19	30	6	4	27	17
18	23	13	14	1	23	12	18
19	11	7	3		30	6	19
20	24	30	26	23	20	3	20
21	12	27	4	22	8	24	21
22	17	13	24	11	28	11	22
23	9	24	22	30	24	30	23
24	27	21	20	25	19	26	24
25	14	4	9	8	18	25	25
26	26	11	25	26	3	23	26
27	21	13	1	13	15	4	27
28	7	8	30	7	21	9	28
29	13	16	13	4	8	16	29
30	2	14	30	28	7	5	30
31	25	23	2	20	4	15	31
32	1	26	18	2	9	17	32
33	22	30	5	4	20	19	33
34	6	4	16	19	2	12	34
35	22	6	21	18	6	4	35
36	12	8	15	14	17	1	36
37	18	5	9	27	22	7	37
38	21	16	14	3	25	28	38
39	8	15	4	21	27	2	39
40	9	7	23	12	15	8	40
41	4	22	11	20	26	18	41
42	12	2	7	8	28	22	42
43	15	21	28	13	18	25	43
	6	5	4	3	2	1	
VRATA							
Inventura k:	1.1.2015						
Provedl:	Ing. Jaroslav Bergman						
CHYBÍ	Chybí čísla klonů	10					
		29					

Celkem 28 KLONŮ

#### Příloha 4- fotografie porostů Velichov

Porost č. 1- 121H000, porost č. 2 -107D000, porost č. 3 - 120C010.



pozn.: (každý klon testován na 16 lokusech, rozděleno do 2 tabulek po 8 lokusech) Příloha 5- ukázky genotypů potomků a rodičů

	EMPaS11		EMPaS02		BPPCT 040		EMPaS12		UDP98-412		EMPaS05		UDP97-403		EMPaS10	
1x1	76	76	146	146	157	161	224	248	122	122	165	173	0	0	310	310
1x11	76	76	146	146	157	161	224	224	122	122	165	175	196	196	310	310
1x12	76	76	143	146	161	161	224	224	122	122	165	175	224	224	287	310
1x18	76	76	146	146	161	161	224	246	120	120	167	175	196	196	287	295
1x19	67	76	146	146	161	165	224	248	118	120	165	173	197	197	281	287
1x3	67	76	143	146	157	157	248	248	120	120	173	175	212	212	295	310
1x4	67	76	146	146	157	161	224	248	120	120	165	173	196	224	287	310
1x5	67	76	146	146	157	157	224	248	120	120	167	173	196	196	295	310
1x8	67	76	146	146	157	159	248	248	120	120	165	175	196	196	287	297
1x9	76	76	146	146	157	161	224	248	120	120	165	173	200	200	287	310
20x1	76	76	146	146	161	163	224	246	120	122	165	165	219	219	295	310
20x10	76	76	146	146	157	161	224	240	122	122	165	173	219	219	310	310
20x11	76	76	143	146	161	161	224	238	120	122	165	173	219	219	295	310
20x12	76	76	146	146	161	161	246	248	120	122	165	173	219	219	287	295
20x15	67	76	146	146	163	163	238	246	120	120	165	167	200	219	281	310
20x16	67	76	143	146	161	163	240	246	120	120	165	165	216	218	281	281
20x4	67	86	146	146	161	163	238	246	120	122	173	175	218	218	281	310
20x5	67	76	143	146	157	163	240	246	120	120	165	173	200	218	281	310
20x6	67	76	143	146	161	161	238	240	120	120	173	175	219	219	281	287
20x9	67	67	146	146	157	163	224	246	114	122	165	167	224	224	281	281
21x1	67	76	146	146	161	163	224	246	122	122	165	173	198	218	281	310
21x10	76	76	143	146	157	161	224	246	120	122	173	173	200	218	295	310
21x13	67	76	143	146	157	161	238	238	120	120	165	165	219	219	295	310
21x16	67	67	146	146	161	171	224	238	120	120	167	173	200	219	295	295
21x20	67	67	144	146	157	163	246	246	120	120	165	175	218	218	281	281
21x4	67	67	146	146	163	171	246	246	122	122	165	175	200	218	281	287
21x5	76	76	146	146	157	163	238	240	120	122	167	173	200	219	281	287
21x6	76	76	143	146	157	163	240	246	120	120	165	165	200	218	281	310
21x8	76	76	146	146	157	163	240	246	114	122	165	173	218	218	281	310

	UCD-CH 31		PS12A02		EMPaS06		PceGA34		UCD-CH11		UCD-CH12		UDP98-411		BPPCT 034	
<b>1x1</b>	126	126	162	169	203	205	270	270	155	157	184	184	262	274	324	343
<b>1x11</b>	126	126	162	171	205	205	251	270	157	157	178	182	276	276	0	0
<b>1x12</b>	126	126	162	179	207	207	270	270	155	157	178	178	262	262	324	343
<b>1x18</b>	126	126	162	179	207	207	245	270	155	155	184	184	262	274	0	0
<b>1x19</b>	126	130	169	171	205	207	251	270	155	157	195	195	274	276	343	355
<b>1x3</b>	126	130	162	169	205	222	270	270	155	157	199	199	262	274	324	336
<b>1x4</b>	126	130	162	169	203	205	270	270	155	157	178	178	262	262	324	339
<b>1x5</b>	126	132	169	175	205	205	251	270	155	157	182	182	262	276	343	355
<b>1x8</b>	126	130	169	173	207	207	251	251	155	155	182	182	0	0	0	0
<b>1x9</b>	126	126	165	165	205	207	245	270	155	157	178	178	262	276	343	343
<b>20x1</b>	126	126	162	179	207	222	264	264	155	157	177	177	262	262	336	336
<b>20x10</b>	126	126	165	179	205	222	251	251	157	157	178	197	274	276	343	343
<b>20x11</b>	126	126	162	169	203	222	262	262	153	155	177	197	262	262	336	336
<b>20x12</b>	126	126	165	165	203	207	245	262	153	153	184	197	262	274	336	336
<b>20x15</b>	126	132	167	167	207	219	264	264	153	155	197	199	262	276	326	336
<b>20x16</b>	132	136	165	169	203	207	262	262	155	155	197	197	262	262	334	336
<b>20x4</b>	126	132	169	169	203	207	251	264	155	157	197	197	262	272	336	336
<b>20x5</b>	126	132	165	171	205	207	262	262	155	155	197	197	262	262	336	336
<b>20x6</b>	126	136	171	171	203	222	251	264	155	157	197	197	262	276	336	343
<b>20x9</b>	126	134	169	179	207	207	262	262	144	155	0	0	262	274	336	336
<b>21x1</b>	126	136	179	179	207	207	245	262	153	153	184	197	262	274	336	336
<b>21x10</b>	126	126	179	179	203	222	251	262	153	157	197	197	262	274	336	336
<b>21x13</b>	126	126	171	171	203	205	262	264	157	157	197	197	262	262	336	336
<b>21x16</b>	126	126	165	179	203	222	251	264	157	157	178	197	262	274	336	336
<b>21x20</b>	126	126	165	179	205	207	262	262	153	153	184	197	262	274	336	336
<b>21x4</b>	126	136	165	169	203	222	251	264	155	157	184	197	262	276	336	357
<b>21x5</b>	126	132	165	171	205	207	262	262	155	155	197	197	262	262	336	336
<b>21x6</b>	126	126	165	171	205	207	262	264	157	157	197	197	262	274	336	336
<b>21x8</b>	126	126	169	169	205	207	251	264	157	157	197	197	262	274	336	343

	EMPaS11		EMPaS02		BPPCT 040		EMPaS12		UDP98-412		EMPaS05		UDP97-403		EMPaS10	
<b>17A_18Ab</b>	76	76	146	146	157	161	224	224	120	122	165	173	196	224	281	295
<b>19Ab</b>	76	76	146	146	157	171	238	246	120	120	167	175	196	219	281	295
<b>1Ab</b>	76	76	143	146	157	161	224	248	120	122	173	175	198	224	287	310
<b>20B_21A</b>	76	76	146	146	157	157	238	248	120	120	175	175	198	200	281	310
<b>20A_21B_2A</b>	67	76	146	146	161	163	238	246	120	122	165	173	218	218	281	295
<b>2B</b>	67	76	146	146	157	157	224	238	114	120	167	175	198	219	281	295
<b>30Ab</b>	67	76	143	146	157	171	224	246	120	120	167	173	200	200	295	310
<b>3A</b>	76	76	143	146	157	161	224	224	120	122	165	175	0	0	287	287
<b>4_5AB</b>	76	76	143	146	157	161	224	248	120	122	167	173	198	219	287	310
<b>6Ab</b>	76	76	146	146	157	161	224	248	114	120	165	175	196	196	287	310
<b>7Ab</b>	67	76	146	146	157	161	224	246	114	120	167	175	218	224	281	295
<b>8Ab</b>	67	76	143	146	157	161	238	240	120	122	173	175	219	219	287	310
<b>9Ab_3B</b>	76	76	146	146	157	157	240	246	120	122	167	173	196	219	287	310

	UCD-CH 31		PS12A02		EMPaS06		PceGA34		UCD-CH11		UCD-CH12		UDP98-411		BPPCT 034	
<b>17A_18Ab</b>	126	132	169	169	203	222	251	262	157	157	182	197	262	276	343	357
<b>19Ab</b>	132	136	169	179	205	222	262	262	153	155	201	201	262	262	336	336
<b>1Ab</b>	126	126	162	171	205	207	251	270	157	157	178	184	262	276	324	343
<b>20B_21A</b>	132	132	169	171	203	203	251	262	157	157	178	199	262	276	343	355
<b>20A_21B_2A</b>	126	136	165	165	203	207	262	264	153	155	184	197	262	262	336	336
<b>2B</b>	126	136	171	179	205	207	243	243	157	157	184	199	276	276	336	355
<b>30Ab</b>	126	126	179	179	222	222	251	251	157	157	178	178	274	274	324	336
<b>3A</b>	126	126	165	165	207	222	251	270	153	153	197	199	274	276	324	336
<b>4_5AB</b>	126	126	165	179	205	207	245	262	157	157	184	197	262	274	336	343
<b>6Ab</b>	126	126	165	169	207	222	245	245	157	157	184	184	262	274	336	343
<b>7Ab</b>	126	134	179	179	205	222	241	245	144	155	178	184	262	274	336	343
<b>8Ab</b>	126	126	171	179	205	222	251	251	157	157	178	197	276	276	343	343
<b>9Ab_3B</b>	126	126	165	179	205	205	245	245	157	157	178	184	262	274	336	343

## Příloha 6- mapa geologického umístění lesní školky Lhota

(pěstování potomků ze sadu Obrovice)



**Příloha 7- ukázka průměrné koncentrace klonů**

	sazenice	µg/ml	260/280	260/230	sazenice	µg/ml	260/280	260/230	Sazenice	µg/ml	260/280	260/230	sazenice	µg/ml	260/280	260/230
<b>klon 1</b>	<b>9</b>	140	1,81	1,04	<b>5</b>	125	1,47	0,82	<b>4</b>	257	1,83	0,31	<b>2</b>	209	1,8	0,27
<b>klon 2</b>	<b>15</b>	299	1,79	0,56	<b>1</b>	433	1,16	0,84	<b>5</b>	307	1,38	0,56	<b>12</b>	35	1,45	1,75
<b>klon 3</b>	<b>8</b>	74	1,7	1,01	<b>5</b>	136,5	1,04	0,25	<b>3</b>	70	1,52	0,44	<b>9</b>	84	1,52	0,47
<b>klon 4</b>	<b>13</b>	479	1,84	0,74	<b>12</b>	399	1,46	0,64	<b>14</b>	427	1,79	0,49	<b>18</b>	285	1,77	0,3
<b>klon 5</b>	<b>14</b>	479	1,74	0,54	<b>1</b>	481	1,75	0,6	<b>20</b>	162	1,89	1,5	<b>12</b>	369	1,76	0,39
<b>klon 7</b>	<b>2</b>	182	1,11	0,31	<b>13</b>	108	1,45	0,57	<b>15</b>	187	1,68	0,68	<b>18</b>	505	1,78	0,54
<b>klon 8</b>	<b>10</b>	84,6	1,09	0,43	<b>11</b>	112	1,6	0,89	<b>9</b>	307	1,8	0,55	<b>4</b>	98	1,62	0,62
<b>klon 9</b>	<b>2</b>	185	1,22	0,3	<b>1</b>	420	1,07	0,9	<b>4</b>	46	1,47	1,27	<b>6</b>	48	1,6	0,39
<b>klon 10</b>	<b>2</b>	26	1,78	0,87	<b>20</b>	122	1,58	0,6	<b>7</b>	29,5	1,63	0,51	<b>11</b>	401	1,89	0,65
<b>klon 11</b>	<b>2</b>	30	1,53	0,27	<b>20</b>	222,5	1,75	0,74	<b>7</b>	162	1,86	0,62	<b>16</b>	237	1,71	0,45
<b>klon 12</b>	<b>12</b>	238	1,93	1,4	<b>10</b>	67,6	1,77	0,69	<b>9</b>	248	1,63	0,93	<b>2</b>	444,7	1,09	1,07
<b>klon 13</b>	<b>3</b>	462,5	1,84	0,54	<b>1</b>	225	1,84	0,67	<b>4</b>	116	1,51	0,72	<b>10</b>	297	1,68	0,99
<b>klon 14</b>	<b>20</b>	288,8	1,72	0,36	<b>13</b>	418	1,74	0,44	<b>9</b>	548,8	1,63	0,6	<b>8</b>	194	1,57	0,29
<b>klon 15</b>	<b>1</b>	36	1,52	0,62	<b>12</b>	309	1,77	0,71	<b>19</b>	403	1,56	0,88	<b>20</b>	83	1,3	0,32
<b>klon 17</b>	<b>12</b>	459	1,71	0,35	<b>4</b>	108	1,7	0,69	<b>7</b>	152	1,57	0,43	<b>15</b>	308	1,65	0,57
<b>klon 18</b>	<b>18</b>	226	1,78	0,25	<b>15</b>	84	1,66	0,85	<b>14</b>	127	1,08	0,41	<b>16</b>	188	1,68	0,94
<b>klon 19</b>	<b>13</b>	148	1,44	0,41	<b>10</b>	310	1,73	0,86	<b>12</b>	257	1,87	1,19	<b>16</b>	279	1,77	0,37
<b>klon 20</b>	<b>16</b>	92	1,87	0,45	<b>10</b>	165	1,79	1,11	<b>9</b>	337	1,04	0,54	<b>1</b>	52	1,6	1,14
<b>klon 21</b>	<b>6</b>	317,5	1,9	0,52	<b>10</b>	65	1,33	43	<b>8</b>	243	1,71	0,7	<b>1</b>	135,8	1,77	1,27
<b>klon 22</b>	<b>11</b>	108	1,49	0,54	<b>18</b>	228,8	1,81	0,88	<b>4</b>	240	1,64	0,36	<b>8</b>	516	1,6	0,6
<b>klon 23</b>	<b>3</b>	72	1,68	0,9	<b>14</b>	256	1,83	0,44	<b>18</b>	220	1,76	0,38	<b>20</b>	43,6	1,04	0,29
<b>klon 24</b>	<b>5</b>	173,8	1,6	0,88	<b>6</b>	142	1,87	0,99	<b>9</b>	449	1,84	0,63	<b>12</b>	380,5	1,67	0,49
<b>klon 25</b>	<b>7</b>	345	1,81	0,48	<b>1</b>	103	1,65	1	<b>19</b>	117	1,65	0,64	<b>12</b>	377	1,63	0,4
<b>klon 26</b>	<b>9</b>	469	1,84	0,36	<b>7</b>	62	1,76	0,65	<b>6</b>	27,5	1,48	0,72	<b>8</b>	18,2	1,75	0,41