

# VYUŽITÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ PRO HODNOCENÍ GENETICKÉ DIVERZITY SMRKU ZTEPILÉHO



Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.

Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.

Ing. OLGA TRČKOVÁ



**6/2018**

# **Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení genetické diverzity smrku ztepilého**

**Certifikovaná metodika**

**Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.**

**Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.**

**Ing. Olga Trčková**

**Strnady 2018**

## **Lesnický průvodce 6/2018**

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 978-80-7417-174-1

ISSN 0862-7657

# USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR EVALUATING GENETIC DIVERSITY OF NORWAY SPRUCE

## *Abstract*

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for genetic characterization and clonal identification of *Picea abies* (L.) Karsten. 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. Twelve selected variable microsatellite markers were proved suitable for finding the genetic parameters of Norway spruce stands and seven high polymorphic nuclear microsatellite markers were selected for verifying the clonal identity. Knowledge based on DNA analyses regarding the variability of genetic resources will contribute to the quality of the reproduction material and the creation of optimal species composition in forests.

**Key words:** Norway spruce; microsatellites; DNA analysis; genetic diversity; genetic differentiation; clonal identification

**Oponenti:** Ing. Alžběta Pařízková, ÚHÚL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové  
RNDr. Slavomír Rakouský, CSc., odborný konzultant, České Budějovice

*Foto na obálce:*

Autorské právo: [https://cz.123rf.com/profile\\_ihervas](https://cz.123rf.com/profile_ihervas)

*Adresy autorů:*

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

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

Strnady 136

Jíloviště 252 02

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

[machova@vulhm.cz](mailto:machova@vulhm.cz)

[trckova@vulhm.cz](mailto:trckova@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>9</b>
<b>b</b>	<b>Postupy PCR amplifikace</b> .....	<b>11</b>
<b>c</b>	<b>Postupy elektroforézy v agarózovém gelu</b> .....	<b>17</b>
<b>d</b>	<b>Postupy fragmentační analýzy</b> <b>a hodnocení PCR produktů</b> .....	<b>18</b>
<b>e</b>	<b>Zpracování molekulárních dat</b> .....	<b>19</b>
<b>III</b>	<b>SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ</b> .....	<b>20</b>
<b>IV</b>	<b>POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY</b> .....	<b>21</b>
<b>V</b>	<b>EKONOMICKÉ ASPEKTY</b> .....	<b>22</b>
<b>VI</b>	<b>DEDIKACE</b> .....	<b>24</b>
<b>VII</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY</b> .....	<b>25</b>
<b>VIII</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY</b> <b>METODICE</b> .....	<b>29</b>
	<b>Summary</b> .....	<b>30</b>
	<b>Příloha</b> .....	<b>39</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 rozšířeného spektra jaderných mikrosatelitových lokusů pro zhodnocení úrovně genetické diverzity a posouzení rozdílů genetických struktur u významných porostů a populací smrku ztepilého za účelem zachování stability lesních ekosystémů. A dále představit objektivní postupy ověřování deklarované identity klonů s pomocí vysoce polymorfních mikrosatelitových markerů.

## II VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 1 Úvod

Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karsten) zařazený do čeledi *Pinacea* je z hlediska hospodářského využití nejvýznamnějším druhem jehličnaté dřeviny střední a severní Evropy. V první polovině 19. století se svým rychlým růstem a hlavně technickými přednostmi dřeva stal hlavní hospodářskou dřevinou, která ovládla náš dřevařský trh (SVOBODA 1953). V posledních desetiletích bylo lesnickým záměrem omezit smrkové porosty a dosáhnout vyvážené proporce mezi listnatými a jehličnatými dřevinami za účelem zachování druhově vyvážených zdravých lesních porostů. Vlivem dramatických klimatických změn posledních let především z nedostatku vláhy naopak začalo docházet k hromadnému napadání suchem oslabeného smrku lýkožroutem smrkovým a především na území Moravy vznikají kalamitní holiny. Smrk ztepilý je dřevina velkých rozměrů, s relativně mělkou povrchovou kořenovou soustavou, značně náročná na půdní vlhkost a vyžaduje i vyšší relativní vlhkost vzduchu. Citlivější je k vysokým teplotám a na znečištění ovzduší. Nedostatek vláhy je limitujícím faktorem jeho dobrého růstu (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Pro zachování genových zdrojů lesních porostů, musí probíhat v dostatečné míře přirozená regenerace, která souvisí s adaptačním potenciálem původních stromů (NOWAKOWSKA et al. 2014). Obecně se předpokládá, že populace vyznačující se nízkou genetickou rozmanitostí, by mohly být podstatně citlivější na změny životního prostředí, napadení chorobami a škůdci (MAGHULY et al. 2006). Genetická rozmanitost a biodiverzita populací lesních dřevin je zásadní podmínkou pro přizpůsobení se změnám klimatu (HAMPE et PETIT 2005; NEALE et al. 2011) a zajištění stability



lesních ekosystémů (WHITHAM et al. 2006; NOWAKOWSKA et al. 2014). Znalosti založené na analýze DNA, pokud jde o ověření variability genetických zdrojů, přispějí ke kvalitě reprodukčního materiálu. U smrku ztepilého bylo již provedeno mnoho genetických studií pomocí izoenzymů (GEBUREK 1999; KONNERT 2009) a analýz jaderných, mitochondriálních a chloroplastových DNA markerů (PFEIFFER et al. 1997; VENDRAMIN et al. 2000; SCHUBERT et al. 2001; BOZHKO et al. 2003; MAGHULY et al. 2008; TOLLEFSRUD et al. 2009; UNGER et al. 2011; CVJETKOVIĆ et al. 2017).

Účelem zde zpracovávaných metodických postupů bylo pro ověřování genetické rozmanitosti smrku ztepilého vybrat vhodné jaderné mikrosatelity, nuclear simple sequence repeats (nSSR) markery. Mikrosatelitové markery se široce využívají pro hodnocení genetické diverzity populací lesních dřevin. Mikrosatelity jsou složeny z mnohokrát se opakujících krátkých motivů nukleotidů zpravidla 2–4 báze dlouhých a jejich polymorfismus je dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu nukleotidů. Pro hodnocení jejich délky musíme získat milióny jejich kopií pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR probíhá s primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem a její postupy je nutné zoptimalizovat, abychom získávali jednoznačné a reprodukovatelné amplifikáty. Velikosti alel sledovaných lokusů se statisticky zpracovávají pro získání genetických charakteristik šetřených populací smrku ztepilého. Mikrosatelitové markery pro studium genetické struktury a diverzity smrkových porostů již uplatnila řada autorů (SCOTTI et al. 2000, 2006; RUNGIS et al. 2004; MELONI et al. 2007; TOLLEFSRUD et al. 2009; FLUCH et al. 2011; UNGER et al. 2011; NOWAKOWSKA et al. 2014; CVJETKOVIĆ et al. 2017; VERBYLAIĚ et al. 2017). Využití polymorfních mikrosatelitových markerů je významné i pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu například v semenných sadech, klonových archivech atd. Genetické otestování deklarovaného původu reprodukčního materiálu umožňuje objektivní kontrolou potvrdit nebo vyvrátit klonovou identitu ramet. 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 období pro odběr rostlinného materiálu je jaro nebo počátek léta, kdy lze odebírat pupeny či mladé jehlice. Starší jehlice lze také použít, ale z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharachidů se snižuje kvalita i kvantita vyzolované DNA, což může zkomplikovat průběh navazující PCR pro získání jednoznačných a reprodukovatelných amplifikovaných lokusů. Při zpracování většího počtu vzorků je lépe 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, uloží do mikroténového sáčku a udržují se při nízké teplotě (chladové tašky s namraženými destičkami) a co nejrychleji 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 přijetí vzorků je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevídaní, nastříhání na vhodnou velikost apod.) uložit minimálně do -20 °C. Další možností jak uchovat vzorky je jejich vysušení za pomoci lyofilizátoru a poté je vzduchotěsně uzavřít v nádobách (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 nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Před zahájením vlastního postupu izolace se přidá ethanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. Inkubační lázeň se nechá nahřívát na 65 °C. V případě výskytu sraženin v pufrch AP1 a AW1 se roztoky nahřejí pro odstranění těchto sraženin.

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 za použití tekutého dusíku aplikovaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách. Utřený materiál se přenesení do 1,5ml mikrocetrifugační zkumavky.
2. K rozdrčenému vzorku se napipetuje 400 µl pufru AP1 a následně 4 µl Rnázylu, pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se ne-

chá inkubovat 10 minut při 65 °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 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 otáček za minutu (rpm).
5. Přefiltrovaná frakce se přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky s odečtením získaného objemu. 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 protékající 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, chladič blok na mikrozku-  
mavky (- 20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, sada pipet a příslušné (sterilní)  
špičky, sterilní mikrozkuhavky 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). Koncen-  
trance DNA se pohybovaly v rozmezí 10–50 ng/μl z mladých jehlic, z pupenů dosa-  
hovaly hodnot 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 (pro-  
teinů, fenolických látek). Kvalita DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR  
amplifikátů. Optimální hodnoty DNA koncentrace dosahují 30–50 ng/μl. Vzorky  
DNA s vyšší koncentrací je pro optimální průběh PCR vhodné naředit.

## **b Postupy PCR amplifikace**

Pro DNA analýzy byla zvolena metoda nuclear simple sequence repeats (nSSR) –  
jaderné mikrosatelity. Z testovaných mikrosatelitových markerů bylo pro získání  
genetických charakteristik vybráno 12 dostatečně polymorfních jaderných mikro-  
satelitových lokusů PAAC23, PAAC19 z publikace SCOTTI et al. (2000), EATC1B02  
z publikace SCOTTI et al. (2002), SpAGD<sub>1</sub>, SpAGG<sub>3</sub>, SpAGC<sub>2</sub>, SpAG<sub>2</sub> z publikace  
MELNIKOVA et al. (2012), WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.  
K13 a WS0023.B03 z publikace RUNGIS et al. (2004), viz Tab. 1. Kromě markeru  
EATC1B02 s třínukleotidovou repeticí mají ostatní markery charakter dvounukleo-  
tidových motivů. Markery PAAC23, PAAC19, EATC1B02, WS00716.F13, WS0022.  
B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03 byly odvozeny z kódující oblasti  
jaderného genomu (expressed sequence tags – simple sequence repeats). Pro zís-  
kání amplifikačních produktů těchto lokusů byly optimalizovány reakční směsi  
a teplotní cykly polymerázové řetězové reakce (PCR) a vypracovány protokoly.  
PCR s vybranými 12 markery byly sestaveny do čtyř multiplexů. Reakční směsi je  
nutné připravovat na ledu nebo chladové destičce, DNA polymerázu dáváme do  
směsi nakonec přímo z mrazicího boxu.

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

Lokusy	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
PAAC23	F: TGTGGCCCCACTTACTAATATCAG R: CGGGCATTGGTTTACAAGAGTTGC	266–314
PAAC19	F: ATGGGCTCAAGGATGAATG R: AACTCCAACGATTGATTCC	141–207
SpAGD <sub>1</sub>	F: GTCAACCAACTT F: GTCAACCAACTTGTAAGCCA R: ACTTGTTTGGCATTTC	115–172
SpAG <sub>2</sub>	F: GCTCTTCACGTGTACTTGATC R: TTCGAAGATCCTCCAAGATAC	89–121
SpAGC <sub>2</sub>	F: TACCATTCAACGCAAGGG R: GTGTATGGTTTTCTTTTCGCA	82–164
SpAGG <sub>3</sub>	F: CTCCAACATTCATGTAGC R: AGCATGTTGTCCCATATAGACC	104–148
EATC1B02	F: TGGCATGAGATTTATGTGGTT R: GTGTGCCACTCAACCTCAC	194–218
WS00716.F13	F: TCAAGTAATGGACAAACGATACA R: TTTCCAATAGAATGGTGGATTT	180–288
WS0022.B15	F: TTTGTAGGTGCTGCAGAGATG R: TGGCTTTTTATTCCAGCAAGA	166–214
WS0073.H08	F: TGCTCTCTTATTTCGGGCTTC R: AAGAACAAGGCTTCCAATG	182–216
WS00111.K13	F: GACTGAAGATGCCGATATGC R: GGCCATATCATCTCAAATAAAGAA	209–271
WS0023.B03	F: AGCAGCTGGGGTCAAAGTT R: AAAGAAAGCATGCATATGACTCAG	162–236

**Protokoly PCR:****Multiplex 1 (SSR lokusy, koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):**

PAAC19 F – 2 μM (6FAM), PAAC19 R – 2 μM

SPAGD<sub>1</sub> F – 2 μM (PET), SPAGD<sub>1</sub> R – 2 μM

PAAC23 F – 4 μM (6FAM), PAAC23 R – 4 μM

EATC1B02 F – 4 μM (PET), EATC1B02 R – 4 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). Při-

pravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100  $\mu\text{l}$  napipetujeme ze zásobního roztoku primerů PAAC19 F – 2  $\mu\text{l}$ , PAAC19 R – 2  $\mu\text{l}$ , SPAGD<sub>1</sub> F – 2  $\mu\text{l}$ , SPAGD<sub>1</sub> R – 2  $\mu\text{l}$ , PAAC23 F – 4  $\mu\text{l}$ , PAAC23 R – 4  $\mu\text{l}$ , EATC1B02 F – 4  $\mu\text{l}$ , EATC1B02 R – 4  $\mu\text{l}$  a doplníme 76  $\mu\text{l}$  TE pufru).

Příprava TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA): 10 ml roztoku připravíme z 10  $\mu\text{l}$  1M Tris – HCl a 0,2  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  na 1 vzorek

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

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 × 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
37 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	57 °C	45 sec	Annealing
4.	72 °C	45 sec	Elongace
1x			
5.	72 °C	20 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

## Multiplex 2 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):

SpAGC<sub>2</sub>F – 2 μM (VIC), SpAGC<sub>2</sub>R – 2 μM

SpAGG<sub>3</sub>F – 2 μM (6FAM), SpAGG<sub>3</sub>R – 2 μM

Provedeme naředění primerů dle příkladu multiplexu 1.

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)	0,1 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 × 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	5 min	Počáteční denaturace
35 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	58 °C	40 sec	Annealing
4.	72 °C	45 sec	Elongace
1x			
5.	72 °C	15 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

### **Multiplex 3 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):**

WS00716.F13 F – 2  $\mu$ M (VIC), WS00716.F13 R – 2  $\mu$ M

WS0022.B15 F – 2  $\mu$ M (NED), WS0022.B15 R – 2  $\mu$ M

Provedeme nařazení primerů dle příkladu multiplexu 1.

Optimalizovaný protokol v celkovém objemu 15  $\mu$ l na 1 vzorek s využitím Type-it® Microsatellite PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
H <sub>2</sub> O RNase – free	5 $\mu$ l
Qiagen Multiplex	7,5 $\mu$ l
Primers Mix	1,5 $\mu$ l
Přidat 1 $\mu$ l templátové DNA	

### Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	15 min	Počáteční denaturace
26 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	30 sec	Denaturace
3.	53 °C	90 sec	Annealing
4.	72 °C	30 sec	Elongace
1x			
5.	60 °C	30 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Uvedené chemikálie kromě primerů jsou součástí komerčního kitu Type-it® Microsatellite PCR Kit.



### **Multiplex 4 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):**

WS0073.H08 F – 2  $\mu$ M (6FAM), WS0073.H08 R – 2  $\mu$ M

WS00111.K13 F – 2  $\mu$ M (VIC), WS00111.K13 R – 2  $\mu$ M

WS0023.B03 F – 2  $\mu$ M (NED), WS0023.B03 R – 2  $\mu$ M

SPAG<sub>2</sub> F – 1  $\mu$ M (NED), SPAG<sub>2</sub> R – 1  $\mu$ M

Provedeme naředění primerů dle příkladu multiplexu 1.

Optimalizovaný protokol v celkovém objemu 15  $\mu$ l na 1 vzorek s využitím Type-it® Microsatellite PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
H <sub>2</sub> O RNase – free	5 $\mu$ l
Qiagen Multiplex	7,5 $\mu$ l
Primers Mix	1,5 $\mu$ l
Přidat 1 $\mu$ l templátové DNA	

### **Teplotní režim PCR**

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	15 min	Počáteční denaturace
26 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	30 sec	Denaturace
3.	55 °C	90 sec	Annealing
4.	72 °C	30 sec	Elongace
1x			
5.	60 °C	30 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Uvedené chemikálie kromě primerů jsou součástí komerčního kitu Type-it® Microsatellite PCR Kit.

### Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrozkuhavky (stripy, destičky PCR 0,2 ml s víčkem), box chladicí na PCR mikrozkuhavky, 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 např. GelRed (GelRed<sup>TM</sup>Nucleic acid Gel Stain, 10,000XinWater, Biotium, Hayward). GelRed se přidává do zahřátého agarózového roztoku v poměru 1 : 10 000. Po ztuhnutí gelu se přilije do vany pro elektroforézu  $0,5 \times$  TBE pufr tak, aby přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se nanáší PCR amplifikáty (15  $\mu$ l) smíchané s 4  $\mu$ l pufru (gel loading buffer, Sigma – Aldrich). Pro porovnání velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1  $\mu$ l standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4  $\mu$ l destilované vody a 2  $\mu$ l 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 elektroforézy je kolem 30 minut při napětí 60 V a dalších 120–150 minut při napětí 100 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 po 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 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 laserovým zářením. Přístroj je schopen souběžně detekovat vícebarevnou fluorescenci, to umožňuje v multiplexovém uspořádání hodnotit najednou více markerů, což je z časových i finančních důvodů velmi výhodné. Pro jejich správnou identifikaci po proběhlé analýze je nutné jejich kombinaci sestavit z hlediska velikosti jejich alel a fluorescenčního zbarvení primerů.

Dvanáct vybraných lokusů lze seskupit pro fragmentační analýzu do 2 běhů. Pro první běh se skupina skládá z PCR produktů multiplexů 1 a 3 (amplifikované lokusy PAAC19, PAAC23, SpAGD<sub>1</sub>, EATC1B02, WS00716.F13, WS0022.B15) jednotlivých rostlinných vzorků, kdy se od každého multiplexu napipetuje po 1  $\mu$ l, objem směsi formamidu a velikostního standardu se sníží na 10  $\mu$ l, aby se pro jamku zachoval celkový objem 12  $\mu$ l, a provede se popsáním způsobem denaturace. V druhém běhu probíhá zároveň fragmentační analýza PCR produktů 2. a 4. multiplexu (amplifikované lokusy WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03, SpAG<sub>2</sub>, SpAGG<sub>3</sub>, SpAGC<sub>2</sub>) a příprava probíhá stejně jako pro vzorky u prvního běhu.

Hodnocení velikosti amplifikačních produktů 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.

## Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

## **e Zpracování molekulárních dat**

Smrk ztepilý má diploidní sadu chromozomů. U sledovaného lokusu získáme pro každého jedince dvě shodné alely 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 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CER-VUS (KALINOWSKI et al. 2007), GENEPOP 4.2 (RAYMOND, ROUSSET 1995; ROUSSET 2008), STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009). Pro kontrolu velikostí odečtených hodnot mikrosatelitových lokusů včetně ohodnocení frekvence nulových alel lze použít 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 diferenciace mezi populacemi, očekávané a pozorované heterozygotnosti, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, odvození populačních struktur 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. Výsledkem je zpracovaná genotypizace – přehled hodnot alel zvolených lokusů pro šetřené klony. Příslušnost jedince ke klonu je deklarovaná, když jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů. V případě použití vysoce polymorfních markerů lze počet sledovaných markerů snížit a tím snížit i náklady na analýzy. Někteří autoři (např. SCHUELER et al. 2003; LACIS et al. 2009, 2011) uvádějí ve svých pracech využití jen tří až sedmi vysoce polymorfních markerů. V případě zde uvedených markerů pro smrk ztepilý je dostačující pro identifikaci totožných jedinců vybrat 7 vysoce polymorfních SSR markerů (PAAC19, SpAGD<sub>1</sub>, SpAGC<sub>2</sub>, SpAGG<sub>3</sub>, WS00716.F13, WS00111.K13, WS0023.B03).

### III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost postupů pro ověřování úrovně genetické diverzity vybraných porostů nebo populací smrku ztepilého se nachází ve využití širšího spektra odzkoušených polymorfních jaderných mikrosatelitových markerů (PAAC23, PAAC19, EATC1B02, SpAGD<sub>1</sub>, SpAGG<sub>3</sub>, SpAGC<sub>2</sub>, SpAG<sub>2</sub>, WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03) a v případě identifikace deklarovaných klonů ve využití vybraných 7 lokusů (PAAC19, SpAGD<sub>1</sub>, SpAGC<sub>2</sub>, SpAGG<sub>3</sub>, WS00716.F13, WS00111.K13, WS0023.B03) s vysokou mírou polymorfismu pro snížení nákladů analýz. Uvedené metodické postupy pro ověřování klonové identity (genetické totožnosti) roubovanců ve stávajících semenných sadech by měly být také využity při naplňování dotačního titulu pro nově uznávané semenné sady. Výstupem analýz je zpracovaná multilokusová genotypizace, což představuje databázi velikostí alel hodnocených lokusů k příslušným klonům. Objektivní genetické hodnocení spočívá v přímé analýze DNA jedinců s využitím polymorfních jaderných mikrosatelitových lokusů, jejichž velikosti jsou s přesností jednotek bází zaznamenávány na genetickém analyzátoru Applied Biosystems. Metodika byla vyvíjena na vybraných porostech genové základny GZ 102 Trčkov – Šerlišský kotel – Vrchmezí a byly k nim přidány i autochtonní smrkové porosty Z CHKO Jeseníky a porost původem z Krušných hor. I když se jedná o porosty pouze z území ČR s vysokou mírou toku genů, při výběru 12 vysoce polymorfních lokusů byly zjištěny genetické rozdíly ve strukturování sledovaných porostů na základě analýzy Structure. Genetické hodnocení bylo provedeno zpočátku s 15 mikrosatelitovými markery a 3 jsme z důvodu nižších hodnot polymorfismu z hodnocení u těchto porostů vyloučili (WS0092A.19, EATC1E03, EATC1G02). Osm zařazených markerů (PAAC23, PAAC19, EATC1B02, WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03) bylo vyvinuto z oblasti kódujících sekvencí DNA (expressed sequence tags - EST), což je pro populační genetiku lesních dřevin přínosné i z hlediska získávání poznatků o variabilitě realizovaných vlastností, které mohou např. souviset s informacemi o proměnlivosti adaptivních znaků (SCOTTI et al. 2000). Pro získání jednoznačných a reprodukovatelných velikostí amplifikovaných lokusů byly optimalizovány postupy polymerázové řetězové reakce (PCR) a optimalizace probíhaly i z hlediska seskupení analyzovaných lokusů do multiplexů, což představuje ekonomické i časové úspory při zpracování velkého počtu vzorků. Amplifikace vybraných 12 lokusů byly sestaveny do čtyř multiplexů a fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru do dvou běhů.

## IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika byla optimalizována za účelem získání genetických parametrů pro ověřování úrovně genetické diverzity u smrkových porostů a pro ověřování deklarované identity klonů.

Znalosti o genetické struktuře porostů představují zásadní informaci pro opatření směřující k zachování biodiverzity lesních ekosystémů. Na základě stanovení úrovně genetické diverzity lze předpovědět další vývoj populací. Získané poznatky o úrovni genetické diverzity, diferenciaci, heterozygotnosti a dalších genetických charakteristik u zdrojových porostů reprodukčního materiálu jsou také velmi důležité z hlediska převažující umělé obnovy lesa. Informace o genetických charakteristikách porostů mohou být využity jako podklady pro rozhodovací řízení, strategické plánování a legislativní činnost státní správy v oblasti ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a nakládání s reprodukčním materiálem.

Další možné využití získaných poznatků při aplikaci předkládané metodiky je při vyhlásování nebo revizi genových základů a dále 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) je možné zařadit jako cenné zdroje. Poznatky o diverzitě populací také napomáhají plnit cíle Státní politiky životního prostředí a mezinárodní závazky ČR při ochraně biologické rozmanitosti. Další významné uplatnění metodiky na základě polymorfních mikrosatelitových markerů je pro ověřování klonové identity například v semenných sadech, klonových archivech atd. Genetické otestování deklarovaného původu reprodukčního materiálu umožňuje objektivní kontrolou potvrdit nebo vyvrátit klonovou identitu ramet. Metodické postupy ověřování identity klonů/ortetů pro semenné sady (popř. klonové archivy) budou sloužit pro potřeby státní správy a koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin (ÚHÚL) pro aplikaci nových kontrolních metod a dotační politiky ČR.

Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat. Byly zvoleny mikrosatelitové markery s vysokou mírou polymorfismu, které byly odzkoušeny u autochtonních porostů z Orlických hor, Jeseníků a Krušných hor. V příloze jsou uvedeny příklady výstupů genetických charakteristik ukazující na genetické rozdíly šetřených porostů smrku ztepilého. Možnosti uplatnění těchto postupů v dalších laboratořích může komplikovat finanční náročnost přístrojového vybavení pro fragmentační analýzy, zejména genetického analyzátoru. Fragmentační

tační analýzy si však lze objednat na zakázku u komerčních firem (např. SEQme, Genomac, Amplicon).

## 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 zachování 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. 193 ze dne 9. března 2016. Vedle celospolečenských přínosů se dá předpokládat i zvýšení tržeb z těžby dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů smrkových porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu.

Smrk ztepilý je v našich podmínkách z hlediska jeho hospodářského uplatnění nejvíce rozšířený druh dřeviny, který zásadním způsobem ovlivňuje ekonomiku většiny 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 bude v době mýtní zralosti lesních porostů dosaženo současně i vyšší objemové produkce. Při rozdílu porostních zásob vztahených k obmytí u kvalitnějších smrkových porostů nacházejících se v současných genových základnách (GZ) oproti ostatním smrkovým porostům na území ČR v objemu 81,04 m<sup>3</sup>/ha a při průměrné ceně surového dříví za rok 2014 ve výši 1 180 Kč/m<sup>3</sup> činí zvýšené tržby z prodeje dřeva u kvalitnějších smrkových porostů (v GZ) částku 95 627 Kč/ha. Kalkulace byla provedena na základě těchto informačních zdrojů:

Analýza datového skladu ÚHÚL – DS ERMA (Pařízková, Hradec Králové, 2014)

Průměrná relativní bonita dřevin v ČR (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství 1995, str. 96)

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 2015 k výpočtu poplatku za odnětí lesních pozemků surového dříví (Věstník MZe, částka 2, str. 73, prosinec 2014)

Vzhledem ke skutečnosti, že průměrná cena surového dříví v ČR, která je každoročně zveřejňována ve Věstníku MZe, v roce 2014 činila 1 180 Kč/m<sup>3</sup> a reprezentuje cenu dřeva na pni, tj. cenu surového dříví na odvozním místě po odečtení těžebních nákladů, je možné tento ekonomický efekt současně označit za zvýšený čistý výnos získaný ze smýceného lesního porostu v době obmýtí, který se projeví i ve zvýšeném hospodářském výsledku (zisku) vlastníků lesa.

Ve skutečnosti lze očekávat ekonomický přínos pro vlastníka lesa ještě vyšší, pokud porovnáme obě hodnoty mýtní výtěžky v obmýtí (v GZ oproti ostatním smrkovým porostům) vypočtené na základě obvykle dosahovaného procentického podílu jednotlivých sortimentů surového dříví a jejich cen (především pilařských výřezů) a obvyklých těžebních nákladů v místě a čase.

Vyšší celková objemová produkce porostů z kvalitních genetických zdrojů se však neprojeví v ekonomice vlastníků lesa pouze v době obmýtí, ale již také v rámci výchovných opatření v podobě zvýšených příjmů z provedených probírek (z předmýtních těžeb), což rovněž pozitivně ovlivní ekonomickou situaci vlastníků lesa a přispěje k podpoře ekonomického pilíře trvale udržitelného hospodaření v lese.

Vzhledem k současné kalamitní situaci u smrkových porostů je zhodnocení ekonomického přínosu vztaženo k období předcházejících hospodářských výsledků.

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 109 Kč. Náklady u jednoho vzorku (stromu) na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 12 lokusů 155 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 perso-



nální) 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 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 výzkumného projektu NAZV č. QJ1530294 (Modelový postup molekulárně genetické charakterizace genové základny jako podklad pro účely rozhodování státní správy v oblasti zachování a reprodukce genetických zdrojů).

## VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- BOZHKO M., RIEGEL R., SCHUBERT R., MÜLLER-STARCK G. 2003. A cyclophilin gene marker confirming geographical differentiation of Norway spruce populations and indicating viability response on excess soil-born salinity. *Molecular Ecology*, 12: 3147–3155.
- CVJETKOVIĆ B., KONNERT M., FUSSI B., MATARUGA M., ŠIJAČIĆ-NIKOLIĆ M., DANIČIĆ V., LUČIĆ A. 2017. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) variability in progeny tests in Bosnia and Herzegovina. *Genetika*, 49: 259–272.
- FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164 (4): 1567–1587.
- FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology*, 7 (4): 574–578.
- GEBUREK T. 1999. Genetic variation of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in Austria. III. Macrospatial allozyme patterns of high elevation populations. *Forest Genetics*, 6: 201–211.
- HAMPE A., PETIT R.J. 2005. Conserving biodiversity under climate change: The rear edge matters. *Ecology Letters*, 8: 461–467.
- HUBISZ M.J., FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9 (5): 1322–1332.
- 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. 2009. Genetic variation of *Picea abies* in southern Germany as determined using isozyme and STS markers. *Dendrobiology*, 61: 131–136.
- LACIS G., RASHAL I., RUISA S., TRAJKOVSKI V., IEZZONI A.F. 2009. Assessment of genetic diversity of Latvian and Swedish sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources collection by using SSR (microsatellite) markers. *Scientia Horticulturae*, 121: 451–457.

- LACIS G., RASHAL I., TRAJKOVSKI V. 2011. Implementation of a limited set of SSR markers for screening of genetic variability in Latvian and Swedish sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genetic resources collections. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, 65 (1/2) (672/673): 21–28. DOI: 10.2478/v100046-011-0014-4
- MAGHULY F., PINSKER W., PRAZNIK W., FLUCH S. 2006. Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. Forest Ecology and Management, 222: 266–271.
- MAGHULY F., BURG K., PINSKER W., NITTINGER F., PRAZNIK W., FLUCH S. 2008. Short Note: Development of mitochondrial markers for population genetics of Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. Silvae Genetica, 57: 41–44.
- 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.
- MELONI M., PERINI D., BINELLI G. 2007. The distribution of genetic variation in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in the western Alps. Journal of Biogeography, 34: 929–938.
- NEALE D.B., KREMER A. 2011. Forest tree genomics: Growing resources and applications. Nature Reviews Genetics, 12: 111–122.
- 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. Leśne Prace Badawcze, 75 (1): 47–54.
- 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.

- PRITCHARD J.K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2): 945–959.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248–249.
- 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.
- SCOTTI I., MAGNI F., FINK R., POWELL W., BINELLI G., HEDLEY P.E. 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*, 43: 41–46.
- SCOTTI I., MAGNI F., PAGLIA G. P., MORGANTE M. 2002. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 40–50.
- 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.
- SCHUBERT R., MUELLER-STARCK G., RIEGEL R. 2001. Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulation genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1223–1231.
- SCHUELER S., TUSCH A., SCHUSTER M., ZIEGENHAGEN B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46: 95–102.
- TOLLEFSRUD M.M., SØNSTEBØ J.H., BROCHMANN C., JOHNSEN Ø., SKROPPA T., VENDRAMIN G.G. 2009. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. *Heredity*, 102: 549–562.
- SVOBODA P. 1953. Lesní dřeviny a jejich porosty. Část I. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- UNGER G. M., KONRAD H., GEBUREK T. 2011. Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria. *Plant Systematics and Evolution*, 292: 133–141.

- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.
- VAN OOSTERHOUT C., HUTCHINSON W.F., WILLS D.P.M., SHIPLEY P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.
- VENDRAMIN G.G., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., SPERISEN C., BUCCI G. 2000. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 43: 68–78.
- VERBYLAITĖ R., PLIŪRA A., LYGIS V., SUCHOCKAS V., JANKAUSKIENĖ J., LABOKAS J. 2017. Genetic diversity and its spatial distribution in self-regenerating Norway spruce and Scots pine stands. *Forests*, 8: 470; doi:10.3390/f8120470.
- WHITHAM T.G., BAILEY J.K., SCHWEITZER J.A., SHUSTER S.M., BANGERT R.K., LEROY C.J., LONSDORF E.V., ALLAN G.J., DiFAZIO S.P., POTTS B.M. et al. 2006. A framework for community and ecosystem genetics from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics*, 7: 510–523.

## 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.
- 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.
- 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.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. Lesnický průvodce, 2015, 8: 36 s.
- MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O., CVRČKOVÁ H. Use of Nuclear Microsatellite Loci for Evaluating Genetic Diversity of Selected Populations of *Picea abies* (L.) Karsten in the Czech Republic. Forests, 9, 2018: 92; doi:10.3390/f9020092.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O. Genetická variabilita vybraných porostů smrku ztepilého z Jeseníků, Orlických a Krušných hor. Zprávy lesnického výzkumu. Zprávy lesnického výzkumu, 63, 2018 (4): in press.

# USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR EVALUATING GENETIC DIVERSITY OF NORWAY SPRUCE

## *Summary*

Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten) is a coniferous species belonging to the family Pinaceae, which is the most economically important tree species in Central and Northern Europe. This species is very demanding of soil moisture and requires higher relative humidity. Today's significant reduction in the occurrence of spruce in some localities is due to the natural increase in drought caused by climate change and by infestation with eight-toothed spruce bark beetle. It is widely assumed that populations characterized by narrow genetic diversity could be more sensitive to environmental changes or diseases, thereby leading to a decrease in productivity. Therefore, it is essential to determine the genetic variability in economically and ecologically valuable stands and populations. This methodology presents the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for genetic characterization and clonal identification of *Picea abies* (L.) Karsten. Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSR) are small repetitive DNA sequences that are highly variable markers and commonly used in population genetic. The selected fourteen Norway spruce stands (from Jeseníky, Orlické hory, Krušné hory) were used to develop this methodology.

This methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of polymerase chain reaction (PCR), separation, 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. Twelve variable microsatellite markers PAAC23, PAAC19 (SCOTTI et al. 2000), EATC1B02 (SCOTTI et al. 2002), SpAGD<sub>1</sub>, SpAGG<sub>3</sub>, SpAGC<sub>2</sub>, SpAG<sub>2</sub> (MELNIKOVA et al. 2012), WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03 (RUNGIS et al. 2004) were selected for DNA analyzes. PCR products were separated by capillary electrophoresis using the Applied Biosystems 3500 genetic analyser. 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 Norway spruce.

Acquiring new knowledge on the genetic structure of coniferous species populations, especially in relation to valuable ecotypes of Norway spruce, is very important in

order to maintain the ecological stability of forests and to optimize the timber production. The developed procedures of genetic monitoring with DNA markers will be used in the amendment of forestry legislation and in the state subsidy policy in the area of protection and reproduction of forest tree gene resources. Knowledge based on DNA analyses regarding the variability of genetic resources will contribute to the quality of the reproduction material and the creation of species composition in forests.





# Příloha

## Příklady výstupů genetických analýz šetřených porostů smrku ztepilého

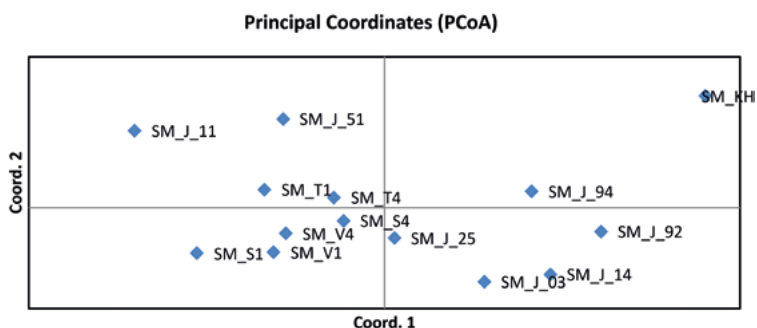


**Obr. 1:** Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru (záznam velikostí alel)

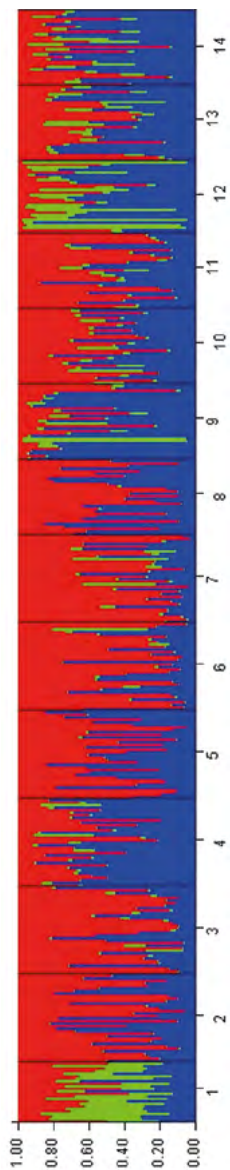
**Tab. 2:** Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro sledované porosty smrku ztepilého

Porosty	N	Na	Ne	I	Priv. alely	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F
SM KH	24	13,17	8,67	2,23	0,67	0,81	0,85	0,031
SM S1	35	14,75	9,10	2,27	0,33	0,77	0,85	0,077
SM S4	35	15,25	9,48	2,29	0,25	0,76	0,85	0,087
SM T1	35	15,92	9,82	2,36	0,42	0,75	0,86	0,107
SM T4	35	15,75	9,51	2,28	0,33	0,75	0,84	0,085
SM V1	35	13,67	8,69	2,21	0,25	0,74	0,84	0,101
SM V4	35	14,67	8,60	2,25	0,33	0,77	0,85	0,072
SM J03	30	14,08	9,23	2,25	0	0,70	0,85	0,170
SM J11	30	13,92	8,25	2,21	0,33	0,73	0,84	0,093
SM J14	30	12,92	8,80	2,16	0,08	0,65	0,82	0,195
SM J25	30	14,33	8,59	2,24	0,08	0,71	0,84	0,134
SM J51	29	12,25	7,68	2,11	0	0,67	0,83	0,164
SM J92	30	13,50	8,57	2,16	0,17	0,68	0,81	0,141
SM J94	30	13,42	8,19	2,19	0,17	0,66	0,83	0,190
Průměr/Mean	31,6	14,11	8,80	2,23	0,24	0,73	0,84	0,118

N: počet vzorků, Na: počet různých alel, Ne: počet efektivních alel, I: Shannonův informační index, Priv. alely: počet privátních alel, H<sub>o</sub>: heterozygotnost pozorovaná, H<sub>e</sub>: heterozygotnost očekávaná, F: fixační index



**Obr. 2:** Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA)



**Obr. 3:** Zhodnocení genetické struktury Bayesianou metodou pro  $K = 3$  u sledovaných porostů (1 – SM KH, 2 – SM S1, 3 – SM S4, 4 – SM T1, 5 – SM T4, 6 – SM V1, 7 – SM V4, 8 – SM J03, 9 – SM J11, 10 – SM J14, 11 – SM J25, 12 – SM J51, 13 – SM J92, 14 – SM J94)



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

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

LESNICKÝ PRŮVODCE 6/2018