

Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity a diverzity u lípy srdčité (*Tilia cordata* Mill.)

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

Strnady 136, Jíloviště 252 02

<http://www.vulhm.cz>

Helena Cvrčková, Pavlína Máchová, Olga Trčková

Adresa autorů:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Ing. Pavlína Máchová, Ph.D., Ing. Olga Trčková, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Strnady 136, Jíloviště 252 02

Email: cvrckova@vulhm.cz, machova@vulhm.cz, trckova@vulhm.cz

Obsah:

I. Cíl metodiky

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

2. Metodické postupy

a. Odběr vzorků a postupy izolace DNA

b. Postupy PCR amplifikace

c. Postupy elektroforézy v agarózovém gelu

d. Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů

e. Zpracování molekulárních dat

III. Srovnání novosti postupů

IV. Popis uplatnění metodiky

V. Ekonomické aspekty

VI. Dedikace

VII. Seznam použité související literatury

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Summary

Abstract

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers to obtain genetic characteristics, and to introduce procedures for verifying the clonal identity in species of small-leaved linden. The methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of the polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products, and molecular data calculations. The selected seed orchard of small-leaved linden was used to develop this methodology. Eight selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for finding the genetic parameters for verifying the clonal identity and levels of genetic diversity between different genotypes.

Keywords: small-leaved linden; DNA analysis; microsatellites; genetic diversity; clonal identification.

Použité zkratky v textu:

DNA – deoxyribonukleová kyselina

nSSR - nuclear Simple Sequence Repeats (jaderné mikrosatelity)

SSR - Simple Sequence Repeats (mikrosatelity)

PCR – Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

Oponenti: Ing. Miroslav Válek, ÚHUL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové

RNDr. Radka Podlipná, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AVČR, v.v.i.

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je představit postupy analýz DNA s využitím mikrosatelitových markerů pro zhodnocení úrovně genetické diverzity a dalších genetických charakteristik lípy srdčité a pro objektivní ověřování deklarované identity klonů např. v semenných sadech nebo v klonových archivech za účelem ověření kvality reprodukčních zdrojů.

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

Lípu srdčitou z řádu slézotvarých lze přiřadit k druhům, které byly v minulých třech stoletích v lesních porostech silně redukovány v důsledku intenzivního zavádění smrkových a borových monokultur (HEJNÝ et SLAVÍK 1992). Současná situace kalamitního úhynu smrku a borovice vyžaduje obnovu lesních porostů výběrem alternativních druhů dřevin, které se v lesních ekosystémech dříve přirozeně vyskytovaly. Lípa srdčitá patří k druhům, jejichž rozšíření by mohlo přispět k obohacení a zvýšení stability lesních ekosystémů. Předností lípy srdčité je vysoká odolnost vůči silným mrazům i vysokým teplotám a nepoškozují ji ani pozdní mrazy. Dorůstá do 20 až 30 m výšky a kořenová soustava je srdčitá se silnými postranními kořeny. Pro velkou odolnost je často využívána v městské zeleni. Snáší přesazování i dospělých stromů, seřezávání, výkopy kolem kmene a vyznačuje se vysokou pařezovou výmladností, kterou se ubránila úplnému vytlačení z hospodářského lesa (SVOBODA 1955; ÚRADNÍČEK et al. 2009). Je to polostinná dřevina přirozeně obývající dubohabřiny, lužní lesy, suťové a stinné roklinové lesy (HEJNÝ et SLAVÍK 1992). Její uplatnění je mnohostranné. Lípa je lesnický i sadovnický pěstovaná dřevina s vhodnými melioračními i půdoochrannými vlastnostmi. Její měkké dřevo je dobře opracovatelné a hodí se pro řezbářské práce. Široké uplatnění již z dávno minulých dob mělo lipové lýko. Její květenství je pro léčivé účinky hojně využíváno v lékařství a je velmi značným přínosem pro včelařství (HEJNÝ et SLAVÍK 1992). Na našem území se vyskytuje roztroušeně asi do 600 m n. m. spíše na stinných svazích a vlhkostně příznivých stanovištích (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Lípa byla již redukována v dávné minulosti přeměnou lesních stanovišť na zemědělské půdy a také někde značně trpěla okusem dobytka. Podstatné snížení lípy bylo po nástupu hospodaření v lesích, kdy lípy byly vysekávány, aby nezastiňovaly a nevytlačovaly sazenice tvrdých dřevin. To zapříčinilo, že se mohla uchovat jen na extrémních stanovištích, kde nebyla záměna dřevin hospodářsky významnou kulturou proveditelná (SVOBODA 1955).

Pro zachování a namnožení genových zdrojů zbývajících porostů je vhodné prověřit jejich genetické vlastnosti především z hlediska zjištění úrovně diverzity. Dostatečná genetická variabilita souvisí s adaptačním potenciálem původních porostů. 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 et PETIT 2005; NEALE et KREMER 2011) a zajištění stability lesních ekosystémů (WHITHAM et al. 2006; NOWAKOWSKA et al. 2014). Znalosti o úrovni genetické

diverzity založené na analýzách DNA přispějí k ohodnocení kvality genetických zdrojů reprodukčního materiálu. Zachování vhodného genofondu tohoto druhu dřeviny probíhá v současné době i s podporou vyhlášeného Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin.

Účelem zde zpracovávaných metodických postupů bylo pro ověřování klonové identity a úrovně genetické rozmanitosti u lípy srdčité vybrat vhodné jaderné mikrosatelity, nuclear simple sequence repeats (nSSR) markery. Mikrosatelitové markery se široce využívají pro hodnocení genetické diverzity populací lesních dřevin. Představují krátké opakující se motivy nukleotidů nejčastěji 2 - 4 báze dlouhé a jejich polymorfismus je dán rozdílným počtem motivů. Pro hodnocení délky sledovaných markerů musíme získat jejich mnohonásobné amplifikáty, které namnožíme pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). K PCR amplifikaci jsou nezbytné primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. Postupy PCR je nutné zoptimalizovat, abychom získávali jednoznačné a reprodukovatelné PCR produkty.

Specifické SSR markery mají kodominantní charakter, což umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů. Mikrosatelitové markery pro studium genetické struktury druhů lip byly vyvinuty autory Phuekvilai a Wolff (2013). Využití polymorfních mikrosatelitových markerů je významné i pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu například v semenných sádkách, klonových archivech atd. Genetické otestování deklarovaného původu reprodukčního materiálu umožňuje objektivním postupem potvrdit nebo vyvrátit klonovou identitu ramet. Aplikace nových kontrolních metod ověřování klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu je využívána i státní správou při realizaci dotační politiky v oblasti podpory zachování a reprodukce genofondu lesních dřevin.

2. Metodický postup

a. Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Pro získání kvalitních izolátů DNA je nejvhodnějším termínem odběru rostlinného materiálu jarní období, kdy lze odebírat narašené pupeny nebo mladé listy. U starších listů z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů se snižuje kvalita i kvantita vyizolované DNA, což může zkomplikovat průběh navazující PCR pro získání amplifikovaných lokusů. Při manipulaci se vzorky jednotlivých stromů je nutné pečlivé vedení evidence, aby nedošlo k záměně mezi vzorky. Vzorky se již při odběru označí, uloží do mikroténového sáčku a udržují

při nízké teplotě (chladové tašky s namraženými destičkami). Ideální je, vzorky co nejrychleji přepravit ke zpracování do laboratoře. Vzhledem k následným analýzám je důležité vzorky držet stále při nízké teplotě. DNA lze izolovat z čerstvého, zmraženého nebo lyofilizovaného rostlinného materiálu. V případě, že izolace DNA není provedena ihned po přijmutí vzorků je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevidování, nastříhání na vhodnou velikost apod.) uložit minimálně do -20 °C. Další možností jak uchovat vzorky je jejich vysušení za pomoci lyofilizátoru a poté je vzduchotěsně uzavřít (např. lze použít plastové falkonky, scintilační lahvičky s dobře těsnícím uzávěrem). Lyofilizovaný materiál má výhodu snadnější manipulace při následném tření vzorků, kdy odpadá nutnost držet vysušené vzorky před homogenizací na ledu. Lyofilizované vzorky jednotlivých stromů lze skladovat při pokojové teplotě. Pro izolaci DNA u lesních dřevin se nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN (Qiagen, Hilden, Germany) dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Před zahájením vlastního postupu izolace se přidá ethanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. Inkubační lázeň se nechá nahřívát na 65 °C. V případě výskytu sraženin v pufrách AP1 a AW1 se roztoky nahřejí pro odstranění těchto sraženin.

Protokol izolace DNA z rostlinných pletiv s použitím Dneasy Plant Mini Kitu:

1. Maximální množství výchozího čerstvého rostlinného pletiva je 100 mg, v případě lyofilizovaného pletiva 20 mg, rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na prášek, například za použití tekutého dusíku aplikovaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách. Utřený materiál se přenesení do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrčenému vzorku se napipetuje 400 µl pufru AP1 a následně 4 µl RnázyA, pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se nechá inkubovat 10 minut při 65 °C, během inkubace se musí směs promíchávat 2 – 3x převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130 µl pufru P3, krátce se promíchá pomocí vortexu a inkubuje 5 minut na ledu a poté centrifuguje 5 minut při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
4. Vzniklý lyzát se přepipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2 ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
5. Přefiltrovaná frakce se přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky s odečtením získaného objemu. Dáváme pozor, abychom nenabrali případný pelet.
6. Přidáme pufr AW1 v množství odpovídajícímu 1,5 násobku objemu odebrané frakce a ihned opakovaným nasáváním a vypouštěním pomocí mikropipety vzniklou směs promícháme.

7. Odpipetujeme 650 μ l směsi a přemístíme do Dneasy Mini spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.
8. Dneasy Mini spin kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 μ l pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
9. Přidáme dalších 500 μ l pufru AW2 a centrifugujeme 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm. Poté vyndáme opatrně Dneasy Mini spin kolonku ze zkumavky, abychom se nedotkli proteklé kapaliny.
10. Přeneseme Dneasy Mini spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Přidáme 100 μ l AE pufru, který aplikujeme přímo na membránu Dneasy Mini spin kolonky. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 minutu při rychlosti 8 000 rpm. Získáme 100 μ l prvního eluátu.
12. Opakujeme krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, chladicí blok na mikrozukumavky (- 20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, sterilní mikrozukumavky Eppendorf 1,5 ml s víčky, sušička nebo sterilizátor

U vyizolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/ μ l a čistotu (na základě poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm) přístrojem Nanophotometer (Implen). Koncentrace DNA z mladých listů lip se pohybovaly v rozmezí 10 – 30 ng/ μ l. Hodnoty optimální čistoty by se měly pohybovat v rozmezí 1,7 - 1,9, nižší nebo vyšší hodnoty indikují přítomnost dalších látek (např. proteinů, fenolických látek). Kvalita extrahované DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. Optimální hodnoty DNA koncentrací pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů se pohybují mezi 30 - 50 ng/ μ l. Vzorky DNA s vyšší koncentrací je pro optimální průběh PCR vhodné naředit.

b. Postupy PCR amplifikace

Pro DNA analýzy byla zvolena metoda nuclear simple sequence repeats (nSSR) – jaderné mikrosatelity. Z testovaných mikrosatelitových markerů (PHUEKVILAI et WOLFF 2013) bylo vybráno 8 dostatečně polymorfních dobře se amplifikujících jaderných mikrosatelitových

lokusů: Tc4, Tc5, Tc6, Tc7, Tc915, Tc920, Tc937, Tc963. Byly optimalizovány reakční směsi a teplotní cykly polymerázové řetězové reakce (PCR) a vypracovány protokoly. PCR s vybranými 8 markery byly sestaveny do dvou multiplexů dle velikostí amplifikovaných lokusů. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo chladové destičce. DNA polymerázu musíme neustále uchovávat při – 20 °C a dáváme ji do reakční směsi až nakonec přímo z mrazicího boxu.

Tab. 1: Vybrané mikrosatelitové lokusy a sekvence primerů

Lokusy/repetiční motivy	Sekvence primerů (5´-3´)	Velikost PCR produktů (bp)
Tc4 / T ₆ (GT) ₁₂	F: ATTTTAGAATGCCAACCTGCTAAG R: TATTGAAGTCCATTCCAATTGTC	194-254
Tc5 / (AG) ₁₂	F: TTTTCATACATTTAGAGACTTTTAGCA R: TGCATGATTTGTATGTTTAGGG	120-180
Tc6 / (AG) ₁₂	F: CCATATCTTCTGCCAGTTTTCC R: GGACTAATTTCTTCCTTTTATTAGGC	113-173
Tc7 / (GA) ₁₃	F: TTTACTTTTGCCAGTTGTGAGG R: CACCTAGAATGCCTCCTATTTCG	204-264
Tc915 / (CT) ₁₆	F: ACATCGATTGTATTTCCCTTTAAC R: GTTGTATTTTGCCCTTAACATTG	135-195
Tc920 / (GA) ₂ (GT) ₁₅ (AG) ₄	F: AAATGTCTTCAGAGTGACTAGATGG R: TGCCTCATTATTCTCCTAATTCTC	202-262
Tc937 / (AG) ₁₃	F: AGCCAACCAACTTTTACAATACAG R: AGATAAAAGCACATAAATCGATGG	132–192
Tc963 / (CT) ₁₁	F: CTAACCCCATTTCTTTAATTCTG R: GCTTTCATTTTCAGTTTTCTCTAG	208-268

Protokoly PCR:

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

Tc4 F - 4 µM (6FAM), Tc4 R - 4 µM

Tc6 F - 4 μ M (6FAM), Tc6 R - 4 μ M

Tc920 F - 3 μ M (NED), Tc920 R - 3 μ M

Tc937 F - 2 μ M (VIC), Tc937 R - 2 μ M

Ředění primerů:

Příprava TE pufru (1 mM Tris - HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA - 10 ml roztoku připravíme z 10 μ l 1M Tris - HCl a 0,2 μ l 0,5M EDTA, doplníme H₂O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich) do 10 ml.

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace (100 pmol/ μ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris - HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μ l, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů Tc4 F - 4 μ l, Tc4 R - 4 μ l, Tc6 F - 4 μ l, Tc6 R - 4 μ l, Tc920 F - 3 μ l, Tc920 R - 3 μ l, Tc937 2 F - 2 μ l, Tc937 R - 2 μ l a doplníme 74 μ l TE pufru).

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

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 μ l
50 mM MgCl ₂	0,6 μ l
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,2 μ l
Primers mix	0,75 μ l
Polymerase Platinum Taq	0,075 μ l
H ₂ O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,875 μ l
Přidat 1 μ l templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 x PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl₂, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou)

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	5 min	Počáteční denaturace
15 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	95 °C	15 sec	Denaturace
3.	54 °C	15 sec	Annealing
4.	72 °C	15 sec	Elongace
20 x opakovat od 2. do 4. kroku			
5.	89 °C	20 sec	Denaturace
6.	52 °C	20 sec	Annealing
7.	72 °C	20 sec	Elongace
1x			
8.	72 °C	20 min	Finální elongace
9.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

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

Tc5 F - 5 μ M (6FAM), Tc5 R - 5 μ M

Tc7 F - 3 μ M (6FAM), Tc7 R - 3 μ M

Tc915 F - 5 μ M (VIC), Tc915 R - 5 μ M

Tc963 F - 6 μ M (VIC), Tc963 R - 6 μ M

Ředění primerů:

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace (100 pmol/ μ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris - HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μ l, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů Tc5 F – 5 μ l, Tc5 R - 5 μ l, Tc7

F - 3 μ l, Tc7 R - 3 μ l, Tc915 F - 5 μ l, Tc915 R - 5 μ l, Tc963 F - 6 μ l, Tc963 R - 6 μ l a doplníme 62 μ l TE pufru).

Reakční směs a teplotní režim PCR jsou stejné jako u multiplexu 1.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrozkušavky (stripy, destičky PCR 0,2 ml s víčkem), box chladicí na PCR mikrozkušavky, chladicí destička, centrifuga, teplotní cyklovač

c. Postupy elektroforézy v agarózovém gelu

Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů se provádí pomocí horizontální elektroforézy na 2% agarózových gelech. Agaróza (Agarose SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) se rozpouští zahříváním v 0,5 x TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k překypění roztoku. K vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se používá fluorescenční barvivo např. GelRed (GelRed™ Nucleic acid Gel Stain, 10,000X in Water, Biotium, Hayward). GelRed lze přidat hned do rozpuštěného agarózového roztoku v poměru 1:10 000 a nalít do formy. Ztuhnutý gel se přendá do vany pro elektroforézu a přilije se 0,5 x TBE pufru tak, aby roztok přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se pipetují PCR amplifikáty (15 μ l) smíchané s 4 μ l pufru (gel loading buffer, Sigma – Aldrich). Pro porovnání velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1 μ l standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4 μ l destilované vody a 2 μ l pufru (gel loading buffer).

V elektrickém poli se pohybují záporné fragmenty DNA ke kladné elektrodě, jejich migrační schopnost závisí na jejich relativní hmotnosti (velikosti amplifikátu). Potřebná doba trvání elektroforézy je kolem 30 minut při napětí 60 V a dalších 120 - 150 minut při napětí 100 V. Po proběhlé elektroforéze se gely dokumentují pod UV zářením pomocí kamerového systému. DNA fragmenty se v gelovém nosiči projevují jako fluoreskující proužky.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrovlnná trouba, vortex, horizontální elektroforéza se zdrojem, dokumentační systém s UV transluminátorem, temnou komorou (Darkroom), snímací kamerou a softwarem pro zobrazení gelů

d. Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů

Přesné zjištění velikostí amplifikovaných fragmentů v hodnotách párů bází se provádí na genetickém analyzátoru (např. typu Applied Biosystem 3500). Polymerázová řetězová reakce musí být provedena s fluorescenčně označenými primery (pro uvedený typ analyzátoru na 5'konci s modifikacemi 6FAM, VIC, NED, PET). PCR amplifikáty po 1 μ l se nanáší do příslušných 96 jamkových destiček pro sekvenátory a před fragmentační analýzou jsou denaturovány. Ke každému vzorku se přidá krátce promíchaná (pomocí vortexu) směs Formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystem) o objemu 11 μ l na jeden vzorek a velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ® Size standard v 2.0, Applied Biosystem) 0,4 μ l na jeden vzorek, destička se krátce stočí na centrifuze a provede se inkubace 4 minuty při teplotě 94° C, pak následuje prudké zchlazení na ledu po dobu minimálně 2 minut.

Genetický analyzátor pracuje na principu elektroforetického rozdělení fragmentů DNA v tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Polymer i zkoumaný vzorek je do kapiláry naplňován automaticky. Detekce fragmentovaných úseků je založena na hodnocení fluorescence z fluorescenčně označených primerů po excitaci laserovým zářením. Přístroj je schopen souběžně detekovat vícebarevnou fluorescenci, to umožňuje v multiplexovém uspořádání hodnotit najednou více markerů, což je z časových i finančních důvodů velmi výhodné. Pro jejich správnou identifikaci je nutné jejich kombinaci sestavit z hlediska velikosti alel a fluorescenčního zbarvení primerů.

Osm vybraných lokusů lze seskupit pro fragmentační analýzy do 2 běhů dle sestavených multiplexů. Pro první běh se skupina skládá z PCR produktů multiplexu 1 (amplifikované lokusy Tc4, Tc6, Tc920, Tc937) u jednotlivých rostlinných vzorků lípy srdčité. Do jamek se nanáší po 1 μ l z PCR směsi amplifikovaných fragmentů v rámci multiplexu. V druhém běhu probíhá fragmentační analýza PCR produktů multiplexu 2 (amplifikované lokusy Tc5, Tc7, Tc915, Tc963).

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

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

sada pipet a příslušné špičky, vortex, teplotní cyklovač, centrifuga, příslušné 96 jamkové destičky, genetický analyzátor

e. Zpracování molekulárních dat

Lípa srdčitá má diploidní sadu chromozomů ($2n=82$) (HEJNÝ et SLAVÍK 1992) a protože specifické mikrosatelitové markery mají kodominantní charakter, tak u sledovaného lokusu získáme pro každého jedince dvě shodné alely v případě homozygota nebo v případě heterozygota dvě různé hodnoty alel. Pro získání genetických charakteristik a zjištění klonově identických jedinců se velikosti alel hodnocených lokusů pro sledované zástupce lípy statisticky zpracovávají (např. za využití statistických programů GenAlEx 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007), GENEPOP 4.2 (RAYMOND et ROUSSET 1995; ROUSSET 2008), STRUCTURE 2.3.4. (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009). Pro kontrolu velikostí odečtených hodnot mikrosatelitových lokusů včetně ohodnocení frekvence nulových alel lze použít software Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004).

Na základě získaných hodnot genetických charakteristik lze u porostů lip hodnotit a porovnávat úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, genetické diference mezi populacemi, očekávané a pozorované heterozygotnosti, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, odvození populačních struktur apod. Jedna z nejvýznamnějších genetických charakteristik je ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi, které lze vypočítat na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972).

V případě ověřování klonové identity se porovnávají hodnoty alel sledovaných lokusů u jedinců (ramet) příslušných klonů. Výsledkem je zpracovaná genotypizace - přehled hodnot alel zvolených lokusů pro šetřené klony. Příslušnost jedince ke klonu je deklarovaná, když jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů. V případě použití vysoce polymorfních markerů lze počet sledovaných markerů snížit a tím snížit i náklady na analýzy. Někteří autoři např. Schueler et al. (2003), Lacis et al. (2009, 2011) uvádějí ve svých pracech využití jen tří až sedm vysoce polymorfních markerů.

III. Srovnání novosti postupů

Metodické postupy DNA analýz u lípy srdčité pro ověřování identity klonů a získání genetických charakteristik pomocí jaderných mikrosatelitových markerů nebyly dosud pro

podmínky České republiky popsány. Z důvodu ekonomických i časových úspor při zpracování většího počtu vzorků byly metodické postupy analýz polymorfních SSR markerů také optimalizovány z hlediska jejich seskupení do multiplexů. Významnost nových postupů v předkládané metodice spočívá ve využití DNA analýz pro objektivní ověření příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu). V případě semenných sadů lípy malolisté dosavadní systém kontroly deklarované identity zdrojů reprodukčního materiálu spočíval pouze v dokumentační evidenci a případnou záměnu klonů nebylo možné zjistit. Objektivní genetické hodnocení spočívá v přímé analýze DNA jedinců s využitím polymorfních jaderných mikrosatelitových lokusů, jejichž velikosti jsou s přesností jednotek bází zaznamenávány na genetickém analyzátoru Applied Biosystems. Výstupem těchto analýz je zpracovaná multilokusová genotypizace (MLG), což představuje databázi velikostí alel hodnocených lokusů k jednotlivým klonům. Příslušnost jedince ke klonu odpovídá, když se hodnoty alel shodují u všech analyzovaných lokusů. Pro získání informací o genetické příslušnosti naroubovaných jedinců v rámci klonu a proměnlivosti mezi různými klony bylo potřebné vyhledat DNA markery, které vykazují vysokou míru polymorfismu. Mezi nejvariabilnější oblasti genomu patří mikrosatelitové lokusy, které se liší v počtu opakování základního motivu. S využitím genetického analyzátoru získáme vynikající rozlišení alel, například lze zjistit i rozdílnou velikost amplifikačního produktu o jednu repetici motivu (u dinukleotidových motivů jen o 2 báze). Za účelem ověření klonální identity a zjištění genetických charakteristik u lípy srdčité bylo pro DNA analýzy po odzkoušení sady mikrosatelitových lokusů vybráno 8 jaderných mikrosatelitových markerů Tc4, Tc5, Tc6, Tc7, Tc915, Tc920, Tc937, Tc963, jejichž PCR amplifikace byly optimalizovány i za účelem seskupení jejich analýz do multiplexů. Amplifikace a navazující fragmentační analýzy provedené v multiplexech představují velkou časovou a finanční úsporu. Popsané metodické postupy byly odzkoušeny při ověřování klonové identity a genetické diverzity mezi klony u semenného sadu lípy srdčité označeném - CZ-3-3-LPM-138-10-4-C, dle evidence ERMA – ÚHÚL, nacházejícím se na LS LČR Tábor nazvaném Písecká Smoleč.

IV. Popis uplatnění metodiky

Uplatnění metodiky bude spočívat v získávání poznatků o úrovni genetické diverzity zájmových porostů lípy srdčité za účelem výběru vhodných zdrojů reprodukčního materiálu a v ověřování deklarované identity klonů u všech typů klonových výsadeb a semenných sadů.

Uvedené metodické postupy by kromě možnosti ověřování klonové identity (genetické totožnosti) roubovanců ve stávajících semenných sadech, měly být také využity státní správou při naplňování dotačního titulu pro nově uznávané semenné sady. V případě, že vlastník při zakládání semenného sadu či sbírky klonů zažádá o zařazení genetického zdroje do Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a dotační podporu na zakládání a obhospodařování těchto zdrojů, je ověření identity klonů jednou ze základních vstupních podmínek pro jejich zařazení a získání dotace. Na základě předkládaných metodických postupů DNA analýz bude probíhat výběrová kontrola genetické totožnosti roubovanců rostoucích v semenném sadu s referenčním materiálem rostlinných vzorků odebraných ze zdrojových rodičovských stromů ve stejnou dobu, když byly odebírány rouby pro napěstování roubovanců. Referenční vzorky se odebírají za přítomnosti zástupce ÚHUL - koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a uchovávají se v ultra nízkých teplotách.

Předložené metodické postupy jsou také návodem pro získání znalostí o genetické struktuře porostů lípy srdčité. Poznatky o úrovni genetické diverzity, diferenciaci, heterozygotnosti a dalších genetických charakteristik u zdrojových porostů reprodukčního materiálu jsou při umělé obnově lesa velmi důležité. Při vyšší úrovni genetické diverzity lze předpokládat zvýšenou adaptační schopnost k nepříznivým podmínkám prostředí a tím zachování stability lesních ekosystémů. Předpokládá se, že informace o genetických charakteristikách porostů budou 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 aplikační využití získaných poznatků je při 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. Metodické postupy ověřování identity klonů/ortetů pro semenné sady (popř. klonové archivy) budou sloužit pro potřeby státní správy a koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin (ÚHÚL) pro aplikaci nových kontrolních metod a dotační politiky ČR.

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

mikrosatelitové markery s vysokou mírou polymorfismu, které byly odzkoušeny u semenného sadu lípy srdčité - CZ-3-3-LPM-138-10-4-C.

V příloze jsou uvedeny příklady výstupů DNA analýz u lípy srdčité. Možnosti uplatnění těchto postupů v dalších laboratořích může komplikovat finanční náročnost přístrojového vybavení pro fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru. Fragmentační analýzy si však lze objednat na zakázku u komerčních firem (SEQme s.r.o., Genomac výzkumný ústav, s.r.o., BIOCEV).

V. Ekonomické aspekty

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů vedoucích k poznatkům o genetické kvalitě především diverzitě porostů nebo ověření klonové příslušnosti je přínos celospolečenský. Současně dochází i k naplňování cílů Národního programu zachování a reprodukce genofondu lesních dřevin - podporovat kvalitní genetické zdroje a ověřovat jejich identitu metodou DNA markerů. Reprodukce genově bohatších populací zaručuje získání stabilnějších a odolnějších porostů, které budou zvyšovat biologickou rozmanitost, lépe se přizpůsobovat možným změnám klimatu a tím přispívat k ochraně životního prostředí. Při posuzování ekonomických aspektů nelze opomenout, že ochrana biologické rozmanitosti představuje také naplnění cílů aktualizované Státní politiky životního prostředí České republiky 2012-2020 schválené usnesením vlády č. 6 ze dne 9. ledna 2013 a Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky schválené usnesením vlády ČR č. 193 ze dne 9. března 2016. Vedle celospolečenských přínosů se dá předpokládat i zvýšení tržeb z těžby dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů lipových porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu.

Lípa srdčitá je typická střeoevropská dřevina, vyskytuje se prakticky po celém území České republiky od nížin až do nižších horských poloh. Je to typický druh suťových lesů. Vysazuje se však také v parcích a stromořadích jako okrasný a stínící strom, jako medonosný strom nebo pro své květy, které jsou vysoce ceněné v lidovém léčitelství, neboť účinné látky mají široké spektrum použití. Lipové dřevo je měkké a lehké, dobře opracovatelné. Hodí se proto zejména pro výrobu hudebních nástrojů a pro další řezbářské a modelářské práce (sochy, loutky, hračky, protézy, obrazové rámy atd.). Lipové lýko je vysloveně houževnaté a pevné a před zavedením umělých hmot bylo s oblibou používáno jako pletivo.

Lepší genetická produkční báze zvyšuje kvantitativní těžební potenciál a přispívá tím ke zvýšení ekonomické životaschopnosti a konkurenceschopnosti trvale udržitelného obhospodařování lesů, což je jeden z cílů Národního lesnického programu II (2013).

Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že v době mýtní zralosti lipových porostů, resp. porostů ve směsi s lípou, bude dosaženo vyšší kvantitativní (objemové) produkce. Rozdíl porostních zásob vztažených k obmýtí u porostů lípy, které se nacházejí v současných genových základnách (GZ) či v uznaných jednotkách selektovaných A nebo B oproti ostatním porostům na území ČR, lze prokázat výsledky analýzy celostátních informací v datovém skladu ERMA. V závislosti na rostoucím věku těchto porostů v rozmezí 120 - 130 let činí nárůst objemové produkce v našich podmínkách v průměru cca $90 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$. Zjištěné výsledky v genových základnách vykazují tedy lepší produkční bázi, přestože je v podmínkách ČR počet těchto GZ zatím nedostatečný. Genové základny a uznané selektované jednotky A a B lípy oproti ostatním porostům lípy ve věku 120 – 130 let prokazují zlepšení absolutní výškové bonity o 3 m, tedy přibližně o 1 relativní stupeň, což bezprostředně souvisí také s vyšší objemovou produkcí.

Modelová ekonomická kalkulace očekávaných přínosů pěstování lípy z kvalitnějšího reprodukčního materiálu vztažená k mýtnímu věku 120 let a k produkčnímu rozdílu vzniklému změnou relativní bonity o 1 stupeň, využívá produkční ukazatele z růstových (výnosových) tabulek Dolnosaských státních lesů (WBR 86).

Vzhledem ke skutečnosti, že v ČR ani v Německu žádné samostatné růstové tabulky pro lípu neexistují, tak je modelová ekonomická kalkulace založena na rozdílu porostní zásoby buku hlavního porostu mezi dvěma lepšími bonitami (výnosovými třídami), jak vyplývá z následující tabulky. Z důvodu předběžné opatrnosti se tak dává přednost těmto nižším tabulkovým hodnotám před vyššími hodnotami zjištěnými v DS ERMA.

Věk	Výnosová třída 9		Výnosová třída 8	
	Střední tloušťka cm	Objem $\text{m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	Střední tloušťka cm	Objem $\text{m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$
120	43	460	39	414
Rozdíl v objemu: 46 m^3				

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

Pouze pro účely porovnání je v následující tabulce ve vazbě na zjištěné absolutní výškové bonity v GZ a v ostatních porostech ČR uvedena modelová produkce podle platných růstových tabulek pro buk (IFER, 1996).

Věk	Bonita 5 (26)		Bonita 6 (24)	
	Střední tloušťka cm	Objem m ³ .ha ⁻¹	Střední tloušťka cm	Objem m ³ .ha ⁻¹
120	35	471	34	415
Rozdíl v objemu: 56 m ³				

Zdroj: Růstové a taxační tabulky hlavních dřevin České republiky (smrk, borovice, buk, dub), IFER (1996)

V modelové kalkulaci se neuvažuje s vyššími náklady na kvalitnější reprodukční materiál. Zde vypočtený ekonomický efekt v Kč.ha⁻¹ představuje tzv. hrubý výnos vlastníka (tržby z prodeje dřeva bez odpočtu nákladů), který získá vlastník v důsledku tržní realizace většího objemu kulatinových sortimentů surového dříví (46 m³.ha⁻¹ ve 120 letech).

Jelikož nejsou k dispozici ani žádné domácí informace o sortimentní struktuře mýtních porostů lípy, tak se pro účely výpočtu vychází alespoň z podílu pilařských výřezů buku podle porostních sortimentačních tabulek používaných v Dolním Sasku, které platí i pro lípu.

Tloušťka cm	Objem zvýšené produkce (m ³ .ha ⁻¹)	Podíl kulatiny z hroubí v % při průměrné kvalitě	Členění kulatiny (= 100 %) podle tloušťkových tříd								Zvýšený objem kulatiny (m ³ .ha ⁻¹)
			1b	2a	2b	3a	3b	4	5	6+	
43	46	46		1	10	20	23	33	10	3	21,2

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

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

Protože v ČR neexistuje žádná cenová statistika podle tloušťkových tříd pilařské kulatiny, resp. ani z Německa se nepodařilo získat tento druh cenové informace, byly další výpočty provedeny náhradním způsobem, tj. na základě starších zahraničních informací (např. výsledky submise cenných listnatých výřezů, Pretzfeld 2015) byl stanoven poměr mezi průměrnou cenou bukových a lipových výřezů, který je 1,224.

Pro kalkulaci ekonomického přínosu lípy při použití kvalitního genetického zdroje, tj. ze zvýšeného objemu obchodovatelného dříví, se vychází z údajů o domácím obchodu s pilařskou kulatinou buku, ke kterému existuje cenová statistika. Z údajů ČSÚ o výsledcích prodeje listnatých sortimentů buku za vlastníky lesa za 1. čtvrtletí 2018 vyplývá:

Název sortimentu (BUK)	Průměrné ceny surového dříví pro tuzemsko za ČR za 1. čtvrtletí 2018 Kč.m ⁻³	Počet zjištěných cen
Výřezy III. A/B tř. jakosti	1739	9
Výřezy III. C tř. jakosti	1640	6
Výřezy III. D tř. jakosti	1381	6
Vážený průměr k počtu zjištěných cen	1 608	

Zdroj: ČSÚ

Jak již bylo výše uvedeno, poněvadž neexistuje cenová statistika podle tloušťkových tříd pilařské kulatiny, byly další výpočty provedeny s průměrnou cenou pro tuzemsko.

Výsledná kalkulace hrubého ekonomického přínosu:

Zvýšený objem pilařské kulatiny 21,2 m³.ha⁻¹ . průměrná cena 1 608 Kč.m⁻³ . koeficient 1,224
= 41 726 Kč.ha⁻¹

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

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

- Analýza datového skladu ÚHÚL - DS ERMA (Pařízková, Hradec Králové, 2017 - 2018)
- ČERNÝ M., PAŘEZ J., MALÍK Z.: Růstové a taxační tabulky hlavních dřevin České republiky (smrk, borovice, buk, dub), Ústav pro výzkum lesních ekosystémů (IFER), 1996
- Průměrné ceny surového dříví pro tuzemsko za ČR v roce 2018, ČSÚ
- SLABÝ, R. (ED): Závěry a doporučení Koordinační rady k realizaci Národního lesnického programu II, ÚHÚL Brandýs nad Labem, 2013
- Statistik der Landesforstverwaltung Niedersachsen (WBR 86 – Tabelle 6)
- Waldbewertungsrichtlinien – WBR 86, Niedersächsische Landesforsten, Druck 7/1990
- Laubwertholzsubmission Pretzfeld, 2015
- Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2006

Náklady na postupy genetických analýz uvedených v metodice jsou kalkulovány na spotřební materiál a chemikálie s předpokladem vlastnictví laboratorního vybavení pro analýzy DNA. Na izolaci DNA vzorku z jednoho stromu jsou průměrné náklady 114,- Kč. Náklady u jednoho vzorku (stromu) na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí přibližně pro 8 lokusů 90,- Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. V uvedené kalkulaci našich nákladů (výzkumné pracoviště) nejsou zahrnuty doplňkové náklady, náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace vybavenosti (materiální i personální) pracoviště. Při využití služeb komerčních laboratoří je možné se obrátit například na společnost SEQme s.r.o., Genomac výzkumný ústav, s.r.o., BIOCEV. Při dodání vlastních PCR amplifikátů účtuje například společnost SEQme za analýzu na genetickém analyzátoru u jednoho vzorku pro 4 lokusy v jednom multiplexu 65,- Kč bez DPH.

VI. Dedikace

Metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0118 a výzkumného projektu NAZV č. QK1810258 (Návrh alternativní druhové skladby

dřevin pro lesní ekosystémy se sníženou ekologickou stabilitou v důsledku fyziologického sucha).

VII. Seznam použité související literatury

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.

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.) 1992: Květena České republiky 3. Praha, Academia: 542 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.

KALINOWSKI S. T., TAPER M. L., MARSHALL T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099–1106.

LACIS G., RASHAL I., RUISA S., TRAJKOVSKI V., IEZZONI A. F. 2009. Assessment of genetic diversity of Latvian and Swedish sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources collection by using SSR (microsatellite) markers. *Scientia Horticulturae*, 121: 451–457.

LACIS G., RASHAL I., TRAJKOVSKI V. 2011. Implementation of a limited set of SSR markers for screening of genetic variability in Latvian and Swedish sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genetic

resources collections. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, 65 (1/2) (672/673): 21–28. DOI: 10.2478/v100046-011-0014-4

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.

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: 283–392.

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. Leśne Prace Badawcze, 75 (1): 47-54.

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.

PHUEKVILAI P., WOLFF K. 2013. Characterization of microsatellite loci in *Tilia platyphyllos* (Malvaceae) and cross-amplification in related species. Applications in Plant Sciences, 1(4): 1200386.

PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155(2): 945–959.

RAYMOND M., ROUSSET F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity, 86, 248-249.

ROUSSET F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementations of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 8, 103-106.

SCHUELER S., TUSCH A., SCHUSTER M., ZIEGENHAGEN B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46: 95–102.

SVOBODA P. 1955. Lesní dřeviny a jejich porosty. Část II. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

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.

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.

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého (Evaluation of Norway spruce seed orchard using microsatellite markers). *Zprávy lesnického výzkumu*, 59, 2014 (4): 243 - 249.

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. *Lesnický průvodce*, 2015, 8: 36 s.

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2016. Genetická charakterizace jedle bělokoré pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. *Lesnický průvodce*, 5: 34 s.

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E. 2016. Studium variability populací buku lesního pomocí mikrosatelitových markerů. *Lesnický průvodce*, 8: 35 s.

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O. 2017. Hodnocení genetických charakteristik u borovice lesní s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. *Lesnický průvodce*, 4: 43 s.

MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E. 2017. Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u třešně ptačí. Certifikovaná metodika. *Lesnický průvodce*, 10: 40 s.

CVRČKOVÁ H., KOMÁRKOVÁ M., TRČKOVÁ O., MÁCHOVÁ P. Micropropagation of *Tilia cordata* Mill. and verification of genetic diversity of donor trees. 2018, 43 – 46. *In*: Bonga JM, Park YS, Trontin JF (Editors) Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on “Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges.” September 10-15, 2018. Coimbra, Portugal. Book of Abstracts.

Published online, April 5, 2019: <https://www.iufro.org/science/divisions/division-2/20000/20900/20902/publications/>

Use of microsatellite markers for verification of clonal identity and diversity in small-leaved linden (*Tilia cordata* Mill.)

Summary

Tilia cordata Mill. is historically considered to be a Czech national tree species, which has naturally frequently occurred in past in forest ecosystems and whose extension could again contribute to enhancing biodiversity and increasing the stability of forest ecosystems.

This species is appreciated for its high adaptability to climatic factors and is often used for urban greenery. Even adult trees are characterized by high regenerative ability after transplanting and pruning. It is a species with suitable soil-improving and soil protection properties. Its application is multifaceted for example for carving, medicine and beekeeping.

In the past, this species has been reduced due to the extensive change of forest to agriculture land and as a consequence of artificial reforestation with preferences for conifers (Úradníček et al., 2009). Small-leaved linden stands have a small number of individuals, so the most effective conservation strategies of gene sources are seed orchards and clone banks (RUSSELL 2003). To acquire more detailed knowledge of the genetic quality of gene sources of reproductive material and to verify the clonal identity by an objective method, it is possible to use DNA analyses with nuclear microsatellite markers. It is widely assumed that populations characterized by narrow genetic diversity could be more sensitive to environmental changes or disease (MAGHULY et al. 2006). Therefore, it is essential to determine the level of genetic variability in ecologically valuable stands and populations. This methodology present the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for genetic characterization and clonal identification of *Tilia cordata* Mill. Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSR) are small repetitive DNA sequences, that are highly variable markers and commonly used in population genetic. The selected seed orchard of small-leaved linden Písecká Smoleč was used to develop this methodology.

This methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of polymerase chain reaction (PCR), separation, sizing of amplification products and calculations of molecular data. Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) from 100 mg fresh leaves or 20 mg lyophilized leaves. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. Eight variable microsatellite markers Tc4, Tc5, Tc6, Tc7, Tc915, Tc920, Tc937, Tc963 (PHUEKVILAI et WOLFF 2013) were selected for DNA analysis. PCR products were separated by capillary electrophoresis using the Applied Biosystems 3500 genetic analyser.

Acquiring new knowledge on the genetic structure and verifying the clonal identity of gene sources of reproductive material is very important in order to maintain the ecological stability of forests. The developed procedures of genetic monitoring and verifying the clonal identity 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 creating optimal species composition in forests.

Příloha

Příklady výstupů genetických analýz u lípy srdčité

Obr. 1: Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru (záznam velikostí alel u tří jedinců deklarovaného ortetu, kdy v případě třetího jedince se projevila neshoda)



Tab. 1.

Příklad multilokusové genotypizace (MLG) u zkoumaných ortetů sledovaného semenného sadu lípy srdčité

Klon	Multiplex 1				Multiplex 2			
	Tc4	Tc6	Tc920	Tc937	Tc5	Tc7	Tc915	Tc963
9393	219/22 6	130/14 0	222/228	148/14 8	136/14 6	215/22 7	149/16 3	255/25 5
9394	224/23 2	130/14 0	228/230	148/14 8	136/14 6	215/22 7	149/15 5	263/27 9
9395	232/23 2	130/13 0	220/228	148/14 8	140/16 6	215/21 5	153/15 5	265/26 5
9396	226/23 4	138/14 0	222/230	148/14 8	136/14 0	215/22 7	149/15 5	257/26 5
9397	232/23 2	134/13 6	230/232	148/14 8	136/14 0	215/22 7	149/17 3	267/27 1
9398	224/22 4	130/13 6	230/230	148/14 8	136/14 0	215/22 7	149/14 9	257/26 5
9399	226/23 4	132/14 0	228/230	148/14 8	146/14 6	227/22 7	149/15 3	245/27 5
9400	224/22 6	130/13 6	220/230	148/14 8	140/16 6	215/21 5	155/16 7	275/27 5
9401	226/22 6	136/13 8	222/230	148/15 8	136/13 6	215/22 7	147/15 5	239/26 7
9402	226/23 4	124/13 8	222/222	148/14 8	136/14 6	215/22 7	169/16 9	255/26 7
9403	213/22 6	124/13 6	222/222	148/15 8	140/15 6	227/22 7	157/16 9	245/26 5
9404	226/23 2	124/13 4	228/228	150/15 8	136/14 6	215/22 7	149/15 7	255/26 3
9405	224/22 6	124/13 6	222/222	148/14 8	136/14 0	227/22 7	157/16 9	245/26 3
9406	234/23 4	134/14 0	222/222	148/14 8	146/16 0	215/21 5	149/16 9	269/27 7
9407	226/22 6	136/13 8	220/234	148/14 8	136/16 0	215/22 7	149/16 9	251/26 5
9408	226/22 6	124/13 8	222/222	148/15 8	136/14 0	227/22 7	153/16 9	255/25 5
9409	226/22 6	130/13 4	232/234	148/14 8	146/15 8	215/22 7	153/17 5	277/27 7
9410	226/22 6	130/13 8	228/230	148/15 0	140/17 6	215/21 5	153/15 5	251/27 1

9411	224/22 6	130/13 8	228/230	148/15 6	144/16 6	215/22 7	153/15 5	251/25 7
9412	234/23 4	136/13 6	230/234	148/15 0	136/13 6	215/21 5	155/16 9	259/26 9
9413	226/23 4	134/13 6	220/230	148/15 0	136/13 6	215/22 7	149/16 9	269/26 9
9414	226/22 6	136/13 6	220/230	148/14 8	136/14 0	227/22 7	153/15 5	251/26 7
9415	226/22 6	134/13 6	220/230	150/15 8	136/14 0	215/22 7	169/17 7	251/27 1
9416	232/23 2	130/13 0	220/230	148/14 8	136/16 6	227/22 7	155/17 3	267/26 7
9417	224/22 6	136/14 0	230/230	150/15 0	146/17 2	215/22 7	155/16 3	251/26 3
9418	213/22 6	136/13 8	228/234	148/14 8	136/14 8	215/22 7	149/15 7	261/26 5
9419	226/23 2	126/13 0	232/234	148/14 8	136/15 4	215/22 7	153/15 3	253/26 1
9420	226/22 6	138/13 8	228/234	148/15 0	148/14 8	215/22 7	167/16 9	263/26 3
9421	226/22 6	130/13 6	232/234	146/14 8	136/14 8	227/22 7	157/16 9	267/26 7
9422	226/23 2	136/13 6	230/234	148/15 8	140/14 6	215/22 7	149/17 9	261/27 7
9423	226/22 6	130/13 6	234/234	148/15 8	146/16 4	215/22 7	149/16 7	261/26 1
9424	226/23 2	136/13 6	232/232	148/14 8	140/14 8	227/22 7	149/15 7	265/26 5
9425	226/23 2	136/13 8	230/234	148/14 8	146/15 6	215/22 7	153/15 5	245/24 5
9426	226/22 6	130/14 0	232/234	148/14 8	140/14 6	227/22 7	149/14 9	273/27 3
9427	226/22 6	130/13 6	228/230	148/16 8	156/16 0	227/23 1	149/16 9	263/26 3
9428	236/23 6	130/13 6	222/230	148/16 6	140/15 4	215/21 5	157/16 3	245/26 3
9429	226/23 0	130/13 6	222/230	146/16 6	136/14 6	227/22 7	149/16 9	267/26 7
9430	217/22 6	136/14 2	220/234	148/14 8	146/16 4	215/22 7	149/15 3	251/25 1

Tab. 2. Průměrné hodnoty genetických charakteristik u sledovaných lokusů pro testované ortety lípy srdčité

Lokus	Velikost PCR produktu (bp)	Na	I	Ho	He	F
Tc4	224–236	5	1.28	0.50	0.64	0.219
Tc5	136–176	11	1.97	0.80	0.82	0.024
Tc6	124–140	8	1.72	0.95	0.78	-0.226
Tc7	215–243	7	1.45	1.00	0.71	-0.408
Tc915	149–173	8	1.92	0.80	0.84	0.045
Tc920	220–234	7	1.58	0.55	0.73	0.247
Tc937	146–166	5	0.84	0.40	0.41	0.027
Tc963	245–281	15	2.48	0.85	0.90	0.056

Na: počet různých alel, I: Shannonův informační index, Ho: heterozygotnost pozorovaná, He: heterozygotnost očekávaná, F: fixační index