

SLEDOVÁNÍ GENETICKÉ PROMĚNLIVOSTI CHLUMNÍHO EKOTYPU SMRKU ZTEPILÉHO POMOCÍ RAPD

STUDYING OF GENETIC VARIABILITY OF NORWAY SPRUCE HURST ECOTYPE BY RAPD

HELENA CVRČKOVÁ, PAVLÍNA MÁCHOVÁ, JAROSLAV DOSTÁL, JANA MALÁ
Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady

ABSTRACT

In this study, we describe the use of DNA analysis by RAPD method (Random Amplified Polymorphic DNA) to identify a variability of Norway spruce hurst ecotype. Total genomic DNA was isolated by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from derived embryogenic cell lines. Embryogenic cultures were established from valuable original of hurst ecotype of Norway spruce (*Picea abies* [L.] KARST.) growing in the České Švýcarsko National Park and the Křivoklátsko Protected Landscape Area. From this area 39 samples of Norway spruce hurst ecotype were analysed, and 3 samples of Norway spruce mountain ecotype from locality Neveklov were compared. Arbitrary decamer primers from sets OPR, OPC and OPBC were tested. Polymorphism of observed Norway spruce lines was proved with primer OPBC – 17. The total of 420 scoreable fragments was amplified. 86 of them were monomorphic and 334 were polymorphic (79.5% polymorphism). The dendrogram of genetic similarity was constructed by the UPGMA method based on the Jaccard coefficient.

Klíčová slova: smrk ztepilý, RAPD, somatická embryogeneze, polymorfismus

Key words: Norway spruce, RAPD, somatic embryogenesis, polymorphism

ÚVOD

Smrk ztepilý patří k nejrozšířenějším a hospodářsky nejvýznamnějším evropským dřevinám. Je to velmi proměnlivá dřevina, která vytváří mnoho odlišných forem. V České republice jsou přirozené původní populace smrku ztepilého vylišený v ekotypy chlumní (pahorkatinný), horský a vysokohorský (např. PAULE 1992). Z ekologického, ale i ekonomického hlediska je významné uchovávat genofond původních ekotypů přizpůsobených daným přírodním podmínkám. Vývoj přirozené populace souvisí s její genetickou diverzitou, a to tak, že čím jsou populace v genetické výbavě rozmanitější, tím se lépe přizpůsobí měnícím se životním podmínkám. Ke genetické charakterizaci původních populací chlumního ekotypu smrku ztepilého byly využity DNA analýzy.

Pro studium genetických vlastností se stále více využívají molekulární markery a především DNA markery, které nejsou ovlivněny podmínkami prostředí jako například izoenzymové markery a umožňují přímo studovat genom organismů. Většina metod studia DNA markerů je založena na PCR – polymerázové řetězové reakci, při které dochází k selektivní amplifikaci určitého úseku nukleové kyseliny. PCR je cyklováná reakce o třech teplotních fázích, při které termostabilní DNA polymeráza namnoží úsek mezi dvěma oligonukleotidy (primery) na základě komplementarity bází se sekvencí templátové DNA. Při PCR reakci je využívána schopnost DNA opakovaně denaturovat a reasociovat v závislosti na různé teplotě. Směs, v níž PCR probíhá, obsahuje templátovou DNA, většinou dva různé primery, nukleotidtrifosfáty, termostabilní polymerázu a reakční pufr. Koncentrace a vzájemné

oměry koncentrací templátu, prekurzorů i primerů a především hořecných iontů jsou v průběhu PCR klíčové. Velmi často je nezbytné optimalizovat složení reakční směsi tak, aby výtěžky byly dostatečně vysoké a spolehlivé. V prvním kroku je zahřátí na cca 92 – 96 °C denaturována templátová dvojřetězcová DNA na jednořetězcové molekuly. Termostabilní polymerázy při této teplotě nedenedaturují, ale uchovávají si svou funkci. V druhém kroku je reakční směs ochlazená na takovou teplotu, při níž mohou příslušné primery hybridizovat s templátovou DNA. Teplota hybridizace je stanovena podle velikosti a vlastností primerů, zpravidla se pohybuje mezi 37 – 58 °C. V třetím kroku je teplota zvýšena na 70 – 78 °C, což je teplota v rozsahu teplotního optima termostabilní DNA polymerázy, která je pro PCR používána (u Tag polymerázy se doporučuje teplota 72 °C). Po době, která je nezbytná k vytvoření příslušné kopie DNA podle předlohy (zpravidla 2 – 3 minuty), je posloupnost reakcí opakována od začátku. Tak vznikne vyšší počet jednořetězcových templátů, k nimž se mohou po zchlazení reakční směsi opět připojovat primery. Opakováním těchto tří kroků dochází k amplifikaci studovaného úseku nukleové kyseliny. Výsledek replikace se stává matricí následujícího cyklu, a tak žádaný úsek přibývá exponenciální rychlostí (VONDREJS, STORCHOVÁ 1997).

Genetická proměnlivost byla prověřována u vybraných embryonických linií odvozených z cenných jedinců chlumního ekotypu smrku ztepilého. Metoda somatické embryogeneze představuje efektivní způsob mikropropagace lesních dřevin vhodný zejména pro jehličnany a představuje perspektivní metodu reprodukce obzvláště pro smrk ztepilý, u kterého se podařilo somatická embrya zregenerovat v kompletní rostliny (HAKMAN et al. 1985; CHALUPA et al. 1990; MALÁ

1991). Pro testování genetické variability vybraných linií smrku ztepilého byla použita metoda odvozená od PCR technik – metoda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA), vycházející z práce WILLIAMS et al. (1990). Reakce probíhá díky náhodnému nasedání krátkého oligonukleotidu (primeru) na analyzovanou genomovou DNA. Při této metodě se jako primer používá oligonukleotid většinou o délce kolem 10 nukleotidů s libovolnou sekvencí. U této délky primeru a nižší teplotě annealingu (35 – 38 °C) je značná pravděpodobnost, že v genomu bude mnoho míst homologních k použitému oligonukleotidu a některá z nich budou dostatečně blízko u sebe, aby v úseku mezi nimi při využití PCR docházelo k amplifikaci DNA. Výsledkem je velká skupina amplifikovaných fragmentů, které se elektroforeticky podle velikosti rozdělí v gelovém nosiči do proužků. Genomy příbuzných, ale často i vzdálenějších druhů jsou velmi shodně organizovány. Většina poloh proužků bývá shodná, proto je třeba pro studium polymorfismu vyhledat primer, který vykazuje různou polohu proužků i u velmi příbuzných organismů. Soubor otestovaných primerů umožňuje například i odrůdu charakterizovat velmi přesně (ČURN, SÁKOVÁ 1997). RAPD markery jsou vhodným systémem pro rychlé hodnocení variability a diverzity ve sledovaných populacích. Cílem práce bylo primární ověření genetické proměnlivosti sledovaných jedinců smrku



Obr. 1.
Chlumní ekotyp smrku ztepilého na Krivoklátské
Fig. 1.
Norway spruce ecotype on Krivoklátské

ztepilého chlumního ekotypu pomocí metody RAPD, která nevyžaduje znalost cílových sekvencí a studovaného genomu. Byl vyhledáván primer, pomocí kterého se získá polymorfní spektrum fragmentů. Pro populačně-genetické studie budou optimalizovány další markerovací systémy analýz DNA.

MATERIÁL A METODIKA

Genetická proměnlivost byla studována u embryogenních linií odvozených z vybraných cenných jedinců chlumního ekotypu smrku ztepilého rostoucích v lokalitách Českosaského Švýcarska a na Krivoklátské (obr. 1). Embryogenní kultury smrku ztepilého byly založeny ze zygotických embryí nezralých semen a jsou kultivovány v genové bance explantátů jako zdroj reprodukčního materiálu (MALÁ et al. 1995).

Označené vzorky představují vybrané jednotlivé stromy z Českosaského Švýcarska, a to z lokalit Doubice – 2B, Tokaň – 26C, 27K, 28, 29K, U Tabule – 16, 17, 31D, 22B, Kyjovský potok – 10, 12D, 13, 34C, 35A, 36B, 37B a z lokality na Krivoklátské – 102G, 104D, 106L, 107L, 108A, 110A, 111A, 112A, 113D, 114A, 114F, 115A, 116B, 117A, 120H, 121A. Z lokality Tokaň byly ještě zařazeny ke zkoumané sérii vzorků i linie odvozené z různých semen jednoho stromu označené 27N, 27T, 27S, 27J, 27L, 27CH, 27I. Pro srovnání s jiným typem ekotypu smrku ztepilého byla studována DNA i z embryogenních kultur 3 smrků horského ekotypu z Neveklova označené 202B, 203A, 204A a jedné linie Se ze Strnad. Před vlastní izolací DNA byly vzorky z důvodu vysokého obsahu vody v embryogenních pletivech nejprve lyofilizovány, pak rozdrnceny na prášek pomocí tekutého dusíku a izolovány pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) dle dodaného izolačního protokolu (DNeasy® Plant Handbook). Úspěšnost vyizolování vzorků DNA byla detekována po proběhlé elektroforéze na 0,8% agarózovém gelu (Agarose SERVA for DNA) a vizualizována pomocí ethidium bromidu pod UV zářením pomocí kamerového systému Discovery 10gD.

Každá PCR reakce probíhala v objemu 25 µl a obsahovala 2,5 µl 10 x PCR pufru (100 mM Tris – HCl, pH = 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl směs dNTP (každý 2,5 mM), 0,3 µl Takara Taq polymerázy (5 jednotek /µl) (TAKARA Biotechnology, Co., Ltd.), 4 µl 10 -mer primeru (18 – 25 pmol) získaného od Operonu (QIAGEN Operon GmbH), 2 µl DNA a doplněno sterilní ultračistou vodou do objemu 25 µl. RAPD reakce probíhaly v termocyklerech Perkin Elmer 2400 a Bioer XP cycler. Teplotní režim teplotního cyklovacího byl nastaven následovně: 93 °C 3 min pro počáteční separaci DNA řetězců, dále se opakovalo v 45 cyklech: 92 °C 1 min pro denaturaci DNA do jednoretězcových molekul, 35 °C 2 min pro nasedání primerů na molekuly DNA, 72 °C 3 min elongační teplota pro syntézu nových vláken. Po těchto cyklech následovala konečná elongační teplota 72 °C 10 min a pak byly testované vzorky chlazeny při 4 °C. Pro získání polymorfní struktury amplifikovaných produktů byly testovány primery Operon Biotechnology GmbH ze sad OPR, OPC a OPBC.

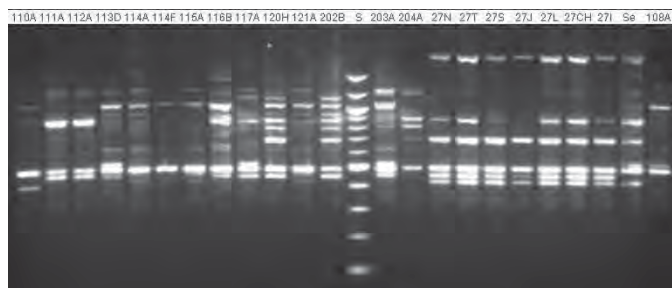
RAPD produkty byly rozděleny elektroforeticky na 1,5% agarózových gelech v 0,5 x TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B. V.) a vizualizovány pomocí ethidia bromidu (SAMBROOK, RUSSELL 2001). Agarózový gel byl připraven zahřátím agarózy (Agarose SERVA for DNA, SERVA Electrophoresis GmbH) s 200 ml roztoku 0,5 x TBE. Do vlašného čirého roztoku bylo přidáno 10 µl ethidium bromidu (ČURN et al. 2008).

Na gel v horizontální elektroforetické aparatuře se nanášelo 25 µl PCR produktu a 4 µl loading pufru. Doba trvání elektroforézy byla 30 minut při napětí 40 V a pokračovala 120 – 150 minut při napětí 90 V. Gely byly dokumentovány pod UV zářením pomocí kamerového systému. Jako standard pro definování velikosti amplifikovaných proužků byl použit 100 bp DNA Ladder (NEW ENGLAND Biolabs). Pro ověření hodnotných amplifikovaných fragmentů byly PCR reakce zopakovány.

Elektroforetické záznamy byly upraveny pomocí specializovaného software UltraQuant a amplifikační produkty na gelu (proužky) zpracovány na základě jejich přítomnosti (1) nebo nepřítomnosti (0) do binární sestavy. Pro zhodnocení genetické vzdálenosti mezi sledovanými jedinci byl použit statistický program Multi Variate Statistical Package (Kovach Computing Services). Dendrogram s graficky vyznačenou genetickou podobností sledovaných linií smrku byl vytvořen pomocí klastrové metody UPGMA (Unweighted Pair Group Method with arithmetic averages) za použití Jaccardova indexu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro ověření genetické proměnlivosti vybraných linií chlumního ekotypu smrku ztepilého byly jako primery odzkoušeny oligonukleotidy s náhodnou sekvencí o velikosti 10 nukleotidů speciálně vyvinuté pro analýzy RAPD ze sad OPR, OPC a OPBC. Genomická DNA od různých jedinců poskytuje rozdílné PCR produkty, náhodně rozdělené v genomu templátové DNA, které mohou být využity k identifikaci polymorfismu DNA nebo jako genetické markery (WILLIAMS et al. 1990). Počet získaných PCR produktů závisí na sekvenci nukleotidů

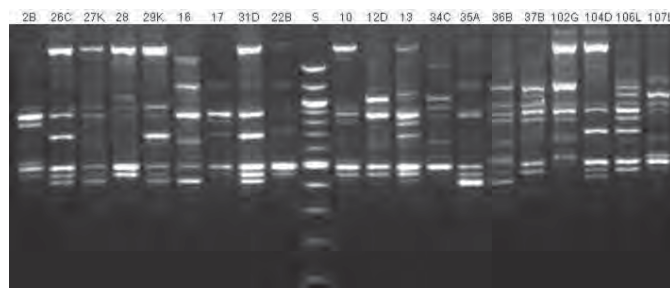


Obr. 2.

Spektrum RAPD fragmentů u smrku ztepilého (linie 110A - 108 A) po amplifikaci s primerem OPBC - 17

Fig. 2.

RAPD fragment spectrum in Norway spruce (line 110A - 108A) after amplification with primer OPBC - 17

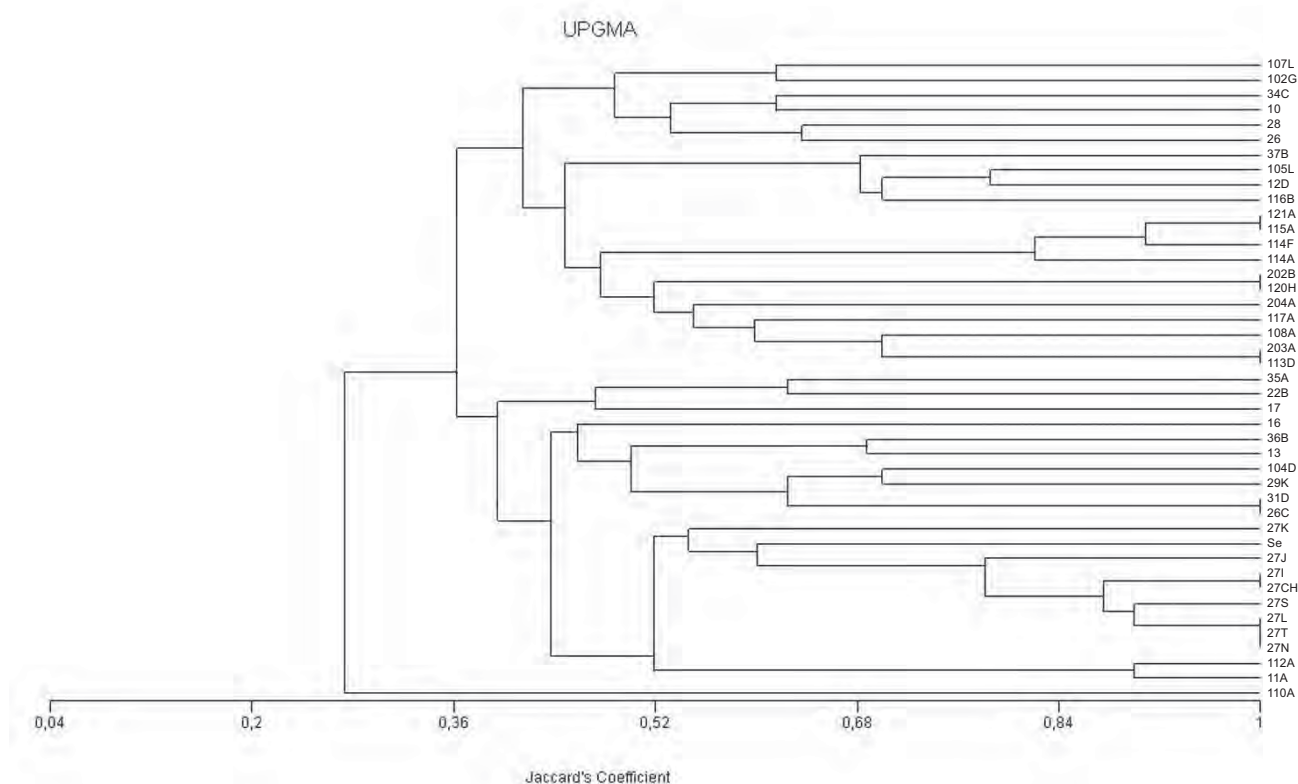


Obr. 3.

Spektrum RAPD fragmentů u smrku ztepilého (linie 2B – 107L) po amplifikaci s primerem OPBC - 17

Fig. 3.

RAPD fragment spectrum in Norway spruce (line 2B – 107L) after amplification with primer OPBC - 17



Obr. 4.

Dendrogram genetické podobnosti sledovaných linií smrku ztepilého

Fig. 4.

Dendrogram of genetic similarity of observed Norway spruce lines

Tab. 1.

Popis vzorků zobrazených na obr. 2 a 3

Description of samples displayed on Fig. 2 and 3

Označení linie/ Indication of line	Lokalita odběru/ Locality of collection	Počet hodnocených fragmentů/ Number of assessed fragments
Gel 1 – obr. 2		
110A	Křivoklát	4
111A	Křivoklát	10
112A	Křivoklát	9
113D	Křivoklát	9
114A	Křivoklát	13
114F	Křivoklát	10
115A	Křivoklát	11
116B	Křivoklát	13
117A	Křivoklát	11
120H	Křivoklát	10
121A	Křivoklát	11
202B	Neveklov	10
100 bp DNA Ladder		
203A	Neveklov	9
204A	Neveklov	7
27N	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	10
27T	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	10
27S	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	9
27J	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	8
27L	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	10
27CH	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	9
27I	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	9
Se	Strnady	9
108A	Křivoklát	8
Gel 2 – obr. 3		
2B	Českosaské Švýcarsko – Doubice	9
26C	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	11
27K	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	12
28	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	10
29K	Českosaské Švýcarsko – Tokáň	9
16	Českosaské Švýcarsko – U Tabule	7
17	Českosaské Švýcarsko – U Tabule	6
31D	Českosaské Švýcarsko – U Tabule	11
22B	Českosaské Švýcarsko – U Tabule	6
100 bp DNA Ladder		
10	Českosaské Švýcarsko – Kyjovský potok	11
12D	Českosaské Švýcarsko – Kyjovský potok	13
13	Českosaské Švýcarsko – Kyjovský potok	14
34C	Českosaské Švýcarsko – Kyjovský potok	10
35A	Českosaské Švýcarsko – Kyjovský potok	7
36B	Českosaské Švýcarsko – Kyjovský potok	13
37B	Českosaské Švýcarsko – Kyjovský potok	12
102G	Křivoklát	11
104D	Křivoklát	8
106L	Křivoklát	12
107L	Křivoklát	10

v primeru a v genomové DNA a na velikosti genomové DNA, protože se u této metody očekává, že vhodná místa k nasednutí primeru se nachází v délce celého genomu.

Na základě zpracovaných výsledků byly nejzřetelnější polymorfni profily proužků potvrzující genetickou proměnlivost sledovaných linií smrku ztepilého získány s primerem OPBC – 17 s nukleotidovou sekvencí CCGTTAGTCC (obr. 2, 3, tab.1). Výsledky genetické podobnosti sledovaných vzorků smrku ztepilého jsou znázorněny ve formě dendrogramu (obr. 4). Sledované linie smrků jsou dle výsledku variability, ale nejsou na výsledném dendrogramu rozřazeny podle lokalit původu a ani se nevylišil horský ekotyp smrku ztepilého z Neveklova a ze Strnad. Na gelu je zřetelná velmi podobná struktura RAPD fragmentů linií z lokality Tokaň, odvozených z různých semen jednoho stromu (vzorky 27N, 27T, 27S, 27J, 27L, 27CH, 27I). I z dendrogramu vyplývá jejich bližší genetická podobnost.

RAPD markery byly využity pro genetické studie a různé biologické přístupy u mnoha rostlinných rodů včetně několika druhů smrku. V případě smrku ztepilého HEINZE a SCHMIDT (1995) využili RAPD analýzu ke studiu identifikace klonů reprodukováných obdobně jako v této práci somatickou embryogenezi. Geneticky testována a porovnávala byla somatická embrya a z nich regenerující výpěstky různých smrkových linií pocházejících převážně z rakouských Alp. RAPD markery byly prokázány shodné a rozdílné linie a také bylo ověřeno, že v průběhu regeneračního systému nedošlo k somaklonální variabilitě. RAPD markery byly také použity k testování polymorfismu proveniencí u druhů smrku *Picea mariana*, *Picea rubens*, *Picea glauca* lesnický významných druhů v Severní Americe, extrakce DNA byla provedena též z embryogenních kultur. Nižší proměnlivost RAPD profilů byla zjištěna mezi populacemi uvnitř sledovaných druhů (NKONGOLO 1999). RAPD markery byly úspěšně využity i pro otestování klonové variability u rodičovských stromů smrku sitka (*Picea sitchensis*), kdy byly vytipovány 4 primery vylisující klonově množený materiál (VEN, MCNICOL 1995). Pro smrk ztepilý COLLIGNON a FAVRE (2000) použili RAPD analýzu k porovnání diverzity původních proveniencí smrků z francouzských Alp se smrkem z Hercynsko-karpatské oblasti a z Alp střední Evropy. Pomocí RAPD markerů se podařilo vylíčit provenienci jihofrancouzských Alp pravděpodobně pocházející z odlišného apeninského refugia. RAPD markery se také uplatnily při konstrukci genetické vazbové mapy příbuzenské podobnosti populace smrku ztepilého z oblasti Apenin (BUCCI et al. 1997).

V ČR byla variabilita smrku ztepilého sledována pomocí izoenzymových analýz v lokalitách Krkonoše, Krušné hory a Šumava (IVANEK 2000, 2006; IVANEK et al. 2009; MÁNEK 1999) a u somatických embryí smrku ztepilého odvozených z lokalit Brno a Beskydy pomocí analýz RAPD a SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions for amplification of specific band), kdy byl navržen RAPD primer pro odlišení a SCAR marker pro charakterizaci vybraných klonů (HANÁČEK, HAVEL 2002).

Nevýhodou RAPD analýz je, že důsledkem krátké délky tzv. nespecifických primerů a nízké teploty, při které primery nasedají na templátovou DNA, bývají spektra RAPD analýz při reprodukci nestabilní a mezi různými laboratořemi hůře porovnatelné než například AFLP a jiné markery. WILLIAMS et al. (1990) poukazuje, že nelze předpokládat, že by u všech RAPD segmentů proběhlo perfektní párování primerů s templátovou DNA. Ne všechny RAPD produkty jsou snadno a jednoznačně pro polymorfismus hodnotitelné. Pro reprodukovatelné výsledky je nutné optimalizovat amplifikační podmínky PCR – reakce a používat stejné postupy a laboratorní vybavení. Dále, i když RAPD metoda patří k jednodušším technikám DNA analýz nevyžadujícím předcházející znalost DNA sekvencí, nemusí být výsledky při hodnocení populačně genetických parametrů u diploidního materiálu spolehlivé (PERRY et al. 1999). U RAPD

markerů převládá dominantní charakter, nelze rozlišit zda je DNA fragment naamplifikovaný z heterozygotního nebo homozygotního lokusu. RAPD markery bývají zřídka kodominantní (WILLIAMS et al. 1990). Dominantní charakter RAPD markerů může zkreslovat výsledky hodnocení genetických parametrů u organismů charakteru diploidů se vzdáleným křížením, k nimž patří i smrk. V případě polymorfního lokusu s recesivní alelou vyskytující se v nízké frekvenci budou RAPD analýzou tyto lokusy hodnoceny jako monomorfni. Zhodnocení heterozygotů mohou poskytnout RFLP markery, které jsou kodominantní (NKONGOLO 1999). Dominantní charakter RAPD markerů, kdy u heterozygotů byla zjištěna nižší genetická diverzita než u homozygotů, byl prokázán např. u *Pinus sylvestris* (SZMIDT et al. 1996) nebo *Pinus strobus* (ISABEL et al. 1999).

RAPD analýza patří k jednodušším a levnějším metodám analýz DNA, a i proto byla využita pro předběžné ověření genetické proměnlivosti sledovaných jedinců smrku ztepilého chlumního ekotypu. Pro hodnocení dalších genetických parametrů budou analýzy DNA rozšířeny i na jiné DNA markery, jak již někteří autoři pro smrk ztepilý použili, např. STS- Sequence tagged site – amplifikace cílového místa (PERRY et al. 1999), SSR – Simple Sequence Repeats – mikrosatelity (YAZDANI et al. 2003, MAGHULY et al. 2006, TOLLEFSRUD et al. 2009), RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky restričních fragmentů (NKONGOLO 1999, JEANDROZ et al. 2002).

ZÁVĚR

Pro studium polymorfismu smrku ztepilého chlumního ekotypu byla zvolena analýza DNA – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA), která je jednou z aplikací PCR technik. Polymorfni spektrum RAPD produktů potvrzující genetickou variabilitu sledovaných vzorků smrku ztepilého bylo získáno amplifikací s primerem OPBC 17. Výsledný dendrogram byl sestaven pomocí softwaru Multi Variate Statistical Package (Kovach Computing Services). I když byl hodnocen polymorfni profil RAPD produktů, sledované linie smrků nejsou na výsledném dendrogramu rozřazeny do klastrů podle lokalit původu a ani horský ekotyp smrku ztepilého nebyl vylíčen v odlišný klastr od smrků chlumního ekotypu. RAPD analýzou byla prokázána proměnlivost sledovaných smrků různých jedinců chlumního ekotypu a ze získaných výsledků vyplývá, že RAPD analýza s primerem OPBC 17 je vhodnější ke sledování variability uvnitř populace a může být vhodným systémem pro rychlé hodnocení variability a diverzity ve sledovaných populacích.

Poděkování:

Příspěvek vznikl v rámci řešení výzkumného záměru č. MZE0002070203 a výzkumného projektu NAZV č. QH82303.

LITERATURA

- BUCCI G., KUBISIAK T. L., NANCE W. L., MENOZZI P. 1997. A population 'consensus', partial linkage map of *Picea abies* Karst. based on RAPD markers. *Theoretical and applied Genetics*, 95: 643-654.
- COLLIGNON A. M., FAVRE J. M. 2000. Contribution to the postglacial history at the western margin of *Picea abies* natural area using RAPD markers. *Annals of Botany*, 85: 713-722.
- ČURN V., SÁKOVÁ L. 1997. Využití biochemických markerů ve šlechtění řepky a dalších brukvovitých plodin. *Genetika a šlechtění*, 33: 281-305.
- ČURN V., NOVÁKOVÁ A., ŠIMÁČKOVÁ K., KUBÁTOVÁ B. 2008. Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.). *České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*: 53 s.
- HAKMAN I., FOWKE L. C., VON ARNOLD S., ERIKSSON T. 1985. The development of somatic embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science*, 38: 53-59.
- HANÁČEK P., HAVEL L. 2002. Charakterizace klonů raných somatických embryí smrku ztepilého pomocí DNA markerů. In: Griga, M. et al. (eds): Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchovávání genových zdrojů rostlin. *Česko-slovenský workshop. Sborník přednášek*, 4. – 6. 11. 2002. Šumperk: 221-225.
- HEINZE B., SCHMIDT J. 1995. Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica*, 85: 341-345.
- CHALUPA V., MALÁ J., DUJÍČKOVÁ M. 1990. Somatic embryogenesis and regeneration of spruce (*Picea abies* /L./Karst.) and oak (*Quercus robur* L.). In: *In vitro manipulation in higher plants. Celostátní konference*. Olomouc, 13. 11. – 16. 11. 1990. Olomouc, Ústav experimentální botaniky: 98.
- ISABEL N., BEAULIEU J., THÉRIAULT P., BOUSQUET J. 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology*, 8: 477-483.
- IVANEK O. 2000. Genetic study of Norway spruce from the northern part of Czech Republic with isoenzyme analyses. *Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae* 19/Práce VÚLHM, 82: 15-23.
- IVANEK O. 2006. Výsledky isoenzymových analýz populací smrku ztepilého na plochách s různými stanovištními podmínkami. *Zprávy lesnického výzkumu*, 51: 32-37.
- IVANEK O., MATĚJKA K., NOVOTNÝ P. 2009. Genetická struktura dvou částí porostu smrku ztepilého při horní hranici lesa na území KRNP. *Zprávy lesnického výzkumu*, 54: 300-306.
- JEANDROZ S., BASTIEN D., CHANDELIER A., JARDIN P. DU, FAVRE J. M. 2002. A set of primers for amplification of mitochondrial DNA in *Picea abies* and other conifer species. *Molecular Ecology Notes*, 4: 389-392.
- 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.
- MALÁ J. 1991. Organogenesis and somatic embryogenesis in Norway spruce. *Communicationes Instituti Forestalis Cechoslovaca*, 17: 59-72.
- MALÁ J., DUJÍČKOVÁ M., KÁLAL J. 1995. The development of encapsulated somatic embryos of Norway Spruce (*Picea abies* /L./Karst.). *Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae*, 18: 59-73.
- MÁNEK J. 1999. Genetic structure of three natural Norway spruce populations in the Šumava mountains. *Silva Gabreta*, 3: 173-182.
- NKONGOLO K. K. 1999. RAPD variations among pure and hybrid populations of *Picea mariana*, *P. rubens*, and *P. glauca* (Pinaceae), and cytogenetic stability of Picea hybrids: identification of species-specific RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution*, 215: 229-239.
- PAULE L. 1992. Genetika a šľachtenie lesných drevín. Bratislava, Príroda: 304 s.
- PERRY D. J., ISABEL N., BOUSQUET J. 1999. Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: the amount and nature of variation revealed in Norway spruce. *Heredity*, 83: 239-248.
- SAMBROOK J., RUSSELL D. W. 2001. Molecular cloning – a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 3 vols.
- SZMIDT A. E., WANG X. R., LU M. Z. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity*, 76: 412-420.
- TOLLEFSRUD M. M., SONSTEBØ J. H., BROCHMANN C., JOHNSEN O., 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.
- VEN W. T. G. VAN DE, MCNICOL R. J. 1995. The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. *Heredity*, 75: 126-132.
- VONDREJS V., STORCHOVÁ Z. 1997. Genové inženýrství I. Praha, Karolinum: 59 s.
- WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A., and TINGEY S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- YAZDANI R., SCOTTI I., JANSSON G., PLOMION C., MATHUR G. 2003. Inheritance and diversity of simple sequence repeat (SSR) microsatellite markers in various families of *Picea abies*. *Hereditas*, 138: 219-227.

STUDYING OF GENETIC VARIABILITY OF NORWAY SPRUCE HURST ECOTYPE BY RAPD

SUMMARY

Somatic embryogenesis is considered as an advantageous technique for *in vitro* clonal propagation of conifers. Embryogenic cultures were established from immature zygotic embryos of hurst ecotype of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) growing in the České Švýcarsko National Park and the Křivoklátsko Protected Landscape Area. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to determine polymorphism of embryogenic cell lines in Norway spruce hurst ecotype. This method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with single primers of arbitrary nucleotide sequence. It is assumed that primer-target sites are randomly distributed along the template genome. Different sequences may be amplified depending on the nucleotide sequence of the primer used and on the source of the template DNA; thereby some RAPD amplified fragments are polymorphic.

Amplification reactions were prepared in volume of 25 µl containing 2.5 µl 10xPCR buffer (100 mM Tris- HCl, pH = 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl mix dNTP (each 2.5 mM), 0.3 µl Takara Taq polymerase (5 units /µl) (TAKARA Biotechnology, CO., LTD.), 4 µl primer (18 – 25 pmoles) from Operon (QIAGEN Operon GmbH), 2 µl DNA and water for molecular biology (Sigma – Aldrich) to complete 25 µl of amplification reaction.

Amplification was performed in thermal cycler Perkin Elmer 2400 or Bioer XP cycler. After an initial denaturation at 93 °C thermal cycler was programmed for 45 cycles of 1 min denaturation at 92 °C, 2 min annealing at 35 °C, 3 min extension at 72 °C. After cycles final extension continued 10 min at 72 °C and subsequent cooling to 4 °C. Amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels and detected by staining with ethidium bromide (Sigma – Aldrich). The oligonucleotides 10 – mers of sets OPR, OPC and OPBC from Operon supplied by company Operon Biotechnologie GmbH were tested. A high level of polymorphism was detected with primer OPBC – 17. The dendrogram of genetic similarity was constructed by the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with arithmetic averages) based on the Jaccard coefficient using Multi Variate Statistical Package (Kovach Computing Services). These results show that RAPD method with primer OPBC – 17 can be used to amplify genomic DNA segments, and that polymorphism can be detected between the amplification products of observed individuals of Norway spruce.

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.,
Strnady 136, 252 02 Jíloviště, Česká republika
tel.: 257 892 268; e-mail: cvrckova@vulhm.cz