

VYUŽITÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ PRO HODNOCENÍ SEMENNÉHO SADU SMRKU ZTEPILÉHO

EVALUATION OF NORWAY SPRUCE SEED ORCHARD USING MICROSATELLITE MARKERS

PAVLÍNA MÁCHOVÁ ✉ - HELENA CVRČKOVÁ - JANA MALÁ

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady 136, CZ - 252 02 Jiloviště

✉ e-mail: machova@vulhm.cz

ABSTRACT

The Simple Sequence Repeats (SSR) method of DNA analyses were used to clonal identification in a model Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karsten) seed orchard. Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from needles taken from 100 sampled trees of seed orchard. Samples were screened using selected nine 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 programs CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007) and GenAlix 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012). There were detected 115 different alleles at 9 loci in the 100 Norway spruce individuals from seed orchard. The obtained results illustrate the utility of the microsatellite loci for assessing spatial patterns of genetic diversity and for individual identification. Declared clonal affiliation was confirmed in 94% of sampled trees. The identified genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for clonal identification of Norway spruce trees.

Klíčová slova: smrk ztepilý, klonální identita, mikrosatelity, semenný sad

Key words: Norway spruce, clonal identity, microsatellites, seed orchard

ÚVOD

Semenné sady jsou jednou z možností jak řešit obtíže (dlouhé intervaly mezi jednotlivými semennými roky nebo obtížnost sběru) spojené se získáváním potřebného množství kvalitního osiva lesních dřevin. Na území České republiky se semenné sady začaly zakládat již v roce 1956 (MUSIL et al. 2007). V současné době je v České republice evidováno 100 uznaných (platných) semenných sadů, přičemž nejvíce uznaných semenných sadů je pro borovici lesní (27), modřín opadavý (20) a smrk ztepilý (16). Semenné sady jako účelové výsadby po celou dobu své existence podléhaly aktuálně platným právním předpisům týkajícím se oblasti využívání reprodukčního materiálu lesních dřevin. V současné době je tato oblast upravena zákonem č. 149/2003 Sb., o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných druhů a umělých kříženců určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin), ve znění pozdějších předpisů, jehož ustanovení přenášejí do národní legislativy i Směrnici Rady 1999/105/ES, o uvádění reprodukčního materiálu lesních dřevin na trh, kterou je Česká republika jako členský stát evropské unie povinna respektovat. Podle této mezinárodně platné směrnice mají členské státy Evropské unie povinnost vybudovat funkční kontrolní systém reprodukčního materiálu lesních dřevin. Dosavadní systém kontroly reprodukčního materiálu lesních dřevin v ČR je založen na podrobné evidenci zahrnující i kontrolu pohybu reprodukčního materiálu (KOTRLA, PAŘÍZEK 2008). V Evropě je kontrolní systém reprodukčního materiálu lesních dřevin vy-

užívající i molekulárně-genetické metody zatím zaveden jen v SRN (BEHM, KONNERT 2002; KONNERT et al. 2006; KONNERT 2006, 2011; KOTRLA et al. 2008). Problematika identifikace roubovanců a klonů v semenných sadech a v klonových výsadbách lesních dřevin pomocí molekulárních analýz, konkrétně s využitím izoenzymových analýz, byla řešena i v ČR (IVANEK, MARTINCOVÁ 2005; IVANEK, PROCHÁZKOVÁ 2006; IVANEK et al. 2013).

Genetickou skladbu organismů a její variabilitu na úrovni populace a jedinců lze stanovit pomocí DNA markerů, které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí a na rozdíl od izoenzymových markerů nereagují na environmentální změny. Pro získání informací o genetické proměnlivosti studovaných jedinců je nutné vyhledat vysoce polymorfní DNA markery, např. SSR (mikrosatelitové) markery.

Mikrosatelity jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících krátkých, zpravidla 2–4 báze dlouhých motivů. 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. Pro studii řešené problematiky ověřování deklarované identity zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů, archivů klonů a směsí klonů) byl vybrán semenný sad smrků ztepilého a zvolena metodika SSR markerů.

MATERIÁL A METODIKA

Ověřování klonové identity bylo provedeno na semenném sadu smrku ztepilého – CZ-3-3-SM-101-10-3-S (dle evidence ERMA – ÚHÚL), který je v soukromém vlastnictví ing. Ireny Kánské (Netluky 2) a má rozlohu 4,75 ha (obr. 1). Jedná se o uznávaný semenný sad smrku ztepilého, založený v katastrálním území Malešice nad Vltavou, lokalita Černíhov, porost 404 J 101. Sad byl založen v letech 1987–1989 a při výsadbě v něm bylo evidováno 1139 roubovanců (ramet) od 97 klonů (ortetů) smrku ztepilého z rodičovských stromů. Klony pocházejí především ze smrku ztepilého posázavského ekotypu z oblasti středních Čech. Nadmořská výška sadu se pohybuje mezi 420–430 m n. m., expozice jižní, půdní typ hnědozem.

Odběr výchozího materiálu byl proveden v květnu v roce 2013; byly odebrány mladé letorosty, popřípadě narašené pupeny z 5 roubovanců (ramet) od 20 vybraných klonů (ortetů). V době odběru vzorků bylo na ploše semenného sadu 775 rostoucích roubovanců. Pro porovnání genetických charakteristik šetřeného souboru vzorků, u kterého se předpokládá původ posázavského ekotypu, byly provedeny analýzy stejných SSR markerů i u 59 vzorků z populace horského ekotypu (SM02 – Trčkov – Šerlišský kotel v Orlických horách) a u 24 vzorků z populace podhorského ekotypu smrku ztepilého (SM08 – Čerňák – Českomoravská vrchovina).

Odebraný rostlinný materiál byl po odběru zamražen a část byla lyofilizována. Izolace DNA ze zmražených jehlic byla provedena pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) dle dodaného protokolu (DNeasy® Plant Handbook).

Porovnání identity klonů bylo provedeno na základě analýz 9 vybraných vysoce polymorfních mikrosatelitových lokusů. Při výběru mikrosatelitových markerů jsme vycházeli z prací SCOTTI et al. (2000),

MELNIKOVA et al. (2012) a RUNGIS et al. (2004). Vybrané SSR markery byly již použity pro studium populací smrku ztepilého na území ČR a byly vysoce polymorfní (CVRČKOVÁ et al. 2013). Sekvence použitých specifických primerů jsou uvedeny v tab. 1. Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů bylo provedeno po proběhlé elektroforéze na 2% agarózových gelech v 0,5× TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B. V.) a amplifikáty byly vizualizovány pomocí GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). PCR reakce probíhaly formou 3 multiplexů. PCR amplifikace pro lokusy PAAC19, PAAC23 a SpAGD₁ (multiplex 1) 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 10× PCR pufr, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM směsi dNTP, 0,37 jednotek Platinum Taq DNA 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 reakce s primery k lokusům WS00716.F13, WS0092.A19, WS0022.B15 (multiplex 2) byla prováděna formou multiplexu podle metodiky 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. Stejná PCR reakce byla provedena i s primery k lokusům WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03 (multiplex 3). PCR reakce probíhaly v termocyklerech Bioer XP cycler, Biorer GenePro a Veriti Thermal cycler. V tab. 2 jsou uvedeny teplotní režimy PCR pro uvedené lokusy, na závěr byly testované vzorky chlazeny při 4 °C. PCR reakce byly provedeny s fluoroscenčně označenými primery (6FAM, VIC, NED) a u získaných amplifikačních produktů byla provedena fragmentační analýza na genetickém analyzátoru.



Obr. 1.
Semenný sad Netluky
Fig. 1.
Seed orchard Netluky

Před fragmentační analýzou byla provedena denaturace, kdy ke každému vzorku bylo přidáno 11 μ l Formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) a 0,4 μ l 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 jedinců smrku ztepilého byla získaná data mikrosatelitových markerů zpracována pomocí statistických programů GenAEx 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012) a CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007).

VÝSLEDKY

Pro testování vzorků smrku ztepilého bylo použito 9 mikrosatelitových markerů, které vykazovaly polymorfismus a byly interpretovatelné. V případě vzorků ze semenného sadu amplifikační produkty sledovaných lokusů dosahovaly velikosti v rozmezí 272–310 bp u markeru PAAC23, 122–156 bp u markeru SPAGD₁, 141–207 bp u markeru PAAC19, 202–296 bp u markeru WS00716.F13, 207–211 bp u markeru WS0092.A19, 175–201 bp u markeru WS0022.B15, 196–212 bp u markeru WS0073.H08, 211–267 bp u markeru WS00111.K13 a 174–222 u markeru WS0023.B03.

U hodnocených 100 jedinců ze semenného sadu (po 5 rametách od 20 ortetů) bylo celkově detegováno 115 rozdílných alel v 9 lokusech. Nejvíce polymorfni se jevil lokus WS00716.F13, u kterého bylo identifikováno 21 rozdílných alel u sledovaného souboru vzorků, u lokusu SpA-

GD₁ to bylo 18 alel, u lokusů WS00111.K13, WS0023.B03 a PAAC19 po 16 alelách, u WS0022.B15 13 alel, u PAAC23 8 alel; u WS0073.H08 5 alel a nejméně polymorfni byl lokus WS0092.A19, u něhož byly detegovány pouze 2 alely.

Pomocí fragmentační analýzy 9 lokusů u sledovaných 100 jedinců semenného sadu byly získány multilokusové genotypové profily, které jsou uvedeny v tab. 3. U 15 klonů byly genotypy všech deklarovaných jedinců (ramet) shodné, u 4 klonů (SM_SS_19, SM_SS_23, SM_SS_70, SM_SS_77) byl vždy 1 genotyp odlišný a u 1 klonu (SM_SS_35) byly 2 genotypy odlišné. Pomocí statistického programu CERVUS byly pro použité lokusy stanoveny hodnoty počtu alel, pozorovaná heterozygotnost, očekávaná heterozygotnost, počty heterozygotů a homozygotů a polymorfni informační obsah (tab. 4). U sledovaných 100 jedinců byl průměrný počet alel na lokus 12,778, průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,7669 a průměrná hodnota polymorfniho informačního obsahu (Polymorphism Information Content, PIC) 0,7466. Vzhledem ke skutečnosti, že markery jsou klasifikovány jako informativní pokud hodnota PIC je $\geq 0,5$ (SHARMA et al. 2010), nelze marker WS0092.A19 (PIC = 0,189) považovat za informativní. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) u celkového souboru 100 jedinců byla nejvyšší u lokusů WS00111.K13, WS0023.B03, a to 1,00; tedy všichni sledovaní jedinci byli v těchto lokusech heterozygotni. Stupeň polymorfismu stanovený hodnotou PIC byl zjištěn nejnižší (0,189) u lokusu WS0092.A19 a nejvyšší (0,918) u lokusu SpAGD₁. Pomocí statistického programu GenAEx 6.51 byly zjištěny průměrné hodnoty Shannonova informačního indexu pro jednotlivé sledované lokusy, které se pohybovaly od 0,803 (lokus WS0023B03) do 0,172 (lokus WS0092.A19). Shoda genotypových profilů jedinců u sledovaných klonů byla při použití 9 SSR markerů

Tab. 1.

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

	Lokus/Locus	Forward primer	Reverse primer
Multiplex 1	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
	SpAGD ₁	GTC AAC CAA CTT GTA AAG CCA	ACT TGT TTG GCA TTT TCC C
Multiplex 2	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
Multiplex 3	WS0073.H08	TGC TCT CTT ATT CGG GCT TC	AAG AAC AAG GCT TCC CAA TG
	WS00111.K13	GAC TGA AGA TGC CGA ATG C	GGC CAT ATC ATC TCA AAA TAA AGA A
	WS0023.B03	AGC AGC TGG GGT CAA AGT T	AAA GAA AGC ATG CAT ATG ACT CAG

Tab. 2.

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

Krok/Step	Počáteční denaturace/ Initial denaturation		Počet cyklů/ Number of cycles	Denaturace/ Denaturation		Annealing		Elongace/Elongation		Finální elongace/ Final elongation	
	T (°C)	Čas (min)		T (°C)	Čas (s)	T (°C)	Čas (s)	T (°C)	Čas (s)	T (°C)	Čas (min)
Multiplex 1	94	5	37	94	45	57	45	72	45	72	20
Multiplex 2	95	15	26	94	30	53	90	72	30	60	30
Multiplex 3	95	15	26	94	30	55	90	72	30	60	30

Tab. 3.
Multilokusové genotypy zkoumaných ortetů
Multilocus genotypes of tested ortets

Genotypy/Genotypes										
Ortety/ Ortets	Počet ramet/ Number of ramets	PAAC19	PAAC23	SPAGD1	WS0022. B15	WS00716. F13	WS0092A. 19	WS00111. K13	WS0023. B03	WS0073. H08
SM_SS_1	5	173/173	276/280	138/142	189/195	226/296	211/211	215/237	178/190	210/212
SM_SS_7	5	153/159	280/280	138/154	189/201	206/228	211/211	215/223	180/186	206/210
SM_SS_10	5	159/173	280/280	132/132	189/191	216/236	211/211	225/243	186/212	206/208
SM_SS_14	5	193/195	280/284	150/162	181/189	210/236	207/211	211/227	174/186	210/210
SM_SS_19	4	175/175	278/280	156/158	185/189	216/224	211/211	235/237	178/180	208/208
	1	205/207	276/310	124/124	177/189	216/228	211/211	229/237	178/186	206/208
SM_SS_23	4	171/175	272/310	156/158	179/189	206/218	211/211	225/247	174/180	206/206
	1	159/183	280/280	150/168	189/199	228/244	211/211	231/267	186/208	206/208
SM_SS_28	5	165/193	280/282	144/144	181/189	232/236	207/211	225/237	178/186	208/212
SM_SS_35	3	161/161	282/210	142/142	179/191	214/228	211/211	225/237	194/222	206/210
	1	203/205	276/280	138/142	185/193	232/234	211/211	247/253	176/180	206/208
	1	167/167	276/280	138/150	179/201	216/238	211/211	225/267	178/186	208/208
SM_SS_36	5	157/175	280/280	122/122	179/195	214/234	211/211	235/237	180/186	206/208
SM_SS_44	5	165/175	280/280	126/126	179/185	208/220	207/211	237/247	174/188	208/208
SM_SS_47	5	165/165	280/282	146/146	189/189	230/240	211/211	215/237	190/196	206/208
SM_SS_49	5	157/157	278/280	138/170	189/189	216/228	211/211	223/239	186/222	206/212
SM_SS_52	5	161/175	280/282	154/156	179/189	228/242	211/211	227/237	196/208	206/212
SM_SS_55	5	141/141	282/284	142/142	183/189	228/248	211/211	219/223	180/186	206/212
SM_SS_60	5	167/195	280/280	138/138	181/189	226/226	207/211	219/237	182/200	206/208
SM_SS_64	5	171/193	274/280	126/158	189/193	206/214	211/211	223/247	186/212	208/212
SM_SS_66	5	153/153	280/282	148/148	187/189	228/232	211/211	223/237	186/194	206/208
SM_SS_70	4	161/175	278/280	134/134	189/201	214/238	207/211	235/267	186/198	206/210
	1	153/175	274/274	122/164	175/199	202/210	211/211	235/267	186/198	206/210
SM_SS_77	4	171/175	278/280	144/150	189/199	220/220	211/211	215/237	186/192	196/210
	1	171/171	280/310	122/146	189/189	228/232	211/211	233/239	176/180	210/212
SM_SS_81	5	153/165	278/284	154/156	185/191	228/238	211/211	211/231	186/208	208/210

Tab. 4.
Parametry genetické diverzity pro použitých 9 mikrosatelitových markerů
Genetic diversity parameters for the working set of 9 microsatellite loci

Lokus/ Loci	Na	H _o	H _e	Počet heterozygotů ¹⁾	PIC
PAAC23	8	0,730	0,675	73	0,646
PAAC19	16	0,660	0,908	66	0,896
SpAGD ₁	18	0,520	0,928	52	0,918
WS00716.F13	21	0,910	0,926	91	0,916
WS0092.A19	2	0,240	0,212	24	0,189
WS0022.B15	13	0,890	0,765	89	0,745
WS0073.H08	5	0,810	0,742	81	0,691
WS00111.K13	16	1,00	0,882	100	0,868
WS0023.B03	16	1,00	0,865	100	0,850

Na = Počet různých alel/Number of different alleles; H_o = Heterozygnost pozorovaná/Observed Heterozygosity; H_e = Heterozygotnost očekávaná/Expected Heterozygosity;
¹⁾Number of heterozygotes; PIC = Polymorfni informační obsah/Polymorphism information content

Tab. 5.
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
SM02	16,222	9,342	2,248	0,823	0,827
SM08	12,000	6,364	1,917	0,724	0,754
SM_SS	12,778	7,084	1,987	0,751	0,763

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 = Heterozygnost pozorovaná/Observed Heterozygosity
H_e = Heterozygotnost očekávaná/Expected Heterozygosity

potvrzena v 75 %, ve 20 % byl odlišný 1 roubovanec a v 5 % byla pozorována odlišnost u 2 roubovanců. Souhrnně byla deklarovaná klonová příslušnost potvrzena u 94 % roubovanců.

Sledovaný semenný sad byl založen z roubovanců klonů posázavského ekotypu smrku ztepilého, je tedy možné je označit jako populaci (SM_SS). Pro porovnání genetických charakteristik byly souběžně vyhodnoceny i populace horského (SM02) a podhorského (SM08) ekotypu smrku ztepilého pomocí statistického programu GenAlEx 6.501. Získané genetické charakteristiky uvádí tab. 5, ve které jsou uvedeny průměrné hodnoty heterozygotnosti pro jednotlivé populace, průměrné hodnoty počtu různých a efektivních alel a Shannonův informační index. Nejvyšší podíl pozorovaných heterozygotů (hodnota $H_o = 0,823$) se ukázal v populaci SM02, nejnižší hodnota pozorované heterozygotnosti ($H_e = 0,724$) byla u populace podhorského ekotypu SM08, což pravděpodobně souvisí s velikostí sledovaného souboru vzorků. Nejvyšší průměrná hodnota počtu efektivních alel byla pozorována u populace SM02 (9,342), tato populace má také nejvyšší počet různých alel (16,222). Další genetická charakteristika uvedená v tab. 5 je Shannonův informační index poukazující na míru genetické diverzity pro jednotlivé populace, nejvyšší hodnota byla pozorována opět u populace horského ekotypu SM02 (2,248).

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. 2). Z hodnocení je patrné genetické rozlišení 3 sledovaných skupin vzorků, tedy populace horského ekotypu SM02, populace podhorského ekotypu SM08 a souboru vzorků ze semenného sadu SM_SS.

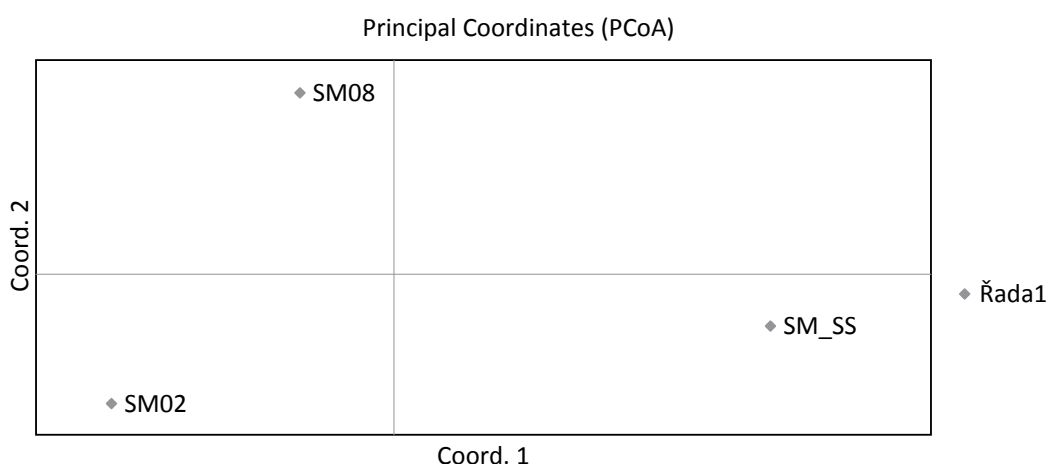
DISKUSE

Mikrosatelity mají široké uplatnění v populační genetice a ve šlechtění rostlin. Vzhledem k jejich kodominantnímu charakteru v kombinaci s velkým počtem variabilních alel se dají využít i pro identifikaci klonů a kultivarů rostlin a také pro mapování genomů (HORMAZA 2002; SCHUELER et al. 2003). V současnosti mnoho autorů využívá pro identifikaci klonů či kultivarů rostlin SSR markery. Jaderné mikrosatelitové markery použili pro identifikaci klonů a kultivarů japonských okras-

ných třešní KATO et al. 2012, variabilitu SSR markerů pro identifikaci jedinců a kultivarů u třešní využila také SCHUELER et al. (2003). SSR markery se jeví jako vhodná metoda pro identifikaci variet u většiny kulturních druhů rostlin (PAN 2010) i dřevin (ROBICHAUD et al. 2006). V naší studii jsme využili vysoce polymorfní jaderné mikrosatelitové (SSR) markery vybrané z prací SCOTTI et al. (2000), MELNIKOVA et al. (2012) a RUNGIS et al. (2004). Uvedené lokusy byly využity pro populační studie, ale vzhledem k vysoké polymorfnosti byly vhodné i pro identifikaci jedinců. Na základě dříve provedených analýz u vybraných populací smrku ztepilého z území ČR byly nejvyšší průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_e) populací dosaženy v lokusu SpAGD₁, nejnižší v lokusu WS0092.A19 (CVRČKOVÁ et al. 2013). I při sledování jedinců ze semenného sadu byly nejvyšší hodnoty H_e v lokusu SpAGD₁ (0,928) a nejnižší v lokusu WS0092.A19 (0,212). SCHUBERT et al. (2001) zjistili u 110 stromů z bavorské populace smrku ztepilého průměrnou hodnotu pozorované heterozygotnosti 0,635. V případě našeho souboru 100 vzorků ze semenného sadu byla průměrná hodnota pozorované heterozygotnosti 0,751. Rozpětí velikostí amplifikovaných alel vybraných lokusů pro jedince smrku ztepilého ze semenného sadu a pro populace smrku ztepilého v ČR bylo srovnatelné. Průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti u italských populací smrku ztepilého zjišťované na základě analýz SSR markerů se pohybovaly od 0,671 (populace Valsesia) do 0,588 (populace Valdieri) (MELONI et al. 2007). V případě našich analýz se průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti u českých populací pohybovaly od 0,827 (SM02) do 0,737 (SM08), průměrná hodnota očekávané heterozygotnosti u souboru jedinců ze semenného sadu byla 0,763. Ve srovnání s italskými populacemi vykazovaly námi sledované populace na základě hodnot očekávané heterozygotnosti vyšší genetickou diverzitu.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit možnosti využití SSR markerů pro hodnocení klonové identity roubovanců semenného sadu smrku ztepilého *Picea abies* (L.) Karsten. U 9 mikrosatelitových lokusů (PAAC23, PAAC19, SpAGD₁, WS00716.F13, WS0092.A19, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03) vykazovaly amplifikační produkty významný polymorfismus, byly interpretovatelné, a proto byly užity ke studiu klonové identity vybraného semenného sadu. Na základě molekulárních dat zjištěných ze souboru 100 jedinců ze semenné-



Obr. 2.

Grafické znázornění genetických vzdáleností sledovaných skupin vzorků smrku ztepilého

Fig. 2.

Graphical representation of genetic distances of the group of samples of Norway spruce

ho sadu byly získány statistické charakteristiky 9 mikrosatelitových markerů. Celkově bylo detegováno 115 rozdílných alel v 9 lokusech. Nejvíce polymorfni se jevil lokus WS00716.F13, u kterého bylo identifikováno 21 rozdílných alel. Na základě provedených analýz byly stanoveny multilokusové genotypové profily jednotlivých klonů smrku ztepilého v semenném sadu Netluky. Při sledování klonové identity roubovanců semenného sadu byla deklarovaná klonová příslušnost potvrzena u 94 % roubovanců, což významně převyšuje předpokládanou 20% toleranční hodnotu pro nehomogenitu ramet s deklarovaným klonem (IVANEK et al. 2010).

Poděkování:

Výzkum byl financován z poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0114 (č. j. 8653/2014- MZE-17011) a vznikl v rámci řešení výzkumného projektu NAZV č. QJ1330240.

LITERATURA

- BEHM A., KONNERT M. 2002. Proposal for a seed certification scheme. *Dendrobiology*, 47: 105–108.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J., MALÁ J. 2013. Hodnocení genetické diverzity vybraných populací smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. *Zprávy lesnického výzkumu*, 58 (3): 273–279.
- HORMAZA J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 321–328.
- IVANEK O., MARTINCOVÁ J. 2005. Klonové výsadby smrku ztepilého – izoenzymové analýzy vybraných klonů I. *Zprávy lesnického výzkumu*, 50: 58–60.
- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ P. 2006. Identifikace roubovanců a klonů ve dvou semenných sadech modřínu opadavého (*Larix decidua* Mill.). *Zprávy lesnického výzkumu*, 51: 38–41.
- IVANEK O., NOVOTNÝ P., FRÝDL J. 2010. Metodika zakládání semených sadů 1,5. generace. Certifikovaná metodika. *Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti*: 29 s. *Lesnický průvodce 7/2010*.
- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ P., MATĚJKA K. 2013. Analysis of the genetic structure of a model Scots pine (*Pinus sylvestris*) seed orchard for development of management strategies. *Journal of Forest Science*, 59: 377–385.
- 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.
- KATO S., MATSUMOTO A., YOSHIMURA K., KATSUKI T., IWAMOTO K., TSUDA Y., ISHIO S., NAKAMURA K., MORIWAKI K., SHIROISHI T., GOJOBORI T., YOSHIMARU H. 2012. Clone identification in Japanese flowering cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) cultivars using nuclear SSR markers. *Breeding Science*, 62: 248–255.
- KONNERT M., FOFFOVÁ E., FOFF V. 2006. Možnosti kontroly identity lesného reprodukčného materiálu genetickými metódami. In: Sarvaš M., Sušková M. (eds.): *Aktuálne problémy lesného škôlkárstva, semenárstva a umelej obnovy lesa*. 22. – 23. 3. 2006, Liptovský Mikuláš. Zvolen, Národné lesnícke centrum: 69–74.
- KONNERT M. 2006. Proof of identity of forest reproductive material based on reference samples. *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt der Forst- und Holzwirtschaft (BFH)*, 221: 61–71.
- KONNERT M. 2011. Certification of forest reproductive material based on reference samples and genetic methods. In: *Applied forestry research in the 21st century*. International conference held on the occasion of the 90th anniversary of the Forestry and Game Management Research Institute. Prague-Průhonice, Sept. 13–15, 2011: book of abstracts. Jíloviště, Forestry and Game Management Research Institute: 58.
- KOTRLA P., PAŘÍZEK M. 2008. Kontroly dodavatelů RM prováděné ze strany ÚHÚL. *Lesnická práce*, 87: 618–619.
- KOTRLA P., PAŘÍZEK M., CAFOUREK J. 2008. Kontrola identity RM pomocí genetických markerů. *Lesnická práce*, 87: 622–623.
- 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.
- MUSIL J., NOVÁK P., ŠEFL J. 2007. Semenné sady v České republice. In: *Aktuálne problémy lesného škôlkárstva, semenárstva a umelej obnovy lesa*. Zborník referátov z medzinárodného seminára, ktorý sa konal 27.-28. marca 2007 v Liptovskom Jáne. Zvolen, Národné lesnícke centrum: 37–43.
- 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.
- PAN Y.-B. 2010. Databasing molecular identities of Sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers. *American Journal of Plant Sciences*, 1: 87–94.
- 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.
- ROBICHAUD R.L., GLAUBITZ J.C., RHODES O.E. JR., WOESTW K. 2006. A robust set of black walnut microsatellites for parentage and clonal identification. *New Forests*, 32: 179–196.
- RUNGIS D., BÉRUBÉ Y., ZHANG J., RALPH S., RITLAND C.E., ELLIS B.E., DOUGLAS C., BOHLMANN J., RITLAND K. 2004. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1283–1294.
- SCOTTI I., MAGNI F., FINK R., POWELL W., BINELLI G., HEDLEY P.E. 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*, 43: 41–46.
- 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.
- 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.

EVALUATION OF NORWAY SPRUCE SEED ORCHARD USING MICROSATELLITE MARKERS

SUMMARY

The clonal identification in model seed orchard of Norway spruce (Fig. 1) 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). In particular nuclear simple sequence repeat (SSR) markers have proven to be extremely useful for characterizing cultivars and identifying clones (KATO et al. 2012). Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from needles taken from 100 sampled trees of seed orchard. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR were optimized for the tested primers that have been scanned in publications (SCOTTI et al. 2000; RUNGIS et al. 2004; MELNIKOVA et al. 2012) (Tab. 1, 2). Nine 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 programs CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007) and GenAlEx 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012). There were detected 115 different alleles at 9 loci in the 100 Norway spruce individuals from seed orchard, i.e. 9.4 alleles per locus and population in average. The most polymorphic in our set of samples was locus WS00716.F13. By applying the 9 suitable markers to the 20 clones from model seed orchard we obtained genotypes shown in Tab. 3. Tab. 4 shows observed heterozygosity, expected heterozygosity, number of alleles, number of heterozygotes and Polymorphism Information Content (PIC) of locus. Allelic richness (number of alleles) at each locus ranged from 21 – 2. Expected heterozygosities ranged from 0.212–0.928 across loci (average of 0.763), and observed heterozygosities ranged from 0.24–1.00 (average 0.751).

Model seed orchard was established from grafted clones Sázava ecotype of Norway spruce. For comparing the genetic characteristics were evaluated simultaneously two populations of Norway spruce – horst (SM02) and highland (SM08) ecotypes using the statistical program GenAlEx 6501 and acquired genetic characteristics are presented in Tab. 5, which shows the average values of heterozygosity for each population, the mean values 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 (Orlické hory, Czech Republic). Genetic distances among populations were calculated based on Nei's standard genetic distance (NEI 1972) and are shown in Fig. 2.

These results illustrate the utility of the microsatellite loci for assessing spatial patterns of genetic diversity and for individual identification. Declared clone affiliation was confirmed in 94% of sampled trees in tested seed orchard. The identified genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for clonal identification of Norway spruce trees.