

# GENETICKÁ VARIABILITA VYBRANÝCH POROSTŮ SMRKU ZTEPILÉHO Z JESENÍKŮ, ORLICKÝCH A KRUŠNÝCH HOR

THE GENETIC VARIABILITY OF SELECTED NORWAY SPRUCE STANDS IN THE JESENÍKY MTS., ORLICKÉ HORY MTS. AND KRUŠNÉ HORY MTS. (CZECH REPUBLIC)

HELENA CVRČKOVÁ ✉ - PAVLÍNA MÁCHOVÁ - OLGA TRČKOVÁ

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady 136, 252 02 Jíloviště, Czech Republic

✉ e-mail: cvrckova@vulhm.cz

## ABSTRACT

The genetic structure of selected Norway spruce stands from the Jeseníky Mts., Orlické hory Mts., and Krušné hory Mts. (Czech Republic) was studied to verify the genetic quality. The genetic variability of tree populations ensures the stability and sustainability of forest ecosystems. DNA polymorphism at twelve nuclear microsatellites of fourteen Norway spruce stands was investigated. The level of genetic diversity within 14 investigated Czech Norway spruce stands was relatively high. Mean values for number of different alleles ranged from 12.25 (stand SM J51) to 15.92 (stand SM T1). The values of observed heterozygosity ( $H_o$ ) ranged from 0.65 to 0.81, and expected heterozygosity ( $H_e$ ) from 0.81 to 0.86. Pairwise population  $F_{ST}$  values ranging from 0.007 to 0.030 indicated low genetic differentiation between units, and values of Nei's genetic distance among Norway spruce units ranged from 0.083 to 0.313. The structuring of investigated Norway spruce stands was also confirmed by different ratios of genetic profiles according to the Bayesian clustering method results. Closer genetic similarity was seen in the stands from the gene conservation unit in the Orlické hory than in other studied stands. The most genetically different stand was from the Krušné hory. Knowledge based on DNA analyses regarding the variability of genetic resources will contribute to the quality of the reproduction material and to creation of an optimal species composition in forests.

For more information see Summary at the end of the article.

**Klíčová slova:** smrk ztepilý; mikrosatelity; DNA analýzy; genetická diverzita

**Key words:** Norway spruce; microsatellites; DNA analyses; genetic diversity

## ÚVOD

Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karsten) zařazený do čeledi *Pinaceae* je z hlediska hospodářského využití nejvýznamnějším druhem jehličnaté dřeviny střední a severní Evropy. Historie jeho plošného rozšíření sahá již do dob rozvoje skláren a hutí, kdy se druhotně rozšiřoval na vznikajících pasekách původních jedlo-bukových porostů. Umožnila mu to především jeho vyšší schopnost růstu na obnažených plochách bez ochrany mateřského porostu z důvodu vyšší odolnosti k mrazu. Šíření smrku na úkor listnáčů také napomáhala i trvalé odstraňování listnatého steliva, ve kterém semena smrku obtížně klíčí a semenáčky špatně rostou. Později byl šířen záměrně i pod spodní hranicí svého výskytu a již v první polovině 19. století se svým rychlým růstem a hlavně technickými přednostmi dřeva stal hlavní hospodářskou dřevinou, která ovládla dřevařský trh (SVOBODA 1953). V posledních desetiletích bylo lesnickým záměrem omezit smrkové porosty a dosáhnout vyvážené proporce mezi listnatými a jehličnatými dřevinami

za účelem zachování druhově vyvážených zdravých lesních porostů. Vlivem dramatických klimatických změn posledních let především z nedostatku vláhy naopak začalo docházet k hromadnému napadání suchem oslabeného smrku lýkožroutem smrkovým a především na území Moravy vznikají kalamitní holiny. Smrk ztepilý je dřevinou velkých rozměrů, s relativně mělkou povrchovou kořenovou soustavou. Je značně náročný na půdní vlhkost a vyžaduje i vyšší relativní vlhkost vzduchu. Citlivější je k vysokým teplotám a na znečištění ovzduší. Nedostatek vláhy je limitujícím faktorem jeho dobrého růstu (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Pro zachování genových zdrojů lesních porostů musí probíhat v dostatečné míře přirozená regenerace, která souvisí s adaptačním potenciálem původních stromů (NOWAKOWSKA et al. 2014). Obecně se předpokládá, že populace vyznačující se nízkou genetickou rozmanitostí by mohly být podstatně citlivější na změny životního prostředí, napadení chorobami a škůdci (MAGHULY et al. 2006). Genetická rozmanitost a biodiverzita populací lesních dřevin

je zásadní podmínkou pro přizpůsobení se změnám klimatu (HAMPE, PETIT 2005; NEALE, KREMER 2011) a zajištění stability lesních ekosystémů (WHITHAM et al. 2006; NOWAKOWSKA et al. 2014). Morfologické znaky smrku ztepilého na území ČR jsou značně proměnlivé, odchylky jsou i ve vlastnostech biologických, např. ve fenologii, v odolnosti vůči chorobám, škůdcům a vlivu imisí, zejména oxidu siřičitého (HEJNÝ, SLAVÍK 1988). Znalosti založené na analýze DNA, pokud jde o ověření genetické variability, přispějí ke kvalitě reprodukčních zdrojů. U smrku ztepilého bylo již provedeno mnoho genetických studií pomocí izoenzymů (GEBUREK 1999; KONNERT 2009) a analýz jaderných, mitochondriálních a chloroplastových DNA markerů (PFEIFFER et al. 1997; VENDRAMIN et al. 2000; SCHUBERT et al. 2001; BOZHKO et al. 2003; MAGHULY et al. 2008; TOLLEFSRUD et al. 2009; UNGER et al. 2011; CVJETKOVIĆ et al. 2017).

V rámci této studie byly pro ověřování polymorfismu vybraných porostů smrku ztepilého zvoleny jaderné mikrosatelity, nuclear simple sequence repeats (nSSR) markery, které se široce využívají pro hodnocení genetické diversity populací lesních dřevin. Vyznačují se vysokým stupněm polymorfismu a kodominantním charakterem, který umožňuje sledovat v populacích zastoupení heterozygotů. Mikrosatelity jsou složeny z mnohokrát se opakujících krátkých motivů nukleotidů zpravidla 2–4 báze dlouhých a jejich polymorfismus je dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu nukleotidů. Cílem studie bylo na základě analýz DNA s využitím jaderných mikrosatelitových markerů ověřit úroveň genetické rozmanitosti, heterozygotnosti a dalších genetických charakteristik u vybraných smrkových porostů z horských oblastí Orlických hor, Jeseníků a Krušných hor.

## MATERIÁL A METODIKA

Genetické šetření bylo provedeno u 14 vybraných porostů smrku ztepilého, pocházejících z Krušných hor, Orlických hor a Jeseníků. V Orlických horách bylo hodnocení provedeno v genové základně GZ 102 na dospělých porostech ze tří centrálních částí Trčkov – Šerlišský kotol – Vrchmezi s označením SM T1, SM S1, SM V1 a porostech jejich přirozeného zmlazení s označením SM T4, SM S4, SM V4. Z CHKO Jeseníky byly hodnoceny autochtonní smrkové porosty ze 7 lokalit SM J03 (Ovčárna), SM J11 (Májová), SM J14 (Břidličná), SM J25 (Šerák), SM J51 (Praděd), SM J92 (Skřítek) a SM J94 (Rejvíz). Z Krušných hor byl geneticky prověřován již vegetativní cestou přemnožený porost (SM KH) rostoucí v podmínkách *ex situ* na lokalitě ve středních Čechách, založený z odolných jedinců vůči imisím, kteří se už na původním stanovišti nevyskytují. Genetické parametry zkoumaných porostů byly získány na základě fragmentačních analýz mikrosatelitových lokusů. Izolace DNA z jednotlivých stromů probíhala z jehlic odebraných v jarním období s využitím kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN (Qiagen, Hilden, Germany). Výchozí navážka rostlinného materiálu byla pod 100 mg u zamražených jehlic a 20 mg u lyofilizovaných jehlic, které byly před vlastní izolací rozdrceny na prášek za použití tekutého dusíku. Koncentrace a kvalita vyzolované DNA byla ověřena spektrofotometricky přístrojem Nanophotometer (Implen). Fragmentační analýzy mohou probíhat až po amplifikaci mikrosatelitových lokusů s fluorescenčně značenými primery. K tomuto účelu probíhaly optimalizace podmínek polymerázových řetězových reakcí (PCR) s příslušnými primery zvolených mikrosatelitových markerů, jejichž sekvence byly vyhledány na základě studia literárních zdrojů. Z testovaných mikrosatelitových markerů bylo pro získání genetických charakteristik vybráno 12 dostatečně polymorfních jaderných mikrosatelitových lokusů PAAC23, PAAC19 z publikace SCOTTI et al. (2000), EATC1B02 z publikace SCOTTI et al. (2002), SpAGD<sub>1</sub>, SpAGG<sub>3</sub>, SpAGC<sub>2</sub>, SpAG<sub>2</sub> z publikace MELNIKOVA et al. (2012), WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13 a WS0023.B03 z publikace RUNGIS et al. (2004). Kromě markeru EATC1B02 s třínukleotidovou

repeticí mají ostatní markery charakter dvounukleotidových motivů. Markery PAAC23, PAAC19, EATC1B02, WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03 byly odvozeny z kódující oblasti jaderného genomu (expressed sequence tags – simple sequence repeats). Zoptimalizované postupy PCR amplifikace poskytovaly reprodukovatelné jednoznačné velikosti alel studovaných lokusů. Pro zefektivnění genetických analýz probíhaly amplifikace s ohledem na velikost alel a charakter reakčních podmínek v multiplexech. Specifické primery byly fluorescenčně označeny (6FAM, VIC, NED, PET). Amplifikační reakce každého lokusu obsahovala 1 µl templátové DNA (≈10–50 ng/µl). V rámci prvního multiplexu byla provedena amplifikace lokusů PAAC19, PAAC23, SpAGD<sub>1</sub>, EATC1B02. PCR probíhala pro každý vzorek v celkovém objemu 15 µl s použitím polymerázy Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) a s dalšími komponenty, 1,5 µl 10xPCR pufr, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM směsi dNTP, 0,37 jednotek Platinum Taq DNA Polymerase, koncentrace specifických forward i reverse primerů byla 0,1 µM k lokusům PAAC19, SpAGD<sub>1</sub> a 0,2 µM k lokusům PAAC23, EATC1B02. Sterilní ultračistou vodou (Sigma – Aldrich) byla reakční směs doplněna do objemu 15 µl. Teplotní profil PCR byl 3 minuty 94 °C pro počáteční denaturaci, následovalo 37 cyklů se střídáním teplot 94 °C, 57 °C (annealingová teplota), 72 °C, perioda každé teploty byla 45 sekund. Amplifikace byla zakončena teplotou 72 °C po dobu 20 minut. Složení PCR reakčních komponent pro společnou amplifikaci dalších dvou lokusů SpAGC<sub>2</sub>, SpAGG<sub>3</sub> (druhý multiplex) bylo odlišné od reakční směsi prvního multiplexu pouze v koncentraci 0,067 mM směsi dNTP. Teplotní profil PCR byl 94 °C, trvající 5 minut pro počáteční denaturaci, následovalo 35 cyklů se střídáním teplot 94 °C 45 sec., 58 °C (annealingová teplota) 40 sec., 72 °C 45 sekund. Finální elongační fáze probíhala při teplotě 72 °C po dobu 15 minut. Amplifikace lokusů WS00716.F13 a WS0022.B15 třetího multiplexu byla provedena s využitím amplifikačního kitu Type-it<sup>®</sup> Microsatellite PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) v celkovém objemu 15 µl na jeden vzorek. Koncentrace forward i reverse primerů byla 0,1 µM. Teplotní podmínky PCR spočívaly v 15minutové počáteční denaturaci při teplotě 95 °C, po které následovalo 26 cyklů s teplotami 94 °C po dobu 30 sekund, 53 °C 90 sekund, 72 °C 30 sekund. Závěrečná elongační fáze pro dokončení řetězců trvala 30 minut při teplotě 60 °C. Poslední amplifikace (čtvrtý multiplex) probíhala u zbývajících lokusů WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03, SpAG<sub>2</sub> se stejnými PCR podmínkami jako pro lokusy WS00716.F13, WS0022.B15, lišila se pouze annealingová teplota, která byla 55 °C. Koncentrace primerů byly 0,1 µM s výjimkou forward a reverse primerů k lokusu SpAG<sub>2</sub>, které byly naředěny na koncentraci 0,05 µM. Amplifikace byly provedeny v teplotním cyklovači Veriti thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

PCR produkty byly podle jejich velikosti separovány kapilární elektroforézou na genetickém analyzátoru Applied Biosystem 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Velikosti alel v hodnotách párů bází byly odečteny pomocí softwarového programu GeneMapper<sup>®</sup> 4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s využitím velikostního standardu GeneScan<sup>™</sup> 600LIZ<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), který je přidáván ke každému vzorku pro stanovení kalibrační křivky. Pro kontrolu velikostí odečtených hodnot mikrosatelitových lokusů, včetně ohodnocení frekvence nulových alel, byl použit software Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004). Pro zhodnocení genetických parametrů smrkových porostů byla data mikrosatelitových lokusů statisticky zpracována s využitím programu GenAlEx 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012). Získané parametry genetické diversity byly počet rozdílných alel, Shannonův informační index, hodnoty pozorované a očekávané heterozygotnosti, fixační index (F), který byl kalkulován jako  $F = 1 - (Ho/He)$  podle WRIGHTA (1965), Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972), analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis, PCoA), míry vzájemné genetické diference pomocí koeficientu inbreedingu

( $F_{ST}$ ), toky genů ( $N_m$ ) a odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. U sledovaných smrkových porostů bylo dále zjišťováno, zda u nich dochází ke strukturování. K odvození populační struktury sledovaných smrkových porostů s využitím multilokusových genetických dat byla použita Bayesianská metoda implementovaná v softwaru STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009). Nastavené parametry v softwaru byly směsný model, korelované alelické frekvence, 10 000 Length of Burn-in Period, 100,000 Markov chain Monte Carlo (MCMC), počet klastrů (K) od 1 do 10, každý s deseti opakováními. Vzhledem k nízkým hodnotám  $F_{ST}$  (vzájemné diferenciacce mezi porosty) byl nastaven model Lock prior. Optimální hodnota K (počet klastrů) byla zjištěna pomocí programu STRUCTURE HARVESTER (EARL, HOLDT 2012).

## VÝSLEDKY

U 14 vybraných porostů smrku ztepilého pocházejících z horských oblastí Krušných hor, Orlických hor a Jeseníků, byly na základě analýz 12 mikrosatelitových lokusů získány genetické parametry. Byly hodnoceny hladiny genetické diverzity, heterozygotnosti a genetické vzdálenosti hodnocených porostů jak v rámci jednotlivých horských oblastí, tak i mezi oblastmi. U genové základny z Orlických horách byly hodnoceny genetické charakteristiky u dospělých porostů a jejich přirozeného zmlazení. Vybrané mikrosatelitové markery poskytovaly po optimalizaci amplifikačních podmínek jednoznačné a reprodukovatelné velikosti lokusů u jednotlivých hodnocených stromů. Rozmezí velikostí alel u sledovaných lokusů a další genetické charakteristiky sledovaných lokusů jsou uvedeny v tab. 1. Počty alel u studovaných lokusů, získaných analýzami 443 smrků, se pohybovaly od 9 do 37, což potvrzuje dostatečnou až vyšší hladinu polymorfismu jak vybraných markerů, tak studovaných smrkových porostů. Nejvíce polymorfni byl lokus SpAGD<sub>1</sub>, nejméně WS0073.H08. Hodnoty očekávané heterozygotnosti ( $H_e$ ), představující podíl očekávaných heterozygotů za předpokladu Hardy-Weinbergovy rovnováhy, se pohybovaly od 0,57 do 0,93 a nejvyšší hodnoty dosáhly lokusy SpAGD<sub>1</sub> a WS00111.K13. Pozorovaná četnost heterozygotů ( $H_o$ ) u sledovaných markerů se pohybovala v širším intervalu od 0,35 u lokusu SpAGC<sub>2</sub> do 0,95 u lokusu WS0023.B03. Další zhodnocení genetické diverzity vyjádřené pomocí Shannonova informačního indexu (I) v sobě odráží i rovnoměrnou distribuci alelových frekvencí. Hodnoty se pohybovaly od 1,08 v lokusu EATC1B02 do 2,80 v lokusu WS00111.K13.

Významné odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy ( $P < 0.001$ ), založené na výpočtech chí-kvadrát testu, se ukázaly v lokusu PAAC19 ve všech porostech s výjimkou porostu SM V4, v lokusu PAAC23 byly významné odchylky pouze v porostu SM T4, v lokusu SPAGD<sub>1</sub> ve všech porostech s výjimkou porostu SM KH, v lokusu EATC1B02 v porostech SM T1, SM V1, SM V4, v lokusu SpAGC<sub>2</sub> ve všech porostech, v lokusu SpAG<sub>2</sub> ve 4 porostech SM S1, SM T4, SM V4 a SM J11. U lokusů PAAC19, SpAGD<sub>1</sub>, SpAGC<sub>2</sub> se také ukázaly vyšší kladné hodnoty fixačního indexu (F) signalizující přebytek homozygotů. Získaná data alel ze všech sledovaných smrkových porostů byla dále prověřena softwarovým programem Mikro-Checker. Z výsledků analýz provedených programem Mikro-Checker byla potvrzena převaha homozygotů v lokusech PAAC19, SpAGD<sub>1</sub>, SpAGC<sub>2</sub> ve všech porostech, v lokusu SpAG<sub>2</sub> v 6 porostech (SM KH, SM T1, SM T4, SM V4, SM J11, SM J14), v lokusu SpAGG<sub>3</sub> v 5 porostech (SM S1, SM S4, SM V4, SM J25, SM J94), v lokusu WS00716.F13 ve dvou porostech (SM J25, SM J51), v dalších čtyřech lokusech převažovali homozygoti pouze v jednom porostu PAAC23 (SM J11), WS0022.B15 (SM T1), WS0023.B03 (SM S4), WS0073.H08 (SM J51). V lokusech EATC1B02 a WS00111.K13 nebyla převaha homozygotů v žádném ze sledovaných porostů. Tento program ověřil, že nedošlo k chybnému odečítání velikostí alel z důvodu alelického propadu nebo záměnou originálních alel za

stutter bandy a studované porosty smrků jsou v Hardy-Weinbergově rovnováze s tím, že přebytek homozygotů je pravděpodobně způsoben přítomností nulových alel.

Genetické charakteristiky 14 sledovaných smrkových porostů jsou uvedeny v tab. 2. Ohodnocení genetické diverzity průměrným počtem různých alel ze všech analyzovaných mikrosatelitových lokusů bylo nejnižší v porostu SM J51 (Praděd) 12,25. Nejvyšší průměrný počet alel 15,92 dosáhl dospělý porost SM T1 z genové základny z Orlických hor. Při sledování počtu alel v jednotlivých lokusech jich bylo nejvíce zjištěno v lokusu SpAGD<sub>1</sub>, a to 25 alel u porostu SM S4, nejnižší počet byly 4 alely v lokusu WS0073.H08 u porostů SM S4, SM V1, SM J11, SM J14, SM J94 a také v lokusu EATC1B02 v porostu SM J51. Průměrný počet efektivních alel se pohyboval od 7,68 (SM J51) do 9,82 (SM T1). Genetická diverzita dle Shannonova indexu se ve sledovaných porostech pohybovala ve vyšších hodnotách, a to od 2,11 (SM J51) do 2,36 (SM T1). Byly také sledovány privátní, tedy jedinečné alely pro danou populaci. V tab. 2 jsou uvedeny průměrné hodnoty privátních alel ze všech lokusů. Nejvyšší počet (8) privátních alel byl zjištěn v porostu SM KH z Krušných hor, a to 4 alely v lokusu PAAC19, 3 alely v lokusu EATC1B02 a 1 alela v lokusu PAAC23. V porostech z Jeseníků SM J03 a SM J51 nebyly privátní alely u sledovaných mikrosatelitových markerů nalezeny. Hodnoty pozorované heterozygotnosti kolísaly od 65 % v porostu SM J14 do 81 % v porostu SM KH. Očekávaná heterozygotnost byla u sledovaných porostů vyrovnanější (81–86 %). Hodnoty fixačního indexu vykazovaly kladné hodnoty signalizující přebytek homozygotů u všech testovaných porostů oproti předpokládanému rozvržení heterozygotnosti dle Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Alely příslušných lokusů se v jednotlivých porostech významně lišily mírou svého zastoupení. Například alela 274 bp lokusu PAAC23 se v porostu SM KH vyskytovala jen ve 2 %, ale v porostu SM J51 byla zastoupena 14 %, zastoupení alely 90 bp v lokusu SpAGC<sub>2</sub> se pohybovalo od 6 % v porostu SM KH do 31 % v SM J14 atd.

Podle kvalitativní interpretace hodnot  $F_{ST}$  (WRIGHT 1943), hodnotící vzájemné genetické diferenciacce (Pairwise Population Fst Values) mezi sledovanými porosty smrku, byly při zjištěných hodnotách od 0,007 do 0,030 dosaženy malé genetické diferenciacce. Mezi porostem z Krušných hor a porosty z Orlických hor se diferenciacce pohybovaly v intervalu 0,017–0,024, mezi porostem z Krušných hor a porosty Jeseníků 0,017–0,026, mezi porosty z Orlických hor a Jeseníků 0,010–0,022, nejnižší rozmezí byla získána mezi porosty v rámci Orlických hor 0,007–0,011, kde byly hodnoceny dospělé porosty a jejich zmlazení. Nejvyšší hodnoty diferenciacce byly shledány v porostech z Jeseníků 0,011–0,030, kde se hodnotily dospělé až velmi staré porosty s předpokladem, že jsou na šetřených lokalitách původní. Tok genů ( $N_m$ ) byl mezi sledovanými porosty vysoký, nejvyšší byl mezi porosty z Orlických hor ( $N_m = 21,6–36,6$ ), mezi porostem z Krušných hor a porosty z Orlických hor dosahoval podstatně nižších hodnot ( $N_m = 10,4–14,1$ ). Obdobný rozptyl hodnot byl mezi porostem z Krušných hor a porosty Jeseníků ( $N_m = 9,4–14,5$ ), mezi jednotlivými porosty Jeseníků se rozdíl v migraci genů pohybovaly ve větším intervalu (8,1–22,7).

Genetické vzdálenosti mezi porosty byly kalkulovány na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972) a jsou graficky znázorněny pomocí analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis – PCoA) na obr. 1. Nejvyšší genetická vzdálenost byla zjištěna mezi porostem původem z Krušných hor SM KH a porostem z Jeseníků SM J11 (0,313). Vzdálenosti mezi porostem z Krušných hor a porosty Orlických hor se pohybovaly od 0,202 do 0,303, mezi porostem z Krušných hor a porosty Jeseníků od 0,185 do 0,313, mezi porosty Jeseníků byly zjištěny hodnoty od 0,110 do 0,274. Nejnižší hodnoty genetických vzdáleností byly zaznamenány mezi porosty Orlických hor v rozmezí 0,083–0,134. Rozdíly genetických profilů mezi porosty byly také ověřovány analýzou Structure z alelických dat jednotlivých stromů. Optimální počet klastrů byl stanoven pomocí Evannovy me-

**Tab. 1.**

 Charakteristiky mikrosatelitových lokusů získaných ze 14 zkoumaných porostů smrku ztepilého  
 Characteristics of selected nuclear microsatellite loci across 14 investigated Norway spruce stands

Lokus/Locus	Sekvence primerů (5'–3')/ Primer sequence (5'–3')	Rozmezí velikostí PCR produktů/PCR product size range (bp)	Na	I	Ho	He	F
PAAC19	F: ATGGGCTCAAGGATGAATG R: AACTCCAACGATTGATTTCC	153–237	32	2,58	0,51	0,91	0,44
PAAC23	F: TGTGGCCCCACTTACTAATATCAG R: CGGGCATTGGTTTACAAGAGTTGC	266–312	20	1,69	0,74	0,73	-0,01
SpAGD <sub>1</sub>	F: GTCAACCAACTTGTAAGCCA R: ACTTGTGGCATTTTCCC	110–188	37	2,78	0,41	0,93	0,56
SpAG <sub>2</sub>	F: GCTCTTCACGTGTAATTGATC R: TTCGAAGATCCTCCAAGATAC	89–121	17	2,34	0,78	0,88	0,12
SpAGC <sub>2</sub>	F: TACCATTCAACGCAAGGG R: GTGTATGGTTTTCTTTTCGCA	82–164	33	2,17	0,35	0,85	0,58
SpAGG <sub>3</sub>	F: CTCCAACATTCCCATGTAGC R: AGCATGTTGTCCCATATAGACC	104–148	23	2,38	0,82	0,89	0,08
EATC1B02	F: TGGCATGAGATTTATGTGGTT R: GTGTGCCACTCAACCTCAC	194–218	11	1,08	0,79	0,57	-0,36
WS00716.F13	F: TCAAGTAATGGACAAACGATACA R: TTTCCAATAGAATGGTGGATT	208–248	21	2,58	0,89	0,91	0,03
WS0022.B15	F: TTTGTAGGTGCTGCAGAGATG R: TGGCTTTTTATTCCAGCAAGA	172–212	20	2,31	0,86	0,87	0,01
WS0073.H08	F: TGCTCTCTTATTCGGGCTTC R: AAGAACAAGGCTTCCCAATG	196–220	9	1,28	0,69	0,68	-0,01
WS00111.K13	F: GACTGAAGATGCCGATATGC R: GGCCATATCATCTCAAATAAAGAA	211–271	28	2,8	0,92	0,93	0,01
WS0023.B03	F: AGCAGCTGGGGTCAAAGTT R: AAAGAAAGCATGCATATGACTCAG	168–240	34	2,74	0,95	0,92	-0,03

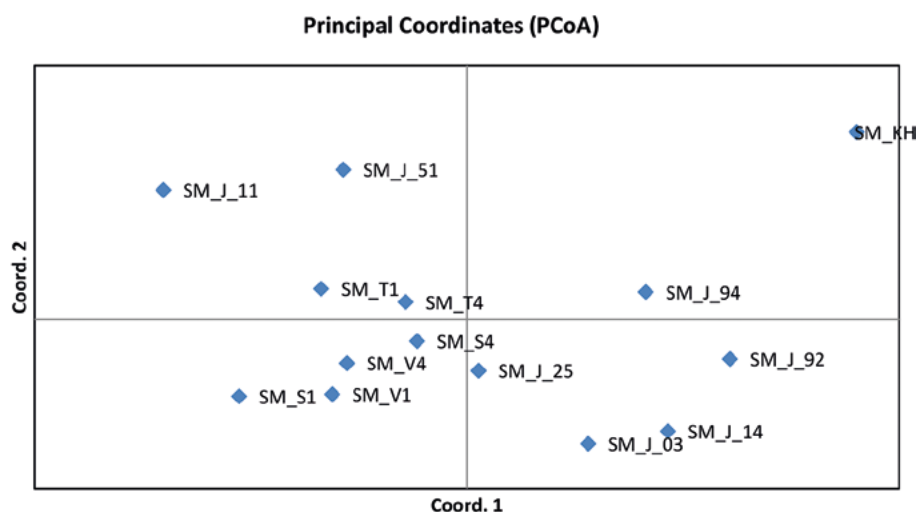
Na: počet různých alel/number of different alleles; I: Shannonův informační index/Shannon's information index; Ho: heterozygotnost pozorovaná/observed heterozygosity; He: heterozygotnost očekávaná/expected heterozygosity; F: fixační index/fixation index

**Tab. 2.**

 Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro sledované porosty smrku ztepilého  
 Mean values for genetic characteristics of investigated Norway spruce stands

Porosty/Stands	N	Na	Ne	I	Priv. alely/ Priv. alleles	Ho	He	F
SM KH	24	13,17	8,67	2,23	0,67	0,81	0,85	0,031
SM S1	35	14,75	9,1	2,27	0,33	0,77	0,85	0,077
SM S4	35	15,25	9,48	2,29	0,25	0,76	0,85	0,087
SM T1	35	15,92	9,82	2,36	0,42	0,75	0,86	0,107
SM T4	35	15,75	9,51	2,28	0,33	0,75	0,84	0,085
SM V1	35	13,67	8,69	2,21	0,25	0,74	0,84	0,101
SM V4	35	14,67	8,6	2,25	0,33	0,77	0,85	0,072
SM J03	30	14,08	9,23	2,25	0	0,7	0,85	0,17
SM J11	30	13,92	8,25	2,21	0,33	0,73	0,84	0,093
SM J14	30	12,92	8,8	2,16	0,08	0,65	0,82	0,195
SM J25	30	14,33	8,59	2,24	0,08	0,71	0,84	0,134
SM J51	29	12,25	7,68	2,11	0	0,67	0,83	0,164
SM J92	30	13,5	8,57	2,16	0,17	0,68	0,81	0,141
SM J94	30	13,42	8,19	2,19	0,17	0,66	0,83	0,19
Průměr/Mean	31,6	14,11	8,8	2,23	0,24	0,73	0,84	0,118

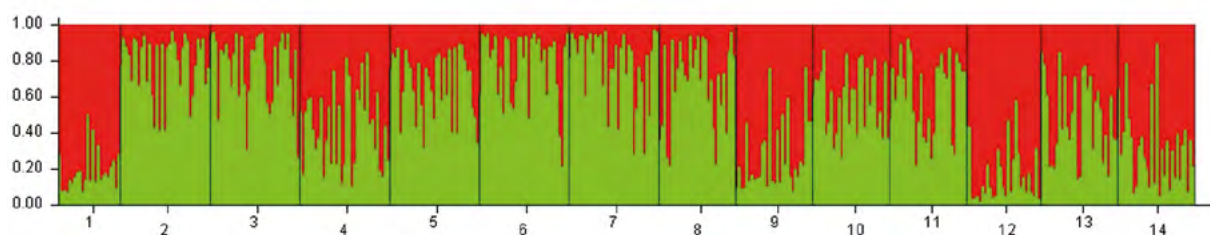
N: počet vzorků/sample size; Na: počet různých alel/number of different alleles; Ne: počet efektivních alel/number of effective alleles; I: Shannonův informační index/Shannon's information index; Priv. alely/priv. alleles: počet privátních alel/number of private alleles; Ho: heterozygotnost pozorovaná/observed heterozygosity; He: heterozygotnost očekávaná/expected heterozygosity; F: fixační index/fixation index

**Obr. 1.**

Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA)

**Fig. 1.**

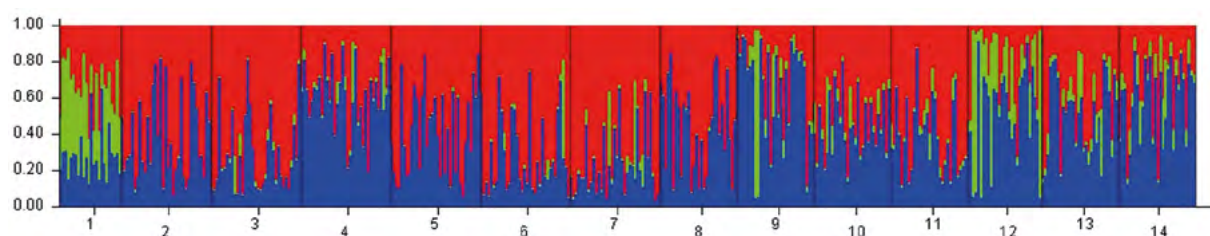
Results of the principal coordinate analysis

**Obr. 2.**

Zhodnocení genetické struktury Bayesiánskou metodou pro  $K = 2$  u sledovaných porostů (1 – SM KH, 2 – SM S1, 3 – SM S4, 4 – SM T1, 5 – SM T4, 6 – SM V1, 7 – SM V4, 8 – SM J03, 9 – SM J11, 10 – SM J14, 11 – SM J25, 12 – SM J51, 13 – SM J92, 14 – SM J94)

**Fig. 2.**

Evaluation of genetic structure by Bayesian method for  $K = 2$  in observed stands (1 – SM KH, 2 – SM S1, 3 – SM S4, 4 – SM T1, 5 – SM T4, 6 – SM V1, 7 – SM V4, 8 – SM J03, 9 – SM J11, 10 – SM J14, 11 – SM J25, 12 – SM J51, 13 – SM J92, 14 – SM J94)

**Obr. 3.**

Zhodnocení genetické struktury Bayesiánskou metodou pro  $K = 3$  u sledovaných porostů (1 – SM KH, 2 – SM S1, 3 – SM S4, 4 – SM T1, 5 – SM T4, 6 – SM V1, 7 – SM V4, 8 – SM J03, 9 – SM J11, 10 – SM J14, 11 – SM J25, 12 – SM J51, 13 – SM J92, 14 – SM J94)

**Fig. 3.**

Evaluation of genetic structure by Bayesian method for  $K = 3$  in observed stands (1 – SM KH, 2 – SM S1, 3 – SM S4, 4 – SM T1, 5 – SM T4, 6 – SM V1, 7 – SM V4, 8 – SM J03, 9 – SM J11, 10 – SM J14, 11 – SM J25, 12 – SM J51, 13 – SM J92, 14 – SM J94)

tody na  $K = 2$  na základě nejvyšší hodnoty delta  $K$  (obr. 2), druhá alternativa při mírně nižší hodnotě delty  $K$  studované porosty strukturovala do tří odlišných skupin (obr. 3). Jednotlivé stromy všech porostů byly zastoupeny v obou klastrech, ale s různým poměrem jejich zastoupení. Nejvíce podílově odlišný profil vykazoval porost Krušné hory, což se ještě výrazněji projevilo v ohodnocení struktury pomocí 3 klastrů, kdy se zeleně znázorněný klastř projevilo výrazně nejvyšším zastoupením právě u jedinců tohoto porostu (obr. 3). Profily ostatních sledovaných porostů se už tak výrazně neodlišovaly. Při  $K = 2$  se u porostů z Orlických hor podíl klastru značeného červeně pohyboval v hodnotách 18–51 % a převládala zeleně značený klastř 49–82 %, u porostů Jeseníků bylo zastoupení skupin vyrovnanější, a to 27–68 % – červeně značený klastř – a 19–73 % – zeleně značený klastř. V rámci porostů Orlických hor se v zastoupených podílech profilů nejvíce vylišoval porost SM T1, u jeseníckých porostů si byly dle získaných profilů podobnější porosty SM J11, SM J51 a SM J94.

## DISKUSE

Zaměřením studie bylo na základě analýz mikrosatelitových markerů ověřit úroveň genetické diverzity a dalších genetických charakteristik u 14 vybraných porostů smrku ztepilého s předpokládaným výskytem orlických a jeseníckých porostů na původních stanovištích a s ověřenou odolností vůči imisím u vybraných jedinců pocházejících z Krušných hor. Účelem bylo zjistit, jestli se pouze v rámci českých populací s vysokou mírou toku genů projeví mezi sledovanými porosty odlišnosti v genetických parametrech a v genetických vzdálenostech. Pro porovnání přenosu genetických informací byly také v rámci šetření genové základny v Orlických horách zařazeny do studie vedle dospělých porostů i porosty z přirozeného zmlazení. Zhoršující se klimatické podmínky pro lesní dřeviny, obzvláště pro smrk ztepilý, nastupující suché a teplé počasí, vyvolávají nutnost geneticky ověřovat potenciální zdroje plánované pro další reprodukci. U dlouhověkých organismů, jako jsou lesní dřeviny, hraje genetická diverzita zásadní roli pro zachování odolnosti a přizpůsobení se populací lesních dřevin změnám klimatu (FADY et al. 2016). Mikrosatelitové markery pro studium genetické struktury a diverzity smrkových porostů již uplatnila řada autorů (SCOTTI et al. 2000, 2006; RUNGIS et al. 2004; MELONI et al. 2007; TOLLEFSRUD et al. 2009; FLUCH et al. 2011; UNGER et al. 2011; NOWAKOWSKA et al. 2014; CVJETKOVIĆ et al. 2017; VERBYLAITĚ et al. 2017). Hladina diverzity námi sledovaných porostů na základě 12 vybraných mikrosatelitových lokusů byla poměrně vysoká (v průměru 14,11 alel na porost a průměrná hodnota Shannonova informačního indexu byla 2,23). Při porovnání hladin diverzity a heterozygotnosti sledovaných smrkových porostů s tyrolskými populacemi (UNGER et al. 2011), polskými (NOWAKOWSKA 2009), italskými (SCOTTI et al. 2006) a německými (SOUSA et al. 2005) byly zjištěny srovnatelné hodnoty. U populací v hraniční oblasti výskytu smrku ztepilého z Bosny a Hercegoviny byly autory CVJETKOVIĆ et al. 2017 prezentovány nižší hodnoty diverzity. I při zjištěných vysokých hodnotách toku genů ( $N_m = 8,1-36,6$ ) byly analýzou Structure zjištěny určité odchylky v proporcích genotypů našich sledovaných porostů. Nejvýrazněji se odlišil porost z Krušných hor. Zajímavé bylo, že nejvyšší bariéra pro tok genů ( $N_m = 8,1$ ) byla zjištěna u dvou porostů z Jeseníků SM J11 (Májová) a SM J92 (Skřítek), kde se projevila i nejvyšší hodnota genetické diferenciace ( $F_{ST} = 0,03$ ) z našeho sledování. Tyto autochtonní porosty však pocházejí z velmi odlišných lokalit, Májová se nachází na svahu v nadmořské výšce 1234 m a Skřítek na rovině v nadmořské výšce 835 m, kdy podložím je rašelina s vysokým zvodněním (NOVOTNÝ et al. 2018). Nejvyšší hodnoty toků genů byly zjištěny u porostů v Orlických horách, kde byly sledovány dospělé porosty a jejich zmlazení. Sledování genetických rozdílů mezi mateřským porostem smrku ztepilého a jeho potomstvem provedli NOWAKOWSKA et al. (2014) na lokalitě Jawor a zjistili rovněž malou genetickou diferenciaci a vysoký tok genů ( $F_{ST} = 0,032$ ;  $N_m = 18,7$ ), i když naše zjištěné

hodnoty pro porosty z Orlických hor vyjadřují o něco vyšší genetickou příbuznost.

U markerů PAAC19, SpAGD<sub>1</sub>, SpAGC<sub>2</sub> byl zjištěn výskyt nulových alel ve všech sledovaných populacích. RUNGIS et al. (2004) a MELNIKOVA et al. (2012) zaznamenali u těchto markerů také chybnou amplifikaci zkrslující z hodnocení heterozygotnosti. Přestože u těchto lokusů jsme také pozorovali výrazné snížení pozorované heterozygotnosti, tak vzhledem k jejich vysokému polymorfismu jsme je z hodnocení porostů nevyřadili. Naším cílem bylo ověřit a porovnat hodnoty diverzity, kdy je pro objektivní posouzení vhodnější použít vyšší počet polymorfních markerů s předpokladem stejného postupu hodnocení u všech sledovaných porostů. Čtyři zvolené mikrosatelitové markery (SpAGD<sub>1</sub>, SpAGG<sub>3</sub>, SpAGC<sub>2</sub>, SpAG<sub>2</sub>) byly odvozeny z genomové oblasti DNA, zbývajících osm z oblasti kódujících sekvencí DNA (expressed sequence tags – EST). Polymorfní mikrosatelitové markery vyvinuté z kódujících oblastí DNA jsou pro populační genetiku lesních dřevin přínosné i z hlediska získávání poznatků o variabilitě realizovaných vlastností, které mohou např. souviset s informacemi o proměnlivosti adaptivních znaků (SCOTTI et al. 2000). Informace o rozložení genetické variability v souvislosti s proměnlivostí a charakterem fenotypových znaků na základě environmentálních podmínek jsou velmi podstatné pro prognózu adaptačních schopností lesních porostů. Vzhledem k nárůstu nepříznivých podmínek pro pěstování a růst smrku ztepilého mnoho výzkumných a vědeckých pracovišť hledá řešení pro vypořádání se s negativními důsledky klimatických změn (ČABOUN 2009; PAROBEKOVÁ et al. 2016; KOLÁŘ et al. 2017; NEUNER, KNOKE 2017). Rozšiřují se také studia zkoumající proměnlivost adaptivních znaků smrku ztepilého na molekulární úrovni (ROMŠÁKOVÁ et al. 2012; GUTKOWSKA et al. 2017; DI PIERRO et al. 2017). V současné době se výzkum i v naší laboratoři zaměřuje na sekvenační analýzy stresolerantních genů pro vyhledávání jedinců smrku ztepilého se zvýšenou odolností vůči suchu na základě studia změn exprese genů.

Znalosti o genetické struktuře porostů představují zásadní informaci pro opatření směřující k zachování biodiverzity lesních ekosystémů. Na základě stanovení úrovně genetické diverzity lze předpovědět další vývoj populací. Získané poznatky o úrovni genetické diverzity, diferenciace a heterozygotnosti u zdrojů reprodukčního materiálu jsou velmi důležité z hlediska převažující umělé obnovy lesa a mohou být využity jako podklady pro rozhodovací řízení, strategické plánování a legislativní činnost státní správy v oblasti ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a nakládání s reprodukčním materiálem.

Další možné využití získaných poznatků je při vyhlásování nebo revizi genových základů a dále v rámci uznávání zdrojů reprodukčního materiálu a jejich zařazování do Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin, včetně zařazování vzorků z těchto zdrojů do Národní banky osiva a explantátů lesních dřevin, kdy lze především na základě míry genetické diverzity rozhodnout, které populace (porosty) je možné zařadit jako cenné zdroje. Poznatky o diverzitě populací také napomáhají plnit cíle státní politiky životního prostředí a mezinárodní závazky ČR při ochraně biologické rozmanitosti. Využití polymorfních mikrosatelitových markerů je významné i pro ověřování klonové identity například v semenných sadech, klonových archivech atd. Genetické otestování deklarovaného původu reprodukčního materiálu umožňuje objektivní kontrolou potvrdit, nebo vyvrátit klonovou identitu ramet.

## ZÁVĚR

Cílem studie bylo analyzovat genetickou diverzitu a diferenciaci u vybraných 14 horských porostů smrku ztepilého (1 původem z Krušných hor, 6 z Orlických hor, 7 z Jeseníků) na základě otestovaných 12 jaderných mikrosatelitových markerů. Analýzy mikrosatelitových markerů mají široké uplatnění v populační genetice lesních dřevin. Všechny sledované porosty se vyznačovaly poměrně vysokou diverzi-

tou. Zastoupení heterozygotů se v populacích pohybovalo od 65 % do 81 %. Nejvíce pozorovaných heterozygotů a privátních alel bylo zjištěno v populaci SM KH (Krušné hory), ale nejvyšší hodnoty diverzity (počet alel, Shannonův index) byly zjištěny u populace SM T1 z Orlických hor. Genetické diference mezi porosty byly nízké, ale biologicky významné, a ukazují na strukturování sledovaných porostů, představující určitou míru adaptace na lokální podmínky. Nejdůležitější genetický profil byl zaznamenán u porostu z Krušných hor, který byl zastoupen jedinci odolnými na imisní zatížení a je i geograficky nejvzdálenější od ostatních sledovaných porostů. Pro analýzy velkých souborů vzorků byly postupy analýz DNA také zaměřeny na seskupování vybraných mikrosatelitových lokusů do multiplexů, kdy probíhají amplifikace a fragmentační analýzy několika lokusů najednou. Významné rozdíly mezi porosty se projeví v rozdílné četnosti zastoupených alel u většiny sledovaných lokusů. Genetická rozmanitost populací je podstatná pro jejich zachování a zvýšení jejich odolnosti vůči abiotickým i biotickým činitelům.

#### Poděkování:

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0118 a v rámci řešení výzkumných projektů NAZV č. QJ1530294 a QJ1520300.

Děkujeme také Mgr. Miroslavu Havirovi, Ph.D., za spolupráci při výběru porostů a odběru vzorků z porostů v CHKO Jeseníky.

## LITERATURA

- BOZHKO M., RIEGEL R., SCHUBERT R., MÜLLER-STARCK G. 2003. A cyclophilin gene marker confirming geographical differentiation of Norway spruce populations and indicating viability response on excess soil-born salinity. *Molecular Ecology*, 12: 3147–3155.
- CVJETKOVIĆ B., KONNERT M., FUSSI B., MATARUGA M., ŠIJAČIĆ-NIKOLIĆ M., DANIČIĆ V., LUČIĆ A. 2017. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) variability in progeny tests in Bosnia and Herzegovina. *Genetika*, 49: 259–272.
- ČABOUN V. 2009. Návrh strategie, adaptačních a mitigačních opatření důsledků klimatických změn pro dřevinu smrek. *Lesnícky časopis – Forestry Journal*, 55 (3): 215–238.
- DI PIERRO E.A., MOSCA E., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S.C., BINELLI G., NEALE D.B., LA PORTA N. 2017. Adaptive variation in natural Alpine populations of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst) at regional scale: Landscape features and altitudinal gradient effects. *Forest Ecology and Management*, 405: 350–359. DOI: 10.1016/j.foreco.2017.09.045
- EARL D.A., VON HOLDT B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359–361.
- FADY B., COTTRELL J., ACKZELL L., ALÍA R., MUYS B., PRADA A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S.C. 2016. Forests and global change: what can genetics contribute to the major forest management and policy challenges of the twenty-first century? *Regional Environmental Change*, 16: 927–939. DOI: 10.1007/s10113-015-0843-9
- FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164 (4): 1567–1587.
- FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology*, 7(4): 574–578. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- FLUCH S., BURG A., KOPECKY D., HOMOLKA A., SPIESS N., VENDRAMIN G.G. 2011. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BMC Research Notes*, 4: 401.
- GEBUREK T. 1999. Genetic variation of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in Austria. III. Macrospatial allozyme patterns of high elevation populations. *Forest Genetics*, 6: 201–211.
- GUTKOWSKA J., BORYS M., TEREBA A., TKACZYK M., OSZAKO T., NOWAKOWSKA J.A. 2017. Genetic variability and health of Norway spruce stands in the regional Directorate of the State Forests in Krosno. *Leśne Práce Badawcze*, 78 (1): 56–66.
- HAMPE A., PETIT R.J. 2005. Conserving biodiversity under climate change: The rear edge matters. *Ecology Letters*, 8: 461–467.
- HEJNÝ S., SLAVÍK B. (eds.) 1988. Květena České socialistické republiky 1. Praha, Academia: 557 s.
- HUBISZ M.J., FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9 (5): 1322–1332.
- KOLÁŘ T., ČERMÁK P., TRNKA M., ŽID T., RYBNÍČEK M. 2017. Temporal changes in the climate sensitivity of Norway spruce and European beech along an elevation gradient in Central Europe. *Agricultural and Forest Meteorology*, 239: 24–33.
- KONNERT M. 2009. Genetic variation of *Picea abies* in southern Germany as determined using isozyme and STS markers. *Dendrobiology*, 61: 131–136.
- MAGHULY F., PINSKER W., PRAZNIK W., FLUCH S. 2006. Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Forest Ecology and Management*, 222: 266–271. DOI: 10.1016/j.foreco.2005.10.025
- MAGHULY F., BURG K., PINSKER W., NITTINGER F., PRAZNIK W., FLUCH S. 2008. Short Note: Development of mitochondrial markers for population genetics of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Silvae Genetica*, 57: 41–44.
- MELNIKOVA M.N., PETROV N.B., LOMOV A.A., LA PORTA N., POLITOV D.V. 2012. Testing of microsatellite primers with different populations of Eurasian spruces *Picea abies* (L.) Karst. and *Picea obovata* Ledeb. *Russian Journal of Genetics*, 48: 562–566.
- MELONI M., PERINI D., BINELLI G. 2007. The distribution of genetic variation in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in the western Alps. *Journal of Biogeography*, 34: 929–938.
- NEALE D.B., KREMER A. 2011. Forest tree genomics: Growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics*, 12: 111–122.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–292. DOI: 10.1086/282771
- NEUNER S., KNOKE T. 2017. Economic consequences of altered survival of mixed or pure Norway spruce under a dryer and warmer climate. *Climatic Change*, 140: 519–531.
- NOVOTNÝ P., FULÍN M., DOSTÁL J., ČÁP J. 2018. Genetický průzkum vybraných autochtonních porostů smrku ztepilého v CHKO Jeseníky. 1. část: výběr porostů, odběr vzorků pro analýzy DNA, fenotypové šetření. *Výzkumná zpráva. Strnady, VÚLHM*: 23 s.
- NOWAKOWSKA J.A. 2009. Mitochondrial and nuclear DNA differentiation of *Picea abies* populations in Poland. *Dendrobiology*, 61: 119–129.
- NOWAKOWSKA J.A., ZACHARA T., KONECKA A. 2014. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce

- (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands. *Lešné Prace Badawcze*, 75 (1): 47–54.
- PARBEKOVÁ Z., SEDMÁKOVÁ D., KUCBEL S., PITTNER J., JALOVÍAR P., SANIGA M., BALANDA M., VENCURIK J. 2016. Influence of disturbances and climate on high-mountain Norway spruce forests in the Low Tatra Mts., Slovakia. *Forest Ecology and Management*, 380: 128–138. DOI: 10.1016/j.foreco.2016.08.031
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2012. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- PFEIFFER A., OLIVIERI A.M., MORGANTE M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40: 411–419.
- PRITCHARD J.K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2): 945–959.
- ROMŠÁKOVÁ I., FOFFOVÁ E., KMEŤ J., LONGAUER R., PACALAJ M., GÖMÖRY D. 2012. Nucleotide polymorphisms related to altitude and physiological traits in contrasting provenances of Norway spruce (*Picea abies*). *Biologia*, 67: 909–916.
- RUNGIS D., BÉRUBÉ Y., ZHANG J., RALPH S., RITLAND C.E., ELLIS B.E., DOUGLAS C., BOHLMANN J., RITLAND K. 2004. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1283–1294.
- SCOTTI I., MAGNI F., FINK R., POWELL W., BINELLI G., HEDLEY P.E. 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*, 43: 41–46.
- SCOTTI I., MAGNI F., PAGLIA G.P., MORGANTE M. 2002. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 40–50.
- SCOTTI I., PAGLIA G., MAGNI F., MORGANTE M. 2006. Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of Forest Science*, 63: 485–491. DOI: 10.1051/forest:2006029
- SCHUBERT R., MUELLER-STARCK G., RIEGEL R. 2001. Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulation genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1223–1231.
- SOUSA S.N. DE, FINKELDEY R., GAILING O. 2005. Experimental verification of microsatellite null alleles in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.): Implications for population genetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23: 113–119. DOI: 10.1007/BF02772701
- SVOBODA P. 1953. *Lesní dřeviny a jejich porosty. Část I.* Praha, Státní zemědělské nakladatelství: 411 s.
- TOLLEFSRUD M.M., SØNSTEBØ J.H., BROCHMANN C., JOHNSEN Ø., SKROPPA T., VENDRAMIN G.G. 2009. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. *Heredity*, 102: 549–562. DOI: 10.1038/hdy.2009.16
- UNGER G.M., KONRAD H., GEBUREK T. 2011. Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria. *Plant Systematics and Evolution*, 292: 133–141. DOI: 10.1007/s00606-010-0407-x
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. *Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.*
- VAN OOSTERHOUT C., HUTCHINSON W.F., WILLS D.P.M., SHIPLEY P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- VENDRAMIN G.G., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., SPERISEN C., BUCCI G. 2000. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 43: 68–78.
- VERBYLAITĚ R., PLIŮRA A., LYGIS V., SUCHOCKAS V., JANKAUSKIENĚ J., LABOKAS J. 2017. Genetic diversity and its spatial distribution in self-regenerating Norway spruce and Scots pine stands. *Forests*, 8 (12): Article Number 470. DOI:10.3390/f8120470
- WHITHAM T.G., BAILEY J.K., SCHWEITZER J.A., SHUSTER S.M., BANGERT R.K., LEROY C.J., LONSDORF E.V., ALLAN G.J., DIFAZIO S.P., POTTS B.M. et al. 2006. A framework for community and ecosystem genetics from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics*, 7: 510–523.
- WRIGHT S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.
- WRIGHT S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395–420. DOI: 10.2307/2406450



## THE GENETIC VARIABILITY OF SELECTED NORWAY SPRUCE STANDS IN THE JESENÍKY MTS., ORLICKÉ HORY MTS. AND KRUŠNÉ HORY MTS. (CZECH REPUBLIC)

### SUMMARY

Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten) is a coniferous species belonging to the family Pinaceae, which is the most economically important tree species in Central and Northern Europe. This species is very demanding of soil moisture and requires higher relative humidity. A significant reduction today in the occurrence of spruce in some localities is due to the natural increase in drought caused by climate change and by infestation with eight-toothed spruce bark beetle. It is widely assumed that populations characterized by narrow genetic diversity could be more sensitive to environmental changes or disease, thereby leading to a decrease in productivity. Therefore, it is essential to determine the genetic variability in economically and ecologically valuable stands and populations. To provide insight into the levels of genetic variation and differentiation of selected fourteen Norway spruce stands from Jeseníky (the locality designations: SM J03, SM J11, SM J14, SM J25, SM J51, SM J92, SM J94), Orlické hory (the locality designations: SM S1, SM S4, SM T1, SM T4, SM V1, SM V4) and Krušné hory (SM KH), twelve microsatellite markers were used: PAAC23, PAAC19 (SCOTTI et al. 2000), EATC1B02 (SCOTTI et al. 2002), SpAGD<sub>1</sub>, SpAGG<sub>3</sub>, SpAGC<sub>2</sub>, SpAG<sub>2</sub> (MELNIKOVA et al. 2012), WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03 (RUNGIS et al. 2004). PCR products were separated by capillary electrophoresis using the Applied Biosystems 3500 genetic analyser. Micro-Checker software (VAN OOSTERHOUT et al. 2004), GenAlEx 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), the Bayesian clustering method implemented in the software STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009) were used to analyse the genetic data. PCR products of the selected markers generated simple patterns and provided variable expected sizes of alleles. The genetic diversity parameters with the primer sequences of the studied markers are reported in Table 1. The most polymorphic locus was SpAGD<sub>1</sub> and the least was WS0073.H08. The Micro-Checker software found no evidence at any locus of scoring error due to stuttering and no evidence of large allele dropout and studied spruce stands are in the Hardy-Weinberg equilibrium, with the excess of homozygotes being probably due to the presence of null alleles. Genetic diversity characteristics of the 14 investigated Norway spruce stands are given in Table 2. The level of genetic diversity within them was relatively high. Mean values for number of different alleles ranged from 12.25 (stand SM J51) to 15.92 (stand SM T1). The values of observed heterozygosity (Ho) ranged from 0.65 to 0.81, and expected heterozygosity (He) from 0.81 to 0.86. Mean values of population genetic diversity according to Shannon's information index (I) ranged from 2.11 to 2.36. All Norway spruce stands showed positive values of fixation index (0.031–0.195), indicating heterozygote deficiencies to the expected fraction. Pairwise population  $F_{ST}$  values ranging from 0.007 to 0.030 indicated low genetic differentiation between stands. The lowest  $F_{ST}$  values were among stands from the Orlické hory (0.007–0.011), where the maternal stands and their natural regeneration were evaluated. A high gene flow among investigated stands was observed, the highest values ( $N_m = 21.6 - 36.6$ ) were among the Orlické hory stands, too. Nei's genetic distances among Norway spruce units ranged from 0.083 to 0.313, and they are graphically illustrated in Fig. 1, constructed on the basis of principal coordinate analysis (PCoA). The structuring of investigated Norway spruce stands was also confirmed by various proportions of genetic profiles according to the Bayesian clustering method results (Fig. 2, 3). The most diverse genetic profile was recorded in SM KH stand of the Krušné hory, which was represented by individuals resistant to air pollution and in which the highest number (8) of private alleles was also found. Significant allelic frequency differences were found at most loci in the studied stands.

Acquiring new knowledge on the genetic structure of coniferous species populations, especially in relation to valuable ecotypes of Norway spruce, is very important in order to maintain the ecological stability of forests and to optimize the timber production. The developed procedures of genetic monitoring with DNA markers will be used in the amendment of forestry legislation and in the state subsidy policy in the area of protection and reproduction of forest tree gene resources. Knowledge based on DNA analyses regarding the variability of genetic resources will contribute to the quality of the reproduction material and to creation of an optimal species composition in forests.

Zasláno/Received: 26. 01. 2018

Přijato do tisku/Accepted: 31. 08. 2018