

HODNOCENÍ GENETICKÉ DIVERZITY VYBRANÝCH POPULACÍ SMRKU ZTEPILÉHO POMOCÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF SELECTED POPULATIONS OF NORWAY SPRUCE BY MICROSATELLITE MARKERS

HELENA CVRČKOVÁ - PAVLÍNA MÁCHOVÁ - JAROSLAV DOSTÁL - JANA MALÁ

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

ABSTRACT

The Simple Sequence Repeats (SSR) method of DNA analyses were used to determine the polymorphism of Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karsten) samples. Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from embryogenic cell lines of valuable original hurst ecotype of Norway spruce growing in the České Švýcarsko National Park and the PLA administration Křivoklátsko, and from needles taken from mountain ecotype of Norway spruce growing in Fláje (Ore Mountains) and Trčkov – Šerlišský kotel (Eagle Mountains), Czech Republic. Samples were screened using selected six polymorphic nuclear microsatellite markers. Measuring the size of amplification products was carried out using the genetic analyzer Applied Biosystems 3500. The obtained data were analyzed using the statistical program GenAlEx 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012). The identified genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for comparative genetic analyses of Norway spruce populations.

Klíčová slova: smrk ztepilý, analýzy DNA, mikrosatelity, polymorfismus

Key words: Norway spruce, DNA analyses, microsatellites, polymorphism

ÚVOD

Smrk ztepilý (*Picea abies* /L./ Karsten) je jednou z našich nejvýznamnějších dřevin z ekonomického i ekologického hlediska. Jeho rozšíření sahá od Sibiře přes severovýchodní a severní Evropu. Zejména v posledních dvou stoletích byl intenzivně uměle vysazován i ve střední Evropě, kde vytlačil řadu původních dřevin (SCHUBERT et al. 2001). Smrk ztepilý je světlomilná dřevina, s relativně mělkou povrchovou kořenovou soustavou. Je značně náročný na půdní vlhkost a vyžaduje i vyšší relativní vlhkost vzduchu. Nedostatek vláhy je limitujícím faktorem jeho dobrého růstu. Snese i nadbytečnou vlhkost rašelinišť (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Avšak na geologické podloží a složení půdy nemá velké nároky, i když na chudých křemičitých půdách a kyselých rašelínách roste špatně, protože nesnáší nedostatečně provzdušněné půdy (CHMELÁŘ 1980). Na klimatické podmínky není náročný, ale málo odolává větru a také námraze a sněhu. Je rovněž velmi citlivý na znečištění ovzduší, zejména imisemi s SO₂.

Vývoj přirozené populace smrku ztepilého závisí na její genetické diverzitě; čím jsou populace geneticky rozmanitější, tím lépe se o přizpůsobí změnám podmínek na stanovišti. Genetickou skladbu organismů a její rozdílnosti mezi jedinci nebo populacemi lze stanovit DNA markery, které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí a které na rozdíl od izoenzymových markerů nereagují na environmentální změny. Aby bylo možné získat ze zkoumaných vzorků informace o genetické proměnlivosti studovaných jedinců, je potřebné vyhledat DNA markery, které vykazují vysoký polymorfismus. Míry charakterizující genetickou strukturu a proměnlivost populací jsou

založeny na alelických frekvencích jednotlivých alelických variant v lokusech (PAULE 1992).

Pro testování polymorfismu vybraných populací smrku ztepilého lze využít mikrosatelity, simple sequence repeats (SSR) markery. Mikrosatelity jsou sekvence DNA, složené z mnohokrát se opakujících krátkých motivů zpravidla 2–4 báze dlouhých. Mikrosatelitové lokusy patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu, kdy je polymorfismus dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu nukleotidů. Kodominantní charakter markerů SSR umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů. Mikrosatelitové lokusy jsou amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. Studium mikrosatelitů je u smrku ztepilého komplikované z důvodu značné velikosti jeho genomu, který je 30–40 miliard párů bází dlouhý a obsahuje vysoký počet repetitivních oblastí (PFEIFFER et al. 1997). Ty způsobují tvorbu multilokusů, což komplikuje hodnocení amplifikačních produktů (SCOTTI et al. 2000a). Cílem této práce bylo zjistit možnosti využití SSR markerů pro sledování úrovně polymorfismu a porovnání míry variability vybraných populací smrku ztepilého.

MATERIÁL A METODIKA

Pro hodnocení genetické diverzity vybraných populací smrku ztepilého s využitím SSR markerů byly vybrány celkem 4 populace: 2 populace chlumního ekotypu rostoucího na lokalitách Českosaské Švýcarsko (SMCH ČS) a Křivoklátsko (SMCH KŘ) a 2 populace horského

ekotypu z oblasti Fláje v Krušných horách (SMF) a z oblasti Trčková – Šerlišský kotel v Orlických horách (SM02) (tab. 1). Odběry výchozího materiálu byly prováděny během roku 2011 a 2012; z Fláje i Orlických hor byly pro analýzy DNA odebírány jehlice. V případě cenných původních populací chlumního ekotypu smrku ztepilého rostoucích na lokalitách Českosaského Švýcarska a Křivoklátska byla DNA izolována z odvozených embryogenních linií. Embryogenní kultury smrku ztepilého byly založeny ze zygotických embryí nezralých semen a jsou kultivovány v bance explantátů (MALÁ et al. 1995).

Jehlice byly po odběru zamrazeny a embryogenní pletiva byla z důvodu vysokého obsahu vody lyofilizována. DNA byla izolována pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) dle dodaného protokolu (DNeasy® Plant Handbook).

Pro studium genetické variability vzorků smrku ztepilého byly testovány mikrosatelitové markery, které jsou považovány za vysoce polymorfnní. Při výběru mikrosatelitových markerů jsme vycházeli z práce SCOTTI et al. (2000a), který v kódující oblasti cDNA identifikoval mikrosatelitové lokusy s dinukleotidovou repeticí AG a AC. Z nich jsme pro testování polymorfismu použili lokusy PAAC3, PAAC11,

PAAC13, PAAC17, PAAC19 a PAAC23 i s navrženými sekvencemi specifických primerů. Další testované mikrosatelitové lokusy SpAG2 a SpAGD1 byly převzaty z práce MELNIKOVA et al. (2012). Reakční směsi a teplotní cykly PCR byly optimalizovány a modifikovány podle práce YAZDANI et al. (2003). Další ověřované mikrosatelitové lokusy WS00716.F13, WS0092.A19, WS0022.B15 pro testování polymorfismu smrku ztepilého vyvinul RUNGIS et al. (2004) z kódující oblasti DNA, tzv. expressed sequence tags (EST) – SSR markery. Sekvence specifických primerů pro testované lokusy jsou uvedeny v tab. 2. Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů bylo provedeno po proběhlé elektroforéze na 2% agarózových gelech v 0,5 x TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) a amplifikáty byly vizualizovány pomocí etidium bromidu (SAMBROOK, RUSSELL 2001). Hodnotitelné polymorfnní amplifikační produkty byly získány s primery k lokusům PAAC19, PAAC23, SpAGD1 WS00716.F13, WS0092.A19 a WS0022.B15. PCR pro lokusy PAAC19, PAAC23 a SpAGD1 probíhala pro každý vzorek v celkovém objemu 15 µl s použitím polymerázy Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) a s ní dodanými komponenty. Obsahovala 1,5 µl 10xPCR pufr, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM směsi dNTP, 0,37 jednotek Platinum Taq DNA

Tab. 1.

Místa odběrů a označení vzorků smrku ztepilého
Sampling sites and labelling of Norway spruce samples

| Lokalita odběru/Sampling sites | Populace/Populations | Vzorky/Samples |
|--|----------------------|--|
| Fláje – horský ekotyp/Mountain ecotype (Krušné hory/Ore Mts., souřadnice/coordinates N 50,6579333°, E 13,581°) | SMF | SM /1/ 1, SM /1/ 2, SM /1/ 3, SM /1/ 4, SM /1/ 5, SM /1/ 6, SM /1/ 7, SM /1/ 8, SM /2/ 1A, SM /2/ 2A, SM /2/ 3A, SM /2/ 4A, SM /2/ 5A, SM /2/ 6A, SM /2/ 7A, SM /2/ 8A, SM /3/ 21A, SM /3/ 22A, SM /3/ 23A, SM /3/ 24A, SM /3/ 25A, SM /3/ 26A, SM /3/ 27A, SM /3/ 28A |
| Českosaské Švýcarsko – chlumní ekotyp/ Hurst ecotype (souřadnice/coordinates N 50,886248°, E 14,404954°) | SMCH ČS | 1, 8, 10, 12D, 13, 16, 17, 22B, 26C, 27CH, 27N, 27I, 27J, 27S, 28, 29K, 34C, 35F, 35A, 36B, 37B |
| Křivoklátsko – chlumní ekotyp/Hurst ecotype (souřadnice/coordinates N 49,988259°, E 13,856309°) | SMCH KŘ | 101A, 102G, 104D, 106L, 107L, 108A, 110A, 111A, 112A, 113D, 114A, 114F, 115A, 116B, 117A, 120H, 121A |
| Trčkov – Šerlišský kotel – horský ekotyp/Mountain ecotype (Orlické hory/Eagle Mts., souřadnice/ coordinates N 50,312756°, E 16,41596°) | SM02 | SM02/1, SM02/2, SM02/3, SM02/4, SM02/11, SM02/12, SM02/13, SM02/14, SM02/21, SM02/22, SM02/23, SM02/24, SM02/31, SM02/32, SM02/33, SM02/34 |

Tab. 2.

Testované SSR lokusy a sekvence primerů
Tested SSR loci and sequence of the primers

| Lokus/Locus | Forward primer | Reverse primer |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------|
| PAAC3 | CGC TAC CTC AGA TTT CTC CA | AGA TAT TCC CTC ACA AAG TTG G |
| PAAC11 | GTA ATG AAA TGT GTG TGT GTG TGT GT | AGT AGC GAG GGT GGA GAT GG |
| PAAC13 | GAT ATT GAT GTA CGC ACT GG | AAT TTT TTG AAC AAG AAG TTT TC |
| PAAC17 | GAA ACA AAA ATT ATT ACG CG | ATG CCC TCC TAA TGA ATG |
| PAAC19 | ATG GGC TCA AGG ATG AAT G | AAC TCC AAA CGA TTG ATT TCC |
| PAAC23 | TGT GGC CCC ACT TAC TAA TAT CAG | CGG GCA TTG GTT TAC AAG AGT TGC |
| SpAGD1 | GTC AAC CAA CTT GTAAAG CCA | ACT TGT TTG GCA TTT TCC C |
| SpAG2 | GCT CTT CAC GTG TAC TTG ATC | TTC GAA GAT CCT CCA AGA TA |
| WS00716.F13 | TCA AGT AAT GGA CAA ACG ATA CA | TTT CCA ATA GAA TGG TGG ATT T |
| WS0092.A19 | GAT GTT GCA GGC ATT CAG AG | GCA CCA GCA TCG ATT GAC TA |
| WS0022.B15 | TTT GTA GGT GCT GCA GAG ATG | TGG CTT TTT ATT CCA GCA AGA |

Polymerase, specifické primery každý 0,1 μM k lokusům PAAC19 a SpAGD1, 0,2 μM k lokusu PAAC23, 10–20 ng izolované DNA a sterilní ultračistou vodou (Sigma – Aldrich) byla reakční směs doplněna do objemu 15 μl . PCR s primery k lokusům WS00716.F13, WS0092.A19, WS0022.B15 byla prováděna formou multiplexu podle metody pracoviště ASP – Bavarian Office for Forest Seeding and Planting, Teisendorf (osobní sdělení). Pro každý vzorek byla reakce provedena v celkovém objemu 15 μl s využitím Type-it® Microsatellite PCR Kit (Qiagen), koncentrace každého primeru byla 0,1 μM a množství DNA 10–20 ng. PCR probíhaly v termocyklerech Bioer XP cycler, Biorer GenePro a Veriti Thermal cycler. V tab. 3 jsou uvedeny teplotní režimy PCR pro uvedené lokusy, na závěr byly testované vzorky chlazeny při 4 °C.

Při hodnocení jedinců stejného druhu je pravděpodobné, že se mohou lišit jen v několika nebo i v jednom opakování motivu (u dinukleotidů to představuje 2 báze) a rozdíly nelze detegovat na agarózovém gelu. Primery poskytující hodnotitelné polymorfni amplifikáty se nechaly fluorescenčně označit (6FAM, VIC, NED) a u získaných amplifikačních produktů byla provedena fragmentační analýza na genetickém analyzátoru. Před fragmentační analýzou byla provedena denaturace, kdy ke každému vzorku bylo přidáno 11 μl Formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) a 0,4 μl velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ' Size standard v 2.0, Applied Biosystems). Po inkubaci 4 minuty při teplotě 94 °C byly vzorky rychle zchlazeny na ledu. Odečtení velikostí fragmentů probíhalo na genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500. Hodnocení jejich velikostí bylo provedeno pomocí softwarového programu GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems). Pro posouzení genetických charakteristik sledovaných populací smrku ztepilého byla získána data mikrosatelitových markerů zpracována pomocí statistického programu GenAlEx 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012).

VÝSLEDKY

Pro testování vzorků smrku ztepilého bylo vyhledáno 6 mikrosatelitových markerů, které vykazovaly polymorfismus a byly interpretovatelné. Jejich amplifikační produkty dosahovaly velikosti v rozmezí 272–310 bp u lokusu PAAC23, 120–164 bp u lokusu SPAGD1, 153–185 bp u lokusu PAAC19, 214–316 bp u lokusu WS00716.F13, 207–233 bp u lokusu WS0092.A19, 177–221 bp u lokusu WS0022.B15. Hraniční velikosti alel pro sledované populace jsou uvedeny v tab. 4.

U hodnocených 78 jedinců ze 4 populací bylo celkově detegováno 225 rozdílných alel v 6 lokusech, v průměru 9,4 alel na lokus a populaci. Nejvíce polymorfni se jevil lokus SpAGD1, u kterého bylo v průměru identifikováno 13,3 alel na populaci, u lokusu WS0022.B15 to bylo 11,5 alel, u WS00716.F13 11 alel, u PAAC19 10,3, u PAAC23 6,8 alel; nejméně polymorfni byl lokus WS0092.A19, u něhož bylo detegováno 3,5 alel. Alelické varianty u sledovaných populací a jednotlivých lokusů jsou uvedeny v tab. 5. Všechny 6 lokusů u sledovaných populací bylo na základě vypočítané hodnoty P (procentní podíl polymorfni lokusů) 100% polymorfni. Hodnoty heterozygotnosti, což je podíl heterozygotních jedinců v daném lokusu, udává tab. 6. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) u celkového souboru 78 jedinců byla nejvyšší u lokusu WS0022.B15, a to 0,964, očekávaná heterozygotnost byla pro tento lokus nižší (0,857). V tab. 7 jsou uvedeny průměrné hodnoty heterozygotnosti pro jednotlivé populace, průměrné hodnoty počtu různých a efektivních alel a Shannonův informační index. Nejvyšší podíl pozorovaných heterozygotů (hodnota $H_o = 0,813$) se ukázal v populaci SM02 z Orlických hor, nejnižší hodnota pozorované heterozygotnosti ($H_o = 0,668$) byla u populace chlumního ekotypu z Křivoklátska. Nejvyšší průměrná hodnota počtu efektivních alel byla pozorována u populace SM02 (5,997), tato populace má také nejvyšší počet různých alel (11,333). Další genetická charakteristika uvedená v tab. 7 je Shannonův informační index poukazující na míru genetické diverzity

Tab. 3.

Průběh optimalizovaných PCR pro vybrané SSR markery
Stages optimized PCR for the selected SSR markers

| Krok/Step | Počáteční denaturace/ Initial denaturation | | Počet cyklů/ No. of cycles | Denaturace/ Denaturation | | Annealing/ Annealing | | Elongace/ Elongation | | Finální elongace/ Final elongation | |
|-------------|---|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| | T (°C) | Čas ¹⁾ (min) | | T (°C) | Čas ¹⁾ (s) | T (°C) | Čas ¹⁾ (s) | T (°C) | Čas ¹⁾ (s) | T (°C) | Čas ¹⁾ (min) |
| WS00716.F13 | | | | | | | | | | | |
| WS0092.A19 | 95 | 15 | 26 | 94 | 30 | 53 | 90 | 72 | 30 | 60 | 30 |
| WS0022.B15 | | | | | | | | | | | |
| PAAC23 | 94 | 3 | 40 | 94 | 45 | 54 | 45 | 72 | 45 | 72 | 20 |
| SpAGD1 | | | | | | | | | | | |
| PAAC19 | 94 | 5 | 37 | 94 | 45 | 57 | 45 | 72 | 45 | 72 | 20 |

Captions: ¹⁾ Time

Tab. 4.

Rozsah velikostí alel u hodnocených lokusů pro populace smrku ztepilého
Size range of alleles at evaluated loci in the populations of Norway spruce

| Populace smrku ztepilého/ Populations of Norway spruce | Lokus/Locus PAAC23 | Lokus/Locus PAAC19 | Lokus/Locus SpAGD1 | Lokus/Locus WS00716.F13 | Lokus/Locus WS0092.A19 | Lokus/Locus WS0022.B15 |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| SMF | 272-310 | 153-175 | 124-164 | 220-316 | 207-233 | 177-219 |
| SMCH ČS | 274-286 | 157-175 | 120-164 | 214-300 | 207-223 | 177-201 |
| SMCH KŘ | 276-294 | 153-173 | 122-164 | 222-316 | 207-211 | 177-221 |
| SM02 | 272-310 | 153-185 | 122-164 | 216-296 | 207-211 | 177-199 |

pro jednotlivé populace. Nejvyšší hodnota byla pozorována u flájské populace (SMF 1,864), nejnižší hodnotu měla populace chlumního ekotypu z Křivoklátska (SMCH KŘ 1,684).

Jedna z nejvýznamnějších genetických charakteristik je ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi, které byly pro sledované vzorky kalkulovány na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972). Získané hodnoty byly graficky zpracovány pomocí analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis, PCoA) (obr. 1). Z hodnocení vyplývá, že geneticky jsou nejbližší seskupeny populace chlumního ekotypu z lokality Českosaské Švýcarsko a Křivoklátsko. Vzdáleněji od těchto populací se nachází flájská populace a geneticky nejvzdálenější se jeví populace SM02 z Orlických hor, která také dosahuje nejvyšších hodnot Neiovy míry genetických vzdáleností vzhledem k ostatním sledovaným populacím; nejvyšší hodnota je 0,306 mezi SMCH KŘ a SM02. Dalším vyhodnoceným genetickým kritériem byl koeficient inbreedingu (F_{ST}), který porovnává míru ge-

netické diferenciace vzájemně mezi populacemi (tab. 8). Populace jsou párově separovány podle podílu na celkové genetické rozdílnosti. F_{ST} se pohybuje v hodnotách od 0–1 a v případě, že populace jsou v Hardy-Weinbergově rovnováze se stejnou alelickou frekvencí, je roven 0. Zjištěné F_{ST} párové hodnoty pro hodnocené populace se pohybovaly od 0,018 do 0,043, což představuje malou genetickou diferenciaci mezi populacemi (WRIGHT 1965).

Pro vyjádření genetické variability (stupně polymorfismu) sledovaných populací v hodnocených lokusech byl zjišťován polymorfni informační obsah (Polymorphism Information Content, PIC). PIC hodnoty pro každý mikrosatelitový lokus byly stanoveny na základě frekvencí alel na lokus pomocí vzorce $PIC = 1 - \sum x_i^2$, kde x_i je relativní frekvence i -té alely mikrosatelitového lokusu (tab. 9). Markery byly klasifikovány jako informativní, když hodnota PIC byla $\geq 0,5$ (SHARMA et al. 2010). Stupeň polymorfismu stanovený hodnotou PIC byl zjištěn nejnižší (0,305) u populace SMCH KŘ v lokusu WS0092.A19

Tab. 5.

Počet rozdílných alel u populací smrku ztepilého v jednotlivých lokusech

Number of different alleles in populations of Norway spruce in individual loci

| Lokus/Locus | SMF | SMCH ČS | SMCH KŘ | SM02 |
|-------------|-----|---------|---------|------|
| PAAC23 | 8 | 6 | 6 | 7 |
| PAAC19 | 11 | 10 | 9 | 11 |
| SpAGD1 | 16 | 14 | 10 | 13 |
| WS00716.F13 | 13 | 10 | 10 | 11 |
| WS0092.A19 | 6 | 4 | 2 | 2 |
| WS0022.B15 | 14 | 11 | 11 | 10 |

Tab. 6.

Průměrné hodnoty heterozygotnosti ze všech sledovaných vzorků pro jednotlivé lokusy

Average values of heterozygosity from all the studied samples for individual loci

| Lokus/Loci | PAAC23 | PAAC19 | SpAGD1 | WS00716.F13 | WS0092.A19 | WS0022.B15 |
|------------|--------|--------|--------|-------------|------------|------------|
| H_e | 0,635 | 0,820 | 0,858 | 0,862 | 0,422 | 0,857 |
| H_o | 0,622 | 0,844 | 0,530 | 0,936 | 0,587 | 0,964 |

H_e = Heterozygotnost očekávaná/Expected Heterozygosity

H_o = Heterozygotnost pozorovaná/Observed Heterozygosity

Tab. 7.

Průměrné hodnoty statistických charakteristik pro sledované populace ze všech pozorovaných lokusů

Average values of statistical characteristics of the studied populations of all observed loci

| Populace/Populations | Na | Ne | I | H_o | H_e |
|----------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| SMF | 11,333 | 5,718 | 1,864 | 0,785 | 0,737 |
| SMCH ČS | 9,167 | 4,948 | 1,721 | 0,722 | 0,724 |
| SMCH KŘ | 8,000 | 4,978 | 1,684 | 0,668 | 0,731 |
| SM02 | 9,000 | 5,997 | 1,844 | 0,813 | 0,776 |

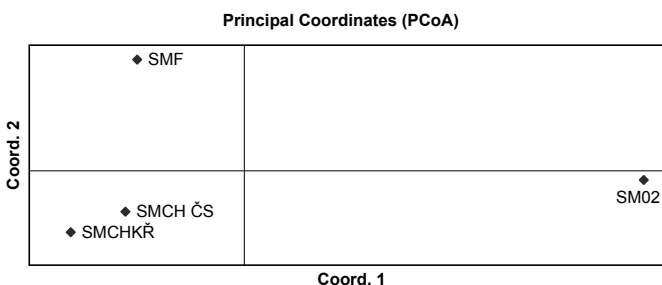
Na = Počet různých alel/Number of different alleles

Ne = Počet efektivních alel/Number of effective alleles

I = Shannonův informační index/Shannon's Information Index

H_o = Heterozygotnost pozorovaná/Observed Heterozygosity

H_e = Heterozygotnost očekávaná/Expected Heterozygosity



Obr. 1.

Grafické znázornění genetických vzdáleností sledovaných populací smrku ztepilého

Graphical representation of genetic distances of the Norway spruce populations

Tab. 8.

Koeficient inbreedingu (F_{ST}) určující genetickou rozdílnost mezi populacemi

Inbreeding coefficient (F_{ST}) determining genetic differentiation among populations

| | SMF | SMCHČS | SMCHKŘ | SM02 |
|---------|-------|--------|--------|-------|
| SMF | 0,000 | | | |
| SMCH ČS | 0,022 | 0,000 | | |
| SMCH KŘ | 0,025 | 0,018 | 0,000 | |
| SM02 | 0,039 | 0,038 | 0,043 | 0,000 |

a nejvyšší (0,911) u populace SMF v lokusu SpAGD1. Dle průměrných hodnot byly sledované populace nejvariabilnější v lokusu SpAGD1 (0,857), nejméně variabilní v lokusu WS0092.A19 (0,422).

Nejvýraznější rozdíly v míře polymorfismu mezi populacemi byly zjištěny v lokusu PAAC23. Průměrné hodnoty polymorfního informačního obsahu souhrnně za všechny lokusy se mezi populacemi výrazně nelišily. Nejvíce polymorfni byla populace SM02 (0,776), nejméně polymorfni SMCH ČS (0,724). Největší rozdíl ve variabilitě ve stejném lokusu byl mezi populacemi SMF (0,535) a SMCH KŘ (0,742) v lokusu PAAC23.

Tab. 9.

Polymorfni informační obsah (PIC) u sledovaných populací pro jednotlivé lokusy
Polymorphism information content (PIC) of the populations in all studied loci

| Lokus/Locus | PIC | | | |
|----------------|-------|---------|---------|-------|
| | SMF | SMCH ČS | SMCH KŘ | SM02 |
| PAAC 23 | 0,535 | 0,569 | 0,742 | 0,693 |
| PAAC 19 | 0,795 | 0,789 | 0,811 | 0,884 |
| SpAGD1 | 0,911 | 0,837 | 0,839 | 0,843 |
| WS00716.F13 | 0,872 | 0,862 | 0,831 | 0,883 |
| WS0092.A19 | 0,470 | 0,422 | 0,305 | 0,491 |
| WS0022.B15 | 0,840 | 0,867 | 0,859 | 0,861 |
| Průměr/Average | 0,737 | 0,724 | 0,731 | 0,776 |

DISKUSE

V současnosti mnoho autorů studujících genetickou variabilitu u smrku ztepilého využívá pro analýzy SSR markery. Pro genetický průzkum sledovaných populací smrku ztepilého byly v naší práci použity mikrosatelitové (SSR) markery vybrané z práce RUNGIS et al. (2004), kde autoři pro porovnání genetických charakteristik 23 druhů rodu *Picea* použili 37 mikrosatelitových markerů. Při porovnání velikostí amplifikovaných alel vybraných lokusů pro smrk ztepilý s velikostmi alel prezentovaných v článku bylo rozpětí velikostí alel detegovaných u populací sledovaných v této studii podstatně vyšší, ale zahrnovalo i velikosti alel uvedených autory. To odpovídá skutečnosti, že jsme sledovali více jedinců, na rozdíl od autorů, kteří provedli analýzy u jednoho stromu smrku ztepilého. Genetickou variabilitu pro 6 původních populací smrku ztepilého z oblasti západních Alp při použití 7 SSR markerů zjišťovali ve své studii MELONI et al. (2007). Průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti u sledovaných italských populací se pohybovaly od 0,588 (populace Valdieri) do 0,671 (populace Valsesia). SCOTTI et al. (2000b) analyzovali pomocí SCAR markerů 7 italských populací z oblasti Alp, hodnoty očekávané heterozygotnosti se pohybovaly od 0,358 do 0,468, u našich populací se pohybovaly od 0,724 (SMCH ČS) do 0,776 (SM02). Ve srovnání s italskými populacemi studovanými výše uvedenými autory vykazovaly námi sledované populace na základě hodnot očekávané heterozygotnosti vyšší genetickou diverzitu. U 18 stromů pocházejících ze tří italských a z jedné švýcarské populace při použití 7 SSR markerů se hodnoty očekávané heterozygotnosti pohybovaly od 0,43 do 0,94 (PFEIFFER et al. 1997). SCHUBERT et al. (2001) zjistili u 110 stromů z bavorské populace smrku ztepilého průměrnou hodnotu pozorované heterozygotnosti 0,635.

Ke genetické charakterizaci sedmi populací (Rusko, severní Švédsko, jižní Švédsko, Německo, Švýcarsko, Itálie, Rumunsko) použili HEU-

ERTZ et al. (2006) hodnocení F_{ST} . Protože porovnávali geograficky vzdálené populace, získali ve srovnání s populacemi, které jsme hodnotili jen z území ČR, vyšší hodnoty F_{ST} . Nejvíce se odlišovala populace z Rumunska, která dosahovala s ostatními populacemi hodnoty F_{ST} od 0,194 do 0,262. U našich populací jsme získali nejvyšší párovou hodnotu F_{ST} 0,043 mezi populacemi SM02 (Trčkov – Šerlišský kotel – Orlické hory) a SMCH KŘ (Křivoklátsko). V práci MELONI et al. (2007) byla u sledovaných 6 italských populací nalezena celková hodnota F_{ST} 0,05, což naznačuje poměrně nízkou genetickou diferenciaci vyplývající ze sledovaných genetických rozdílů mezi populacemi, nejvyšší párová hodnota F_{ST} mezi sledovanými populacemi byla 0,089. Podobné výsledky uvádí SCOTTI et al. (2006) při použití chloroplastových a di- a trinukleotidových jaderných SSR markerů. Ve srovnání s výsledky práce MELONI et al. (2007) uvádějí SCOTTI et al. (2000b) při použití SCAR markerů u italských populací z oblasti západních Alp vyšší úroveň celkové hodnoty F_{ST} (0,118). U 37 populací z oblasti severní Evropy (Norsko, Švédsko, Rusko, Pobaltské republiky) TOLLEFSRUD et al. (2009) zjistili při použití 7 mikrosatelitových markerů nízkou celkovou hodnotu F_{ST} (0,029). U námi sledovaných populací se párové hodnoty F_{ST} mezi populacemi pohybovaly od 0,018 do 0,043. Nízká úroveň genetické diferenciace mezi populacemi, vyjádřené pomocí F_{ST} se vyskytuje obecně u lesních dřevin a zvláště u Jehličnanů (HAMRICK et al. 1992). TOLLEFSRUD et al. (2008) ve své rozsáhlé studii analyzující 369 evropských populací smrku ztepilého pomocí mitochondriálního markeru zjistili pro populace Českého masívu ve srovnání s populacemi východních Alp a karpatskými populacemi (populace střední Evropy) nízkou genetickou diverzitu (G_{ST}). U 9 euroasijských populací smrku ztepilého zjišťovali MELNIKOVA et al. (2012) genetické parametry i pomocí lokusu SpAGD1; hodnota očekávané heterozygotnosti byla 0,9 a pozorované heterozygotnosti 0,432 a F_{ST} byl 0,145. Populace smrku v ČR, sledované v této práci, měly v tomto lokusu hodnotu očekávané heterozygotnosti nižší (0,858) a pozorované heterozygotnosti vyšší (0,530). Příčinou by mohla být vyšší frekvence nulových alel u euroasijských populací. Vyšší hodnota F_{ST} u euroasijských populací je nejspíše způsobena většími geografickými vzdálenostmi mezi euroasijskými populacemi. Vysokou hodnotu F_{ST} 0,6 uvádějí ve své práci VENDRAMIN et al. (2000) při sledování 97 euroasijských populací smrku ztepilého pomocí chloroplastových mikrosatelitových markerů.

ZÁVĚR

Genetická proměnlivost 4 vybraných populací smrku ztepilého byla studována SSR markery. Cílem práce bylo zjistit možnosti využití SSR markerů pro hodnocení genetické diverzity vybraných populací smrku ztepilého *Picea abies* (L.) Karsten. U 6 mikrosatelitových lokusů (PAAC23, PAAC19, SpAGD1, WS00716.F13, WS0092.A19, WS0022.B15) vykazovaly amplifikační produkty významný polymorfismus, byly interpretovatelné, a proto byly užity ke studiu polymorfismu sledovaných smrků. Na základě molekulárních dat zjištěných ze souboru 78 jedinců byly získány statistické charakteristiky všech 6 mikrosatelitových markerů. Celkově bylo detegováno 225 rozdílných alel v 6 lokusech. Nejvíce polymorfni se jevil lokus SpAGD1. Nejvyšší podíl heterozygotů byl zjištěn v populaci horského ekotypu z oblasti Trčkova – Šerlišský kotel v Orlických horách (SM02). Hodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi ukázalo, že populace chlumního ekotypu z lokalit Českosaského Švýcarska a Křivoklátska k sobě mají geneticky nejblíže a jsou vzdálenější od populací horského ekotypu. Geneticky nejvzdálenější se jeví populace SM02 z Orlických hor. Při hodnocení míry genetické diferenciace mezi populacemi pomocí F_{ST} se zjistila malá genetická diferenciace mezi populacemi.

Při porovnávání genetické variability pomocí polymorfního informačního obsahu se ukázalo, že průměrné hodnoty polymorfismu všech testovaných lokusů jsou u všech sledovaných populací relativně

vysoké a vzájemně se mezi sebou výrazně neliší. Hodnocení polymorfismu jednotlivých lokusů ale ukázalo, že jsou mezi nimi významné rozdíly. Lze konstatovat, že lokusy studované v této práci byly ověřeny jako vysoce polymorfni a že analýza mikrosatelitových markerů může být využita pro genetickou charakteristiku dalších populací smrku ztepilého.

Poděkování:

Príspevek vznikl v rámci řešení výzkumného záměru č. MZE0002070203 a výzkumného projektu NAZV č. QJ1230334.

LITERATURA

- HAMRICK J.L., GODT M.J.W., SHERMAN-BROYLES S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest*, 6: 95–124.
- HEUERTZ M., DE PAOLI E., KÄLLMAN T., LARSSON H., JURMAN I., MORGANTE M., LASCoux M., GYLLENSTRAND N. 2006. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). *Genetics*, 174: 2095–2105.
- CHMELÁŘ J. 1980. Dendrologie s ekologií lesních dřevin. Část I. Jehličnany. Brno, Vysoká škola zemědělská v Brně: 83 s.
- 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.
- 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* Karst.) populations in the western Alps. *Journal of Biogeography*, 34: 929–938.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–392.
- PAULE L. 1992. Genetika a šlachtenie lesných drevín. Bratislava, Príroda: 304 s.
- 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.M., OLIVIERI A.M., MORGANTE M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40: 411–419.
- 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.
- SAMBROOK J., RUSSELL D.W. 2001. *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbor (N.Y.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: 3 vol.
- SCOTTI I., MAGNI F., FINK R., POWELL W., BINELLI G., HEDLEY P.E. 2000a. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*, 43: 41–46.
- SCOTTI I., VENDRAMIN G.G., MATTEOTTI L.S., SCARPONI C., SARI-GORLA M., BINELLI G. 2000b. Postglacial recolonization routes for *Picea abies* K. in Italy as suggested by the analysis of sequence-characterized amplified region (SCAR) markers. *Molecular Ecology*, 9: 699–708.
- SCOTTI I., PAGLIA G., MAGNI F., MORGANTE M. 2006. Populations genetics (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of Forest Science*, 63: 485–491.
- SHARMA M.V., KANTARTZI S.K., STEWART J.M. 2010. Molecular diversity and polymorphism information content of selected *Gossypium hirsutum* accessions. In: Oosterhuis D.M. (ed.): *Summaries of Arkansas Cotton Research 2009*. Fayetteville, Arkansas Agricultural Experiment Station: 124–127. Research Series 582.
- 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.
- TOLLEFSRUD M.M., KISSLING R., GUGERLI F., JOHNSEN Ø., SKRØPPA T., CHEDDADI R., VAN DER KNAAP W.O., LATAŁOWA M., TERHÜRNE-BERSON R., LIT T., GEBUREK T., BROCHMANN C., SPERISEN CH. 2008. Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen. *Molecular Ecology*, 17: 4134–4150.
- TOLLEFSRUD M.M., SØNSTEBØ J.H., BROCHMANN C., JOHNSEN Ø., SKRØPPA 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*, 10: 549–562.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.
- 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.
- WRIGHT S. 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19: 395–420.
- YAZDANI R., SCOTTI I., JANSSON G., PLOMION CH., MATHUR G. 2003. Inheritance and diversity of simple sequence repeat (SSR) microsatellite markers in various families of *Picea abies*. *Hereditas*, 138: 219–227.

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF SELECTED POPULATIONS OF NORWAY SPRUCE BY MICROSATELLITE MARKERS**SUMMARY**

Analyses of the genetic structure of valuable plant and animal species are of great practical interest. The Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karsten) is one of the most important tree species from both ecological and economical point of view. Knowledge on genetic structure of coniferous species populations, especially of valuable ecotypes of Norway spruce, is very important for the maintenance of ecological stability of forests as well as for the timber production optimization. The genetic diversity of four populations of Norway spruce was studied by DNA analyses using the Simple Sequence Repeats (SSR) method. Microsatellites (SSR) are highly variable markers that are commonly used in population genetic studies for analyses of gene flow, parentage analyses, and studies on genetic diversity (PFEIFFER et al. 1997). Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from embryogenic cell lines of valuable original hirst ecotype of Norway spruce growing in the České Švýcarsko National Park and the PLA administration Křivoklátsko, and from needles from mountain ecotype of Norway spruce growing in Fláje (Ore Mountains) and Trčkov – Šerlišký kotel (Eagle Mountains) (Tab. 1). The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR was optimized for the tested primers that have been scanned in publications (SCOTTI et al. 2000a; MELNIKOVA et al. 2012; RUNGIS et al. 2004) (Tab. 2, 3). Six polymorphic nuclear microsatellite markers were selected and specific primers were fluorescently labelled. Measurement of the size of amplification products was carried out on the genetic analyzer Applied Biosystems 3500. The obtained data were analyzed by means the statistical program GenAlix 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012). There were detected 225 different alleles at 6 loci in the 78 Norway spruce individuals, i.e. 9.4 alleles per locus and population in average. Size range of alleles within evaluated loci for Norway spruce populations is shown in Tab. 4. Allelic variants in all loci of observed populations are given in Tab. 5. Average values of heterozygosity of examined samples for all loci are given in Tab. 6. The observed heterozygosity (H_o) for the total group of 78 individuals was highest in locus WS0022.B15 (0.964). Tab. 7 shows heterozygosity average values for all populations, the average value of the number of different and effective alleles and Shannon's information index. The highest proportion of observed heterozygosity (H_o value = 0.813) emerged in population SM02 from the Eagle Mountains. Genetic distances among populations were calculated based on Nei's standard genetic distance (NEI 1972) and are graphically represented in Fig. 1. Pairwise F_{ST} values (the inbreeding coefficient) obtained from the study populations ranged from 0.018 to 0.043 (Tab. 8), which represents little genetic differentiation among populations (WRIGHT 1965). Average values of polymorphic information content for all loci among populations did not differ significantly (Tab. 9). The most polymorphic population was SM02 (0.776), whereas the least polymorphic population was SMCH ČS (0.724). The identified loci were verified as highly polymorphic and could be used as markers for next genetic analyses of Norway spruce populations.

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.: +420 257 892 268; e-mail: cvrckova@vulhm.cz