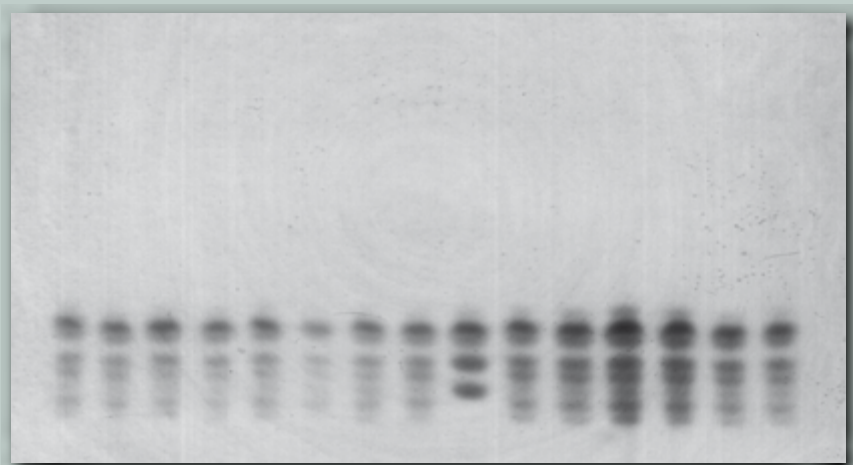


**METODICKÉ PRINCIPY VYUŽITÍ  
ISOENZYMOVÝCH ANALÝZ PŘI OVĚŘOVÁNÍ  
GENETICKY PODMÍNĚNÉ PROMĚNLIVOSTI  
DÍLČÍCH POPULACÍ LESNÍCH DŘEVIN**

**LESNICKÝ PRŮVODCE**



Ing. ONDŘEJ IVANEK, CSc.

Ing. JAROSLAV DOSTÁL

Ing. JOSEF FRÝDL, CSc.

Ing. et Ing. PETR NOVOTNÝ, Ph.D.

Ing. JIŘÍ ČÁP

RNDr. VÁCLAV BURIÁNEK



**Certifikovaná metodika**

**3/2013**

# **Metodické principy využití isoenzymových analýz při ověřování geneticky podmíněné proměnlivosti dílčích populací lesních dřevin**

**Certifikovaná metodika**

**Ing. Ondřej Ivanek, CSc.**

**Ing. Jaroslav Dostál**

**Ing. Josef Frýdl, CSc.**

**Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.**

**Ing. Jiří Čáp**

**RNDr. Václav Buriánek**

## **Lesnický průvodce 3/2013**

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

<http://www.vulhm.cz>

**Vedoucí redaktorka:** Šárka Holzbachová, DiS.; e-mail: [holzbachova@vulhm.cz](mailto:holzbachova@vulhm.cz)

**Výkonná redaktorka:** Miroslava Valentová; e-mail: [valentova@vulhmop.cz](mailto:valentova@vulhmop.cz)

**Grafická úprava a zlom:** Klára Šimerová; e-mail: [simerova@vulhm.cz](mailto:simerova@vulhm.cz)

ISBN 978-80-7417-066-9

ISSN 0862-7657

# THE METHODOLOGICAL PRINCIPLES OF THE ISOZYME ANALYSES IN VERIFYING THE GENETICALLY CONDITIONED VARIABILITY OF FOREST TREE SPECIES PARTIAL POPULATIONS

## *Abstract*

This work summarizes the methodology for genetic testing of selected forest tree species populations using isozymes as gene markers used in the past in the Isozyme Laboratory of Forest Trees at Forestry and Game Management Research Institute in Strnady (Czech Republic). This methodology consists of genetic screening of autochthonous forest tree populations, identifying and evaluating genetic variability in different stand conditions, verification of clones in the framework of various breeding programmes and related items.

**Key words:** isozyme analyses, forest tree species, genetically determined variability

Uplatněná certifikovaná metodika byla uznána Osvědčením č. 43257/2013-MZE-16222/M65, vydaným dne 16. 7. 2013 Ministerstvem zemědělství ČR.

**Oponenti:** Ing. Miloš Pařízek, ÚHÚL Brandýs nad Labem, pobočka Hradec Králové

Ing. Josef Cafourek, Ph.D., Wotan Forest, a. s.

*Foto na obálce:*

Ukázka nehomogenity klonů u smrku ztepilého, enzym MDH (archiv Laboratoře analýzy isoenzymů lesních dřevin Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.)

*Adresy autorů:*

Ing. Ondřej Ivanek, CSc.

Tusarova 12, 170 00 Praha 7 (do r. 2011 Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady)

e-mail: [ondrej\\_IV@seznam.cz](mailto:ondrej_IV@seznam.cz)

Ing. Jaroslav Dostál; Ing. Josef Frýdl, CSc.; Ing. et Ing. Petr Novotný, Ph.D.;

Ing. Jiří Čáp; RNDr. Václav Buriánek

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

Strnady 136

252 02 Jíloviště

e-mail: [dostal@vulhm.cz](mailto:dostal@vulhm.cz), [frydl@vulhm.cz](mailto:frydl@vulhm.cz), [pnovotny@vulhm.cz](mailto:pnovotny@vulhm.cz), [cap@vulhm.cz](mailto:cap@vulhm.cz),  
[buriánek@vulhm.cz](mailto:buriánek@vulhm.cz)

# Obsah:

<b>1. ÚVOD A CÍL METODIKY .....</b>	<b>7</b>
<b>2. VLASTNÍ POPIS METODIKY .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Cíl šetření, šetřené druhy dřevin,         analyzované enzymy .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Odběr vzorků (vzorkování).....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 Příjem a evidence vzorků .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Uskladnění vzorků .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Příprava vzorků .....</b>	<b>12</b>
<b>2.6 Příprava zásobních roztoků .....</b>	<b>12</b>
<b>2.7 Příprava škrobového gelu .....</b>	<b>13</b>
<b>2.8 Elektroforéza.....</b>	<b>13</b>
<b>2.9 Barvení a fixace gelů .....</b>	<b>15</b>
<b>2.10 Skenování a zatavení gelů .....</b>	<b>16</b>
<b>2.11 Záznam a vyhodnocení výsledků.....</b>	<b>16</b>
<b>2.12 Zálohování dat a archivace výsledků, ochrana dat .....</b>	<b>18</b>
<b>3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ .....</b>	<b>19</b>
<b>4. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY.....</b>	<b>19</b>
<b>5. EKONOMICKÉ ASPEKTY .....</b>	<b>20</b>
<b>6. DEDIKACE.....</b>	<b>21</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>7.1 Seznam použité související literatury .....</b>	<b>21</b>
<b>7.2 Seznam publikací, které předcházely metodice.....</b>	<b>23</b>

<b>8. PŘÍLOHY.....</b>	<b>25</b>
<b>8.1 Příprava extrakčního a zásobních roztoků</b>	
– složení .....	<b>25</b>
<b>8.2 Složky pro přípravu škrobového gelu (příklad) .....</b>	<b>26</b>
<b>8.3 Příprava roztoků pro barvení gelů</b>	
– složení jednotlivých roztoků .....	<b>26</b>
<b>8.4 Fixace gelů.....</b>	<b>29</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>30</b>

# 1. ÚVOD A CÍL METODIKY

Jednou z metod, kterou se dokumentuje genetická variabilita populací lesních dřevin na molekulární úrovni, je isoenzymová analýza. Genetická struktura populace je tak popisována pomocí sady markerů, které jsou představovány vybranými enzymatickými systémy. Genetická variabilita populace dané dřeviny je výslednicí genotypové skladby porostu v době jeho přirozené obnovy či umělého založení, dále selekčního působení stanovištních faktorů na přežívání jedinců (z přirozených např. klima, geologické, pedochemické poměry, z antropogenních např. imisní zátěž), které ovlivňují selekci různých genotypů v rámci druhu. Dále je dána výslednou druhovou skladbou a výchovnými, případně obnovními zásahy v porostu.

Isoenzymy tvoří skupinu proteinových genových markerů vzájemně se lišících molekulární hmotností, nábojem a jinými geneticky kódovanými znaky na molekulární úrovni, které umožňují tyto proteiny rozdělit a identifikovat. Analýza isoenzymů využívá elektroforetický princip, popsáný např. BERGMANNEM (1971, 1975), CHELIAKEM a PITELEM (1984), HATTEMEREM et al. (1993) a nověji v souvislosti s environmentální problematikou např. MÜLLER-STARCKEM a SCHUBERTEM (2001).

Isoenzymové analýzy jsou v široké míře aplikovány při různých genetických studiích lesních dřevin. Předpokládá se zde kodominantní dědičnost podle Mendelových zákonů. Studie zahrnují sledování genetické variability, zákonitostí migrace a genových toků, genetických rozdílů vnitrodruhových kříženců a identifikaci ortetů a klonů. Jsou využitelné i pro indikaci dědičných kvantitativních a morfologických vlastností.

Z území bývalého Československa jsou prezentovány např. výsledky výzkumu semenných sadů smrku ztepilého (PAULE et al. 1993). GÖMÖRY a PAULE (1993) dále aplikovali tuto metodiku při výzkumu křížení modřínu opadavého. GÖMÖRY et al. (1998) prezentovali výsledky isoenzymových analýz buku z hlediska semenářských oblastí této dřeviny. Pro získání obecnějšího náhledu na tento typ analýz je možno doporučit dnes již klasickou monografii PAULEHO (1992).

Jedna z prvních takto zaměřených prací (KORMUTAK et al. 1982) se zabývala variabilitou enzymatických systémů u 4 populací jedle bělokoré na Slovensku. KONNERT (1993) popsala genetickou variabilitu 14 populací jedle v Bavorsku na základě analýz 9 polymorfních isoenzymových lokusů. Podobně HUSSENDÖRFER et al. (1995) sledovali příbuzenské vztahy mezi různými populacemi této dřeviny, v novější studii pak popsali BALLIAN a KAJBA (2005) lokální genetickou variabilitu jedle v Chorvatsku. LONGAUER et al. (2001) srovnávali s použitím isoenzymových analýz selekční tlak atmosférického znečištění na genofond smrku ztepilého, jedle bělokoré a buku



lesního. BERGMANN a MEJNARTOWICZ (2002) se zabývali obecnějšími otázkami diferenciace struktury vybraných enzymů, tj. glukokinázy, fruktokinázy a hexokinázy u jedle bělokoré, smrku ztepilého a borovice lesní, LIEPELT et al. (2009) sledovali pomocí isoenzymů postglaciální expanzi jedle, EŠNEROVÁ et al. (2010) popsali genetickou diverzitu 5 populací jedle bělokoré v oblasti Šumavy. IVANEK (2000, 2001), IVANEK (2003, 2006), resp. IVANEK et al. (2009b) shromáždili výsledky isoenzymových analýz dílčích populací smrku ztepilého na plochách s různými stanovištními podmínkami. Využití isoenzymových analýz při kontrole genetické homogenity klonů u řízkovanců této dřeviny popsali IVANEK a MARTINCOVÁ (2005), genetickou diverzitou semenáčků smrku ztepilého ve vysokohorských podmínkách se zabývali IVANEK et al. (2012). IVANEK a PROCHÁZKOVÁ (2006) identifikovali klony a roubovance v semenných sadech modřínu opadavého. Z tohoto hlediska, s důrazem na kontrolu homogenity klonů, byly rovněž podniknuty rozsáhlé studie sadů borovice lesní (PROCHÁZKOVÁ et al. 2006; IVANEK et al. 2009a).

Praktická realizace isoenzymových analýz představuje soubor vysoce kvalifikovaných dílčích postupů, které je možné obecně rozdělit na venkovní operace (výběr a odběry rostlinných vzorků pro isoenzymové analýzy – tzv. „vzorkování“) a na laboratorní činnosti (přípravné a laboratorní práce, porovnávací experimenty, zpracování získaných dat a vyhodnocování prováděných experimentů). K vyhodnocování získaných dat jsou používány softwarové programy, jako např. ImageMaster, IsoEnz (MATĚJKA 2009a) či SeqAn (MATĚJKA 2009b). Isoenzymové analýzy by měly být prováděny pokud možno v prostředí akreditovaných laboratorních pracovišť.

Cílem předkládané práce je shrnout a zobecnit metodické postupy používané v delším časovém horizontu ca 10–15 let v Laboratoři analýzy isoenzymů lesních dřevin Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., v rámci řešení dlouhodobých výzkumných projektů zaměřených na ověřování geneticky podmíněných charakteristik dílčích populací vybraných lesních dřevin se zaměřením na hlavní lesní dřeviny (jehličnany), včetně molekulárně-genetického ověřování klonů a sledování genetické struktury populací dřevin v různých stanovištních podmínkách.

## 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1 Cíl šetření, šetřené druhy dřevin, analyzované enzymy

Při šetření se stanovuje zastoupení isoenzymů u jednotlivých stromů. Toto zastoupení isoenzymů se provádí pomocí elektroforézy na gelové vrstvě, kde mají jednotlivé isoenzymy rozdílnou pohyblivost v elektrickém poli. Za určitý čas tak příslušná část vzorku dosáhne konkrétní vzdálenosti od startovní pozice. Tato vzdálenost se měří na zpracovaném gelu jako hodnota označovaná Rf. Jednotlivé isoenzymy se označují arabskými číslicemi vzestupně podle třídy pohyblivosti, a to vždy společně pro všechny porovnávané jedince.

Šetření je možné provádět za účelem:

1. ověření totožnosti sledované populace a zdrojového jedince/zdrojové populace,
2. screeningu populace.

Pro dřeviny, které jsou v isoenzymové laboratoři předmětem šetření, je třeba odzkoušet a validovat aplikované postupy isoenzymových analýz. Příkladem isoenzymových systémů, frekventovaně sledovaných v Laboratoři analýzy isoenzymů lesních dřevin Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., jsou:

Glukózo-6-fosfátdehydrogenáza	G-6-PDH
Glutamátdehydrogenáza	GDH
Šikimátdehydrogenáza	SDH
6-fosfoglukonátdehydrogenáza	6-PGDH
Fosfoglukomutáza	PGM
Malátdehydrogenáza	MDH
Fosfogluoizomeráza	PGI
Aspartátaminotransferáza	AAT

### 2.2 Odběr vzorků (vzorkování)

Zpracovávaným materiálem mohou být pupeny nebo v menším rozsahu i semena. V prvním případě se ze šetřených stromů odebírají části větví s dormantními pupeny v období září až květen v závislosti na klimatických podmínkách odběrového

stanoviště. Větve musí pocházet z vitální části koruny, zřetelně nepoškozené, ze které se odebírají náhodným výběrem. Zpravidla se odebírají u vzrostlých stromů koncové části větví o délce minimálně 20 až 30 cm; u sazenic a mladých stromů mohou být i kratší (nutno předem domluvit v laboratoři). Počet větví musí být takový, aby celkový vzorek obsahoval dostatečný počet vitálních pupenů, tj. například několik desítek pro smrk ztepilý a jedli bělokorou nebo několik pro borovici lesní.

Osoba nebo subjekt odebírající vzorky (dále vzorkovatel) odpovídá za označení stromů podle specifikace zadavatele. Stromy, ze kterých byl proveden odběr, jsou v terénu nebo v plánu označeny jednoznačným způsobem tak, aby je bylo možné identifikovat alespoň po dobu dalšího 1 roku. Odběr vzorků, jejich transport či manipulace s nimi mimo laboratoř mohou zásadním způsobem ovlivňovat aktivitu enzymů, a tím i vyhodnotitelnost záznamů.

Zadavatel, kterým je v některých případech sama laboratoř, zodpovídá za jednoznačné určení lokality, způsobu odběru a specifikaci odebíraného materiálu vzorkovateli. Ten provede odběr po dohodě s vlastníkem porostu, přičemž zodpovídá za provedení odběru podle pokynů zadavatele a za stav vzorků do doby předání zadavateli (semena) nebo laboratoři analýzy isoenzymů (pupeny).

Zadavatel a vzorkovatel musí zaručit, že po odběru budou vzorky uchovávány a přepravovány za vyhovujících podmínek tak, aby nedošlo k poklesu vitality materiálu (zvláště nesmí dojít k přehřátí, zapaření nebo vyschnutí vzorků). Vzorky nesmí dosáhnout teploty, při níž by začalo docházet k jejich tepelnému rozkladu. Teplota je v případě podezření na možnost přehřátí orientačně kontrolována vzorkovatelem. Semena se odebírají náhodným výběrem z vitální části koruny. V další fázi se musí nechat naklíčit do stadia rozvinutí děložních lístků, klíčnicí rostlinky musí být plně vitální a nepoškozené. Naklíčení semen zajišťuje zadavatel s využitím standardních postupů semenářské praxe. Před vlastním transportem musí být naklíčená semena uchovávána při teplotě 5 až 10 °C po dobu nejvýše 3 dnů. Zadavatel ručí za zachování vitality semen při následném transportu do laboratoře analýzy isoenzymů.

## **2.3 Příjem a evidence vzorků**

Vzorky větví s pupeny se dodávají v plastových pytlích, jednoznačně identifikovaných názvem lokality, kódovým označením stromů a jejich polohou (GPS, plán výsadby) tak, aby nedošlo k jejich nekontrolovatelnému promísení.

Vzorky nepoškozených naklíčených semen s uvedenými pořadovými čísly nebo kombinací čísel se dodávají v označených uzavřených plastových kontejnerech, roz-

tříděných podle lokalit, porostů, souborů atd. Vzorky vybavené průvodním listem dodané vzorkovatelem nebo zadavatelem jsou umístěny do příslušných prostorů laboratoře (mrazící boxy nebo lednice).

Označení vzorků v laboratoři vychází z kombinace pořadového čísla a označení jedinců v terénu či plánu.

Průvodní listy, jež jsou dále archivovány, zahrnují označení vzorkovaného jedince, identifikaci lokality či porostu, datum odběru, specifikaci odebraného materiálu, identifikaci vzorkovatele, zadavatele aj. a jsou opatřeny seznamem předávaných vzorků včetně náležité dokumentace.

## 2.4 Uskladnění vzorků

Přijatý materiál (větvě nebo naklíčená semena) a vlastní oddělené vzorky (pupeny nebo části semen) jsou uskladňovány v mrazících boxech při teplotě nižší než  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Oddělování vzorků se provádí následujícím způsobem:

Pupeny: Z mrazícího boxu se vyjme označený uskladněný materiál (větvě) a vybere se z něj nebo oddělí tak velká část, aby byl k dispozici potřebný počet dormantních pupenů o velikosti zahrnující dostatečné množství biologického materiálu k analýzám. Ten představují vzrostlé vrcholy pupenů, které jsou vkládány do plastových mikrozkupek, označených shodně s původním označením v terénu a uskladněných dále v mrazícím boxu.

Referenční vzorky, které slouží jako univerzální porovnávací standardy (UPS), jsou ve formě jednotlivých pupenů neprodleně (do 2 týdnů) z mrazících boxů přemístěny v ochranných plastových kontejnerech označených kódem lokality do speciálního hlubokomrazícího boxu. Zde jsou dlouhodobě pod nezaměnitelným označením skladovány při kontrolované teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Všechny vzorky (větvě, vzrostlé vrcholy dormantních pupenů) jsou v mrazících boxech skladovány po dobu nejvýše 3 měsíců, s možností přechodného umístění v hlubokomrazícím boxu, nelze-li tuto lhůtu dodržet. Pokud se zjistí, že skladování za definovaných a kontrolovaných podmínek nebylo dodrženo, vzorky jsou bez dalšího likvidovány.

Semena: Semena jsou zpracovávána obdobně. V mrazícím boxu je možno uchovávat celá naklíčená semena nebo jejich části dle specifikace analýzy, a to maximálně po dobu 3 měsíců. Uchovávají se rovněž v mikrozkupech. Před ulože-

ním do mrazicího boxu nebo v průběhu skladování se provede vlastní příprava materiálu k analýze – z naklíčených semen se oddělí gymnosperm nebo embryo (dle požadavků analýzy) a uloží se do mikrozkuhavky. Přijatý materiál i vlastní vzorky jsou uchovávány za výše uvedených podmínek před vlastní analýzou nebo po ní (v případě předpokládaného opakování nebo doplnění analýz). Semena jsou podobně jako vzorky pupenů číslována kombinací pořadového čísla lokality, příp. klonu a pořadového čísla stromu, příp. semene.

V návaznosti na příjem vzorků pupenů nebo semen zaznamenává laborant kombinaci kódu lokality, označení čísla stromu v terénu, druh dřeviny, datum odběru, datum zkoušky, výběr měřených enzymů, základní specifické údaje o separačním médiu, na kterém probíhá elektroforéza (škrob) a zvolené voltampérové charakteristiky elektroforézy. Označení každého gelu je kódováno. Teplota v mrazícím boxu se soustavně kontroluje prostřednictvím k tomu určených elektronických datalogerů. Dataloger je zde umístěn vždy nad vrstvou uskladněných vzorků. Kontrola představuje stažení dlouhodobě monitorovaných teplotních údajů do počítače a jejich vyhodnocení.

## **2.5 Příprava vzorků**

Příprava vzorků spočívá v extrakci enzymů z rostlinného materiálu. Mikrozkuhavky s předem připraveným materiálem (zpracované pupeny nebo semena) se vyjmou z mrazicího boxu. Směs pupenů se homogenizuje s 20–40  $\mu$ l extrakčního pufru (příloha 8.1) v mikrozkuhavkách pomocí rotačního homogenizátoru po dobu 4–12 s. Do vzniklého homogenátu se podle požadavků na počet analyzovaných enzymů a předpokládaného opakování analýz namočí 2 nebo více proužků chromatografického papíru Whattman o velikosti 3×10 mm. Po uzavření se mikrozkuhavky neprodleně opětovně umísťují zpět do mrazicího boxu. Zde jsou takto připravené vzorky uloženy po dobu maximálně 3 dnů před vlastní analýzou na gelu.

## **2.6 Příprava zásobních roztoků**

Za účelem extrakce pupenů a následné elektroforézy jsou připraveny zásobní roztoky extrakčního pufru (CHELIAK, PÍTEL 1984), zásobní roztoky elektrodoových pufrů, roztoků pro přípravu gelů a dále pro dlouhodobou konzervaci (fixaci) těchto gelů.

Hojně používaným elektrodočným puřrem je například tris-citrátový tlumivý roztok na bázi směsi 0,2M roztoku Tris(hydroxymethyl)-aminometanu a 1M kyseliny citronové, jehož odpovídajícím naředěním v poměru 1:7 až 1:15 se připravují roztoky pro přípravu gelů. Jako roztoky pro fixaci gelů jsou používány ternární směsi vody, kyseliny octové a glycerolu.

Zásobní roztoky jsou přechovávány v lednici při průměrné teplotě 3–7 °C po dobu nejvýše 1 měsíce. Teplota je dlouhodobě sledována datalogerem. Složení zásobních roztoků je uvedeno v příloze 8.1.

## 2.7 Příprava škrobového gelu

Pro přípravu škrobového gelu se používají následující složky:

- škrob pro elektroforézu od zavedených dodavatelů jako jsou Biomol, Gerbu, případně Sigma-Aldrich,
- sacharóza,
- roztok pro přípravu gelů.

Příprava gelu spočívá v opakovaném zahřívání suspenze škrobu a krystalické sacharózy v zásobním roztoku pro přípravu gelů na teplotu varu v mikrovlnné troubě po dobu, jež činí úhrnem ca 2 minuty. Výsledkem je vznik homogenního solu.

Následuje evakuace solu v odsávačce membránovou pumpou a jeho nalití do připraveného rámečku z plexiskla o velikosti odpovídající rozměrům elektroforetické vany. Sol se nechá vychladnout při pokojové teplotě po dobu 60 minut, přičemž dojde k jeho ztuhnutí (přechodu solu v gel). Gel je následně umístěn do elektroforetické vany. Pokud nelze v ojedinělých případech dosáhnout požadované kvality solu, je k zahřevu jeho složek alternativně použito vodní lázně. Postup přípravy škrobového gelu je uveden v příloze 8.2.

## 2.8 Elektroforéza

Elektroforéza je technika, jejíž pomocí se v elektrickém poli separují jednotlivé enzymy (CHELIAK et al. 1987; EŠNEROVÁ 2010). Elektroforetická separace enzymů je možná díky ionizaci molekuly proteinu, tj. molekula nese určitý nenulový náboj.

Elektroforéza pak spočívá v různě rychlé migraci enzymů elektrickým polem, což je dáno právě rozdílnou primární proteinovou strukturou. Jako nosič se pro elektroforézu používá polyakrylamidový (obvykle vertikální uspořádání) nebo škrobový gel (horizontální uspořádání). Kontakt mezi elektrodami a gelem je zprostředkován pufrem (HARTL, CLARK 2007).

Po vložení homogenátu zkoumaného pletiva, což je vlastně směs isoenzymů, do elektrického pole, jsou zobrazeny rozdělené isoenzymy po proběhlé elektroforéze na gelu podle jejich elektroforetické pohyblivosti (MÁNEK 2001). Jako materiál pro isoenzymové analýzy se nejčastěji používá pletivo dormantních pupenů nebo semen.

Pro isoenzymové analýzy se používá jednorozměrná horizontální elektroforéza na škrobovém gelu, která probíhá v elektroforetických vanách s odděleným katodovým a anodovým prostorem a vybavených dutou horizontální chlazenou keramicou nebo plastovou deskou. Katodový a anodový prostor je určen značkou na horizontální desce. Po vsunutí nosičů se vzorkem do gelu je vlastní elektroforéza zahájena vložением předvoleného elektrického napětí na boční strany gelu, které je zprostředkováno vlhkou vrstvou filtračního papíru ve funkci vodivého můstku. Uvedené teplotní rozmezí je zabezpečeno chlazením desek vodou, která cirkuluje mezi vnitřním prostorem desek a termostatem. K elektroforéze je v případě Laboratoře analýzy isoenzymů lesních dřevin Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., používána originální sestava Multiphor II od výrobce Pharmacia Biotech, zahrnující zdroj napětí a proudu EPS 3500, dále elektroforetické vany Multiphor II opatřené kryty, které zabezpečují ochranu před účinky vysokého napětí, a termostat Multi-temp III. Jmenované části jsou propojeny původními kabely a tepelně izolovanými plastovými trubkami pro rozvod chladicí vody. Tato souprava je dále vybavena signalizačním zařízením, které eliminuje nekontrolovatelný pokles napětí nebo proudu v kterémkoli místě obvodu (zejména při nespolehlivosti kontaktu, výpadku proudu apod.) zvukovou a světelnou signalizací a automatickým přerušením elektroforézy.

### **Postup práce:**

30–45 min. před zahájením elektroforézy je nutno zapnout termostat, který zabezpečuje chlazení horizontálních desek a nastavit předvolbu teploty chladicí vody tak, aby odpovídala 1 až 3 °C. Katodový i anodový prostor elektroforetické vany se zcela naplní elektrodovým pufrem.

Připravený gel se položí na chlazenou desku elektroforetické vany a vodivě se spojí s elektrodovým roztokem několika vrstvami filtračního papíru Whattman 3 mm. Pro umístění vzorků se v gelu pomocí nerezového hřebenu připraví 15 až 20 rovnoměrně rozmístěných zářezů vedených rovnoběžně s kratší stranou gelu v blízkosti katody, a to přes celou vrstvu gelu.

Vzorky jsou na gely umísťovány v počtu a pořadí v závislosti na účelu analýzy. Prakticky se vzorek (připravený proužek chromatografického papíru nasyceného vzorkem) vloží do konkrétního připraveného zářezu v gelu. U každého vzorku je zaznamenáno jeho pořadí na gelu.

Následně se spustí elektroforéza, která v obou elektroforetických vanách probíhá v několika fázích (předvolitelných programech), jejichž parametry (údaje o napětí a proudu) jsou společně s teplotou místnosti zaznamenávány.

Po skončení elektroforézy se gel vyjme, přenesse se mimo prostor elektroforetických van a jeho rozměry jsou seříznuty na normalizovanou velikost. Hmota celého gelu se rozřeže pomocí nylonového vlasce na sedm souběžných vrstev, přičemž první a poslední vrstva tvoří odpad (není možno je dále zpracovávat), 5 zbývajících vnitřních vrstev pak slouží k vyhodnocení 5 různých enzymů.

## 2.9 Barvení a fixace gelů

### Popis přípravy roztoků pro barvení gelů

Po rozřezání gelu jsou jednotlivé vrstvy opatrně vkládány do krabiček s roztoky, specifických pro jednotlivé enzymy (příloha 8.3). Krabičky jsou po uzavření víčky vloženy do termostatu, jehož předvolbu teploty je třeba nastavit tak, aby teplota prostoru termostatu odpovídala přibližně hodnotě  $37,5 \pm 2,5$  °C. Teplota je kontrolována na počátku a na konci procesu barvení pomocí sondy odporového termoměru, umístěného v prostoru termostatu. Doporučená doba barvení je specifická pro každý enzym a pohybuje se v rozmezí ca 45 minut až několika hodin. V případě potřebného zvýšení kontrastu je nutno podstatně zvýšit dobu barvení, přičemž je tato okolnost specifikována poznámkou v tabulce gelů v programu ImageMaster. Gely v krabičkách se během inkubace pravidelně kontrolují (první 2 hodiny inkubace každých 15–20 min.). Pokud se gely dostatečně nevybarví během této doby, jsou ponechány v inkubátoru delší dobu. Podmínky a okolnosti inkubace (barvení) jsou podchyceny v záznamech. Po obarvení se gely propláchnou vodou a jednotlivé vrstvy gelu se zalijí fixačním roztokem (příloha 8.4). Tím jsou gely připraveny pro skenování a následné zatavení do fólií. Roztoky pro barvení gelů jsou připravovány podle postupů popsanych PASTEUREM et al. (1988).

Roztoky pro barvení gelů jsou přechovávány v lednici při průměrné teplotě 3–7 °C po dobu nejvýše 6 týdnů, extrakční roztok v prostoru přiléhajícím k zadní stěně



lednice o teplotě 0–4 °C po dobu 6 měsíců. Teplota je dlouhodobě sledována zařízením umožňujícím teplotní záznam. Jestliže teplota vzduchu v lednici překročí např. z důvodu výpadku elektrického proudu hodnotu 15 °C na dobu delší než 24 hod., jsou zásobní roztoky zlikvidovány.

## 2.10 Skenování a zatavení gelů

Skenování obarvených a fixovaných gelů se provádí do šedotónového obrazu při rozlišení 400 dpi. V současnosti se ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., používá skener SHARP Scan JX-330 s adaptérem pro transparentní materiály. Soubory se ukládají ve formátu TIFF pod kódovým označením odvozeným z číselného kódu enzymu a pořadového čísla vzorků měřeného souboru. Bezprostředně po naskenování jsou gely zataveny mezi transparentní plastové fólie a jsou připraveny k archivaci.

## 2.11 Záznam a vyhodnocení výsledků

Po naskenování jsou gely pro všechny enzymy nejprve předběžně (orientačně) vizuálně vyhodnoceny, a to nejpozději do 5 pracovních dnů ode dne analýzy. Toto vyhodnocení provádí laborant podle disponibilního vzorníku. Výsledky zaznamenává na soubor pomocných formulářů s údaji předtištěnými vedoucím laboratoře (kódy lokalit měřených položek a standardu UPS). Tyto formuláře jsou základním podkladem pro protokoly o zkouškách. Následně jsou předány vedoucímu laboratoře ke kontrolnímu vizuálnímu hodnocení a poté archivovány. Poté jsou výsledky tohoto vyhodnocení doplněny do databáze programu IsoEnz pro danou lokalitu nebo její kód.

Základem jakéhokoli vyhodnocení elektroforetických záznamů na gelu (viz obrázek na titulní straně) je relativní porovnání polohy proužků ztmavnutí (oblastí zvýšené optické hustoty), odpovídajících obarveným isoenzymům, které jsou v dalším textu označovány jako pásy. Tyto pásy jsou dále klasifikovány podle vzestupného pořadí tříd relativní rychlosti migrace (RM) isoenzymů v elektrickém poli při jejich elektroforetické separaci na gelu.

Předběžné vizuální vyhodnocení představuje zároveň vodítko, podle kterého rozhodne vedoucí laboratoře o konečném způsobu vyhodnocení pro danou skupinu gelů, kdy jsou enzymy rozděleny:

- (1) na skupinu, u které budou uvedeny pouze výsledky vizuálního vyhodnocení,
- (2) na skupinu, u které budou uvedeny výsledky na základě počítačového vyhodnocení s případnou vizuální korekcí.

V případě vizuálního vyhodnocení je po předběžném orientačním zpracování výsledků provedeno vedoucím laboratoře opakované kontrolní vizuální vyhodnocení pro danou skupinu gelů, které potvrdí, po případných opravách, na výše uvedeném formuláři, a které je jako konečné uvedeno tehdy, jestliže:

- (1) pořadí polohy pásů na gelu podle tříd RM je v rámci sledované skupiny gelů jednoznačné, zejména u enzymů, které nevykazují polymorfismus,
- (2) charakter elektroforetického záznamu na gelu neumožňuje přehledné počítačové vyhodnocení gelu.

V opačném případě jsou gely určeny k počítačovému vyhodnocení.

Jednotlivým pásům (předpokládaným třídám RM) jsou podle pořadí RM přiřazeny u haploidního materiálu (gymnosperm semen) předpokládané alely 1, 2, 3, ..., nebo u dormantních pupenů a embryí semen předpokládané alelické páry 11, 12, ..., 22, 23, ... Toto přiřazení vychází z odborného stanoviska vedoucího laboratoře na základě vzájemného porovnání dlouhodobých výsledků laboratoře pro danou dřevinu, jakož i literárních údajů. Výsledky, tj. přítomnost alel nebo alelických párů pro jednotlivé vzorky, jsou zaneseny do protokolů v elektronické podobě.

Počítačově se vyhodnocují gely, které nelze jednoznačně vizuálně vyhodnotit, případně jakékoli další gely.

V případě počítačového vyhodnocení jsou základními daty rastry s obrazem skenovaných gelů v běžném formátu (TIFF). Z rastrů s obrazem skenovaných gelů jsou programem ImageMaster odečítány referenční hodnoty maxim optické hustoty, odpovídající hodnotám relativní rychlosti migrace ( $R_f$ ), a to s použitím automatické procedury tohoto programu, zahrnující detekci pásů, odhad hodnot  $R_f$  a vyloučení chybových signálů, jako jsou bodová kontaminace gelu barvivem, přítomnost vzduchové bubliny apod.

Pro posouzení kvality záznamů na vyhodnocovaném gelu je důležitá maximální optická hustota odpovídající jednotlivým isoenzymům a šířka a tvar záznamů. Údaje o kvalitě gelu jsou zaznamenávány do databáze IsoEnz. Série hodnot  $R_f$  pro každý gel jsou exportovány do textového souboru, který slouží pro přenos dat do databáze IsoEnz.

Základní zpracování výsledků na jednotlivých gelech je prováděno programem SeqAn, přičemž použita jsou data načítaná přímo z prostředí databáze IsoEnz. V programu SeqAn je provedena klasifikace hodnot  $R_f$  podle tříd RM pro všechny vzorky umístěné na jednom konkrétním gelu podle standardního postupu (provádí vedoucí laboratoře), podrobnosti použití programu jsou uvedeny v nápovědě k programu. V programu se zobrazí distribuce jednotlivých hodnot. Výsledky klasifikace jsou programem SeqAn zapsány do databáze IsoEnz.

Z klasifikace gelů pomocí výše uvedeného postupu vychází odborné stanovisko, podle kterého je vzorku přiřazena alela nebo alelický pár. Výsledky počítačového vyhodnocení gelů jsou doplněny do elektronických protokolů a spolu s výsledky vizuálního vyhodnocení jsou vytištěny a uloženy v listinné formě. Klasifikace jsou provedeny samostatně na jednotlivých gelech. Gely náležící do jedné skupiny jsou dále pro každý jednotlivý enzym porovnávány v prostředí programu IsoEnz, s cílem dosáhnout vzájemného optimálního přiřazení klasifikačních skupin isoenzymů (podle relativních RM) pro stejné vzorky umístěné na různých gelech v rámci hodnocené skupiny gelů. Výsledný protokol o zkoušce musí v části uvádějící výskyt alelických párů obsahovat pro každý hodnocený enzym všechny výsledky (všechna opakování). Standardně se každá zkouška provádí dvakrát. V případě, že při opakování došlo k neshodě, je třeba zkoušku opakovat. V případě, že zkoušku není možné z jakéhokoliv důvodu opakovat, je ve výsledném protokolu uveden údaj „nelze stanovit“.

## **2.12 Zálohování dat a archivace výsledků, ochrana dat**

Písemné protokoly o odběru vzorků a související písemnosti jsou archivovány po dobu nejméně 5 let.

Databáze programu IsoEnz je pravidelně zálohována:

- na jiný pevný disk minimálně 1× za dva týdny, přičemž uchovávány jsou minimálně dvě poslední kopie dat;
- na nepřepisovatelné zálohovací médium (obvykle CD).

Rastry s obrazem skenovaných gelů v běžném formátu (TIFF, JPEG, ...) jsou zálohovány na CD společně s daty databáze.

Rastry s obrazem skenovaných gelů po jejich zpracování programem ImageMaster jsou archivovány na CD po zpracování celé série dat, nejméně 1× za 3 měsíce.

Zálohovací média jsou archivována po dobu nejméně 7 let.

Počítače jsou chráněny proti neoprávněnému přístupu k programům heslem na úrovni MS Windows, obdobně jsou heslem chráněny sdílené disky dostupné prostřednictvím interní sítě a dále jsou standardně chráněny proti proniknutí počítačových virů rezidentní antivirovou ochranou.

### **3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ**

Ve srovnání s tradičními šlechtitelskými metodami ověřování geneticky podmíněné variability testovaných variant, kdy jsou aplikovány klasické dlouhodobé genetické postupy, představuje využívání analýzy izoenzymů jako jedné z molekulárně-genetických metod, významný kvalitativní posun. Tato metoda umožňuje (a je pro tyto účely dostatečně propracována) určení genetické skladby, případně kontrolu původu u přirozených i syntetických populací řady druhů lesních dřevin, a to již v raných stádiích jejich vývoje. Umožňuje tak například identifikaci rodičovských jedinců a klonů ve šlechtitelských programech, podobně jako certifikaci komerčních vzorků semen z matečnic nebo semenných sadů. Podmínkou její aplikace je pouze dostatečné množství biologického materiálu s dostatečnou aktivitou, resp. koncentrací sledovaných enzymů. Metoda tedy není závislá na projevech makroskopických fenotypových znaků, které lze u lesních dřevin často zaznamenat až ve vyšším věku. Analýza izoenzymů je dostatečně propracovaná pro řadu lokusů, lze ji využít jak pro identifikaci jednotlivých genotypů, tak pro stanovení genotypových frekvencí u celých populací.

### **4. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY**

Využití metodiky se předpokládá zejména v lesnickém výzkumu při racionalizaci šlechtitelských aktivit orientovaných např. na ověřování geneticky podmíněné variability potomstev z hybridizačních programů, provenienčních experimentů, ověřování zdrojů reprodukčního materiálu aj. Postupy prezentované v metodice mohou být využity také jako doplňující studijní materiál pro výuku odborných lesnických a biologických předmětů na lesnických školách středoškolského i vysokoškolského

typu. Předpokládá se také možnost praktického využití metodiky v lesnické praxi, v úvahu tak přicházejí např. pracoviště lesnických velkoškolek se specificky vybaveným laboratorním zázemím ap.

## **5. EKONOMICKÉ ASPEKTY**

V návaznosti na stále větší uplatňování a využívání moderních biochemických metodických postupů orientovaných na získání nových genetických informací ověřovaného biologického materiálu v obecném smyslu je možno i v oborech souvisejících se šlechtěním lesních dřevin a se studiem geneticky podmíněné variability ověřovaných variant, resp. potomstev, předpokládat a reálně očekávat významné zkracování klasických, většinou dlouhodobých šlechtitelských programů. Tato skutečnost v důsledku představuje pro lesní hospodářství mj. významnou ekonomickou úsporu a návazně i vyšší a rychlejší ekonomický zisk. Konkrétně v oboru šlechtění lesních dřevin, kde jsou tradiční šlechtitelské programy s ohledem na dlouhověkost šlechtěných a ověřovaných variant většinou dlouhodobého charakteru, představují praktické aplikace vhodných biochemických metodických postupů, mezi kterými mají nezastupitelnou roli i isoenzymové analýzy, možnost zkrácení (z řádu desítek let na roky) jednotlivých šlechtitelských cyklů příslušných šlechtitelských programů (např. v případě hybridizačních programů je tak možno specifikovat jejich dílčí cykly, jako selekci, křížení a testování, obdobně je možno definovat dílčí cykly šlechtitelských programů orientovaných např. na šlechtění dílčích populací vyznačujících se žádoucími kvalitativními, kvantitativními či dalšími specifickými charakteristikami, na ověřování zdrojů reprodukčního materiálu, ověřování introdukovaných dřevin aj.). Poměrně vysoké náklady související s praktickými aplikacemi isoenzymových analýz se tak v rámci šlechtitelských programů realizovaných v řádech let stávají výrazně nižšími ve srovnání s náklady na tradiční dlouhodobé šlechtitelské programy realizované v řádech desítek let. Rozdíly v nákladech na realizaci krátkodobých a dlouhodobých šlechtitelských programů je možno charakterizovat obdobným způsobem, prakticky se může jednat o rozdíly vyjádřené v řádech desítek, resp. stovek tisíců Kč.

## 6. DEDIKACE

Popisy obecných charakteristik dílčích postupů v rámci aplikace isoenzymových analýz při ověřování geneticky podmíněné variability dílčích populací lesních dřevin, které jsou prezentovány v předkládané metodice, vycházejí z poznatků získaných při řešení výzkumného projektu NAZV QI92A248 „Využití genových základů jedle bělokoré v komplexu výzkumných opatření k záchraně a reprodukci genových zdrojů této dřeviny v lesním hospodářství České republiky“ a výzkumného záměru MZE0002070203 „Stabilizace funkcí lesa v antropogenně narušených a měnících se podmínkách prostředí“.

Autoři děkují W. Keithu Moserovi, Dr. For., CF (USDA, Forest Service, NRS FIAP, St. Paul, MN 55108, USA) za jazykovou revizi anglického abstraktu a souhrnu.

## 7. LITERATURA

### 7.1 Seznam použité související literatury

- BALLIAN D., KAJBA D. 2005. Estimation of the isoenzyme genetic variability of the silver fir (*Abies alba* Mill.) from the area of Gorski Kotar (Croatia). *Periodicum Biologorum*, 107: 67–72.
- BERGMANN F. 1971. Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. II. Möglichkeiten für genetische Zertifizierung von Forstsaatgut. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung*, 142: 278–280.
- BERGMANN F. 1975. Herkunfts-Identifizierung von Forstsaatgut auf der Basis von Isoenzym-Genhäufigkeiten. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung*, 146: 191–195.
- BERGMANN F., MEJNARTOWICZ L. 2002. Substrate specificity of glucokinase and fructokinase of several conifer species. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 71: 125–127.
- EŠNEROVÁ J. 2010. Studium genetické diverzity jedle bělokoré (*Abies alba* Mill.) na vybraných lokalitách v NP Šumava s využitím analýz isoenzymů. Disertační práce. Praha, ČZU: 109 s.

- EŠNEROVÁ J., MÁNEK J., KOLÁŘ R. 2010. Genetická diverzita pěti populací jedle bělokoré v oblasti Šumavy. *Silva Gabreta*, 16: 33-41.
- GÖMÖRY D., HYNEK V., PAULE L. 1998. Delineation of seed zones for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in the Czech Republic based on isozyme gene markers. *Annales des Sciences Forestières*, 55 (4): 425-436.
- GÖMÖRY D., PAULE L. 1993. Inferences on mating system and genetic composition of a seed crop in the European larch (*Larix decidua* Mill.). *Journal of Genetics and Breeding*, 46: 309-314.
- HARTL D.L., CLARK A.G. 2007. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc.: 652 s.
- HATTEMER H.H., BERGMANN F., ZIEHE M. 1993. Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft. Frankfurt am Main, J. D. Sauerländer's Verlag: 492 s.
- HUSSENDÖRFER E., KONNERT M., BERGMANN F. 1995. Inheritance and linkage of isozyme variants of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Forest Genetics*, 2 (1): 29-40.
- CHELIAK W.M., PITEL J.A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Inst., Canadian Forestry Service, Agriculture Canada.
- CHELIAK W.M., YEH F.C.H., PITEL J.A. 1987. Use of electrophoresis in tree improvement programs. *The Forestry Chronicle*: 89-96.
- KONNERT M. 1993. Untersuchungen über die genetische Variation der Weißtanne (*Abies alba* Mill.) in Bayern. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung*, 164: 162-169.
- KORMUTAK A., BENCAT F., RUDIN D., SEYEDYAZDANI R. 1982. Isoenzyme variation in the 4 Slovakian populations of *Abies alba* Mill. *Biologia*, 37: 433-440.
- LIEPELT S., CHEDDADI R., DE BEAULIEU J.L., FADY B., GOMORY D., HUSSENDÖRFER E., KONNERT M., LITT T., LONGAUER R., TERHURNE-BERSON R., ZIEGENHAGEN B. 2009. Postglacial range expansion and its genetic imprints in *Abies alba* (Mill.) – A synthesis from palaeobotanic and genetic data. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 153: 139-149.
- LONGAUER R., GOMORY D., PAULE L., KARNOSKY D.F., MANKOVSKA B., MULLER-STARCK G., PERCY K., SZARO R. 2001. Selection effects of air pollution on gene pools of Norway spruce, European silver fir and European beech. *Environmental Pollution*, 115: 405-411.
- MÁNEK J. 2001. Genetická diverzita smrku ztepilého ve zvláště chráněných územích ČR a identifikace ohrožených populací jako podklad pro záchranná opat-

ření. Závěrečná grantová zpráva projektu VaV/610/1/99. Depon. in MŽP ČR Praha: 86 s.

MATĚJKA K. 2009a. Program IsoEnz. Databáze isoenzymových analýz. URL: [http://www.infodatasys.cz/software/hlp\\_isoenz/isoenz.htm](http://www.infodatasys.cz/software/hlp_isoenz/isoenz.htm)

MATĚJKA K. 2009b. Nápopověda k programu SeqAn Sequential data distribution analyse. URL: [http://www.infodatasys.cz/software/hlp\\_seqan/seqan.htm](http://www.infodatasys.cz/software/hlp_seqan/seqan.htm)

MÜLLER-STARCK, G., SCHUBERT, R. (eds). 2001. Genetic response of forest systems to changing environmental conditions. London, Kluwer Academic Publishers: 353–363.

PASTEUR N., PASTEUR G., BONHOMME F., CATALAN J., BRITTON-DAVIDIAN J. 1988. Practical isozyme genetics. Wiley & Sons, Chichester: 215 s.

PAULE L. 1992. Genetika a šľachtenie lesných drevín. Bratislava, Príroda: 304 s.

PAULE L., LINDGREN D., YAZDANI R. 1993. Allozyme frequencies, outcrossing rate and pollen contamination in *Picea abies* seed orchards. Scandinavian Journal of Forest Research, 8 (1): 8–17.

## 7.2 Seznam publikací, které předcházely meto- dice

IVANEK O. 2000. Výsledky analýzy izoenzymů u smrkových porostů s různou tolerancí vůči průmyslovým imisím. In: Slodičák, M., Novák, J. (eds.): Výsledky a postupy výzkumu v imisní oblasti SV Krušnohoří. Sborník referátů z celostátního semináře. Jíloviště-Strnady, VÚLHM: 69–74.

IVANEK O. 2001. Výsledky analýzy izoenzymů u smrkových porostů s různou tolerancí vůči průmyslovým imisím. In: Slodičák, M., Novák, J. (eds.): Výsledky lesnického výzkumu v Krušných horách. Sborník z celostátní konference. Jíloviště-Strnady, VÚLHM: 111–114.

IVANEK O. 2003. Isoenzyme analysis of Norway spruce in the Ore Mountains. Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae, 20: 95–100.

IVANEK O. 2004. Isoenzymová analýza. In: Monitoring stavu lesa v České republice 1984–2003. Praha, MZE ČR; Jíloviště-Strnady, VÚLHM: 431 s.



- IVANEK O. 2006. Výsledky isoenzymových analýz populací smrku ztepilého na plochách s různými stanovištními podmínkami. Zprávy lesnického výzkumu, 51 (1): 32–37.
- IVANEK O., MARTINCOVÁ J. 2005. Klonové výsadby smrku ztepilého – izoenzymové analýzy vybraných klonů I. Zprávy lesnického výzkumu, 50 (1): 58–60.
- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ Z. 2006. Identifikace roubovanců a klonů ve dvou semenných sadech modřínu opadavého (*Larix decidua* Mill.). Zprávy lesnického výzkumu, 51 (1): 38–43.
- IVANEK O., KAŇÁK J., NOVOTNÝ P. 2009a. Zakládání semenných sadů druhé generace pro borovici lesní. Závěrečná technická zpráva projektu GS LČR 7/2007. Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti: 40 s.
- IVANEK O., MATĚJKA K., NOVOTNÝ P. 2009b. Genetická struktura dvou částí porostu smrku ztepilého při horní hranici lesa na území KRNAP. Zprávy lesnického výzkumu, 54 (4): 300–306.
- IVANEK O., LEUGNER J., JURÁSEK A. 2012. Vliv specifického třídění semenáčků na růst a genetickou diverzitu výsadeb v extrémních horských podmínkách. Zprávy lesnického výzkumu, 57 (2): 144–150.
- PROCHÁZKOVÁ Z., BEZDĚČKOVÁ L., BERAN F., IVANEK O. 2006. Fruktifikace a kvalita semen borovice lesní ze semenných sadů Panenská, Pabožek, Vřesná a Holičky. In: Z. Procházková, P. Kotrla (eds.): Semenné sady jako zdroj kvalifikovaného reprodukčního materiálu – minulost, současnost a budoucnost. Sborník referátů z mezinárodního odborného semináře, Bzenec 20.–21. 6. 2006. Jíloviště-Strnady, VÚLHM: 56–64.

## 8. PŘÍLOHY

### 8.1 Příprava extrakčního a zásobních roztoků – složení

#### Extrakční roztok:

Při přípravě 200 ml roztoku se užívají následující složky:

Složka	Množství	Poznámka
Polyvinylpyrrolidon (PVP), mol. hmotnost 360 000	2 g	Odvážené množství předem rozpustit ve 150 ml vody, další složky se přidávají do tohoto roztoku
Polyvinylpyrrolidon (PVP), mol. hmotnost 40 000	14 g	Dtto
Sacharóza	20 g	
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	0,040 g	
Dithiotreitol	0,030 g	
Kyselina askorbová	0,035 g	
Bovine Serum Albumin	0,200 g	
B-Nikotinamid adenindinukleotid (NAD)	0,055 g	
B-Nikotinamid adenindinukleotidfosfát (NADP)	0,045 g	
Pyridoxal-5-fosfát	0,010 g	

U výsledného roztoku se provede adjustace pH na hodnotu  $\text{pH } 6,7 \pm 0,02$  přidáním roztoku ( $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ) Tris (hydroxymethyl)-aminomethanu (Trisu). Poté je přidáno 1,32 ml merkptoethanolu a roztok se doplní vodou na 200 ml.

#### Zásobní roztok 0,2 M Tris (připravuje se 1000 ml roztoku):

Složka	Množství	Poznámky
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	24,2 g	

Složka Tris se rozpustí v ca 900 ml vody. U výsledného roztoku se provede adjustace pH na hodnotu pH 8,0 přidáním roztoku HCl (1:5) a roztok se doplní vodou na 1000 ml.

**Elektrodotový roztok** (připravuje se 1000 ml roztoku):

Složka	Množství	Poznámky
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	18,17 g	
Kyselina citronová 1 mol/l	viz níže:	adjustace pH

Složka Tris se rozpustí v cca 900 ml vody. U výsledného roztoku se provede adjustace pH na hodnotu pH 7,5 přidáním roztoku kyseliny citronové a roztok je doplněn vodou na 1000 ml.

**Zásobní roztok na přípravu gelů** (elektrodotový roztok se zředí vodou v poměru 1:7,5 (v:v)).

## 8.2 Složky pro přípravu škrobového gelu (příklad)

Složka	Množství	Poznámka
Zásobní roztok na přípravu gelů	280 ml	
Škrob fy. BIOMOL (B) a GERBU (G)	29 g (B) + 10 g (G)	
Sacharóza	3 g	

## 8.3 Příprava roztoků pro barvení gelů – složení jednotlivých roztoků

**G-6-PDH (glukózo-6-fosfátdehydrogenáza)**

40 ml 0,2M Tris-HCl, pH 8,0

160 mg glukózo-6-fosfát

01 ml 1% MgCl<sub>2</sub> hexahydrát (w/v)

01 ml NADP

01 ml MTT

01 ml PMS

Inkubace v temnu při 37 °C až do objevení se modrých pásů

**GDH (glutamátdehydrogenáza)**

40 ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)

500 mg kyselina L-glutamová

01,5 ml NAD

01,5 ml NBT

01 ml PMS

Inkubace v temnu při 37 °C až do objevení se modrých pásů

**SDH (šikimátdehydrogenáza)**

40 ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)

20 mg kyselina (-) šikimová

01 ml 1% MgCl<sub>2</sub> hexahydrát (w/v)

01 ml NADP

01 ml NBT

00,5 ml PMS

Inkubace v temnu při 37 °C až do objevení se modrých pásů

**6-PGDH (6-fosfátdehydrogenáza)**

40 ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)

50 mg trojsodná sůl kyseliny 6-fosfoglukonové

02 ml 10% MgCl<sub>2</sub> hexahydrát (w/v)

02 ml NADP

02 ml MTT

01 ml PMS

Inkubace v temnu při 37 °C až do objevení se modrých pásů

**PGM (fosfoglukomutáza)**

40 ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)

500 mg glukózo-1-fosfát, dvojsodná sůl

00,5 ml glukózo-1,6-difosfát  
roztok (0,1 mg/ml H<sub>2</sub>O)

40 jedn. glukózo-6-fosfátdehydrogenázy (0,08 – 0,1 ml)

01 ml 10% MgCl<sub>2</sub> hexahydrát (w/v)

02 ml NADP

02 ml MTT

00,5 ml PMS

Inkubace v temnu při 37 °C až do objevení se modrých pásů

**MDH (malátdehydrogenáza)**

20 ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)  
20 ml 0,5M DL kyselina malonová (pH 7,0)  
02 ml NAD  
02 ml NBT  
00,5 ml PMS

Inkubace v temnu při 37 °C až do objevení se modrých pásů

**PGI (fosfoglucoisomeráza)**

40 ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)  
35 mg fruktózo-6-fosfát, dvojsodná sůl  
08 jedn. glukózo-6-fosfátdehydrogenáza  
01 ml 10% MgCl<sub>2</sub> hexahydrát (w/v)  
01 ml NADP  
01 ml MTT  
0,5 ml PMS

Inkubace v temnu při 37 °C až do objevení se modrých pásů

**IDH (isocitrátdehydrogenáza)**

40 ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)  
230 mg DL-isocitric acid, trisodium salt  
01 ml NADP  
01,5 ml NBT  
00,5 ml PMS

Inkubace v temnu při 37 °C až do objevení se modrých pásů

**AAT (aspartátaminotransferáza)**

08 mg pyridoxal 5-fosfát  
150 mg sůl BB fast blue  
40 ml roztok substrátu<sup>x)</sup>

<sup>x)</sup> Roztok substrátu:

2,65 g kys. L-aspartová  
0,35 g α-ketoglutarová rozpuštěná v 0,5 litru 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)

Po rozpuštění znovu adjustovat pH na 8,0 pomocí pevného NaOH

Inkubace v temnu při 37 °C až do objevení se červenohnědých pásů

## 8.4 Fixace gelů

Zásobní roztok pro fixaci gelů

<b>Složka</b>	<b>Množství</b>
Voda	800 ml
Glycerin	100 ml
Kyselina octová	100 ml

Složky se smísí ve výše uvedeném poměru. Jako voda je používána demineralizovaná voda s vodivostí  $< 0,5 \mu\text{S/cm}$  (tj. s měrným odporem  $> 2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

# **THE METHODOLOGICAL PRINCIPLES OF THE ISOZYME ANALYSES IN VERIFYING THE GENETICALLY CONDITIONED VARIABILITY OF FOREST TREE SPECIES PARTIAL POPULATIONS**

## *Summary*

Isozyme analysis is one of the methods, which was used to document forest tree species genetic variability at the molecular level. Genetic structure of the population is thus described by using a selected set of markers, which are represented by the respective enzymes. Genetic variability of the selected species population is the result of forest stand genotypic composition at the time of its establishment, either anthropogenic or natural, as well as the influence of site factors on the survival of individuals, which affect the selection of different genotypes within a species. Examples of these influences are natural factors, e.g. climate, geological and pedochemical conditions, and anthropogenic factors, e.g. pollution load. Genetic variability is further determined by the resulting species composition and renewative and silvicultural interventions in forest stand.

It is possible to identify isozymes as a group of protein gene markers, which differ in their molecular weight, charge and other genetically encoded characters at the molecular level. These characteristics facilitate the division and identification of these proteins.

Isozyme analyses used to be widely applied in various genetic studies of forest tree species. It is assumed here the codominant inheritance in accordance with Mendelian laws. The genetic studies include monitoring of genetic variability, patterns of migration and gene flow, intraspecific genetic differences and identification of ortets and clones. Isozyme analyses are also used to indicate the heredity of certain quantitative and morphological characteristics.

The practical implementation of isozyme analyses is comprised of a collection of highly qualified partial procedures, which can be generally divided into outdoor operations (selection and collecting of plant samples for isozyme analyses – so called “sampling”) and laboratory activities (preparatory and laboratory work, comparative experiments, data processing and evaluation of experimental results). Specific software programs, such as ImageMaster, IsoEnz or SeqAn, are used to evaluate the data. The isozyme analyses should be carried out as a priority in

certified laboratory facilities, where the accreditation certificate for these facilities is updated on a regular basis.

In this work, we summarize methodological procedures that were used in the forest tree species isozyme analyses laboratory at the Forestry Game and Research Institute, ca 10–15 years ago. Isozyme analyses, such as those described in this work, were carried out as a part of long-term research projects aimed at verifying the genetic characteristics of populations of selected forest tree species with a focus on the main forest coniferous trees, including molecular genetic verification of selected clones' authenticity and investigation of the genetic structure of tree species populations in different site conditions.

The use of the methodology in forestry research, in particular, is most appropriate for evaluating breeding-oriented activities, e.g. the testing of genetically-conditioned variability of progenies resulting from hybridization programs, provenance experiments or the verification of reproductive material sources. The procedures presented in the methodology can also be used as a supplementary study material in the teaching of professional forestry and biological subjects at secondary and higher schools of forestry. Finally, this methodology can also be practically employed in forestry practice, such as in workplaces of united forest nurseries with specifically equipped laboratory facilities.



# LESNICKÝ PRŮVODCE



Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.  
[www.vulhm.cz](http://www.vulhm.cz)