

# HODNOCENÍ GENETICKÝCH CHARAKTERISTIK U BOROVICE LESNÍ S VYUŽITÍM MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

**LESNICKÝ PRŮVODCE**



**Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.**

**Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.**

**Mgr. LUCIE POLÁKOVÁ**

**Ing. OLGA TRČKOVÁ**



**4/2017**

**Hodnocení genetických charakteristik  
u borovice lesní  
s využitím mikrosatelitových markerů**

**Certifikovaná metodika**

**Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.**

**Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.**

**Mgr. Lucie Poláková**

**Ing. Olga Trčková**

Strnady 2017

## **Lesnický průvodce 4/2017**

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

[www.vulhm.cz](http://www.vulhm.cz)

Publikace vydané v řadě Lesnický průvodce jsou dostupné v elektronické verzi na:

[http://www.vulhm.cz/lesnicky\\_pruvodce](http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce)

**Vedoucí redaktor:** Ing. Jan Řezáč; e-mail: [rezac@vulhm.cz](mailto:rezac@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 978-80-7417-140-6

ISSN 0862-7657

# **EVALUATION OF THE GENETIC CHARACTERISTICS IN SCOTS PINE USING MICROSATELLITE MARKERS**

## *Abstract*

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers to obtain genetic characteristics, especially genetic diversity, heterozygosity, differentiation and genetic distances of important Scots pine populations and to introduce procedures for verifying the clonal identity of this species. The methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of the polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products, and molecular data calculations. The important populations and the seed orchard of the Scots pine were used to develop this methodology. Fourteen selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for finding the genetic parameters and verifying the clonal identity.

**Keywords:** simple sequence repeats, Scots pine populations, seed orchard, genetic diversity and differentiation, genetic distance, gene reserves, DNA analysis

**Oponenti:** Ing. Miloš Pařízek, ÚHUL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové  
Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D., Laboratoř růstových regulátorů,  
Univerzita Palackého v Olomouci a Ústav experimentální botaniky  
AV ČR, v.v.i.

*Foto na obálce:*

Jan Řezáč

*Adresa autorek:*

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.  
Strnady 136, 252 02 Jíloviště

e-mail: [cvrckova@vulhm.cz](mailto:cvrckova@vulhm.cz)  
[machova@vulhm.cz](mailto:machova@vulhm.cz)

# Obsah:

<b>I</b>	<b>CÍL METODIKY</b> .....	<b>7</b>
<b>II</b>	<b>VLASTNÍ POPIS METODIKY</b> .....	<b>7</b>
<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Metodické postupy</b> .....	<b>9</b>
<b>a</b>	<b>Odběr vzorků a postupy izolace DNA</b> .....	<b>12</b>
<b>b</b>	<b>Postupy PCR amplifikace</b> .....	<b>12</b>
<b>c</b>	<b>Postupy elektroforézy v agarózovém gelu</b> .....	<b>19</b>
<b>d</b>	<b>Postupy fragmentační analýzy</b> <b>a hodnocení PCR produktů</b> .....	<b>20</b>
<b>e</b>	<b>Zpracování molekulárních dat</b> .....	<b>21</b>
<b>III</b>	<b>SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ</b> .....	<b>22</b>
<b>IV</b>	<b>POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY</b> .....	<b>23</b>
<b>V</b>	<b>EKONOMICKÉ ASPEKTY</b> .....	<b>26</b>
<b>VI</b>	<b>DEDIKACE</b> .....	<b>29</b>
<b>VII</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY</b> .....	<b>30</b>
<b>VIII</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY</b> <b>METODICE</b> .....	<b>33</b>
	<b>Summary</b> .....	<b>35</b>
	<b>Příloha</b> .....	<b>37</b>

*Zkratky použité v textu:*

DNA deoxyribonukleová kyselina

nSSR nuclear Simple Sequence Repeats (jaderné mikrosatelity)

SSR Simple Sequence Repeats (mikrosatelity)

PCR Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

# I CÍL METODIKY

Cílem metodiky je představit postupy analýz DNA s využitím jaderných mikrosatelitových lokusů pro získání genetických charakteristik především genetické diverzity, heterozygotnosti, diference a genetických vzdáleností významných populací borovice lesní a představit postupy ověřování příslušnosti ramet (jedinců) náležejících k určitému ortetu (klonu) na modelovém semenném sadu borovice lesní.

## II VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 1 Úvod

Borovice lesní je u nás po smrku ztepilém lesnicky nejvýznamnějším jehličnatým druhem dřeviny, jejíž dřevo se využívá ve stavebnictví nebo truhlářství. Široké využití poskytuje i obsah pryskyřic, silic a balsámů. Je to strom středních rozměrů s kůlovým kořenem a křehkým dřevem rozlišeným na jádro a běl. Území České republiky se nachází uvnitř eurasijského areálu výskytu, ale původně u nás borovice rostla přirozeně jen ostrůvkovitě v lesní oblasti pahorkatin, v nižších polohách na extrémních skalnatých a suťovitých stanovištích a v nejnižších polohách byla přimíšena v doubravách na písčích a mělkých suchých půdách. Reliktní bory těchto typů najdeme např. na hadcích Slavkovského lesa, na pískovcových skalách severovýchodních Čech, na chudých písčích Polabí, na balvanitých svazích podhůří Šumavy nebo na písčích a zrašelinělých půdách Třeboňské pánve. Výskyt reliktních borů na Moravě je na skalnatých výspách Dražanské a Českomoravské vrchoviny, na příkrých stráních v údolí řek (Jihlava, Oslava, Rokytná, Dyje) nebo na vápencových skalách a písčitéch půdách na jihu území. Vzhledem k nenáročnosti na půdu borovice na těchto extrémních stanovištích prospívá dobře a není vytlačována konkurenceschopnějšími druhy (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Zastoupení borových porostů se začalo výrazně zvyšovat umělou výsadbou od poloviny 19. století. Nové porosty byly zakládány z dováženého osiva z různých oblastí i velkým podílem ze zahraničí. Postupnou hybridizací s původními porosty a vlivem místních klimatických podmínek i hospodářských zásahů se vytvořily kulturní sorty (SVOBODA 1953). Z některých těchto porostů se vyvinuly hospodářsky cenné kulturní typy



(MUSIL, HAMERNÍK 2007). Pro zachování vhodného genofondu této dřeviny jsou vyhlášována chráněná území různých kategorií, genové základny a uznané porosty genových zdrojů v současné době i s podporou vyhlášeného Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin. Pro ověřování genetické kvality zdrojů reprodukčního materiálu je důležitý genetický průzkum, který lze uskutečnit na základě analýz DNA. Zajištění kvality zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin je základním předpokladem pro budoucí výnos, adaptační schopnosti a ekologickou stabilitu lesa.

Genetickou skladbu organismů a její rozdílnosti mezi jedinci nebo populacemi lze zjišťovat přímým studiem genomu s využitím DNA analýz. Genotyp představuje dědičnou informaci organismu a není na rozdíl od fenotypových znaků ovlivněn změnami vnějšího prostředí. Vyhledávají se DNA markery (lišící se úseky DNA), které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí nebo délce fragmentů DNA. Aby bylo možné získat ze zkoumaných vzorků optimální informace o genetické proměnlivosti studovaných jedinců, je potřebné vyhledat DNA markery, které vykazují vysoký polymorfismus. Míry charakterizující genetickou strukturu a proměnlivost populací jsou založeny na alelických frekvencích jednotlivých alelických variant v lokusech (PAULE 1992). Pro ověřování polymorfismu borovice lesní byly zvoleny jako DNA markery jaderné mikrosatelity - nuclear simple sequence repeats (nSSR). Mikrosatelitové markery jsou složené z mnohokrát se opakujících krátkých motivů nukleotidů zpravidla 2–5 báze dlouhých (SCHMIDT, HESLOP – HARRISON 1996). Mikrosatelitové lokusy patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu, kdy je polymorfismus dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu nukleotidů. Abychom je mohli detekovat, jsou amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. Kodominantní charakter markerů SSR umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů. Mikrosatelitové markery již byly široce použity v mnoha genetických výzkumech např. pro sledování genetické diversity, analýzy toku genů, genového mapování, identifikace jedinců, určení rodičovství apod. (PFEIFFER et al. 1997; CHRISTIAKOV et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2006). U borovice lesní byly mikrosatelitové markery využity pro genetická studia např. autory BELLETTI et al. (2012), BERNHARDSSON et al. (2016), LUČIČ et al. (2014), PAZOUKI et al. (2016), SEBASTIANI et al. (2012), SCALFI et al. (2009) a SORANZO et al. (1998). Účelem zpracovávaných metodických postupů bylo vybrat vhodné polymorfní mikrosatelitové markery a optimalizovat postupy polymerázové řetězové reakce (PCR) pro získání jednotlivých reprodukovatelných amplifikátů a po statistickém zpracování velikostí alel získat genetické charakteristiky šetřených populací. Z důvodu časových a finančních úspor při provádění DNA analýz u velkých souborů vzorků byly také postupy získávání PCR produktů a odečítání jejich velikostí při fragmentační analýze zaměřeny na seskupování vybraných mikrosatelitových

lokusů do multiplexů, kdy probíhají amplifikace a fragmentační analýzy několika lokusů najednou.

S využitím vypracovaných postupů metodiky lze získat znalosti o úrovni genetické diverzity, diferenciaci, heterozygotnosti a dalších genetických charakteristik šetřených populací nebo porostů. Poznatky o genetických charakteristikách jsou významné k efektivnějšímu využívání stávajících genetických zdrojů reprodukčního materiálu pro zkvalitňování genetické struktury populací a pro zachování biodiverzity. Na základě stanovení úrovně genetické diverzity lze předpovídat průběh dalšího vývoje populací. Tato zjištění přispějí k zachování biologické rozmanitosti lesních ekosystémů a prosazování zásad trvale udržitelného obhospodařování, což je jedním z prioritních úkolů státní lesnické politiky.

Při uplatnění metodických postupů pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů, archivů klonů a směsí klonů) je cílem s využitím DNA markerů zajistit objektivní metodou jejich jasnou identifikaci. Aplikace nových kontrolních metod klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu by měla státní správě vytvořit předpoklady pro formulaci dotační politiky v oblasti podpory zachování a reprodukce genofondu lesních dřevin.

## **2 Metodické postupy**

### **a Odběr vzorků a postupy izolace DNA**

Nejvhodnější doba pro odběr rostlinného materiálu je jarní období nebo počátek léta, kdy lze odebírat pupeny nebo mladé jehlice. U starších jehlic se z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů snižuje kvalita i kvantita vyizolované DNA, což může zkomplikovat průběh navazující PCR amplifikace. Při zpracování většího počtu vzorků je výhodnější odebírat mladé jehlice, zpracování pupenů je časově náročnější. Při manipulaci se vzorky je nutná evidenční kontrola, aby nedošlo k záměně mezi vzorky. Vzorky se při odběru označí, uloží do mikrotenového sáčku a udržují při nízké teplotě (chladové tašky s namraženými destičkami) a co nejrychleji přepraví ke zpracování v laboratoři. Vzhledem k následným analýzám je důležité vzorky držet stále při nízké teplotě. DNA lze izolovat okamžitě z takto čerstvě odebraných vzorků. V případě, že izolace není provedena ihned po přijetí vzor-

ků, je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevidování, úpravy na vhodnou velikost apod.) uložit minimálně do  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Další možností jak uchovat vzorky, je jejich vysušení za pomoci lyofilizátoru a poté je vzduchotěsně uzavřít v nádobách (např. lze použít plastové falkonky, scintilační lahvičky s dobře těsnícím uzávěrem). Takto zpracovaný (lyofilizovaný) materiál je snadněji zpracovatelný při následném tření vzorků, odpadá nutnost držet homogenizované vzorky na ledu. Pro izolaci DNA u lesních dřevin se na našem pracovišti nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Touto metodou lze v krátkém časovém úseku získat kvalitní eluáty DNA. Před zahájením vlastního postupu izolace je nutné přidat etanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. V případě výskytu sraženin v pufrech AP1 a AW1 se roztoky nahřejí. Inkubační lázeň se nechá nahřívát na  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby byla připravena pro 2. krok pracovního postupu.

Protokol izolace DNA z rostlinných pletiv s použitím Dneasy Plant Mini Kitu:

1. Maximální množství výchozího čerstvého rostlinného pletiva je 100 mg, v případě lyofilizovaného pletiva 20 mg. Rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na prášek, například použitím tekutého dusíku aplikovaného na rostlinný materiál v třecích miskách. Rozdrcený materiál se přenese do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrcenému vzorku se napipetuje 400 ml pufru AP1 a následně 4 ml RnázzyA, pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se nechá inkubovat 10 minut při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , během inkubace se musí směs promíchávat 2 – 3× převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130 ml pufru P3, krátce se promíchá pomocí vortexu a inkubuje 5 minut na ledu a poté centrifuguje 5 minut při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
4. Vzniklý lyzát se přepipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm.
5. Přefiltrovaná frakce se s odečtením získaného objemu přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Dáváme pozor, abychom nenabrali případný pelet.
6. Přidáme pufr AW1 v množství odpovídajícímu 1,5násobku objemu odebrané frakce a ihned opakovaným nasáváním a vypouštěním z mikropipety vzniklou směs promícháme.

7. Odpipetujeme 650 ml směsi a přemístíme do Dneasy Mini spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.
8. Dneasy Mini spin kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 ml pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
9. Přidáme dalších 500 ml pufru AW2 a centrifugujeme 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm. Poté vyndáme opatrně Dneasy Mini spin kolonku ze zkumavky, abychom se nedotkli proteklé kapaliny.
10. Přeneseme Dneasy Mini spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Přidáme 100 ml AE pufru, který aplikujeme přímo na membránu Dneasy Mini spin kolonky. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 minutu při rychlosti 8 000 rpm.
12. Opakujeme krok dle bodu 10 a 11 pro získání druhého eluátu.

#### Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, chladicí blok na mikrozkumavky (- 20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, sterilní mikrozkumavky Eppendorf 1,5 ml s víčky, sušička nebo sterilizátor

U vyzolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/μl a čistotu (na základě poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm) přístrojem Nanophotometer (Implen). Koncentrace DNA se pohybovaly v rozmezí 20–80 ng/μl z mladých jehlic, z pupenů byly dosaženy hodnoty i nad 300 ng/μl. Hodnoty optimální čistoty by se měly pohybovat v rozmezí 1,7–1,9, nižší nebo vyšší hodnoty indikují přítomnost dalších látek (proteinů, fenolických látek). Čistota a koncentrace eluátů DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. Vzorky DNA s vyšší koncentrací byly pro PCR reakce naředěny na hodnotu cca 20 ng/μl.

## b Postupy PCR amplifikace

Pro DNA analýzy byla zvolena metoda nuclear simple sequence repeats (nSSR) – jaderné mikrosatelity. Z testovaných mikrosatelitových markerů bylo vybráno 14 polymorfních mikrosatelitových lokusů psyl2, psyl16, psyl17, psyl36, psyl42, psyl57 z publikace SEBASTIANI et al. (2012), SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5 z publikace SORANZO et al. (1998), PtTX 3032, PtTX 3107, PtTX 3116, PtTX 4001, PtTX 4011 z publikace BELLETTI et al. (2012), viz Tab. 1. Pro získání amplifikačních produktů těchto lokusů byly optimalizovány reakční směsi a teplotní cykly polymerázové řetězové reakce (PCR) a vypracovány protokoly. PCR s vybranými lokusy byly sestaveny do tří multiplexů (I, II, III) kromě lokusu PtTX 3116, jehož amplifikace musí pro specifické podmínky PCR probíhat odděleně a až fragmentační analýzu na genetickém analyzátoru lze provést společně s amplifikovanými lokusy multiplexu III. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo na namražené chladové destičce, DNA polymerázu je nutné stále uchovávat při -20 °C, dáváme ji proto do směsi nakonec přímo z mrazicího boxu.

**Tab. 1:** Vybrané mikrosatelitové lokusy a sekvence primerů

Lokusy	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
psyl2	F: TTG CTT TTG CAG AAC ATT CG R: GTC CTG CAG GCAATC AAAAT	195–207
psyl16	F: GCT CTG CCC ATG CTA TCA CT R: TGA TGC TAC CCAATG AGG TG	195–207
psyl17	F: TGG TCT GCA AAT CAA TCG AA R: GGG TAG GAA TGC AAG TTA GGC	217–235
psyl36	F: TAT CAT CGA GAG CCC CAA AA R: GAA AGG CGA AAG CAA AAG TG	225–258
psyl42	F: CAA CTT CAG CCT TGC AAC AA R: CGA CTT CAT TTG GAA CAC CA	165–175
psyl57	F: CCC CAC ATC TCT ACA GTC CAA R: TGC TCT TGG ATT TGT TGC TG	183–204
SPAG 7.14	F: TTC GTA GGA CTA AAAATG TGT G R: CAAAGT GGA TTT TGA CCG	174–236
SPAC 11.4	F: CTT CAC AGG ACT GAT GTT CA R: TTA CAG CGG TTG GTAAT G	121–165
SPAC 12.5	F: CTT CTT CAC TAG TTT CCT TTG G R: TTG GTT ATA GGC ATA GAT TGC	120–192
PtTX 3032	F: CTG CCA CAC TAC CAA CC R: AAC ATT AAG ATC TCA TTT CAA	307–506

PtTX 3107	F: AAA CAA GCC CAC ATC GTC AAT C R: TCC CCT GGA TCT GAG GA	150–198
PtTX 3116	F: CCT CCC AAA GCC TAA AGA AT R: CAT ACA AGG CCT TAT CTT ACA GAA	115–274
PtTX 4001	F: CTA TTT GAG TTAAGAAGG GAG TC R: CTG TGG GTA GCA TCA TC	195–231
PtTX 4011	F: GGT AAC ATT GGG AAAACA CTC A R: TTA ACC ATC TAT GCC AAT CAC TT	255–279

1. Multiplex I: lokusy psyl2, psyl16, psyl17, psyl36, SPAC 11.4
2. Multiplex II: lokusy psyl42, psyl57, SPAC 12.5, SPAG 7.14
3. Multiplex III: lokusy PtTX 3032, PtTX 3107, PtTX 4001, PtTX 4011
4. Lokus PtTX 3116 specifická PCR

#### Protokoly PCR:

1. Multiplex I (názvy SSR lokusů, koncentrace jejich primerů a fluorescenční označení forward primerů):
  - psyl2 – (forward), 2  $\mu$ M, 6FAM
  - psyl2 – (revers), 2  $\mu$ M
  - psyl16 – (forward), 2  $\mu$ M, NED
  - psyl16 – (revers), 2  $\mu$ M
  - psyl17 – (forward), 2  $\mu$ M, PET
  - psyl17 – (revers), 2  $\mu$ M
  - psyl36 – (forward), 2  $\mu$ M, VIC
  - psyl36 – (revers), 2  $\mu$ M
  - SPAC 11.4 – (forward), 2  $\mu$ M, PET
  - SPAC 11.4 – (revers), 2  $\mu$ M

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100  $\mu$ M koncentrace (100 pmol/ $\mu$ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100  $\mu$ l, napipetujeme ze zásobních 100  $\mu$ M roztoků

primerů: psyl2 F – 2 µl, psyl2 R – 2 µl, psyl16 F – 2 µl, psyl16 R – 2 µl, psyl17 F – 2 µl, psyl17 R – 2 µl, psyl36 F – 2 µl, psyl36 R – 2 µl, SPAC 11.4 F – 2 µl, SPAC 11.4 R – 2 µl a doplníme 80 µl TE pufru).

Příprava TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA): 10 ml roztoku připravíme z 10 µl 1M Tris – HCl a 0,2 µl 0,5M EDTA, doplníme H<sub>2</sub>O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich) do 10 ml.

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) s reakční směsí v celkovém objemu 15 µl na 1 vzorek

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,6 µl
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,3 µl
Primers mix	0,75 µl
Polymerase Platinum Taq	0,075 µl
H <sub>2</sub> O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,775 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 x PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou )

### Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	3 min	Počáteční denaturace
35 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	55 °C	45 sec	Annealing
4.	72 °C	45 sec	Elongace
1 x			
5.	72 °C	20 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

2. Multiplex II (názvy SSR lokusů, koncentrace jejich primerů a fluorescenční označení forward primerů):

psyl42 – (forward), 2  $\mu$ M, VIC

psyl42 – (revers), 2  $\mu$ M

psyl57 – (forward), 2  $\mu$ M, NED

psyl57 – (revers), 2  $\mu$ M

SPAC 12.5 – (forward), 2  $\mu$ M, 6FAM

SPAC 12.5 – (revers), 2  $\mu$ M

SPAG 7.14 – (forward), 2  $\mu$ M, PET

SPAG 7.14 – (revers), 2  $\mu$ M

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100  $\mu$ M koncentrace (100 pmol/ $\mu$ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris - HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100  $\mu$ l, napipetujeme ze zásobních 100  $\mu$ M roztoků primerů: psyl42 F – 2  $\mu$ l, psyl42 R – 2  $\mu$ l, psyl57 F – 2  $\mu$ l, psyl57 R – 2  $\mu$ l, SPAC 12.5 F – 2  $\mu$ l, SPAC 12.5 R – 2  $\mu$ l, SPAG 7.14 F – 2  $\mu$ l, SPAG 7.14 R – 2  $\mu$ l a doplníme 84  $\mu$ l TE pufru).

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) s reakční směsí v celkovém objemu 15  $\mu$ l na 1 vzorek

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 $\mu$ l
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,6 $\mu$ l
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,1 $\mu$ l
Primers mix	0,375 $\mu$ l
Polymerase Platinum Taq	0,075 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	11,35 $\mu$ l
Přidat 1 $\mu$ l templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 x PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou )



## Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	3 min	Počáteční denaturace
35 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	59 °C	45 sec	Annealing
4.	72 °C	45 sec	Elongace
1 x			
5.	72 °C	20 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

3. Multiplex III (názvy SSR lokusů, koncentrace jejich primerů a fluorescenční označení forward primerů):

PtTX 3032 – (forward), 4  $\mu$ M, NED

PtTX 3032 – (revers), 4  $\mu$ M

PtTX 3107 – (forward), 2  $\mu$ M, NED

PtTX 3107 – (revers), 2  $\mu$ M

PtTX 4001 – (forward), 2  $\mu$ M, VIC

PtTX 4001 – (revers), 2  $\mu$ M

PtTX 4011 – (forward), 2  $\mu$ M, 6FAM

PtTX 4011 – (revers), 2  $\mu$ M

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100  $\mu$ M koncentrace (100 pmol/ $\mu$ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100  $\mu$ l, napipetujeme ze zásobních 100  $\mu$ M roztoků primerů: PtTX 3032 F – 4  $\mu$ l, PtTX 3032 R – 4  $\mu$ l, PtTX 3107 F – 2  $\mu$ l, PtTX 3107 R – 2  $\mu$ l, PtTX 4001 F – 2  $\mu$ l, PtTX 4001 R – 2  $\mu$ l, PtTX 4011 F – 2  $\mu$ l, PtTX 4011 R – 2  $\mu$ l a doplníme 80  $\mu$ l TE pufru).

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) s reakční směsí v celkovém objemu 15 µl na 1 vzorek

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 µl
50mM MgCl <sub>2</sub>	0,6 µl
10mM dNTPs (2,5mM each)	0,1 µl
Primers mix	0,375 µl
Polymerase Platinum Taq	0,075 µl
H <sub>2</sub> O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	11,35 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 x PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou )

#### Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	3 min	Počáteční denaturace
30 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	95 °C	45 sec	Denaturace
3.	57 °C	30 sec	Annealing
4.	72 °C	45 sec	Elongace
1 x			
5.	72 °C	20 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Lokus PtTX 3116

PtTX 3116 – (forward), 1 µM, PET

PtTX 3116 – (revers), 1 µM

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 µM koncentrace (100 pmol/µl) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme roztok z forward a revers primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 µl, napipetujeme ze zásob-

ních 100  $\mu\text{M}$  roztoků primerů: PtTX 3116 F – 1  $\mu\text{l}$ , PtTX 3116 R – 1  $\mu\text{l}$  a doplníme 98  $\mu\text{l}$  TE pufru).

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 $\mu\text{l}$
50 mM $\text{MgCl}_2$	0,6 $\mu\text{l}$
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,1 $\mu\text{l}$
Primers mix	0,375 $\mu\text{l}$
Polymerase Platinum Taq	0,075 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$ (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	11,35 $\mu\text{l}$
Přidat 1 $\mu\text{l}$ templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 x PCR Buffer minus Mg, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , jsou dodány výrobcem společně s polymerázou )

### Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	5 min	Počáteční denaturace
20 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	60 sec	Denaturace
3.	55 °C (-0,5 °C/ 1 cyklus)	30 sec	Annealing
4.	72 °C	60 sec	Elongace
20 x opakovat od 5. do 7. kroku			
5.	94 °C	60 sec	Denaturace
6.	55 °C	60 sec	Annealing
7.	72 °C	60 sec	Elongace
1 x			
8.	72 °C	20 min	Finální elongace
9.	4 °C	úložná teplota	Chlazení amplifikátů

### Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, sterilní mikrozkrumavky (stripy, destičky PCR 0,2 ml s víčkem), box chladicí na PCR mikrozkrumavky, chladicí destička, centrifuga, teplotní cyklovač

## c Postupy elektroforézy v agarózovém gelu

Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů se provádí pomocí horizontální elektroforézy na 2% agarózových gelech. Agaróza (Agarose SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) se rozpouští zahříváním v 0,5 x TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k překypění roztoku. K vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se používá fluorescenční barvivo GelRed (GelRed™ Nucleic acid Gel Stain, 10,000X in Water, Biotium, Hayward). GelRed se přidává do zahřátého agarózového roztoku v poměru 1:10 000. Po ztuhnutí gelu se přilije do vany pro elektroforézu 0,5 x TBE pufr tak, aby přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se nanáší PCR amplifikáty (15 µl) smíchané s 4 µl pufru (gel loading buffer, Sigma – Aldrich). Pro možnost zjištění orientačních velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1 µl standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4 µl destilované vody a 2 µl pufru (gel loading buffer).

V elektrickém poli se pohybují záporné fragmenty DNA ke kladné elektrodě, jejich migrační schopnost závisí na jejich relativní hmotnosti (velikosti amplifikátu). Potřebná doba trvání procesu elektroforézy je kolem 30 minut při napětí 40 V a dalších 120–150 minut při napětí 90 V. Po proběhlé elektroforéze se gely dokumentují pod UV zářením pomocí kamerového systému. DNA fragmenty se v gelovém nosiči projevují jako fluoreskující proužky.

### Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrovlnná trouba, vortex, horizontální elektroforéza se zdrojem, dokumentační systém s UV transluminátorem, temnou komorou (Darkroom), snímací kamerou a softwarem pro zobrazení gelů

## **d Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů**

Přesné zjištění velikostí amplifikovaných fragmentů v hodnotách párů bází se provádí na genetickém analyzátoru (např. typu Applied Biosystem 3500). Polymerázová řetězová reakce musí být provedena s fluorescenčně označenými primery (pro uvedený typ analyzátoru na 5' konci s modifikacemi 6FAM, VIC, NED, PET). PCR amplifikáty (většinou postačuje 1  $\mu$ l) se nanáší do 96 jamkových destiček pro sekvenátory a před fragmentační analýzou jsou denaturovány. Ke každému vzorku se přidá krátce promíchaná (pomocí vortexu) směs formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystem) o objemu 11  $\mu$ l na jeden vzorek a velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ' Size standard v 2.0, Applied Biosystem) – 0,4  $\mu$ l na jeden vzorek. Destička se krátce stočí na centrifuze a provede se inkubace 4 minuty při teplotě 94 °C, pak následuje prudké zchlazení na ledu po dobu minimálně dvou minut.

Genetický analyzátor pracuje na principu elektroforetického rozdělení fragmentů DNA v tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Polymer i zkoumaný vzorek je do kapiláry naplňován automaticky. Detekce fragmentovaných úseků je založena na hodnocení fluorescence z fluorescenčně označených primerů po excitaci laserem. Přístroj je schopen souběžně detekovat vícebarevnou fluorescenci, což umožňuje v multiplexovém uspořádání hodnotit najednou více markerů. Hodnocení velikosti se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems), který z výsledku měření velikostního standardu, jenž je přidáván ke každému vzorku, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů.

Fragmentační analýzy vybraných lokusů probíhají ve třech multiplexech dle jejich seskupení pro PCR amplifikace. Amplifikační produkt lokusu PtTX 3116 každého příslušného vzorku se přidá k amplifikátům multiplexu III. Od každého vzorku se směs PCR produktů příslušného multiplexu pipetuje do jamek sekvenáčnických destiček po 1  $\mu$ l. K multiplexu III se ještě přidá 1  $\mu$ l amplifikačního produktu lokusu PtTX 3116 a fragmentační analýza lokusů PtTX 3032, PtTX 3107, PtTX 4001, PtTX 4011 a PtTX 3116 probíhá zároveň v jednom běhu.

### Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, vortex, teplotní cyklovač, centrifuga, genetický analyzátor

## e Zpracování molekulárních dat

Borovice lesní má diploidní sadu chromozomů ( $2n = 24$ ) (SLAVÍK, HEJNÝ 1988). U sledovaného lokusu získáme pro každého jedince dvě stejné hodnoty alel v případě homozygota nebo v případě heterozygota dvě různé hodnoty alel. Pro získání genetických charakteristik se velikosti alel z hodnocených lokusů pro sledované populace statisticky zpracovávají (např. za využití statistických programů GenALEX 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007), GENPOP 4.0 (ROUSSET 2008). Pro identifikaci a opravu genotypových chyb v mikrosatelitových datech lze využít software Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004).

Na základě získaných genetických charakteristik lze u populací hodnotit a porovnávat úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, genetické diference mezi populacemi, heterozygotnost apod. Jedna z nejvýznamnějších genetických charakteristik je ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi, které lze vypočítat na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972).

V případě ověřování klonové identity se porovnávají hodnoty alel sledovaných lokusů u jedinců (ramet) příslušných klonů na základě vypracované genotypizace – přehled hodnot alel zvolených lokusů pro šetřené klony. Deklarovaná příslušnost jedince ke klonu je ověřená, pokud jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů.

### III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost pro získání genetických charakteristik populací borovice lesní a hodnocení identity klonů spočívá v inovaci metodických postupů analýz polymorfních SSR markerů i z hlediska jejich seskupení do multiplexů z důvodu ekonomických i časových úspor při zpracování velkého počtu vzorků a dále v přesném odečtení velikostí alel mikrosatelitových markerů po proběhlé fragmentační analýze na kapilárním genetickém analyzátoru (např. Applied Biosystem 3500). Výstupem je zpracovaná databáze velikostí alel vybraných mikrosatelitových markerů k testovaným jedincům borovice lesní. Do současné doby nebyly komplexní informace o genetické diverzitě významných populací borovice lesní na základě analýz DNA s využitím mikrosatelitových lokusů zpracovány. Popsané metodické postupy byly ověřeny a využity pro získání genetických charakteristik u 13 vybraných populací reprezentujících přirozené zastoupení borovice lesní na území ČR a také byly uplatněny pro klonovou identifikaci u semenného sadu s borovicí lesní (ev. č. CZ-3-3-BO-100-30-2-B, ŠLP Křtiny, Bílovice nad Svitavou).

Získané poznatky o proměnlivosti porostů borovice lesní vycházely v minulosti převážně z hodnocení provenienčních ploch pomocí fenotypového šetření. V případě semenných sadů dosavadní systém kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu spočíval pouze v dokumentační evidenci, kdy případný omyl nebylo možné zjistit. Objektivní kontrola klonové identity spočívá v přímé analýze genomů jedinců, s využitím DNA markerů, jejichž složení je zděděné a je nezávislé na podmínkách prostředí. Výstupem těchto analýz je zpracovaná genotypizace, což představuje databázi velikostí alel hodnocených lokusů příslušných klonů. Příslušnost jedince ke klonu odpovídá, když se hodnoty alel shodují u všech analyzovaných lokusů. Pro získání informací o genetické proměnlivosti ze zkoumaných vzorků bylo potřebné vyhledat DNA markery, které vykazují vysoký polymorfismus. Mezi nejvariabilnější oblasti genomu patří mikrosatelitové lokusy, které se liší v počtu opakování základního motivu. S využitím automatického sekvenátoru získáme vynikající rozlišení alel, například lze zjistit i rozdílnou velikost amplifikačního produktu o jednu repetici motivu (u dinukleotidových motivů jen o 2 báze). Bylo vybráno 14 jaderných mikrosatelitů psyl2, psyl16, psyl17, psyl36, psyl42, psyl57, SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5, PtTX 3032, PtTX 3107, PtTX 3116, PtTX 4001, PtTX 4011, u kterých byly postupy DNA analýz optimalizovány i pro sestavení do multiplexů. Amplifikace a navazující fragmentační analýzy v multiplexech představují velkou časovou a finanční úsporu.

## **IV POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY**

Vypracovanou metodiku lze uplatnit pro získávání podrobnějších poznatků o genetických charakteristikách populací borovice lesní, jako jsou např. genetická diverzita, heterozygotnost, diferenciacie, genetické vzdálenosti. Poznatky o genetické struktuře zdrojů reprodukčního materiálu jsou významným zdrojem informací pro management správných postupů při zalesňování. Další významné uplatnění předkládané metodiky je pro ověřování příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu). Vypracované metodické postupy ověřování klonové identity na základě objektivních analýz DNA se uplatní např. při procesu uznávání semenných sadů dle pravidel Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin.

Pro vypracování a ověření metodiky byli využiti dospělí jedinci borovice lesní ze 13 populací, rostoucí převážně v genových základnách nebo na chráněných území a roubovanci ze semenného sadu borovice lesní nacházejícího se v polesí Bílovice nad Svitavou, ŠLP Křtiny.

Předpověď dalšího vývoje populací a jejich zachování je uskutečnitelná především na základě zjištění genetické struktury. Genetická rozmanitost populací je podstatná pro přežití jejich zástupců a přizpůsobení se změnám životních podmínek na stanovišti. Znalost úrovně genetické diverzity, diferenciacie, heterozygotnosti a ostatních genetických charakteristik populací, které se využívají nebo plánují využívat jako zdroj reprodukčního materiálu, je významná k efektivnějšímu využívání stávajících genetických zdrojů pro zkvalitňování genetické struktury populací a k zachování biodiverzity. Povinnost zachovávat a reprodukovat genetické zdroje lesních dřevin vyplývá mimo jiné z mezinárodních závazků ČR, přijetí Úmluvy o biologické rozmanitosti dne 5. června 1992 v Rio de Janeiru a naplnění závěrů ministerských konferencí o ochraně lesů Forest Europe (Štrasburk 1990, Helsinky 1993, Lisabon 1998, Vídeň 2003, Varšava 2007, Oslo 2011 a Madrid 2015). Ochrana biologické rozmanitosti představuje také naplnění cílů aktualizované Státní politiky životního prostředí České republiky 2012-2020 schválené usnesením vlády č. 6 ze dne 9. ledna 2013 a Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky schválené usnesením vlády ČR č. 193 ze dne 9. března 2016. Znalosti o genetických charakteristikách by bylo účelné uplatňovat také z důvodu převažující umělé obnovy lesa, kdy je zajištění kvality zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin základním předpokladem pro budoucí výnos, adaptační schopnosti a ekologickou stabilitu lesa. Důležitý je genetický průzkum i z hlediska lokalizací populací a získané poznatky by měly být zohledňovány při stanovování pravidel přenosu



reprodukčního materiálu. Předložené metodické postupy nacházejí také uplatnění v rámci uznávání zdrojů reprodukčního materiálu a jejich zařazování do Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin včetně zařazování vzorků z těchto zdrojů do Národní banky osiva a explantátů lesních dřevin, kdy lze především na základě míry genetické diverzity rozhodnout, které populace (porosty) zařadit jako cenné zdroje. Další možné využití znalostí o genetické struktuře populací (porostů) je při vyhlásování nebo revizi genových základů nebo jako podkladů pro aktualizaci Oblastních plánů rozvoje lesů.

Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat. Vybrané lokusy prokázaly dostatečný polymorfismus pro zjištění genetických rozdílů mezi jedinci, populacemi a klony. V příloze (Obr.1 až 3 a Tab. 3 až 7) jsou uvedeny příklady výstupů genetických charakteristik šetřených populací borovice lesní. Reprodukovatelnost této metody potvrzují shodné výsledky při opakovaných analýzách sledovaných lokusů a zkušenosti i jiných laboratoří, např. ASP - Bavarian Office for Forest Seeding and Planting Teisendorf, Institute of Biosciences and BioResources National Research Council Florencie, BFW Department of Genetics molecular laboratory Vídeň, Genetics Department Institute of Experimental Biology, Faculty of Natural Science, Kazimierz Wielki University, Bydgoszcz při využití metody analýzy mikrosatelitů. Možnosti uplatnění těchto postupů v dalších laboratořích může komplikovat finanční náročnost přístrojového vybavení pro fragmentační analýzy, zejména genetického analyzátoru. Fragmentační analýzy si však lze objednat na zakázku u komerčních firem (např. SEQme, Genomac, Amplicon).

Genetické ověření deklarovaného původu reprodukčního materiálu u semenného sadu pomocí 14 vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů umožňuje potvrdit nebo vyvrátit klonovou identitu ramet. Pro každý deklarovaný klon musí být analyzován soubor lokusů a odečteny hodnoty alel k jednotlivým lokusům. Kontrola příslušnosti spočívá v provedení analýz zkoumaných vzorků stejným postupem a porovnání velikosti alel. V tabulce 2 je ukázka zpracované genotypizace pro 5 jedinců od klonů 17 a 19 ze semenného sadu s borovicí lesní (CZ-3-3-BO-100-30-2-B, ŠLP Křtiny, Bílovice nad Svitavou), přičemž klonovou identitu prokazuje klon 17. Jedinci deklarovaní ke klonu 19 nevykazují klonovou identitu (rameta BO\_SS\_19\_4 má v lokusech psyl42, psyl57, SPAC 12.5, PtTX 3116 odlišné velikosti alel).

**Tab. 2:** Ukázka zpracované genotypizace

Lokusy/ramety	psyl17		psyl16		psyl12		psyl42		psyl57		SPAC12.5		PtTX 3116	
BO_SS_17_1	223	223	201	201	207	207	171	171	195	198	144	168	160	172
BO_SS_17_2	223	223	201	201	207	207	171	171	195	198	144	168	160	172
BO_SS_17_3	223	223	201	201	207	207	171	171	195	198	144	168	160	172
BO_SS_17_4	223	223	201	201	207	207	171	171	195	198	144	168	160	172
BO_SS_17_5	223	223	201	201	207	207	171	171	195	198	144	168	160	172
BO_SS_19_1	223	227	201	207	207	207	165	165	195	198	154	154	115	154
BO_SS_19_2	223	227	201	207	207	207	165	165	195	198	154	154	115	154
BO_SS_19_3	223	227	201	207	207	207	165	165	195	198	154	154	115	154
BO_SS_19_4	223	227	201	207	207	207	165	171	195	195	120	150	154	160
BO_SS_19_5	223	227	201	207	207	207	165	165	195	198	154	154	115	154

Metodické postupy zjišťování genetických charakteristik populací a ověřování identity klonů/ortetů pro semenné sady (popř. klonové archivy) budou sloužit pro potřeby státní správy v oblasti lesního a vodního hospodářství (MZe, MŽP) a koordinátora Národního programu (ÚHÚL), přičemž se předpokládá jejich promítnutí do legislativních předpisů a dotační politiky ČR.

## V EKONOMICKÉ ASPEKTY

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů vedoucích k poznatkům o genetické kvalitě, především diverzitě a heterozygotnosti populací nebo porostů, je přínos celospolečenský. Současně dochází i k naplňování cílů Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin – podporovat kvalitní genetické zdroje a ověřovat jejich identitu metodou DNA markerů. Reprodukce genově bohatších populací zaručuje získání stabilnějších a odolnějších porostů, které budou zvyšovat biologickou rozmanitost, lépe se přizpůsobovat možným změnám klimatu, a tím přispívat k ochraně životního prostředí. Při posuzování ekonomických aspektů nelze opomenout, že ochrana biologické rozmanitosti představuje také naplnění cílů aktualizované Státní politiky životního prostředí České republiky 2012–2020. Vedle celospolečenských přínosů se dá reálně předpokládat i zvýšení tržeb z těžby dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů borových porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu.

Borovice lesní je v našich podmínkách z hlediska svého hospodářského uplatnění důležitý druh dřeviny, neboť je po smrku druhou plošně nejrozšířenější dřevinou, která významným způsobem ovlivňuje ekonomiku řady lesních majetků všech forem vlastnictví, a tedy i celého lesního hospodářství a navazujícího dřevozpracujícího průmyslu (celého lesnicko-dřevařského sektoru).

Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že v době mýtní zralosti lesních porostů bude dosaženo současně i vyšší objemové produkce. Rozdíl porostních zásob vztažených k obmýti u borových porostů nacházejících se v současných genových základnách (GZ) oproti ostatním borovým porostům na území ČR, zjištěný na základě analýzy celostátních informací v datovém skladu, činí v objemovém vyjádření cca 123 m<sup>3</sup>/ha a jednoznačně reprezentuje lepší produkční bázi v genových základnách.

Zlepšená genetická produkční báze zvyšuje kvantitativní těžební potenciál a přispívá tím ke zvýšení ekonomické životaschopnosti a konkurenceschopnosti trvale udržitelného obhospodařování lesů, což je jeden z cílů Národního lesnického programu II (2012).

Vzhledem ke skutečnosti, že průměrná cena surového dříví v ČR, která reprezentuje cenu dřeva na pni, tj. cenu surového dříví na odvozním místě po odečtení těžebních nákladů, a která je každoročně zveřejňována ve Věstníku MZe, odráží značnou měrou i současnou dominantní pozici dřeviny smrk na trhu se surovým dřívím, nebylo v případě kalkulací u borovice metodicky zcela odůvodněné použití

této průměrné ceny surového dříví k ekonomickým výpočtům, protože by došlo k nadhodnocení výsledků. Z tohoto důvodu byla kalkulace ekonomického přínosu u borovice ze zvýšeného objemu obchodovatelného dříví konstruována na základě:

- a) dlouhodobě dosahovaného procentického podílu hlavních sortimentů surového dříví v dodávkách dříví v ČR (pilařská kulatina, vlákna, palivové dříví)
- b) současných cen surového dříví (především pilařské kulatiny)
- c) současných průměrných celostátních těžebních nákladů na těžbu a přibližování dřeva po odvozní místo.

Při dlouhodobě dosahovaném celostátním průměrném podílu sortimentů surového dříví v dodávkách jehličnatého dříví (pilařská kulatina 59 %, vlákna a ostatní průmyslové dříví 32 % a palivového dříví 9 %) a při ceně surového dříví za 2. čtvrtletí 2016 ve výši 1 656 Kč/m<sup>3</sup> za pilařskou kulatinu III. tř. jakosti A/B, 810 Kč/m<sup>3</sup> za dříví V. tř. jakosti pro výrobu buničiny a 789 Kč/m<sup>3</sup> za palivové dříví, činí zvýšené tržby z prodeje dřeva u kvalitnějších borových porostů v GZ v době obmýtní částku 161 000 Kč/ha. Tento hrubý výnos po odpočtu celkových těžebních nákladů ve výši 52 100 Kč/ha (průměrné celostátní náklady přitom činí 423 Kč/m<sup>3</sup>) pak představuje zvýšený čistý výnos ve výši 108 900 Kč/ha. Tato částka je tvořena především značným rozdílem v objemu porostních zásob v GZ oproti celostátnímu průměru porostních zásob borových porostů. Vypočtený výsledný ekonomický efekt (zvýšený čistý výnos) ze smýceného lesního porostu v době obmýtní však můžeme označit za pesimistickou variantu výpočtu. Při optimistické variantě výpočtu, pokud budeme vycházet z reálné situace na řadě lesních majetků, kdy v závislosti na kvalitě těžebního fondu lze dosáhnout i vyšších podílů pilařské kulatiny v dodávkách surového dříví než je celostátní průměr, tj. více než 60 %, a při současném použití těžebních nákladů v místě a čase obvyklých, odpovídajících nižším nákladům vztaženým jen k těžbě mýtně zralých jehličnatých porostů, by se výsledný ekonomický efekt ještě výrazněji projevil ve vyšším hospodářském výsledku (zisku) vlastníků lesa. Dále, vyšší celková objemová produkce porostů z kvalitních genetických zdrojů se neprojeví v ekonomice vlastníků lesa pouze v době obmýtní, ale již také v rámci výchovných opatření v podobě zlepšení (zvýšení) cash flows z provedených probírek, což rovněž pozitivně ovlivní ekonomickou situaci vlastníků lesa a přispěje k podpoře ekonomického pilíře trvale udržitelného hospodaření v lese.

Je nutno rovněž připomenout, že provedená kalkulace se zabývá pouze oceněním změny v kvantitativních parametrech (v objemu). Jen z důvodu současné neznalosti řady potřebných ekonomických veličin nejsou do výpočtů zařazeny také další dodatečné ekonomické efekty vyplývající z lepších kvalitativních parametrů bu-

doucích porostů, které by se projevíly např. v lepší sortimentaci těžebního fondu a v následném vyšším zpeněžení surového dříví.

Kalkulace ekonomického přínosu (tzv. „genetického zisku“) byla provedena na základě následujících informačních zdrojů:

- Analýza datového skladu ÚHÚL – DS ERMA (Pařízková, Hradec Králové, 2016)
- Lesnictví 2015, katalog produktů, dodávky jehličnatého dříví za období 2006-2015, tabulka č. 2.12, Český statistický úřad, Praha, 2016
- Indexy cen v lesnictví (surové dříví) – 2. čtvrtletí 2016, průměrné ceny surového dříví pro tuzemsko za ČR v roce 2016 (Kč/m<sup>3</sup>), tabulka 4 – vlastníci, Český statistický úřad, Praha, 2016
- Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2014, Ministerstvo zemědělství, Praha 2015, ISBN 978-80-7434-242-4

Získané výsledky výpočtů byly také porovnány s výsledky získanými jinými metodickými postupy (např. porovnáním hodnoty mytní výtěže) s využitím těchto podkladových materiálů:

- Vyhláška č. 441/2013 Sb., k provedení zákona o oceňování majetku (oceňovací vyhláška), ve znění vyhlášky č. 199/2014 Sb.
- Černý, M., Pařez, J., Malík, Z. : Růstové a taxační tabulky hlavních dřevin České republiky (smrk, borovice, buk, dub), IFER, 1996
- Vyhlášení průměrné ceny dřeva pro rok 2016 k výpočtu poplatku za odnětí lesních pozemků surového dříví (Věstník MZe, částka 2, str. 97, listopad 2015)

Náklady na postupy genetických analýz uvedených v metodice jsou kalkulovány na spotřební materiál a chemikálie s předpokladem přístrojového laboratorního vybavení pro analýzy DNA. Na izolaci DNA vzorku z jednoho stromu jsou průměrné náklady 106,- Kč. Náklady u jednoho vzorku (stromu) na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 14 lokusů 199,- Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. V uvedené kalkulaci našich nákladů (výzkumné pracoviště) nejsou zahrnuty doplňkové náklady, náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace vybavenosti (materiální i personální) pracoviště. Při využití služeb komerčních laboratoří jsme při průzkumu na tuzemském trhu zjistili výhodné cenové nabídky od firmy SEQme. Předpokládaná cena na analýzu jednoho vzorku je 242,- Kč včetně DPH a zahrnu-

je PCR amplifikaci a fragmentační analýzu jednoho multiplexu. Tato cena je kalkulována při vlastním dodání vysoce kvalitní DNA a vypracovaných metodických postupů (nebude nutno dopracovávat jakékoliv optimalizace PCR). Na postupy optimalizace PCR komerční firmy nevedou ceníky, např. firma SEQme si tyto práce účtuje hodinovou sazbou a to 1 500,- Kč bez DPH/hod. Fragmentační analýza při dodání vlastních PCR amplifikátů v destičce vychází na 72,- Kč pro jeden vzorek (z 1 stromu 1 multiplex).

## **VI DEDIKACE**

Metodika je výsledkem řešení poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0117 (č. j. 6779/2017-MZE-14151.) z 30 % a výsledkem řešení výzkumných projektů NAZV č. QJ1330240 z 70 % a č. QJ1230334 v rámci PUV.

## VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- 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.
- 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
- BUCCI G., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., VENDRAMIN G.G. 1998. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in *halepensis* complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Molecular Ecology*, 7: 1633-1643.
- CHRISTIAKOV D.A., HELLEMANS B., VOLCKAERT F.A.M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1-29.
- CREMER E., ZIEGENHAGEN B., SCHULEROWITZ K., MENGEL CH., DONGES K., BIALOZYT R., HUSSENDÖRFER E., LIEPELT S. 2012. Local seed dispersal in European silver fir (*Abies alba* Mill.): lessons learned from a seed trap experiment. *Trees*, 26: 987-996.
- 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.
- 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: 1485–1492.
- MARQUARDT P.E., EPPERSON B.K. 2004. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology*, 13: 3305-3315.
- MELNIKOVA M.N., PETROV N.B., LOMOV A.A., LA PORTA N., POLITOV D.V. 2012. Testing of Microsatellite Primers with Different populations of Eurasian Spruces *Picea abies* (L.) Karst. and *Picea obovata* Ledeb. *Russian Journal of Genetics*, 48: 562-566.

- MUSIL I., HAMERNÍK J. 2007. Jehličnaté dřeviny. [Conifers.] Praha, Academia: 352.
- NAVASCUÉS M., VAXEVANIDOU Z., GONZÁLES-MARTÍNEZ S.C., CLIMENT J., GIL L., EMERSON B.C. 2006. Chloroplast microsatellites reveal colonization and metapopulation dynamics in the Canary island pine. *Molecular Ecology*, 15: 2691-2698.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-392.
- 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.
- OLIVEIRA E.J., PÁDUA J.G., ZUCCHI M.I., VENCOVSKY R., VIEIRA M.L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294-307.
- PAULE L. 1992. Genetika a šľachtenie lesných drevín. Bratislava, Príroda: 304 s.
- 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.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2006. GENALEX 6. genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2012. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- PFEIFFER A.M., OLIVIERY A.M., MORGANTE M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40: 411-419.
- POSTOLACHE D., LEONARDUZZI C., PIOTTI A., SPANU I., ROIG A., FADY B., ROSCHANSKI A., LIEPELT S., VENDRAMIN G.G. 2014. Transcriptome versus Genomic Microsatellite Markers: Highly Informative Multiplexes for Genotyping *Abies alba* Mill. and Congeneric Species. *Plant Molecular Biology Report*, 32: 750-760.
- ROUSSET F. 2008. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.



- RUNGIS D., BÉRUBÉ Y., ZHANG J., RALPH S., RITLAND C.E., ELLIS B.E., DOUGLAS C., BOHLMANN J., RITLAND K. 2004. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1283-1294.
- 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.
- SCHMIDT T., HESLOP – HARRISON J.S. 1996. The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. *Proceedings of the National Academy of Science* 93 (16): 8761-8765.
- SCOTTI I., PAGILA G., MAGNI F., MORGANTE M. 2006. Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of Forest Science*, 63: 485-491.
- 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.
- SLAVÍK B., HEJNÝ S. (eds.) 1988. Květena České republiky 1. Academia, Praha.
- SORANZO N., PROVAN J., POWELL W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 7: 1247-1263.
- SVOBODA P. 1953. Lesní dřeviny a jejich porosty. Část I. Praha, Státní zemědělské nakladatelství: 412 s.
- ÚRADNÍČEK 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*, 4: 535-538.
- WANG Y., LUO J., XUE X., KORPELAINEN H., LI C. 2005. Diversity of microsatellite markers in the populations of *Picea asperata* originating from the Mountains of China. *Plant Science*, 168: 707-714.

## VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J., MALÁ J.: Sledování genetické proměnlivosti chlumního ekotypu smrku ztepilého pomocí RAPD (Studying of genetic variability of Norway spruce hurst ecotype by RAPD). Zprávy lesnického výzkumu, 56, 2011(2): 137-143.

(Dedikace: výzkumný záměr č. MZE0002070203 a výzkumný projekt NAZV č. QH82303)

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J., MALÁ J.: Hodnocení genetické diversity vybraných populací smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů (Assessment of genetic diversity of selected populations of Norway spruce by microsatellite markers). Zprávy lesnického výzkumu, 58, 2013 (3): 248-252.

(Dedikace: výzkumný záměr č. MZE0002070203 a výzkumný projekt NAZV č. QJ 1230334)

MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J.: Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého (Evaluation of Norway spruce seed orchard using microsatellite markers). Zprávy lesnického výzkumu, 59, 2014 (4): 243-249.

(Dedikace: institucionální podpora č. RO0114 (č.j. 8653/2014- MZE-17011) a výzkumný projekt NAZV č. QJ 1330240)

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., MALÁ J.: Use of nuclear microsatellite loci for evaluating genetic diversity among selected populations of *Abies alba* Mill. in the Czech Republic. Journal of Forest Science, 61, 2015 (8): 345-351.

(Dedikace: institucionální podpora č. RO0115 (č.j. 5774/2015-MZE-17011), výzkumný projekt NAZV č. QJ 1230334 a Trees4Future Project no. 284181)

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P.: Genetická charakterizace jedle bělokore pomocí mikrosatelitových markerů. Lesnický průvodce, 2016, 5: 34 s.

(Dedikace: institucionální podpora č. RO0116 (č.j. 10462/2016-MZE-17011), výzkumný projekt NAZV č. QJ 1230334, výzkumný projekt NAZV č. QJ 1330240)

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E.: Studium variability populací buku lesního pomocí mikrosatelitových markerů. Lesnický průvodce, 2016, 8: 35 s.

(Dedikace: institucionální podpora č. RO0116 (č.j. 10462/2016-MZE-17011), výzkumný projekt NAZV č. QJ 1230334)

- ČÁP J., FULÍN M., NOVOTNÝ P., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O., POLÁKOVÁ L., DOSTÁL J., FRÝDL J.: Genetická charakterizace významných regionálních populací borovice lesní v České republice. Lesnický průvodce, 2016, 19: 41 s.  
(Dedikace: institucionální podpora č. RO0116 (č.j. 10462/2016-MZE-17011), výzkumný projekt NAZV č. QJ 1230334, výzkumný projekt NAZV č. QJ 1330240, výzkumný projekt COST LD14110)
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O.: Genetická variabilita vybraných populací borovice lesní v České republice (Genetic variability of selected populations of Scots pine in the Czech Republic). Zprávy lesnického výzkumu, 61, 2016 (3): 223-229.  
(Dedikace: výzkumný projekt COST LD14110)
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O.: Evaluation of the genetic diversity of selected *Fagus sylvatica* L. populations in the Czech Republic using nuclear microsatellites. Journal of Forest Science, 63, 2017 (2): 53-61.  
(Dedikace: institucionální podpora č. RO0116 (č.j. 10462/2016-MZE-17011), výzkumný projekt NAZV č. QJ 1230334)

# EVALUATION OF THE GENETIC CHARACTERISTICS IN SCOTS PINE USING MICROSATELLITE MARKERS

## *Summary*

*Pinus sylvestris* L. is one of the most widespread European conifer tree belonging to the family Pinaceae. Its natural range extends from the Arctic Circle in Scandinavia down to central Spain and central Italy and from western Scotland to eastern Siberia (BELLETTI et al. 2012). On the territory of the Czech Republic, Scots pine originally grew naturally only on the small islands in the forest area of the uplands, in the lower mountains on the extreme rocky and debris stands, and in the lowest positions it was admixed in the oak forests on the sandy or shallow dry soils. In our country it is the most important coniferous species after Norway spruce. The Scots pine is undemanding on soil conditions, so it grows well on extreme stations where other tree species are not successful. The extension of pine forests has significantly started by artificial planting since the mid-19th century. The new pine stands were planted from imported seeds of different regions and also large share was from abroad. The culture sorts were formed by gradual hybridization with native Scots pine and due to local climatic conditions and agriculture interferences (SVOBODA 1953).

In order to verify the genetic quality of pine populations it is important to acquire more detailed knowledge about the dynamics of genetic diversity within and among populations. A high level of variability is essential to supply adaptability populations so knowledge on genetic structure is very important for the maintenance of ecological stability of forests and for the conservation and management of genetic resources.

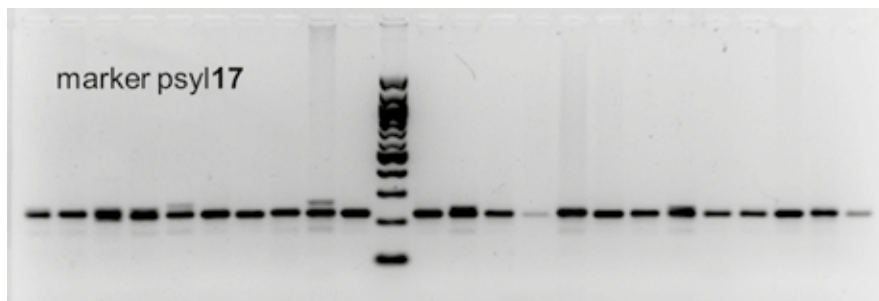
This methodology presents the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for genetic characterization and clonal identification of *Pinus sylvestris* L. Nuclear microsatellites are highly polymorphic, selectively neutral and codominant markers that enable to differentiate homozygotes from heterozygotes. Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSR) are small repetitive DNA sequences, that are highly variable markers and commonly used in population genetic studies for gene flow analyses, parentage analyses, studies of genetic diversity, gene mapping and for individual identification (PFEIFFER et al. 1997; CHRISTIAKOV et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2006). They were used for genetic studies of several conifer species, e.g. *Picea abies* (RUNGIS et al. 2004; SCOTTI et al. 2006; MELNIKOVA et al. 2012), *Picea asperata* (WANG et al. 2005), *Pinus brutia* and *Pinus eldarica* (BUCCI et al. 1998),

*Pinus canariensis* (NAVASCUÉS et al. 2006), *Pinus strobus* (MARQUARDTR, EPPERSON 2004), *Abies alba* (CREMER et al. 2012; POSTOLACHE et al. 2014) including *Pinus sylvestris* (SCALFI et al. 2009; BELLETTI et al. 2012; LUČIČ et al. 2014; NOWAKOWSKA et al. 2014; BERNHARDSSON et al. 2016; PAZOUKI et al. 2016).

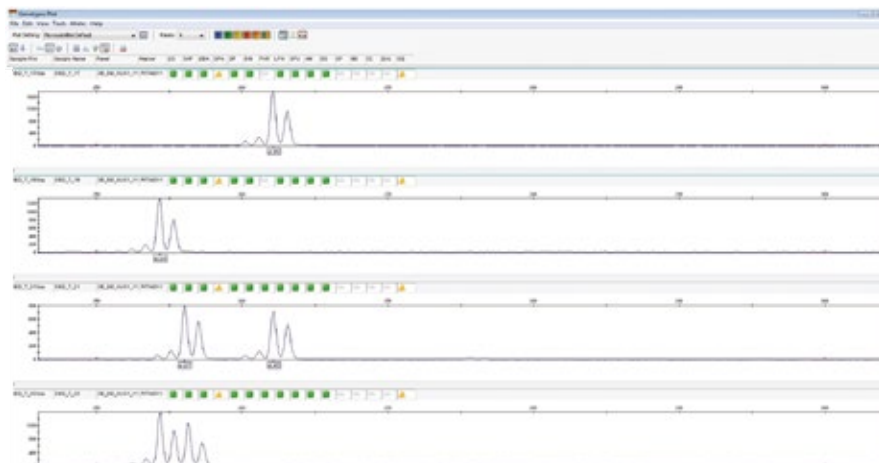
This methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products and calculations of molecular data. Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) from 100 mg fresh needles or 20 mg lyophilized needles. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR was optimized with the tested primers, whose oligonucleotide sequences had been published by SORANZO et al. (1998), BELLETTI et al. (2012), SEBASTIANI et al. (2012). Thirteen important populations and the seed orchard of Scots pine were used to develop this methodology. Clear, reproducible PCR products were produced for all fourteen microsatellite loci, so they proved suitable for finding genetic parameters and verifying the clonal identity. The identified loci were verified as highly polymorphic and could be used as DNA markers for the next Scots pine populations and for verifying the clonal identity of this species.

# Příloha

## Příklady výstupů genetických charakteristik šetřených populací borovice lesní



**Obr. 1:** Příklad PCR amplifikátů na gelovém nosiči získaných s primery k lokusu psyl17



**Obr. 2:** Příklad fragmentační analýzy (záznam z genetického analyzátoru, různé velikosti alel lokusu PtTX 4011 u čtyř jedinců borovice lesní)

**Tab. 3:** Genetické charakteristiky vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů z 389 sledovaných vzorků borovice lesní

Lokusy	Velikost PCR produktů (bp)	Na	I	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>
psyl2	195–207	5	0,50	0,29	0,29
psyl16	195–207	7	1,56	0,46	0,76
psyl17	217–235	9	1,53	0,61	0,76
psyl36	225–258	8	0,52	0,26	0,25
psyl42	165–175	6	1,20	0,66	0,65
psyl57	144–204	10	1,19	0,60	0,60
SPAG 7.14	174–236	32	2,86	0,69	0,93
SPAC 11.4	121–165	19	2,11	0,80	0,84
SPAC 12.5	120–264	36	2,75	0,85	0,92
PtTX 3032	307–506	91	3,22	0,87	0,95
PtTX 3107	150–198	11	1,61	0,47	0,76
PtTX 3116	115–274	31	2,03	0,83	0,81
PtTX 4001	195–231	17	1,61	0,70	0,70
PtTX 4011	225–279	8	1,23	0,47	0,62

Na počet rozdílných alel v lokusech všech sledovaných vzorků borovice lesní

I Shannonův informační index – zhodnocení genetické diverzity jednotlivých lokusů

H<sub>o</sub> průměrné hodnoty pozorované heterozygotnosti pro jednotlivé lokusy ze všech sledovaných vzorků

H<sub>e</sub> průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti pro jednotlivé lokusy ze všech sledovaných vzorků

**Tab. 4:** Počet rozdílných alel u populací borovice lesní v jednotlivých lokusech

Populace	psy 2	psy 16	psy 17	psy 36	psy 42	psy 57	SPAG 7.14	SPAC 11.4	SPAC 12.5	PITX 3032	PITX 3107	PITX 3116	PITX 4001	PITX 4011
BO01	3	5	5	6	4	6	23	11	19	28	6	14	7	6
BO02	3	6	6	6	5	6	23	12	19	27	8	10	12	6
BO03	3	7	6	4	5	6	22	10	20	30	7	12	10	6
BO04	3	6	6	5	4	5	21	14	19	29	6	9	9	6
BO05	3	5	5	4	5	5	24	11	20	28	6	15	11	7
BO06	4	6	6	2	5	6	23	11	25	31	5	11	12	5
BO07	3	6	7	3	4	5	25	12	22	33	6	17	10	5
BO08	3	6	5	4	4	5	20	14	20	32	8	15	9	5
BO09	2	6	5	3	4	5	21	9	21	34	7	18	8	5
BO-H	2	6	7	4	5	5	20	14	20	34	7	14	11	5
BO-KL1	3	6	5	4	4	5	18	13	19	26	7	12	13	6
BO-KL2	2	6	5	3	4	5	19	14	19	28	6	15	9	5
BO-S	3	6	5	3	4	5	19	16	21	33	7	14	9	5



**Tab. 5:** Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro sledované populace

Populace/ Charakteristiky	BO01	BO02	BO03	BO04	BO05	BO06	BO07	BO08	BO09	BO-H	BO-KL1	BO-KL2	BO-S
N	30	30	29	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Na	10,21	10,64	10,57	10,14	10,64	10,93	11,29	10,71	10,57	11,00	10,10	10,00	10,71
I	1,67	1,73	1,72	1,63	1,74	1,71	1,79	1,73	1,69	1,68	1,74	1,69	1,69
Privat. alely	0,50	0,29	0,14	0,36	0,57	0,43	0,21	0,29	0,29	0,50	0,00	0,143	0,429
H <sub>o</sub>	0,56	0,61	0,62	0,62	0,64	0,64	0,63	0,60	0,60	0,64	0,56	0,65	0,62
H <sub>e</sub>	0,69	0,71	0,71	0,67	0,72	0,70	0,73	0,71	0,69	0,69	0,73	0,70	0,69

N počet analyzovaných stromů u sledovaných populací

Na průměrný počet rozdílných alel u sledovaných populací ze 14 mikrosatelitových lokusů

I Shannonův informační index – zhodnocení genetické diverzity jednotlivých populací

Privat. alely – počet privátních alel

H<sub>o</sub> průměrné hodnoty pozorované heterozygotnosti pro sledované populace

H<sub>e</sub> průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti pro sledované populace

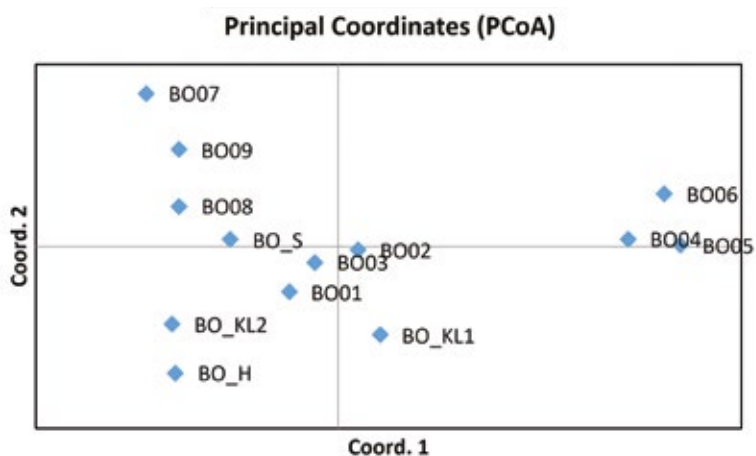
**Tab. 6:** Hodnoty ( $F_{ST}$ ) – vyjadřující vzájemné genetické diferenciace mezi populacemi

Populace	BO01	BO02	BO03	BO04	BO05	BO06	BO07	BO08	BO09	BO-H	BO-KL1	BO-KL2	BO-S
<b>BO01</b>	0,000												
<b>BO02</b>	0,008	0,000											
<b>BO03</b>	0,008	0,007	0,000										
<b>BO04</b>	0,011	0,010	0,010	0,000									
<b>BO05</b>	0,013	0,011	0,009	0,009	0,000								
<b>BO06</b>	0,013	0,011	0,009	0,009	0,009	0,000							
<b>BO07</b>	0,012	0,010	0,010	0,014	0,013	0,013	0,000						
<b>BO08</b>	0,010	0,009	0,008	0,012	0,011	0,013	0,008	0,000					
<b>BO09</b>	0,013	0,013	0,008	0,013	0,016	0,012	0,010	0,012	0,000				
<b>BO-H</b>	0,009	0,010	0,008	0,014	0,013	0,015	0,014	0,009	0,015	0,000			
<b>BO-KL1</b>	0,010	0,009	0,008	0,013	0,010	0,011	0,012	0,011	0,014	0,009	0,000		
<b>BO-KL2</b>	0,012	0,011	0,011	0,015	0,015	0,014	0,013	0,010	0,015	0,010	0,009	0,000	
<b>BO-S</b>	0,013	0,013	0,009	0,016	0,015	0,012	0,013	0,013	0,012	0,013	0,014	0,016	0,000

**Tab. 7:** Neiovy mýr vzájemných genetických vzdáleností mezi populacemi

	BO01	BO02	BO03	BO04	BO05	BO06	BO07	BO08	BO09	BO-H	BO-KL1	BO-KL2	BO-S
BO01	0,000	0,044	0,037	0,051	0,064	0,063	0,060	0,050	0,054	0,046	0,045	0,060	0,060
BO02	0,044	0,000	0,035	0,047	0,060	0,056	0,058	0,052	0,057	0,056	0,052	0,060	0,058
BO03	0,037	0,035	0,000	0,048	0,048	0,050	0,054	0,043	0,039	0,041	0,041	0,052	0,044
BO04	0,051	0,047	0,048	0,000	0,042	0,043	0,071	0,060	0,065	0,065	0,055	0,071	0,077
BO05	0,064	0,060	0,048	0,042	0,000	0,039	0,076	0,060	0,073	0,068	0,053	0,075	0,072
BO06	0,063	0,056	0,050	0,043	0,039	0,000	0,071	0,069	0,063	0,078	0,056	0,071	0,063
BO07	0,060	0,058	0,054	0,071	0,076	0,071	0,000	0,044	0,046	0,072	0,066	0,068	0,064
BO08	0,050	0,052	0,043	0,060	0,060	0,069	0,044	0,000	0,051	0,048	0,060	0,053	0,063
BO09	0,054	0,057	0,039	0,065	0,073	0,063	0,046	0,051	0,000	0,062	0,061	0,061	0,062
BO-H	0,046	0,056	0,041	0,065	0,068	0,078	0,072	0,048	0,062	0,000	0,047	0,051	0,058
BO-KL1	0,045	0,052	0,041	0,055	0,053	0,056	0,066	0,060	0,061	0,047	0,000	0,053	0,061
BO-KL2	0,060	0,060	0,052	0,071	0,075	0,071	0,068	0,053	0,061	0,051	0,053	0,000	0,069
BO-S	0,060	0,058	0,044	0,077	0,072	0,063	0,064	0,063	0,062	0,058	0,061	0,069	0,000

**Obr. 3:** Grafické znázornění genetických vzdáleností sledovaných populací





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

[www.vulhm.cz](http://www.vulhm.cz)

LESNICKÝ PRŮVODCE 4/2017