

GENETICKÁ CHARAKTERIZACE JEDLE BĚLOKORÉ POMOCÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

LESNICKÝ PRŮVODCE

Certifikované
METODIKY
PRO PRAXI



Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.
Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.

5/2016

Genetická charakterizace jedle bělokoré pomocí mikrosatelitových markerů

Certifikovaná metodika

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Strnady 2016

Lesnický průvodce 5/2016

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

www.vulhm.cz

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

http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce

Vedoucí redaktor: Ing. Jan Řezáč; e-mail: rezac@vulhm.cz

Výkonná redaktorka: Miroslava Valentová; e-mail: valentova@vulhmop.cz

Grafická úprava a zlom: Klára Šimerová; e-mail: simerova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-117-8

ISSN 0862-7657

GENETIC CHARACTERIZATION OF SILVER FIR 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 silver fir 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 silver fir were used to develop this methodology. Eight selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for finding the genetic parameters and verifying the clonal identity.

Key words: simple sequence repeats, silver fir populations, seed orchard, genetic diversity and differentiation, genetic distance, gene reserves, DNA analysis

Oponenti: Ing. Miroslav Válek
ÚHUL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové
RNDr. Slavomír Rakouský, CSc.
odborný konzultant, České Budějovice

Foto na obálce:

Jedle bělokorá (Ing. Jan Řezáč 1. 10. 2016)

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
machova@vulhm.cz

Obsah:

| | | |
|-------------|------------------------------------------------------|-----------|
| I | CÍL METODIKY | 7 |
| II | VLASTNÍ POPIS METODIKY | 7 |
| 1 | Úvod | 7 |
| 2 | Metodické postupy | 9 |
| a | Odběr vzorků a postupy izolace DNA | 9 |
| b | Postupy PCR amplifikace | 11 |
| c | Postupy elektroforézy v agarózovém gelu | 14 |
| d | Postupy fragmentační analýzy | |
| a | hodnocení PCR produktů | 15 |
| e | Zpracování molekulárních dat | 16 |
| III | SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ | 17 |
| IV | POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY | 18 |
| V | EKONOMICKÉ ASPEKTY | 20 |
| VI | DEDIKACE | 23 |
| VII | SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY | 24 |
| VIII | SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY | |
| | METODICE | 27 |
| | Summary | 28 |
| | Příloha | 31 |

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, diferenciacie a genetických vzdáleností významných populací jedle bělokoré a představit postupy ověřování příslušnosti ramet (jedinců) náležejícím k určitému ortetu (klonu) na modelovém semenném sadu jedle bělokoré.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Úvod

Jedle bělokorá (*Abies alba* Mill.) z čeledi borovicovitých (*Pinaceae*) má z ekologického pohledu velmi významnou úlohu jako stabilizující prvek v lesním ekosystému. Hlavním důvodem této schopnosti je její pevné zakotvení v půdě výrazným kulovým kořenem a hluboko sahajícími postranními kořeny. Dosahuje výšky až 60 m a stárí do 500 let. V Čechách roste ve všech okrajových i vnitrozemských pohorích, místy sestupuje do oblasti pahorkatin, ale málokdy překročí výšku nad 1 100 m n. m. (ÚRADNÍČEK et al. 2009). V nižších polohách se nachází ve společnosti buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) a ve středních a vyšších roste ve směsích se smrkem ztepilým (LIEPELT et al. 2009). V průběhu posledních dvou století jedle výrazně ustoupila, a to zejména z lesů uprostřed severní části svého areálu rozšíření, tedy i z území ČR. Ke katastrofickému poklesu došlo ve druhé polovině 20. století, a to v důsledku stresových faktorů životního prostředí a lesnické preference ostatních jehličnanů, většinou smrku ztepilého. Klesající zastoupení jedle bělokoré přineslo nejen ztráty v oblasti životního prostředí, ale i ekonomické ztráty, protože jedle je jedním z neproduktivnějších evropských lesních druhů. Spolu s bukem a smrkem patřila k nosným prvkům střeoevropského horského lesa a v porostech je oceňována její zpevňující funkce proti bořivému větru (MUSIL, HAMERNÍK 2007). V posledních letech dle Zprávy o stavu lesa a lesního hospodářství v roce 2014 (Ministerstvo zemědělství ČR 2015) jedle vykazuje setrvale mírný nárůst, což je doloženo navýšením plochy porostní půdy z 23 tis. ha v roce 2000 na 28 tis. ha v roce 2014. V současnosti lesníci usilují o dosažení optimální druhové skladby lesů. Pro návrat tohoto druhu do lesů ve větším měřítku je důležité získat podrobnější znalosti o genetické rozma-

nitosti původních populací. Pro jedli bělokorou byly prováděny genetické výzkumy s využitím terpenů, izoenzymů, mitochondriálních DNA markerů, chloroplastových a jaderných mikrosatelitů (KONNERT, BERGMANN 1995; SAGNARD et al. 2002; CREMER et al. 2006; LIEPELT et al. 2009; PIOVANI et al. 2010; GÖMÖRY et al. 2012; POSTOLACHE et al. 2014). Vývoj přirozené populace závisí na rozsahu její genetické diverzity; čím jsou populace geneticky rozmanitější, tím se lépe přizpůsobí změnám podmínek na stanovišti. 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 mění se délce specifických úseků 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 jedle bělokoré byly zvoleny jaderné mikrosatelity – nuclear simple sequence repeats (nSSR) markery. Mikrosatelitové markery jsou složeny 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. Kodominantní charakter markerů SSR umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů. Mikrosatelitové lokusy jsou amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. 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).

Účelem zde 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. Ověřené poznatky o genetické diverzitě by měly přispět k zachování biologické rozmanitosti lesních ekosystémů a prosazování zásad trvale udržitelného obhospodařování, což je jedním z prioritních úkolů státní lesnické politiky.

Vzhledem k převažující umělé obnově lesa je zajištění kvality zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin základním předpokladem pro budoucí výnos, adaptační schopnosti a ekologickou stabilitu lesa. Znalost genetické struktury je proto důležitá zejména u ohrožených populací, které byly selektovány přírodními procesy na specifických stanovištích. Prognóza dalšího vývoje populací a jejich zachování je uskutečnitelná především na základě stanovení jejich genetické diverzity.

Cílem metodických postupů ověřování deklarované identity zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů, archivů klonů a směsí klonů) je s využitím DNA markerů zajistit, aby byl reprodukční materiál od jeho získání až po dodání spotřebiteli objektivní metodou jasně identifikován. Aplikace nových kontrolních metod identity zdrojů reprodukčního materiálu by měla státní správě vytvořit předpoklady např. pro zajišťování dodržování legislativně přípustných přenosů reprodukčního materiálu nebo pro formulaci dotační politiky v oblasti podpory zachování a reprodukce genofondu lesních dřevin.

2 Metodické postupy

a Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Nejvhodnější období pro odběr rostlinného materiálu je jarní období nebo počátek léta, kdy lze odebírat pupeny nebo mladé jehlice. Starší jehlice lze také použít, ale z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů se 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 tedy při odběru označí, ukládají se do mikrotenového sáčku a udržují se při nízké teplotě (chladové tašky s namraženými destičkami) a co nejdříve se 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 DNA není provedena ihned po přijmutí vzorků je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevidování, nastříhání 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 (lyofi-

lizovaný) materiál je snadněji zpracovatelný při následném tření vzorků, odpadá nutnost držet 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 se přidává etanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. V případě výskytu sraženin v pufrách AP1 a AW1 se roztoky nahřejí. Inkubační lázeň se nechá nahřívat na 65 °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 přenesení do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrcenému vzorku se napipetuje 400 µl pufru AP1 a následně 4 ml Rnázylázy, pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se nechá inkubovat 10 minut při 65 °C, během inkubace se musí směs promíchávat 2 – 3× převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130 µl 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 lyzáát 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 µl 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 11 pro získání druhého eluátu.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

U vyzolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/μl a čistotu (na základě poměru absorbcí při 260 nm a 280 nm) přístrojem Nanophotometer (Implen). Koncentrace DNA se pohybovaly v rozmezí 10–60 ng/μl z mladých jehlic, z pupenů byly dosaženy hodnoty i nad 400 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 8 polymorfních mikrosatelitových lokusů NFH3, NFF3, NFH15, NFF7 z publikace HANSEN et al. (2005), SF b4, SF g6, SF 78, SF 1 z publikace CREMER et al. (2006), 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 8 lokusy byly sestaveny do dvou multiplexů. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo 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) |
|--------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| SF b4 | F: GCCTTTGCAACATAATTGG R: TCACAATTGTATGTGTGTGG | 147–191 |
| NFH3 | F: TTGCCATCAAATTA AAATGCTT R: CATCATTCTCTATCCCCATCA | 93–133 |
| NFF3 | F: GTCAACCAACTT F: CCAATGGGTTGTCAGAGTGTT R: GGCATTTCGAGATTGCTTGAT | 107–143 |
| SF g6 | F: GTAACAATAAAAGGAAGCTACG R: TGTGACACATTGGACACC | 96–118 |
| SF 78 | F: CATTGTTGTCTTTGTTTCACA R: TGCACCGTTTTGTTTTCC | 153–260 |
| SF 1 | F: TTGACGTGATTAACAATCCA R: AAGAACGACACCATTCTCAC | 201–222 |
| NFH15 | F: CGCCTCCCTCCACTTCTC R: TCGTCTAGAGAGGCCGAAATTCT | 82–132 |
| NFF7 | F: CCCAAACTGGAAGATTGGAC R: ATCGCCATCCATCATCAGA | 121–159 |

Protokoly PCR:

Multiplex 1 (názvy SSR lokusů, koncentrace jejich primerů a fluorescenční označení forward primerů):

SF b4 - (forward), 4 μM, 6FAM

SF b4 - (revers), 4 μM

NFH3 - (forward), 2 μM, NED

NFH3 - (revers), 2 μM

NFF3 - (forward), 1 μM, VIC

NFF3 - (revers), 1 μM

SF g6 - (forward), 1 μM, 6FAM

SF g6 - (revers), 1 μM

Primery (forward i revers) 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 směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 µl, napipetujeme ze zásobních 100 µM roztoků primerů: SF b4 F – 4 µl, SF b4 R – 4 µl, NFH3 F – 2 µl, NFH3 R – 2 µl, NFF3 F – 1 µl, NFF3 R – 1 µl, SF g6 F – 1 µl, SF g6 R – 1 µl a doplníme 84 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 H₂O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich) do 10 ml.

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, 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 ₂ | 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 ₂ 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 MgCl₂, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou)

Teplotní režim PCR

| Počet cyklů | Teplota (°C) | Čas | Popis |
|-------------|--------------|----------------|----------------------|
| 1 | 94 | 5 min | Počáteční denaturace |
| 35 | 94 | 45 sec | Denaturace |
| 35 | 58 | 30 sec | Annealing |
| 35 | 72 | 45 sec | Elongace |
| 1 | 72 | 20 min | Finální elongace |
| 1 | 4 | úložná teplota | Chlazení amplifikátů |

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

SF 78 - (forward), 1 μ M, VIC

SF 78 - (revers), 1 μ M

SF 1 - (forward), 1 μ M, NED

SF 1 - (revers), 1 μ M

NFH15 - (forward), 2 μ M, NED

NFH15 - (revers), 2 μ M

NFF7 - (forward), 0,5 μ M, 6FAM

NFF7 - (revers), 0,5 μ M

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace (100 pmol/ μ 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 μ l, napipetujeme ze zásobních 100 μ M roztoků primerů: SF 78 F – 1 μ l, SF 78 R – 1 μ l, SF 1 F – 1 μ l, SF 1 R – 1 μ l, NFH15 F – 2 μ l, NFH15 R – 2 μ l, NFF7 – 0,5 μ l, NFF7 R – 0,5 μ l a doplníme 91 μ l TE pufru).

Složení reakční směsi a teplotní režim PCR jsou stejné jako u multiplexu 1.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, sterilní mikrozkušavky (stripy, destičky PCR 0,2 ml s víčkem), box chladicí na PCR mikrozkušavky, 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 \times 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 (GelRedTMNucleic acid Gel Stain,

10,000 XInWater, 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 × 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 záporně nabitě 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 µl) 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 µl na jeden vzorek a velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ™ Size standard v 2.0, Applied Biosystem) – 0,4 µl 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 2 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 amplifikačních produktů se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems), který z výsledku měření velikostního standardu, který je přidáván ke každému vzorku, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

e Zpracování molekulárních dat

Jedle bělokora má diploidní sadu chromozomů. 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).

Na základě získaných genetických charakteristik lze u populací hodnotit a porovnávat úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, genetické diferenciace 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, když jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů.

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodické postupy získání genetických charakteristik populací jedle bělokoré vybraných na území České republiky a ověřování identity klonů v semenném sadu jedle bělokoré pomocí jaderných mikrosatelitových markerů nebyly dosud popsány. V zahraničí byla genetická proměnlivost populací jedle bělokoré na základě analýz DNA zkoumána např. pomocí chloroplastových mikrosatelitů (VENDRAMIN et al. 1999; PARDUCCI et al. 2001), nad5-4 lokusu mitochondriální DNA (GÖMÖRY et al. 2012) a jaderných mikrosatelitů (HANSEN et al. 2005; CREMER et al. 2006, 2012, POSTOLACHE et al. 2014). Do současné doby nebyly komplexní informace o genetické diverzitě významných populací nebo porostů jedle bělokoré v ČR na základě molekulárně-genetických metod, konkrétně analýz DNA s využitím mikrosatelitových lokusů zpracovány. Získané poznatky o proměnlivosti jedlových porostů vycházely 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). Pro analýzy byly vybrány jaderné mikrosatelity NFH3, NFF3, NFH15, NFF7, SF b4, SF g6, SF 78, SF 1, jejichž PCR amplifikace byly optimalizovány i za účelem seskupení jejich analýz do dvou multiplexů po 4 lokusech. Amplifikace a navazující fragmentační analýzy v multiplexech představují velkou časovou a finanční úsporu.

IV POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vypracována za účelem zjišťování genetických charakteristik především genetické diverzity, heterozygotnosti, diferenciace a genetických vzdáleností populací jedle bělokoré a dále pro ověřování příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu).

Pro vypracování a ověření metodiky byli využiti dospělí jedinci jedle bělokoré osmi významných populací, rostoucích převážně v genových základnách na území České republiky a roubovanci ze semenného sadu jedle bělokoré – LS LČR Nové Hradý (Horní Stropnice), označeného dle evidence ERMA CZ-3-3-JD-26-14-6-C.

Genetická rozmanitost populací je podstatná pro přežití jejich zástupců a přizpůsobení se změnám životních podmínek na stanovišti. Proto prognóza dalšího vývoje populací a jejich zachování je uskutečnitelná především na základě zjištění genetické struktury. Znalost úrovně genetické diverzity, diferenciace, 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. 620 ze dne 25. května 2005.

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 jsou uvedeny příklady výstupů genetických charakteristik šetřených populací jedle bělokoré. 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 při využití metody SSR. 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 otestování deklarovaného původu reprodukčního materiálu u semenného sadu pomocí 8 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 klony 117, 124 a 142 ze semenného sadu LS LČR Nové Hradky, přičemž klonovou identitu prokazují klony 124 a 142. Jedinci deklarovaní ke klonu 117 nevykazují klonovou identitu.

Tab. 2: Ukázka zpracované genotypizace

| Lokusy/ramety | SF b4 | | NFF3 | | SF g6 | | SF 78 | | NFH15 | | NFF7 | |
|-------------------|-------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|------|-----|
| JDSS_117_1 | 175 | 189 | 133 | 139 | 106 | 106 | 168 | 218 | 102 | 118 | 145 | 153 |
| JDSS_117_2 | 167 | 187 | 131 | 133 | 108 | 108 | 230 | 240 | 112 | 116 | 153 | 157 |
| JDSS_117_3 | 167 | 187 | 131 | 133 | 108 | 108 | 230 | 240 | 112 | 116 | 153 | 157 |
| JDSS_124_1 | 149 | 169 | 133 | 137 | 104 | 108 | 168 | 188 | 110 | 122 | 153 | 157 |
| JDSS_124_2 | 149 | 169 | 133 | 137 | 104 | 108 | 168 | 188 | 110 | 122 | 153 | 157 |
| JDSS_124_3 | 149 | 169 | 133 | 137 | 104 | 108 | 168 | 188 | 110 | 122 | 153 | 157 |
| JDSS_142_1 | 163 | 163 | 133 | 135 | 100 | 100 | 182 | 240 | 102 | 110 | 123 | 145 |
| JDSS_142_2 | 163 | 163 | 133 | 135 | 100 | 100 | 182 | 240 | 102 | 110 | 123 | 145 |
| JDSS_142_3 | 163 | 163 | 133 | 135 | 100 | 100 | 182 | 240 | 102 | 110 | 123 | 145 |

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 schválené usnesením vlády č. 6 ze dne 9. ledna 2013 a Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky schválené usnesením vlády ČR č. 620 ze dne 25. května 2005. Vedle celospolečenských přínosů se dá reálně předpokládat i zvýšení tržeb z těžby dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů jedlových porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu.

Jedle bělokorá je v našich podmínkách z hlediska svého hospodářského uplatnění méně rozšířený druh dřeviny, který sice zásadním způsobem neovlivňuje ekonomiku většiny lesních majetků všech forem vlastnictví, a tedy ani ekonomiku celého lesního hospodářství a navazujícího dřevozpracujícího průmyslu (celého lesnicko-dřevařského sektoru), ale z hlediska dalších aspektů lesnického hospodaření má oproti smrku ztepilému značný potenciál do budoucna v oblasti zvýšení stability, vitality a diverzity lesních porostů.

Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že v době mýtní zralosti lesních porostů bude dosaženo současně i vyšší objemové produkce (z hlediska celkové hmotové produkce předčí jedle bělokorá i smrk ztepilý). Rozdíl porostních zásob vztahených k obmýtí u jedlových porostů nacházejících se v současných genových základnách (GZ) oproti ostatním jedlovým porostům na území ČR, zjištěný na základě analýzy celostátních informací v datovém skladu, činí v objemovém vyjádření cca 184 m³/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 smrk na trhu se surovým dřívím, nebylo v případě kalkulací u jedle bělokoré 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 jedle ze zvýšeného objemu obchodovatelného dříví konstruována na základě:

- a) dlouhodobě dosahovaného procentického podílu hlavních sortimentů surového dříví v dodávkách dříví v ČR (pilařská kulatina, vláknina, 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 %, vláknina a ostatní průmyslové dříví 32 % a palivového dříví 9 %) a při ceně surového dříví za 2. čtvrtletí 2016 ve výši 1 800 Kč/m³ za pilařskou kulatinu III. tř. jakosti A/B (pozn.: vzhledem ke skutečnosti, že státní statistické zjišťování prováděné Českým statistickým úřadem nesleduje samostatně ceny surového dříví pro dřevinu jedle, byla cena 2 072 Kč/m³ smrkové pilařské kulatiny stejné jakosti na základě informací z trhu snížena o cca 300 Kč/m³), 825 Kč/m³ za dříví V. tř. jakosti pro výrobu buničiny a 789 Kč/m³ za palivové dříví, činí zvýšené tržby z prodeje dřeva u kvalitnějších jedlových porostů v GZ v době obmýetí částku 257 700 Kč/ha. Tento hrubý výnos po odpočtu celkových těžebních nákladů ve výši 77 700 Kč/ha (průměrné celostátní náklady přitom činí 423 Kč/m³) pak představuje zvýšený čistý výnos ve výši 180 000 Kč/ha. Tato částka je tvořena především značným rozdílem v objemu porostních zásob v GZ oproti celostátnímu průměru porostních zásob jedlových porostů a příznivými cenami na trhu se surovým dřívím. Vypočtený výsledný ekonomický efekt (zvýšený čistý výnos) ze smýceného lesního porostu v době obmýetí 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 vztaheným jen k těžbě mýtně zralých jehličnatých porostů, by se výsledný ekonomický efekt ještě výrazněji projevil ve vyšším hospo-

dářském výsledku (zisku) vlastníků lesa. Dále, vyšší celková objemová produkce porostů z kvalitních genetických zdrojů se neprojeví v ekonomice vlastníků lesa pouze v době obměty, 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 budoucích porostů, které by se projevily 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/m³), 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 na PCR produkt a následnou fragmentační analýzu, což představuje dle uvedených optimalizovaných postupů v jednom multiplexu analýzu současně 4 lokusů, činí 61,- Kč vč. DPH. 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. Tedy cena analýzy 8 mikrosatelitových lokusů (získaných postupy dvou multiplexů) pro jeden vzorek (strom) je 122,- Kč včetně DPH plus náklady na izolaci DNA, to je celkem 228,- Kč. 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 zahrnuje 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. RO0116 (č.j. 10462/2016-MZE-17011) z 20 % a výsledkem řešení výzkumných projektů NAZV č. QJ1230334 z 50 % a č. QJ1330240 z 30 %.

VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- 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.
- CREMER E., LIEPELT S., SEBASTIANI F., BUONAMICI A., MICHALCZYK I.M., ZIEGENHAGEN B., VENDRAMIN G.G. 2006. Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill. *Molecular Ecology Notes*, 6: 374-376.
- 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.
- GÓMEZ A., VENDRAMIN G.G., GONZÁLEZ-MARTINEZ S.C., ALIA R. 2005. Genetic diversity and differentiation of two mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Ait.) along a latitudinal cline using chloroplast microsatellite markers. *Diversity and Distributions*, 11: 257-263.
- GÖMÖRY D., PAULE L., KRAJMEROVÁ D., ROMŠÁKOVÁ I., LONGAUER R. 2012. Admixture of genetic lineages of different glacial origin: a case study of *Abies alba* Mill. in the Carpathians. *Plant Systematics and Evolution*, 298: 703-712.
- HANSEN O.K., VENDRAMIN G.G., SEBASTIANI F., EDWARDS K.J. 2005. Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus. *Molecular Ecology Notes*, 5: 125-129.
- 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.
- 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.
- KONNERT M., BERGMANN F. 1995. The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution*, 196: 19-30.
- LIEPELT S., CHEDDADI R., DE BEAULIEU J.L., FADY B., GÖMÖRY D., HUSSENDÖRFER E., KONNERT M., LITT T., LONGAUER R., TERHÜRNE-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.
- MARQUARDT P.E., EPPERSON B.K. 2004. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. Molecular Ecology, 13: 3305-3315.
- MUSIL I., HAMERNÍK J. 2007. Jehličnaté dřeviny. [Conifers.] Praha, Academia: 352.
- NAVASCUÉS M., VAXEVANIDOU Z., GONZÁLES-MARTÍNEZ S.C., CLIMENT J., GIL L., MERSON 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.
- 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.
- PARDUCCI L., SZMIDT A.E., MADAGHIELE A., ANZIDEI M., VENDRAMIN G.G. 2001. Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. Theoretical and Applied Genetics, 102: 733-740.
- PAULE L. 1992. Genetika a šľachtenie lesných drevín. Bratislava, Príroda: 304 s.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2006. GENALEX 6. genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288-295.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2012. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. Bioinformatics, 28: 2537-2539.
- PFEIFFER A.M., OLIVIERY A.M., MORGANTE M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). Genome, 40: 411-419.
- PIOVANI P., LEONARDI S., PIOTTI A., MENOZZI P. 2010. Conservation genetics of small relic populations of Silver fir (*Abies alba* Mill.) in northern Apennines. Plant Biosystem, 144: 683-691.
- 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.

- SAGNARD F., BARBEROT C., FADY B. 2002. Structure of genetic diversity in *Abies alba* Mill. from southwestern Alps: multivariate analysis of adaptive and non-adaptive traits for conservation in France. *Forest Ecology and Management*, 157: 175-189.
- SCOTTI I., PAGLIA G., MAGNI F., MORGANTE M. 2006. Population genetics (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of Forest Science*, 63: 485-491.
- 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.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. *Dřeviny České republiky*. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.
- VENDRAMIN G.G., DEGEN B., PETIT R.J., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., ZIEGENHAGEN B. 1999. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. *Molecular Ecology*, 8: 1117-1126.
- 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 Sci.* 168: 707-714.
- Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2014. Ministerstvo zemědělství ČR, 2015.

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).

GENETIC CHARACTERIZATION OF SILVER FIR USING MICROSATELLITE MARKERS

Summary

Abies alba Mill. is a coniferous species belonging to the family Pinaceae. It plays a very important ecological role as a stabilizing element in the forest ecosystem. Silver fir is a species native to the Czech Republic, where it grows in all marginal and inland mountains. Over the past two centuries, however, trees of this species have decreased in number. A catastrophic decline occurred as a consequence of environmental stress factors and silvicultural preferences for other conifers, mostly Norway spruce, in the second half of the 20th century. Diminishing silver fir brings not only environmental losses but also economic losses, because fir is one of the most productive European forestry species (MUSIL, HAMERNÍK 2007). In order to reintroduce this species in larger proportions, it is important to acquire more detailed knowledge about the dynamics of genetic diversity within and among silver fir populations.

This methodology presents the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for genetic characterization and clonal identification of *Abies alba* Mill. 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).

Microsatellite markers were used to describe genetic diversity and population differentiation among several conifer species, e.g. *Picea abies* (SCOTTI et al. 2006), *Picea asperata* (WANG et al. 2005), *Pinus brutia* and *Pinus eldarica* (BUCCI et al. 1998), *Pinus canariensis* (NAVASCUÉS et al. 2006), *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster* (GÓMEZ et al. 2005), *Pinus Strobus* (MARQUARDT et al. 2004), *Abies alba* (VENDRAMIN et al. 1999; PARDUCCI et al. 2001; HANSEN et al. 2005; CREMER et al. 2006, 2012). Nuclear microsatellites are highly polymorphic, selectively neutral and codominant markers that enable to differentiate homozygotes from heterozygotes.

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 developed by HANSEN et al. (2005) and CREMER et al. (2006). The important populations and the seed orchard of silver fir were used to develop this methodology. Clear, reproducible PCR products were produced for all eight 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 markers for the next genetic analyses of populations and for verifying the clonal identity of the silver fir.

Příloha

Příklady výstupů genetických charakteristik šetřených populací jedle bělokoré

Tab. 3: Genetické charakteristiky vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů ze 250 sledovaných vzorků jedle bělokoré

| Lokusy | Velikost PCR produktů (bp) | Na | I | H _o | H _e |
|--------|----------------------------|----|------|----------------|----------------|
| SF b4 | 147–191 | 19 | 1,87 | 0,92 | 0,79 |
| NFH3 | 93–133 | 19 | 2,07 | 0,58 | 0,83 |
| NFF3 | 107–143 | 13 | 1,57 | 0,81 | 0,76 |
| SF g6 | 96–118 | 11 | 1,33 | 0,31 | 0,65 |
| SF 78 | 153–260 | 48 | 2,63 | 0,85 | 0,90 |
| SF 1 | 201–222 | 5 | 0,72 | 0,47 | 0,45 |
| NFH15 | 82–132 | 17 | 2,03 | 0,84 | 0,83 |
| NFF7 | 121–159 | 19 | 2,03 | 0,76 | 0,82 |

Na počet rozdílných alel v lokusech všech sledovaných vzorků jedle bělokoré

I Shannonův informační index – zhodnocení genetické diverzity jednotlivých lokusů

H_o průměrné hodnoty pozorované heterozygotnosti pro jednotlivé lokusy ze všech sledovaných vzorků

H_e průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti pro jednotlivé lokusy ze všech sledovaných vzorků

Tab. 4: Počet rozdílných alel u populací jedle bělokoré v jednotlivých lokusech

| Lokusy/Populace | SF b4 | NFH3 | NFF3 | SF g6 | SF 78 | SF 1 | NFH15 | NFF7 |
|-----------------|-------|------|------|-------|-------|------|-------|------|
| JD01 | 6 | 10 | 5 | 6 | 17 | 3 | 11 | 9 |
| JD02 | 7 | 13 | 9 | 4 | 17 | 3 | 13 | 14 |
| JD03 | 11 | 13 | 9 | 6 | 25 | 3 | 12 | 14 |
| JD04 | 11 | 10 | 6 | 8 | 18 | 3 | 9 | 11 |
| JD05 | 12 | 14 | 8 | 6 | 16 | 3 | 11 | 14 |
| JD06 | 12 | 13 | 7 | 6 | 23 | 3 | 11 | 13 |
| JD07 | 11 | 9 | 6 | 4 | 19 | 3 | 12 | 11 |
| JD08 | 12 | 11 | 7 | 8 | 21 | 3 | 11 | 12 |

Tab. 5: Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro sledované populace jedle bělokoré

| Populace/Charakteristiky | JD01 | JD02 | JD03 | JD04 | JD05 | JD06 | JD07 | JD08 |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| N | 20 | 36 | 59 | 18 | 29 | 36 | 24 | 28 |
| Na | 8,38 | 10,00 | 11,63 | 9,50 | 10,50 | 11,00 | 9,38 | 10,63 |
| I | 1,63 | 1,63 | 1,74 | 1,84 | 1,84 | 1,91 | 1,81 | 1,85 |
| Privat. alely | 0,250 | 1,250 | 0,500 | 0,375 | 0,625 | 0,250 | 0,250 | 0,875 |
| H _o | 0,68 | 0,74 | 0,69 | 0,69 | 0,66 | 0,71 | 0,72 | 0,65 |
| H _e | 0,73 | 0,72 | 0,73 | 0,77 | 0,77 | 0,78 | 0,76 | 0,76 |

N počet analyzovaných stromů u sledovaných populací

Na průměrný počet rozdílných alel u sledovaných populací z 8 mikrosatelitových lokusů

I Shannonův informační index – zhodnocení genetické diverzity jednotlivých populací

Privat. alely – počet privátních alel

H_o průměrné hodnoty pozorované heterozygotnosti pro sledované populace

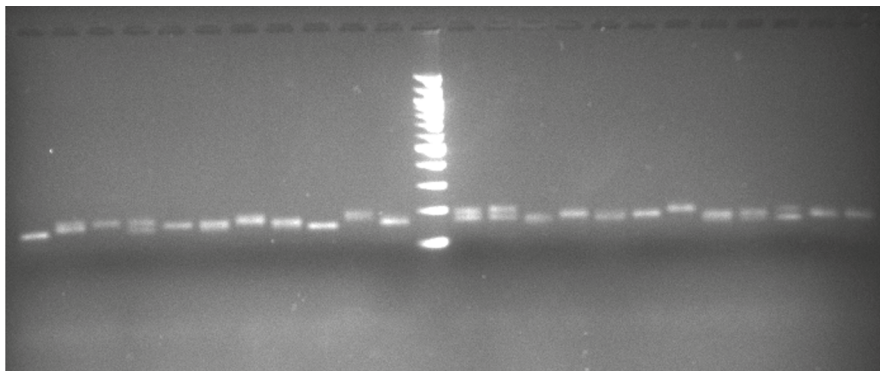
H_e průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti pro sledované populace

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

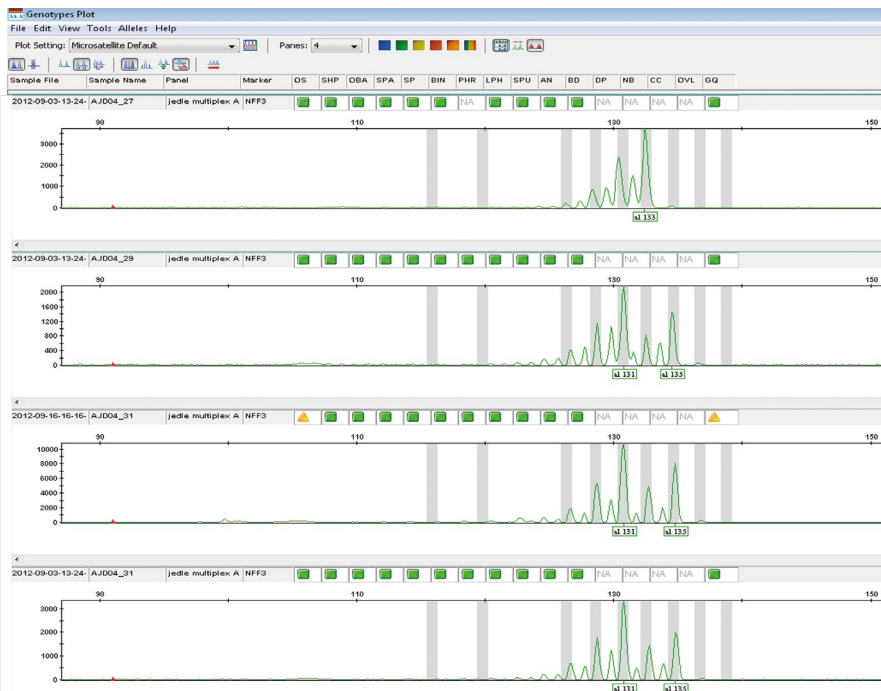
| | JD01 | JD02 | JD03 | JD04 | JD05 | JD06 | JD07 | JD08 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| JD01 | 0 | | | | | | | |
| JD02 | 0,025 | 0 | | | | | | |
| JD03 | 0,015 | 0,020 | 0 | | | | | |
| JD04 | 0,027 | 0,027 | 0,018 | 0 | | | | |
| JD05 | 0,029 | 0,018 | 0,028 | 0,023 | 0 | | | |
| JD06 | 0,019 | 0,024 | 0,016 | 0,016 | 0,019 | 0 | | |
| JD07 | 0,024 | 0,036 | 0,019 | 0,019 | 0,029 | 0,016 | 0 | |
| JD08 | 0,022 | 0,032 | 0,022 | 0,013 | 0,021 | 0,016 | 0,015 | 0 |

Tab. 7: Neiovy míry vzájemných genetických vzdáleností mezi populacemi

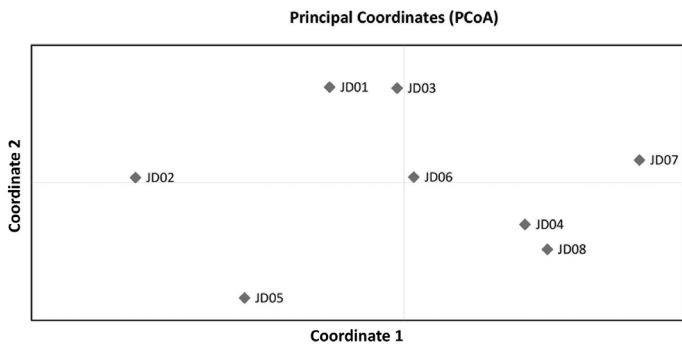
| | JD01 | JD02 | JD03 | JD04 | JD05 | JD06 | JD07 | JD08 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| JD01 | 0 | | | | | | | |
| JD02 | 0,136 | 0 | | | | | | |
| JD03 | 0,091 | 0,113 | 0 | | | | | |
| JD04 | 0,186 | 0,172 | 0,122 | 0 | | | | |
| JD05 | 0,180 | 0,112 | 0,192 | 0,171 | 0 | | | |
| JD06 | 0,127 | 0,136 | 0,099 | 0,121 | 0,133 | 0 | | |
| JD07 | 0,164 | 0,232 | 0,122 | 0,142 | 0,202 | 0,123 | 0 | |
| JD08 | 0,152 | 0,193 | 0,150 | 0,097 | 0,130 | 0,121 | 0,110 | 0 |



Obr. 1: Příklad PCR amplifikátů na gelovém nosiči získaných s primery k lokusu SF b4



Obr. 2: Příklad fragmentační analýzy (záznam z genetického analyzátoru, marker NFF3)



Obr. 3: Grafické znázornění genetických vzdáleností sledovaných populací jedle bělokoré



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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 5/2016