

GENETICKÁ VARIABILITA VYBRANÝCH POPULACÍ BOROVICE LESNÍ V ČESKÉ REPUBLICE

GENETIC VARIABILITY OF SELECTED POPULATIONS OF SCOTS PINE IN THE CZECH REPUBLIC

PAVLÍNA MÁCHOVÁ ✉ - HELENA CVRČKOVÁ - LUCIE POLÁKOVÁ - OLGA TRČKOVÁ

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

✉ e-mail: machova@vulhm.cz

ABSTRACT

The Simple Sequence Repeats (SSR) method of DNA analyses were used to determine the polymorphism of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) samples. Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (Qiagen) from needles taken from three marginal populations of Scots pine located on serpentines, from one population growing at high altitude (Šumava mountains) and from two core populations of Scots pine from the Czech Republic. Samples were screened using selected twelve polymorphic nuclear microsatellite markers. Measuring the size of amplification products was carried out using the genetic analyzer Applied Biosystems 3500. The obtained data were analysed using the statistical program GenAlix 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2012) and Cervus (KALINOWSKI et al. 2007). Ten selected genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for comparative genetic analyses of Scots pine populations.

Klíčová slova: borovice lesní, analýzy DNA, mikrosatelity, polymorfismus, marginální populace

Key words: Scots pine, DNA analyses, microsatellites, polymorphism, marginal populations

ÚVOD

Borovice lesní má rozsáhlý areál rozšíření, který zaujímá téměř celou Evropu a podstatnou část lesních oblastí Asie. V této oblasti je zastoupení borovice nerovnoměrné, maximum výskytu je na severovýchodě, v horách se vyskytuje skupinovité a v malých porostech, v severní části oblasti výskytu je borovice lesní stromem nížiny, na jihu stromem pohoří. Rozšíření borovice ukazuje na její nenáročnost na klimatické i půdní podmínky (SVOBODA 1953; CHMELÁŘ 1980). Borovice lesní se v euroasijském regionu přirozeně vyskytovala jen ostrůvkovitě v lesní oblasti pahorkatin a nižších pohoří na extrémních stanovištích skalních ostrohů a sutí. V nejnižších polohách byla přimíšena v doubravách na písčích a mělkých suchých půdách. Autochtonní populace borovice lesní se v České republice (ČR) vyskytuje jen ostrůvkovitě na extrémních reliktních stanovištích. Tyto autochtonní výskytu označujeme jako reliktní bory (MUSIL, HAMERNÍK 2007). Reliktní bory najdeme v Čechách např. na hadcích Slavkovského lesa, na pískovcových skalách severovýchodních Čech, na chudých písčích Polabí, na balvanitých svazích podhůří Šumavy nebo na zrašelinělých půdách Třeboňské pánve. Na Moravě se vyskytují reliktní borovice na skalnatých výspách Dražanské a Českomoravské vrchoviny, na příkrých stráních zaříznutých do údolí řek nebo na vápencových skalách a písčítých půdách na jihu území (ÚRADNÍČEK et al. 2009).

Borovice lesní je běžná domácí dřevina významná zejména lesnický a obvykle sázená v monokulturách. Častá je také jako příměs v polopřirozených smíšených lesnických porostech, kde je však její původnost na lokalitě sporná (BUSINSKÝ, VELEBIL 2011). V rámci lesního hospodářství byly zejména v souvislosti s tzv. borovou a smrkovou máníí vysazovány i některé populace cizího původu, např. z alpských

oblastí, Pruska, Horního Porýní nebo z Panonské pánve, takže nynější rozšíření původní borovice je dnes již těžko identifikovatelné (ŠINDELÁŘ et al. 2007). V současnosti má borovice lesní 17,2% zastoupení v lesích ČR (MIKESKA et al. 2008).

V České republice lze rozlišit dva hlavní přirozené ekotypy borovice lesní – tzv. náhorní ekotyp vyšších poloh, považovaný za reliktní a tzv. chlumní ekotyp nízkých poloh, považovaný za evolučně mladší (KAŇÁK 2011). Oba typy jsou charakterizovány zejména vlastnostmi kmene, koruny, příp. některými dalšími morfologickými charakteristikami, dále růstem a adaptací na podmínky prostředí.

V lesnické praxi jsou vylišovány regionální populace – ekotypy, které se vyznačují určitými typickými vlastnostmi – např. borovice jihočeská (třeboňská), která se cení zejména s ohledem na tvárnost kmene a jakost dřeva (stejněměrné letokruhy), dále borovice šumavská (stožecká), polabská, týništská (východočeská), západočeská, severočeská, na Moravě svratecká (oblast Českomoravské vrchoviny), heraldická (oblast Nízkého Jeseníku), záhorská (rohatecká, hodonínská) a karpatská (z oblasti Ždánického lesa a nižších poloh Bílých Karpat). V některých případech lze současné regionální populace s ohledem na původ (i když většinou neznámý) a adaptaci na místní podmínky prostředí označit jako nezáměrně vzniklé kulturní odrůdy (ŠINDELÁŘ et al. 2007).

Genetická variabilita je klíčovým faktorem pro dlouhodobou adaptaci lesů na klimatické změny. Poznatky o geneticky podmíněné proměnlivosti lesních dřevin byly dosud získávány převážně na základě dlouhodobých provenienčních pokusů zakládaných v různých stanovištních podmínkách. V posledních letech se pro studium genetické struktury rostlinných populací ve vztahu ke geografické a generační

proměnlivosti začalo využívat molekulárních markerů. Pro hodnocení genetické struktury populací je využívána celá řada DNA technik – např. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), PCR – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSRs (mikrosatelity, simple sequence repeats) a DNA sekvenování (COATES, BYRNE 2005). V současné době se za vysoce polymorfní DNA markery pro studium genetické variability lesních dřevin považují mikrosatelity – SSR (simple sequence repeats). 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. Cílem této práce bylo zjistit možnosti využití SSR markerů pro sledování úrovně polymorfismu a porovnání míry variability vybraných populací borovice lesní.

MATERIÁL A METODIKA

Do studie byly zahrnuty populace borovice lesní nacházející se na extrémních stanovištích, a to na hadcích a v horské oblasti výskytu náhorní borovice. Z ekologického hlediska se jedná o marginální/periferní populace vyskytující se na hranicích přirozeného rozšíření druhů; jsou tedy adaptovány na hraniční podmínky přežití.

Hadec (serpentinit) je metamorfovaná hornina obsahující vysoké procento hořčíku, draslíku a dalších prvků. Vznikající půda je tak pro růst rostlin nevhodná a rostliny na této půdě zpravidla nerostou, případně tvoří zakrslé formy. Hadcový bor je unikátním typem lesa, vyskytující se pouze na horninovém podkladu hadci. Stromové patro hadcového boru tvoří především borovice lesní, která se dokáže nepříznivým podmínkám přizpůsobit, výjimečně se vyskytuje bříza. Pro laboratorní zpracování byl proveden odběr 30 stromů z hadcového boru u Želivky (BOMH1). Národní přírodní památka Hadce u Želivky byla vyhlášena v roce 2011 pro ochranu hadcových borů. Tento hadcový bor je unikátní i dalšími vlastnostmi, zdejší borovice velmi pomalu rostou a u více než 100 let starých porostů se jen velmi těžko odhaduje skutečný věk. Hadcové bory u Želivky jsou spravovány Lesy ČR, s. p., Lesní správa Ledec nad Sázavou. Dále byl odběr proveden na 2 lokalitách s hadcovým podložím Pluhův bor (BOMH2) a Vlček (BOMH3), které spadají pod Lesní závod LČR Kladská. Odebráno bylo opět po 30 stromech na obou lokalitách.

Další odběry byly provedeny v oblasti Šumavy, kde byli jedinci sbíráni z reliktních borů v lokalitách nacházejících se na hranici výskytu borovice lesní z hlediska nadmořské výšky – lokality Dračí skály a Dobrá voda (BOMŠ4), povolení odběrů (30 jedinců) bylo řešeno se Správou národního parku Šumava. Pro srovnání byly do studie zařazeny populace východočeské borovice (BO04, PLO 17 – Polabí) a populace heraltické borovice (BO05, PLO 29 – Nízký Jeseník). Geografické údaje sledovaných populací jsou uvedeny v tab. 1.

Pro odběr vzorků v dílčí populaci bylo dodržováno pravidlo efektivního rozestupu, které je specifikováno v odborné literatuře (NEI 1972; STERN, ROCHE 1974; RUNO et al. 2004). Základní rozestupy mezi stromy byly 30–100 m. Vybrané lokality a odebraným vzorkům byly přiděleny evidenční kódy. Stromy, ze kterých byl odebrán rostlinný materiál, byly v terénu označeny a zaměřeny pomocí GPS. Odebraný materiál byl označen, uložen v mikrotenových sáčcích do chladových boxů a po převozu na pracoviště ihned zpracován (izolace DNA), případně zamražen a lyofilizován. DNA byla izolována pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) dle dodaného protokolu (DNeasy® Plant Handbook). Množství a kvalita vyzolované DNA byla měřena pomocí spektrofotometru NanoPhotometr (Implen).

Pro studium genetické variability vzorků borovice lesní byly testovány mikrosatelitové markery, které jsou považovány za vysoce polymorfní. Bylo otestováno 17 vtypovaných lokusů (SSR) a proběhla optimalizace PCR protokolů. Testované mikrosatelitové markery psyl2, psyl16, psyl17, psyl18, psyl25, psyl36, psyl42, psyl44, psyl57 (SEBASTIANI et al. 2012), SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 11.6, SPAC 12.5 (SORANZO et al. 1998) byly vyvinuté pro *Pinus sylvestris*. Markery PtTX 3107, PtTX 4001, PtTX 4011 (AUCKLAND et al. 2002) byly původně vyvinuté pro *Pinus taeda* a dle práce GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al. (2004) jsou polymorfní i pro *Pinus sylvestris*. 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). Po vyhodnocení PCR amplifikace na agarózových gelech bylo vybráno 14 nejvhodnějších (nejvíce polymorfních a reprodukovatelných) lokusů. Z testovaných markerů byly podle velikosti sledovaných alel a s ohledem na průběh optimalizovaných PCR programů vytvořeny 4 multiplexy (A, B, C, D).

Pro všechny multiplexy PCR 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. Pro multiplex A (lokusy psyl2, psyl16, psyl17, psyl18, psyl44) a multiplex C (lokusy psyl36, SPAC 11.4) reakce obsahovala 1,5 µl 10xPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM směsi dNTP, 0,37 jednotek Platinum Taq DNA Polymerase, specifické primery k uvedeným lokusům každý v koncentraci 0,1 µM, 10–20 ng vyzolované DNA. Pro multiplex B (lokusy psyl42, psyl57, SPAC 12.5) a multiplex D (lokusy SPAG 7.14, PtTX 3107, PtTX 4001, PtTX 4011) reakce obsahovala 1,5 µl 10xPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0,067 mM směsi dNTP, 0,37 jednotek Platinum Taq DNA Polymerase, specifické primery k uvedeným lokusům každý v koncentraci 0,05 µM, 10–20 ng vyzolované DNA.

PCR reakce probíhaly v termocykleru Veriti Thermal cycler (Applied Biosystem). Pro multiplexy A a C byl použit cyklus: 94 °C 3 min., dále se opakovalo v 35 cyklech: 94 °C 45 sec., 55 °C 45 sec., 72 °C

Tab. 1.

Geografické údaje populací borovice lesní
Geographic information of the Scots pine populations

Označení populace/ Population	Lokalita/Locality	Zem. šířka/Latitude (N)	Zem. délka/Longitude (E)	Nadm. výška/Altitude (m)
BOMH1	Hadce u Želivky	49.6879981	15.1082211	410
BOMH2	Pluhův Bor	50.0601119	12.7773117	750
BOMH3	Vlček	50.0302683	12.7269667	875
BOŠ4	Šumava Dračí skály	49.1196669	13.4834944	760
BO04	východočeská BO – Vysoké Chvojno	50.1365500	15.9878800	285
BO05	heraltická BO – Opava	49.9838833	17.7037333	430

45 sec., po ukončení cyklů následovalo 72 °C 20 min. a nakonec byly testované vzorky chlazeny na 4 °C. Pro multiplex B a lokus SPAG 7.14 z multiplexu D byl použit cyklus: 94 °C 3 min., dále se opakovalo v 35 cyklech: 94 °C 45 sec., 59 °C 45 sec., 72 °C 45 sec., po ukončení cyklů následovalo 72 °C 20 min. a nakonec byly testované vzorky chlazeny na 4 °C. Pro multiplex D (kromě lokusu SPAG 7.14) byl použit cyklus: 95 °C 3 min., dále se opakovalo v 30 cyklech: 95 °C 45 sec., 57 °C 59 sec., 72 °C 45 sec., po ukončení cyklů následovalo 72 °C 20 min. a nakonec byly testované vzorky chlazeny na 4 °C. PCR reakce byly provedeny s fluorescenčně označenými primery (6FAM, VIC, NED) a u získaných amplifikačních produktů byla provedena fragmentační analýza na genetickém analyzátoru. Odečtení velikostí fragmentů proběhlo 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 borovice lesní byla získaná data mikrosatelitových markerů zpracována pomocí statistických programů GenAlEx 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2012) a CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007). Pomocí programu Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004) byla provedena detekce přítomnosti nulových alel ve zkoumaném souboru lokusů, pro určení frekvence nulových alel v jednotlivých lokusech byla použita metoda dle van Oosterhouta.

VÝSLEDKY

Pro testování vzorků borovice lesní bylo použito 14 mikrosatelitových markerů, které vykazovaly polymorfismus, a získané výsledky jejich analýzy byly interpretovatelné. Vzhledem k nízkému polymorfismu jsme vyloučili ze statistického zpracování lokusy psyl18 a psyl44. Primerové sekvence 12 použitých markerů jsou uvedeny v tab. 2.

U hodnocených 179 jedinců z 6 populací bylo celkově detegováno 146 rozdílných alel ve 12 lokusech, v průměru 12,167 alel na lokus. Nejvíce polymorfní se jeví lokusy SPAG 7.14 (v průměru 20,17 alel na populaci) a SPAC 12.5 (19,67 alel na populaci), nejméně polymorfní byly lokusy psyl2 (2,67 alel na populaci) a psyl36 (3,83 alel na populaci). Základní hodnoty genetické diverzity sledovaných lokusů, získané pomocí statistických programů GenAlEx 6.501 a CERVUS, jsou uvedeny v tab. 2. Všechny sledované lokusy u studovaných populací byly na základě vypočítané hodnoty P (procentní podíl polymorfních lokusů) 100% polymorfní. U sledovaných lokusů byly stanoveny hodnoty heterozygotnosti (H_o , H_e) udávající podíl heterozygotních jedinců v daném lokusu. Hodnoty pozorované heterozygotnosti byly v rozmezí 0,229–0,844. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) byla nejvyšší u lokusu SPAC 11.4 (0,844), očekávaná heterozygotnost pro tento lokus byla 0,852. Hodnoty očekávané heterozygotnosti byly v rozmezí 0,229–0,928, nejvyšší očekávaná heterozygotnost byla u lokusu SPAG 7.14.

Tab. 2.

Charakterizace vybraných SSR lokusů ve sledovaných populacích borovice lesní
Characterization of selected nuclear microsatellite loci across investigated Scots pine populations

Lokus/ Locus	Sekvence primerů (5' - 3')/ Primer sequence (5'-3')	Velikost PCR produktů/ PCR product size	Na	I	H_o	H_e	F	HW	Null present	F (null)	PIC	Hets
psyl2	F: TTG CTT TTG CAG AAC ATT CG R: GTC CTG CAG GCA ATC AAA AT	198-207	3	0,499	0,330	0,294	-0,112	ns	0	0,0075	0,267	59
psyl16	F: GCT CTG CCC ATG CTA TCA CT R: TGA TGC TAC CCA ATG AGG TG	197-207	6	1,553	0,452	0,754	0,401	***	+	0,2025	0,734	81
psyl17	F: TGG TCT GCA AAT CAA TCG AA R: GGG TAG GAA TGC AAG TTA GGC	217-235	8	1,505	0,572	0,748	0,237	***	0	0,0489	0,724	102
psyl42	F: CAA CTT CAG CCT TGC AAC AA R: CGA CTT CAT TTG GAA CAC CA	165-173	6	1,214	0,668	0,662	-0,006	ns	0	-0,0203	0,611	119
psyl57	F: CCC CAC ATC TCT ACA GTC CAA R: TGC TCT TGG ATT TGT TGC TG	186-201	6	1,191	0,610	0,605	-0,003	ns	0	-0,0248	0,576	109
psyl36	F: TAT CAT CGA GAG CCC CAA AA R: GAA AGG CGA AAG CAA AAG TG	246-258	5	0,474	0,229	0,229	-0,010	ns	0	0,024	0,222	41
SPAG 7.14	F: TTC GTA GGA CTA AAA ATG TGT G R: CAA AGT GGA TTT TGA CCG	114-234	29	2,794	0,664	0,928	0,285	***	+	0,1108	0,943	119
SPAC 11.4	F: CTT CAC AGG ACT GAT GTT CA R: TTA CAG CGG TTG GTA AAT G	121-165	19	2,235	0,844	0,852	0,009	ns	0	0,0067	0,878	151
SPAC 12.5	F: CTT CTT CAC TAG TTT CCT TTG G R: TTG GTT ATA GGC ATA GAT TGC	120-195	32	2,712	0,827	0,918	0,099	***	0	0,0305	0,937	148
PtTX 3107	F: AAA CAA GCC CAC ATC GTC AAT C R: TCC CCT GGA TCT GAG GA	150-189	9	1,605	0,486	0,761	0,364	***	+	0,1139	0,744	87
PtTX 4001	F: CTA TTT GAG TTA AGA AGG GAG TC R: CTG TGG GTA GCA TCA TC	195-231	16	1,528	0,710	0,669	-0,060	ns	0	-0,0763	0,647	127
PtTX 4011	F: GGT AAC ATT GGG AAA ACA CTC A R: TTA ACC ATC TAT GCC AAT CAC TT	255-279	7	1,216	0,444	0,607	0,281	***	+	0,2126	0,586	79

Na = Počet rozdílných alel/Number of different alleles

I = Shannonův informační index/Shannon's information index

H_o = Heterozygotnost pozorovaná/Observed heterozygosity

H_e = Heterozygotnost očekávaná/Expected heterozygosity

F = Fixační index/Fixation index = $(H_e - H_o) / H_e = 1 - (H_o / H_e)$,

HW = Signifikantnost odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy/Significance of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (ns = není signifikantní/not significant, *** = signifikantní na 0,1% úrovni/significant at the 0.1% level)

Null present = Přítomnost nulových alel/Presence of null alleles

F(null) = Ohodnocená frekvence nulových alel dle van Oosterhouta/Estimated null allele frequency (according to van Oosterhout)

PIC = Polymorfní informační obsah/Polymorphic information content

Hets = Počet heterozygotů/Number of heterozygotes

Pomocí statistického programu Cervus byla u jednotlivých lokusů stanovena hodnota PIC (polymorfni informační obsah). Průměrná hodnota PIC u sledovaných lokusů byla 0,6557. Markery jsou klasifikovány jako informativní, pokud hodnota PIC je $\geq 0,5$ (SHARMA et al. 2010). Stupeň polymorfismu stanovený hodnotou PIC byl zjištěn nejnížší (0,222) u lokusu psyl36 a nejvyšší (0,943) u lokusu SPAG 7.14. Na základě získaných hodnot lze lokusy psyl2 a psyl36 označit za málo informativní. Odchytky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy při aplikaci Bonferroniho korekce mezi lokusy byly u lokusů psyl16, psyl17, SPAG 7.14, SPAC 12.5, PtTX 3107 a PtTX 4011 signifikantní na hladině významnosti $P < 0,001$, což je pravděpodobně důsledek přítomnosti nulových alel. Přítomnost nulových alel v lokusech psyl16, PtTX 3107, PtTX 4011 a SPAG 7.14 byla určena pomocí programu Micro-Checker, odhadované frekvence nulových alel v jednotlivých lokusech dle metody van Oosterhouta jsou uvedeny v tab. 2. Pomocí statistického programu GenAlEx 6.501 byly zjištěny průměrné hodnoty Shannonova informačního indexu pro jednotlivé sledované lokusy, pohybovaly se od 0,474 (lokus psyl36) do 2,794 (lokus SPAG 7.14).

Tab. 3.

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	Na	Ne	I	H _o	H _e	Np	F
BOMH1	8,833	4,726	1,520	0,503	0,659	0,417	0,212
BOMH2	8,583	5,195	1,595	0,615	0,692	0,083	0,078
BOMH3	8,083	4,827	1,503	0,555	0,665	0,083	0,141
BOMŠ4	8,583	5,011	1,550	0,573	0,665	0,417	0,104
BO04	8,667	4,931	1,503	0,572	0,646	0,417	0,099
BO05	8,833	5,233	1,593	0,600	0,688	0,583	0,109

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

Np = Počet privátních alel/Number of private alleles

F = Fixační index/Fixation index = $(H_e - H_o) / H_e = 1 - (H_o / H_e)$

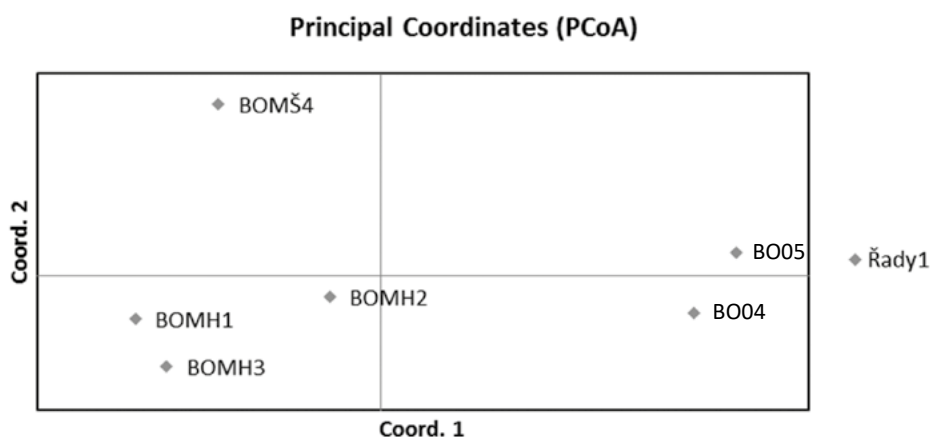
Základní hodnoty genetické diverzity u sledovaných populací předkládá tab. 3. Jsou zde uvedeny průměrné hodnoty heterozygotnosti pro jednotlivé populace, průměrné hodnoty počtu různých a efektivních alel, počty privátních alel, Shannonův informační index a fixační index. Nejvyšší podíl očekávaných heterozygotů (hodnota H_e = 0,692) se ukázal v populaci BOMH2, nejnižší hodnota očekávané heterozygotnosti (H_e = 0,646) byla u populace BO04. U všech hodnocených populací byly hodnoty H_o (pozorovaná heterozygotnost) nižší ve srovnání s H_e (očekávaná heterozygotnost), což ukazuje na převahu homozygotů ve sledovaných populacích oproti jejich očekávanému výskytu. Nejvyšší průměrná hodnota počtu efektivních alel byla pozorována u populace BO05 (5,233); tato populace má také nejvyšší počet různých alel společně s populací BOMH1 (8,833). Rozdíly mezi populacemi byly v existenci (přítomnosti) a počtu privátních alel, jejich nejvyšší počet (0,583) byl zaznamenán u populace BO05, nejnižší výskyt byl u populací BOMH2 a BOMH3 (0,083). Nejvyšší hodnota Shannonova informačního indexu byla pozorována u populace BOMH2 (1,595), tato hodnota vyjadřuje míru genetické diverzity pro jednotlivé populace. Fixační index F (0,078–0,212) udává ve sledovaných populacích přebytek homozygotů od hodnot předpokládaných dle Hardy-Weinbergovy (HW) rovnováhy, nejvyšší odchylka od HW byla pozorována u populace BOMH1 (0,212).

Jedna z nejvýznamnějších genetických charakteristik je ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972). Z hodnocení vyplývá, že geneticky jsou si nejbližší marginální populace BOMH1 a BOMH3, tedy populace nacházející se na hadcovém podloží, mezi nimiž hodnota Neiovy míry genetických vzdáleností vzhledem k ostatním sledovaným populacím je 0,038. Geneticky nejvzdálenější se jevíly populace BOMŠ4 a BO04, tedy populace z oblasti hraničního výskytu borovice na našem území z hlediska nadmořské výšky a populace východočeské BO (0,068). Získané hodnoty byly graficky zpracovány pomocí analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis, PCoA, obr. 1). Z hodnocení je patrné genetické rozlišení marginálních populací nacházející se na hadcovém podloží a ostatních sledovaných populací.

Dalším vyhodnoceným genetickým kritériem byl koeficient inbreedingu (F_{ST}), který porovnává míru genetické diferenciace párově mezi populacemi. Populace jsou párově separovány podle podílu na celkové genetické rozdílnosti. F_{ST} byl kalkulován na základě vzorce:

$$F_{ST} = (H_t - \text{Mean } H_e) / H_t,$$

kde H_t je hodnota celkové očekávané heterozygotnosti.



Obr. 1.

Grafické znázornění genetických vzdáleností sledovaných populací borovice lesní

Fig. 1.

Graphical representation of genetic distances of the Scots pine populations

Zjištěné F_{ST} párové hodnoty pro hodnocené populace se pohybovaly v rozmezí od 0,008 do 0,017, což představuje malou genetickou diferenciaci mezi populacemi (WRIGHT 1965). Genetická variabilita byla zjištěna především na vnitropopulační úrovni.

DISKUSE

Pro studium genetické variability u rodu borovice lze s úspěchem využít analýzy SSR markerů, např. SSR markery použili pro studium 17 populací borovice smolné BOYS et al. (2005). V naší práci byly použity mikrosatelitové (SSR) markery sérií psyl, SPA a PtTX. Markery psyl jsou specifické pro *P. sylvestris*, autoři SEBASTIANI et al. (2012) je testovali na třech geograficky vzdálených populacích borovice lesní (Rusko, Finsko). Celkový počet detegovaných alel u lokusů psyl2, psyl16, psyl17, psy36, psyl42 a psyl57 byl srovnatelný s výsledky našich analýz, tj. celkový počet alel u lokusů použitých v naší studii byl vyšší o 1–2 alely. Markery série SPA byly pro borovici lesní vyvinuty SORANZEM et al. (1998), v pilotní studii provedené na 14 vzorcích DNA bylo u těchto lokusů detegováno 6–10 alel, u našich vzorků bylo detegováno 19–32 alel. BELLETTI et al. (2012) ve své studii genetické variability a divergence borovice lesní na území Itálie sledovali 449 jedinců z 21 populací pomocí 9 vybraných SSR markerů. Autoři použili markery ze sérií SPA a PtTX, počty detegovaných alel jednotlivých lokusů byly v rozmezí 21–151, pro lokus PtTX 3107 nalezli 22 alel a v lokusu SPAG 7.14 detegovali 64 alel. Lokus SPAG 7.14 použili NOWAKOWSKA et al. (2014) pro studii genetické variability mateřského porostu a přirozené obnovy borovice lesní v polské oblasti Oława, v daném lokusu detegovali 21 alel. V naší studii jsme vzhledem ke sledování pouze pěti populací nalezli u těchto lokusů nižší počet alel, u lokusu PtTX 3107 devět alel a u lokusu SPAG 7.14 dvacet devět alel. LUČIČ et al. (2014) detegovali u sedmi srbských populací u lokusu SPAC 12.5 pět alel, u stejného lokusu nalezli PAZOUKI et al. (2016) 43 alel při genetickém screeningu 180 stromů ze tří estonských populací, u našich pěti populací bylo nalezeno v případě tohoto lokusu 32 alel.

V italských populacích BELLETTI et al. (2012) detegovali 137 privátních alel, v naší studii bylo detegováno 24 privátních alel. V italských populacích byly frekvence výskytu privátních alel 0,021–0,208, maximální počet detegovaných privátních alel na populaci byl 17. U námi zkoumaných populací se frekvence výskytu privátních alel pohybovala v rozsahu 0,083–0,583, nejvyšší počet privátních alel byl u populace BO05 (7), tyto nižší hodnoty lze vysvětlit jednak nižším počtem analyzovaných jedinců a populací, jednak použitím jiných lokusů.

Průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti H_e se u 21 italských populací (BELLETTI et al. 2012) pohybovaly v rozmezí 0,754–0,886, u 13 rumunských populací z Karpat v rozmezí 0,43–0,62 a u dvou maďarských populací 0,54 a 0,55 (BERNHARDSSON et al. 2016). U studie tří populací borovice lesní ve Švédsku zjistili GARCÍA-GIL et al. (2015) hodnoty H_e 0,79–0,8, v případě tří estonských populací byly tyto hodnoty zjištěny v rozmezí 0,77–0,80 (PAZOUKI et al. 2016). SCALFI et al. (2009) sledovali genetickou variabilitu italských marginálních populací borovice lesní v Apeninách, u nichž při použití lokusů ze série SPA zjistili hodnoty H_e 0,74–0,80; jako srovnání použili Alpskou populaci, kde byla detegovaná hodnota H_e 0,91. V případě naší studie se hodnoty H_e pro marginální populace (extrémní stanoviště hadcového podloží nebo vysoké nadm. výšky) pohybovaly v rozmezí 0,659–0,692, u srovnávacích populací byly 0,646–0,688. Tyto poměrně nízké hodnoty očekávané heterozygotnosti souvisí i s vypočítanou hodnotou fixačního indexu, který udává především ve sledovaných marginálních populacích přebytek homozygotů, což by bylo možné vysvětlit i přízpusobením se sledovaných jedinců selekčním podmínkám prostředí.

Pro sledování genetické diversity je využíván i koeficient inbreedingu (F_{ST}), který porovnává míru genetické diferenciace párově mezi populacemi. Při porovnání 21 skotských a tří evropských populací zjistili WACHOWIAK et al. (2011) průměrnou hodnotu F_{ST} 0,025. BELLETTI

et al. (2012) zjistili rozsah hodnot F_{ST} mezi italskými, převážně alpskými, populacemi 0,015–0,141. Při srovnání alpských a apeninských italských populací zjistili hodnoty F_{ST} v rozsahu 0,06–0,1 SCALFI et al. (2009), průměrná hodnota F_{ST} byla 0,08. NOWAKOWSKA et al. (2014) zjistili průměrnou hodnotu F_{ST} u polských populací 0,082. U rumunských populací byla celková hodnota F_{ST} 0,056 (BERNHARDSSON et al. 2016). PAZOUKI et al. (2016) zjistili celkovou hodnotu F_{ST} u tří estonských populací 0,007. Ve studii zaměřené na polymorfismus chloroplastových mikrosatelitových markerů u 24 populací borovice lesní, zahrnující celý evropský areál rozšíření, byla zjištěna hodnota F_{ST} 0,012 (WÓJKIEWICZ, WACHOWIAK 2016). Zjištěné F_{ST} párové hodnoty pro hodnocené populace v naší studii se pohybovaly v rozmezí od 0,008 do 0,017. Celková hodnota F_{ST} vypočítaná pro všechny lokusy a populace byla 0,022. Genetická variabilita u námi sledovaných populací byla tedy zjištěna především na vnitropopulační úrovni, což koresponduje s výsledky studia populací borovice lesní v Evropě. Borovice lesní patří mezi ty druhy lesních dřevin, u kterých se neprojevuje silná vazba na specifická stanoviště, a mají rozsáhlý areál rozšíření. Jedná se o druhy s vyšší vnitropopulační variabilitou (BELLETTI et al. 2012; PAZOUKI et al. 2016). Nízká úroveň genetické diferenciace mezi populacemi, vyjádřená pomocí F_{ST} se vyskytuje obecně u lesních dřevin a zvláště u jehličnanů (HAMRICK et al. 1992).

ZÁVĚR

Genetická proměnlivost šesti vybraných populací borovice lesní byla studována SSR markery. Pro studii byly vybrány populace borovice lesní nacházející se na extrémních stanovištích, a to na hadcích a v horské oblasti výskytu náhorní borovice. Pro srovnání byly do studie zařazeny populace východočeské a heraltické borovice. Cílem práce bylo zjistit možnosti využití SSR markerů pro hodnocení genetické diversity vybraných populací borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.). U 12 vybraných mikrosatelitových lokusů vykazovaly amplifikační produkty významný polymorfismus, byly interpretovatelné, a proto byly užity ke studiu polymorfismu sledovaných borovic. Na základě molekulárních dat zjištěných ze souboru 179 jedinců byly získány statistické charakteristiky všech 12 mikrosatelitových markerů. Celkově bylo detegováno 146 rozdílných alel ve 12 lokusech. Nejvíce polymorfni se jeví lokusy SPAG 7.14 a SPAC 12.5. Nejvyšší podíl očekávaných heterozygotů se ukázal u populaci BOMH2, nejnižší hodnota očekávané heterozygotnosti byla u populace BO04. U všech hodnocených populací byla detegovaná převaha homozygotů. Rozdíly mezi populacemi byly v existenci (přítomnosti) a počtu privátních alel. Jejich nejvyšší počet byl zaznamenán u populace BO05, nejnižší výskyt u populací BOMH2 a BOMH3, tedy u marginálních populací, nacházejících se na hadcovém podloží. Z hodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi vyplývá, že geneticky jsou si nejbliže marginální populace BOMH1 a BOMH3. Při hodnocení míry genetické diferenciace mezi populacemi pomocí F_{ST} se zjistila malá genetická diferenciace mezi studovanými populacemi a genetická variabilita byla zjištěna především na vnitropopulační úrovni. Tyto výsledky jsou ve shodě s poznatky ze studia populací borovice lesní v Evropě.

Markery využití v této studii byly vysoce polymorfni s výjimkou lokusů psyl2 a psyl36 a lze konstatovat, že analýza zbývajících 10 mikrosatelitových markerů může být využita pro genetickou charakterizaci dalších populací borovice lesní. Získané výsledky jsou součástí databáze genetických informací o marginálních populacích v Evropě, která vzniká v rámci projektu COST Action FP1202 „Strengthening conservation: a key issue for adaptation of marginal/peripheral populations of forest tree to climate change in Europe (MaP-FGR)“.

Poděkování:

Příspěvek vznikl v rámci řešení projektu COST LD14110, podpory poskytnuté Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v programu COST.

LITERATURA

- AUCKLAND L.D., BUI T., ZHOU Y., SHEPHERD M., WILLIAMS C.G. 2002. Conifer microsatellite handbook. College Station, Texas A & M University: 57 s.
- BELLETTI P., FERRAZZINI D., PIOTTI A., MONTELEONE I., DUCCI F. 2012. Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy. *European Journal of Forest Research*, 131: 1127–1138. DOI: 10.1007/s10342-011-0584-3
- BERNHARDSSON C., FLORAN V., GANEA S.L., GARCÍA-GIL M.R. 2016. Present genetic structure is congruent with the common origin of distant Scots pine populations in its Romanian distribution. *Forest Ecology and Management*, 361: 131–143. DOI: 10.1016/j.foreco.2015.10.047
- BOYS J., CHERRY M., DAYANANDAN S. 2005. Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations of red pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). *American Journal of Botany*, 92: 833–841.
- BUSINSKÝ R., VELEBIL J. 2011. Borovice v České republice. Výsledky dlouhodobého hodnocení rodu *Pinus* L. v kultuře v České republice. Průhonice, VÚKOZ: 180 s.
- COATES D.J., BYRNE M. 2005. Genetic variation in plant populations: assessing cause and pattern. In: HENRY, R.J. (ed.): *Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants*. Wallingford, CABI Publishing: 139–164.
- GARCÍA-GIL M.R., FLORAN V., ÖSTLUND L., MULLIN T.J., GULL B.A. 2015. Genetic diversity and inbreeding in natural and managed populations of Scots pine. *Tree Genetics & Genomes*, 11: 28 (12 pp.) DOI: 10.1007/s11295-015-0850-5
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S.C., ROBLEDO-ARNUNCIO J.J., COLLADA C., DÍAZ A., WILLIAMS C.G., ALÍA R., CERVERA M.T. 2004. Cross-amplification and sequence variations of microsatellite loci in Euroasian hard pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 103–111. DOI: 10.1007/s00122-004-1596-x
- 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.
- CHMELÁŘ J. 1980. *Dendrologie s ekologií lesních dřevin. Část I. Jehličnany*. Brno, Vysoká škola zemědělská v Brně: 83 s.
- 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.
- KAŇÁK J. 2011. Návrh šlechtitelských postupů pro borovici lesní v západních a jižních Čechách. Disertační práce. Praha, Česká zemědělská univerzita v Praze: 132 s.
- LUČIČ A., POPOVIČ V., NEVENIČ M., RISTIČ D., RAKONJAC L., ČIRKOVIČ-MITROVIČ T., MLADENOVIČ-DRINIČ S. 2014. Genetic diversity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in Serbia revealed by SSR markers. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 66 (4): 1485–1492.
- MIKESKA M., VACEK S., PRAUSOVÁ R., SIMON J., MINX T., PODRÁZSKÝ V., MALÍK V., KOBLIHA J., ANDĚL P., MATĚJKA K. 2008. Lesnicko-topologické vymezení, struktura a management přirozených borů a borových doubrav v ČR. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 448 s.
- MUSIL I., HAMERNÍK J. 2007. *Jehličnaté dřeviny*. Praha, Academia: 352 s.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106: 283–292.
- NOWAKOWSKA J.A., ZACHARA T., KONECKA A. 2014. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands. *Lešné Práce Badawcze (Forest Research Papers)*, 75 (1): 47–54.
- PAZOUKI L., SHANJANI P.S., FIELD P.D., MARTINS K., SUHHORUTŠENKO M., VIINALASS H., NIINEMETS Ü. 2016. Large within-population genetic diversity of the widespread conifer *Pinus sylvestris* at its soil fertility limit characterized by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *European Journal of Forest Research*, 135: 161–177. DOI: 10.1007/s10342-015-0928-5
- 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., OLIVIERY A.M., MORGANTE M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40: 411–419. DOI: 10.1139/g97-055
- RUNO M.S., MULUVI G.M., ODEE D.W. 2004. Analysis of genetic structure in *Melia volkensii* (Gurke.) populations using random amplified polymorphic DNA. *African Journal of Biotechnology*, 3 (8): 421–425.
- SCALFI M., PIOTTI A., ROSSI M., PIOVANI P. 2009. Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: the rear edge of the range. *European Journal of Forest Research*, 128: 377–386. DOI: 10.1007/s10342-009-0273-7
- SEBASTIANI F., PINZAUTI F., KUJALA S.T., GONZÁLES-MARTÍNEZ S.C., VENDRAMIN G.G. 2012. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conservation Genetics Resources*, 4: 231–234.
- 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.
- SORANZO N., PROVAN J., POWELL W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 7: 1260–1261.
- STERN K., ROCHE L. 1974. *Genetics of forest ecosystems*. Berlin, Springer: 330 s.
- SVOBODA P. 1953. *Lesní dřeviny a jejich porosty (část 1)*. Praha, Státní zemědělské nakladatelství: 411 s.
- ŠINDELÁŘ J., FRÝDL J., NOVOTNÝ P. 2007. Příspěvek k charakteristikám regionálních populací - ekotypů borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) v České republice. *Zprávy lesnického výzkumu*, 52 (2): 148–159.
- ŮRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. *Dřeviny České republiky*. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.
- VAN OOSTERHOUT C.V., HUTCHINSON W.F., WILLS D.P.M., SHIPLEY P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- WACHOWIAK W., SALMELA M.J., ENNOS R.A., IASON G., CAVERS S. 2011. High genetic diversity at the extreme range edge: nucleotide variation at nuclear loci in Scot pine (*Pinus sylvestris* L.) in Scotland. *Heredity*, 106: 775–787.
- WÓJKIEWICZ B., WACHOWIAK W. 2016. Substructuring of Scots pine in Europe based on polymorphism at chloroplast microsatellite loci. *Flora*, 220: 142–149.
- WRIGHT S. 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19: 395–420.

GENETIC VARIABILITY OF SELECTED POPULATIONS OF SCOTS PINE IN THE CZECH REPUBLIC

SUMMARY

Analyses of the genetic structure of valuable plant and animal species are of great practical interest. The genetic variation is an important attribute of forest tree populations enabling them to adapt spatial and temporal variations in environmental conditions (PAZOUKI et al. 2016). Knowledge on genetic structure of coniferous species populations is very important for the maintenance of ecological stability of forests and for the conservation and management of genetic resources. Understanding the genetic structure and diversity of edge populations can shed light on the role of peripheral (marginal) populations and their relevance for conservation strategies (SCALFI et al. 2009). The Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is one of the most widespread European conifer trees, and its natural range extends from the Arctic Circle in Scandinavia down to central Spain and central Italy and from western Scotland to eastern Siberia (BELETTI et al. 2012).

The genetic diversity of six populations of Scots pine 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 needles taken from three marginal populations of Scots pine located on serpentines, from one population growing at high altitude (Šumava mountains) and from two core populations of Scots pine from the Czech Republic (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 (SORANZO et al. 1998; AUCKLAND et al. 2002; SEBASTIANI et al. 2012) (Tab. 2). Twelve 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 analysed by means of the statistical program GenAlEx 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2012) and Cervus (KALINOWSKI et al. 2007). There were detected 146 different alleles at 12 loci in the 179 Scots pine individuals, i.e. 12.167 alleles per locus and population in average. Characteristics of selected nuclear microsatellite loci across six investigated Scots pine populations are shown in Tab. 2. The expected heterozygosity (H_e) for the total group of 179 individuals was highest at locus SPAG 7.4 (0.928). The presence of null alleles was also suspected for four of twelve used loci. The population frequency of private alleles ranged between 0.083 and 0.583. The population BO05 was the population with the highest number of private alleles. Tab. 3 shows average values of statistical characteristics of the studied populations of all observed loci. The highest proportion of expected heterozygosity (H_e value = 0.692) emerged in population BOMH2. Genetic distances among populations were calculated based on Nei's standard genetic distance (NEI 1972) and are graphically represented in Fig. 1. The marginal populations located on serpentines were clearly separated by the others. Pairwise F_{ST} values (the inbreeding coefficient) obtained from the study populations ranged from 0.008 to 0.017. Most of the genetic diversity was found within populations, while small amount of the variability occurred among populations. Due to low variability of loci *psyl2* and *psyl36* only ten selected genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for comparative genetic analyses of Scots pine populations.

Studying adaptive processes in marginal populations is crucial and of mutual interest for European and neighbouring countries for understanding the evolution of species and developing gene pool conservation and management strategies and networks to cope with global changes.

Zasláno/Received: 15. 06. 2016

Přijato do tisku/Accepted: 27. 07. 2016